

慢病毒包装试剂盒说明书

产品简介

源井生物慢病毒包装试剂盒采用了第三代包装系统，其基因组的 3' LTR 经突变形成了所谓的“自失活” (Self-inactivation, SIN)，即该病毒基因组整合到细胞基因组后，不会产生新的子代病毒，因此具有较好的安全性。该试剂盒是由慢病毒包装质粒混合物 (LV PacMix)、携带 EGFP 和 Puro 标记的对照病毒质粒和 Polybrene 组成，可用于高滴度慢病毒的高效包装与纯化，从而应用于体内外实验中。

其中慢病毒包装质粒混合物 (LV PacMix) 包含 3 个慢病毒包装辅助质粒，通过采用源井全新独家配比，实现病毒产量的有效提高与更好的病毒包装效果。同时病毒包装辅助质粒和对照病毒质粒均为即用型无内毒素质粒，可直接用于转染，操作简便，如需慢病毒表达质粒欢迎联系源井生物订购。

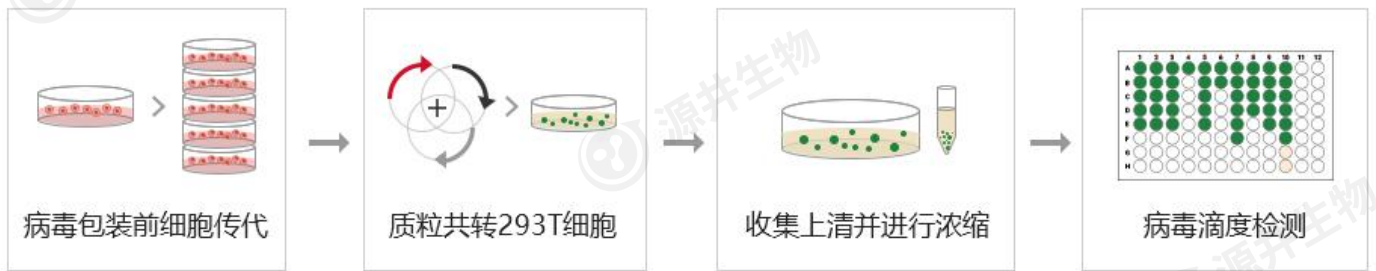
另外，源井可提供优质的慢病毒表达载体和 293T 包装细胞，其中源井生物的 293T 包装细胞来源 ATCC 细胞库，代次低、活力强，能快速生长并具有更强的培养存活能力，同时具有高度可转染性，病毒产量高于普通 293T 细胞，如需订购欢迎联系源井生物。

试剂盒组成

货号	试剂	规格	储存温度
YK-LVP-05	LV PacMix (endotoxin-free)	100 μ L	-20°C
	LV GFP Ctrl (endotoxin-free)	100 μ L	
	Polybrene (0.5 mg/mL)	1 mL	
YK-LVP-20	LV PacMix (endotoxin-free)	400 μ L	-20°C
	LV GFP Ctrl (endotoxin-free)	100 μ L	
	Polybrene (0.5 mg/mL)	1 mL	
YK-LVP-40	LV PacMix (endotoxin-free)	800 μ L	-20°C
	LV GFP Ctrl (endotoxin-free)	100 μ L	
	Polybrene (0.5 mg/mL)	2 mL	



慢病毒包装操作图示



操作步骤

1. 准备材料

1.1 细胞培养材料

细胞：293T 细胞（建议使用源井生物 293T 包装细胞，货号 YC-A006）

培养基：90%DMEM（高糖）基础培养基+10%FBS（下称 HD 完全培养基）

其他试剂：0.25%胰酶，PBS 缓冲液

耗材：培养皿或培养瓶

1.2 病毒包装材料

转染试剂：脂质体转染试剂（如 lipofectamine 2000），或者磷酸钙试剂

病毒浓缩试剂：50%的 PEG 6000，2× HBSS

耗材：50 mL 离心管，0.45 μm 针头滤器，注射器

1.3 病毒滴度检测材料

细胞：293T 细胞（建议使用源井生物 293T 包装细胞，货号 YC-A006），或 H1299 细胞

试剂：基因组提取试剂盒，qPCR 试剂，慢病毒标准品。

2. 293T 细胞培养

2.1 细胞复苏



- ① 将冻存的细胞从液氮中取出，转移到干冰冰盒中，带入洁净房。
- ② HD 完全培养基放 37°C 水浴锅预热。
- ③ 取 6~7 mL 预热的 HD 完全培养基至 15 mL 离心管中。
- ④ 将细胞从干冰冰盒取出，轻轻甩掉附着的干冰碎片，迅速用镊子夹住盖子将其放入 37°C 水浴中快速晃动，使其在 1 分钟左右完全融化。

注意：冻存管内的冰块必须浸入水面以下，但水不能没过盖子。

⑤ 在超净台内，用酒精棉球擦拭冻存管外壁消毒，稍稍晾干。用移液器吸取融化的细胞悬液至加好 HD 完全培养基的 15 mL 离心管中，1100 rpm 室温离心 4 分钟收集细胞。

⑥ 超净台内小心倒去上清，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 HD 完全培养基的 T25 培养瓶中，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。

2.2 细胞传代

① 待细胞长至 75%-85% 融合度即可传代。在超净台内把培养瓶里的培养液倒至废液缸，用 1×PBS 洗涤细胞，（T25 cm² 培养瓶添加约 2~3 mL，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），但洗涤时尽量避免将 293T 细胞冲洗下来。

