

慢病毒包装体系使用说明

本说明书适用于以下产品：

名称	货号
慢病毒包装体系	KLV3501
慢病毒包装体系（含 293T 细胞）	KLV3502
慢病毒包装体系（含转染试剂）	KLV3503
慢病毒包装体系（含 293T 细胞、转染试剂）	KLV3504

北京英茂盛业生物科技有限公司
北京市海淀区温泉路 45 号 4 号楼 9-602
Tel: 010-62495135
Email: order@inovogen.com
Web site: <http://www.inovogen.com>

产品内容

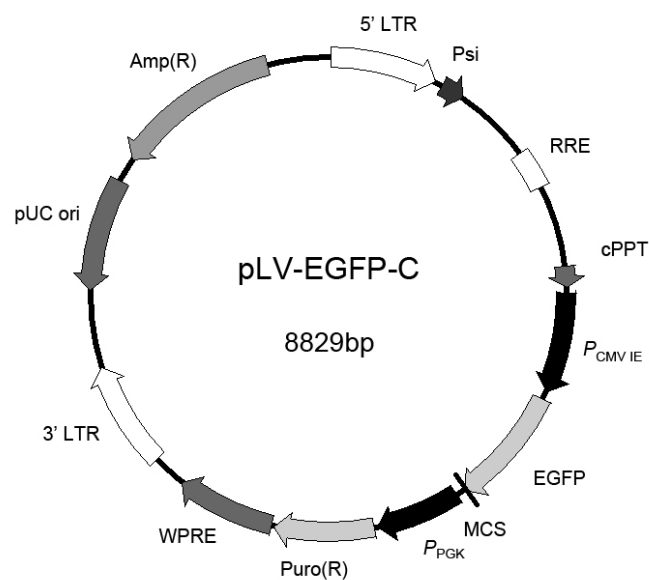
	KLV3501	KLV3502	KLV3503	KLV3504
慢病毒载体（过表达或RNA干扰载体任选一种）	✓	✓	✓	✓
辅助载体 pH1	✓	✓	✓	✓
辅助载体 pH2	✓	✓	✓	✓
HEK293T 细胞		✓		✓
Polyfect-V 转染试剂			✓	✓

载体采用质粒形式发货，请在收到质粒后放-20℃冻存，也可以直接转化大肠杆菌感受态进行质粒扩增。HEK293T 细胞采用干冰或培养瓶发货。请在收到细胞后根据附带说明书进行复苏或传代。

