

E-Poly™ Fast-Lv 慢病毒

包装试剂盒使用说明

一、产品简介

E-Poly™ Fast-Lv 是一款性能优良的慢病毒包装试剂盒，试剂盒的组分包含包装质粒、对照质粒和转染试剂，适用于基因过表达和干扰慢病毒的包装及稳转细胞株的构建。仅需搭配带有目的基因的转移质粒，共转染 HEK293T 细胞，6h 即可看到荧光，30h 即可收获高滴度的慢病毒，简单便捷，操作方便。配套本公司提供的浓缩试剂，可得到更高滴度及纯度的慢病毒液。

二、产品信息

组分	名称	规格			储存条件
		1T	10 T	20 T	
包装质粒	Fast-Lv packaging mix	5 μ L	50 μ L	100 μ L	-20°C
对照质粒	Fast-Lv control vector	5 μ L	20 μ L	40 μ L	-20°C
转染试剂	E-Poly™ Transfection Reagent A	0.5 mL	1 mL*5	2 mL*5	2-8°C
	E-Poly™ Transfection Reagent B	30 μ L	300 μ L	600 μ L	2-8°C

三、运输及保存方法

冰袋运输；转染试剂需 2-8°C 保存；质粒需 -20°C 保存。

四、慢病毒操作注意事项

安全起见，慢病毒包装及使用过程中请使用生物安全柜（BL-2 级别），并规范佩戴手套、口罩、实验服，不要裸露双手及手臂的皮肤。如必须使用普通超净工作台，请不要打开风机。

小心病毒液溅出污染！如不慎洒落，请使用酒精擦拭工作台面，并用紫外照射 60min。

如需离心，请使用密封性好的离心管，或用封口膜封口后离心。

实验结束后，将所用到的实验废弃物如培养基、枪头、培养板等耗材放入 84 消毒液中浸泡，24h 后按普通实验固废液废处理。

操作完毕后，请使用洗手液及清水清洗双手。

五、前期准备

转移质粒构建及大提：构建携带目的基因或 shRNA 的转移质粒，并进行大提，获得高纯度无内毒素的优质质粒，所提质粒的 A260/280 需在 1.8-2.0 之间，且经电泳确认无杂带。

包装所用的细胞株：HEK293T，为贴壁依赖型上皮样细胞，选择低代数、状态良好的 HEK293T 细胞进行慢病毒包装。

质粒系统：对照质粒、包装质粒、携带目的基因或 shRNA 的转移质粒

慢病毒包装使用仪器与耗材：含 10%FBS、1%双抗的 DMEM 完全培养液、孔板/培养皿、无菌无酶枪头、移液器、0.45 μ m PES 滤器、注射器、冷冻离心机、细胞 CO₂ 培养箱。



六、慢病毒包装及浓缩纯化流程

6.1 反向转染包毒

E-Poly™ Fast-Lv 慢病毒包装试剂盒可进行反向转染包毒，即细胞种板同时加入质粒和转染试剂，无需提前种板的操作，30h 即可收到高滴度的病毒液。

Day1——铺板及转染

Reagent A 和 Reagent B 提前恢复至室温；

目的质粒（或对照质粒）（1mg/mL）与包装质粒（1mg/mL）按体积比 1: 1 混匀备用，为混合质粒溶液（1mg/mL）。

将生长状态良好的 HEK293T 细胞以完全培养液稀释至 120-160 万/mL，接种到包毒孔板中。种板细胞数推荐如下表。

	面积(cm ²)	细胞数/10 ⁴	培养基体积/mL	质粒量/μg
10cm 皿	55	1800-2400	15	30
6cm 皿	21	600-800	5	10
6 孔板	10	300-400	2.5	5
12 孔板	4.5	120-160	1	2
24 孔板	2	60-80	0.5	1

配液：以 6cm 皿包毒为例，取 10 μL 混合质粒溶液，加入 500 μL Reagent A，混匀后加入 30 μL Reagent B，吹打混匀，室温孵育 10-20min。取全部复合液滴加至 6cm 皿（含 5mL 细胞悬液）中，吹打混匀，此时孔板内质粒浓度为 2 μg/mL。于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养，6h 后，小心弃除细胞上清（此时上清中已含少量慢病毒，需收集进行灭菌处理或 84 消毒液稀释），换成 5mL 预热的完全培养基，放入培养箱继续培养。

对于其它孔板包毒，以培养基体积折算质粒、Reagent A 和 Reagent B 用量即可。

注：反向转染包毒推荐质粒浓度为 2 μg/mL；为保证最大出毒量，细胞数需按照推荐量接种，换液时间建议严格按照 6h。

Day 2-3——病毒收集与浓缩

病毒收集：收集换液后 24h 的上清，使用 0.45 μm PES 无菌过滤器过滤除去细胞碎片。若需收集更多病毒，可将第一批的上清放至 4℃ 储存，重新加入新鲜的培养基，继续培养 24h 后再次收集上清液，两批混合处理。对病毒进行分装保存，可以直接用于下游实验。如果对病毒的滴度及纯度有较高要求，可对病毒原液进行浓缩与纯化。注意病毒液切忌反复冻融，建议浓缩后直接用于转染，或浓缩后分装成小体积单独使用。

病毒浓缩：使用本公司的慢病毒浓缩液（FZ-012）进行病毒浓缩，取过滤后的病毒原液，按病毒原液的 1/4 体积加入病毒浓缩液，混匀后 4℃ 放置，每 30min 混合一次，共进行 4 次后，4℃，4000g，离心 30min，此时离心管底通常可见白色沉淀（有时沉淀不可见），小心吸弃上清后静置离心管 1~2min，吸走残余液体，再加入适量的慢病毒溶解液（PBS 或培养基），使用移液器小心吹打 20-30 次，重悬病毒沉淀。100 μL/管分装并冻存于 -80℃。



