

Lenti-Pac™ SARS-CoV-2 Full Length Spike protein-pseudotyped (D614G) Lentivirus Packaging Kit

Lenti-Pac™ HIV 慢病毒包装试剂盒

Cat. No. LT015 (20 transfections)

Cat. No. LT016 (40 transfections)

使用手册

目录

- 1 产品概述
- 2 试剂盒组成
- 3 包装慢病毒颗粒所需的实验材料
- 4 慢病毒颗粒转导靶细胞所需的实验材料
- 5 实验前的准备
- 6 慢病毒颗粒的包装制备原理
- 7 制备慢病毒
- 8 慢病毒滴度检验
- 9 慢病毒感染目的细胞
- 10 使用许可与质量保证

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

广州高新技术产业开发区广州科学城
掬泉路3号广州国际企业孵化器F区8楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@igenebio.com
英文网址: www.genecopoeia.com
中文网址: www.igenebio.com

1 产品概述

HIV（人类免疫缺陷病毒）骨架的慢病毒载体是目前最常用的慢病毒表达载体，它能在体外或体内实验有效介导外源基因转导多种分化或非分化哺乳动物细胞，使外源基因稳定整合靶细胞的基因组，并进行稳定的高水平表达。

GeneCopoeia Lenti-Pac™ HIV 慢病毒包装系统是安全性较高的第三代慢病毒包装系统，表达载体自身失活，不产生额外的慢病毒复制。该系统包括：混合包装质粒、EndoFectin™-Lenti 转染试剂、可进一步提高滴度的 TiterBoost™ 滴度增强剂、以及 eGFP 阳性对照质粒。Lenti-Pac™ HIV 慢病毒包装系统可将 HIV 载体的慢病毒表达克隆包装成为具有转导效果的慢病毒颗粒，包装所得的慢病毒颗粒可立即使用，介导目的基因在哺乳动物细胞进行高效表达。

GeneCopoeia 提供 40000 多种人源及小鼠源的慢病毒载体 ORF 表达克隆，以及针对人源、小鼠源、大鼠源及其他哺乳类动物染色体组靶基因的慢病毒载体 shRNA 克隆。除此以外，GeneCopoeia 同时提供 20000 多种人源慢病毒载体 miRNA 前体表达克隆、miRNA 抑制剂表达克隆以及启动子报告克隆，18000 种小鼠的慢病毒载体启动子报告克隆。以上所有克隆均应用 HIV 骨架，可随时应用于慢病毒包装。

根据疾病控制中心制定的标准，GeneCopoeia 第三代 HIV 慢病毒包装系统满足生物安全第二级别（BSL-2）的要求。

1. 删除了 HIV 载体 3'LTR 的 U3 区段增强子，使慢病毒载体自体失活，慢病毒进行转导后无法自行复制，提高使用安全性。
2. 5'LTR 上游应用 RSV 启动子，使病毒 RNA 的生产无需依赖 Tat，进一步减少对野生型 HIV 骨架的依赖。
3. 对慢病毒表达克隆的包装、复制和转导起关键作用的 HIV 骨架组件降低至 3 个（gag、pol、rev），并分别在 3 个不含包装信号的质粒进行表达；此外，3 个组件与慢病毒载体、SARS-CoV-2 S 表达载体或其它相关载体均无显著同源结构，防止通过同源重组产生可自行复制的病毒。
4. 表达 HIV 骨架相关组分（gag、pol、rev）的包装质粒不含包装信号，因此，包装所得的慢病毒颗粒不含 HIV 骨架相关组分，从而无法自主复制。

2 试剂盒组成

试剂盒组成及推荐储存环境 (表格内容参照货号 Cat. No. LT015/LT016)

试剂盒成分	货号	包装规格	运输温度	保存条件
Pseudo type packaging mix (FLSP-D614G)	LT015-01 LT016-01	100 µL (0.5 µg/µL) 200 µL (0.5 µg/µL)	常温运输	-20°C 可保存至少 6 个月 -80°C 可保存至少 12 个月 可根据每次用量，分装保存于-80°C，避免反复冻融。
eGFP Positive Control Plasmid	LT001-02 LT001-02	15 µg (0.25 µg/µL) 15 µg (0.25 µg/µL)	常温运输	-20°C 可保存至少 6 个月 -80°C 可保存至少 12 个月 可根据每次用量，分装保存于-80°C，避免反复冻融。
EndoFectin™-Lenti	LT001-03 LT002-03	500 µL 1 mL	常温运输	4 - 8°C 可保存至少 12 个月
TiterBoost™ Viral Titer Reagent (500×)	LT001-04 LT002-04	500 µL 1 mL	常温运输	4 - 8°C 可保存至少 12 个月

