

Lenti-V™ Over Expression System (EGFP)说明书

Cat. No. GP0201

Protocol No. PT140814-1

出版日期 Aug. 2014

南京市汉中门大街 301 号
南京国际服务外包产业园 01 栋 13 层 A 座
电话: +86-25-66776700/66776718
传真: +86-25-66776701
邮编: 210036
网址: www.genloci.com



订购&技术咨询

客服/订购	技术支持
Telephone: +86-25-66776730	Telephone: +86-25-66776718
Fax: +86-25-66776701	Fax: +86-25-66776701
Web: www.genloci.com	Web: www.genloci.com
E-mail: sales@genloci.com	E-mail: service@genloci.com

目 录

I. 组份列表.....	2
II. 附加产品推荐	2
III. 产品概要.....	3-4
IV. 操作步骤.....	5-6
1. 设计引物序列.....	5
2. 目的基因的获得.....	5
3. 线性化 pGO1.1 Vector.....	5
4. 重组 pGO1.1 Vector 的构建.....	5
5. 慢病毒包装.....	5-6
6. 慢病毒收获与储存	6
7. 慢病毒侵染靶细胞.....	6
8. 筛选阳性克隆.....	6
V. FAQ.....	7
VI. 附录.....	8
附录 A pGO1.1 Vector.....	8
VII. 参考文献.....	9

图

Figure 1. Lenti-V™ Over Expression System (EGFP)实验流程

Figure 2. pGO1.1 插入位点示意图

Figure 3. pGO1.1 质粒图谱

表

Table 1. Lenti-V™ Over Expression System (EGFP)组份列表

I. 组份列表

Lenti-V™ Over Expression System (EGFP)组份如下:

Table 1. Lenti-V™ Over Expression System (EGFP)组份列表

组份列表	含量
pGO1.1 Vector	11 µl
Packaging Mix	40 µl
T4 DNA Ligase (350U/µl)	5 µl
10xT4 DNA Ligase Buffer	100 µl

贮存条件

※注意: 在收到货后, 请您将 pGO1.1 Vector、Packaging Mix 和 T4 DNA Ligase 瞬时离心后再保存。

将 pGO1.1 Vector、Packaging Mix、T4 DNA Ligase 置于-20℃保存, 且避免污染;
将 10xT4 DNA Ligase Buffer 置于 2~8℃保存;

II. 附加产品推荐

本试剂盒不包含以下所需试剂和仪器, 您可以购买指定产品或购买替代产品进行实验。

- Celetrix 细胞电转仪(Cat. No. : GP7901)
- Cell Plaza™单细胞培养板(Cat. No. : GP5036)
- Genloci TNA 抽提试剂盒(Cat. No. : GP0155, GP0156)
- HEK-293T 细胞(Cat. No. : GP5045)

III. 产品概要

Lenti-V™ Over Expression System (EGFP)是一款高效的基因过表达试剂盒，它是基于人类 HIV-1 研发的，其操作简便，表达效率高，基因表达检测更加准确和方便。Lenti-V™ Over Expression System (EGFP)能够适用于几乎所有哺乳动物细胞的基因过表达研究。

该试剂盒中的 pGO1.1 载体包含 2 个重要组件，分别为 hUbC promoter 和 EGFP，含有 hUbC 启动子可以高效启动目的基因在细胞中的表达；在多克隆位点中有一个 EGFP 的完整编码序列，因此您可以根据自身需要选择是否保留该序列，若保留，则在多克隆位点插入目的基因后可以表达出含有 EGFP 的融合蛋白，可以方便地使用 EGFP 的荧光特性来识别目的蛋白，有利于目的蛋白检测和分离纯化。Packaging Mix 包含慢病毒包装所需的辅助质粒(其包含能表达慢病毒包装所需的全部反式激活蛋白,以及 VSV-G 等元件)，该试剂盒能够让您仅靠单个载体就可以轻松地完成目的基因的过量表达，实现稳定遗传。

