

## 慢病毒包装专用转染试剂

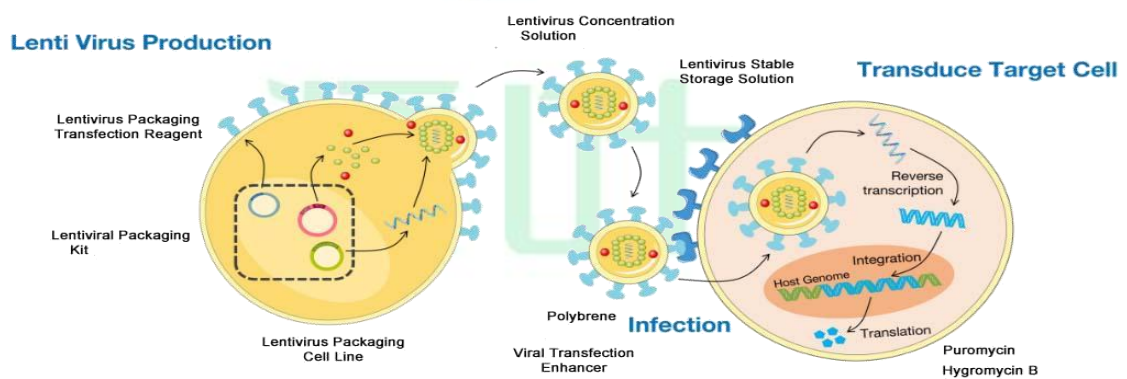
货号: R43719

储存条件: -20° C;避免反复冻融

有效期: 36个月

### 产品简介:

慢病毒是一种逆转录病毒,能使外源基因整合入宿主细胞的基因组,实现外源基因稳定、长期的表达,比一般的逆转录病毒具有更高的滴度和更广的宿主范围。携带外源基因的慢病毒载体与包装载体(产生病毒颗粒所需的辅助蛋白)一同转染包装细胞,即可进行病毒的包装。包装好的慢病毒为假型病毒(病毒感染目的细胞后不会再感染其他细胞,也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒,慢病毒中的毒性基因已被剔除并被外源性目的基因所取代),分泌到细胞外的培养基中,经过离心取得上清液后进行慢病毒浓缩,浓缩后的慢病毒液可以直接用于宿主细胞的感染,目的基因进入到宿主细胞后,经过反转录,整合到基因组,从而实现外源基因在宿主细胞中的表达(下图)。



Lentivirus Packaging Transfection Reagent 是一种基于阳离子高分子聚合物的新型转染试剂,优化的配方特别适合于慢病毒包装细胞系(HEK293T、HEK293FT 等)



的病毒包装，具有高效低毒、操作简单、重复性好等优点，能显著提高慢病毒载体在慢病毒包装细胞系中的包装效率，并能产生更高滴度的重组慢病毒，经该转染试剂包装获得的对照质粒病毒滴度可达  $10^8$  TU/mL，具有感染效率高、感染谱广等特点。此外，LentivirusPackaging Transfection Reagent 独特的配方使其可直接加入培养基中，血清的存在不会影响转染效率，这样可以减少去除血清对细胞造成的损伤。同时，转染后不需要除去转染试剂-核酸复合物或更换新鲜培养基。