3 包装慢病毒颗粒所需的实验材料

1. GeneCopoeia GCI-L3 化学感受态细胞 (Cat. No. CC003), 该细胞系用于扩增慢病毒表达克隆;
2. GeneCopoeia 293Ta 慢病毒包装细胞系(Cat. No. LT008/LT009), 亦可选择 HEK 293T/17 细胞系(ATCC Cat. No. CRL-11268), 该细胞系用于包装慢病毒颗粒;
3. ACE2 稳转细胞株(Genecopoeia Cat. No. SL221)或 ACE2+TMPRSS2 稳转细胞株(Genecopoeia Cat. No. SL222)用于测定慢病毒滴度、检验转导效果;
4. DMEM 培养液 (含葡萄糖、谷氨酰胺、丙酮酸钠), 用于培养工具细胞系;
5. 胎牛血清, 例如 Thermo Scientific (Cat. No. SH300700.02), 用于培养工具细胞系;
6. 无血清培养液, 例如 Invitrogen Opti-MEM I (Cat. No. 31985-062/31985-070);
7. BD Falcon® 5ml 或 14 ml 离心管(Cat. No. 352053/352059)。

4 慢病毒颗粒转导靶细胞所需的实验材料

1. ACE2 稳转细胞株(Genecopoeia Cat. No. SL221)或 ACE2+TMPRSS2 稳转细胞株(Genecopoeia Cat. No. SL222)用于测定慢病毒滴度、检验转导效果;
2. 凝聚胺(Polybrene), 例如 Sigma-Aldrich (Cat. No. H9268): 以 150mM 氯化钠溶解 Polybrene, 调配成 10mg/mL 溶液, 过滤除菌, 分装贮存于 -20℃ 备用; 如需频繁使用, 可在使用后存放于 4℃ (4℃ 下可保存两个月); (不是包装必须的)
3. 结晶紫(Sigma-Aldrich Cat. No. C3886): 溶于 25%乙醇, 溶液终浓度为 0.5% (不是包装必须的)
4. 青霉素-链霉素双抗, 如 Sigma-Aldrich (Cat. No. P4333), 用于哺乳动物细胞的转导后培养;
5. 用于后续筛选稳转株的抗生素: 嘌呤霉素(Invivogen Cat. No. ant-pr-1/ant-pr-5)、潮霉素 B (Invivogen Cat. No. ant-hm-1/ant-hm-5)、新霉素(G-418) (Invivogen Cat. No. ant-gn-1/ant-gn-5);
6. BD Falcon® 5ml 或 14 ml 离心管(Cat. No. 352053/352059)。

5 实验前的准备

在您收到慢病毒载体的表达克隆后, 如需马上开始慢病毒包装操作, 请先将收到的表达克隆转导至 GeneCopoeia GCI-L3 化学感受态细胞 (或具有同等活力的其它感受态细胞系) 进行质粒活化; 提取质粒 DNA 后, 以可靠的 DNA 纯化方法制备去内毒素质粒 DNA, 再用于慢病毒包装操作。GeneCopoeia 慢病毒载体的 ORF、shRNA 及 miRNA 表达克隆均含有氨苄青霉素抗性基因, 便于进行上述质粒活化及大提步骤。

如您使用的表达克隆是购自 GeneCopoeia™ 的去内毒素质粒, 则可直接用于慢病毒包装实验, 不需进行上述的预处理。

注意: 表达质粒状态对包装效率有重要影响

必须使用低内毒素的转染级别质粒。可通过 260 nm 光吸收测定 DNA 浓度, 并根据 260 nm/280 nm 确定 DNA 纯度 (比值在 1.8 ~2.0 范围内为宜), 并通过琼脂糖电泳检测 DNA 完整性。