Genloci 公司为您提供完整的基因过表达解决方案，从引物设计→载体构建→慢病毒包装→转染→阳性克隆检测→结果分析，让您的实验一次成功！

产品特点

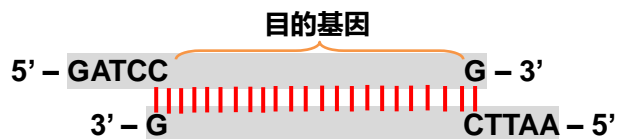
- 病毒滴度可高达 10^7 - 10^9 IFU/ml；
- 稳定、持久地表达目的基因；
- 可有效感染分裂和非分裂细胞；
- Lenti-V 系统使操作的安全性更高；
- 提供多种功能的慢病毒表达系统

Lenti-V™ Over Expression System (EGFP)

Lenti-V™ Over Expression System (EGFP)实验流程如下：

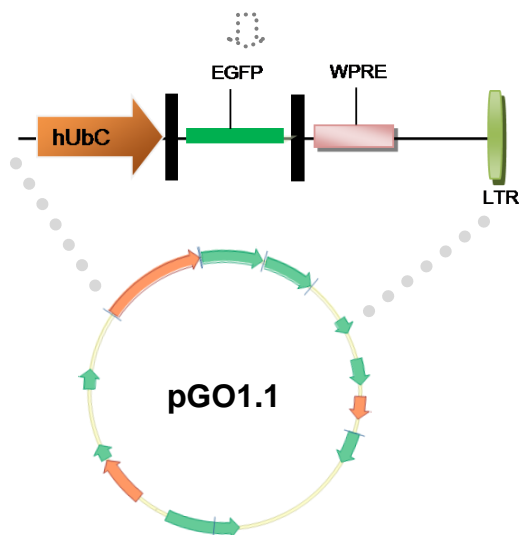
1

设计 2 条引物；目的基因 PCR 扩增和酶切。



2

将目的基因片段连接到慢病毒表达载体中。



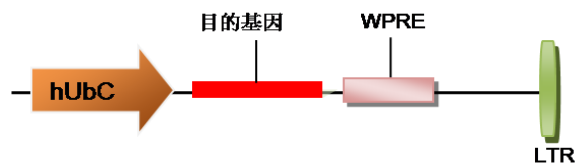
3

转化大肠杆菌感受态细胞；筛选阳性克隆；测序验证序列；质粒大提；共转染 HEK-293T 细胞；慢病毒收获、浓缩、储存。



4

使用慢病毒侵染靶细胞；在细胞内，目的基因过量表达。



5

PCR 扩增初筛阳性克隆；将阳性克隆测序验证；Q-PCR 验证。

Figure 1. Lenti-V™ Over Expression System (EGFP)实验流程

IV. 操作步骤

实验前，请您务必做好以下验证实验：

- A. 单细胞生长情况，确保单个细胞可以正常生长形成单克隆，低细胞密度的培养皿中可以形成单克隆。
- B. 目的基因的表达情况分析，为防止因染色体缺失等情况导致靶基因缺失，首先需要 PCR 扩增靶基因，并对 PCR 结果进行测序，确保靶基因的完整存在；其次，您还可以用 RT-PCR 分析靶基因的活跃度。

1. 设计引物序列

首先，您需要在目的基因两端设计一对 20 bp 左右的引物，引物 5' -端分别加上 *BamH* I 和 *EcoR* I 的识别序列，且需依据保护碱基添加原则添加相应的保护碱基。

将设计后的序列送到值得信赖的公司合成，纯化级别为 PAGE。

2. 目的基因的获得

首先提取细胞的总 RNA，推荐使用 Genloci 公司的 TNA 抽提试剂盒 (Cat. No. : GL10851S)，只需 500 个左右的细胞即可提取总 RNA，详细实验步骤请参看 Genloci TNA 抽提试剂盒 (Cat. No. : GL10851S) 说明书。

然后反转录得到 cDNA 序列，以 cDNA 为模板使用高保真酶进行 PCR 扩增。胶回收纯化目的基因片段，使用 *BamH* I 和 *EcoR* I 进行酶切。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后，进行胶回收纯化，获得酶切后的目的基因片段。

