

Make a leap-forward in Biosciences

ViralStarsTM
Lentivirus Packaging Cell Line

Catalog Number: CL110001

LeapWalTM 立谱沃生物
BIOTECH

Hunan LeapWal Biotech Co., Ltd.



Product Manual

Version 1.0

LeapWalTM Biotech 保留此产品技术文件的所有权利。未经 LeapWalTM 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

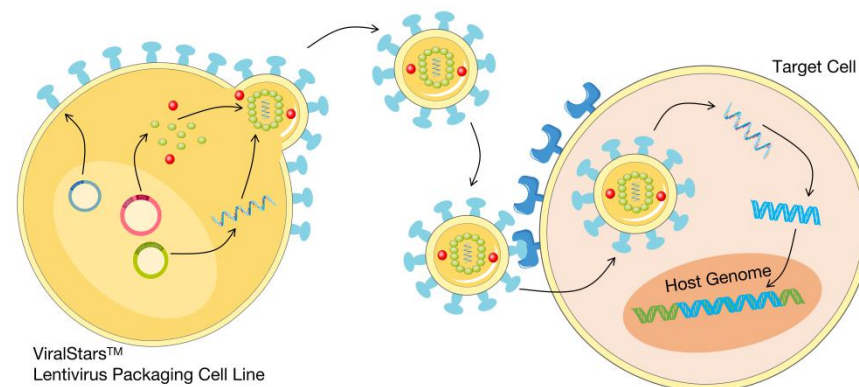
目录 Contents

High
titer

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/实验步骤	03
06/适用范围	05
07/注意事项	05
08/实验案例分析	05
09/其他相关产品	08

01/产品概述

慢病毒是一种逆转录病毒，能使外源基因整合入宿主细胞的基因组，实现外源基因稳定、长期的表达，比一般的逆转录病毒具有更高的滴度和更广的宿主范围。携带外源基因的慢病毒载体与包装载体（产生病毒颗粒所需的辅助蛋白）一同转染包装细胞，即可进行病毒的包装。包装好的慢病毒为假型病毒（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被剔除并被外源性目的基因所取代），分泌到细胞外的培养基中，经过离心取得上清液后进行慢病毒浓缩，浓缩后的慢病毒液可以直接用于宿主细胞的感染，目的基因进入到宿主细胞后，经过反转录，整合到基因组，从而实现外源基因在宿主细胞中的表达（下图）。



ViralStars™ Lentiviral transduction system

要充分利用慢病毒包装系统产生高滴度的慢病毒颗粒，就需要宿主细胞系具备易于转染并且可以高水平表达病毒蛋白质的特性。我们的 ViralStars™ Lentivirus Packaging Cell Line 经过了克隆筛选，可以满足这些需求。当与我们优质的 ViralStars™ LP Lentivirus Packaging Kit (LP110) 高滴度慢病毒包装试剂盒配合使用时，可以获得更

高的慢病毒滴度（高达 10^8 TU/mL）。ViralStarsTM Lentivirus Packaging Cell Line 是人胚胎肾细胞转化细胞 HEK 293 的亚克隆，经过基因编辑改进后筛选出的单克隆细胞株，具备高细胞活性、低细胞凋亡水平、可高度转染并高水平表达病毒蛋白质等特性。

02/产品组分

组分	CL110001
ViralStars TM Lentivirus Packaging Cell Line	3-5x10 ⁶ 个细胞/管

03/保存条件

为确保细胞活力，细胞产品接收后应立即进行细胞培养及后续操作（详见 05/实验步骤）。

04/产品特点

- ◇ 高细胞活性、低细胞凋亡水平
- ◇ 高度易于转染
- ◇ 高水平表达重组慢病毒

05/实验步骤

一、ViralStarsTM Lentivirus Packaging Cell Line 细胞传代

1. 待细胞密度达 90% 左右，即可进行传代培养。弃去旧培养基，用 PBS 润洗细胞 1-2 次。

2. 加入适量胰酶消化液，置于 37℃ 培养箱中消化细胞约 1-2 分钟，显微镜下观察细胞消化情况，若观察到大部分细胞变圆并脱落，则迅速拿回操作台，加入与胰酶等量的完全培养基（DMEM，10% FBS，1% 双抗）终止消化。
3. 轻轻吹打细胞，使细胞完全脱落后吸出，1000 rpm 离心 5 分钟，弃去上清液，用新鲜的完全培养基重悬细胞。
4. 将细胞悬液按合适的比例（推荐 1:4-1:5）接种到新的培养皿或培养瓶中，置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中继续培养。

二、ViralStarsTM Lentivirus Packaging Cell Line 细胞冻存

1. 选择处于指数生长期的细胞，按照常规方法收集细胞于离心管中。
2. 1000 rpm，离心 5 分钟，收集培养细胞沉淀，弃上清液。
3. 加入适量 4℃ 预冷的 LeapWalTM Cell Freezing Medium (1x) (PZ110R) 重悬细胞，制成细胞悬液。
 - 按照细胞密度和所用细胞冻存管的尺寸计算所需冻存液的量，推荐冻存密度：1x10⁶ 至 5x10⁶ cells/mL。
4. 将细胞悬液分装至已标记的冻存管中，建议每管 1 mL 或 1.5 mL。
5. 直接将细胞冻存管放入 -80℃ 超低温冰箱中，可长期冷冻保存。如果想放入液氮中长期保存，需先放入 -80℃ 冰箱至少 12 小时，方可移至液氮罐中长期保存。