如您使用的表达克隆是新购自 GeneCopoeia™ 的去内毒素质粒, 则不需进行上述处理。如质粒在使用前经历了较长的储存时间, 则建议先检测质粒 DNA 状态, 再进行包装操作。

注意: 包装细胞的生长状态对包装效率有重要影响

必须使用生长状态良好、连续传代的包装工具细胞 (293Ta)。请确保细胞培养液无细菌、真菌或支原体污染; 如细胞刚从液氮罐取出并复苏, 请先让该细胞传代至少两次, 再用于慢病毒包装。

6 慢病毒颗粒的包装制备原理

GeneCopoeia 提供的 HIV 骨架慢病毒表达系统由加强了生物安全特性、并可提高产物滴度的第三代慢病毒载体系统优化所得。在该系统中，HIV 慢病毒表达质粒与 GeneCopoeia Lenti-Pac™ HIV 慢病毒包装试剂盒通过共转染，使重组慢病毒质粒于 293Ta 包装细胞 (GeneCopoeia Cat. No. LT008/LT009) 中表达、并包装成为具有感染活性的慢病毒颗粒、并分泌进入细胞培养液。

本系统产生的慢病毒以 SARS-CoV-2 病毒 S 蛋白作为准型，具有对表达 ACE2 受体细胞的高亲和性和较高的滴度。GeneCopoeia 即用型慢病毒表达质粒 (装载于慢病毒载体) 含有慢病毒包装、转导、整合至染色体组 DNA 并稳定表达目标基因所需的组分。但是，它缺乏转录和包装这些 RNA 拷贝到慢病毒的组分，这些组分由 Lenti-Pac™ HIV 包装质粒混合物提供，包含慢病毒骨架表达、调控、复制相关的基因。

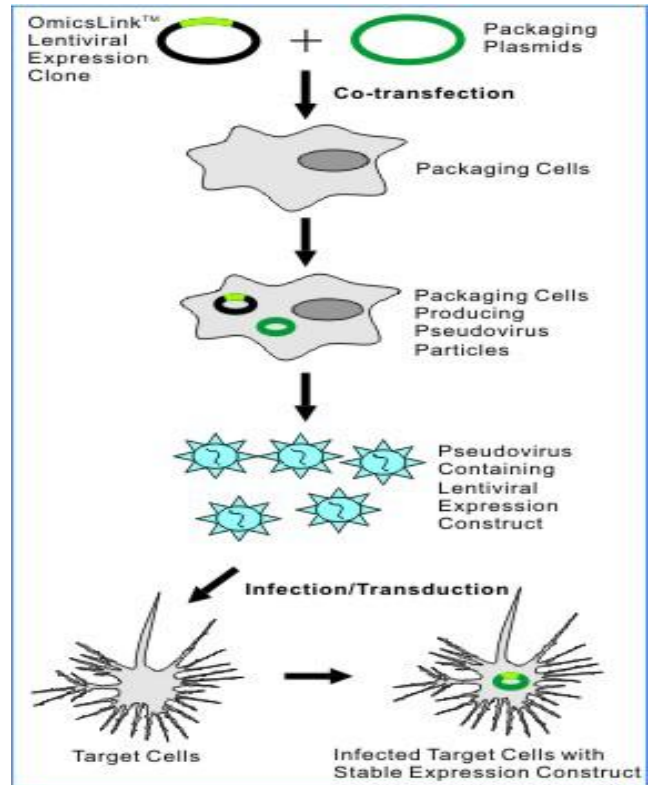


图 1. 慢病毒包装及感染目的细胞示意图

作为 Lenti-Pac HIV 包装质粒混合物的辅助工具，本试剂盒也包含表达 eGFP 蛋白的阳性对照载体、EndoFectin Lenti 转染试剂 (Cat. No. EF001/EF002)、TiterBoost™ 滴度增强试剂。EndoFectin™ Lenti 转染试剂对混合质粒转染包装细胞具有优化作用，相较其他转染试剂有更高的转染效率和更低的毒性。TiterBoost™ 试剂则可在包装过程中进一步增强慢病毒滴度。

