

慢病毒快速纯化试剂盒

（磁珠型）

Lentiviral Rapid Purification Kit

产品编号	产品组成	规格	保存条件
FRL-02	Buffer LP	35 mL	4 °C
	Buffer LS	12 ml	4 °C
	Buffer LT	3 ml	4 °C
	Buffer LE	20 ml	4 °C
	Magnetic Beads（磁珠）	4 ml	4 °C
	过滤器 B (φ25 mm, 0.8 μm, 紫褐色)	10 个	RT 或 4 °C
	说明书	1 份	

一、运输与存储。

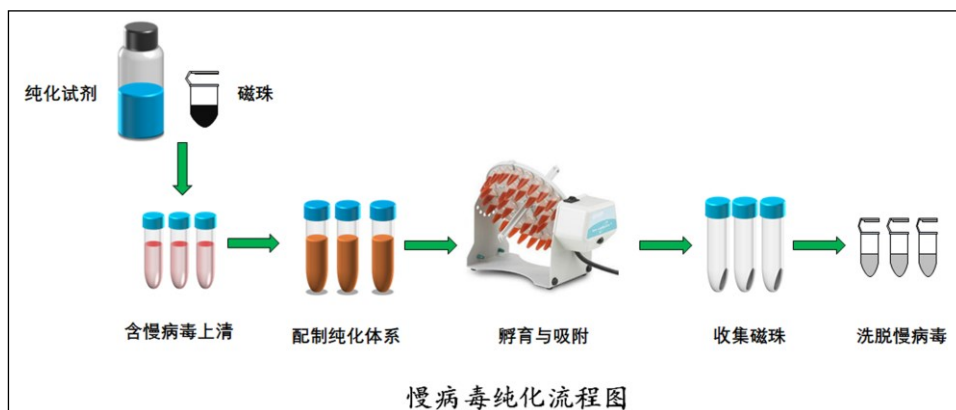
本产品低温（冰袋）运输，4 °C 保存，有效期 1 年。

二、注意事项（实验前阅读）。

1. 磁珠 4 °C 保存，严禁冻存，否则失效。
2. 纯化后的慢病毒，可以和细胞培养液按照不同比例混合（如 1: 1、1: 2、1: 3 等），添加到细胞培养皿中，感染目的细胞。
3. 磁珠长期静置存放会沉到管底部，吸取磁珠前请先震荡（Vortex）混匀。
4. 请使用试剂盒提供的过滤器 B 过滤纯化的慢病毒溶液，**严禁使用孔径为 0.2 μm 和 0.45 μm 的滤器过滤**纯化的慢病毒溶液，以免降低慢病毒滴度。
5. 纯化的慢病毒保存条件：4 °C，一个月；-80 °C，长期保存，但冻存导致慢病毒活性降低。
6. 为了您的健康，实验过程中请穿好实验服、佩戴乳胶手套和安全眼镜。

三、产品简介。

本产品是一款以磁珠为分离介质的慢病毒纯化试剂。在特定的缓冲体系中，表面修饰特殊基团的磁珠可高效吸附慢病毒，且在去除纯化体系后，磁珠上吸附的慢病毒可以被洗脱下来，完成慢病毒的纯化。纯化后的慢病毒，滴度提高 5 倍以上，并可直接用于动物体内注射。



四、特点与优势。

1. 本试剂盒纯化效率高，可以提取细胞上清中 90% 以上的慢病毒。
2. 本试剂盒纯化的慢病毒纯度高，只含有慢病毒和 PBS，可以直接用于细胞培养和动物注射。
3. 本试剂盒操作简单，不需要大型实验仪器，且能够在 2 h 内完成慢病毒的纯化实验。

五、使用说明。

1. 本产品纯化慢病毒的体系见表 1。

表 1. 慢病毒纯化体系表

试剂名称	试剂体积 (ml)	试剂比例
Buffer LP	3	15 %
Buffer LS	1	5 %
Buffer LT	0.2	1 %
Magnetic Beads (磁珠)	0.35	1.75 %
含慢病毒的细胞培养上清	15.45	77.25 %
合计	20	100 %

2. 慢病毒包装。慢病毒包装实验请按照各实验室成熟体系进行。
3. 收集含慢病毒的细胞培养上清。293T 细胞（直径为 100 mm 培养皿培养）转染慢病毒包装质粒及骨架质粒后 48 h，收集第一批细胞培养上清（10 ml），并加入 10 ml 新鲜的细胞培养液，继续培养 24 h，收集第二批细胞培养上清（第二批细胞培养上清中慢病毒滴度高于第一批）。

