

慢病毒生产及使用操作手册

一、实验流程

制备慢病毒穿梭质粒及其辅助包装原件载体质粒，三种质粒载体分别进行高纯度无内毒素抽提，共转染 293T 细胞，转染后 6 h 更换为完全培养基，培养 48 和 72h 后，分别收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液，病毒上清液通过超离心浓缩病毒。

二、实验材料

（一）慢病毒载体、包装细胞和菌株

该病毒包装系统为三质粒系统，组成为 pspax2, pMD2G, pHBLV™ 系列质粒。

1、载体信息（见附录）

2、细胞株 293T，慢病毒的包装细胞，为贴壁依赖型成上皮样细胞，生长培养基为 DMEM(含 10% FBS)。贴壁细胞经培养生长增殖形成单层细胞。

3、菌株 大肠杆菌菌株 DH5 α 。用于扩增慢病毒载体和辅助包装载体质粒。

三、包装细胞 293T 细胞的培养

（一）293T 细胞的冻存

随着传代的次数增加，293T 细胞会出现生长状态下降、突变等。为了防止此类现象的出现，我们需要在开始就对细胞进行大量冻存，以保证实验的稳定性和持续性。在细胞对数生长期进行冻存，增加细胞复苏成活率。

1、去掉上清液，加入 PBS 洗去残留的培养基；

2、加入 0.25%的胰酶，消化 1-2min 后，镜下观察细胞变圆，细胞间间隙加大时，去除胰酶，加入新鲜培养基吹打混匀，移入离心管中。

3、细胞计数，将细胞全部晃下，加入 3mL 37 °C 预热的 10% DMEM，用 10mL 移液管进行吹打，较大力吹打 6~8 次即可，不留死角，之后，将所有细胞吸出，置于 15mL 离心管中，取 50uL 混匀后的细胞于 1.5mL eppendorf 管中，加入 450uL 10% DMEM，即为 10 倍稀释，混匀，取 10uL 细胞于计数板中计数。计数板上共 4 大格，每大格 16 小格。计数时，4 大格均计数，总数除以 4（得每大格细胞数），再乘以 10（10 倍稀释），即为实

实际 n 万/mL 细胞浓度。

4、细胞离心，1000rpm，5min。去掉上清。

5、根据细胞计数结果加入细胞冻存液（70%完全培养基+20%FBS+10%DMSO），重悬细胞，密度为 3×10^6 个/ml。

6、分装进细胞冻存管，放入冻存盒中，放入 -80°C 超低温冰箱。

7、第二天将细胞放于液氮罐中长久保存，并作记录。保存过程中，要不时复苏细胞检测细胞存活率，观察细胞状态等。

（二）293T 细胞的传代

当细胞生长到汇合率达到 80%~90%时需要将细胞进行传代操作，以扩大细胞数量，维持细胞良好的生长状态。

1、消化细胞，方法同细胞冻存。

2、细胞离心结束后，加入完全培养基重悬。

3、根据具体情况，将细胞分到 10cm 培养皿中，每个培养皿补足到 10ml 培养基。

4、将培养皿平稳放回 37°C 、5% CO_2 和 95%相对湿度的培养箱中培养。

（三）293T 细胞的复苏

当细胞传代次数过多，细胞状态变差时，或者细胞出现污染事故时，需要丢弃并对最初冻存的细胞进行复苏。

1、设置温度为 $37\sim 42^{\circ}\text{C}$ 的水浴。

2、查看细胞库记录，根据记录从液氮罐中取出冻存的细胞（需戴上棉手套，防止被冻伤），迅速丢入水浴锅中并快速晃动，尽量在 1~2min 内使细胞溶液完全溶解。

3、将细胞溶液转移到 15ml 离心管中，并在其中加上 1ml 新鲜的完全培养基，混匀后离心，1000rpm，5min。

4、去掉上清，加入 5ml 新鲜的完全培养基，混匀沉淀后，转入 6cm 培养皿。

5、将培养皿平稳放入 37°C 、5% CO_2 和 95%相对湿度的培养箱中培养。

6、第二天观察细胞存活率。给细胞换一下培养基。以后每天观察细胞生长情况。

四、慢病毒包装和浓缩

(一) 质粒扩增

构建好的慢病毒载体和辅助质粒需经过大量抽提，浓度大于 1ug/u1, A260/280 在 1.7-1.8 间方可用以包毒。推荐使用 Qiagen 大抽试剂盒进行质粒的大量去内毒素抽提。

