



艾迪基因  
EDITGENE

加速基因编辑进程,造福人类健康

www.edgene.cn



# 艾迪基因慢病毒包装试剂盒

## EDITGENE Lentiviral Packaging Kit

### 产品说明书



中国总部: 020-3223-8856

美国办事处: 833-2263234

总部地址: 广东省广州市黄埔区科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器D栋5F





## 目录

▶ 产品信息	3
▶ 产品概述	3
▶ 产品组分	3
▶ 慢病毒包装所需其他材料	4
▶ 实验流程介绍	4
1. 流程示意图	4
2. 慢病毒载体制备	5
3. 慢病毒包装	5
4. 慢病毒浓缩	6
5. 滴度测定	6
6. 慢病毒感染预实验	7
7. 病毒感染正式实验	9
▶ 常见的问题及其解决方案	9
▶ 注意事项	10
▶ 为什么选择艾迪基因	11
▶ 附录	12





## 慢病毒包装试剂盒说明书

### ▶ 产品信息

货号	规格
EDLV-L01	10T
EDLV-L02	20T

### ▶ 产品概述

慢病毒包装试剂盒由经优化的包装质粒、表达 GFP 蛋白的对照质粒、高效转染试剂及慢病毒浓缩试剂组成, 具有兼容多种质粒系统、包装时间周期短、病毒滴度高、操作简便的优势, 非常适合于病毒包装初试者。

### ▶ 产品组分

试剂盒成分	储存条件	10T	20T
Lentipac-Mix 包装质粒	-20 °C	200 µL	400 µL
GFP Control Plasmid 对照质粒	-20 °C	20 µL	20 µL
Trans-PEI 转染试剂	4 °C	70 µL	150 µL
LentiCon-PEG 病毒浓缩液	4 °C	40 mL	80 mL

**注意:** -20 °C保存的 Lentipac-Mix 包装质粒和 GFP Control Plasmid 对照质粒避免反复冻融, 使用前于 4 °C融化, 如果需要多次使用, 建议在第一次融化后分装保存。





## ▶ 慢病毒包装所需其他材料

- (1) 表达目的基因的慢病毒载体质粒。
- (2) 慢病毒包装及滴度检测所用工具细胞：HEK 293T（EDITGENE Cat No.EDC2024001）
- (3) 细胞培养所需试剂：opti-MEM（Gibco Cat No.31985070）、PBS（Beyotime Cat No.ST476）、DMEM（Gibco Cat No.C11995500BT）、FBS（Gibco Cat No.FBS-S500）。
- (4) 实验耗材：培养皿、离心管、吸头、移液管等。

## ▶ 实验流程介绍

将目的基因慢病毒载体质粒及 Lentipac-Mix 包装质粒在 Trans-PEI 转染试剂的辅助下共转染到 293T 细胞中，细胞上清液(含慢病毒)经 0.45  $\mu\text{m}$  PES 滤膜过滤后即获得慢病毒，根据实验需要选择进行慢病毒浓缩，使用荧光计数法或 QPCR 法检测病毒滴度，根据病毒滴度及靶细胞 MOI 进行慢病毒感染目的细胞后，经抗生素、荧光等相应的筛选，完成细胞稳转。