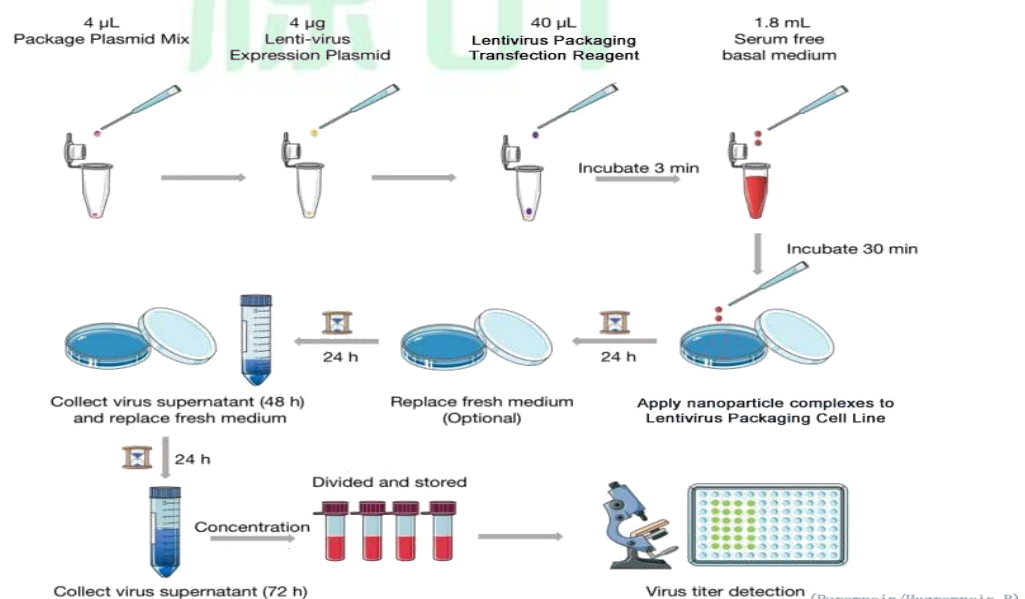
### 产品特点:

- \* 卓越的慢病毒包装效率——优化的配方特别适合于慢病毒包装细胞系的病毒包装，表现出卓越的转染效率和高滴度慢病毒表达水平。
- \* 细胞毒性低——作用温和，能较好地实现高转染效率与低细胞毒性之间的平衡
- \* 操作简单——转染后无需去除复合物或更换新鲜培养基。
- \* 具有化学成分明确、无血清、无动物源成分等特点，可获得高度重现性和批间可靠性。

### 适用范围

该产品优化的配方特别适合于慢病毒包装细胞系(HEK293T、HEK293FT 等)的病毒包装，能显著提高慢病毒载体在慢病毒包装细胞系中的包装效率，并能产生更高滴度的重组慢病毒。

### 实验流程概要





## 图 1. 采用 Lentivirus Packaging Transfection Reagent

进行慢病毒包装实验流程图(图中所示为包装 10 cm 皿的慢病毒所需试剂量)

**实验步骤** (以 10cm 皿包装慢病毒为例, 其他培养装置加样体积参考表一: 转染量度标准)

### 1. 细胞准备

转染前一天, 将  $4-6 \times 10^6$  个慢病毒包装细胞(HEK293T、HEK293FT、Lentivirus Packaging Cell Line 等)接种到 10 cm 细胞培养皿中, 使其在包装时密度为 70%-80%, 放置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱培养 16-24 小时。

\* 细胞状态会极大影响病毒包装效率, 待包装细胞应处于良好生长状态, 建议使用生长处于指数期、存活率大于 90% 的细胞进行慢病毒包装。

\* 该转染试剂与 Lentivirus Packaging Cell Line 配合使用, 可包装出更高滴度、更高表达水平的慢病毒。

### 2. 慢病毒包装

(1) 取 4  $\mu$ L 慢病毒包装辅助质粒混合物(Package Plasmid Mix)加入到 2 mL 离心管中, 加入 4  $\mu$ g 含有目的基因的慢病毒载体质粒, 轻轻混合, 加入 40  $\mu$ L 转染试剂与质粒混合, 室温孵育 3 分钟。

\* 慢病毒载体质粒需根据研究基因自行构建, 应使用无内毒素质粒抽提试剂盒进行质粒提取, 保证质粒 A260/A280比值为 1.8-2.0, 浓度不低于 500 ng/ $\mu$ L。溶解后的质粒切忌反复冻融, 需按照使用量进行分装并于-20°C保存。

