

GeticoFect™ LV-Plus Transfection Kit

产品说明书

订购信息

货号	规格	组分	体积
181301	1L	GeticoFect™ LV-PLUS 转染试剂	6ml
		GeticoFect™ LV-PLUS 转染增强剂	40ml
181302	10L	GeticoFect™ LV-PLUS 转染试剂	60ml
		GeticoFect™ LV-PLUS 转染增强剂	400ml
181303	50L	GeticoFect™ LV-PLUS 转染试剂	5 X 60ml
		GeticoFect™ LV-PLUS 转染增强剂	5 X 400ml

操作步骤

一、适用范围

本标准操作程序适用于使用 LV-PLUS™慢病毒生产系统进行慢病毒载体生产过程中的细胞转染操作，旨在指导实验人员规范、准确地完成转染实验，获得高质量的慢病毒载体。

二、实验前准备

(一) 所需材料

1. **细胞：**在 LV-PLUS™生产培养基中培养的病毒生产细胞，该细胞源自 HEK293F 细胞系，适应在 LV-PLUS™生产培养基中进行悬浮培养，具有特定的细胞系特征，如经剪切的人腺病毒 5 DNA 转化、表达 E1A 腺病毒基因、缺乏 SV40 大 T 抗原、细胞倍增时间约 26 小时、在摇瓶培养中最大细胞密度可达 $\sim 1 \times 10^7$ 细胞/mL，且在细胞传代 5-20 次期间具有较高的慢病毒生产能力。

2. 培养基及试剂

- 预温至 37°C 的 LV-PLUS™生产培养基，这是一种完全的、化学成分确定的、无动物源成分、无血清、无蛋白的配方培养基，专为病毒生产细胞的生长和转染而开发。
- Opti-MEM™ I 减血清培养基，用于稀释质粒 DNA 和 LV-PLUS™转染试剂。
- LV-PLUS™转染试剂盒，包含转染试剂、增强剂。其中，转染试剂专为高效共转染多种质粒进入病毒生产细胞设计，毒性低；增强剂是化学成分确定的、无动物源成分、无血清、无蛋白的配方，用于提高慢病毒载体的产量。
- LV-PLUS™慢病毒包装混合物。
- 质粒 DNA，包括慢病毒包装质粒 LPM 和慢病毒转移质粒 LTV，要求无菌、无酚和氯化钠，且主要为超螺旋 DNA。

3. 耗材

- 一次性无菌锥形瓶、无菌离心管，用于细胞培养、试剂储存和离心操作。
- 移液器及枪头，用于精确移取各种试剂和细胞悬液。
- 根据实验规模选择不同规格的培养容器，如 96 孔深孔板、24 孔深孔板、迷你生物反应器管、125mL 摇瓶、250mL 摇瓶、1 L 摇瓶、2L 摇瓶、3L 摇瓶等。这些容器需具备良好的无菌性和适用性，以满足不同规模实验的需求。

4. 仪器设备

- CO₂抗性轨道摇床，为细胞培养提供稳定的振荡环境，不同摇床直径对应不同的推荐转速，如 19 mm 直径为 125±5 rpm, 25 mm 直径为 120±5 rpm, 50 mm 直径为 95±5 rpm。

- 可调节微量移液器，用于准确量取微升级别的试剂。
- 实验室混合器（涡旋混合器或等效设备），用于快速混合试剂，确保成分均匀。
- 3mm 轨道摇床，在特定实验步骤中使用。
- 温度和 CO₂控制培养箱，维持细胞培养所需的温度（37°C）、CO₂浓度（不超过 8%）和相对湿度（≥80%）。
- 细胞密度和活力检测设备，如带有台盼蓝的血细胞计数器或细胞计数器，用于监测细胞的生长状态和活力。

（二）实验环境准备

1. 所有使用的仪器设备需经过校准，确保实验数据的准确性和实验结果的可靠性。培养箱温度设置为 37°C，CO₂浓度不超过 8%，相对湿度≥80%。推荐使用加湿培养箱，以减少培养过程中培养基的蒸发，维持细胞生长环境的稳定。
2. 实验操作在无菌超净工作台中进行。使用前开启紫外灯消毒 30 分钟以上，操作过程中严格遵守无菌操作规范，如佩戴无菌手套、使用无菌器械等，避免微生物污染实验样本和试剂。

