合生基因 SyngenTech

慢病毒包装试剂盒产品说明书

【产品组成】

产品名称	货号	规格
慢病毒包装试剂盒 (Lentiviral Packaging Kit)	BG20401S	20 assays
	BG20401L	40 assays

【储存条件】4 ℃ 保存

【保质期】12 个月（溶解后的质粒溶液需-20℃保存）。

【产品说明】

慢病毒包装试剂盒由优化的包装质粒混合物(Package Plasmid Mix) 、表达 EGFP 的对照质粒（Control Plasmid)、EpFect™ Transfection Reagent 组成。它属于第二代慢病毒包装体系，同时可兼容第二代和第三代慢病毒包装质粒。慢病毒中的毒性基因已经被剔除并被外源性目的基因所取代，属于假型病毒，即产生的慢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。慢病毒系统具有感染效率高，感染谱广等特点，可实现外源基因在宿主细胞中的稳定持续表达。经该试剂盒包装获得的对照质粒病毒滴度可达 10^8 TU/mL。

【操作步骤】

一、慢病毒载体准备

1. 获取含有目的基因的慢病毒载体：合生基因提供定制化慢病毒载体构建服务，多种启动子、多种抗性筛选标记、多种荧光标记可供选择，可实现基因的过表达、shRNA/miRNA 介导的基因沉默、CRISPR/Cas9 介导的基因敲除等。
2. 根据不同规格中包装质粒混合物(Package Plasmid Mix)及 EGFP control 质粒的量，使用前 ddH_2O 稀释成 1 μg/μL 的质粒溶液。

   注：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℃保存。

二、慢病毒包装

1. 细胞准备：转染前一天，将 3-5×10^6 的 293FT 或 293T 细胞接种到 10 cm 细胞培养皿中，放置于 37℃，5% CO_2 培养箱培养 16 h～24 h。

   注：细胞要充分消化，成团细胞影响转染效率。
2. 细胞转染：

   （1）取一支 1.5 mL EP 管（标记为 A 管），分别加入 300 μL Opti-MEM medium 及 40 μL EpFect™ Transfection Reagent 进行稀释，混匀，室温静止 5 min；

   （2）另取一支 1.5mL EP 管（标记为 B 管），加入以下试剂并混匀；

试剂名称	试剂数量
慢病毒载体（或 EGFP 对照质粒）	2.5 μL (1.0 μg/ μL)
慢病毒包装质粒混合物	7.5 μL (1.0 μg/ μL)
Opti-MEM medium	300 μL

   （3）将 A 管液体转入到 B 管内，混匀，室温静止 15-30 min；

   （4）将混合物逐滴均匀加入到 10 cm 皿中的 293FT 或 293T 细胞，轻微混匀，置于 37℃，5% CO_2 培养箱中培养.；

   （5）转染 6 h 后，吸去含有转染复合物的培养基，更换为 37℃预热的新鲜培养基。

   注：转染前细胞密度达 80%左右，细胞状态对于慢病毒包装至关重要。
3. 转染 48 h 后，收集病毒上清液，再加入 10-15 mL 新鲜的完全培养基（DMEM +10% FBS）至 10 cm 细胞培养皿中，置于 37℃，5% CO_2 培养箱继续培养。
4. 转染 72 h 后，可进行二次病毒上清液收集，与 48 h 收集的上清液混合后使用 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盒（BG20101）进行浓缩后-80℃保存。

   注：（1）切忌反复冻融病毒，冻融一次病毒滴度将降低10-20%。

   （2）-80℃保存的慢病毒最好在半年内使用。

三、病毒滴度测定

1. 测定前一天，将生长状态良好的293细胞消化计数后稀释至5×10^4/mL，加入96孔板，100 μL/孔，为每个病毒准备8-10个孔。放入37℃，5% CO_2培养箱中培养。
2. 取一定量的病毒液感染细胞：在EP管中做10倍梯度稀释，连续10个稀释度。稀释方法如下：每种病毒准备10个1.5 mL EP管，每管加入90 μL培养液，往第一个管中加入10 μL病毒原液，记作10^0；混匀后，吸取10 μL加入第二个管混匀，记作10^{-1}；依此类推（10^0~10^{-8}），在对应细胞孔中加入10 μL稀释好的病毒液并做好标记，培养48-72 h后观察结果。
3. 滴度计算：对于带有荧光标记的慢病毒可使用荧光计数法测定滴度。
4. 在荧光显微镜下观察结果，并数出最后两个有荧光的荧光细胞克隆数。

a) 假设为X和Y，则滴度（TU/mL）=（X+Y×10）×1000/2/X孔的病毒液的含量（μL）。

四、慢病毒感染目的细胞

VSVG包膜蛋白对不同的细胞和组织的亲嗜性有很大差异，在使用慢病毒感染目的细胞之前，需要查阅相关文献或进行预实验确定目的细胞的复感染指数（MOI, multiplicity of infection）。

预实验方案：

1. 按照上述步骤包装EGFP对照慢病毒及确定慢病毒滴度；
2. 实验前一天，将生长状态良好的目的细胞消化计数后稀释至5×10^4/mL，加入96孔板，100 μL/孔。放入37℃，5% CO_2培养箱中培养。
   注：悬浮细胞不需要提前一天接种，实验前将细胞计数接种后，直接加入病毒混合液即可。
3. 配制不同MOI梯度（1、10、100）的慢病毒 + polybrene + 培养基混合液；
   注：polybrene（BG20301）为常用的促感染试剂，能够显著提高病毒对细胞的接触及感染效率，一般使用浓度为2-12 μg/mL，但对某些细胞（如末端分化的神经元，DC细胞等）毒性较大，初次使用建议先做毒性测试。
4. 吸去96孔板中目的细胞的培养基，加入3中配制的慢病毒混合液，放入37℃，5% CO_2培养箱中继续培养；
5. 24 h后更换为新鲜培养基继续培养；
6. 感染48-72 h后，荧光显微镜下观察荧光表达情况，确认目的细胞的感染条件和感染参数，感染效率=荧光蛋白表达的细胞数/同一视野中明场总细胞数×100%；
7. 如预实验未能找到合适的感染条件，可调整MOI梯度再次检测。

正式实验方案：确定了目的细胞的最佳感染条件和MOI，可正式开始实验。

1. 包装目的质粒慢病毒；
2. 对目的质粒慢病毒进行收集浓缩及滴度测定；
3. 根据预实验测定的感染条件进行感染（感染流程与预实验相同）。