3. 线性化 pGO1.1 Vector

同样使用 *BamH* I 和 *EcoR* I 对 pGO1.1 Vector 进行酶切。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳后，进行胶回收纯化，获得线性的 pGO1.1 Vector。

4. 重组 pGO1.1 Vector 的构建

分别取 2 μ l 线性 pGO1.1 Vector 和 1.75 μ l 酶切后的目的基因片段进行 T4 DNA Ligase 连接反应，反应体系如下：

pGO1.1 vector	2 μ l
目的基因片段	1.75 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l
10xT4 DNA Ligase Buffer	1 μ l
ddH ₂ O	4.25 μ l
	10 μ l

连接产物可以直接转化大肠杆菌感受态细胞，转化和筛选阳性克隆的实验步骤请您参考《分子克隆实验指南》，pGO1.1 的抗性为氨苄青霉素抗性，筛选后的阳性克隆，需测序验证序列的正确性。

5. 慢病毒包装

5.1 293T 细胞的培养

1) 第 1~2 天内复苏 293T (较低代次) 的细胞，从液氮罐中取出冻存的细胞并迅速放入 37°C 热水中，轻轻晃动使细胞快速解冻。然后用 70% 的酒精擦拭细胞冻存管，拿入超净台中操作。以后所有步骤都应注

Lenti-V™ Over Expression System (EGFP)

意无菌操作。

2) 第 4~5 天进行细胞传代, 传代至 10 cm 培养皿中。

3) 第 7~8 天, 按照相应的接种密度接种至欲使用包装生产病毒的孔板或培养皿中并转移到无菌的细胞培养皿中。

※注意: 293T 细胞的生长状态影响病毒的生产, 应使用较低代次的细胞, 并于复苏后传代培养至少两代以上的 293T 细胞来进行包装慢病毒, 但不能使用超过 20 代的细胞。

5.2 转染

共转染前进行质粒大提, 稀释至质粒浓度为 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, 同时以 pGO1.1 Vector 空质粒为对照。转染前 48 小时, 接种细胞至备用生产慢病毒的孔板或是培养皿中, 转染时, 细胞汇合度约为 70%-80% 为最佳感染状态, 活力 $\geq 95\%$ 以上。电转染靶细胞, 推荐使用 Celextrix 细胞电转仪 (Cat. No.: GP7901), 贴壁细胞的数量需 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$, 悬浮细胞的数量需 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ (另外, 您也可以使用转染试剂转染)。

a) 加入 800 μl 0.25% 胰酶消化大概 30 s, 随时观察细胞形态, 消化结束, 加入 2 倍胰酶体积的完全培养基终止消化, 吹打均匀;

b) 25°C, 900 rpm, 离心 5min, 去上清;

c) 加入 1ml PBS, 重悬后, 25°C, 900 rpm, 离心 5 min, 去上清, 重复此步骤 1~2 次;

d) 加入 200 μl 无血清的培养基, 重悬细胞, 各加入 5 μl 重组 pGO1.1 Vector 和 Packaging Mix;

e) 离心过程中, 可准备电转设备, 开通电源, 移液枪吸取 200 μl 的细胞悬液至电极管中 (保证不要出现起泡), 按照 1200 V, 20 ms, 2/pluses 电转条件进行电转;

f) 电转结束, 放入预先准备好的孔板或是培养皿中, 加入适量的含血清浓度为 2%~10% 的 DMEM 培养基, 细胞培养箱培养。

6. 慢病毒收获与储存

以电转时间为起始点, 一次收获时间为 24 hr 后收获上清, 保存于 4°C 下, 并补足适量培养基。二次收获时间为 36~48 hr 间, 收获上清, 可以与一次收获病毒合在一起, 并补足适量培养基。三次收获 (此次可需要也可不需要, 时间超过 72 hr, 细胞活力严重下降, 生产病毒能力减弱, 病毒量较低) 时间为 72 hr, 收获上清, 与前两次收获可合在一起。

