

# 慢病毒包装试剂盒

产品名称	慢病毒包装试剂盒
公司名称	深圳市百恩维生物技术有限公司
价格	面议
规格参数	
公司地址	深圳市宝安区67区留仙一路高新奇工业园二期1号楼5楼501-503
联系电话	86-075526980323 13430783600

## 产品详情

### 慢病毒包装试剂盒

#### 产品简介

百恩维生物的慢病毒包装试剂盒是利用第三代慢病毒包装系统改进而来的慢病毒包装试剂盒，可以兼容第二代和第三代的慢病毒包装质粒，其优势在于慢病毒包装时间周期短（一周之内即可拿到纯化好的慢病毒）、病毒滴度高（基因过表达慢病毒滴度可达到 $10^8$ TU/ml，RNAi慢病毒滴度甚至可高达 $10^9$ TU/ml）。

#### 产品货号

BW12008-05 5次/10cm dish

BW12008-20 20次/10cm dish

#### 试剂盒内容

1. 慢病毒包装混合物（Lentiviral Packaging Mixture）75ug或300ug
2. 慢病毒包装GFP对照质粒（pLenti-GFP，20ug）
3. HET高效转染试剂盒（Cat.No.BW11002）20次/10cm dish

#### 产品用于

仅供研究使用，不适用于人或动物体外治疗与诊断。

## 产品贮藏条件

-20 避光保存。

## 产品运输

冰袋运输。

## 慢病毒包装操作步骤：

1. 在转染的前一天，传代准备细胞：用0.25%胰蛋白酶消化293T细胞，以含10%血清的DMEM培养基调整细胞密度后，按照每10cm细胞培养皿接种 $6 \sim 8 \times 10^6$  cells到10cm细胞培养皿中，置于37℃，5% CO<sub>2</sub>培养箱培养，16h~24h后待细胞密度生长到80%~90%时即可用于转染。

2. 第二天，在转染前2~4h，用5ml不含P/S的完全培养基换液（DMEM+10% FBS）。

3. 按照以下实验步骤来进行转染：

A、加入500ul HET Buffer A到一支洁净的1.5ml EP管中（可标记为A管）

B、在另一支洁净的1.5ml EP管中（可标记为B管），加入以下试剂，终体系为500ul

试剂名称	试剂数量
Vector	10ul(1.0ug/ul)
Lentiviral packaging mixture	15ul(1.0ug/ul)
HET Buffer B	50ul
ddH <sub>2</sub> O	425ul

C、将B管中的DNA混合液缓缓逐滴加入到A管中，用移液器轻轻混匀10min。

D、将混匀后的混合物室温静置30min，然后将混合物逐滴均匀加入到10cm细胞培养皿中，轻微混匀。置于37℃，5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

4. 第三天，即培养12h~16h后弃去培养基，用10ml新鲜的完全培养基换液（DMEM+10% FBS+P/S）。

5. 第四天，即换液后24h，收集上清液，置于4℃冰箱保存，然后加入10ml新鲜的完全培养基（DMEM+10% FBS+P/S）至10cm细胞培养皿中，置于37℃，5% CO<sub>2</sub>培养箱继续培养。

6. 第五天：再一次收集上清，与第一次收集的上清液混合，1000rpm离心5min，弃去细胞碎片，上清液以0.45 μm PVDF滤器过滤至50ml圆底离心管中。

- 7.4 , 50000g 高速离心2h, 离心后可用记号笔对病毒沉淀做好标记。
8. 小心弃去上清, 晾干, 按200ul /10cm培养皿的量加入DMEM (不含血清、双抗) 或者PBS重悬病毒沉淀, 室温静置2h, 然后用移液器轻轻地吹匀 (避免产生气泡), 继续室温放置30min, 按每次使用的病毒量分装到洁净的1.5ml EP管中, -80 冰箱保存。

慢病毒生物学滴度测定操作步骤:

1. 在滴度测定的前一天取一块48孔板, 按照每孔 $3 \times 10^4$ cells的密度接种HEK 293细胞。
2. 加polybrene到新鲜的完全培养基中 (DMEM+10% FBS+P/S), 使其终浓度为8ug/ml。
3. 用含有polybrene的完全培养基10倍梯度稀释病毒, 具体做法如下: 取一个96孔板, 每孔含有90ul培养基, 第一个孔加入10ul待测病毒原液, 混匀后吸取10ul病毒混合液至第二个孔 (混匀时尽量不要产生气泡), 如此稀释至第六个孔 (即稀释105倍)。

Titer	1ul	0.1 ul	0.01 ul	0.001 ul	0.0001 ul
Virus Stock	5 or 10	10	10	10	10
Medium with 8ug/ml polybrene	45 or 90	90	90	90	90
Load volume	10	10	10	10	10

4. 各吸取10ul病毒稀释液到相对应的48孔板中, 置于37 , 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养过夜, 16h ~ 24h后用新鲜的完全培养基换液 (DMEM+10% FBS+P/S)。
5. 置于37 , 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养48h后, 用荧光显微镜计数荧光细胞数量(如果观察不清晰可以先用PBS (pH7.4) 换液后再进行观察)。一般情况下, 在最高稀梯度10m的孔数出现N (N<10) 个带荧光的细胞, 则病毒滴度为 $N \times 10^m$ TU/ul (10m为稀释倍数), 即病毒滴度为 $N \times 10^{m+3}$ TU/ml, 若N>10, 则需要继续稀释。

使用注意事项:

1. 需要使用去内毒素的质粒抽提试剂盒来抽提质粒, 而且质粒OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>的比值在1.8 ~ 2.0之间。
2. 细胞生长状态对于病毒包装至关重要, 因此需要保证良好的细胞生长状态和较少的细胞传代次数, 细胞代数不要超过20代。
3. 在质粒转染时细胞培养基里面不要添加抗生素 (如P/S、G418等)。
4. 病毒包装试剂盒应与HET高效转染试剂盒配套使用才能达到最佳的病毒包装效率; 一般来说包装基因过表达的慢病毒其生物学滴度能够达到 $10^7 \sim 10^8$ TU/ml, 而包装RNAi的慢病毒其生物学滴度能够达到 $10^8 \sim 10^9$ TU/ml。

5. 病毒切勿反复冻融，冻融次数尽量不要超过3次，每冻融一次大约有10%左右的病毒损失，应按每次使用的病毒量来分装然后冻存于-80度冻箱，保存时间尽量不要超过6个月。