

慢病毒包装试剂盒

产品编号	试剂名称	规格	保存条件
OmL-01	慢病毒包装质粒 (Lenti-Mix)	10 tubes	-20 °C
	慢病毒对照质粒 (Lenti-GFP)	1 tube	-20 °C
	Omifection (质粒 DNA 转染试剂)	1 ml	4 °C
	Polybrene (慢病毒感染增强试剂)	1 ml	4 °C
	说明书	1 份	

一、运输和存储条件。

1. 本产品低温运输，各组份依据保存条件分开保存，有效期为 12 个月。
2. Omifection 与 Polybrene 4 °C 保存，严禁冻存。

二、注意事项（请使用试剂盒前阅读此注意事项）。

1. Lenti-Mix 和 Lenti-GFP 体积较小，使用前 12,000×g，4 °C 离心 30 sec，使质粒溶液沉到管底。
2. 请使用高纯度的 Lenti-shRNA 质粒或表达目的蛋白的慢病毒质粒进行转染实验，质粒 DNA 的 OD260/OD280 比值在 1.7~1.9 之间为宜。
3. 293T (N) 细胞的生长状态对于慢病毒包装至关重要，一般使用代数较低 (20 代以内) 的 293T (N) 细胞进行慢病毒包装。
4. 转染慢病毒质粒时，293T 细胞的密度应该控制在 60-80% 之间，密度过低，生产的慢病毒较少；密度过高，则影响质粒转染效率，也会减少慢病毒产量，导致慢病毒滴度降低。
5. 本试剂盒提供的 Omifection (质粒 DNA 转染试剂) 与 Polybrene (慢病毒感染增强试剂)，保存在 4 °C，**严禁冻存**。
6. 为了增强慢病毒感染效果，可以使用本公司的**慢病毒感染增强试剂盒 (Cat: OmL-04)**，其感染增强效率比 Polybrene 高 **4-8** 倍。
7. 为了您的健康，请穿实验服、佩戴乳胶手套和安全眼镜，使用安全工作台，避免慢病毒感染。

三、产品简介。

本产品包括慢病毒包装质粒 (Lenti-Mix)、阳性对照质粒 (lenti-GFP)、质粒 DNA 转染试剂 (Omifection) 和病毒感染增强试剂 (Polybrene), 其中包装质粒能够与已经构建的慢病毒骨架质粒联合, 生产高滴度的慢病毒。

四、特点与优势。

1. 本试剂盒中的包装质粒能够与多家公司提供的慢病毒骨架质粒配合, 生产高滴度的慢病毒。
2. 本试剂盒中的转染试剂 Omifection, 可以转染分子量较大的慢病毒质粒, 保证转染效率, 提高病毒产量。

五、自备试剂与耗材。

1. OPTI-MEM 培养液 (Gibco)
2. 293T 细胞, 最好是 293TN 细胞 (System Biosciences), 病毒生产量大。

六、使用说明。

1. 慢病毒包装。

- 1) 细胞培养。293T 细胞传代接种于细胞培养皿 (Φ 100 mm), 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后细胞密度达到 60%~80%。(细胞密度不宜过大, 否则影响转染效率)
- 2) 转染。向 Lenti-Mix 中加入 1 mL OPTI-MEM 培养液, 再加入 9 μ g 慢病毒骨架质粒 (目的蛋白过表达或 RNAi 质粒, 或一管 GFP 对照质粒), 混匀, 加入 54 μ L 转染试剂 Omifection, 混合 10 次, 室温静置 30 min, 滴加入细胞培养液中, 轻轻摇匀。
- 3) 换液。转染 6-12 h, 更换成新鲜的细胞培养液, 继续培养。
- 4) 慢病毒收集。转染 48 h, 收集第一批含有慢病毒的细胞培养上清 (暂时置于 4 °C 保存),
- 5) 293T 细胞中再加入 10 ml 新鲜的细胞培养液, 24-48 h 后, 收集第二批含有慢病毒的细胞培养上清 (第二批细胞培养上清中的慢病毒滴度高于第一批)。
- 6) 离心。含有慢病毒的细胞培养上清转入离心机, 3,000 rpm (离心力为 870 g), 4 °C 离心 5 min, 弃沉淀, 上清转入新的无菌离心管, 即是含有慢病毒的细胞培养上清。
- 7) 用慢病毒滴度检测卡测定慢病毒滴度或利用本公司的慢病毒纯化试剂盒 (Cat: OmL-02) 纯化慢病毒。
- 8) 含有慢病毒的细胞培养上清可在 4 °C 保存 1 个月, 长期保存应置于 -80 °C, 但冻融一次, 病毒感染效果降低 30-50%。

2. 慢病毒感染。

- 1) 目的细胞培养。目的细胞传代后接种到细胞培养皿（Φ 100 mm）中，24 h 后细胞密度达到 30%-60%。
- 2) 慢病毒感染。弃培养液，加入 5 ml 新鲜培养液和 5 mL 含有慢病毒的细胞培养上清液，再加入 5-20 μl 的 polybrene（与细胞培养液按照 1: 500-1:2000 稀释），轻摇，混匀。
- 3) 换液。病毒感染 12-24 h 后，更换成新鲜的培养液，继续培养，若无细胞毒性，可以不换液。
- 4) 检测。慢病毒感染 72 h，荧光显微镜下观察 GFP 表达情况，或检测目的基因表达水平。

七、效果鉴定。

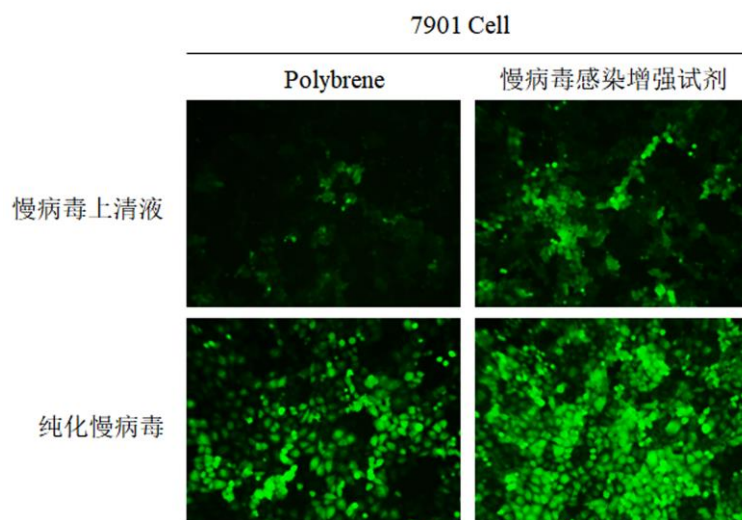


图 1. 慢病毒包装、纯化与感染目的细胞鉴定。

293TN 细胞包装慢病毒（Lenti-GFP），纯化后感染 7901 细胞。慢病毒纯化后显著增强其感染效果，且慢病毒感染增强试剂能够显著增强未纯化及纯化后的慢病毒感染效果。

八、常见问题与分析。

问题	可能原因	解决方案
生产的慢病毒滴度偏低	293T(N)细胞代数较高(超过 20 代)。	选择代数较低的 293T (N) 细胞进行慢病毒包装。
	293T 细胞密度不合适。	转染时，293T 细胞密度控制在 60-80%之间。
	慢病毒骨架质粒纯度或浓度不合适。	慢病毒骨架质粒的 OD260/OD280 应控制在 1.7-1.9 之间，浓度为 0.2 μg/μl 以上。