

慢病毒纯化试剂盒

（磁珠型）

产品编号	试剂名称	规格	保存条件
OmL-02	Buffer LP	35 mL	4 °C
	Buffer LS	15 ml	4 °C
	Buffer LE	50 ml	4 °C
	Buffer LT	3 ml	4 °C
	Magnetic Beads（磁珠）	3.5 ml	4 °C
	针式过滤器	10 个	RT
	说明书	1 份	

一、运输与存储条件

本产品常温运输，4 °C保存，有效期 2 年。

二、注意事项（请使用试剂盒前阅读此注意事项）

1. 磁珠 4 °C保存，严禁冻存，否则失效。
2. 本试剂盒提供的慢病毒纯化体系为 20 ml/样品，若含有慢病毒的细胞培养上清较少，可以用无菌的 ddH₂O（滤膜孔径为 0.2 μm 滤器过滤）补齐体积。也可以按照比例减少试剂盒中各试剂的用量（**请勿随意更改各试剂比例，易导致慢病毒纯化失败**），构建小体系慢病毒纯化系统，但每个样品中磁珠用量不得少于 0.1 ml，否则降低慢病毒纯化效果。
3. 纯化后的慢病毒，可以和细胞培养液按照不同比例混合（如 1: 1、1: 2、1: 3 等），添加到细胞培养皿中，感染目的细胞。
4. 强烈建议使用本公司的**慢病毒感染增强试剂盒（Cat: OmL-04）**来介导纯化的慢病毒的感染，可以显著提高慢病毒的感染效率。
5. 磁珠长期静置存放会沉到管底部，吸取磁珠前请先震荡（Vortex）混匀。
6. 请使用试剂盒提供的针式过滤器过滤纯化的慢病毒溶液，**严禁使用常规的滤膜孔径为 0.2 μm 和 0.45 μm 的滤器过滤**纯化的慢病毒溶液，以免降低慢病毒滴度。
7. 纯化的慢病毒保存条件：**4 °C，一个月；-80 °C，长期保存**，但冻存后慢病毒活性降低。
8. 为了您的健康，实验过程中请穿好实验服、佩戴乳胶手套和安全眼镜。

三、产品简介

本产品是一款以磁珠为分离介质的慢病毒纯化试剂。在特定的缓冲体系中，磁珠可吸附慢病毒，并被洗脱液（PBS 或 ddH₂O）洗脱下来。慢病毒纯化后，滴度提高 10 倍以上，且利用 PBS 或 ddH₂O 洗脱后的慢病毒不含其它化合物，可直接用于动物体内注射。

四、特点与优势

1. 本试剂盒纯化效率高，纯化后的慢病毒滴度可达 6.25×10^7 TU/ml。
2. 本试剂盒纯化的慢病毒不含其它化合物，可以直接用于动物实验。
3. 本试剂盒操作简单，能够在 2 h 内完成慢病毒的纯化实验。

五、使用说明

1. 慢病毒包装。慢病毒包装实验请参考本公司产品（**慢病毒包装试剂盒，Cat: OmL-01**）说明书中的实验步骤。
2. 含慢病毒的细胞培养上清收集。293T 细胞（直径为 100 mm 培养皿培养）转染慢病毒包装质粒及骨架质粒后 48 h，收集第一批细胞培养上清（10 ml），并加入 10 ml 新鲜的细胞培养液，继续培养 24-48 h，收集第二批细胞培养上清（**第二批收集的细胞培养上清中慢病毒滴度高于第一批**）。
3. 收集完全含慢病毒的细胞培养上清后，1,000 rpm（离心力为 100 g）离心 5min，去除细胞碎片。（**所有含有慢病毒的细胞培养上清保存在 4°C 冰箱中，严禁冻存，以免降低慢病毒活性**）。
4. 慢病毒纯化。本产品提供的慢病毒纯化体系是 20 ml，各组份比例如下表。参照下表将各种试剂与含有慢病毒的细胞培养上清加入 50 ml 无菌离心管中，置于混合器中，4 °C 旋转混合 60 min。

表 1. 慢病毒纯化体系各组份统计表

试剂名称	试剂体积 (ml)	试剂比例
Buffer LP	3	15 %
Buffer LS	1	5 %
Buffer LT	0.2	1 %
Magnetic Beads (磁珠)	0.35	1.75 %
含慢病毒的细胞培养上清	15.45	77.25 %
合计	20	100 %

5. 磁珠收集。孵育完毕，将离心管转入离心机，3000 g，4 °C 离心 5 min，沉淀磁珠，弃上清；或将离心管置于磁力架上，4 °C 静置 5-10 min，使磁珠聚集，弃上清。
6. 残余液体去除。将装有磁珠沉淀的离心管转入离心机，3000 g，4 °C 离心 2 min，用移液器吸尽管中残余液体。
7. 洗脱。加入 1 ml Buffer LE（PBS 或 ddH₂O），剧烈震荡（Vortex）1 min。