(二) 传 293T 细胞

将培养 293T 细胞 T75 瓶中的培养基吸净，加入 2mL 4 度冰箱取出的 0.25%胰酶，使其均匀覆盖瓶底，置于 37 度培养箱中 3-5min，取出，摇晃可发现细胞于底部脱离，将其全部晃下，加入 3mL 37 度水浴中预热的 10% DMEM，移液枪用 10mL 移液管进行吹打，较大力吹打 6-8 次即可，不留死角，瓶口处较难吹打可将移液管对准培口，小力将培养基打出即可覆盖到接近瓶口的细胞。之后，将所有细胞吸出，置于 15mL 离心管中，取 50ul 混匀后的细胞于 1.5mL eppendorf 管中，加入 450ul 10% DMEM，即为 10 倍稀释，混匀，取 10ul 细胞于计数板中计数。计数板上共 4 大格，每大格 16 小格。计数时，4 大格均计数，总数除以 4（得每大格细胞数），再乘以 10（10 倍稀释），即为实际 n 万/mL 细胞浓度。传代当天记为第一天，若第二天进行转染，铺 900-1000 万/T75；若第三天转染，铺 350-400 万/T75。每瓶 T75 加 10mL 10%DMEM 培养基。转染当天观察细胞密度，80-90%满即可进行转染。转染前无需换培养基。

(三) 做脂转 complex

DMEM 需在 37 度水浴中预热，LipoFiter™ 转染试剂需恢复至室温方可使用，使用前需摇匀。

转染每瓶 T75 的 complex 成分如下：

pspax	10 μ g
PMD2G	10 μ g
pHBLV™ 系列载体	10 μ g

转染后 6h 换新鲜培养液。

注：LipoFiter™ 转染试剂为汉恒生物产品，使用说明参考 LipoFiter™ 说明书。

（四）病毒收集

转染后 48 和 72h 分别两次收集病毒上清 (24h 收集后置换新鲜培养液), 收集后以 0.45 μm 滤器过滤, 于 40 mL 超速离心管中, 4℃, 72000g/min 离心 120 分钟;

（五）病毒重悬和保存

500ul 新鲜培养液重悬病毒沉淀, 置于-80 度甚至液氮保存。

五、感染目的细胞

（一）细胞准备

将状态良好的目的细胞接种到 24 孔板, 使细胞浓度为 1×10^5 /ml 细胞, 接种细胞数量因细胞的生长速度而略有不同, 一般是保证第二天进行病毒感染的时候细胞汇合率介于 50% 至 70% 直接。

（二）病毒感染

1. polybrene 的选择:

Polybrene: 是带正电的小分子, 与细胞表面的阴离子结合, 提高慢病毒对细胞的感染效率, 通常加入 polybrene 能提高感染效率 2~10 倍。

Polybrene 有一定的细胞毒性, 有的细胞对 polybrene 的毒理反应明显, 因此细胞感染时是否适合 polybrene 需要摸索; 不同细胞对 polybrene 的敏感度不同, 可以用 1~10 μg/ml 的范围筛选合适的浓度, 以 24h 内细胞无明显毒性反应为佳, 可参考文献并进行预实验摸索, polybrene 最常用的工作浓度为 6~8 μg/ml。

注: 1) 汉恒生物的自产的 Polybrene 产品, 用户可用以进行辅助感染。提供的 Polybrene 母液保存在-20℃ (可保存 1 年以上), 避免反复冻融 3 次以上, 否则活性受影响。4℃可保存 2 周。

2) Polybrene 预实验请先以对照病毒进行摸索, 部分细胞系 MOI 及 Polybrene 的使用参见附表 2。

2. 感染细胞最佳 MOI 的测定

MOI (Multiplicity of Infection, 感染复数) 是指每个细胞感染的病毒数, 通常 MOI

越高，病毒整合到染色体的数量以及目的蛋白的表达量越高。
 对于分裂活跃的细胞，比如 HeLa、293 细胞，MOI=1~3 时，80%以上的细胞均表达目的基因。而对于非分裂细胞，比如原代细胞，感染效率较低。需要进行 MOI 梯度摸索实验，选择适合的 MOI 进行实验。

3. 感染步骤

按实验需要将细胞铺板（比如 12 孔板）。细胞数以第 2 天密度约 50%为宜。37℃ 培养过夜。

对于 Polybrene 可施加的细胞：准备完全培养基和 Polybrene 混合物，Polybrene 终浓度为摸索得到的最适终浓度。移去培养基并添加 0.5 ml Polybrene/培养基混合物于每孔中（适用于 24 孔板，其他孔板请相应调整体积。）

对于不适用 Polybrene 的细胞，以上步骤省略，直接进入下面步骤。

感染前，从冰箱取出并在 37℃ 水浴中快速融化病毒，吸去细胞原有培养基，加入 1/2 体积新鲜培养基，再将病毒原液加入细胞中，轻轻 8 字混匀。（具体加入的病毒数可参考附表 1）37℃ 小体积感染 4 小时，4 小时后补齐培养基至正常体积。（感染时培养基体积表格如下）

病毒小培养体积感染表			
培养皿类型	表面积/cm ²	对应细胞培养液体积	病毒感染对应细胞培养液体积
96-well	0.3cm ²	100ul	50ul
24-well	2cm ²	500ul	250ul
12-well	4cm ²	1ml	500ul
6-well	10cm ²	2ml	1ml