慢病毒载体

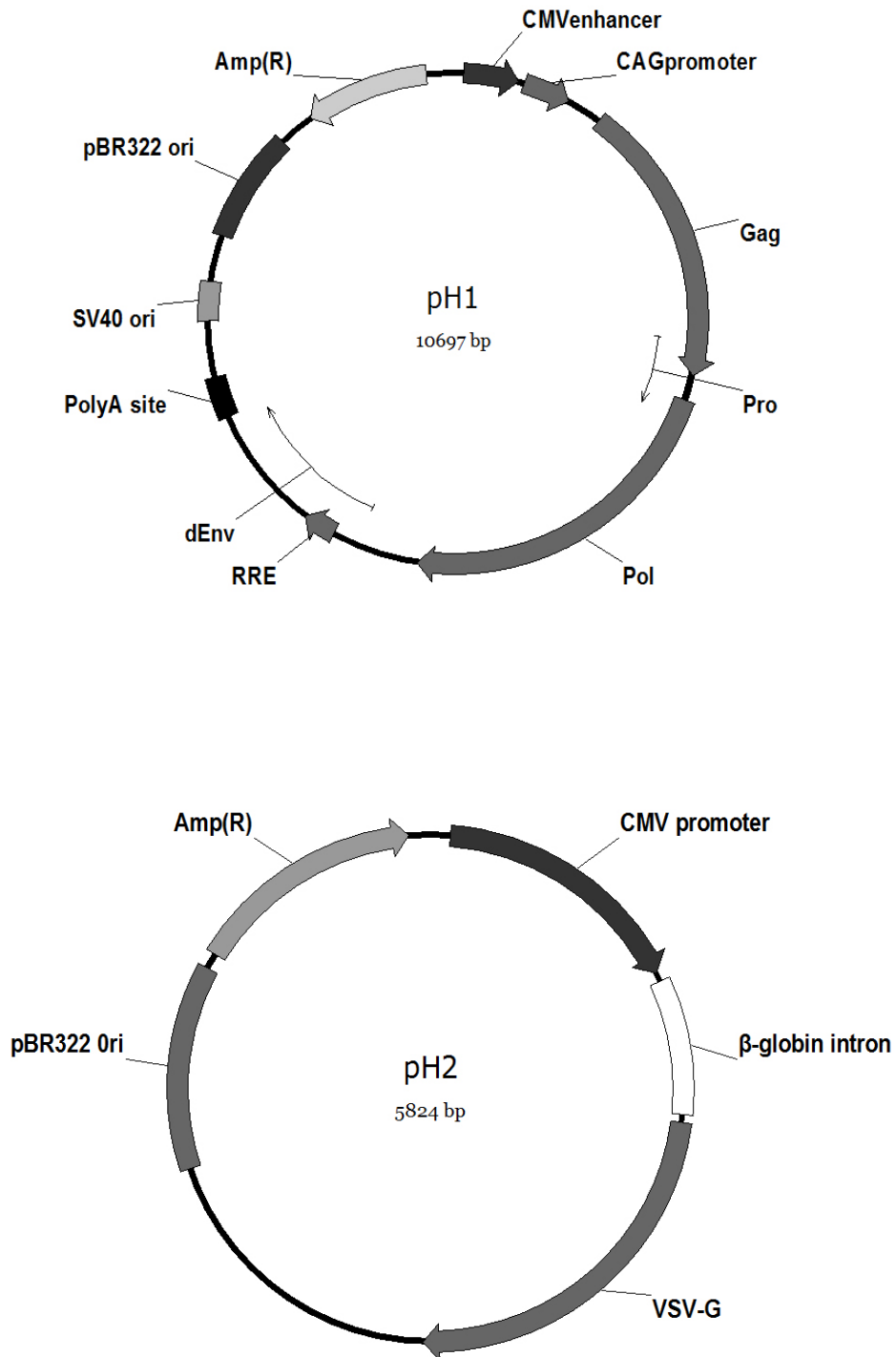
慢病毒载体中含有病毒整合和表达所需原件及表达外源目的基因的元件。外源基因通过载体中的多克隆位点插入慢病毒载体中进行表达。

pLV-EGFP-C 的载体图谱见下，本公司的其它慢病毒载体结构与之基本相似。其它载体信息见本公司网站 www.inovogen.com 或本说明书后面的附表。



慢病毒包装载体

慢病毒包装载体包括 pH1 和 pH2，表达生产病毒颗粒所需的病毒蛋白。载体图谱见下：



HEK293T 细胞

包装细胞的状态对病毒包装效果有直接影响。我公司保存的 293T 细胞为低次代 293T 细胞，细胞性状稳定。在高密度下生长 3 天仍可保持贴壁状态，持续产生病毒颗粒，因此可多次收获病毒，降低病毒包装实验成本。

Polyfect-V 转染试剂

Polyfect-V 转染试剂专为 293T 细胞转染及慢病毒包装研制,可以在细胞铺板同时进行转染，缩短病毒包装时间；无要求细胞处于生长对数期，细胞转染时密度可以很高；细胞毒性极低；质粒和转染试剂用量是普通转染试剂的 1/3 到 1/2 等显著优点；包装病毒时转染效率接近 100%，能提高病毒产量 3-5 倍。

慢病毒包装

概述:

病毒包装前需制备转染级慢病毒载体及两种包装载体。为保证转染效率，请采用 Qiagen 转染级试剂盒或类似质量级别试剂盒制备质粒。

以下采用我公司的 Polyfect-V 转染试剂 ([货号 P2010](#)) 为例说明慢病毒包装过程。您也可以采用其它品牌转染试剂进行慢病毒包装。转染试剂和质粒用量请参考生产厂家的说明书，也可以通过预实验决定。无论采用哪种转染试剂，3 种载体的相对比例应保持不变。

本例中病毒包装采用 10cm 培养皿。如需用其它规格细胞培养器皿进行转染和病毒包装，请根据细胞相对生长面积对培养液体积和转染试剂用量进行相应调整。

试剂

293T 培养基: DMEM 高糖培养基+10%FBS

病毒培养基: DMEM 高糖培养基+10%FBS, 丙酮酸 1mM。

Polyfect-V-V 转染试剂

转染级慢病毒载体, 包装载体 pH1 及 pH2。

快速转染法

在此方法中质粒转染和细胞铺板一次完成,传统病毒制备一次需要 72 至 96 小时,采用本方法仅需 48 小时。制备病毒滴度和传统方法没有差别。

1、 漩涡震荡混匀 Polyfect-V-v 转染试剂。

2、 准备 2 个离心管,按以下顺序分别制备质粒和转染试剂稀释液。

离心管 1 (质粒 DNA)

慢病毒载体 5 μ g

pH1 载体 3.75 μ g

pH2 载体 1.25 μ g

DMEM 无血清培养基 X μ l

总体积 500 μ l

离心管 2 (转染试剂)

Polyfect-V 转染试剂 20 μ l

DMEM 无血清培养基 480 μ l

总体积 500 μ l

3、 充分混匀。

4、 将转染试剂稀释液 (离心管 2) 加入质粒 DNA 溶液 (离心管 1) 中,立刻充分混匀。注意加入顺序非常重要。

5、 室温孵育转染混合液 15 分钟。

6、 在孵育转染混合液时,消化 HEK293T 细胞,用 293T 培养基制备成 0.6×10^6 /ml 细胞悬液。根据需要制备的病毒量,将细胞悬液放入 15ml 或 50ml 离心管备用。

7、 将每 1ml 转染混合液加入 10ml 细胞悬液,轻轻吹吸细胞混匀。

8、 将细胞悬液加入 10cm 培养皿,放入 37 $^{\circ}$ C 培养 24 小时。

9、 去除含有转染试剂的培养基,用 10ml 病毒培养基换液。

- 10、转染后 48 小时收集细胞培养上清。500g 离心 10min 去除细胞碎片。该上清可以直接用于慢病毒感染，也可以进行病毒滴度测定或病毒浓缩。如需长时间保存，可-80℃冻存。注意每次冻融将导致病毒滴度下降 2-4 倍。

常规转染法

- 1、转染前 24 小时，将 293T 细胞以 $4-5 \times 10^6/10\text{cm}$ 平皿密度接种，加入 10ml 293T 培养基 37℃，5% CO₂ 培养。细胞转染前密度应达到 80%-90%。
- 2、漩涡震荡混匀 Polyfect-V 转染试剂。
- 3、准备 2 个离心管，按以下顺序分别制备质粒和转染试剂稀释液。

离心管 1 (质粒 DNA)	离心管 2 (转染试剂)
慢病毒载体 5μg	Polyfect-V 转染试剂 20 μl
pH1 载体 3.75μg	DMEM 无血清培养基 480 μl
pH2 载体 1.25μg	总体积 500μl
DMEM 无血清培养基 X μl	
总体积 500μl	
- 4、充分混匀。
- 5、将转染试剂稀释液（离心管 2）加入质粒 DNA 溶液（离心管 1）中，立刻充分混匀。注意加入顺序非常重要。
- 6、室温孵育转染混合液 15 分钟。
- 7、将 1ml 转染混合液逐滴加入步骤 1 准备的细胞培养皿，前后晃动培养皿，充分混匀。
- 8、37℃培养。
- 9、4-6 小时后，用 10ml 新鲜的 293T 培养基换液。转染后 24 小时，用 10ml 病毒培养基换液。
- 10、转染后 48 小时收集细胞培养上清。500g 离心 10min 去除细胞碎片。该上清可以直接用于慢病毒感染，也可以进行病毒滴度测定或病毒浓缩。如需长时间保存，可-80℃冻存。注意每次冻融将导致病毒滴度下降 2-4 倍。