7 制备慢病毒

以下步骤是使用 293Ta 工具细胞包装生产慢病毒颗粒的标准操作流程。

如严格按照以下步骤操作，每个 10 cm 培养板包装 eGFP 或 mCherry 阳性对照所得到的慢病毒产量为 10 mL 上清液(未离心)，每毫升具有 1×10^5 - 1×10^6 TU 的慢病毒颗粒。在靶细胞感染复数(MOI)为 1 的前提下，这些包装所得的慢病毒足够用于感染 1×10^6 - 1×10^7 数量的靶细胞。需要注意的是，针对不同长度、对包装细胞有不同危害程度目的基因，慢病毒滴度将根据实际情况而出现差异。

注意：以下是适用于感染哺乳动物细胞的慢病毒颗粒包装操作步骤。请务必在生物安全为第 2 级的实验环境下进行操作。

7.1 培养包装细胞

在进行转染前，提前两天将数量约为 1.3×10^6 - 1.5×10^6 的 293Ta 细胞(或其它具有同等活力的包装细胞)接种到 10 cm 培养板，加入 10 mL 含 10% 热灭活胎牛血清的 DMEM 培养基，在 5% CO₂、37°C 的条件下

铺板培养细胞。如 293Ta 细胞在进行转染的当天达到 70-80%融合率，则相对容易达到最佳包装效果。

提示：进行转染的两天前铺板培养包装细胞，可明显提高慢病毒滴度。培养细胞的期间请使用热灭活的胎牛血清，这种血清可从其他公司购买，也可通过 56℃振荡培养冻融血清 30 分钟制备获得。

7.2 制备 DNA-EndoFectin 转染复合物

往无菌 EP 管 (A 管) 加入慢病毒载体的表达质粒 2.5 µg、LentiPac™ 混合包装质粒 5.0 µL (0.5 µg/µL)，再添加 Opti-MEM I 补齐至 200 µL (此时，A 管的质粒总量是 5 µg)。取另一无菌 EP 管 (B 管)，加入 EndoFectin™ Lenti 转染试剂 15 µL，再添加 Opti-MEM I 补齐至 200 µL。一边轻柔涡旋 A 管，一边往 A 管滴加 B 管的溶液 (注意：请勿颠倒添加顺序)，直到 B 管溶液全部滴加完毕。溶液混合后，室温放置 10-25 分钟，即完成 DNA-EndoFectin 转染复合物的制备。

如反应体系较大，需要配制大量 DNA-EndoFectin 转染复合物，则建议使用圆底离心管 (如 Falcom 5mL 或 14mL 离心管)。

提示：虽然有蛋白的环境 (如 10%血清) 对转染步骤无影响，但不利于 DNA-EndoFectin 转染复合物的形成，所以本步骤必须使用无血清培养液。推荐使用 Opti-MEM I，也可以使用不添加血清的 DMEM (但效率比 Opti-MEM I 低)。每 1 µg 质粒添加 3.0 µL EndoFectin Lenti 试剂是最佳比例；如继续提高转染试剂的添加比例，转染效率不会继续出现明显提高。

7.3 转染包装细胞

进行转染操作的当天，将第 1 步铺板培养的细胞从培养箱取出，将第 2 步制作的转染复合物均匀滴加至细胞板；吸取转染复合物的动作需轻柔，切勿反复吹打转染复合物。滴加后以 8 字形水平晃动细胞板 (动作需轻柔)，使转染复合物均匀分散。完成转染后，在 5% CO₂、37℃ 的条件下培养 8-14 小时；

转染操作的 8-14 小时后，去除含有转染复合物的旧培养液，添加新鲜的、含 2-5% 热灭活胎牛血清、青霉素和链霉素的 DMEM 培养液 (例如 10 cm 培养板需添加 10 mL DMEM)。在这一步骤，可向新鲜 DMEM 培养液添加 1/500 体积的 TiterBoost™ 滴度增强剂 (例如 10 cm 培养板需添加 20µL TiterBoost™)，并继续在 5% CO₂、37℃ 的条件下培养，准备收获慢病毒颗粒。