60mm	20cm ²	4ml	2ml
100mm	60cm ²	10ml	5ml
慢病毒感染 4 小时后补足至培养体积，感染 24 小时后换液，腺病毒感染 2 小时后直接换液			

感染后第二天（约 24 小时），吸去含病毒的培养液，换上新鲜的完全培养液，继续 37℃ 培养。

感染后 48 小时，对于带 GFP 报告基因的病毒，可通过荧光显微镜观测 GFP 表达效率，对于携带 Puromycin 抗性基因的病毒，换上含适当浓度的 Puromycin 的新鲜完全培养液，筛选稳定转导的细胞株（详见下方）。

注意：溶化的 shRNA 慢病毒颗粒置于冰上。反复冻溶或长时间将病毒颗粒暴露于常温可使病毒效价降低。

4. Puromycin 抗性筛选：

Puromycin 标准的施加终浓度范围为 1~10 μg/ml，不同细胞 puromycin 的工作浓度不同，请查找相关文献（部分细胞参考用量见下图），另外请设不感染筛选对照（未经过病毒感染的野生型细胞），加入等量等浓度的 puromycin。

部分细胞 puromycin 参考值

Cell line	Species	Puromycin (μg/ml)
293	Human	3
HeLa	Human	3

B16	Mouse	1-3
PC1.0	Hamster	10
MC3T3-E1	Mouse	10
H9C2	Rat	1
MCF-7	Human	1-3
MDA-MB-×××	Human	1-3
HepG2	Human	2
HT1080	Human	1
A549	Human	1.5
H1299	Human	2
Human embryonic stem cells (Human ESCs)	Human	1
更多 Puromycin 使用浓度更新中，详情请参考公司网站……		

每 2-3 天换含 puromycin 的完全培养液一次，至不感染筛选对照组细胞被 puromycin 杀光，可进行以下两步操作（依照具体实验需要选择）。

不挑取单克隆:

将感染并筛选后的细胞进行传代, 并继续施加 puromycin 进行维持性筛选培养。连续筛选并传 3 代后, 冻存保重稳定细胞株。

挑取单克隆:

将感染并筛选后的细胞挑选至少 5 个克隆进行细胞扩增, 并继续施加 puromycin 进行维持性筛选培养。扩增完毕后 western blot 或者 QPCR 检测目的蛋白的表达。挑取表达适中的稳定细胞株, 连续筛选并传 3 代后, 冻存保重稳定细胞株。

5. 感染悬浮细胞

上面介绍的是针对贴壁细胞的感染方法, 若是悬浮或半悬浮细胞, 则需要通过平角离心转染法, 即将适量的病毒液加入细胞培养皿后, 封好口, 放入平角离心机后, 低速 (500g-1000g/min) 离心 1h, 然后放入培养箱中正常培养即可。若由于实验条件有限, 没有平角离心机, 可用离心管代替, 将细胞吹打吸入离心管中, 进行低速离心, 去掉大部分上清, 然后加入适量的病毒液, 室温放置 15min (不能超过半小时), 然后将细胞和病毒液同时吸出转入培养皿中继续病毒感染过夜后换液即可。