三、ViralStarsTM Lentivirus Packaging Cell Line 细胞复苏

1. 在 15 mL 离心管中加入 5-10 mL 平衡至室温的完全培养基。
2. 从 -80℃ 冰箱/液氮中取出冻存的细胞，立即放入 37℃ 水浴锅或其他细胞复苏设备中，迅速解冻。
3. 将冻存管中的细胞悬液逐滴转移至预先准备好的含完全培养基的离心管中，1000 rpm，离心 5 分钟，收集细胞沉淀，弃上清（操作时小心，切勿将细胞沉淀移去）。
4. 加入适量平衡至室温的完全培养基重悬细胞，接种到事先准备好的培养容器中，轻

轻摇晃培养容器，使细胞分布均匀。

5. 培养 5-16 h 后，观察细胞状态，可视情况更换预热的新鲜完全培养液，之后进行常规细胞培养及传代。

06/适用范围

ViralStarsTM Lentivirus Packaging Cell Line 经过了基因编辑及单克隆筛选，具备高细胞活性、低细胞凋亡水平、可高度转染并高水平表达病毒蛋白等特性，兼容所有慢病毒包装体系。

07/注意事项

1. 该产品与我们优质的 ViralStarsTM LP Lentivirus Packaging Kit (LP110) 高滴度慢病毒包装试剂盒配合使用时，可以获得更高的慢病毒滴度（高达 10^8 TU/mL）。
2. 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。
3. 所有慢病毒操作均需在 BSL2 级生物安全柜中进行。
4. 本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及治疗。

08/实验案例分析

1. 提前一天使用 10 cm 细胞培养皿培养 ViralStarsTM Lentivirus Packaging Cell Line (CL110001) 及其它两种常用 HEK 293 包装细胞系 (HEK293T、293FT)，待细胞密度为 75% 左右开始包装慢病毒。
2. 使用 ViralStarsTM LP Lentivirus Packaging Kit (LP110-10) 进行慢病毒包装。取 3 个 2 mL EP 管，分别加入 10 μ L 慢病毒包装辅助质粒混合物 (Package Plasmid Mix)，2.5 μ L 表达 GFP 的对照质粒 (Control Plasmid)，轻轻混合，加入 32 μ L PolyShooterTM

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，做好标记，置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 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 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 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 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 培养箱继续培养。

7. 转染 72 h 后，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 μ m 滤器过滤，使用 ViralStarsTM LC Lentivirus Concentration Solution 慢病毒浓缩试剂盒 (LC110R) 进行 20 倍浓缩，使用 1 mL ViralStarsTM LS Lentivirus Storage Solution (LS110R) 分别重悬三组慢病毒颗粒。

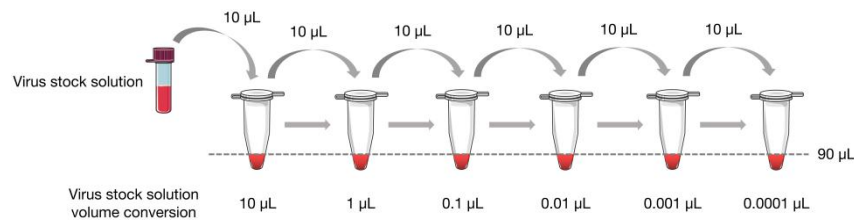
8. 孔稀释法测定病毒滴度。

(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 $1-3 \times 10^5$ 个 / mL，加入 96 孔板，100 μ L / 孔 ($1-3 \times 10^4$ 个 / 孔)，每一种慢病毒设 6 个梯度孔，置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 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 90 μ L 新鲜的完全培养基 (含 10 μ g/mL polybrene)，取待测定病毒液 10 μ L 加入到第一个 EP 管中 (标记 10 μ L)，混匀后取 10 μ L 病毒稀释液加入到第二个 EP 管中 (标记 1 μ L)，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。



(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

感染 36-48 h 后，采用流式细胞术对荧光比例合适（10%-50%）的连续两个梯度进行阳性细胞统计，计算出病毒滴度，实验结果如图 2 所示。

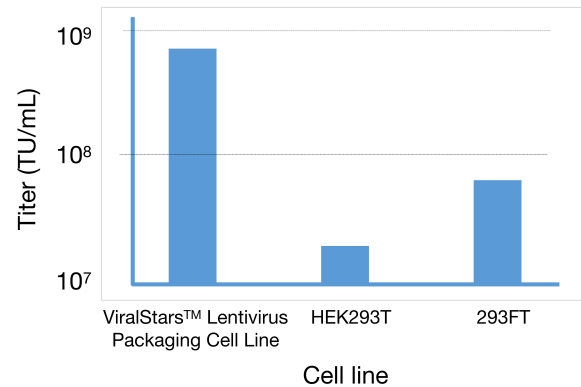


图 2: ViralStars™ Lentivirus Packaging Cell Line 慢病毒包装细胞系可制备出更高滴度的慢病毒颗粒。

我们使用 ViralStars™ LP Lentivirus Packaging Kit (LP110-10) 进行慢病毒包装，比较 ViralStars™ Lentivirus Packaging Cell Line 和其它两种常用 HEK 293 包装细胞系

的病毒制备能力，ViralStars™ Lentivirus Packaging Cell Line 明显优于其他细胞系——所获得的病毒滴度比 293FT 细胞高出 10 倍，比亲代 HEK 293 细胞系高出 26 倍。

09/其他相关产品

产品名称	货号	规格
ViralStars™ LP Lentivirus Packaging Kit	LP110-10	10 T
	LP110-20	20 T
	LP110-40	40 T
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