LeapWal™ BIOTECH 立谱沃生物

Make a leap-forward in Biosciences

ViralStars™ LP
Lentivirus Packaging Kit

Catalog Number：LP110

Product Manual

Version 1.0

Hunan LeapWal Biotech Co., Ltd.

LeapWal™ Biotech 保留此产品技术文件的所有权利。未经 LeapWal™ Biotech 的书面许可，本文件的任何部分，不得改编或转载用作其他商业用途。

FOR RESEARCH USE ONLY
Not for use in diagnostic procedures

目 录 Contents



01/产品概述……02
02/产品组分……03
03/保存条件……03
04/产品特点……03
05/实验流程概要……04
06/实验步骤……05
07/适用范围……09
08/注意事项……10
09/实验案例分析……10
10/其他相关产品……12

01/产品概述

慢病毒是一种有包膜的 RNA 病毒，直径为 80-120 nm，呈二十面体对称结构、球形。病毒颗粒最外层是包膜（包膜蛋白决定了感染细胞的类型），再往里依次为基质蛋白和衣壳，最里面是两条相同的正股 RNA 链和酶（逆转录酶、整合酶和蛋白酶）。

慢病毒表达载体包含了包装、转染、稳定整合所需要的遗传信息。慢病毒包装质粒可提供包装重组慢病毒载体所需的所有辅助蛋白。为产生高滴度的病毒颗粒，需要利用表达载体和包装质粒同时共转染细胞，在细胞中进行病毒包装，包装好的假病毒颗粒分泌到细胞外的培养基中，离心取得上清液后，可以直接或浓缩后用于宿主细胞的感染。

慢病毒感染细胞的第一步是通过包膜蛋白与细胞表面受体结合。慢病毒与宿主细胞膜融合后释放结构蛋白、酶蛋白和病毒核心。病毒 RNA 在逆转录酶的作用下逆转录并与整合酶形成整合前复合物。整合前复合物进入细胞核后，整合酶催化其整合至宿主基因组。整合后的 DNA 转录为 mRNA，回到细胞浆中，表达目的蛋白或产生 RNAi 干扰。ViralStars™ LP Lentivirus Packaging Kit 慢病毒包装试剂盒属于第二代慢病毒包装体系，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。ViralStars™ LP Lentivirus Packaging Kit 包装的慢病毒具有感染效率高、感染谱广等特点，可实现外源基因在宿主细胞中的稳定持续表达。经该试剂盒包装获得的对照质粒病毒滴度可达 10^8 TU/mL。ViralStars™ LP Lentivirus Packaging Kit 慢病毒包装试剂盒包含如下组分：

(1) 优化配比的慢病毒包装辅助质粒混合物（Package Plasmid Mix），经过设计调整，可兼容大多数慢病毒表达载体，确保将重组子包装成具有高感染率的慢病毒颗粒。

(2) 表达 GFP 和 Puro 标记的对照质粒（Control Plasmid），便于观察病毒包装效率及测定病毒滴度。

(3) 高效转染试剂（PolyShooter™ Transfection Reagent），具有卓越的转染效率和更低的细胞毒性。

(4) 常用病毒感染增强试剂 Polybrene，能够显著提高病毒与细胞的接触及感染效率。

02/产品组分

ViralStars™ LP Lentivirus Packaging Kit 组分	LP110-10 (10T)	LP110-20 (20T)	LP110-40 (40T)
ViralStars™ Package Plasmid Mix	100 μL	200 μL	400 μL
Control Plasmid	10 μL	20 μL	40 μL
PolyShooter™ Transfection Reagent	350 μL	700 μL	1400 μL
Polybrene (10 mg/mL)	200 μL	400 μL	800 μL

注：T 代表包装 1 个 10 cm 皿的慢病毒所需的所有组分。

03/保存条件

冰袋（wet ice）运输。-20℃ 保存，有效期 12 个月。

04/产品特点

- ✧ 简单快速——操作简单，无需对包装辅助质粒进行抽提，也无需对包装体系进行优化
- ✧ 病毒滴度高——可包装出高滴度、高表达水平的慢病毒
- ✧ 应用范围广——经过设计及优化配比，兼容大多数慢病毒表达载体

