

Code No. 6161

研究用

---

**TaKaRa**

Retrovirus Packaging Kit  
Ampho

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 原 理	1
● 制品内容	2
● 保 存	2
● 试剂盒外主要试剂和仪器	2
● 实验操作	2
● 附 录	3
● 参考文献	4
● 关联产品	4

## Precautions for the use of this product

- Please follow the guideline for experiments using recombinant DNA issued by the relevant authorities and the safety committee of your organization or your country in using this product.
- The use of this product is limited only for research purposes. It must not be used for clinical purposes or for *in vitro* diagnosis.
- Individual license agreement must be concluded when this product is used for industrial purposes.
- Recombinant retrovirus solution may include virus with unknown hazardous gene. Please use a safety cabinet and gloves to prevent inhalation or adhesion of the virus.
- Basic techniques of genetic engineering and cell cultivation are needed for the use of this product.
- The user is strongly advised not to generate recombinant retrovirus capable of expressing known oncogenes and any genes known to be hazardous to the mammals.
- Takara Bio is not liable for any accidents or damages caused by the use of this product.

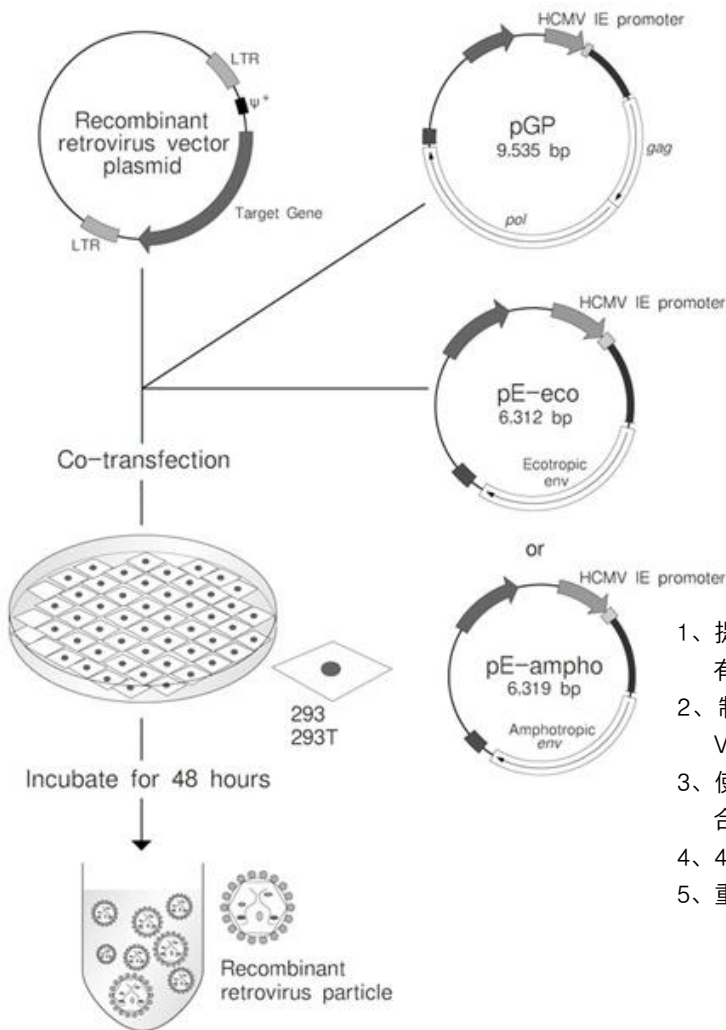
## ● 制品说明

Retrovirus Packaging Kit Ampho 是逆转录病毒包装试剂盒，通过将插入有目的基因的逆转录病毒表达载体和 2 个特别设计的病毒包装用质粒通过磷酸钙法共转染到包装细胞中，可以得到高病毒滴度的逆转录病毒体。试剂盒中包含有表达 *gag-pol* 基因的质粒，pGP 质粒和表达 amphotropic *env* 基因的质粒及 pE-ampho 质粒作为包装载体。使用本产品包装得到的逆转录病毒可以用于感染大多数的哺乳动物细胞。

试剂盒中特别设计的病毒包装用质粒上插入有逆转录病毒的结构基因，*gag-pol* 和 *env* 基因，这两种基因是逆转录病毒构建和复制所必需的基因，但是质粒上缺少包装信号  $\Psi$  序列和 LTR 序列，因此包装用质粒本身是无法包装成逆转录病毒的，只有将其和包含  $\Psi$  序列和 LTR 序列的逆转录病毒表达载体共转染到 HEK293 或者 HEK293T 包装细胞中，才能包装得到逆转录病毒体。试剂盒中同时还包含基于磷酸钙转染方法的转染试剂，方便客户使用，一般转染后 48 小时就可以得到高病毒滴度的逆转录病毒。