三、转染步骤

（一）细胞准备

1. 细胞复苏与传代

- 从液氮中取出病毒生产细胞冻存管，迅速将其放入 37°C 水浴中摇晃解冻。注意观察细胞悬液状态，待其接近完全融化，仅剩少量冰块时，从水浴中取出。
 - 用 70% 乙醇消毒冻存管表面，在超净台内将细胞转移至含有 30mL 预温 LV-PLUS™ 生产培养基的 125mL 摇瓶中。转移过程中，动作要轻柔，避免细胞受到机械损伤。
 - 将摇瓶置于 37°C、8% CO₂、≥80% 相对湿度的轨道摇床上培养。根据摇床摇臂直径设置合适的摇床转速，19mm 直径为 125±5 rpm，25mm 直径为 120±5 rpm，50mm 直径为 95±5 rpm。在培养过程中，定期观察细胞生长状态，每 3-4 天进行一次传代。当细胞密度达到 3.5 -5.5×10⁶活细胞/mL 时，表明细胞生长良好，可进行传代操作。传代时，根据细胞密度和推荐的接种密度计算所需细胞悬液体积，将细胞转移至新鲜的预温 LV-PLUS™ 生产培养基中继续培养。
2. **转染前细胞处理：**在转染前一天，使用细胞密度和活力检测设备测定处于对数生长期（细胞密度 3.5-5.5×10⁶活细胞/mL）的细胞密度和活力。根据测定结果，用新鲜的 LV-PLUS™ 生产培养基将细胞稀释，使细胞终密度为 3.5×10⁶活细胞/mL，置于摇瓶中过夜培养。这一步骤的目的是使细胞在转染时处于最佳生长状态，提高转染效率。

（二）转染试剂准备

1. 按照实验所需转染体积，依据优化的转染条件准备各试剂。具体试剂用量参考不同规模转染推荐体积表（见表 1）。该表中详细列出了不同培养容器下所需的细胞数、各种试剂的体积等参数，实验人员应严格按照表格数据进行准备。
2. 轻轻颠倒 LV-PLUS™ 转染试剂瓶 4-5 次，使转染试剂充分混匀。颠倒过程要轻柔，避免产生过多气泡，影响试剂性能。
3. 用 Opti-MEM™ I 培养基分别稀释质粒 DNA 和 LV-PLUS™ 转染试剂。稀释质粒 DNA 时，将所需量的质粒 DNA 加入到相应体积的 Opti-MEM™ I 培养基中，通过涡旋或颠倒管子使其混合均匀，确保质粒 DNA 均匀分散在培养基中。稀释 LV-PLUS™ 转染试剂时，同样将试剂加入 Opti-MEM™ I 培养基，可通过涡旋、颠倒或轻轻吹打 2-3 次辅助混合，使转染试剂充分溶解并均匀分布。
4. 将稀释后的质粒 DNA 加入稀释后的 LV-PLUS™ 转染试剂中，再次通过涡旋、颠倒或轻轻吹打 2-3 次混合均匀，形成转染试剂/质粒 DNA 复合物。混合过程要确保两种溶液充分接触，形成稳定的复合物，以便后续高效转染细胞。
5. 将转染试剂/质粒 DNA 复合物在室温下孵育 10 分钟。孵育过程中，复合物会进一步稳定，提高转染效率。需注意孵育时间不宜过长或过短，以免影响转染效果。