提示：

- A.** 需要在转染操作后的 14 小时内去除含转染复合物的旧培养液，以新鲜培养液继续培养细胞。转染复合物对细胞状态有一定负面影响，不宜长时间接触细胞，更换新鲜培养液更利于获得高滴度慢病毒颗粒。
- B.** TiterBoost™ 滴度增强剂在其通常浓度下 (1×)，可显著提升慢病毒产物滴度 5-10 倍。TiterBoost™ 试剂使用后容易去除，在通常的慢病毒纯化步骤如离心、超滤或层析等过程中即可轻松除去，不残留在病毒液中。但如果使用未经纯化的病毒液直接感染靶细胞，病毒液的添加量不可超过培养容积的 1/10，否则易对靶细胞产生不利影响。TiterBoost™ 滴度增强剂在体系中的浓度低于 0.05 × 时，它对哺乳动物细胞的负面影响可忽略不计。推荐先对病毒液进行纯化再使用、或预先对靶细胞做梯度感染测试。

7.4 收获慢病毒颗粒

转染操作的 48 小时后收集细胞培养液，以 2000×g 离心 10 分钟去除细胞碎片，即可获得慢病毒的粗病毒液，或使用 0.45 µm 低蛋白结合的 PES 滤膜过滤细胞碎片。

提示：

A. 通常在转染操作后 24-48 小时是慢病毒产量的峰值，推荐在转染后 48 小时收集一次即可。如您希望单次获得更多病毒量，可在转染操作后 36、48、60 小时各收集一次培养液，在 36 小时和 48 小时收集后重新添加新鲜的（含 2-5% 热灭活胎牛血清、青霉素-链霉素双抗、TiterBoost™ 滴度增强剂）的 DMEM 培养液，以便继续收集。

B. 请勿使用硝酸纤维素膜过滤慢病毒液进行纯化。硝酸纤维素膜可与慢病毒结合，使过滤后的产物滴度降低。

收集、纯化后的病毒液可直接用于感染靶细胞，也可先测试获得滴度数据后再进行靶细胞的感染操作。在感染靶细胞前，请先确认靶细胞的生长状态是否良好。如收集到的慢病毒液不打算立即用完，则建议分装成小管并贮存于 -80℃，要使用时再取出对应的份量；因为慢病毒每冻融一次，滴度都将明显降低约 50%。

8 慢病毒滴度检验

如您希望在正式转导靶细胞时能更精确计算病毒液的添加量，建议您在收获慢病毒液后检验滴度，以确认包装成果、并计算出有效感染靶细胞所需的病毒量。以下检测方法使用的工具细胞是 SL221，您也可使用 SL222 或其它 MOI=1 的工具细胞。使用不同工具细胞，检测所得的滴度或有少量差异，所以请在重复滴度检测时使用同一种工具细胞。

第一天：培养 SL221 或 SL222 细胞

1. 使用 24 孔培养板，铺板培养细胞，每孔各加入细胞 5×10^4 、DMEM 全培养基 0.5mL（添加 10% 热灭活胎牛血清、青霉素-链霉素双抗），在 5%CO₂、37℃ 条件下培养过夜（约 24 小时）。检测每种慢病毒滴度所需的板孔至少 5 个，您可根据手里的慢病毒数量决定接种板孔的数量。

提示：具体铺板的细胞数取决于细胞的种类，一般在感染实验时达到 30-40% 的融合度即可。

第二天：感染 SL221 或 SL222 细胞

2. 细胞培养 24 小时后，去除细胞培养液，先加入按提示 B 配置好的培养液，再加入以下步骤 2a 或 2b 所示的稀释慢病毒。每种慢病毒分别对应细胞培养板的 5 个板孔。

2a. 慢病毒带有荧光标记可使用流式细胞荧光计数法检测滴度。先梯度接种慢病毒：细胞板第一孔添加 0.1 μL 慢病毒原液（亦可取 10uL 已稀释 100 倍的病毒原液）、第二孔添加 0.5 μL 慢病毒原液（亦可取 50uL 已稀释 100 倍的病毒原液）、第三孔添加 2.0 μL 慢病毒原液、第四孔 10 μL 慢病毒原液、第五孔 50 μL 慢病毒原液。各孔分别加入适当 DMEM 培养基（添加 10% 热灭活胎牛血清、青霉素-链霉素双抗溶液）至终容量为每孔 0.5 mL。（下接步骤 4-5a）

