



## 慢病毒包装质粒 Mix

### Lentiviral Packaging Plasmid Mix

#### 产品信息

产品货号	产品名称	产品规格
JY03024/JY03025/JY03026	慢病毒包装质粒 Mix	100 µg (10T)/200 µg (20T)/400 µg (40T)

#### 产品简介

江苑生物的慢病毒包装质粒 Mix (Packaging Mix) 为优化的全套慢病毒包装辅助质粒混合物, 可以兼容第二代和第三代的慢病毒包装系统。本产品附赠表达 eGFP 蛋白的对照质粒 (eGFP Control), 用于验证慢病毒包装效果。本公司还提供**慢病毒包装试剂盒 (江苑生物 JY03021)**, 包含全套的包装组分和试剂。

Packaging 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。江苑生物的慢病毒包装系统产生的慢病毒为“自杀”性病毒, 即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。

本产品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) 和病毒滴度高的优势, 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。为了加速科研进程, 江苑生物还提供细胞基因过表达、shRNA/siRNA 介导的基因沉默、CRISPR/Cas9 介导的基因敲除等服务。

#### 产品组分

组分名称	储存	产品货号/规格		
		JY03024	JY03025	JY03026
Packaging Mix	-20°C	100 µg (10 Tests)	200 µg (20 Tests)	400 µg (40 Tests)
eGFP Control	-20°C	10 µg	10 µg	10 µg

#### 保存条件

干冰运输。-20°C 保存, 避免反复冻融, 1 年有效。

#### 还需准备的其他实验材料

1. 被包装的慢病毒载体质粒: 在慢病毒包装前, 需要先获得含有目的序列的慢病毒载体, 以无内毒素高纯度的试剂盒提取慢病毒载体质粒, 并将质粒 DNA 溶于无菌的 TE 或 ddH<sub>2</sub>O 中, 测定其浓度及纯度, 保证质粒 DNA A260/A280 在 1.8-2.0 之间。
2. 慢病毒包装用 293T 细胞株: 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, 如果细胞是刚复苏的话, 最好传两代之后再包装。
3. 细胞培养基, 血清和双抗等
4. 质粒转染试剂
5. 其他常用实验耗材 (如 10 cm 培养皿, 离心管等)



## 使用说明 (以 10 cm 培养皿, 为例):

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: 转染前将 293T 细胞换成新鲜培养基, 10 mL/10 cm 皿。现在的转染试剂例如 Lipofectamine 2000、Lipofectamine 3000、LipoSuper (江苑生物 JY03051) 和其他转染试剂, 多不受血清和抗生素的影响, 此处可换为含有血清和抗生素的完全培养基。具体需根据转染试剂的要求换液。

注: 293T 细胞贴壁性不是很好, 换液时应小心滴加尽量避免冲起细胞。

3. 转染: Packaging Mix: 表达目的序列的慢病毒载体质粒=1: 1

★ 以使用 LipoSuper (江苑生物 JY03051) 转染试剂为例:

取一只无菌的离心管, 加入 750  $\mu$ L DMEM (不含血清和抗生素), 10  $\mu$ g 表达目的序列的慢病毒载体质粒 (自行提供), 和 13.5  $\mu$ L Packaging Mix (10  $\mu$ g), 用枪轻轻吹打混匀; 再加入 32  $\mu$ L LipoSuper, 用枪轻轻吹打混匀, 静置 5 min, 请特别注意不可 Vortex 或离心。将混合液均匀滴加到提前换液的细胞培养基中, 轻轻晃匀, 置于培养箱中培养, 后续无需在数小时后更换培养液。

DMEM	750 $\mu$ L
表达目的基因慢病毒载体质粒 (或者 eGFP Control, 作为对照)	10 $\mu$ g (eGFP Control 10 $\mu$ g)
Packaging Mix	13.5 $\mu$ L
LipoSuper	32 $\mu$ L