※注意: 若短时间内不使用慢病毒进行实验, 请放置于 -80°C 保存 (病毒置于冻存管, 并使用封口膜封口)。

7. 慢病毒侵染靶细胞

接种适量靶细胞, 可加入 4-8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 polybrene 以提高感染效率, 混匀。于 25°C, 800 g 下, 贴壁细胞离心 30 min~1 h, 悬浮细胞离心 1.5~2.5 h, 离心结束后, 放于 37°C, 5% CO₂ 培养箱, 24 小时后, 更换新鲜的完全培养基。

8. 筛选阳性克隆

将靶细胞有限稀释后, 分到 96 孔板中进行单克隆培养, 如果靶细胞是悬浮细胞, 推荐使用 Cell Plaza™ (Cat. No.: GP08250) 培养细胞, 待细胞长好后, 取 1000 个左右的细胞, 提基因组 DNA, 推荐使用 Genloci TNA 抽提试剂盒 (Cat. No.: GP0155)。

然后使用 PCR 扩增初步筛选阳性克隆, 推荐 PCR 扩增引物为 hUbCpro-F 5'-TGAAGCTCCGGTTTTGAACT-3' 和基因下游引物或 WPRE-R 5'-CATAGCGTAAAAGGAGCAACA-3' 和基因上游引物 (即一条位于载体上, 一条位于目的基因中), 对扩增片段大小符合预期的克隆进行测序分析。

另外, 还可以采用 Q-PCR 方法进行验证。

V. FAQ

Q-1: 慢病毒包装时转染效率低，怎么办？

A-1: 整个质粒较大（9 kb 左右），如此大的质粒很容易导致转化效率低下，尤其是使用脂质体等化学试剂转染时，转染效率会比较低些。所以，我们推荐使用电转的方法进行转染。Bio-Rad 的电转仪器需要根据不同的细胞单独配制转染 buffer，所以不推荐使用；Life 的 Neon 系统不错，但是因为耗材是镀金的，所以非常贵；而 Genloci 的 Celetrix 电转仪，转化效率高，不需要单独配制 buffer，只需使用无血清的培养基就行，而且该电转仪的耗材也是相对比较便宜的。其次，建议使用较易转染的细胞，如 293T 细胞进行共转染。

Q-2: 慢病毒保存时应注意哪些？

A-2: 收获的慢病毒液后若在很短时间内即使用慢病毒进行实验，可以将病毒暂时放置于 4 °C 保存；若长时间不适用，可以存放于 -80 °C 6 个月以上；但如果病毒储存时间超过 6 个月，我们建议在使用前需要重新滴定病毒滴度。反复冻融会降低病毒滴度：每次冻融会降低病毒滴度 10%；因此在病毒使用过程中应尽量避免反复冻融，为避免反复冻融我们强烈建议客户收到病毒后按照每次的使用量进行分装。

Q-3: 单个细胞不生长，怎么办？

A-3: 对于单细胞不长的细胞进行转染，首先建议采用共培养的方法看看能否促进单个细胞的生长。共培养可以采用培养过同种细胞的培养基培养单细胞；也可以使用 Cell Plaza™（单细胞培养板），可以把细胞的存活率提高三倍以上。如果以上方法都不行，建议对细胞进行改造，加快其分裂速度，让单细胞可以很容易生长后，再对目的基因进行过表达。具体方法可以联系 Genloci 的客服做进一步的了解。