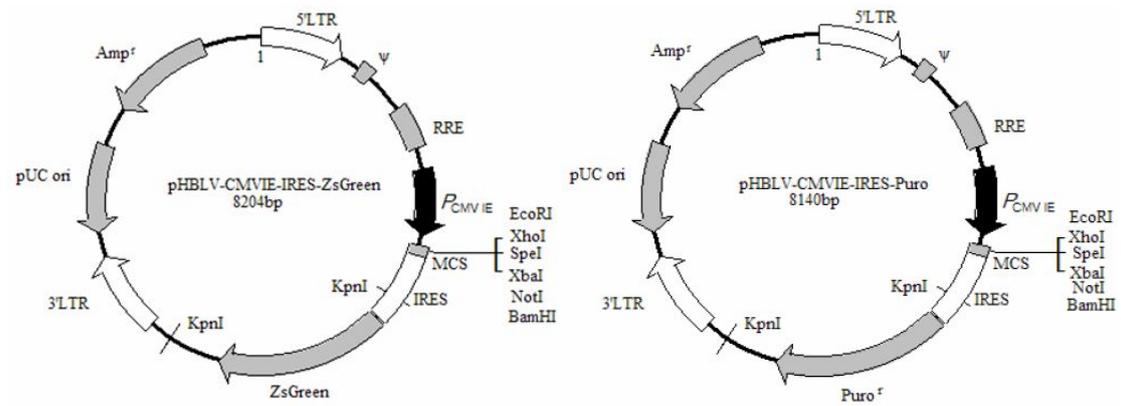
6. 对于极难感染的细胞

对于极难感染的细胞, 如 DC (树突状细胞) 等, 可采用多次感染的方法, 即感染 24 小时后, 更换新鲜病毒进行二次感染, 可显著提升感染效率。

附 1：汉恒生物慢病毒质粒图谱

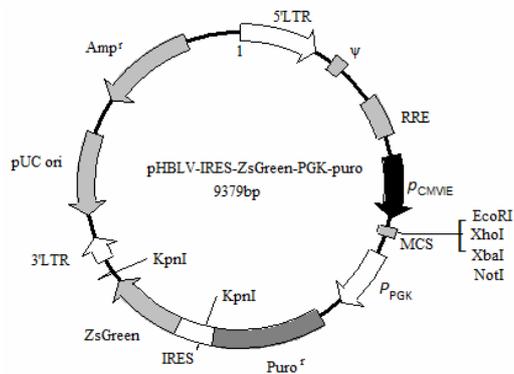
过表达

1. 单标记



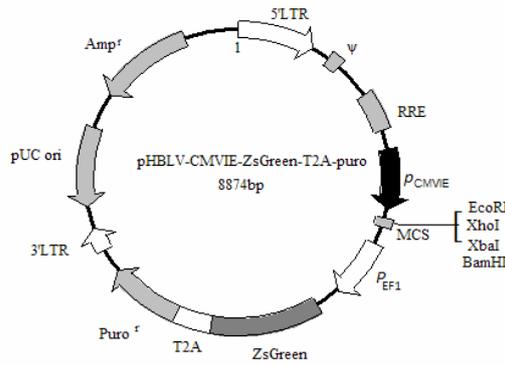
2. 双标记

IRES 载体

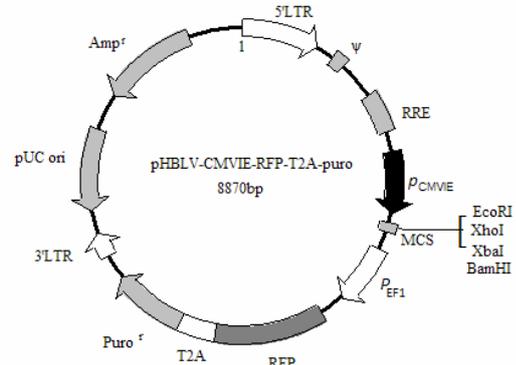


慢病毒过表达载体，ZSGreen/puro 标记

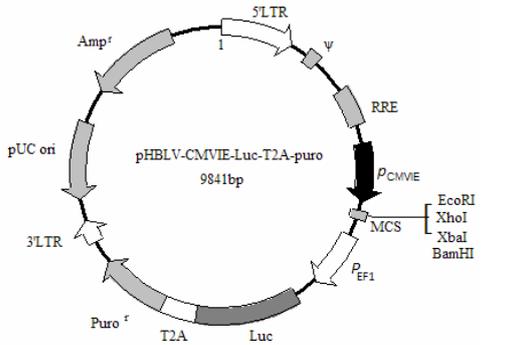
T2A 系列载体:



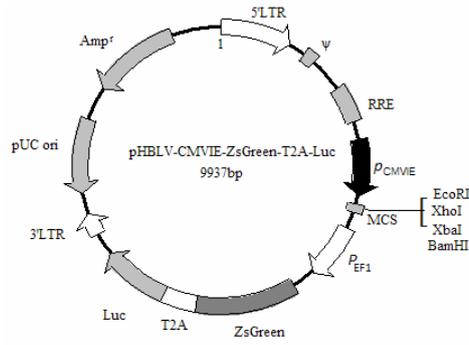
ZsGreen-T2A-Puro



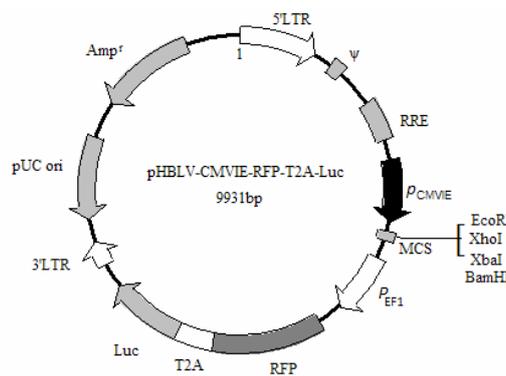
RFP-T2A-Puro



Luc-T2A-Puro



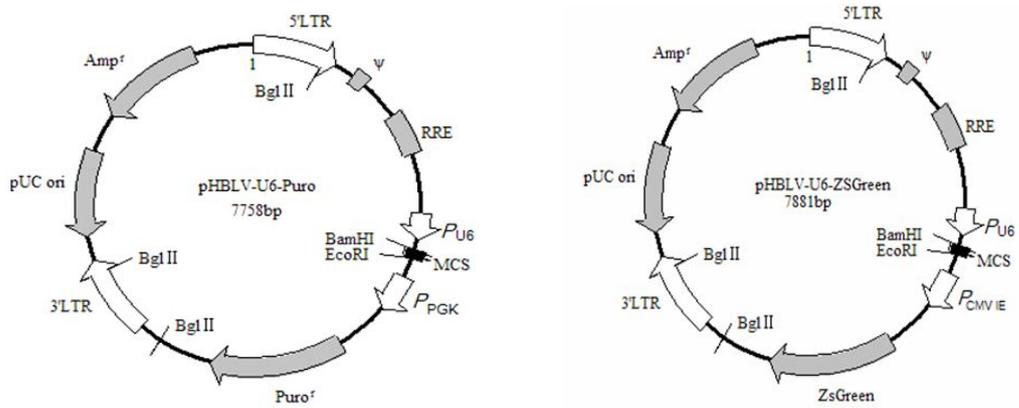
ZsGreen-T2A-Luc



RFP-T2A-luc

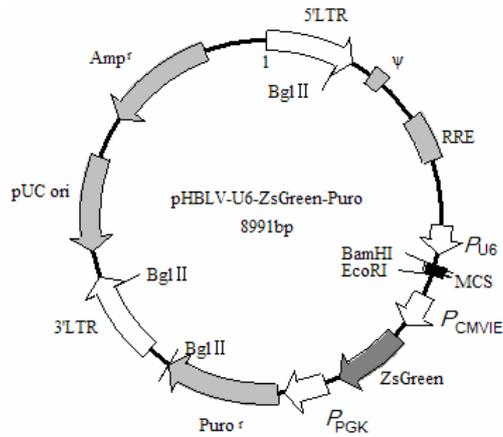
干扰

1. 单标记



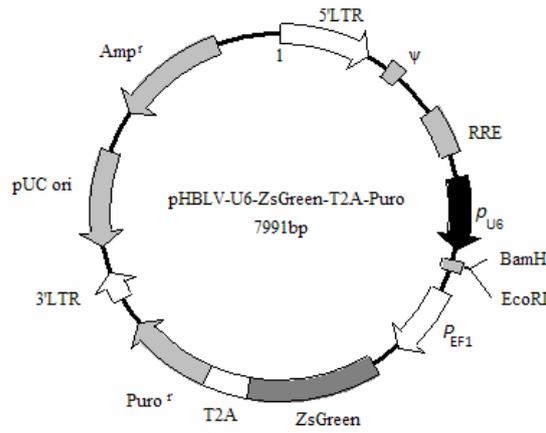
2. 双标记

IRES 系列载体

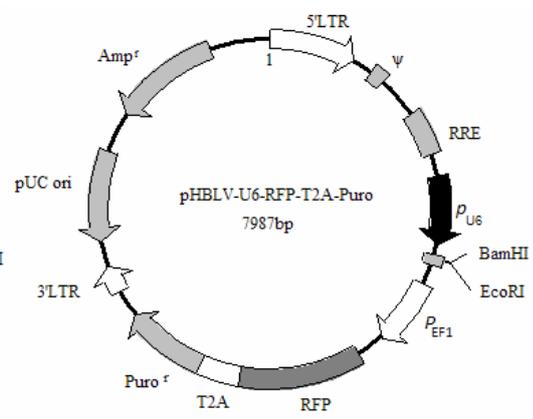


慢病毒 shRNA 干扰载体，ZsGreen/puro 标记

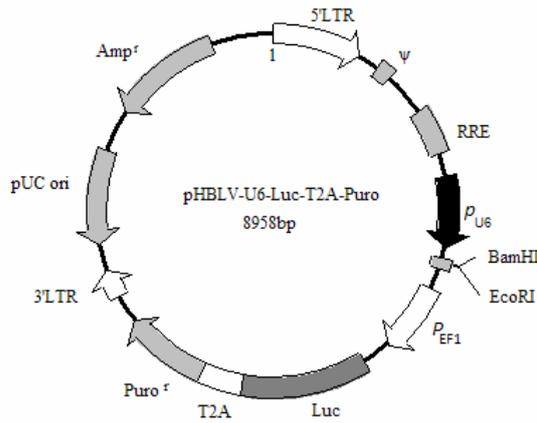
T2A 系列载体:



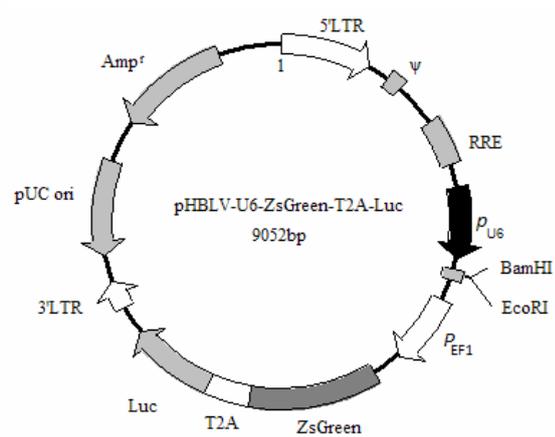
ZsGreen-T2A-Puro



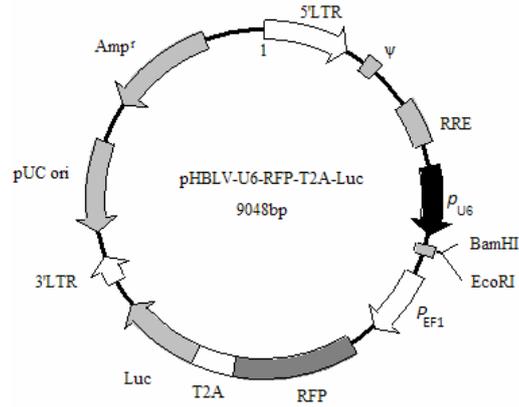
RFP-T2A-Puro



Luc-T2A-Puro

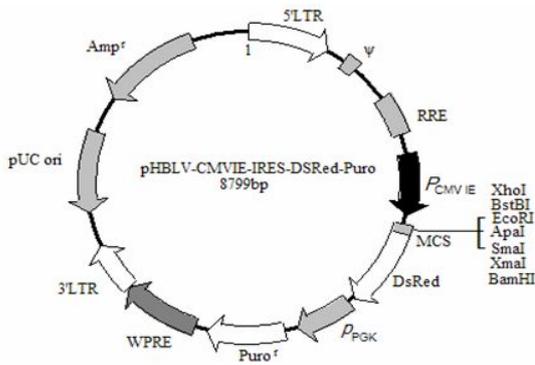


ZsGreen-T2A-Luc

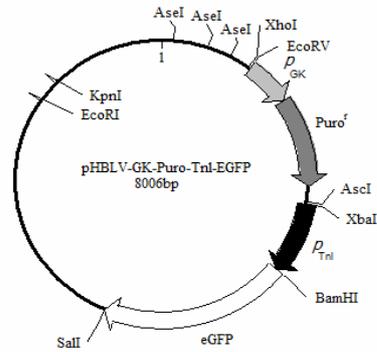


RFP-T2A-luc

特殊用途

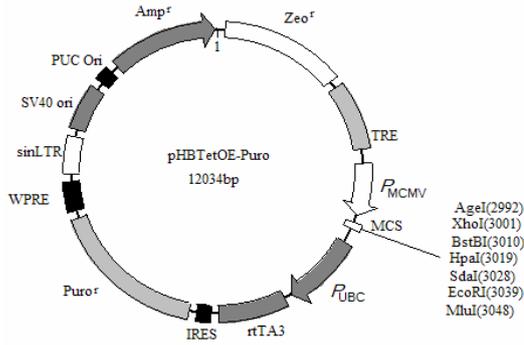


用于融合蛋白构建

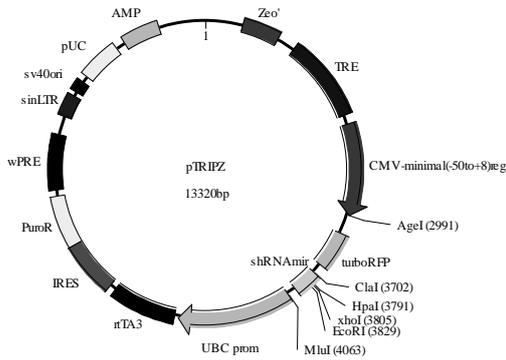


慢病毒载体启动子替换

Tet-on system 慢病毒载体：单病毒系统，无须另外表达 rtTA，出毒率低，只做建系用，无法提供病毒



Tet-on 过表达系统，目的基因插入 MCS 区，只在 DOX 存在下才表达，puro 可持续表达，用于筛选



Tet-on 干扰系统，应用 mir30 的 sh-mir 结构，与 tuboRFP 融合表达，加 DOX 时 RFP 和 sh-mir 结构启动表达，因此会看到加 Dox 后 24 小时有荧光出现；puro 为持续表达，用于筛选
注意：sh-mir 合成非常贵

附 2: 慢病毒滴度测定方法简介:

1、细胞准备

将生长状态良好的 293T 细胞消化计数后稀释至 1×10^5 /ml, 加入 96 孔板, 100ul/孔, 为每个病毒准备 6 个孔。放入 37℃, 5%CO₂ 培养箱中培养。

2、加病毒

第二天, 在 EP 管中做 3 倍梯度稀释, 连续 6 个稀释度。稀释方法如下: 每种病毒准备 6 个 1.5mlEP 管, 每管加入 90ul 培养液, 往第一个管中加入 10ul 病毒原液, 混匀后, 吸取 10ul 加入第二个管混匀。以此类推, 做十个稀释度 ($10 \sim 3 \times 10^{-3}$)。

3、追加培养液

第三天, 吸去带有病毒的培养液, 在每个孔中再加入 100ul 完全培养液, 以利于细胞的生长。

4、观察结果并计算滴度

第五天, 在荧光显微镜下观察结果。

滴度 (PFU/ml) = 细胞数 * 荧光百分比 * MOI * 病毒稀释倍数 * 10^3

附 3:

汉恒生物目的细胞慢病毒感染复数 (MOI) 与体积对应表					
规格	大约数目	MOI 值	加入病毒数量	慢病毒	MOI 摸索时加入的体积梯度/ μ l
96well	$2-5 \times 10^4$	$20-50$	$0.4-2.5 \times 10^6$	4-25 μ l	4; 12; 20
48well	$1-2 \times 10^5$	$20-50$	$0.2-1 \times 10^7$	20-100 μ l	20; 60; 100
24well	$2-3 \times 10^5$	$20-50$	$0.4-1.5 \times 10^7$	40-150 μ l	40; 120; 200
12well	5×10^5	$20-50$	$1-2.5 \times 10^7$	100-250 μ l	100; 300; 500
6well	$1-2 \times 10^6$	$20-50$	$0.2-1 \times 10^8$	0.2-1ml	200; 600; 1000
35mmdish	$1-2 \times 10^6$	$20-50$	$0.2-1 \times 10^8$	0.2-1ml	200; 600; 1000
60mmdish	$2-4 \times 10^6$	$20-50$	$0.4-2 \times 10^8$	0.4-2ml	400; 1200; 2000

100mmdish	$6-10 \times 10^6$	$20-50$	$1.2-5 \times 10^8$	1.2-5ml	1200; 3600; 6000
150mmdish	$1-2 \times 10^7$	$20-50$	$0.2-1 \times 10^9$	2-10ml	2000; 6000; 10000
<p>慢病毒滴度以 10^8/ml 为准，其他滴度需相应换算；</p> <p>大约细胞数目是根据 80%~100%细胞密度估算而出，具体细胞数请种细胞时进行细胞计数。</p>					

注：

1) 24板长满了细胞大约有 3×10^5 个细胞。 如果一天后要长到70% (2.1×10^5)， 建议 $1.2-1.4 \times 10^5$ 个细胞。因为细胞刚放进去的前几个小时需要粘在生长表面及适应新的生长条件，不会达到24小时翻一倍的速度。其他规格培养可参照此确定相应culture细胞量。

2) MOI值: MOI 是multiplicity of infection的缩写，中文译为感染复数,实际的含义即为每个细胞被多少个有活力病毒所感染。各种细胞的最适MOI值有差别，请客户正式实验前先进行预实验摸索最适MOI。

附 4：慢病毒 MOI 感染参数

注：不同实验室由于细胞的来源、代数和细胞状态等因素的影响，MOI 值也略有差异，以下数据是在细胞感染效率在 85-100%细胞状态良好的情况下获得的，仅供参考。

细胞系名称	细胞描述	MOI 值范围	能否添加 polybrene
K562	人白血病细胞	20~40	可
Jurkat	人白血病细胞株	50~80	不可
kasumi	人白血病细胞株	10~30	不可
NB4	人白血病细胞株	50~80	不可
U937	人单核细胞	20~40	可
THP-1	人单核细胞株	50~80	可
GBC-SD	人胆囊癌细胞株	30~50	不可
H929	人多发性骨髓瘤 症细胞系	100~150	不可
H1299	人非小细胞性肺 癌细胞	1~3	可

95D	人肺巨细胞癌	2~4	可
A549	人肺腺癌	20~40	可
SPC-A-1	人肺腺癌细胞	100~150	可
7402	人肝癌细胞	10~15	可
Hep 3B	人肝癌细胞	10~30	可
Hep G2	人肝癌细胞	10~30	可
SMMC-7721	人肝癌细胞	10~30	可
Huh-7	人肝癌细胞系	10~30	可
HeLa	人宫颈癌细胞株	10~30	可
HOS	人骨肉瘤细胞系	20~40	可
Hep-2	人喉癌细胞株	10~30	可
HL-60	人急性髓系白血病细胞株	>100	可
HT-29	人结肠癌细胞	10~30	可

PKO	人结肠癌细胞	2~4	可
SW480	人结肠癌细胞株	10~30	可
DLD-1	人结直肠肿瘤细胞株	10~30	可
SK-OV-3	人卵巢癌细胞株	2~4	可
SHG-44	人脑胶质瘤细胞	10~30	可
U251	人脑胶质母细胞瘤	1~3	可
U87	人脑星型胶质母细胞瘤	1~3	可
293T	人胚肾上皮细胞	1~3	可
HUVEC-2C	人脐静脉血管内皮细胞	10~30	可
PC-3	人前列腺癌细胞	20~40	可
MDA-MB-231	人乳腺癌细胞	10~30	可
MCF-7	人乳腺癌细胞株	20~40	不可

Tca8113	人舌鳞状细胞癌	10~30	可
RPE	人视网膜色素上皮细胞	10~30	可
AGS	人胃癌细胞	100~150	可
BGC-823	人胃癌细胞	100~150	可
SGC-7901	人胃癌细胞	10~30	可
MKN-28	人胃癌细胞株	20~40	可
MKN-45	人胃低分化腺癌细胞株	20~40	可
BxPc-3	人胰腺癌细胞	20~40	可
CFPAC-1	人胰腺癌细胞	50~80	可
Panc-1	人胰腺癌细胞	2~4	可
HEC-1-B	人子宫内膜癌细胞株	2~4	可
NIH-3T3	小鼠成纤维细胞系	20~40	可

