

第三代慢病毒包装/感染/浓缩试剂盒说明书

货号：100-508

产品简介：

信天翁第三代慢病毒包装/感染/浓缩试剂盒由加强了生物安全特性的第三代慢病毒包装辅助质粒混合物、DNA转染试剂，病毒感染增强剂，病毒浓缩液组成。使用第三代的慢病毒载体包装病毒，可将载有目的基因或shRNA的表达克隆包装成为具有转导效果的病毒颗粒，包装所得的病毒颗粒可介导目的基因或shRNA在哺乳动物细胞中高效表达。

本品具有高安全性，操作简便，包装迅速、高病毒滴度，一站式配齐全套试剂的优势。一个试剂盒可以用于5个10 cm细胞培养皿或25个35 mm细胞培养皿的HEK293T细胞生产病毒。和市售大多数病毒感染试剂盒不同，本产品还包括了感染增强剂，浓缩液以及对应的操作指南，不用再额外购买，一次性配齐了慢病毒从包装到感染的全套试剂。

产品组成

货号	组分	保存条件	规格
100-508A	包装辅助质粒混合物	-20 °C，一年	50 μL
100-508B	DNA转染试剂	4 °C，一年	100 μL
100-508C	病毒感染增强剂	4 °C，一年	25 μL
100-508D	病毒浓缩液	4 °C，半年	25 mL

需自备的关键试剂和细胞

1. HEK293T细胞及其对应的培养基。推荐使用含10%血清的DMEM。
2. 载有目的基因或shRNA的第三代慢病毒穿梭质粒。需用无内毒素质粒提取试剂盒提取，推荐使用信天翁无内毒素质粒提取试剂盒（货号400-201）。

使用说明

1. 转染HEK293T细胞

- 1.1. 接种细胞：转染前一天，将约 2.5×10^6 个细胞接种在10cm细胞培养皿中，使用含10%血清的DMEM培养18-22小时。转染前不用换液。
- 1.2. 质粒转染：
 - a. 准备2个无菌的1.5 mL 离心管，先分别加入300 μL无血清DMEM培养基。
 - b. 向1号管中的300 μL培养基中加入5μg 载有目的基因或shRNA的慢病毒穿梭质粒，再加入10 μL 包装辅助质粒混合物（组分100-508A），涡旋混匀10秒或者用移液枪吹打20次。
 - c. 向2号离心管中的300 μL培养基中加入20 μL DNA转染试剂（组分100-508B），涡旋混匀10秒或者用移液枪吹打20次。
 - d. 两支管子室温静置3分钟后，将2号管中的液体加入1号管中（**请勿颠倒添加顺序!**），迅速涡旋混匀30秒或者用移液枪吹打20次，再在室温静置15分钟。

e. 用移液枪将600 μ L混合物分散滴入细胞培养皿中，轻轻摇晃以混匀。

1.3. 换液：

转染10-16小时后，除去旧的培养基，更换为10 mL新鲜的含10%血清的DMEM培养基。吸掉的旧培养基和枪头须弃于盛有消毒液的废液杯中。

2. 收集病毒：

换液后继续培养48到72小时，于符合标准的生物安全柜中吸取细胞培养基于15mL离心管，1000 \times g离心5分钟，弃沉淀，上清液再用0.45 μ m针头过滤器过滤，以除去细胞和碎片。此时上清液中的病毒颗粒可直接用于滴度检测，感染目的细胞，或进行浓缩。

3. 病毒感染：

根据目的细胞的MOI加入适量的病毒和新鲜培养基，按照1：2000的比例加入病毒感染增强剂（组分100-508C），即10mL培养体积加入5 μ L病毒感染增强剂。先吸掉旧培养基，加入用9mL培养基稀释的病毒。再用1mL培养基稀释5 μ L病毒感染增强剂，再均匀散布加入培养皿，轻轻摇晃以混匀。感染24-48小时后，更换为新鲜培养基。若进行药物筛选，再培养12至24小时以让细胞表达抗性基因。

4. 浓缩病毒（可选）：

将慢病毒上清与试剂盒中的浓缩液（组分100-508D）按照3:1的比例混合（上清液3份，浓缩液1份），4 $^{\circ}$ C孵育4到6小时或过夜。初始阶段每隔30分钟混匀一次。孵育结束后，4000 \times g，4 $^{\circ}$ C，离心30分钟，弃上清。用初始体积1/10 - 1/100的DMEM或PBS重悬病毒颗粒，吹打均匀，保存于-80 $^{\circ}$ C。

5. 分装与保存：

将病毒上清液或浓缩后的病毒分装后保存于-80 $^{\circ}$ C。切勿反复冻融，冻融会降低病毒滴度。

注意事项

1. 实验操作时请穿实验服和佩戴手套，并在符合标准的生物安全柜中操作，废液和枪头须弃于盛有消毒液的废液杯中。
2. 本产品仅作科研用途！不能用于诊断和治疗。
3. 过滤病毒上清液只能使用PVDF或聚醚砜（PES）膜，不能用硝酸纤维素（NC）膜。
4. 质粒与转染试剂比例可根据细胞类型优化，对于难转染的细胞，可增加转染试剂的用量。
5. 包装所用的HEK293T细胞状态对病毒的包装很重要，尽量使用传代次数较少的细胞。谨慎操作，避免细胞培养基被细菌、真菌或支原体污染。
6. 表达目的基因的穿梭质粒过大时会影响包装效率。载体质粒容纳目的基因长度超过3 kb后会降低包装效率，进而影响病毒滴度。若不能控制插入片段的大小，需尽量选择较小的穿梭质粒。
7. 目的基因长度不同、对包装细胞危害程度不同，得到的慢病毒滴度会有差异。
8. 慢病毒对目的细胞有毒性，如果加入病毒后，目的细胞大量死亡，需降低感染的MOI值，并且缩短感染时间。