（三）细胞转染

1. 转染当天，再次使用细胞密度和活力检测设备测定细胞密度和活力。细胞密度应达到约 $5.0-6.0 \times 10^6$ 活细胞/mL，活力 $\geq 95\%$ 方可进行转染。若细胞密度或活力不符合要求，需调整培养条件或重新准备细胞。
2. 用新鲜的 LV-PLUS™ 生产培养基将细胞稀释至终密度为 4×10^6 活细胞/mL。
3. 将孵育后的转染试剂/质粒 DNA 复合物缓慢加入细胞悬液中，加入体积为最终生产体积的 10%（例如，最终生产体积为 30 mL，则加入 3mL 复合物）。加入过程中要缓慢滴加，并轻轻涡旋摇瓶，使复合物均匀分散在细胞悬液中，避免局部浓度过高对细胞造成损伤。
4. 将细胞置于 37°C 、 $8\% \text{CO}_2 \geq 80\%$ 相对湿度的轨道摇床上培养。不同培养容器推荐的摇床转速不同，具体可参考不同规模转染推荐体积表（见表 1）。合适的摇床转速有助于细胞均匀分布和充分接触营养物质，促进细胞生长和转染过程的进行。
5. 转染后 5-6 小时（LV-PLUS™ 增强剂添加时间最长可至转染后 14 小时），向细胞悬液中加入 LV-PLUS™ 增强剂。添加体积根据转染体积确定，如转染 30 mL 细胞则加入 1.2mL LV-PLUS™ 增强剂。添加增强剂时，要确保其均匀分散在细胞悬液中，可通过轻轻涡旋摇瓶实现。增强剂的加入可进一步提高慢病毒载体的产量。

（四）转染后培养与收获

1. 转染后 48-55 小时收获慢病毒载体。收集细胞培养液时，动作要轻柔，避免细胞碎片混入。将收集的细胞培养液转移至离心管中，将细胞在 $1,300 \times g$ 的条件下，使用水平转子离心机离心 15 分

钟。对于较小体积样本，可使用 1.5 mL 微量离心管，在台式离心机中 13,000 rpm 离心 5 分钟。离心的目的是去除细胞沉淀，收集含有慢病毒载体的上清液。

2. 将上清小心转移至新的管子中，注意不要吸到细胞沉淀，以收获慢病毒载体。再通过 0.45 μm 低蛋白结合滤器过滤上清液，进一步去除可能残留的细胞碎片和杂质，保证慢病毒载体的纯度。
3. 收获后的慢病毒载体应立即储存于 -80°C 。为避免反复冻融对病毒活性造成影响，可提前将上清分装到多个冻存管中保存。分装过程在超净台内进行，确保无菌操作。

四、不同规模转染推荐体积

容器类型	96 深孔板	24 深孔板	迷你生物反应器管	125-mL 摇瓶	250-mL 摇瓶	1-L 摇瓶	2-L 摇瓶	3-L 摇瓶
所需细胞数	3.84×10 ⁶	12×10 ⁶	72×10 ⁶	1.2×10 ⁸	2.4×10 ⁸	9.6×10 ⁸	19.2×10 ⁸	38.4×10 ⁸
起始培养体积	816 μL	2.55 mL	15.3 mL	25.5 mL	51 mL	204 mL	408 mL	816 mL
摇床转速 [1]	900 ± 50 rpm (3mm 摇径)	225±5 rpm 等	240±5 rpm 等	125 ± 5 rpm (19mm 摇径) 等	同 125-mL 摇瓶	同 125-mL 摇瓶	90±5 rpm 等	90±5 rpm 等
总质粒 DNA 量 (LPM + LTV) [2]	2.5μg/mL (终产培体积)	同左	同左	同左	同左	同左	同左	同左
LPM DNA 体积 [3]	1.44 μL	4.5 μL	27 μL	45 μL	90 μL	360 μL	720 μL	1.44 mL
LTV DNA 体积 [3]	0.96 μL	3 μL	18 μL	30 μL	60 μL	240 μL	480 μL	960 μL
稀释质粒 DNA 的 Opti-MEM™ I 体积 [4]	48 μL	150 μL	900 μL	1.5 mL	3 mL	12 mL	24 mL	48 mL
LV-PLUS™转染试剂量	5.76 μL	18 μL	108 μL	180 μL	360 μL	1.44 mL	2.88 mL	5.76 mL

注:

[1] 最佳转速依设备定, 给出为推荐范围。

[2] 可减半质粒量, 需测对转染效率影响。

[3] 质粒储备液浓度 1mg/mL, 转染终浓度 2.5μg/mL。

[4][5] 分别为稀释转染试剂、质粒 DNA 的 Opti-MEM™ I 体积。

[6] 生产体积需减去 LV-PLUS™增强剂体积。