### 1. 流程示意图

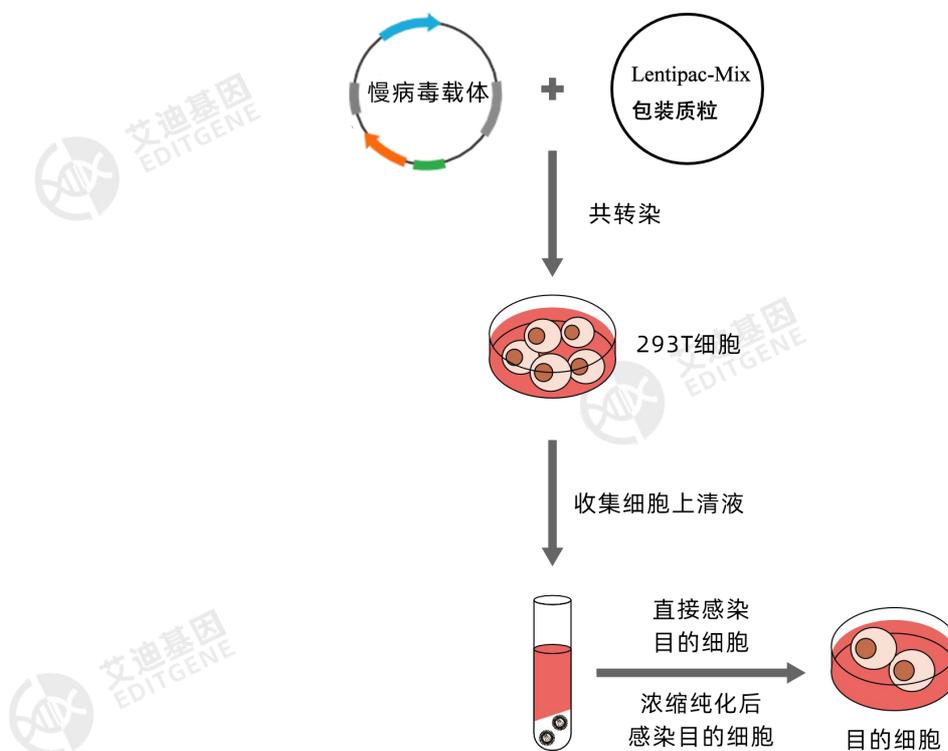


图 1 慢病毒包装流程示意图





## 2. 慢病毒载体制备

在进行慢病毒包装之前,您需要先获得您感兴趣的**目的基因慢病毒载体**,该载体可能表达目的基因、表达 shRNA 或表达 microRNA 等。艾迪基因现有以下慢病毒载体,更有多种启动子,多种筛选标记,多种表达标签或报告基因可以选择定制,以满足您不同的实验需求,制备好慢病毒载体后,根据预期的病毒包装量,确定需要的质粒用量并进行质粒抽提。

**注意:**为获得高的转染效率,需要保证质粒的质量,建议采用高纯度质粒抽提试剂盒(OMEGA Cat No.D6950-02)抽提质粒,质粒 A260/A280 通常在 1.8~2.0 之间。

## 3. 慢病毒包装

将 Lentipac-Mix 包装质粒 和 GFP Control Plasmid (或目的基因慢病毒载体质粒) 共转染入 293T 包装细胞中。

以下操作以 100 mm 培养皿为例使用其他培养器皿时,需要根据不同的底面积调整相应的用量。

- (1) 开始包装前 24 h 传代 293T 细胞,接种  $3.6 \times 10^6$  个细胞于 100 mm 细胞培养皿中,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养,包毒前细胞密度 70%左右;
- (2) A 液配制:取 20  $\mu\text{L}$  的 Lentipac-Mix 包装质粒、20  $\mu\text{L}$  的 GFP Control Plasmid 对照质粒(或 10  $\mu\text{g}$  目的基因慢病毒载体质粒)与 80  $\mu\text{L}$  的 Opti-MEM 混合均匀;
- (3) B 液配制:取 30  $\mu\text{L}$  (按 1  $\mu\text{g}$  质粒加入 3  $\mu\text{L}$  的转染试剂)的 Trans-PEI 转染试剂与 70  $\mu\text{L}$  的 Opti-MEM 混合均匀;
- (4) 将含有 B 液滴加到 A 液中,用移液器轻轻混匀,室温孵育 15-20 min;
- (5) 换液 293T 细胞 12 mL 的完全培养基;
- (6) 将 200  $\mu\text{L}$  混合液滴加入 293T 细胞的培养液中,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$  培养;
- (7) 培养 8 h 后,更换含 20% FBS 的 DMEM 培养基 12 mL,于  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$  中继续培养;
- (8) 转染 48 h 后,收集细胞上清液,800 g 离心 10 min;
- (9) 用一次性针管吸取上清,用 0.45 mm PES 滤膜过滤至 50 mL 离心管中;
- (10) 过滤后的病毒液根据实验需要可选择慢病毒浓缩,如不需要,请及时分装后液氮速冷至  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存;

**注意:**首次进行包装慢病毒,建议使用试剂盒的 GFP control plasmid 进行预实验。





#### 4. 慢病毒浓缩

- (1) 向病毒液中加入 4mL 的 LentiCon-PEG 病毒浓缩液, 并立即颠倒混匀, 放置在冰上, 每 30 min 颠倒 5 下, 共操作 5 次, 静置在 4°C 冰箱内过夜;
- (2) 注意事项: 白色沉淀物为病毒沉淀, 静置过夜步骤可适当延长至 1 周以内, 延长静置时间对病毒滴度有一定提升;
- (3) 预冷离心机至 4 °C, 离心 4000 g, 20 min;
- (4) 在细胞超净台中, 吸取上清液, 用 1/10-1/100 体积的 PBS 重悬病毒沉淀;
- (5) 收集好的病毒及时分装后液氮速冷至 -80 °C 冰箱保存。