2b. 使用药物筛选和细胞计数法进行分析。先梯度接种慢病毒：细胞板第一孔添加 0.001 μL 慢病毒原液（亦可取 10uL 已稀释 10000 倍的病毒原液）；在第二孔添加 0.01 μL 慢病毒原液（亦可取 10uL 已稀释 1000 倍的病毒原液）；在第三孔添加 0.1 μL 慢病毒原液（亦可取 10uL 已稀释 100 倍的病毒原液）；在第四孔添加 0.5 μL 慢病毒原液（亦可取 50uL 已稀释 100 倍的病毒原液），在第五孔添加 2.0 μL 慢病毒原液。各孔加入适当 DMEM 培养基（添加 10% 热灭活胎牛血清、青霉素-链霉素双抗溶液）至终容量为每孔 0.5 mL。（步骤 5b-10）

在 4-8℃ 下培养细胞两小时，再将细胞板置于含 5%CO₂ 条件的培养箱内，37℃ 培养过夜。

提示:

- A. 只使用培养基对慢病毒进行稀释, 不可使用水或其它 buffer 进行稀释。
- B. 以 DMEM 培养基稀释 Polybrene 至 10 µg/mL, 内含 5% 热灭活胎牛血清和青霉素-链霉素双抗。加入第 2 步制得的 Polybrene 混合物 0.25mL, Polybrene 的终浓度应为 5 µg/mL。
- C. Polybrene 的最佳浓度取决于细胞类型, 或许需要凭经验值进行估算, 其通常范围是 2-10 µg/mL。需预留足够 Polybrene 用于阴性对照孔。
- D. 与 Polybrene 接触时间过长 (大于 12 小时), 对某些细胞将产生毒性。

第三天: 更换培养基

4. 以胰酶消化细胞并转移至 6 孔板 (每块 6 孔板对应一种慢病毒, 留出一孔用于阴性对照细胞), 以 DMEM 培养基 (添加 10% 热灭活胎牛血清、青霉素-链霉素双抗溶液) 培养 48 小时。

第五天: 以荧光法或药筛测定慢病毒滴度

5a. 带上 eGFP 荧光的细胞可用 FACS (流式细胞分析技术) 进行计数。使用荧光显微镜可进行 eGFP 荧光观察。通常情况下, 在荧光显微镜(100×)下, 每孔随机抽取 10 个视野判断该细胞孔的荧光细胞百分比。观察荧光状态后, 细胞以胰酶消化, 悬浮于 DMEM 全培养基, 可使用血细胞计数器测定每孔细胞总数。
慢病毒液滴度 (TU/mL) = 每个视野的荧光百分比平均值 × 被转染细胞总数 ÷ 实际添加的慢病毒液体积 (单位: mL)。

5b. 如慢病毒不带有荧光标记, 感染 SL222 或 SL221 细胞后, 可在更换 DMEM 培养基时添加合适的选择药物 (提示: 该选择药物的浓度应提前根据经验值决定), 然后按下方步骤 6-10 操作。

第 6-14 天: 选择稳定转导的细胞, 进行菌落计数

6. 细胞每隔 3-4 天更换新鲜的、含有合适选择药物的培养基, 直至肉眼可见抗药的细胞克隆出现 (通常在筛选 7-14 天后可观察到), 此时, 阴性对照孔内不应出现任何细胞克隆。

7. 除去培养基, 以 4℃ 冷冻的 PBS 洗板两次。

8. 每孔加入 10% 福尔马林覆盖平板底部, 室温下孵育 5 分钟以固定细胞。

9. 倒出福尔马林, 加入 0.5% 结晶紫溶液并室温孵化 10 分钟

10. 除去结晶紫溶液, 以自来水洗板直至背景无色。对蓝色细胞克隆计数并计算慢病毒的滴度。

慢病毒液滴度 = 蓝色细胞克隆数 × 已知的细胞 MOI (此处为: 1) ÷ 实际添加的慢病毒液体积 (单位: mL)。

提示: 使用药筛法检测的慢病毒滴度明显低于 FACS 检测的慢病毒滴度。

9 慢病毒感染目的细胞

转导效率的高低是由目的细胞及实验操作决定的。建议检验慢病毒的浓度时, 使用已测滴度、含阳性对照 eGFP 的慢病毒, 并设置适用于目的细胞的 MOI 值。感染结束后, 通常即可测定含 eGFP 荧光的慢病毒最适浓度。