试剂盒中包装用质粒已经纯化可以直接用于转染，同时质粒上除了 *gag-pol* 和 *env* 基因外，不包含其他任何逆转录病毒来源的 DNA 序列，所以产生具有自我复制能力逆转录病毒的几率非常低。

## ● 原理



- 1、提前一天于平板上接种细胞，并制备含有目的基因的重组逆转录病毒质粒；
- 2、制备含有重组逆转录病毒质粒、pGP Vector、pE-ampho Vector 混合液；
- 3、使用试剂盒中配备的转染试剂将质粒混合液转染进细胞中；
- 4、48 小时后收集细胞培养上清液，过滤；
- 5、重组的逆转录病毒颗粒制备完成。

图 1：逆转录病毒包装过程

## ● 制品内容 (10 次量)

1. pGP Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	50 $\mu\text{l}$
2. pE-ampho Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	50 $\mu\text{l}$
3. Transfection Buffer	500 $\mu\text{l} \times 10$ 支
4. 2 M $\text{CaCl}_2$	620 $\mu\text{l}$
5. 25 mM Chloroquine	40 $\mu\text{l}$

本试剂盒中包含有 2 个病毒包装用质粒以及必要的转染用试剂。

## ● 保存: $-20^\circ\text{C}$ 。

试剂盒中组分 3、4、5 融化后  $4^\circ\text{C}$  保存。

※ 未开封试剂盒  $-20^\circ\text{C}$  保存, 可稳定保存 2 年。

开封后 (融化后) 各组分需要放在指定温度保存, 同时注意防止污染并尽快用完。

## ● 试剂盒外主要试剂和仪器

### 试剂

- 纯化的重组逆转录病毒质粒 (可直接用于细胞转染)
  - 胎牛血清 (FBS)
  - Trypsin-EDTA 溶液
  - 293 cells 或者 293T cells<sup>2)</sup> \*等
  - 含葡萄糖 (4.5 g/L) 和 L-谷氨酰胺 (584 mg/L) 的 Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium (DMEM)
  - Penicillin/Streptomycin
  - 灭菌水
- \*: 293T 细胞<sup>2)</sup>是在 293 细胞中引入 SV40T 抗原基因制备而成的, 能比使用 293 细胞得到更高滴度的病毒。

### 实验器具和仪器

- 生物安全柜
- 显微镜
- $\text{CO}_2$  培养箱
- $-80^\circ\text{C}$  冰箱
- 无菌移液枪头 (带有滤膜)
- 无菌 5.0 ml 圆底试管 (聚苯乙烯)
- 无菌 2.0 ml 试管 (用于病毒液保存)
- 无菌 0.45  $\mu\text{m}$  过滤膜 (低吸附)
- Gelatin 或者 Collagen 包被培养皿 (直径 6 cm)
- 无菌移液管
- 电动移液枪

## ● 实验操作

### 1. 细胞接种 (前一天)

在 Gelatin 或者 Collagen 包被的 6 cm 培养皿中接种  $2\sim 3 \times 10^6$  个包装细胞 (293 细胞或 293T 细胞\*) 同时准备好重组逆转录病毒质粒。

293T 细胞<sup>2)</sup>是在 293 细胞中引入 SV40T 抗原基因制备而成的, 能比使用 293 细胞得到更高滴度的病毒。

## 2. 细胞转染（第一天）

实验前取出转染试剂，2 M CaCl<sub>2</sub>和灭菌水，并使其温度恢复到室温。

将千分之一体积的 25 μM 氯喹加入 10%FBS 的 DMEM 培养基中，37℃ 孵育。

准备 3 ml 培养基置于 6 cm 培养皿，进行以下实验操作时要注意无菌操作避免污染。

1) 将以下组分在无菌 5 ml 圆底试管（聚苯乙烯）中配制混合物：

试剂	使用量
重组逆转录病毒质粒	10 μg
pGP Vector (1 μg/μl)	5 μl
pE-ampho Vector (1 μg/μl)	5 μl
2 M CaCl <sub>2</sub>	62 μl
灭菌水	Up to 500 μl

