

# 快速慢病毒包装试剂盒

## Rapid Lentiviral Packaging Kit

本产品需冰袋运输；其中Vtransfectin和阳性对照完全培养基4℃保存，其它组分-20℃保存，保质期12个月。

### 货号规格

货号	规格
GY101	10次

### 产品内容

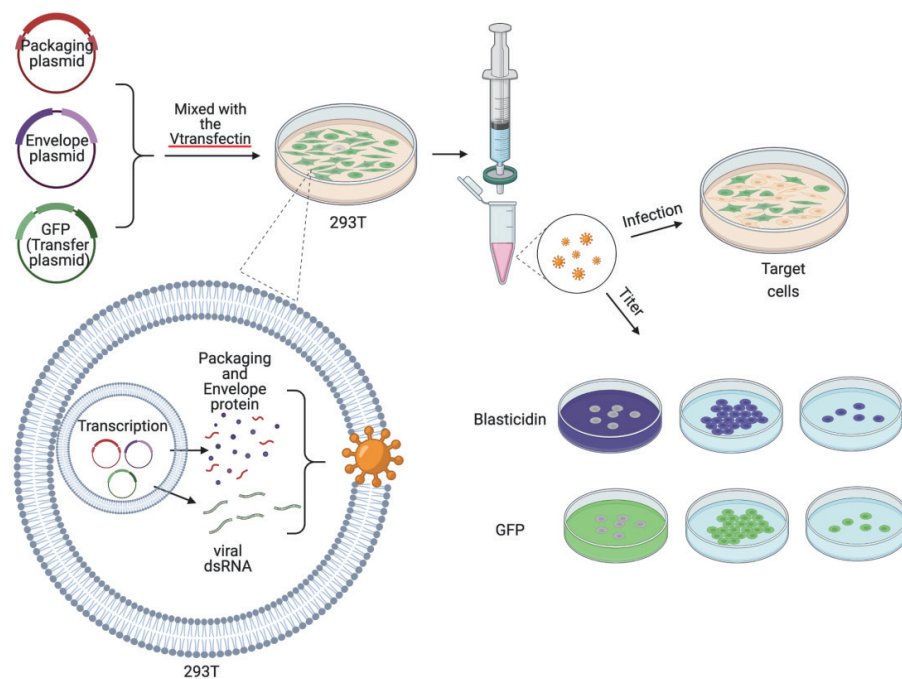
组分	规格
Dual-Vplasmid Premix	20 $\mu$ L
Vtransfectin	60 $\mu$ L
GFP阳性对照质粒	2 $\mu$ L (1 $\mu$ g)
阳性对照完全培养基	5 mL

### 产品简介

慢病毒感染是目前最常用于构建稳转细胞系的方法之一。本试剂盒基于第二代慢病毒包装系统，提供了病毒囊膜表达质粒和包装质粒的预混液 (Dual-Vplamid Premix)、表达 GFP 的阳性对照质粒以及高效的转染试剂。操作者只需自备携带目的基因的慢病毒转移质粒即可快速高效地完成慢病毒包装实验。

### 实验流程

将含有相关基因的转移质粒(用户自备)及Dual-Vplamid Premix在Vtransfectin的辅助下共转染到293T细胞中，细胞上清液(含慢病毒)经0.45  $\mu$ m滤器过滤后即获得慢病毒。慢病毒感染目的细胞后，经抗生素、荧光等相应的筛选，完成稳转细胞系的制备及病毒滴度鉴定。



## 操作步骤

### 慢病毒包装

如下步骤以6孔板实验体系为例，如使用其它型号培养板，可以按相应比例调整。

1. Day1 细胞铺板：将状态良好的293T按 $1 \times 10^6$  cells/孔均匀地铺板，培养基使用10%胎牛血清+DMEM (High Glucose)，总体积2 mL。请确保过夜后，转染前，细胞覆盖率在70%~90%左右；
2. Day2 质粒转染：取两个1.5 mL EP管，标上1号和2号，在两管中分别配制如下反应体系(请按从上至下顺序添加)：

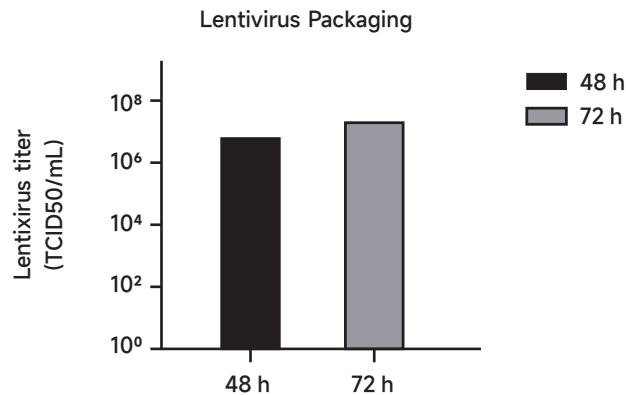
1号管	试剂名称	使用量
	无血清DMEM	250 $\mu$ L
	Dual-Vplasmid Premix	2 $\mu$ L
	DNA	1 $\mu$ g