**注意: 建议收毒完成 3 天内直接使用慢病毒转染细胞, 可无需液氮速冷至 -80°C 保存, 冻存对慢病毒活性影响较大;**

#### 5. 滴度测定

##### ● 荧光计数法

技术原理: 通过将慢病毒与靶细胞共培养, 然后使用荧光显微镜观察和计数感染后表达荧光蛋白的细胞数量来测定滴度。这种方法可有效测定病毒的活性单位 (TU/mL)。

- (1) 测定前一天, 铺板 293T 细胞, 96 孔板, 每个孔加  $5 \times 10^3$  个细胞, 体积为 100  $\mu$ l。
- (2) 梯度稀释病毒样品, 准备 8 个 Ep 管, 每个管子中加入 90  $\mu$ l 的完全培养基, 取待测定的病毒样品 10  $\mu$ l 加入到第一个管中, 混匀后, 取 10  $\mu$ l 加入到第二个管中, 继续相同的操作直到最后一管。
- (3) 标记孔板, 加入相应浓度 90  $\mu$ l 相应浓度的病毒溶液。
- (4) 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 培养 24 h, 加入新鲜培养基 100  $\mu$ l。
- (5) 48 h 后, 观察荧光表达情况, 统计荧光细胞个数或用 FACS 计数。若病毒本身只带有 Puromycin 筛选抗性, 则感染后 48 h 加入相应的抗性药物持续筛选 6-7 天, 观察细胞生长状况, 计算具有抗性的细胞数。
- (6) 观察各视野中的荧光细胞比例, 选取荧光细胞比例接近 50% 的视野计算病毒滴度, 计算方式如下:

病毒滴度 (TU/mL) = 荧光细胞数量 (或抗性细胞数量) / 病毒体积 (mL)





### 示例：GFP 测定病毒滴度

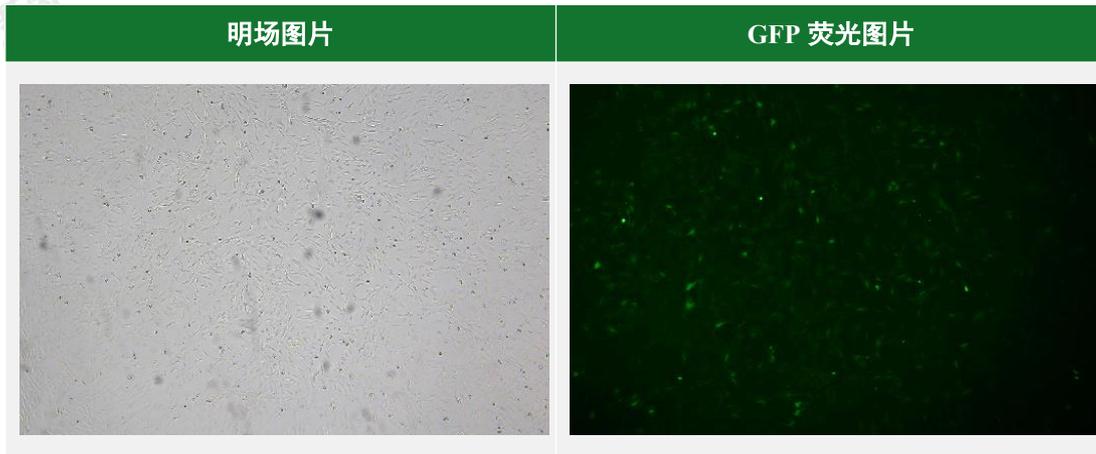


图 2  $10^{-4}$  mL 慢病毒转染  $5 \times 10^3$  个 293T 细胞，荧光细胞比例约为 50%；

结论：该病毒滴度为  $5 \times 10^3 \times 50\% / 10^{-4} = 2.5 \times 10^7$  TU/mL

#### ● QPCR 检测法

技术原理：用特异性引物能够对以 HIV-1 为结构基础的慢病毒样品的 RNA 基因组的保守序列进行特异性扩增，通过 qRT-PCR 对产物进行实时监测。用标准品扩增得到的 CT 值绘制标准曲线，将待测病毒样本反应的 CT 值带入标准曲线，计算得到病毒样本中的 RNA 基因组拷贝数，即病毒颗粒数 (copies/mL)。