第一天: 铺板培养细胞

1. 在进行慢病毒感染前 24 小时, 在 24 孔板上铺板培养目的细胞, 每孔细胞数 2-10 × 10⁴ 个, 添加 0.5mL DMEM 培养基 (添加 10% 热灭活胎牛血清、青霉素-链霉素双抗溶液), 在 5% CO₂ 条件下, 37℃ 培养过夜。

提示：不同的细胞在慢病毒感染前最优的融合度有所不同，如 SL221 细胞融合度推荐达到 70%-80%，Hela 细胞融合度推荐达到 50%左右，NIH-3T3 细胞融合度推荐达到 30%-50%。因此需要根据细胞的种类，决定该细胞的铺板数量。

第二天：感染目的细胞

2. 制作慢病毒和全培养基的混合液（可添加 Polybrene，使 Polybrene 终浓度为 5-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），每细胞孔的慢病毒混合液用量为 0.5 mL。

提示：

慢病毒用量推荐从 0.1 μL 到 100 μL ，纯化慢病毒（滴度 10^8 TU/mL）推荐为 0.1 μL 、0.3 μL 、3 μL 、10 μL 、30 μL 。我们推荐同时做 eGFP 阳性对照的感染，其它合适的阳性及阴性对照也可。轻柔倾侧混合慢病毒和培养基，不可涡旋混合。

3. 去除旧培养基，加入步骤 2 制作的慢病毒混合液 0.5 mL 感染目的细胞。阴性对照孔加入 0.5 mL 含 Polybrene 的 DMEM 培养基，于 37°C 5%CO₂ 培养箱中继续培养。（可选操作：将平板置于 4-8°C 处理 2 小时，再于 37°C 5%CO₂ 培养箱中继续培养。）

提示：

低温下孵育 2 小时可明显提高转导效率。但如果目的细胞不耐受低温，此低温步骤可省略。

第三天：替换培养基

4a. 去除旧培养基，添加 0.5 ml 不含 Polybrene 的全培养基，进入步骤 5a。

4b. 用胰酶消化细胞，接种至 6 孔板或 10 cm 平板，添加培养基继续孵育 48 小时，进入步骤 5b。

第五天：分析转导成功的细胞，或开始药物筛选稳定转导的细胞

5a. 对被感染的目的细胞，可使用合适的生物学方法分析其瞬时表达。如用 eGFP 作为对照，则可使用流式细胞仪或荧光显微镜测定被感染的细胞百分比。

5b. 若要选择已稳定转导的细胞，以含有合适筛选药物的培养基替换旧培养基，每 3-4 天更换一次，直至具抗药性的细胞克隆变得肉眼可见（通常在进行药筛后 7-14 天）。

10 使用许可协议及质量保证

有限使用许可协议

以下条款适用于 GeneCopoeia 所有的产品。如果不接受以下条款，所有的产品必须 5 个工作日内返回 GeneCopoeia。GeneCopoeia 的产品仅限购买方内部研究使用，不可用于包括人类或体外诊断和治疗在内的其他用途。GeneCopoeia 的产品不得修改和转售、转赠给任何第三方，未经 GeneCopoeia 的书面批准，不得将产品用于向其他第三方提供服务或用于制造商品化产品。此产品必须按照 NIH 指南用于 DNA 重组和基因研究。

有限质量保证

GeneCopoeia 保证您收到的产品符合产品目录上的规格。如果 GeneCopoeia 的产品未能满足这些规格，GeneCopoeia 将替换该产品。如果不能提供替换产品，GeneCopoeia 将退款给购买方。这个有限质量保证不得延伸至产品的原始购买者以外的人。如果产品与订购信息不符，所有的产品必须在 30 天内返回 GeneCopoeia。GeneCopoeia 的责任仅限于替换产品，且退款只限于实际的购买价格。GeneCopoeia 不对任何由于使用或不正确使用本公司产品造成的直接、间接的、衍生的或偶然的损害所产生的后果负责。GeneCopoeia 对于产品的适销性以及任何特定使用用途不提供任何其他保证。

GeneCopoeia 致力于为我们的客户提供高质量的产品。如果你对我们的产品有任何问题和担忧，请和我们联系，电话：4006-020-200。

© 2020 GeneCopoeia, Inc.