2号管	试剂名称	使用量
	无血清DMEM	250 $\mu$ L
	Vtransfectin	6 $\mu$ L

混匀后，将2号管混匀后的液体加入1号管中，立即涡旋振荡混匀5 sec，室温静置15~20 min，瞬时离心将管壁液体收集至管底；

3. 细胞转染：将上一步得到的转染混合液缓慢地滴加入6孔板细胞中。滴加过程中请勿将贴壁的细胞吹起；
4. 换液：转染后6~8 h，吸去细胞上清，添加新鲜的培养基。请尽量轻柔操作，少量细胞被吹起，不影响最终实验效果；
5. 病毒收集：转染48 h后，取细胞上清病毒液，补加2 mL新鲜培养基，将细胞放回培养箱培养。病毒液请用0.45  $\mu$ m滤器过滤后使用。病毒液可暂时存放于4 $^{\circ}$ C，长期保存请置于-80 $^{\circ}$ C。为避免反复冻融，可根据实验需要对慢病毒进行分装；
6. 转染72 h后，可第二次收集慢病毒，操作步骤同上一步；
7. 如果对慢病毒的滴度有更高的要求，可使用慢病毒浓缩液(货号：GY102)对病毒液进行浓缩后使用。

### 慢病毒滴度



通过TCID50方式，检测携带GFP的慢病毒滴度。慢病毒滴度范围一般为 $10^6 \sim 10^7$  TCID50/mL。

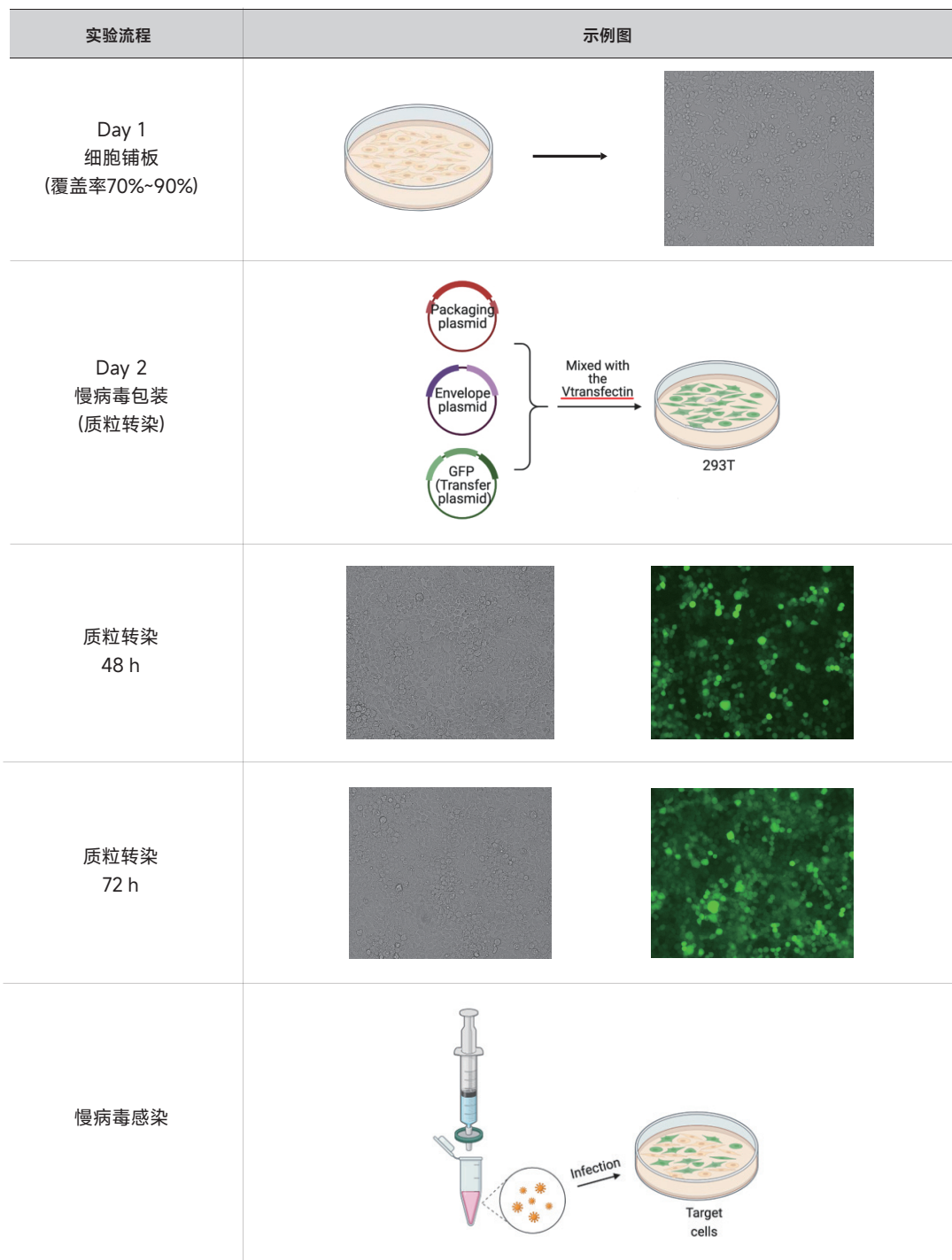
### 稳转细胞系的制备

1. 通过查阅文献或进行预实验确定目标细胞的MOI(multiplicity of infection)值，即感染复数；
2. 选择状态良好且无支原体污染的目标细胞进行铺板，以6孔板为例，每孔铺 $1 \times 10^6$ 个目标细胞，过夜培养后，确保细胞覆盖率在70%左右；
3. 根据确定的MOI值，计算慢病毒添加量，直接加入到6孔板中，轻摇混匀。24 h后换液；

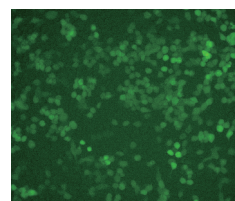
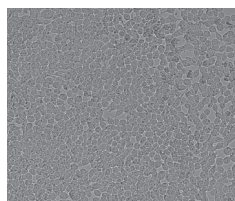
#### 4. 细胞筛选:

- ① 药物筛选: 若用户目的基因的转移质粒含有荧光蛋白基因, 可在慢病毒感染后 72 h, 观察目标细胞荧光表达的情况, 并在 6 孔板中添加筛选药物, 如 Puromycin/Blasticidin 等, 添加量需根据目标细胞的特性来决定。72 h 后, 需继续换液并添加药物, 药物筛选至少持续 14 天, 直至观察显微镜下荧光细胞比例接近 100%。