操作步骤详细请参考相关试剂盒说明书 (Takara Cat No. 631235)。

## 6. 慢病毒感染预实验

- (1) 实验前一天，以  $3 \sim 5 \times 10^4$  cell/mL 的 293T 细胞浓度接种 96 孔培养板中的 10 个孔，体积为 90  $\mu$ l。
- (2) 慢病毒感染优化实验，分为三组，每组设置 3 个不同梯度的 MOI (100、10、1) A. 完全培养基，加病毒感染；B. 含 5  $\mu$ g/ml Polybrene 的完全培养基，加病毒感染；C. 含 10  $\mu$ g/ml Polybrene 的完全培养基，然后加病毒感染。
- (3) 依据不同 MOI 稀释相应浓度的病毒，将稀释后的病毒液加入对应孔中。
- (4) 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h，更换新鲜培养基。
- (5) 细胞感染 3-4 天后，在荧光显微镜下观察荧光表达情况。对于生长缓慢的细胞，可以适当延长观察时间，中途可以换液，保持细胞活力。
- (6) 通过观察细胞感染效果，确认目的细胞的感染条件和感染参数。感染效率 = 荧光细胞数 / 同一视野中总细胞数  $\times 100\%$ 。





(7) 如果预实验中没有找到较高感染效率的感染条件和合适的 MOI，可以考虑提高病毒用量重复实验或用适当的抗生素进行筛选。

**注意：**以上的操作是针对贴壁细胞的。悬浮细胞的区别主要在细胞接种上，它不需要提前一天接种。实验前将细胞离心后悬浮在不同的培养基中，计数接种后，就可以加入病毒

#### 示例：人胚肾细胞 2V6.11 转染预实验

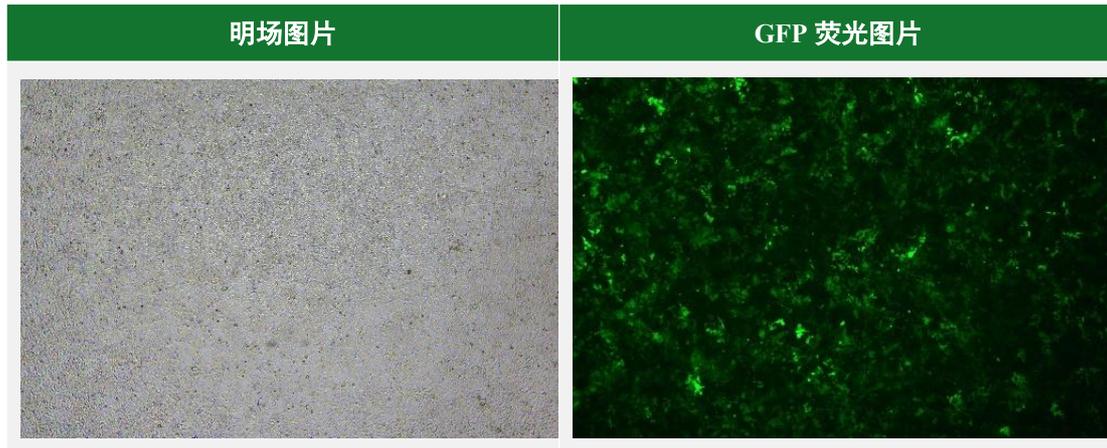


图 3 MOI=3, polybrene=10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的条件下, 2V6.11 细胞转染效果

结论：2V6.11 细胞在 MOI=3, polybrene=10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的条件下, 转染效率在 80%以上。

**注意：**Lentivirus 表达时间较慢，部分细胞感染后 72-96h 甚至更长时间可以观察到 GFP 荧光。感染后期请根据细胞生长的情况对细胞进行及时换液和传代，以保证细胞良好的生长状态。





## 7. 病毒感染正式实验

根据预实验确定的 MOI 及 polybrene 转染条件, 计算相应的病毒、试剂用量, 实验步骤参照预实验即可, 不同培养器皿所推荐的细胞数量及相应的培养体积可参照下表进行:

器皿	底面积 (cm <sup>2</sup> )	参考接种细胞数量 (个)	培养体积 (mL)
35 mm	8.8	$0.3 \times 10^6$	2
60 mm	21.5	$0.8 \times 10^6$	5
100 mm	56.7	$2.2 \times 10^6$	12
6-well	9.6	$0.3 \times 10^6$	1 to 3
12-well	3.5	$0.1 \times 10^6$	1 to 2
24-well	1.9	$0.05 \times 10^6$	0.5 to 1.0
48-well	1.1	$0.03 \times 10^6$	0.2 to 0.4
96-well	0.32	$0.01 \times 10^6$	0.1 to 0.2
T-25	25	$0.7 \times 10^6$	3 to 5
T-75	75	$2.1 \times 10^6$	8 to 15
T-175	175	$4.9 \times 10^6$	35 to 53
T-225	225	$6.3 \times 10^6$	45 to 68

### ► 常见的问题及其解决方案

**病毒滴度低:** 可能与细胞状态、质粒提取质量、目的基因片段大小和序列、收毒时间等因素有关。为提高病毒滴度, 应确保使用高纯度无内毒素的质粒, 选择合适的细胞株和转染条件, 并在适当的时间收集病毒上清。

**目的基因表达不稳定:** 这可能是由于基因整合位点的随机性导致的。为了稳定目的基因的表达, 可以选择使用具有诱导表达功能的病毒载体。

**细胞毒性:** 慢病毒感染的细胞可能会出现细胞毒性, 影响细胞生长和存活。为了降低细胞毒性, 可以选择对细胞毒性较低的病毒载体和包装质粒, 并优化实验条件, 降低感染病毒颗粒浓度。

**免疫反应:** 慢病毒感染过程中可能会引起机体产生免疫反应。为了减轻免疫反应对实验结果的影响, 可以在病毒感染后添加免疫抑制剂。





**转染效率低：**可能与转染试剂的选择、细胞状态、质粒质量等因素有关。应确保使用高质量的转染试剂，并优化转染条件，如细胞密度和转染时间。

**慢病毒浓缩效率低下：**如果使用病毒浓缩液，需要注意与病毒原液混合后必须置于低温环境，以产生缓慢的沉淀析出。室温会影响试剂成分的析出，从而导致浓缩效率低下。

**病毒感染力低：**可能是由于病毒载体或包装质粒的质量问题，或者转染过程中出现了问题。提高病毒感染力可以通过使用高质量的病毒载体和包装质粒，同时优化转染条件来实现。

**GFP 荧光信号弱：**可能与进入宿主细胞内慢病毒颗粒数较少、细胞自身的增殖状态较差、细胞种类、观察时间较早等因素有关。一般慢病毒感染细胞 3 天左右荧光信号最强。

## ► 注意事项

- (1) 本产品仅供实验室作为科研目的使用，请严格遵守相关法律法规和伦理要求，否则产生一切后果与本公司无关。
- (2) 请按要求运输、存储及使用试剂，非必要请勿反复冻融，因未按要求保存、操作造成的实验失败，本公司概不负责。





## ► 为什么选择艾迪基因?



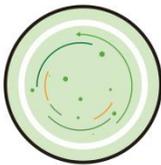
### 操作简便

预配制的即用型包装质粒, 无需在计算浓度、比例, 简化操作流程



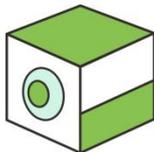
### 病毒产量高

通过独家优化的病毒质粒配比、包装流程, 有效提高慢病毒的产量



### 兼容性高

选用第二代慢病毒包装系统, 在保证安全的前提下可兼容第二代、第三代慢病毒质粒



### 高滴度病毒

配套病毒浓缩液可用于生产更高滴度的病毒, 适用范围更广泛





## 附录

推荐使用以下载体进行改造, 获得携带目的基因的慢病毒载体:

艾迪编号	质粒名称	描述
EDV280	lentiCRISPR-v3-PURO	CRISPR 敲除载体 puro 抗性
EDV289	lentiCRISPR-v3-BLAST	CRISPR 敲除载体 blast 抗性
EDV1954	Lenti-CMV-MCS-EF1a-Puro	过表达 CMV 启动子,无标签
EDV3021	pLV3-U6-MCS-shRNA-Cop GFP-Puro	shRNA 表达载体 puro 抗性, GFP 荧光
EDV3022	pLV3-U6-MCS-shRNA-EF1-a-mCherry-Blast	shRNA 表达载体 blast 抗性, mCherry 荧光

艾迪基因出售以上空载体质粒, 更可提供载体改造服务, 助力慢病毒包装一步到位。