Raw264.7	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞	10~30(感染后分化)	不可
CHO	中国仓鼠卵巢细胞	20~40	可
HSC-T6	大鼠肝星型细胞	10~30	不可
C6	大鼠脑胶质瘤细胞	>100	可
NRK	大鼠肾细胞	10~30	可

附 5：汉恒生物各病毒载体感染目的细胞比较

	腺病毒	慢病毒	逆转录病毒
感染方式	直接加入	直接加入	直接加入
换液时间	感染后 2h	感染后 24h	感染后 24h
是否需要筛选	不需要, 腺病毒感染能力很强	需要筛选获得稳定感染株, 慢病毒的感染能力不强	需要筛选获得稳定感染株, 逆转录病毒的感染能力不强
观察时间	如带有 GFP 等荧光标签, 24h 后可观察到荧光, 36h 可达到表达高峰, 若不带有荧光标签, 则需要鉴定	带有 GFP 等荧光标签, 24h 后可以观察到表达, 36h 达到高峰, 若不带有荧光标签, 则不可直接观察到, 需要鉴定	带有 GFP 等荧光标签, 24h 后可以观察到表达, 36h 达到高峰, 若不带有荧光标签, 则不可直接观察到, 需要鉴定
是否需要助转剂	不需要	有时需要, 但是根据具体情况操作, 因为助转剂, 如 polybrene, 对细胞的伤害比较大, 有的细胞可能承受不了	有时需要, 但是根据具体情况操作, 因为助转剂, 如 polybrene, 对细胞的伤害比较大, 有的细胞可能承受不了

附 6：汉恒生物病毒包装周期表

	腺病毒			慢病毒	
	过表达	干扰		过表达	感染
目的序列获得	3~5 天	2~4 天	目的序列获得	3~5 天	2~4 天
穿梭质粒构建	3~12 天	3~12 天	重组表达质粒构建	8~12 天	8~12 天
质粒重组	5~10 天	5~10 天	慢病毒包装	5~10 天	5~10 天
腺病毒包装	12~15 天	12~15 天	病毒浓缩 (可选)	1~2 天	1~2 天
大量扩增	12~15 天	12~15 天	滴度测定	3~5 天	3~5 天
纯化 (可选)	14~21 天	14~21 天	目的细胞感染, 筛选	14 天	14 天
滴度测定	3~5 天	3~5 天	过表达/干扰效率验证	3 天	3 天
时间总	52~83	51~82	时间总	37~49	36~48

计	天	天	计	天	天
---	---	---	---	---	---

附 7：动物实验对腺病毒和慢病毒的要求及实现方式

	腺病毒	慢病毒
是否需要纯化及方法	需要纯化，纯化方法：CsCl 梯度离心	不需要纯化
是否需要浓缩及浓缩方法	纯化之前需要浓缩，PEG8000 沉降法	需要浓缩，浓缩方法：超速离心法或 PEG8000 沉淀法。
实现方式	注射	注射

附 8：病毒的保存条件与运输条件

	腺病毒	慢病毒
保存条件	分装于-80 度长久保存；一周内使用可保存于 4 度。忌反复冻融。六个月后再次使用，需要重新测定病毒滴度。	分装于-80 度长久保存；一周内使用可保存于 4 度。勿反复冻融。六个月后再次使用，需要重新测定病毒滴度。
0 运输条件	用普通的冰袋，不可以用干冰运输，因为干冰所造成的 CO ₂ 气体环境会大大降低缓冲液的 pH 值，从而极大影响腺病毒在缓冲液中的稳定性。但如果使用封口严密的西林瓶或安培瓶包装腺病毒，则可以用干冰运输。	先将病毒保存于-80 度，然后全程干冰运输

附 9：慢病毒收到后的注意事项

1、慢病毒的储存

用户收到病毒液后在短期内即使用慢病毒进行实验，可以将病毒暂时放置于 4 °C 保存（尽量一周内用完）；如需长期保存请放置于-80°C。

注：

a. 反复冻融会降低病毒滴度（每次冻融会降低病毒滴度 10%）；在病毒使用过程中应尽量避免反复冻融，所以我们前期对病毒进行了分装（100ul/tube），收到后直接放置-80 °C 保存即可。

b. 如果病毒储存时间超过 6 个月，我们建议使用前重新测定病毒滴度。

2、慢病毒的稀释

用户需要稀释病毒时，请将病毒取出置于冰浴融解后，使用培养目的细胞用 PBS 或无血清培养基（含血清或含双抗不影响病毒感染）混匀分装后置于 4°C 保存（请尽量一周内用完）。