

**GeticoFect™ 3000Plus Transfection
Reagent**

用于慢病毒生产说明书

操作步骤

一、实验准备

(一) 试剂与材料准备

使用 GeticoFect™ 3000Plus 转染试剂生产慢病毒标准操作流程 (SOP)

一、实验准备

(一) 材料准备

试剂:

DMEM (高糖, 含 谷氨酰胺补充剂、丙酮酸钠)

胎牛血清

遗传霉素选择性抗生素 (50mg/mL)

Opti-MEM I 低血清培养基 (含 谷氨酰胺补充剂)

Opti-MEM I 低血清培养基

丙酮酸钠 (100mM)

慢病毒包装混合物

GeticoFect™ 3000Plus 转染试剂

pLenti6.3/V5-GW/EmGFP 表达对照载体

293、293T、HT1080 细胞系

聚凝胺 (Polybrene™) 试剂 (10mg/mL)

结晶紫

杀稻瘟菌素 (Blasticidin S HCl)

(二) 培养基准备

1. 完全培养基：用于 293T 和 293FT 细胞培养，在无菌环境下，将 450mL DMEM（高糖，含谷氨酰胺补充剂、丙酮酸钠）、50mL 胎牛血清混合；若使用 293FT 细胞，还需额外添加 500μg/mL 遗传霉素选择性抗生素。
2. 慢病毒包装培养基：无菌条件下混合 474mL Opti-MEM I 低血清培养基（含 谷氨酰胺补充剂）、25mL 胎牛血清、1mL 丙酮酸钠（100mM）。

(三) 实验环境与安全注意事项

所有病毒制备及相关操作必须严格按照所在机构的生物安全二级（BL - 2）协议指南执行。实验结束后，所有接触过病毒的材料均需用 10% 漂白剂溶液处理后再丢弃。

二、慢病毒生产流程

(一) 正向转染（以 6 孔板为例，放大培养规模时参考表格调整用量）

1. 第 1 天（下午）：细胞接种
 - 取适量 293T 或 293FT 细胞，用慢病毒包装培养基重悬，以每孔 1.2×10^6 个细胞的密度接种到 6 孔培养板，每孔加入 2mL 慢病毒包装培养基。
 - 将培养板置于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中孵育过夜。
2. 第 2 天（上午）：转染操作
 - 转染时细胞密度需达到 95 - 99% 融合度。将 Opti-MEM I 低血清培养基恢复至室温，准备 Tube A 和 Tube B，按如下表格添加试剂：

成分	Tube A 体积	Tube B 体积
Opti-MEM I 低血清培养基	250 μL	250 μL
GeticoFect™ 3000Plus 转染试剂	7 μL	-
T3000 增强剂试剂	-	6 μL
慢病毒包装混合物（1 μg/μL）	-	2.25 μL
pLenti 表达载体	-	0.75 μg

- 将 Tube A 中的溶液缓慢加入 Tube B，轻轻吹打混匀，室温孵育 10 - 20 分钟，形成脂质-DNA 复合物。
- 孵育复合物期间，从每个培养孔吸出 1mL 培养基，使每孔剩余 1mL 培养基。
- 将 500μL 脂质 - DNA 复合物缓慢加入每个培养孔，加样时滴加到孔壁避免冲击细胞，加样后轻轻晃动培养板使复合物均匀分布。
- 将培养板放入 37°C、5% CO₂ 的培养箱孵育 6 小时。

- 6 小时后, 小心吸出含有脂质 - DNA 复合物的培养基, 用 10% 漂白剂处理后丢弃。每孔加入 2mL 预温的慢病毒包装培养基, 更换培养基时动作轻柔, 避免损伤细胞。
- 将培养板放回培养箱, 37°C、5% CO_2 条件下继续孵育过夜。
- 3. 第 3 天 (上午): 收获第一批病毒
 - 转染 24 小时后, 从每个培养孔收集 2mL 细胞上清液, 转移到 15mL 离心管, 4°C 保存。
 - 每孔加入 2mL 预温的慢病毒包装培养基, 继续将培养板放回 37°C、5% CO_2 的培养箱孵育过夜。
- 4. 第 4 天 (下午): 收获第二批病毒
 - 转染约 52 小时后, 从每个培养孔收集 2mL 细胞上清液, 与第一批收集的上清液合并, 每孔共收集到 4mL 上清液。
 - 将 4mL 上清液转移到离心管, 室温下 2000rpm 离心 10 分钟, 去除细胞碎片。离心结束后, 小心吸取上清液转移到新离心管, 弃去沉淀的细胞碎片。
 - 使用 0.45 μm 孔径的过滤器过滤澄清的慢病毒上清液, 进一步去除残留细胞碎片。
 - 将过滤后的病毒液分装到冻存管, -80°C 保存。若需浓缩病毒, 可在冻存前进行浓缩操作, 注意减少病毒冻存管的冻融次数, 以维持病毒滴度。