05/实验流程概要

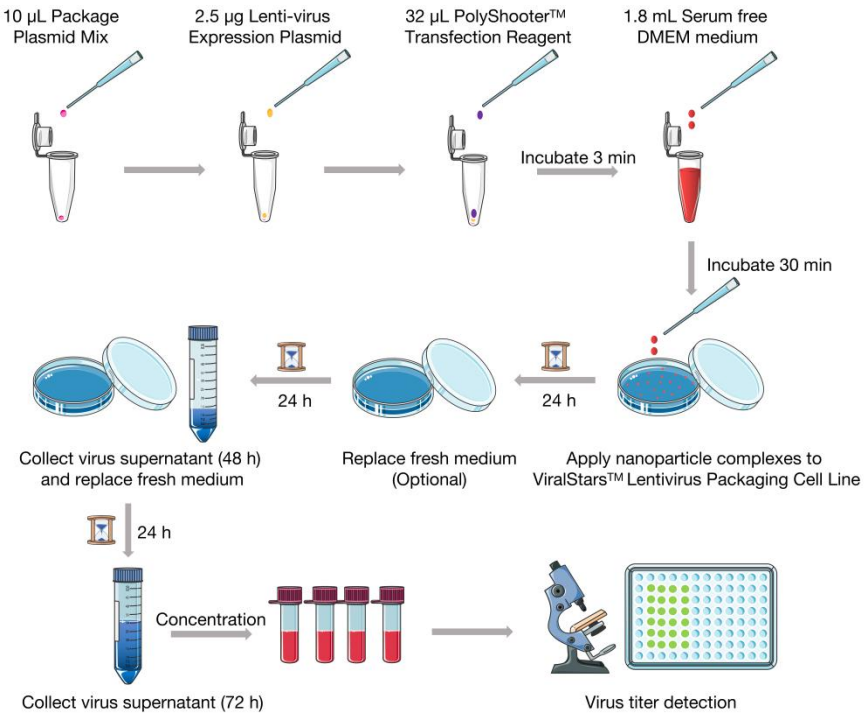


图1：ViralStars™ LP Lentivirus Packaging Kit 慢病毒包装实验流程图

06/实验步骤

一、重组慢病毒制备

1. 细胞准备

转染前一天，将 4-6×10^6 个 293T 细胞接种到 10 cm 细胞培养皿中，使其在包装时密度为 70%-80%，放置于 37℃，5% CO_2 培养箱培养 16 h～24 h。

- 细胞状态会极大影响病毒包装效率，待包装细胞应处于良好生长状态，建议使用生长处于指数期、存活率大于 90% 的细胞进行慢病毒包装。
- 该包装系统与 ViralStars™ Lentivirus Packaging Cell Line（CL110001）配合使用，可包装出更高滴度、更高表达水平的慢病毒。

2. 慢病毒包装

(1) 取 10 μL 慢病毒包装辅助质粒混合物（Package Plasmid Mix）加入到 2 mL 离心管中，加入 2.5 μg 含有目的基因的慢病毒载体质粒，轻轻混合，加入 32 μL PolyShooter™ 转染试剂与质粒混合，室温孵育 3 分钟。

- 慢病毒载体质粒需根据研究基因自行构建，应使用无内毒素质粒抽提试剂盒进行质粒提取，保证质粒 A_{260}/A_{280} 比值为 1.8-2.0，浓度不低于 500 ng/μL。溶解后的质粒切忌反复冻融，需按照使用量进行分装并于-20℃保存。

(2) 往上述混合物中加入 1.8 mL 无血清无双抗的 DMEM 基础培养基，轻轻混匀，在室温下静置 30 分钟，形成转染试剂-核酸复合物。

- 转染试剂-核酸复合物在室温下 4 个小时内保持稳定。

(3) 将上述 1.8 mL 转染试剂-核酸复合物轻轻地逐滴均匀加入 10 cm 皿 293T 细胞中，轻轻摇动培养皿混匀，置于 37℃，5% CO_2 培养箱中培养产毒。

3. 收获病毒

(1) 转染 24 h 后，可选择弃去初始病毒上清液，加入 10-15 mL 新鲜的完全培养基(DMEM +10% FBS)至 10 cm 细胞培养皿中，置于 37℃，5% CO_2 培养箱继续培养(此步骤可选)。

(2) 转染 48 h 后，收集病毒上清液，再加入 10-15 mL 新鲜的完全培养基(DMEM +10% FBS)至 10 cm 细胞培养皿中，置于 37℃，5% CO_2 培养箱继续培养。

(3) 转染 72 h 后，观察细胞状态并拍照，进行二次病毒上清液收集，与 48 h 收集的上清液混合，300xg 离心 10 分钟以除去细胞碎片，使用 0.22 μm 滤器过滤，过滤后的上清液可直接感染目的细胞，或使用慢病毒浓缩试剂盒(LC110R)浓缩后感染目的细胞。