- ② 荧光筛选: 使用流式细胞仪进行细胞分选。

**慢病毒包装流程图**



慢病毒感染  
(图例为慢病毒稀释  
100倍后感染状况)



## 注意事项

1. 血清的质量对转染后细胞的状态至关重要，请确保使用优质血清配制细胞培养基(本产品提供了5 mL 完全培养基用于对照测试，以排除用户所用血清的质量问题)；
2. 内毒素的存在会影响转染效率，请使用去内毒素方法提取的质粒，并用超纯水溶解；
3. 进行转染前，请确认细胞的覆盖率在70%~90%之间；
4. 实验过程中需穿戴实验服、一次性手套及口罩。请勿随意丢弃病毒接触过的物品，并尽可能使用甲醛等灭活剂和紫外照射进行处理；
5. 本产品仅限科研使用。

## 常见问题

问题描述	可能原因	解决方案
慢病毒包装过程中， 293T漂浮	293T受到支原体污染	立即丢弃该细胞，使用支原体清除剂对培养箱、超净台等细胞房内场所进行消毒灭菌，重新复苏冻存的293T。
	血清质量差	更换质量更好的血清(推荐澳洲胎牛血清)。
	细胞铺板数量过多或过少	铺板前进行细胞计数，保证第二天包装时细胞覆盖率在70%~90%。
	用户自备的转移质粒含有内毒素	使用无内毒素质粒抽提试剂盒提取质粒。
慢病毒感染目标细胞时， 目标细胞死亡	目标细胞受到支原体污染	立即丢弃该细胞，使用支原体清除剂对培养箱、超净台等细胞房内场所进行消毒灭菌，重新复苏冻存的293T。
	血清质量差	更换质量更好的血清(推荐澳洲胎牛血清)。
	目标细胞本身较敏感， 耐受力差	降低MOI值或更换别的方案获得稳转细胞系。
	选用的MOI值过高	实验之前，可通过查询文献资料，选用最佳感染MOI值；正式实验前可通过预实验进一步确定最适MOI值。
大量克隆含有不正确 插入片段	慢病毒保存不当， 效价降低	若48 h内使用，可将慢病毒置于4°C保存； 若短期内不使用，请将慢病毒置于-80°C，为避免反复冻融， 可分装后冻存，每冻融一次，慢病毒会有一些量的损失； 使用之前请将慢病毒置于冰上融化，需尽快使用。
	MOI值有问题	实验之前，可通过查询文献资料，选用最佳感染MOI值； 正式实验前可通过预实验进一步确定最适MOI值。
	目标细胞特性，难以感染	提高MOI值或更换别的方案获得稳转细胞系。