VI. 附录

附录A pGO1.1 Vector

以下为pGO1.1的插入位点示意图和质粒图谱，线性化pGO1.1所用的酶为*Bam*H I 和*Eco*R I。

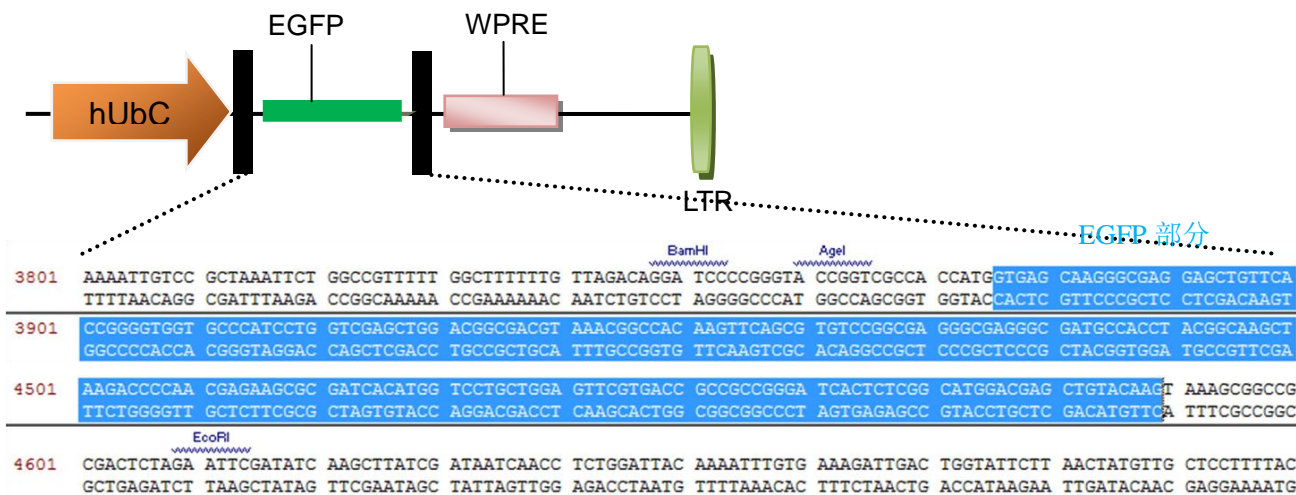


Figure 2. pGO1.1插入位点示意图

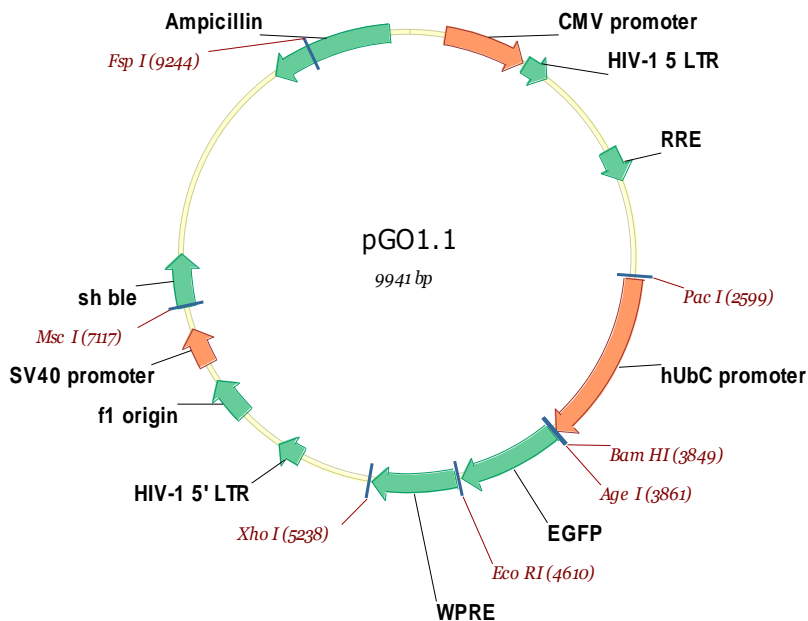


Figure 3. pGO1.1 质粒图谱

VII. 参考文献

1. YanFei Qi, Vinayak Shenoy, Fong Wong, Hongwei Li, Aqeela Afzal, J. Mocco, Colin Sumners, Mohan K. Raizada, Michael J. Katovich. Lentivirus-mediated overexpression of angiotensin-(1-7) attenuated ischaemia-induced cardiac pathophysiology. *Experimental Physiology*, 2011, 96: 863-874.
2. K. Eerola, W. Nordlund, S. Virtanen, A. M. Dickens, M. Mattila, S. T. Ruohonen, S. C. Chua Jr, S. L. Wardlaw, M. Savontaus, E. Savontaus. Lentivirus-Mediated α -Melanocyte-Stimulating Hormone Overexpression in the Hypothalamus Decreases Diet Induced Obesity in Mice. *Journal of Neuroendocrinology*, 2013, 25(12): 1298-1307.
3. Xiaoli Shen, Feng Chen, Lili Han, Zhen Lin, Saimei Lin, Xiaoqing Liu, Lifang Lin, Leng Pan, Xiaodong Pu, Xiaoli Shen. THE STUDY OF TARGET GENE OVER-EXPRESSION LENTIVIRUS PARTICLE INFECTING HUMAN CARDIAC FIBROBLASTS IN VITRO. *Heart*, 2012, 98: E122.
4. Xiao Qin Jia, Hai Qing Cheng, Xu Qian, Chuan Xiu Bian, Zhu Mei Shi, Jian Ping Zhang, Bing Hua Jiang, Zhen Qing Feng. Lentivirus-Mediated Overexpression of MicroRNA-199a Inhibits Cell Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 62(1): 237-244.
5. Xu D, Wang C, Shen X, Yu Y, Rui Y, Zhang D, Zhou Z. Apoptotic block in colon cancer cells may be rectified by lentivirus mediated overexpression of caspase-9. *Acta Gastro-enterologica Belgica*, 2013, 76(4): 372-380.
6. M. Nosov, M. Wilk, M. Morcos, M. Cregg, L. O'Flynn, O. Treacy, T. Ritter. Role of Lentivirus-Mediated Overexpression of Programmed Death-Ligand 1 on Corneal Allograft Survival. *American Journal of Transplantation*, 2012, 12(5): 1313-1322.
