



# StarCell Lentiviral Packaging Kit

## StarCell 慢病毒包装试剂盒

版本号: V250902

货号: C106

保存: -20°C, Transfection Reagent 保存于 4°C, 切勿冻融

运输: 低温

货号	规格
C106-01	10 T
C106-05	50 T

### 【产品概述】

慢病毒感染是目前最常用于构建稳转细胞系的方法之一。StarCell Lentiviral Packaging Kit 基于第二代慢病毒包装系统, 由经过优化的慢病毒包装辅助质粒混合物 (Lentiviral Mix)、表达绿色荧光蛋白的对照质粒 (GFP Control) 和高效的转染试剂 (Transfection Reagent) 组成, 可以兼容第二代和第三代慢病毒质粒系统, 用户只需自备携带目的基因的慢病毒转移质粒即可快速高效地完成慢病毒包装实验。

试剂盒中 Lentiviral Mix 能够表达病毒包装需要的各种必需成分如: gag 基因, 编码病毒的核心蛋白如基质蛋白、衣壳蛋白和核衣壳蛋白等; pol 基因, 编码病毒复制所需的酶如反转录酶、整合酶和蛋白酶; rev 基因, 编码调节 gag 和 pol 基因表达的调节因子; 还含有单纯疱疹病毒来源的 VSV-G 基因, 提供病毒包装所需要的包膜蛋白。

本试剂盒具有慢病毒包装时间周期短 (一周之内即可获得纯化好的高滴度慢病毒)、病毒滴度高、操作简便等优势, 可应用于针对不同基因和药物靶标的细胞学实验和整体动物实验。非常适合于病毒包装初试者。

### 【产品组分】

组分货号	组分名称	C106-01	C106-05
ZC106-101	Lentiviral Mix	100 µl	100 µl×5
ZC106-102	Transfection Reagent	200 µl	1 ml
ZC106-103	GFP Control(1µg/µl)	20 µl	20 µl

### 【保存条件】

-20°C保存, 保质期 6 个月, 其中 Transfection Reagent 组分子 4°C保存, 切勿冻融。

### 【注意事项】

- 用户需自行准备的材料:
  - 表达目的基因的慢病毒载体质粒。
  - 慢病毒包装及滴度检测所用工具细胞: HEK 293T/293FT
  - 细胞培养所需试剂: DMEM (GIBCO)、FBS, GOLD (GIBCO)、Penicillin-Streptomycin (GIBCO)、Trypsin: GenStar (Cat# C112-C116)、Antibiotics: 用于稳定转染细胞株筛选, 如 Puromycin 等
  - 实验耗材: 培养皿、离心管、吸头、移液管等
- 病毒包装前准备:
  - 慢病毒表达载体制备: 在进行慢病毒包装之前, 先获得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。
  - 高质量质粒 DNA 溶液的制备: 为获得高的转染效率, 需要保证质粒的质量, 建议采用 GenStar 无内毒素超纯质粒大提试剂盒 (Cat# D211) 抽提质粒, 质粒 A260/A280 通常在 1.8-2.0 之间。
  - 细胞状态: 良好的细胞状态对病毒的包装至关重要, 避免细胞培养基有细菌、真菌或支原体的污染, 尽量使用传代次数较少的细胞, 刚复苏的细胞, 最好传两代之后再包装; 进行转染前, 请确认细胞的覆盖率在 70-90% 之间。
- 为了您的健康和安, 请穿实验服并戴一次性手套操作。所有慢病毒操作均应尽量在 BSL2 级生物安全柜中进行。请勿随意丢弃病毒接触过的物品, 并尽可能使用甲醛等灭活剂和紫外照射进行处理。



## 【操作步骤】

将表达目的基因的慢病毒载体质粒（用户自备）及 Lentiviral Mix 在 Transfection Reagent 的辅助下共转染到 293T 细胞中，转染后 6-8 h 更换为完全培养基，培养 48 h 后，收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液，获得慢病毒。慢病毒感染目的细胞后，经抗生素、荧光等相应的筛选，完成稳转细胞系的制备及病毒滴度鉴定。