- 切忌反复冻融病毒，冻融一次病毒滴度将降低 10-20%。-80℃保存的慢病毒最好在半年内使用。

二、病毒滴度测定

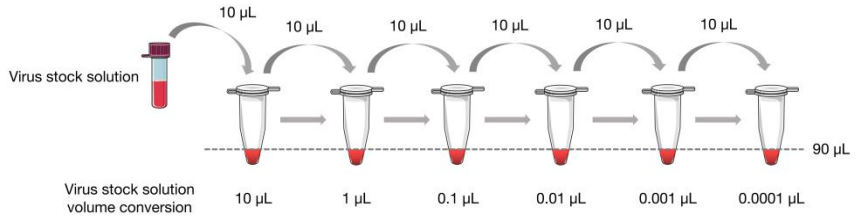
1. 孔稀释法标定带荧光的重组慢病毒滴度

(1) Day1：准备细胞

对生长状态良好的 293T 细胞消化计数后稀释至 1-3x10^5 个 /mL，加入 96 孔板，100 μL/孔（1-3x10^4 个 /孔），每一种慢病毒设 6 个梯度孔，置于 37℃，5% CO_2 培养箱中培养。

(2) Day2：病毒的稀释与感染

在 EP 管中做 10 倍梯度稀释，连续 6 个稀释梯度。稀释方法如下：准备 6 个无菌 EP 管，每个 EP 管中加入90μL 新鲜的完全培养基（含 10 μg/mL polybrene），取待测定病毒液 10 μL 加入到第一个 EP 管中（标记 10 μL），混匀后取 10 μL 病毒稀释液加入到第二个 EP 管中（标记 1 μL），以此类推，直到稀释到最后一管。弃去 96 孔板中原有的培养基，将稀释好的病毒依次加入孔中，并做好标记，小心操作，不要吹起细胞，置于培养箱中培养 16 h。如需设置复孔，则按复孔的数量倍数增加以上用量。



(3) Day3：弃病毒，换液

吸去带有病毒的培养基，在每个孔中再加入 100 μL 预热的新鲜完全培养基。

(4) Day4：荧光计数与滴度计算

方法 1：末位稀释计数法

感染 36-48 h 后，用荧光显微镜对荧光阳性细胞进行计数。数出最后两孔的荧光细胞数(若设置了复孔，则计算复孔内的总数之和并计算出平均数)，假设为 A(倒数第二孔的荧光细胞数）和 B（倒数第一孔的荧光细胞数)。

慢病毒滴度计算公式 1：病毒滴度（TU/mL) = （A+B×10）×1000/2/A 孔病毒量（μL）

举例 1：5 号管对应的荧光阳性细胞数为 10 个，6 号管对应的荧光阳性细胞数为 2 个，则病毒滴度为：

滴度（TU/mL）= （10+2x10）x1000/2/0.001 = $1.5x10^7$

如果需要感染 $2x10^5$ 个细胞，MOI=5 (1 个细胞对应 5 个病毒颗粒)，则需病毒体积为：

所需病毒体积 = 2 $x10^5$x 5/$1.5x10^7$（mL）= 0.067 mL = 67 μL

方法 2：适量荧光计数法

感染 36-48 h 后，用荧光显微镜或流式细胞术对荧光比例合适（10%-50%）的连续两个梯度进行统计，数出两孔的荧光细胞数(若设置了复孔，则计算复孔内的总数之和并计算出平均数)，假设为 C（较高浓度孔的荧光细胞数）和 D（较低浓度孔的荧光细胞数）。