6.2 正向转染包毒

如细胞数偏少、包毒时间富裕，选择正向转染包毒，可更节约转染试剂及质粒。正向转染包毒，即提前一天将细胞种板，待细胞 24h 贴壁生长后再进行转染包毒。

Day 1-----铺板

转染前约 24h，将生长状态良好的 HEK293T 细胞，以完全培养液稀释，接种到包毒孔板中，转染前最好要达到 80%-90%的汇合度。种板细胞数推荐如下表。

	细胞数/10 ⁴	培养基体积/mL	质粒量/μg
10cm 皿	400-600	10	10
6 孔板	80-120	2	2
12 孔板	40-60	1	1
24 孔板	20--30	0.5	0.5
T25	200-300	5	5

Day 2-----转染

Reagent A 和 Reagent B 提前恢复至室温；

目的质粒（或对照质粒）（1mg/mL），包装质粒（1mg/mL），按体积比 1: 1 混匀备用。

配液：以 10cm 皿包毒为例，取 10 μL 混合质粒，加入 500 μL Reagent A，混匀后加入 30 μL Reagent B，吹打混匀，室温孵育 10-20min。取全部复合液滴加至 10cm 皿（含 10mL 完全培养液）中，此时质粒浓度为 1 μg/mL。于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养，6h 后，小心弃除细胞上清（此时上清中已含少量慢病毒，需收集进行灭菌处理或 84 消毒液稀释），换成 10mL 预热的完全培养基，放入培养箱继续培养。

对于其它孔板包毒，以培养基体积折算质粒、Reagent A 和 Reagent B 用量即可。

注：正向转染包毒推荐质粒浓度为 1 μg/mL；为保证最大出毒量，细胞数需按照推荐量接种，换液时间建议严格按照 6h。

Day 3-----培养及观察

对于目的质粒带有荧光标记的，可用荧光显微镜观察到细胞表达荧光。

Day 4-5-----病毒收集与处理

病毒收集：收集转染换液后 48h 时的上清，使用 0.45 μm PES 无菌过滤器过滤除去细胞碎片。若需收集更多病毒，可将第一批的上清放至 4℃ 储存，重新加入 10mL 新鲜的培养基，继续培养 24h 后再次收集上清液，两批混合处理。

病毒浓缩：同反向包毒步骤。



七、慢病毒滴度测定

(1) 测定前,将生长状态良好的 HEK293T 细胞铺入 96 孔板,每孔加 $0.5-1 \times 10^4$ 细胞,体积为 $100 \mu\text{L}$ 。含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 培养基, 5% CO_2 , 37°C 培养过夜。

(2) 种板次日,用 DMEM 完全培养基对病毒原液进行 10 倍的梯度稀释: 准备 8 个无菌 EP 管, 每管加入 $180 \mu\text{L}$ 细胞培养基, 取待测定的病毒样品 $20 \mu\text{L}$ 加入到第一个管中 ($100 \mu\text{L}$ 含病毒原液 $10^1 \mu\text{L}$), 混匀后, 取 $20 \mu\text{L}$ 加入到第二个管中混匀 ($100 \mu\text{L}$ 含病毒原液 $10^0 \mu\text{L}$), 继续相同的操作直到最后一管。(每个梯度可做三复孔, 以减少实验误差)。

(3) 选取所需的细胞孔, 吸去 96 孔板中原有的培养基, 分别加入 $100 \mu\text{L}$ 含病毒原液 10^{-2} 到 $10^{-6} \mu\text{L}$ 的培养液, 每个病毒量加 3 个平行孔, 并做好标记。小心操作, 不要吹起细胞, 放入培养箱培养。培养 24 小时内不要换液, 培养 24h 后, 可根据细胞状态适当补液或更换培养基以维持细胞正常生长。

(4) 感染 72 小时后, 观察荧光表达情况, 统计荧光细胞个数。若病毒本身只带有 Puromycin 筛选抗性, 则感染后 48 小时加入抗性药物 Puromycin, 继续培养 2 天, 观察细胞生长状况, 计算具有抗性的细胞数。

(5) 滴度的计算: 72 h 后用荧光显微镜对荧光阳性细胞进行计数, 数出最后两个能观察到荧光的孔内的荧光细胞数, 计算两孔平均滴度, 如: 96 孔板 293T 细胞, 在加入 $10^{-4} \mu\text{L}$ 病毒原液的孔中观察到 14 个带有荧光的细胞, 加入 $10^{-5} \mu\text{L}$ 病毒原液的孔中观察到 4 个带有荧光的细胞, 则病毒滴度计算方式为:

带有荧光的细胞数除以病毒原液量: $[14/(10^{-4})+4/(10^{-5})]/2=2.7 \times 10^5$, 单位为 $\text{TU}/\mu\text{L}$, 也就是 $2.7 \times 10^8 \text{ TU/mL}$ 。建议采用 3 个平行样品进行最终滴度的计算。

八、慢病毒的储存

1. 在病毒的使用过程中应尽量避免反复冻融, 每次冻融滴度可下降 10% 以上, 可根据每次实验用量进行分装。包装好的慢病毒建议分装后标记(病毒名称, 年-月-日), 置于 -80°C 冰箱保存, 储存期限为半年。若超过半年, 建议使用前重新测定滴度。若短时间内 (3-7 天) 进行实验, 也可置于 4°C 保存。

2. 病毒的稀释

如需稀释病毒, 可以先将病毒冰浴融化, 再用 PBS 或不含血清的培养基稀释混匀后使用, 为保证病毒滴度, 建议尽快使用完毕。