2) 取出前一天接种的细胞，吸去培养基，再添加 3 ml 新鲜的 DMEM 培养基（10% FBS，25 μM Chloroquine）。

3) 配制 DNA 磷酸钙混合物并转染细胞：

① 用电动移液枪吸取 500 μl Transfection Buffer；

② 将 Transfection Buffer 缓慢滴加到 1) 中配制的 DNA 混合物中，一边振动试管一边滴加；

③ Transfection Buffer 滴加完后，立刻在溶液中吹打鼓泡并持续 10-20 秒，目的是为了加速磷酸钙沉淀物的形成；

④ 在 1-2 分钟内，将混合液均匀的滴加到 2) 中准备的细胞培养皿中，并前后左右摇动培养皿使其分布均匀；

⑤ 将细胞放置培养箱（5% CO<sub>2</sub>，37℃）中培养 7-11 小时，在显微镜下能够观察到在细胞表面有雪粒状沉淀物生成；

4) 细胞换液，吸去 3 ml 培养基，再添加 4 ml 新鲜的 DMEM 培养基（10% FBS）；（如果将细胞培养皿中的培养基全部吸去会降低转染效率，建议在细胞培养皿中剩余 1 ml 培养基）

## 3. 细胞换液（第二天）

转染 24 小时后，使用 4 ml 新鲜 DMEM 培养基（10% FBS）对细胞换液。

## 4. 收集病毒液（第三天）

转染 48 小时后，收集细胞上清液并使用 0.45 μm 的无菌过滤膜进行过滤，滤液分装后-80℃ 保存。避免反复冻融。

注意：

使用本产品得到的逆转录病毒滴度会受到插入目的基因大小、转染效率等因素的影响而有所不同，一般可以得到 10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup> infectious U/ml 病毒滴度。

# ● 附录

## [使用 pDON-AI-2 Neo DNA 构建的逆转录病毒滴度测定]

[ 细胞接种（前一天） ]

在 6 well 板中接种细胞（NIH/3T3 或者其他细胞）5 × 10<sup>4</sup> cells/well。

[ 细胞感染（第一天） ]

a. 使用新鲜培养基对细胞换液，900 μl/well，其中包含 9 μg/ml 的 polybrene；

b. 使用新鲜培养基稀释病毒液，10<sup>-1</sup>~10<sup>-5</sup> 稀释；

c. 向每个孔中加入 100 μl 稀释的病毒液；（polybrene 终浓度 8 μg/ml）

d. 将细胞放于培养箱中（5% CO<sub>2</sub>，37℃）培养 4-6 小时，再向每孔中添加 1 ml 新鲜培养基后继续培养；

[ 细胞换液 (第二天) ]

使用包含 G418 (400–800  $\mu\text{g/ml}$ ) 的新鲜培养基对细胞换液, 此后每隔 3–4 天进行细胞换液。

[ 计算病毒滴度 (约 2 星期后) ]

- a. 用亚甲基蓝溶液 (methylene-blue) 或者 Giemsa 方法对细胞克隆染色, 并计算数目;
- b. 将细胞克隆数和病毒液稀释倍数相乘得到病毒滴度 (cfu/ml);

\*如果使用 MLV 系列逆转录病毒载体包装得到的病毒液, 可以通过 real-time PCR 的方法使用 Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR)( Code No. 6166)试剂盒对病毒 RNA 进行定量分析, 进而快速检测病毒滴度。

## ● 参考文献

- 1) Pear W S, Nolan G P, Scott M L, and Baltimore D. *Proc Natl Acad Sci.* (1993) **90**: 8392–8396.
- 2) DuBridge R B, Tang P, Hsia H C, Leong P M, Miller J H, Calos M P. *Mol Cell Biol.* (1987) **7**: 379–387.

## ● 关联产品

pDON–5 Neo DNA (Code No. 3657)

pDON–5 DNA (Code No. 3658)

pDON–AI–2 Neo DNA (Code No. 3653)

pDON–AI–2 DNA (Code No. 3654)

pMEI–5 Neo DNA (Code No. 3655)

pMEI–5 DNA (Code No. 3656)

RetroNectin<sup>®</sup> (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (Code No. T100A/B)

RetroNectin<sup>®</sup> Dish (RetroNectin Pre-coated Dish, 35 mm  $\phi$ ) (Code No. T110A)

pSINsi–hH1 DNA (Code No. 3660)

pSINsi–hU6 DNA (Code No. 3661)

pSINsi–mU6 DNA (Code No. 3662)

Retrovirus Constructive Cell (G3T–hi) (Code No. 6163)

Retrovirus Constructive System Eco/Ampho (Code No. 6164/6165)

Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) (Code No. 6166)

Human iPS Cell Generation<sup>™</sup> All-in-One Vector (Code No. 3671)

Human iPS Cell Generation<sup>™</sup> Vector Set (Code No. 3670)

RetroNectin is a registered trademark of Takara Bio Inc.

Cell Generation is a trademark of Takara Bio Inc.

**注意**

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站[www.takara-bio.com](http://www.takara-bio.com)。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

**TAKARA BIO INC.**

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202003Da