慢病毒滴度计算公式 2：病毒滴度（TU/mL) = (C+D×10）×1000/2/C 孔病毒量（μL）

举例 2：3 号管对应的荧光阳性细胞数为 10000 个，4 号管对应的荧光阳性细胞数为 2000 个，则病毒滴度为：

滴度（TU/mL）= （10000+2000x10）x1000/2/0.1 = $1.5x10^8$

如果需要感染 $2x10^5$ 个细胞，MOI=30（1 个细胞对应 30 个病毒颗粒），则需病毒体积为：

所需病毒体积 = 2 $x10^5$x 30/$1.5x10^8$（mL）= 0.04 mL = 40 μL

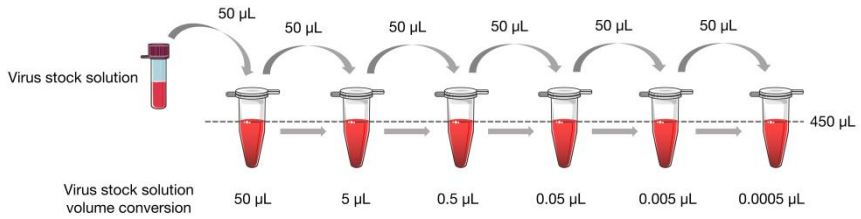
2. 相对定量 PCR 标定非荧光的重组慢病毒滴度

(1) Day1：准备细胞

对生长状态良好的 293T 细胞消化计数后稀释至 1-3x10^5 个 /mL，加入 24 孔板，500 μL/孔（0.5-1.5x10^5 个 /孔），每一种慢病毒设 6 个梯度孔，置于 37℃，5% CO_2 培养箱中培养。

(2) Day2：病毒的稀释与感染

在 EP 管中做 10 倍梯度稀释，连续 6 个稀释梯度。稀释方法如下：准备 6 个无菌 EP 管，每个 EP 管中加入450μL 新鲜的完全培养基（含 10 μg/mL polybrene），取待测定病毒液 50 μL 加入到第一个 EP 管中（标记 50 μL），混匀后取 50 μL 病毒稀释液加入到第二个 EP 管中（标记 5 μL），以此类推，直到稀释到最后一管。弃去 24 孔板中原有的培养基，将稀释好的病毒依次加入孔中，并做好标记，小心操作，不要吹起细胞，置于培养箱中培养 16 h。如需设置复孔，则按复孔的数量倍数增加以上用量。



(3) Day3：弃病毒，换液

吸去带有病毒的培养基，在每个孔中再加入 500 μL 预热的新鲜完全培养基。

(4) Day4：相对定量 PCR 与滴度计算

用 PBS 清洗并将细胞吹打下来，离心收集细胞，进行基因组 DNA 的提取，qPCR 检测。以被测慢病毒载体梯度稀释为标准品，慢病毒载体上的通用引物进行 qPCR 以获得病毒整合拷贝数。以 Actin 质粒梯度稀释为标准品，Actin 引物进行 qPCR 检测样品的

基因组拷贝数以得到基因组拷贝数。

慢病毒滴度计算公式 3：滴度（IU/mL）=(E×N×1000)/对应孔病毒量（μL），其中 E=平均每基因组慢病毒整合拷贝数，N=感染时细胞的数目（约为 1.5×10^5）。

- 测定时，设置一组带荧光的已知 TU 的慢病毒作为对照，以校验检测出的数值。

三、慢病毒感染目的细胞

VSVG 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，multiplicity of infection）。

1. 按照上述步骤包装慢病毒及确定慢病毒滴度，通过病毒滴度和 MOI 计算所需病毒量（计算公式参考 06/实验步骤/病毒滴度测定）。
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 $1\text{-}3\times10^5$/mL，加入 12 孔板，1 mL/孔。放入 37℃，5% CO_2 培养箱中培养。

- 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。

3. 配制慢病毒+polybrene+培养基混合液。polybrene 为常用的促感染试剂，能够显著提高病毒与细胞的接触及感染效率，一般使用浓度为 2-10 μg/mL，但对某些细胞（如末端分化的神经元，DC 细胞等）毒性较大，初次使用建议先做毒性测试。
4. 吸去 12 孔板中目的细胞的培养基，加入 3 中配制的慢病毒混合液，放入 37℃，5% CO_2 培养箱中继续培养。

- 感染悬浮细胞或半悬浮细胞，则需采用平角离心转染法，即将适量的病毒液加入细胞培养板后，封好口，放入平角离心机中，低速（200xg）离心 1 h，然后放入培养箱中继续培养。
- 若实验条件有限，没有平角离心机，可用离心管代替，将细胞吸入离心管中，进行低速离心，去掉大部分上清，加入适量的病毒液，室温放置 15 min，然后将细胞和病毒液同时吸出转入培养板中继续培养。

5. 病毒感染 16 h 后更换为新鲜培养基继续培养。
6. 病毒感染 36-48 h 后，荧光显微镜下观察荧光表达情况。

7. 若表达效果不理想，可调整 MOI（例如，设置 MOI 梯度）再次检测。

07/适用范围

兼容大多数慢病毒表达载体，经过设计及优化配比，确保将重组子包装成具有高感染率的慢病毒颗粒，同时防止病毒的自我复制。

08/注意事项

1. 该系统与 ViralStars™ Lentivirus Packaging Cell Line（CL110001）配合使用，可包装出更高滴度、更高表达水平的慢病毒。
2. 在收获粗病毒后，建议额外分装几支 20-100 μL 小体积管，和其他分装的大体积病毒一并置于-80℃保存。待这些小体积病毒结冰后，取出来融化，再测定滴度。这一步可以模拟一次冻融带来的活性滴度下降，这样测得的滴度才是真正具有参考价值的。
3. 为了您的健康安全，请规范操作，穿戴实验服与手套开展实验。
4. 所有慢病毒操作均需在 BSL2 级生物安全柜中进行。
5. 本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及治疗。