(2) 往上述混合物中加入 1.8 mL 无血清基础培养基, 轻轻混匀, 在室温下静置 30 分钟, 形成转染试剂-核酸复合物。

\* 转染试剂-核酸复合物在室温下 4 个小时内保持稳定。

(3) 将上述 1.8 mL 转染试剂-核酸复合物轻轻地逐滴均匀加入 10 cm 皿慢病毒包装细胞中, 轻轻摇动培养皿混匀, 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养产毒。

### 3. 收获病毒



(1) 转染 24 小时后, 可选择弃去初始病毒上清液, 加入 10-15 mL 新鲜的完全培养基(含血清)至 10 cm 细胞培养皿中, 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱继续培养(此步骤可选)。

(2) 转染 48 小时后, 收集病毒上清液, 再加入 10-15 mL 新鲜的完全培养基(含血清)至 10 cm 细胞培养皿中, 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub>培养箱继续培养。

(3) 转染 72 小时后, 观察细胞状态并拍照, 进行二次病毒上清液收集, 与 48 小时收集的上清液混合, 800xg 离心 10 分钟以除去细胞碎片, 使用 0.45 μm 滤器过滤, 过滤后的上清液可直接感染目的细胞, 或使用慢病毒浓缩试剂 (5x) 浓缩后感染目的细胞。

\* 切忌反复冻融病毒, 冻融一次病毒滴度将降低 10-20%。 -80°C 保存的慢病毒最好在半年内使用。

表一: 转染量度标准

| 细胞培养装置规格  | 培养体系 (mL) | Total DNA (μg) | 转染试剂 (μL) | 无血清基础培养基体积 (μL) |
|-----------|-----------|----------------|-----------|-----------------|
| 6 孔板      | 2         | 2              | 8         | 400             |
| 60mm 皿    | 4         | 4              | 8-16      | 800             |
| 100mm 皿   | 10        | 10             | 20-40     | 1800            |
| 125mL 摇瓶  | 30-35     | 30-35          | 60-120    | 6000            |
| 500mL 摇瓶  | 120-140   | 120-140        | 250-500   | 25000           |
| 1000mL 摇瓶 | 240-280   | 240-280        | 500-1000  | 50000           |

#### 注意事项

1. 核酸质量: 想要获得最高的转染效率和最低的细胞毒性, 应选用高纯度、无菌、无污染、无内毒素的优质核酸。质粒中的内毒素是转染的大敌, 内毒素会导致转染效率显著下降, 特别是对内毒素敏感的细胞, 例如原代细胞、悬浮细胞、造血细胞等。推荐使用无内毒素质粒抽提试剂盒进行质粒提取, 保证质粒 A260/A280 比值为 1.8-2.0。同时, 需合理计算质粒用量, 转染过量的质粒可能会导致细胞毒性甚至死亡。

2. 包装细胞质量: 细胞状态会极大影响转染效率, 从而影响慢病毒质量, 建议使用生长处于指数期、存活率大于 90% 的细胞进行慢病毒包装。该转染试剂与



Lentivirus Packaging Cell Line 配合使用，可包装出更高滴度、更高表达水平的慢病毒。

3. 细胞密度：建议细胞传代后 12-24 小时内、细胞密度约为 70%-80% 时进行慢病毒包装。在实验过程中保证相同的接种条件，确保实验数据的可重复性。

4. 质粒与转染试剂的用量：DNA (total  $\mu\text{g}$ ) 与转染试剂 ( $\mu\text{L}$ ) 的推荐用量可以参考表一：转染量度标准。想要获得更适合您慢病毒包装体系的转染条件，可以根据推荐用量进行进一步的优化。

5. Lentivirus Packaging Transfection Reagent 可用于有血清培养基的转染，并且转染前后不需要换培养基。但是，制备转染复合物时要求用无血清基础培养基稀释 DNA 和转染试剂，因为血清会影响复合物的形成。