一、慢病毒包装：以 10 cm 培养皿为例（1 皿为 1T）

1. **293T 细胞分盘**：转染前一天，将 293T 细胞以合适的比例传代到 10 cm 培养皿中，当细胞长到 70-90% 时准备转染。

注：细胞要充分消化，成团细胞影响转染效率。

2. **转染前换液**：转染前 1-2 h 将需要转染的细胞换新鲜的完全培养基（含有血清和抗生素），10 ml/10 cm 皿。

注意：换液时应小心滴加尽量避免冲起细胞，抗生素和血清不会影响转染效率，也不会导致细胞毒性。

3. **质粒转染**：取两个无菌的 1.5 ml EP 管，标上 1 号和 2 号，在两管中分别配制如下反应体系：

1 号管		2 号管	
组分	体系	组分	体系
无血清 DMEM	500 $\mu$ l	无血清 DMEM	500 $\mu$ l
Lentiviral Mix	10 $\mu$ l	Transgene Reagent	20 $\mu$ l
含有目的基因的重组质粒/GFP Control(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	10 $\mu$ g		

将两管 EP 管各自混匀后，将 2 号管混匀后的液体加入 1 号管中，立即涡旋振荡混匀 5 s，瞬时离心将管壁液体收集至管底，室温静置 15-20 min，形成转染复合物后，均匀滴加到提前换过液的培养皿中，滴加过程中请勿将贴壁的细胞吹起，后置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

4. **转染后换液（可选）**：转染后 6-8 h，将培养皿中的培养基吸掉，弃于废液杯中，然后加入 10 ml 完全培养基（含有血清和抗生素）继续培养。请尽量轻柔操作，少量细胞被吹起，不影响最终实验效果。

注：丢弃的培养基已含有少量的病毒，必须经处理后才能丢弃，所用的移液枪头等必须经处理后才能丢弃。

5. **病毒收集**：换液 48 h 后，吸取细胞上清液于 50 ml 离心管，4 $^{\circ}$ C，800 g 离心 10 min，上清液用 0.45  $\mu$ m 滤器过滤后转移到新的离心管中，即得到粗病毒。添加 10 ml 新鲜的完全培养基到细胞中，注意不要冲起细胞。转染 72 h 后，可第二次收集慢病毒，操作步骤同上。

注：粗病毒液可暂时存放于 4 $^{\circ}$ C，长期保存请置于 -80 $^{\circ}$ C。为避免反复冻融，可根据实验需要对慢病毒进行分装。

上清液中的病毒颗粒可直接检测滴度或感染目的细胞，如对病毒的滴度及纯度有较高要求，可对上清液进行浓缩与纯化。

6. **病毒浓缩与纯化（可选）**：每 10 ml 过滤后的病毒上清液加入 2.5 ml GenStar 慢病毒浓缩液（Cat#C103），轻柔颠倒混匀，置于 4 $^{\circ}$ C 过夜，4 $^{\circ}$ C，7000 g 离心 10 min，可见病毒粒子聚集成团状，吸除上清液体，加入适量（上清液体积的 1/100-1/10）无血清培养基或 PBS，充分重悬病毒后分装 40-50  $\mu$ l/tub，保存于 -80 $^{\circ}$ C。

注：病毒液一定要分装，切忌反复冻融，冻融一次病毒滴度将降低 20-60%。

## 二、稳转细胞系的制备

通过查阅文献或进行预实验确定目标细胞的 MOI (multiplicity of infection) 值，即感染复数。

以 293T 细胞为例，MOI 值为 1。

1. **细胞铺板**：

1) 将 293T 细胞配成 5 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/ml 细胞悬液，待铺板。

2) 将上述细胞悬液接种到 6 孔板，每孔铺 2 ml，即 1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well。

2. **感染慢病毒**：

1) 铺好板细胞过夜培养 12-20 h，确保细胞覆盖率在 70 % 左右，准备感染。

2) 加病毒：根据确定的 MOI 值，计算慢病毒添加量，直接加入到 6 孔板中，轻摇混匀。

计算方法：病毒添加量 ( $\mu$ l) = (细胞数  $\times$  MOI 值 / 病毒原液滴度)  $\times$  10<sup>3</sup>。

3) 换液：感染 8-12 h 弃去培养基，每孔加入 2 ml 新鲜培养基。

3. **细胞筛选**：

1) 药物筛选：若用户目的基因的转移质粒含有荧光蛋白基因，可在慢病毒感染后 72 h，观察目标细胞荧光表达的情况，并在 6 孔板中添加筛选药物，如 Puromycin 等，添加量需根据目标细胞的特性来决定。72 h 后，需继续换液并添加药物，药物筛选至少持续 14 天，直至观察显微镜下荧光细胞比例接近 100%。

2) 荧光筛选：使用流式细胞仪进行细胞分选。

## 【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。