



ABP Lentiviral Packaging System

Cat #: D020-01, D020-02

1. 试剂盒组分及储存条件

材料	规格	储存条件	有效期
ABP Lentiviral Packaging System (Cat #: D020-01, 10 assays)			按照推荐的储存条件保存, 有效期为 1 年
Package Plasmid Mix	50 μ L (0.5 μ g/ μ L)	-20 $^{\circ}$ C	
Control Plasmid	50 μ L (0.25 μ g/ μ L)	-20 $^{\circ}$ C	
LipoFectMax TM Transfection Reagent	250 μ L	4 $^{\circ}$ C	
ABP Lentiviral Packaging System (Cat #: D020-02, 40 assays)			
Package Plasmid Mix	200 μ L (0.5 μ g/ μ L)	-20 $^{\circ}$ C	
Control Plasmid	100 μ L (0.25 μ g/ μ L)	-20 $^{\circ}$ C	
LipoFectMax TM Transfection Reagent	1 mL	4 $^{\circ}$ C	

2. 产品简介

ABP Lentiviral Packaging System(慢病毒包装试剂盒)是由经优化的包装质粒混合物(Plasmid Mix)、eGFP阳性对照质粒(Control Plasmid)、LipoFectMaxTM Transfection Reagent组成。它属于第三代慢病毒包装体系,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,经该试剂盒包装获得的对照质粒病毒滴度可达 10^8 TU/mL。

3. 包装慢病毒颗粒所需的实验材料

3.1 HEK293T细胞系(ATCC Cat #: CRL-11268), 该细胞系用于包装慢病毒颗粒;

3.2 H1299 细胞系(ATCC Cat #: CRL-5803), 该细胞系用于测定慢病毒滴度、检验病毒转导效率;

3.3 DMEM 培养液用于工具细胞系培养;

3.4 胎牛血清, 例如(Biosera Cat #: FB-1001/500), 用于工具细胞培养;

3.5 无血清培养液, 例如Opti-MEM I (Thermo Fisher Cat #: 31985062);

3.6 感染增强剂, 例如 Polybrene (ABP Biosciences Cat #: D025), Lentivirus Transduction Enhancer I (Cat #: D023)或Lentivirus Transduction Enhancer II (Cat #: D024)均可用于增强感染效率(可选用);

3.7 青霉素-链霉素双抗, 如(Thermo Fisher Cat #: 15070063), 用于哺乳动物细胞病毒转导后细胞培养;

- 3.8 用于后续筛选稳转细胞系的抗生素：嘌呤霉素、潮霉素 B、新霉素（依据载体抗性选择）；
- 3.9 5ml 或 14 ml 离心管(BD Falcon® Cat #:352053/352059)。

4. 慢病毒包装操作步骤

以下步骤是使用HEK293T工具细胞包装，生产慢病毒颗粒的标准操作流程。

如严格按照以下步骤操作，每个10cm培养板皿包装eGFP阳性对照质粒所得到的慢病毒颗粒产量为10mL 上清液(粗制病毒)，每毫升具有 1×10^5 - 1×10^6 TU的慢病毒颗粒。在靶细胞感染复(MOI) 为1的前提下，这些包装所得的慢病毒颗粒足够用于感染 1×10^6 - 1×10^7 数量的靶细胞。需要注意的是，针对不同目的片段长度、对包装细胞有不同危害程度的目的基因，慢病毒滴度可能因实际情况而出现差异。

注意：以下是适用于感染哺乳动物细胞的慢病毒颗粒包装操作步骤。请务必在生物安全等级为II级以上的实验环境下进行操作。

4.1 培养包装细胞

在进行质粒转染前，提前两天将数量约为 1.3×10^6 - 1.5×10^6 个HEK293T细胞均匀接种到10cm培养皿中，加入10 mL含10%热灭活胎牛血清的DMEM培养基，在37℃，5% CO₂的培养条件下，培养包装工具细胞。如HEK293T细胞在进行转染的当天达到70-80%融合率，则相对容易获得最佳包装效果。

注意：

(1) 目的基因表达质粒质量对包装效率有重要影响：

病毒包装所用目的基因表达质粒必须为低内毒素的转染级别质粒。可通过260nm光吸收测定DNA浓度，并根据260nm/280nm确定DNA纯度（比值在1.8-2.0范围内为宜），并通过琼脂糖电泳检测DNA完整性。

(2) HEK293T包装细胞生长状态对包装效率有重要影响

包装细胞必须使用生长状态良好、连续传代的未老化的HEK293T细胞，并确保细胞培养液无细菌、真菌或支原体污染；如包装细胞为冻存细胞，请先行复苏，并使其传代至少两次，再用于后续慢病毒包装操作。

4.2 制备转染复合体

向无菌EP管（A管）加入慢病毒载体表达质粒（目的基因或阳性对照）2.5 μg，Package Plasmid Mix包装质粒5.0 μL（0.5 μg/μL），再添加Opti-MEM I培养基补齐至200 μL（此时，A管的质粒总量是5 μg）。取另一无菌EP管（B管），加入LipoFectMax™ Transfection Reagent转染试剂15 μL，再添加Opti-MEM I培养基补齐至200 μL。一边轻柔涡旋A管，一边向A管滴加B管所配制溶液（切勿颠倒添加顺序），直到B管溶液全部滴加完毕。溶液混合均匀后，室温放置10-25分钟，即完成转染复合体制备。如反应体系较大，需要配制大量转染复合体，则建议使用圆底离心管（如BD Falcon 5mL 或 14mL 离心管）。

