

293T 病毒包装细胞使用说明书

产品基本信息

产品货号	YC-A006		
细胞名称	293T 病毒包装细胞	中文名称	人胚肾细胞
细胞形态	上皮样, 贴壁细胞	传代比例	1:3~1:6
培养体系	90% DMEM+10%FBS		
冻存液体系	50%DMEM+40%FBS+10%DMSO		
特殊备注			

STR 鉴定

EV	Cell No.	Cell name	Locus names								
			D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO
	<i>Query (Your Cell)</i>		8,9	12,12	11,11	9,13	16,19	7,9.3	X,X	11,11	11,12
1.0(36/36)	RCB2253	HKb20	[8', '9']	[12', '12']	[11', '11']	[9', '13']	[16', '19']	[7', '9.3']	[X', 'X']	[11', '11']	[11', '12]
1.0(36/36)	CVCL_0063Best	HEK293T	[8', '9']	[12', '12']	[11', '11']	[9', '13']	[16', '19']	[7', '9.3']	[X', 'X']	[11', '11']	[11', '12]

细胞接收

- 1) 冻存细胞：如果是干冰运输的冻存细胞，收到后请立即转入液氮储存或短暂（24H）放至-80℃冰箱保存，或直接进行细胞复苏。
- 2) 活细胞：如果是 T25 瓶活细胞运输，收到后用 75%的酒精对 T25 瓶外表面进行消毒，之后放在 5%CO₂、37℃的细胞培养箱静置 2h，静置后取出细胞瓶在显微镜下观察细胞贴壁情况和细胞汇合度，分别在 100X 和 40X 下各拍 2 个不同视野的细胞拍照记录。如果汇合度达到 80%以上的传代密度，可以进行传代操作，如果细胞汇合度没有达 80%以上不够传代，弃掉瓶内培养





基，更换新鲜完全培养基。(灌满细胞培养基不能正常用来培养细胞。)

注意：收到细胞后，活细胞首先观察细胞瓶是否完好，培养液是否漏液、浑浊等现象。冻存细胞若发现干冰已挥发完、冻存管瓶盖脱落、破损等异常情况，请务必**拍照保留**，并于收货 24h 内与我们联系(电话：400-688-9033; <https://www.ubigene.com>)。

细胞复苏

- 1) 准备工作：将完全培养液置 37°C 水浴锅预热 30 分钟，随后将冻存的细胞从液氮中取出，转移到 -80°C 冰箱，放置数分钟让残余液氮挥发；
- 2) 在超净台内用吸管吸取 6-7 mL 完全培养液至 15 mL 离心管中；
- 3) 将细胞从 -80°C 冰箱取出暂时放置于干冰里，复苏时稍稍甩动，去除残留的干冰和液氮，再迅速用镊子夹住盖子放入 37°C 水浴中快速晃动(注意：水不能没过盖子)，使其在 1 分钟左右完全融化；
- 4) 在超净台内，用酒精棉球擦拭冻存管外壁消毒，稍稍晾干。用单道移液器将所有融化的细胞悬液转至提前准备好的完全培养液中，盖上盖子，1100 rpm 室温离心 4 分钟收集细胞；
- 5) 超净台内小心吸弃上清，用单道移液器吸取 1 mL 新鲜完全培养液重悬细胞至单细胞悬液，再转移至装有 4 mL 完全培养液的 T25 cm² 培养瓶(或者 6cm 的皿)中，写上细胞名称、复苏日期、代次，放置 37°C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。

注意：请勿直接复苏到 T75 cm² 瓶或 10cm 的皿。

细胞传代

- 1) 常规细胞长至 80%-90% 汇合度即可传代。在超净台内把培养瓶里的培养液倒至废液缸，用 1× PBS (T25 cm² 培养瓶添加约 2~3mL, T75 cm² 培养瓶约 4~5 mL) 洗涤细胞 1~2 次，以去除残余的培养液和血清(血清含有胰酶的抑制因子)；