09/实验案例分析

1. 提前一天使用 10 cm 细胞培养皿培养 ViralStars™ Lentivirus Packaging Cell Line（CL110001），待细胞密度为 75% 左右开始包装慢病毒。
2. 使用 ViralStars™ LP Lentivirus Packaging Kit（LP110-10）进行慢病毒包装。取 10 μL 慢病毒包装辅助质粒混合物（Package Plasmid Mix）加入到 2 mL 离心管中，加入 2.5 μL 表达 GFP 的对照质粒（Control Plasmid），轻轻混合，加入 32 μL PolyShooter™ 转染试剂与质粒混合，室温孵育 3 分钟。

3. 往上述混合物中加入 1.8 mL 无血清无双抗的 DMEM 基础培养基，轻轻混匀，在室温下静置 30 分钟，形成转染试剂-核酸复合物。

4. 将上述 1.8 mL 转染试剂-核酸复合物轻轻地逐滴均匀加入 10 cm 皿慢病毒包装细胞中，轻轻摇动培养皿混匀，置于 37℃，5% CO_2 培养箱中培养产毒。

5. 转染 24 h 后，弃去初始病毒上清液，加入 10 mL 新鲜的完全培养基(DMEM +10% FBS)至 10 cm 细胞培养皿中，置于 37℃，5% CO_2 培养箱继续培养。

6. 转染 48 h 后，收集病毒上清液，再加入 10 mL 新鲜的完全培养基(DMEM +10% FBS)至 10 cm 细胞培养皿中，置于 37℃，5% CO_2 培养箱继续培养。

7. 转染 72 h 后，观察细胞状态并拍照，进行二次病毒上清液收集，与 48 h 收集的上清液混合后，300xg 离心 10 分钟以除去细胞碎片，0.22 μm 滤器过滤，使用 ViralStars™ LC Lentivirus Concentration Solution 慢病毒浓缩试剂盒 (LC110R) 进行 20 倍浓缩，使用 1 mL ViralStars™ LS Lentivirus Storage Solution（LS110R）重悬慢病毒颗粒。

8. 孔稀释法测定病毒滴度（参考 06/实验步骤中病毒滴度测定方法），使用荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况，并拍照记录，实验结果如图 2 所示。

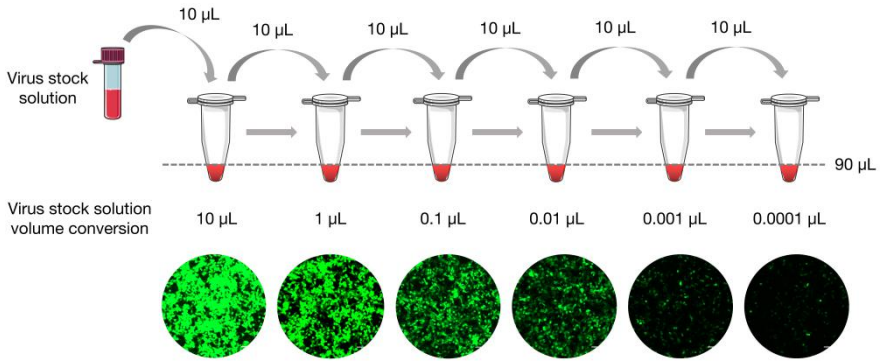


图2: 采用ViralStars™ LP Lentivirus Packaging Kit 包装慢病毒（GFP, Control Plasmid）感染 293T 细胞检测病毒滴度

10/其他相关产品

产品名称	货号	规格
ViralStars™ Lentivirus Packaging Cell Line	CL110001	3-5x10^6 个细胞/管
ViralStars™ LC Lentivirus Concentration Solution	LC110R	100 mL
ViralStars™ LS Lentivirus Storage Solution	LS110R	100 mL
Polybrene (10 mg/mL)	LE110-01	1 mL
	LE110-05	1 mL x 5 支
Puromycin (10 mg/mL)	PS610-01	1 mL
	PS610-05	1 mL x 5 支