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，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；若细胞仍然有大部分贴壁，可适当延长孵育时间，或者放置在培养箱中进行消化。。

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 50 mL 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 2 mL 完全培养基重悬细胞。

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
T25 瓶	0.3 mL-0.5 mL
T75 瓶	1 mL-1.5 mL
T175 瓶	3-4 mL



10 cm 皿	1 mL-1.5 mL
15 cm 皿	3 mL-4 mL

⑥ 取 20 μ L 细胞悬液计数，按照表 2 所示细胞密度接种。

表 2 不同规格培养体积列表

接种类别	建议接种量	培养液总体积
T75 培养瓶	4.0×10^6 /瓶	12 mL
T175 培养瓶	9×10^6 /瓶	25 mL
10 cm 皿	5.0×10^6 /皿	10 mL
15 cm 皿	1.2×10^7 /皿	25 mL

⑦ 摇晃均匀后，写上细胞名称、代次、日期，放置 37°C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。

3. 病毒包装

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 μ L LV PacMix，20 μ L LV GFP Ctrl（浓度为 500 ng/ μ L）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 μ g。

B 液：取 60 μ L 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。

4. 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。

5. 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 、 $1500 \times g$ 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 $2\times$ HBSS 重悬病毒。
- ④ 将病毒进行分装，于 -70°C 以下储存。

6. 病毒滴度检测

以荧光计数法为例：

- ① 滴度检测前一天，以每孔 5×10^3 个细胞（体积为 $100\mu\text{L}$ ）接种 293T 细胞到 96 孔板中，每种病毒需要用到 10 个孔。
- ② 准备 6 个无菌的 EP 管，在每个管中加入 90 μL DMEM 完全培养基，取 10 μL 待测定的病毒原液加入到①号管中，混匀后，从①号管中取 10 μL 加入到②号管中，继续相同的操作直到最后一管。
- ③ 吸去旧培养基并加入稀释好的 100 μL 病毒溶液，①号管样品对应的孔记作 10^{-1} ，②号管样品对应的孔记作 10^{-2}⑥号管样品对应的孔 10^{-6} 。
- ④ 37°C ，5% CO_2 培养 48 小时后，加 100 μL 新鲜的 DMEM 完全培养基继续培养。
- ⑤ 再经过 24 小时后，更换新鲜 DMEM 完全培养基 150 μL 。
- ⑥ 96 小时后，观察荧光表达情况。荧光细胞数随稀释倍数的增加而减少。数出最后 1 个孔中含有荧光细胞的孔中的荧光细胞个数 N。N 除以相应的稀释倍数就得到了病毒原液的滴度值。

如： 10^{-5} 梯度读出 5 个荧光细胞，那么此病毒原液的病毒滴度为： $5/10^{-5}=5\times 10^5\text{TU}/\mu\text{L}$ ，即 $5\times 10^8\text{TU}/\text{mL}$ 。



FAQ

1. 为什么选择用 293T 细胞进行病毒包装，可以用其他细胞吗？

因为 293T 细胞的转染率高，生长速度快，有利于提高病毒的得率，且 293T 细胞经过修饰，允许包装质粒在该细胞中存在较长时间，有利于病毒包装元件的表达，增加病毒产量。另外在选用 293T 细胞时，我们建议选用源井生物的 293T 包装细胞。因为源井的 293T 细胞是购自 ATCC 细胞库，不仅身份准确，而且代次低、活力强、生长快，具有很强的培养存活能力以及高度可转染性，病毒产量高于普通 293T 细胞，能进一步提高病毒包装以及后续细胞转染环节的成功率。

2. 慢病毒包装质粒混合物 (LV PacMix) 包含哪些组分？

该试剂盒提供的慢病毒包装质粒混合物 (LV PacMix) 包含 3 个慢病毒包装辅助质粒，分别为 pMDLG/pRRE、pCMV-VSVG、pRSV-REV，源井生物为进一步提高病毒产量，全新优化质粒配比，实验数据表明，采用该配比能有效提高病毒产量，并达到更好的病毒包装效果。

3. 细胞汇合度不在 80-90% 范围内，是否可以进行病毒包装？

① 在细胞汇合度低于 80% 时是可进行病毒包装的，但是会影响病毒产量，细胞汇合度过低还会导致病毒包装过程中细胞状态变差。

② 细胞汇合度高于 90%，会影响细胞的转染率，也会影响病毒产量，且细胞过满状态会变差或者脱落。

4. 如何判断病毒包装是否成功？

若表达质粒带有荧光，则可以通过看荧光的表达情况来判断，此外还可以通过看细胞是否发生病变来判断病毒是否包装成功。（有细胞融合现象）

5. 病毒可以在 -70°C 以下存放多久？

建议慢病毒放在 -70°C 不要超过 6 个月。

6. 反复冻融对病毒的滴度有影响吗？

反复冻融会使病毒滴度降低，病毒溶解后尽量一次性用完，若有剩余，须尽快放回 -70°C 保存。不建议反复冻融超过 2 次。



7. 试剂盒中附赠的 Polybrene 的作用是什么？

Polybrene 是一种促感染试剂，其常用浓度为 5~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Polybrene 能通过中和电荷间的相互作用来增强病毒与细胞膜的结合，从而提高病毒的转导效率。但 Polybrene 对于某些细胞有毒性，不同细胞对 polybrene 的敏感度不同，必要的话可以设置几个工作浓度以测试 Polybrene 对靶细胞的毒性。Ubigene 提供的 Polybrene 的浓度为 0.5 mg/mL，如有需要，使用过程中可用 PBS 或培养液进行稀释。

