

# 慢病毒包装试剂盒

## Lentiviral Packaging Kit

产品编号	产品组成	规格	保存条件
FRL-01	慢病毒包装质粒 (Lenti-Mix)	10 tubes	-20 °C
	慢病毒对照质粒 (Lenti-GFP)	1 tube	-20 °C
	Chemifect (质粒 DNA 转染试剂)	1 ml	4 °C
	Polybrene (慢病毒感染增强试剂)	1 ml	4 °C
	说明书	1 份	

### 一、运输和存储条件。

1. 本产品低温运输，各组份依据保存条件分开保存，有效期为 2 年。
2. Chemifect 与 Polybrene 4 °C 保存，严禁冻存。

### 二、注意事项（使用前阅读）。

1. Lenti-Mix 和 Lenti-GFP 体积较小，使用前 12,000×g，4 °C 离心 30 sec，使溶液沉到管底。
2. 请使用高纯度的 Lenti-shRNA 质粒或表达目的蛋白的慢病毒质粒进行转染实验，质粒 DNA 的 OD260/OD280 比值在 1.7~1.9 之间为宜。
3. 293T (N) 细胞的生长状态对于慢病毒包装至关重要，一般使用代数较低（20 代以内）的 293T (N) 细胞进行慢病毒包装。
4. 转染慢病毒质粒时，293T 细胞的密度应该控制在 60-80% 之间，密度过低，生产的慢病毒较少；密度过高，则影响质粒转染效率，减少慢病毒产量，导致慢病毒滴度降低。
5. 本试剂盒提供的 Chemifect (质粒 DNA 转染试剂) 与 Polybrene (慢病毒感染增强试剂)，保存在 4 °C，**严禁冻存**。
6. 为了您的健康，请穿实验服、佩戴乳胶手套和安全眼镜，使用安全工作台，避免慢病毒感染。

### 三、产品简介。

本产品包括慢病毒包装质粒(Lenti-Mix)、阳性对照质粒(lenti-GFP)、DNA 转染试剂(Chemifect)和慢病毒感染增强试剂(Polybrene)，其中包装质粒能够与已经构建的慢病毒骨架质粒联合，生产高滴度的慢病毒。

### 四、特点与优势。

1. 本试剂盒中的包装质粒能够与多家公司提供的慢病毒骨架质粒配合，生产高滴度的慢病毒。
2. 本试剂盒中的转染试剂 Chemifect，可以转染分子量较大的慢病毒质粒，保证转染效率，提高病毒产量。

### 五、自备试剂与耗材。

1. OPTI-MEM 培养液 (Gibco)
2. 293T 细胞，最好是 293TN 细胞 (System Biosciences)，病毒生产量大。

### 六、使用说明。

#### 1. 慢病毒包装。

- 1) 细胞培养。293T 细胞传代接种于细胞培养皿 ( $\Phi$  100 mm)，置于 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，24 h 后细胞密度达到 60%~80%。**(细胞密度不宜过大，否则影响转染效率)**
- 2) 转染。向 Lenti-Mix 中加入 1 mL OPTI-MEM 培养液，再加入 9  $\mu$ g 慢病毒骨架质粒 (目的蛋白过表达或 RNAi 质粒，或一管 GFP 对照质粒)，混匀，加入 54  $\mu$ l 转染试剂 Chemifect，混合 10 次，室温静置 30 min，滴加入细胞培养液中，轻轻摇匀。
- 3) 换液。转染 6-12 h，更换成新鲜的细胞培养液，继续培养。
- 4) 慢病毒收集。转染 48 h，收集第一批含有慢病毒的细胞培养上清 (暂时置于 4 °C 保存)，
- 5) 293T 细胞中再加入 10 ml 新鲜的细胞培养液，继续培养 24-48 h 后，收集第二批含有慢病毒的细胞培养上清 **(第二批细胞培养上清中的慢病毒滴度高于第一批)**。
- 6) 离心。含有慢病毒的细胞培养上清转入离心机，3,000 rpm (离心力为 870 g)，4 °C 离心 5 min，弃沉淀，上清转入新的无菌离心管，即是**含有慢病毒的细胞培养上清**。
- 7) 用慢病毒滴度检测卡 (**Cat: FRL-04**) 测定慢病毒滴度或利用本公司的慢病毒纯化试剂盒 (**Cat: FRL-02**) 纯化慢病毒。
- 8) 含有慢病毒的细胞培养上清可在 4 °C 保存 1 个月，长期保存应置于 -80 °C，但冻融一次，病毒感染效果降低 30-50%。

## 2. 慢病毒感染。

- 1) 目的细胞培养。目的细胞传代后接种到细胞培养皿 ( $\Phi 100$  mm) 中, 24 h 后细胞密度达到 30%-60%。
- 2) 慢病毒感染。弃培养液, 加入 5 ml 新鲜培养液和 5 mL 含有慢病毒的细胞培养上清液, 再加入 5-20  $\mu$ l 的 polybrene (与细胞培养液按照 1: 500-1:2000 稀释), 轻摇, 混匀。
- 3) 换液。病毒感染 12-24 h 后, 更换成新鲜的培养液, 继续培养, 若无细胞毒性, 可以不换液。
- 4) 检测。慢病毒感染 72 h, 荧光显微镜下观察 GFP 表达情况, 或检测目的基因表达水平。

## 七、效果鉴定。

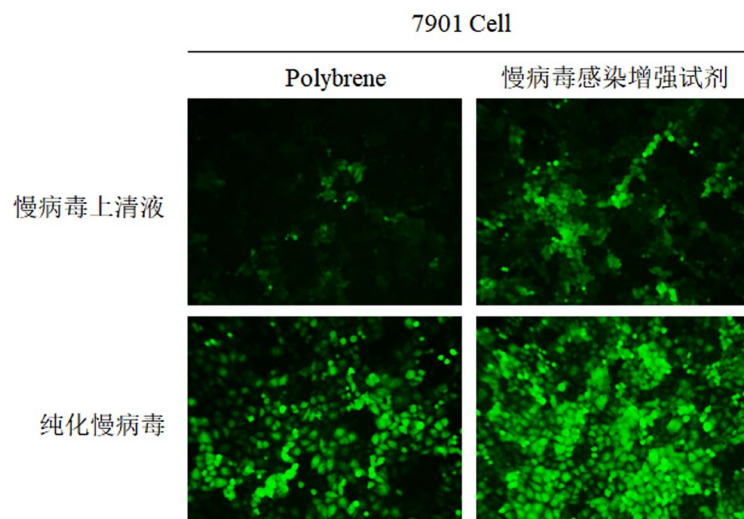


图 1. 慢病毒包装、纯化与感染目的细胞鉴定。

293TN 细胞包装慢病毒 (Lenti-GFP), 纯化后感染 7901 细胞。慢病毒纯化后显著增强其感染效果。

## 八、常见问题与分析。

问题	可能原因	解决方案
慢病毒滴度低	293T(N)细胞代数较高(超过 20 代)。	选择代数较低的 293T (N) 细胞进行慢病毒包装。
	293T 细胞密度不合适。	转染时, 293T 细胞密度控制在 60-80%之间。
	慢病毒骨架质粒纯度或浓度不合适。	慢病毒骨架质粒的 OD260/OD280 应控制在 1.7-1.9 之间, 浓度为 0.2 $\mu$ g/ $\mu$ l 以上。