(二) 反向转染 (以 6 孔板为例, 放大培养规模时参考表格调整用量)

1. 第 1 天 (上午): 复合物形成与细胞接种
 - 将适量 293T 或 293FT 细胞用预温的慢病毒包装培养基重悬, 调整细胞浓度, 以 6 孔板为例, 每孔接种 (3.6×10^6) 个细胞。
 - 将 Opti-MEM I 低血清培养基恢复至室温, 准备 Tube A 和 Tube B, 试剂添加量同正向转染第 2 天操作。
 - 将 Tube A 中的溶液加入 Tube B, 室温孵育 10 - 20 分钟。
 - 将 500 μL 脂质 - DNA 复合物直接加入到 6 孔板的每个孔中。
 - 立即向每孔加入 1mL 含有 (3.6×10^6) 个细胞的慢病毒包装培养基, 接种细胞。注意反向转染时细胞接种密度比正向转染高 3 倍。
 - 将培养板放入 37°C、5% CO_2 的培养箱孵育 6 小时。
2. 第 1 天 (下午): 更换培养基
 - 转染 6 小时后, 小心吸出含有复合物的培养基, 用 10% 漂白剂处理后丢弃。
 - 每孔加入 2mL 预温的慢病毒包装培养基, 更换培养基后将培养板放回 37°C、5% CO_2 的培养箱孵育过夜。
3. 第 2 天 (上午): 收获第一批病毒: 操作同正向转染第 3 天上午收获第一批病毒的步骤。
4. 第 3 天 (下午): 收获第二批病毒: 操作同正向转染第 4 天下午收获第二批病毒的步骤。

三、慢病毒滴度测定

(一) 基于 GFP 筛选的滴度测定 (适用于表达 GFP 的慢病毒, 以 96 孔板为例进行高通量流式细胞术分析)

1. 第 1 天 (上午)
 - 在 96 孔板中接种 HT1080 细胞, 每孔接种 7000 个细胞, 加入 100 μL 培养培养基。
 - 将 96 孔板放入培养箱孵育 4 - 5 小时, 等待进行病毒转导。

- 在病毒转导前，新鲜配制病毒稀释液：将 15mL 新鲜培养培养基与 12 μ L 10mg/mL 聚凝胺试剂混合，涡旋混匀，使聚凝胺终浓度为 8mg/mL。
 - 取一个 96 孔圆底板，每 4 个孔为一组，每组加入 135 μ L 上述配制的培养基。
 - 向每组的第一排孔中加入 15 μ L 慢病毒上清液，此时总体积为 150 μ L，形成 1:10 的稀释度，用移液器轻轻吹打混匀。
 - 对第一排孔进行系列稀释：用移液器从第一排孔吸取 15 μ L 液体转移到第二排孔中，混匀，形成 1:100 的稀释度；依次类推，继续转移液体进行稀释，直至得到 1:1000、1:10000 等稀释度。
 - 从 HT1080 细胞培养孔中吸出原有的培养基，将制备好的不同稀释度的病毒液 100 μ L 加入到对应的 HT1080 细胞培养孔中。
 - 将 96 孔板室温下 2000rpm 离心 30 分钟。
 - 离心结束后，将 96 孔板放入培养箱孵育过夜。
2. 第 2 天
- 吸出含有病毒上清液的培养基，更换为新鲜的 HT1080 细胞培养培养基（不含聚凝胺试剂）。
 - 将细胞继续培养 3 天，3 天后通过流式细胞术分析 GFP 阳性细胞的百分比。
3. 滴度计算
- 根据 GFP 阳性细胞的百分比确定合适的用于计算滴度的稀释度，理想的转导范围是 1 - 20% GFP 阳性细胞。
 - 使用公式计算滴度。