7. Lei Jiang, Fule Wang, Feiyan Lin, Shen-Meng Gao, Yingxia Tan, Yixiang Han, Chiqi Chen, Jianbo Wu. Lentivirus-mediated overexpression of TGF- β inducible early gene 1 inhibits SW1990 pancreatic cancer cell growth. *Cell Biology International*, 2011, 35(9): 891-896.
8. Samantha L Ginn, Sophia HY Liao, Allison P Dane, Min Hu, Jessica Hyman, John W Finnie, Maolin Zheng, Marina Cavazzana-Calvo, Stephen I Alexander, Adrian J Thrasher, Ian E Alexander. Lymphomagenesis in SCID-X1 Mice Following Lentivirus-mediated Phenotype Correction Independent of Insertional Mutagenesis and γ c Overexpression. *Molecular Therapy*, 2010, 18(5): 965-976.
9. Xiao Hu, Xinyue Qin. Lentivirus-mediated estrogen receptor α overexpression in the central nervous system ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *International Journal of Molecular Medicine*, 2013, 31(5): 1209-1221.
10. Adam S. Cockrell, Hong Ma, Kailing Fu, Thomas J. McCown, Tal Kafri. A Trans-Lentiviral Packaging Cell Line for High-Titer Conditional Self-Inactivating HIV-1 Vectors. *Molecular Therapy*, 2005, 10: 276-284.
11. S Bobadilla, N Sunseri, N R Landau. Efficient transduction of myeloid cells by an HIV-1-derived lentiviral vector that packages the Vpx accessory protein. *Gene Therapy*. 2012, 10: 514-520.
12. Mohamed R. Ahmed, Amandine Berthet, Evgeny Bychkov, Gregory Porras, Qin Li, Bernard H. Bioulac, *et al.* Lentiviral Overexpression of GRK6 Alleviates L-Dopa-Induced Dyskinesia in Experimental Parkinson's Disease. *Sci Transl Med*, 2010, 2(28): 28-28.
13. Haibo Wang, Zhuang Yu, Shihai Liu, Xiangping Liu, Aihua Sui, Ruyong Yao, Zheng Luo, Chuanzhi Li. Lentivirus-mediated LIGHT overexpression inhibits human colorectal carcinoma cell growth in vitro and in vivo. *Oncology Letters*, 2013, 6(4): 927-932.
14. Xiaojing Hu, Xiubing Lei, Jidong Wang, Hongjuan Pan, Cong Li, Zhenwei Yao. Lentivirus vector-mediated mitofusin-2 overexpression in rat ovary changes endocrine function and promotes follicular development in vivo. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2014, 8(3): 731-736.