注意：含有慢病毒的细胞培养上清保存在 4℃ 冰箱中，严禁冻存，以免降低慢病毒活性。

4. 将收集的细胞培养上清转入离心管，1,000 rpm（离心力为 100 g）离心 5min，去除细胞碎片。
5. 慢病毒纯化。本产品提供的慢病毒纯化体系是 20 ml，各组份比例见表 1。参照表 1，将各种试剂与细胞培养上清依次加入 50 ml 离心管中，颠倒混匀。
6. 将装有慢病毒纯化体系的离心管转入旋转混合仪中，4 °C 旋转混合 60-90 min。
7. 孵育完毕，将离心管转入离心机，3000 g，4 °C 离心 5 min，沉淀磁珠，弃上清；或将离心管置于磁力架上，4 °C 静置 5-10 min，使磁珠聚集，弃上清。
8. 将离心管转入离心机，3000 g，4 °C 离心 2 min，吸除残余液体，以免降低慢病毒纯度。
9. 在离心管中加入 0.5-1 ml Buffer LE（PBS 或 ddH₂O 亦可），剧烈震荡（Vortex）1 min。
10. 将离心管转染离心机，7000 g，4 °C 离心 5 min，取出离心管，置于磁力架上，将上清转移至新的无菌 EP 管中，即为**纯化的慢病毒溶液**。
11. 利用试剂盒提供的针头过滤器 B，过滤纯化的慢病毒溶液，除去杂质。

注意：不可使用膜孔径为 0.2 或 0.45 μm 的滤器过滤慢病毒溶液，以免降低慢病毒滴度。

12. 纯化的慢病毒可立即用于滴度测定（用本公司的**慢病毒滴度快速检测卡（FRL-04）**，15 min 即可检测出慢病毒的大概滴度），或感染目的细胞，也可保存在 4 °C（**有效期 1 个月**）。
13. 感染细胞时，纯化的慢病毒溶液与细胞培养液按照不同比例混合，加入细胞中，并添加 Polybrene。
14. 慢病毒感染 24 h，换液，72 h 后观察 GFP 荧光强度或检测目的蛋白表达变化。

六、慢病毒纯化效果鉴定。

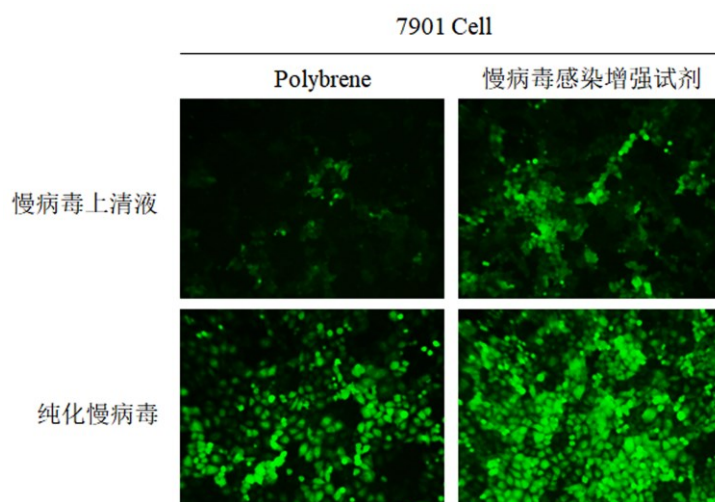


图 1. 慢病毒包装、纯化与感染目的细胞鉴定。

293TN 细胞包装慢病毒（Lenti-GFP），纯化后感染 7901 细胞，72 h 后荧光显微镜下观察绿色荧光，并拍照。

七、常见问题与分析。

问题	可能原因	解决方案
纯化慢病毒滴度低	细胞培养上清中的慢病毒滴度较低。	利用慢病毒滴度较高的细胞培养上清，重新纯化。
	含慢病毒的细胞培养上清用量较少。	增加纯化体系中慢病毒上清液用量，或扩大纯化体系。
	纯化试剂过期。	保证使用保质期内的试剂。
	磁珠冻存，吸附慢病毒能力降低甚至消失。	更换新的磁珠或试剂盒。
	未按规定体积添加磁珠，磁珠用量减少。	按照纯化体系要求，正确使用磁珠。
	未按照体系要求，随意更改体系中各试剂比例。	按照纯化体系要求，按比例添加试剂盒中的各成分到纯化体系中。
	磁珠与慢病毒上清液孵育时间偏短。	延长孵育时间。
	洗脱强度偏低。	增加 Vortex 强度，延长 Vortex 时间。
	慢病毒上清液被微滤膜过滤，慢病毒减少。	慢病毒上清液不可使用滤膜孔径为 0.2 和 0.45 μm 的滤器过滤。
	纯化的慢病毒溶液被微滤膜过滤，慢病毒减少。	纯化的慢病毒溶液不可使用滤膜孔径为 0.2 和 0.45 μm 的滤器过滤，请使用试剂盒提供的针头滤器（过滤器 B）过滤。
	慢病毒上清液被高速离心，导致慢病毒减少。	慢病毒上清液离心条件是：1,000 rpm（100 g），4°C，离心 5 min，去除细胞碎片等杂质即可。
纯化的慢病毒感染效率偏低	纯化的慢病毒用量较少。	增加纯化的慢病毒用量。
	Polybrene 用量偏低。	增加 polybrene 使用量
	细胞密度偏大。	慢病毒感染时，细胞密度控制在 70%以下。
	细胞状态差。	请使用对数生长期细胞做慢病毒感染。
	纯化的慢病毒反复冻融，导致活性降低。	纯化的慢病毒 4 °C 保存，1 个月用完。