慢病毒滴度测定

在需要用确定的感染复数获得稳定的感染效果时，需要对病毒滴度进行测定。病毒滴度测定最好直接用收获和纯化的病毒液进行，也可以用冻存的病毒液。值得注意的是采用不同的细胞系和方法测定的病毒滴度会存在很大差异。测得的病毒滴度值和感染靶细胞所需的病毒滴度相差可能很大。但是每次采用相同的方法测定病毒滴度还是可以对病毒包装效果进行一个较为准确的衡量标准。

病毒滴度测定可以采用 Realtime-PCR、抗生素筛选细胞克隆法以及流式细胞对荧光细胞进行直接计数等。也可以采用商业的病毒滴度测定试剂盒。具体实验方法可以参考(R. H. Kutner, 2009)中的方法进行。

慢病毒感染靶细胞

以下方法可用于感染一般贴壁细胞如 293T 细胞，CHO 细胞等。在病毒感染时添加 polybrene 可以增加病毒感染效率。但是 polybrene 可能对某些细胞系产生毒性。在使用前可以通过预实验确定合适的 polybrene 浓度，一般为 4-12 μ g/ml。

- 1、感染病毒前 18-24 小时将细胞以合适的密度接种到培养皿。
- 2、室温溶解病毒液，混匀。
- 3、将适量病毒液和 polybrene 用细胞培养基稀释，加入细胞培养皿中。
- 4、继续培养 24 小时，用新的完全培养基替换病毒感染液。如果病毒液或 polybrene 对细胞生长有较大影响可以将病毒感染时间缩短至 6-8 小时。
- 5、病毒感染后 48-72 小时可以观测到外源基因表达。这时细胞可用于荧光检测或加入抗生素筛选稳定细胞株。

慢病毒载体

货号	名称	荧光标签	抗性基因
RNA 干扰慢病毒载体			
VL3101	pLVshRNA-EGFP	EGFP	-
VL3102	pLVshRNA-Puro	-	Puromycin
CMV 启动子基因过表达载体			
VL3001	pLV-Puro	-	Puromycin
VL3002	pLV-IRES-Puro	-	Puromycin
VL3003	pLV-IRES-Neo	-	Neomycin
VL3211	pLV-EGFP-N	EGFP	Puromycin
VL3212	pLV-ECFP-N	ECFP	Puromycin
VL3213	pLV-EYFP-N	EYFP	Puromycin
VL3214	pLV-mCherry-N	mCherry	Puromycin
VL3215	pLV-EGFP-C	EGFP	Puromycin
VL3216	pLV-ECFP-C	ECFP	Puromycin
VL3217	pLV-EYFP-C	EYFP	Puromycin
VL3218	pLV-mCherry-C	mCherry	Puromycin
VL3219	pLV-mTomato-C	mTomato	Puromycin
EF1α 启动子基因过表达载体			
VL3311	pLV-EF1 α -EGFP-N	EGFP	Puromycin
VL3312	pLV- EF1 α -ECFP-N	ECFP	Puromycin
VL3313	pLV- EF1 α -EYFP-N	EYFP	Puromycin
VL3314	pLV- EF1 α -mCherry-N	mCherry	Puromycin
VL3315	pLV- EF1 α -EGFP-C	EGFP	Puromycin
VL3316	pLV- EF1 α -ECFP-C	ECFP	Puromycin
VL3317	pLV- EF1 α -EYFP-C	EYFP	Puromycin
VL3318	pLV- EF1 α -mCherry-C	mCherry	Puromycin
VL3319	pLV- EF1 α -mTomato-C	mTomato	Puromycin

查询更详细的产品信息请访问本公司网站: www.inovogen.com