

使用SRV™ Vector时无需添加其他试剂,只需将其添加至细胞中即可建立感染。  
根据细胞和培养条件的不同,加入载体24~48 h后可在荧光显微镜下观察到EGFP (增强绿色荧光蛋白)。

## A.载体的感染

### 【所需材料】

细胞:待感染细胞

试剂:SRV™ control Vector

(载体、含有载体的培养基以及附着有载体和载体培养基的枪头、试管和孔板全部需要在经过紫外线辐照后,再进行高压灭菌处理。)

目标细胞各自对应的培养基

PBS (-)

器材:培养板-12孔板等

1.5 mL 离心管 (带旋盖)

吸液器、移液枪、吸管、枪头

细胞计数仪

### 【操作步骤】

贴壁细胞

Day -1

1. 在板上接种细胞,使第二天的细胞密度能达到70~80%。

Day 0

2. 根据SRV™ control Vector的滴度计算出需要的载体量,使1.接种的细胞数的MOI=1-3。

例)  $1 \times 10^5$  cells  $\times$  MOI=3  $\rightarrow$  计算  $3 \times 10^5$  CIU所需载体量

当载体的滴度为  $3 \times 10^7$  CIU/mL时,需要的载体量为10  $\mu$ L。

3. 计算所需培养基的量,使其与2.计算出的载体量总计为500  $\mu$ L。

4. 用室温水快速解冻载体后稍加离心,使用前放置于冰上。

5. 去除在1.中准备的细胞的培养基,根据2.3.的计算结果加入载体以及培养基。

6. 室温 (推荐放置于安全柜) 孵育2 h后,在37°C, 5%CO<sub>2</sub>的条件下培养一晚。

7. 去除载体液,用1 mL PBS (-) 清洗3次后,加入新的培养基。

8. 在37°C, 5%CO<sub>2</sub>的培养箱中进行培养。

之后,用荧光显微镜对细胞进行观察,以EGFP为指标确认载体的感染情况。

## 补充

针对难以感染的细胞,可考虑提高MOI或改变感染温度。

- 请注意过高的MOI会导致细胞损伤。
- 用32°C的条件代替37°C进行过夜培养更易建立感染。但请注意低温 (室温、32°C) 条件也有可能导致细胞损伤。

## 悬浮细胞

### Day 0

1. 将 $1 \times 10^5$  cells/tube的细胞分别加入1.5 mL离心管中后进行离心(200 x g, 5 min, 4°C)。
2. 小心地吸出并去除上清液, 轻敲使细胞分散。
3. 根据SRV™ control Vector的滴度计算所需载体量, 使 $1 \times 10^5$  cells的MOI=1-3。  
     $1 \times 10^5$  cells x MOI=3 → 计算 $3 \times 10^5$  CIU所需载体量  
    例) 当载体的滴度为 $3 \times 10^7$  CIU/mL时, 需要的载体量为10  $\mu$ L。
4. 计算所需培养基的量, 使其与3.计算出的载体量总计为20~33  $\mu$ L。  
    使感染的细胞密度为 $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  cells/mL。
5. 用室温水快速解冻载体后稍加离心, 使用前放置于冰上。
6. 向2.所准备细胞中加入3.4.计算结果的培养基与载体, 吸放2, 3次混匀。
7. 已加入细胞的1.5 mL离心管放入37°C培育箱中, 静置2 h, 中途轻敲2, 3次。
8. 加入1 mL培养基后离心(200 x g, 5 min, 4°C)。
9. 除去含有载体液的上清液, 轻敲细胞使其松动。
10. 8.9.重复两次。(共清洗三次)
11. 让细胞充分悬浮后接种到平板上。
12. 在37°C, 5%CO<sub>2</sub>的培养箱中进行培养。

之后, 用荧光显微镜对细胞进行观察, 以EGFP为指标确认载体的感染情况。

## 补充

- (a) 增加细胞数进行感染时, 请保证计算结果符合4.中所示的细胞密度。
- (b) 针对难以感染的细胞, 可考虑提高MOI。  
    请注意过高的MOI会导致细胞损伤。
- (c) 虽然在培养中直接添加载体进行培养也能建立感染, 但感染率可能会比上述方法要低。  
    请在37°C或32°C的条件下过夜培养, 第二天去除载体并进行清洗。  
    此外, 在32°C条件下进行过夜培养更易建立感染, 但请注意低温条件也有可能导致细胞损伤。

---

## 使用过程中的注意事项

- 本产品是“根据转基因生物等的使用等规范确保生物多样性相关法律(卡塔赫纳协定)”的对象产品。
- 由于需要在Biosafety Level 2 (BSL2)实验室标准下进行操作, 因此请务必使用符合BSL2标准的安全柜。
- 本产品为研究用试剂, 不可用于医疗、诊断等非研究目的的用途。

## B.清除载体

通过在传代时引入siRNA,可以将载体从载体感染的细胞中去除。

使用HeLa细胞进行实验时,进行三次siRNA (siTB1) 转染,在siRNA转染后约10天内可以发现仅有极少数EGFP阳性细胞。  
(下面记载siTB1\*的序列)

此外,请注意对于其它的贴壁细胞和悬浮细胞需另外进行试验。

### 实验示例 清除已被载体感染的HeLa细胞中的载体的实验方案

#### 【所需材料】

细胞:已被载体感染的HeLa细胞

试剂:HeLa细胞用培养基

PBS (-)

TrypLE™ Select Enzyme (ThermoFisher SCIENTIFIC, 12563011)

Opti-MEM™ I Reduced Serum Free Medium (ThermoFisher SCIENTIFIC, 31985070)

Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (ThermoFisher SCIENTIFIC, 13778075)

10 μM siTB1\* [由于试剂盒中不包含siTB1,因此请根据以下信息自行订购合成物。]

有义链: 5' - CAAUAGUUCACGCUGAAAGug - 3'

反义链: 5' - CUUUCAGCGUGAACUAUUGcu - 3'

(小写字母为突出端,请在退火处理后进行使用)

台盼蓝染色液

器材:培养板 -24孔板

1.5 mL 离心管 (带旋盖)

吸液器、移液枪、吸管、枪头

细胞计数仪

#### 【操作步骤】

1. 吸除培养基后,用PBS(-)进行清洗,再加入适量的TrypLE Select,在37°C培养箱中反应5 min。
2. 加入适量的HeLa细胞用培养基,用吸管吸放并剥离细胞收集在试管中,计算细胞的数量。
3. 在24孔板上按照 $0.5 \sim 1 \times 10^5$  cell/well进行接种,使培养基总体积为500 μL。
4. 同时进行siRNA转染。使最终浓度为40 nM。

将siRNA添加到opti-MEM中进行混合 → 再添加Lipofectamine RNAiMAX进行混合 → 在室温下静置20 min → 添加至细胞

24孔板	10 μM siRNA	RNAi MAX	Opti-MEM	AK02N
每孔的量	2.5 μL	1.25 μL	125 μL	500 μL

5. 之后,用荧光显微镜对细胞进行观察,以EGFP为指标确认载体感染情况。  
如有需要,可每4天重复一次1.~5.的操作。

#### 富士胶片和光(广州)贸易有限公司

广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼3002-3003室

北京 Tel: 13611333218 上海 Tel: 021 62884751

广州 Tel: 020 87326381 香港 Tel: 852 27999019

询价: wkgz.info@fujifilm.com

官网: labchem.fujifilm-wako.com.cn

官方微信

目录价查询



2212TBBU01