（二）基于杀稻瘟菌素筛选的滴度测定（以 24 孔板为例）

1. 第 1 天（上午）
- 在 24 孔板中接种 HT1080 细胞，每孔接种 42000 个细胞（接种时细胞汇合度为 30 - 50%），加入 500 μ L 培养培养基。
 - 将 24 孔板放入培养箱孵育 4 - 5 小时，等待进行病毒转导。建议进行重复滴度测定。
 - 在病毒转导前，新鲜配制病毒稀释液：同基于 GFP 筛选的滴度测定中病毒稀释液的配制方法，将 15mL 新鲜培养培养基与 12 μ L 10mg/mL 聚凝胺试剂混合，涡旋混匀，使聚凝胺终浓度为 8mg/mL。
 - 取 5 个无菌离心管，分别加入 135 μ L 上述配制的培养基，并标记为 1 - 5 号管。
 - 向 1 号管中加入 15 μ L 慢病毒，用移液器吹打混匀。
 - 对 1 号管进行系列稀释：从 1 号管吸取 15 μ L 液体转移到 2 号管中，混匀，形成 1:100 的稀释度；依次类推，继续转移液体到 3 - 5 号管进行稀释，得到 1:1000、1:10000、1:100000 的稀释度。
 - 细胞接种 4 - 5 小时后，吸出 24 孔板中的培养基，每孔加入 450 μ L 上述配制的含有聚凝胺的培养基。将 24 孔板的孔编号为 1 - 5 号及一个对照孔。
 - 向 1 号孔中加入 50 μ L 1 号管的病毒稀释液，用移液器吹打混匀，此时 1 号孔中的病毒稀释度变为 1:100（因加入 50 μ L 稀释液，总体积变为 500 μ L，相对于原 1:100 稀释度又稀释了 10 倍）。
 - 按照同样的方法，将其他稀释度的病毒液分别加入到对应的编号孔中。
 - 向对照孔中加入 50 μ L 含有聚凝胺的培养基（不含病毒）。
 - 轻轻晃动 24 孔板，使液体混合均匀。
 - 将 24 孔板室温下 2000rpm 离心 30 分钟。

- 离心结束后，将 24 孔板放入培养箱孵育过夜。
- 2. 第 2 天
 - 吸出每孔中的培养基，更换为 500 μ L 新鲜的培养培养基（不含聚凝胺）。
 - 将细胞继续培养 24 小时。
- 3. 杀稻瘟菌素筛选
 - 病毒转导 48 小时后，吸出培养基，更换为含有杀稻瘟菌素（终浓度为 10 μ g/mL）的筛选培养基。
 - 此后每 2 天更换一次筛选培养基，持续 10 天。注意在染色前，对照孔应无存活细胞。
- 4. 第 12 天
 - 吸出培养基，每孔用 1mL PBS 洗涤。
 - 配制 1% 结晶紫工作溶液（将结晶紫溶解在 10% 乙醇水溶液中）。
 - 每孔加入 250 μ L 稀释后的结晶紫溶液进行染色，室温孵育 20 分钟。
 - 吸出染色液（染色液可重复使用或按规定丢弃），用清水多次洗涤培养板，以降低背景。
- 5. 滴度计算。

四、转染方法计算表格
1. 正向转染病毒生产的放大培养 (Table 1. Scale-up of viral production using forward transfection.)

细胞培养容器	放大倍数	接种时包装培养基体积 (mL)	每孔 293T 或 293FT 细胞数量	DNA 共转染				GeticoFect 3000 (μL)	替换用慢病毒包装培养基体积 (mL)	收获慢病毒总体积 (mL)
				Opti-MEM I 培养基体积 (mL)	慢病毒包装 (DNA)		P3000 试剂 (μL)			
					包装混合物 (μg)	pLenti 载体 (μg)				
6 孔板	1	2	1.2x10 ⁶	2x250 μL	2.25	0.75	6	7	2	2x2
60mm	2.2	4	2.6x10 ⁶	2x500 μL	5	1.7	13	15	4	2x4
10cm	5.8	12	7.0x10 ⁶	2x1.5mL	13	4.3	35	41	12	2x12
T75	7.9	16	9.5x10 ⁶	2x2mL	17.8	5.9	47	55	16	2x16
T175	18.4	37	22.1x10 ⁶	2x4.6mL	41.4	13.8	111	129	37	2x37

注：放大倍数基于 6 孔板生长面积计算

2. 反向转染病毒生产的放大培养 (Table 2. Scale-up of viral production using reverse transfection.)

细胞培养容器	放大倍数	接种时包装培养基体积 (mL)	每孔 293T 或 293FT 细胞数量	DNA 共转染				GeticoFect 3000 (μL)	替换用慢病毒包装培养基体积 (mL)	收获慢病毒总体积 (mL)
				Opti-MEM I 培养基体积 (mL)	慢病毒包装 (DNA)		P3000 试剂 (μL)			
					包装混合物 (μg)	pLenti 载体 (μg)				
6 孔板	1	1	3.6x10 ⁶	2x250μL	2.25	0.75	6	7	2	2x2
60mm	2.2	2	7.92x10 ⁶	2x500μL	5	1.7	13	15	4	2x4
10cm	5.8	6	21x10 ⁶	2x1.5mL	13	4.3	35	41	12	2x12
T75	7.9	8	28.4x10 ⁶	2x2mL	17.8	5.9	47	55	16	2x16
T175	18.4	18	66.2x10 ⁶	2x4.6mL	41.4	13.8	111	129	37	2x37

注：放大倍数基于 6 孔板生长面积计算