- 2) 加入相应体积的胰酶溶液，具体参考附表 1，轻轻晃动瓶子并使胰酶完全浸过细胞，将培养瓶放入培养箱孵育 1~2 分钟（若细胞难以消化，可适当延长孵育时间），待在显微镜下观察到大部分细胞变圆不贴壁，轻轻晃动和敲击培养瓶两侧有大量细胞脱离时，立即终止消化；
- 3) 加入 2 倍胰酶体积的完全培养液终止消化，并轻吹打细胞数次，使所有细胞彻底脱壁；（注意：吹散细胞时注意要轻柔，尽量不产生气泡或尽可能产生少量气泡。）；
- 4) 用 10 mL 移液管转移细胞悬液到一支 50 mL 离心管中，同一批次的细胞可以合并收集在一起，视情况用适量 PBS 将培养瓶里的残余细胞洗下来，一起加到 50mL 离心管中。盖上盖子，做好标记；
- 5) 1100 rpm 室温离心 4 分钟，离心后，打开盖子弃上清，加 2mL 完全培养基重悬细胞；
- 6) 细胞按照一定的接种比例传代，首次按照 1: 3 进行传代，若细胞在两天内长满可增加传代比例，若细胞生长三四天还未长满，可适当缩小传代比例。

表 1 不同规格培养物加入胰酶体积列表

培养物规格	胰酶体积
6 孔板	0.5 mL
T25	1 mL
T75	2-3 mL
T175	3-4 mL

细胞冻存

- 1) 按细胞传代的方法，在超净台内把培养瓶里的细胞进行消化至单细胞悬液，加入培养基终止反应。所有液体转移到一支 50 mL 离心管中。





- 2) 用移液管吹打混合均匀，取 20 μL 进行细胞计数；
- 3) 1100 rpm 室温离心 4 分钟，离心后，打开盖子倒去上清，用 1~2 mL 4°C 预冷的冻存液重悬细胞，随后加入冻存液调整至密度为 1×10^6 - 1×10^7 个细胞/mL。
- 4) 将细胞悬液按 1 mL/管平均分装至冻存管中，旋紧盖子，冻存管应提前贴好细胞名称、细胞代次、数量、冻存日期；
- 5) 将冻存管放置于 4°C 预冷的程序降温盒中，并在冻存结束的 15 分钟之内将程序降温盒放置超低温冰箱内；
- 6) 过夜后，将冻存细胞转移至液氮罐内保存。

病毒包装 (以对照病毒包装为例，用源井病毒包装试剂盒，货号为：YK-LVP-20)

以下操作以 10 cm 皿包装 GFP 病毒为例 (15cm 培养皿的用量相应增加为 10cm 用量的 2.25 倍。)

① 病毒包装前一天，接种 293T 细胞到 10 cm 培养皿中，接种细胞数量应以包装当天的细胞生长达到 80%~90% 融合为佳。

② 包装前 1 小时将细胞从培养箱中拿出，换成 8-10 mL Opti-MEM 培养基，并放入孵箱平衡。

③ 准备 DNA-Lipofectamine 2000 复合物：

A 液：取 20 μL LV PacMix, 20 μL LV GFP Ctrl (浓度为 500 ng/ μL) 对照混合，加 Opti-MEM 补足 1.5 mL，颠倒混匀。

注：慢病毒表达质粒，推荐加入 10~12 μg 。

B 液：取 60 μL Lipofectamine2000 与 1.44 mL Opti-MEM 混合，颠倒混匀。

A 液和 B 液室温孵育 5 min 后混合，颠倒混匀 (避免振荡)，再室温复苏 20-30 min，形成





DNA-Lipofectamine2000 复合物。

④ 把 DNA-Lipofectamine2000 复合物逐滴添加到 293T 细胞中，轻轻地前后摇晃培养皿以混匀复合物。放置 37°C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。

⑤ 转染后 4-6 小时换液，培养基换成 HD 完全培养基，放置 37°C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 48 小时。

病毒上清收集

① 48 小时后收集含有病毒的上清培养液至 50 mL 离心管中，1500 rpm 离心 10 min。

② 将上清用 0.45 μm 的针头滤器过滤，除去细胞碎片，即得到粗病毒。

粗病毒可直接用于细胞感染，若暂时不使用，请及时分装并于-70°C以下储存。

病毒浓缩

粗病毒经过浓缩纯化后可大大提高病毒滴度和纯度，能更高效感染细胞。

① 按照滤液体积的 1/5 加入 50% PEG 6000 溶液，上下颠倒充分混匀，置于 4°C 过夜。

② 次日，4°C、1500 × g 离心 30 分钟，在超净台内倒掉上清。

③ 用移液枪吸除多余上清，每个 10 cm 皿加 300-500 μL 的 2× HBSS 重悬病毒。

④ 将病毒进行分装，于-70°C以下储存。