6. 所有慢病毒操作均需在 BSL2 级生物安全柜中进行。

7. 为了您的健康安全，请规范操作，穿戴实验服与手套开展实验。

8. 本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及治疗。

### 实验案例分析

1. 提前一天使用 10 cm 细胞培养皿培养 Lentivirus Packaging Cell Line，待细胞密度为 75% 左右开始包装慢病毒。

2. 取 4  $\mu\text{L}$  慢病毒包装辅助质粒混合物 (Package Plasmid Mix) 加入到 2 mL 离心管中，加入 4  $\mu\text{L}$  表达 GFP 的对照质粒 (Control Plasmid)，轻轻混合，加入 40  $\mu\text{L}$  转染试剂与质粒混合，室温孵育 3 分钟。

3. 往上述混合物中加入 1.8 mL 无血清 DMEM 基础培养基，轻轻混匀，在室温下静置 30 分钟，形成转染试剂-核酸复合物。

4. 将上述 1.8 mL 转染试剂-核酸复合物轻轻地逐滴均匀加入慢病毒包装细胞中，轻轻摇动培养皿混匀，置于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养产毒。

5. 转染 24 小时后，弃去初始病毒上清液，加入 10 mL 新鲜的完全培养基 (DMEM + 10% FBS) 至 10 cm 细胞培养皿中，置于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养。

6. 转染 48 小时后，收集病毒上清液，再加入 10 mL 新鲜的完全培养基 (DMEM + 10% FBS) 至 10 cm 细胞培养皿中，置于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养。

7. 转染 72 小时后, 观察细胞状态并拍照, 进行二次病毒上清液收集, 与 48 小时收集的上清液混合后, 800xg 离心 10 分钟以除去细胞碎片, 0.45  $\mu\text{m}$  滤器过滤, 使用 Lentivirus Concentration Solution (5x) 进行 10 倍浓缩, 使用 2 mL Lentivirus Stable Storage Solution 重悬慢病毒颗粒。

8. 孔稀释法测定病毒滴度, 使用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况, 并拍照记录, 实验结果如图 2 所示。

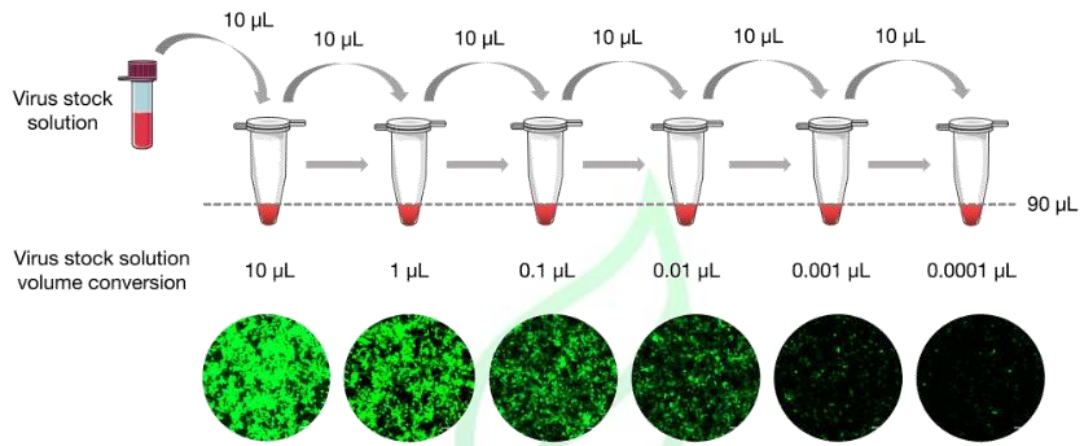


图 2. 采用 Lentivirus Packaging Transfection Reagent

包装慢病毒(GFP)进行滴度检测, 采用荧光显微镜检测 GFP 绿色荧光蛋白表达情况。