8. 7000 g, 4 °C离心 5 min, 取出离心管, 置于磁力架上, 并将上清转移至新的无菌 EP 管中, 即为**纯化的慢病毒溶液**。
9. 过滤。利用试剂盒提供的针式过滤器, 过滤纯化的慢病毒溶液, 除去杂质。
10. 纯化的慢病毒可立即用于滴度测定（用本公司的慢病毒滴度检测试剂卡, 15 min 即可检测出慢病毒滴度）, 或感染目的细胞, 也可保存在 4 °C（**有效期 1 个月**）。
11. 感染细胞时, 纯化的慢病毒溶液与细胞培养液按照不同比例混合, 加入细胞中, 并添加 Polybrene 或本公司的**慢病毒感染增强试剂盒（Cat: OmL-04）**中的病毒感染增强试剂。
12. 慢病毒感染 24 h, 换液, 72 h 后观察 GFP 荧光强度或检测目的蛋白表达变化。

六、慢病毒纯化效果鉴定

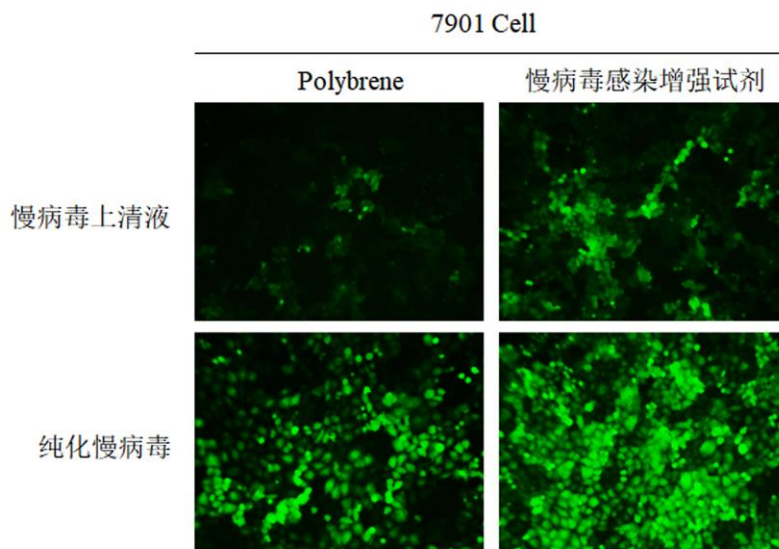


图 1. 慢病毒包装、纯化与感染目的细胞鉴定。

293TN 细胞包装慢病毒（Lenti-GFP），纯化后感染 7901 细胞。慢病毒纯化显著增强其感染效果，且慢病毒感染增强试剂能够显著增强未纯化及纯化后的慢病毒感染效果。

七、常见问题与分析

问题	可能原因	解决方案
纯化慢病毒滴度低	纯化前的细胞培养上清中的慢病毒滴度较低	更换成慢病毒滴度较高的细胞培养上清，重新纯化，或浓缩样品。
	含慢病毒的细胞培养上清用量较少	增加纯化体系中慢病毒上清液用量，或扩大纯化体系。
	纯化试剂过期	保证使用保质期内的试剂。
	磁珠冻存，吸附慢病毒能力降低甚至消失	更换新的磁珠或试剂盒。
	未按规定体积添加磁珠，磁珠用量减少	按照纯化体系要求，正确使用磁珠。
	未按照体系要求，随意更改体系中各试剂比例	按照纯化体系要求，按比例添加试剂盒中的各成分到纯化体系中。
	磁珠与慢病毒上清液孵育时间偏短	延长孵育时间。
	洗脱强度偏低	增加 Vortex 强度，延长 Vortex 时间。
	慢病毒上清液被微滤膜过滤，慢病毒减少	慢病毒上清液不使用滤膜孔径为 0.2 和 0.45 μm 的滤器过滤，以及更小孔径滤膜的滤器过滤。
	纯化的慢病毒溶液被微滤膜过滤，慢病毒减少	纯化的慢病毒溶液不使用滤膜孔径为 0.2 和 0.45 μm 的滤器过滤，以及更小孔径滤膜的滤器过滤。请使用试剂盒提供的大孔径滤膜过滤。
慢病毒上清液被高速离心，导致慢病毒减少	慢病毒上清液离心条件是：1,000 rpm（100 g），4°C，离心 5 min，去除细胞碎片等杂质即可。	
纯化的慢病毒感染效率偏低	纯化的慢病毒用量较少	增加纯化的慢病毒用量。
	Polybrene 效率偏低	使用本公司的慢病毒感染增强试剂盒。
	细胞密度偏大	慢病毒感染时，细胞密度控制在 70% 以下。
	细胞状态差	请使用状态较好的对数生长期细胞做慢病毒感染。
	纯化的慢病毒反复冻融，导致活性降低	纯化的慢病毒 4°C 保存，1 个月用完。