4.3 转染包装细胞



进行转染操作的当天，将第 4.1 步铺板培养的细胞从培养箱取出，将第 4.2 步制作的转染复合体均匀滴加至细胞培养皿中；吸取转染复合体的动作需轻柔，切勿反复吹打转染复合体。滴加后以 8 字形水平晃动细胞皿（动作需轻柔），使转染复合体均匀分散。完成转染后，将包装细胞置于 5% CO₂、37℃ 培养条件下继续培养 6 - 12 小时。转染操作的 6 - 12 小时后，去除含有转染复合体的旧培养液，添加新鲜的、含 2-5% 热灭活胎牛血清、青霉素和链霉素的 DMEM 培养液（例如 10 cm 培养皿需添加 10 mL DMEM 培养基）。

4.4 收获慢病毒毒液

转染操作完成后 48 小时，收集细胞培养液，以 2000×g 离心 10 分钟去除细胞碎片，即可获得慢病毒的粗制病毒液，或使用 0.45 μm 低蛋白结合的 PES 滤膜（切勿使用硝酸纤维素滤膜）过滤细胞碎片。如您希望单次获得更多病毒毒液，可于转染操作后 72 小时再收集一次细胞培养液，可在 48 小时收集后重新添加新鲜的培养液，以便继续收集。

提示：收集、纯化后的病毒液可直接用于侵染靶细胞，也可在测试获得滴度数据后，再进行靶细胞的侵染操作。在感染靶细胞前，请先确认靶细胞的生长状态是否良好。如收集到的慢病毒毒液，短期内无使用计划，建议立刻分装并置于 -80℃ 分装保存；切勿反复冻融，因慢病毒每冻融一次，滴度都将明显降低约 20- 50%。另外，也可使用 ABP Lentivirus Storage Buffer (Cat #: D022) 保存病毒液，4℃ 冰箱放置一周，或 -80℃ 保存，即使反复冻融 5 次，均不会对病毒滴度造成明显影响。

5. 慢病毒滴度测定

5.1 测定前一天，将生长状态良好的 H1299 细胞系消化计数后，稀释至 5×10^4 个/mL，以 100 μL/孔加入 96 孔板中，铺板 8-10 个孔，并置于 37℃，5% CO₂ 培养条件下培养 24 小时。

5.2 取一定量的包装收集的病毒原液侵染 H1299 细胞：于 EP 管中做 10 倍梯度稀释，连续 10 个稀释梯度。稀释方法如下：每种病毒准备 10 支 1.5 mL EP 管，每管加入 90 μL 培养液，向第 1 支 EP 管中加入 10 μL 病毒原液，记作 100；混匀后吸取 10 μL 加入第二支 EP 管中混匀，记作 10-1；依此类推。在对应 96 孔细胞板细胞中加入 10 μL 稀释好的病毒液并做好标记，培养 48-72 h 后观察结果。

5.3 滴度计算：对于带有荧光蛋白标记的慢病毒毒液，可使用荧光计数法测定滴度，（对于无荧光蛋白筛选标记的慢病毒毒液，请使用商业化 qPCR 法病毒滴度检测试剂盒进行滴度测定）。

5.4 在荧光显微镜下观察结果，并按顺序数出最后两个有荧光的荧光细胞克隆数。假设其分别为 X 和 Y，则滴度 (TU/mL) = $(X+Y \times 10) \times 1000 / X$ 孔的病毒液的含量 (μL)。

提示：建议使用 DMEM 培养基对慢病毒毒液进行稀释，不可使用水或其它 buffer 进行稀释。

6. 慢病毒感染目的细胞

VSV-G 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)，建议检验慢病毒的使用浓度时使用已测滴度、含 eGFP 荧光蛋白阳性对照慢病毒，并设置适用于目的细胞的 MOI 值。感染结束后即可测定含 eGFP 荧光蛋白阳性对照慢病毒最适浓度。

预实验方案：

6.1 按照步骤 4，5 包装 eGFP 对照慢病毒及测定慢病毒滴度；

6.2 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 个/mL，加入 96孔板，100 μ L/孔。放入37°C，5% CO₂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）。

6.3 根据该细胞文献所查MOI值配制不同MOI梯度的慢病毒 + Polybrene + 培养基混合液；注：Polybrene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，但对某些细胞（如末端分化的神经元，DC细胞等）毒性较大，可选用毒性低的Lentivirus Transduction Enhancer I或无毒性的Lentivirus Transduction Enhancer II的感染增强剂，如细胞对Polybrene毒性可承受，配合Lentivirus Transduction Enhancer II一起使用，可更显著的提高病毒感染效率。

6.4 吸去96孔板中目的细胞培养液，加入6.3中配制的慢病毒混合液，置于37°C，5% CO₂培养箱中继续培养。

6.5 24 h后更换为新鲜培养基继续培养。

6.7 侵染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 $\times 100\%$ 。

6.8 若预实验未能找到合适的感染条件，可调整MOI梯度再次检测直到找到最优的实验条件。