注: 上述混合液室温存放 6 h 内稳定。

某些细胞对转染试剂比较敏感, 可以在转染后 8-12 小时更换细胞培养液, 转染效率无显著影响。

★ 以使用 Lipofectamine 3000 (Invitrogen L3000015) 转染试剂为例:

取两只无菌的离心管, 一只加入 500  $\mu$ L Opti-MEM 和 32  $\mu$ L Lipofectamine 3000, 用枪轻轻吹打混匀; 另一只加入 500  $\mu$ L Opti-MEM 和 10  $\mu$ g 表达目的序列的慢病毒载体质粒 (自行提供)、13.5  $\mu$ L Packaging Mix (10  $\mu$ g) 及 40  $\mu$ L P3000 试剂, 用枪轻轻吹打混匀。将两管液体混合, 再次用枪轻轻吹打混匀, 不可 Vortex 或离心, 室温孵育 10-15 min。将混合液均匀滴加到提前换液的细胞培养基中, 轻轻晃匀, 置于培养箱中培养, 后续无需在数小时后更换培养液。

第一管	Opti-MEM	500 $\mu$ L
	Lipofectamine 3000	32 $\mu$ L
第二管	Opti-MEM	500 $\mu$ L
	表达目的基因慢病毒载体质粒 (或者 eGFP Control, 作为对照)	10 $\mu$ g (eGFP Control 10 $\mu$ g)
	Packaging Mix	13.5 $\mu$ L
	P3000	40 $\mu$ L

注: 某些细胞对转染试剂比较敏感, 可以在转染后 8-12 小时更换细胞培养液。

Invitrogen 的 Protocol 显示 10 cm 培养皿 Lipofectamine 3000 推荐使用 21.7  $\mu$ L 或者 43.4  $\mu$ L 两种剂量, 自行探索哪个剂量更为合适。本实验室在检测该包装质粒时, 选用的剂量为 32  $\mu$ L。

4. 病毒收集: 转染 36 h 左右后, 吸取上清至新的离心管中, 4 $^{\circ}$ C 保存。另外添加 10 mL 新鲜的完全培养基到细胞中, 注意不要冲起细胞。再次大约 36 h 后, 收取上清至同一个离心管中。

5. 将两次收集的病毒上清用 0.45  $\mu$ m 滤器过滤后转移到新的离心管中 (若没有 0.45  $\mu$ m 滤器, 直接将病毒上清 3000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃沉淀亦可)。此时上清液中的病毒颗粒可以直接检测滴度或者感染目的细胞, 如果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。



注: 如果使用滤器过滤, 只能使用低蛋白结合力的纤维素醋酸酯或聚醚砜 (PES) 膜, 不能用硝酸纤维素膜 (NC)。

若上清较多, 可以 1500 rpm 离心 5 min, 将细胞及碎片离心到管底, 再进行过滤, 防止堵塞滤器。

过滤时, 将注射器与滤器卡紧, 轻柔推动活塞, 防止用力过度造成滤器崩离注射器, 使得病毒液四溅。

6. (可选) 慢病毒浓缩: 可以使用江苑生物的慢病毒浓缩试剂盒 (JY03011) 进行慢病毒浓缩与纯化, 效率更高。同时, 也可以自行配制 PEG-8000 慢病毒浓缩液浓缩慢病毒。

注: 慢病毒滴度测定方法参考 <http://www.jiangyuanbio.com/news/xingyedongtai/179.html> (江苑生物官网→新闻中心)

7. 病毒分装与保存: 将病毒上清或浓缩后的病毒分装, 保存于 -80°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%。

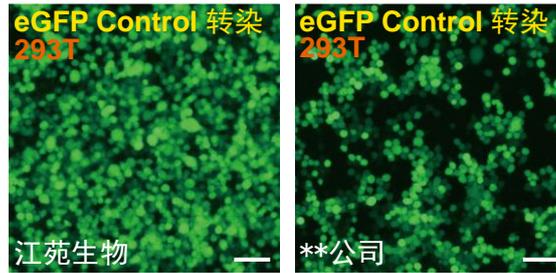


图 1 江苑生物与\*\*公司慢病毒包装试剂盒包装效率比较

## 注意事项

1. 废弃的含病毒的培养基中加入 84 消毒液 (1:20 左右), 浸泡 1 天后丢弃。接触过病毒的枪头, 离心管, 培养板等其他物品可用 84 消毒液稀释液处理, 也可以用煮沸处理半小时或常规灭菌 (121°C, 20 min)。
2. 本产品仅用于科学研究。
3. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 包装效率低可能存在的问题:

1. 优化质粒与转染试剂比例, 对于难转染的细胞, 可适当增加转染试剂的用量。
2. 应使用高纯度、无内毒素、无污染物的质粒进行包装, DNA 纯度方面 A260/A280 比值要接近 1.8, 通常宜控制在 1.8-1.9 范围内, 偏低则有可能有蛋白污染, 偏高则有可能有 RNA 污染。
3. 包装细胞 (例如 293T) 状态对病毒的包装很重要, 尽量使用传代次数较少的细胞。状态不好的 293T 可能导致包装效率降低 60% 以上。轻柔换液就能导致半数细胞漂起, 这样的 293T 细胞再高效的包装试剂盒也无济于事。请从正规细胞库购买细胞, 借来或者不正规公司获得的细胞可能会因为传代次数过多影响包装效率。避免细胞培养基有细菌、真菌或支原体的污染。
4. 表达目的序列的载体质粒过大, 会降低包装效率。载体质粒容纳外源基因长度的能力是有限的, 尽管理论上, 在 LTR 之间可以插入的基因长度约为 8.5 kb, 但超过 3 kb 就会导致包装效率降低。而整个载体质粒过大, 也会导致包装效率降低, 进而影响最后的病毒滴度。若不能控制插入片段的大小, 需尽量选择较小的载体骨架。
5. CRISPR-Cas9 质粒中, Cas9 基因长度就达 4 kb 左右, 整个载体质粒 15 kb 左右, 故其慢病毒包装效率和感染能力比一般病毒低, 包装时产生的空壳病毒 (即有病毒外壳, 但没有组装进目的基因的病毒) 比较多。感染细胞时, 空壳病毒会竞争细胞表面受体, 造成正确感染率下降, 因此密度梯度离心、PEG 纯化法和超滤法等浓缩病毒再感染目的细胞可提高病毒感染效果。



## 相关产品

产品编号	产品名称	产品规格
JY03011/JY03012	慢病毒浓缩试剂盒	50 mL/100 mL
JY03013/JY03014	PEG-8000 慢病毒浓缩液	50 mL/100 mL
JY03021/JY03022/JY03023	慢病毒包装试剂盒	10T/20T/40T (10cm dish)
JY03024/JY03025/JY03026	慢病毒包装质粒 Mix	100 µg/200 µg/400 µg
JY03027/JY03028	慢病毒包装质粒 pMD2.G	1 µg/100 µg
JY03029/JY03030	慢病毒包装质粒 psPAX2	1 µg/100 µg
JY03031/JY03032	慢病毒包装质粒 pCMV-VSV-G	1 µg/100 µg
JY03033/JY03034	慢病毒包装质粒 pCMV-dR8.91	1 µg/100 µg
JY03035/JY03036	慢病毒包装质粒 pMDLg/pRRE	1 µg/100 µg
JY03037/JY03038	慢病毒包装质粒 pRSV-Rev	1 µg/100 µg
JY04013/JY04014	RNA 退火缓冲液 (5×)	2 mL/5 mL
JY04011/JY04012	DNA 退火缓冲液 (5×)	2 mL/5 mL
JY02066/ JY02088	人脐带间充质干细胞 P2 P3	1×10 <sup>6</sup> cells
JY05021/JY05022/JY05023	PKH26 试剂盒 细胞膜、囊泡、外泌体标记	0.1 mL/0.2 mL/0.5 mL
JY03041	293T, HEK-293T, 人胚肾细胞	> 1×10 <sup>6</sup> cells

巨折产品!!