

EuLV ONE[®]

慢病毒包装系统

用户指南

适用于单质粒瞬时转染生产慢病毒载体

仅用于科研，不可用于诊断程序。

G1001

**EuLV ONE[®] 慢病毒包装试剂盒
(贴壁)**

G1002

**EuLV ONE[®] 慢病毒包装试剂盒
(悬浮)**

EULV ONE®

慢病毒包装系统

用户指南



修订历史:
Pub. No. EU2509001

版本	日期	描述
1.0	2025.09.05	EuLV ONE® 慢病毒包装系统用户指南



本指南中的信息如有变更，可在官网获取最新版本。

■ 免责声明

在法律允许的范围内，深圳市深研生物科技有限公司及其关联公司对因本文件引起或与之相关的任何特殊、附带、间接、惩罚性、多重或后果性损害，包括但不限于利润损失和数据丢失，不承担责任。

■ 重要许可信息

这些产品可能受一项或多项有限使用标签许可的约束。使用这些产品，即表示您同意所有适用的有限使用标签许可的条款和条件。

■ 商标声明

本文件中的所有商标均为深圳市深研生物科技有限公司及其子公司的财产。禁止用户未经授权使用这些商标。

■ 版权声明

©2025深圳市深研生物科技有限公司保留所有权利。未经许可，不得复制或传播本文件的任何部分。

■ 知识产权

本文件及相关产品中包含的所有知识产权，包括专利、版权和设计，均归深圳市深研生物科技有限公司及其子公司所有。

■ 联系信息

如果您对我们产品的使用或此处提供的条款有任何疑问，请通过
[+86-0755-86562586] 或 [eulvone.support@eurekabio.com]与我们联系。

目录

1.	产品信息	
1.1.	产品描述	1
1.2.	内容及描述	1
1.2.1.	EuLV ONE® Packaging Cell Line	2
1.2.2.	EuLV ONE® Lentiviral Vector Backbone Plasmid	2
1.2.3.	EuLV ONE® Lentiviral Vector EGFP Plasmid	4
1.2.4.	Polybrene	5
1.2.5.	Transfection Reagent	5
1.2.6.	EuLV Inducer, adherent	5
1.2.7.	EuLV Medium I	5
1.2.8.	EuLV Inducer, suspension	5
2.	复苏、传代和冻存	
2.1.	贴壁细胞	6
2.1.1.	复苏	6
2.1.2.	传代	7
2.1.3.	冻存	7
2.2.	悬浮细胞	8
2.2.1.	复苏	8
2.2.2.	传代	8
2.2.3.	冻存	9
2.3.	操作提示	9
2.4.	设备指南	9

3.	慢病毒载体生产	
3.1.	贴壁细胞操作	10
3.1.1.	接种 (10cm培养皿)	10
3.1.2.	瞬时转染	11
3.1.3.	诱导	11
3.1.4.	收获	11
3.2.	悬浮细胞操作	11
3.2.1.	接种 (125 mL摇瓶)	11
3.2.2.	瞬时转染	12
3.2.3.	诱导	12
3.2.4.	阳性率检测	12
3.2.5.	收获	12
3.3.	收获慢病毒载体	13
4.	慢病毒载体滴度检测	
4.1.	操作提示	13
4.2.	转导Jurkat细胞 (第1天)	13
4.3.	滴度检测 (第3天)	14
5.	故障排除	16
6.	安全	
6.1.	生物安全等级要求	17
6.2.	毒性风险警示	17
6.3.	意外泄漏措施	17

1.1 产品信息

与传统共转染多个质粒（如包装质粒、包膜质粒和转移质粒）的慢病毒包装系统不同，EuLV ONE® 慢病毒包装系统使用单个转移质粒即可完成慢病毒生产。这一创新消除了质粒比例优化和兼容性方面的挑战，显著降低了操作复杂性和生产成本。

EuLV ONE® Packaging Cell Line稳定整合了可诱导的gag/pol、rev和VSV-G基因，通过对转移构建体进行单质粒转染，能够在贴壁和悬浮培养中生产慢病毒载体（LVV）。

EuLV ONE® 慢病毒包装系统提供两种优化试剂盒：

1

EuLV ONE®

慢病毒包装试剂盒(贴壁)

(G10 01)

用于在培养皿或细胞工厂中生产贴壁的慢病毒载体。

2

EuLV ONE®

慢病毒包装试剂盒(悬浮)

(G10 02)

用于使用离心管、培养瓶或生物反应器进行可放大规模的慢病毒载体生产。

1.2. 内容及描述

两种试剂盒均能生产300 mL慢病毒载体。

EuLV ONE®

慢病毒包装试剂盒(贴壁)

货号 G10 01

组件	货号	数量	储存条件	运输条件
EuLV ONE® Packaging Cell Line	G2001	1mL×3	液氮	干冰包裹寄送
EuLV ONE® Lentiviral Vector Backbone Plasmid	G4001	50μL×1	-20℃	
EuLV ONE® Lentiviral Vector EGFP Plasmid	G4002	500μL×1		
Polybrene	G50011	500μL×1		
EuLV Inducer, adherent	G50022	30 mL×1		

Transfection Reagent	G50041	500μL×5	2°C 至 8°C 避光保存	四度条件包裹
----------------------	--------	---------	-------------------	--------

EuLV ONE®

慢病毒包装试剂盒 (悬浮)

货号 G1002

组件	货号	数量	储存条件	运输条件
EuLV ONE® Packaging Cell Line	G2001	1mL×3	液氮	干冰包裹寄送
EuLV ONE® Lentiviral Vector Backbone Plasmid	G4001	50μL×1	-20℃	
EuLV ONE® Lentiviral Vector EGFP Plasmid	G4002	500μL×1		
Polybrene	G50011	500μL×1		
EuLV PCL Inducer, suspension	G50051	30 mL×1		
EuLV Medium I	G50031	1000 mL×1	2℃ 至 8℃ 避光保存	四度条件包裹
Transfection Reagent	G50041	500μL×5		

1.2.1. EuLV ONE® Packaging Cell Line

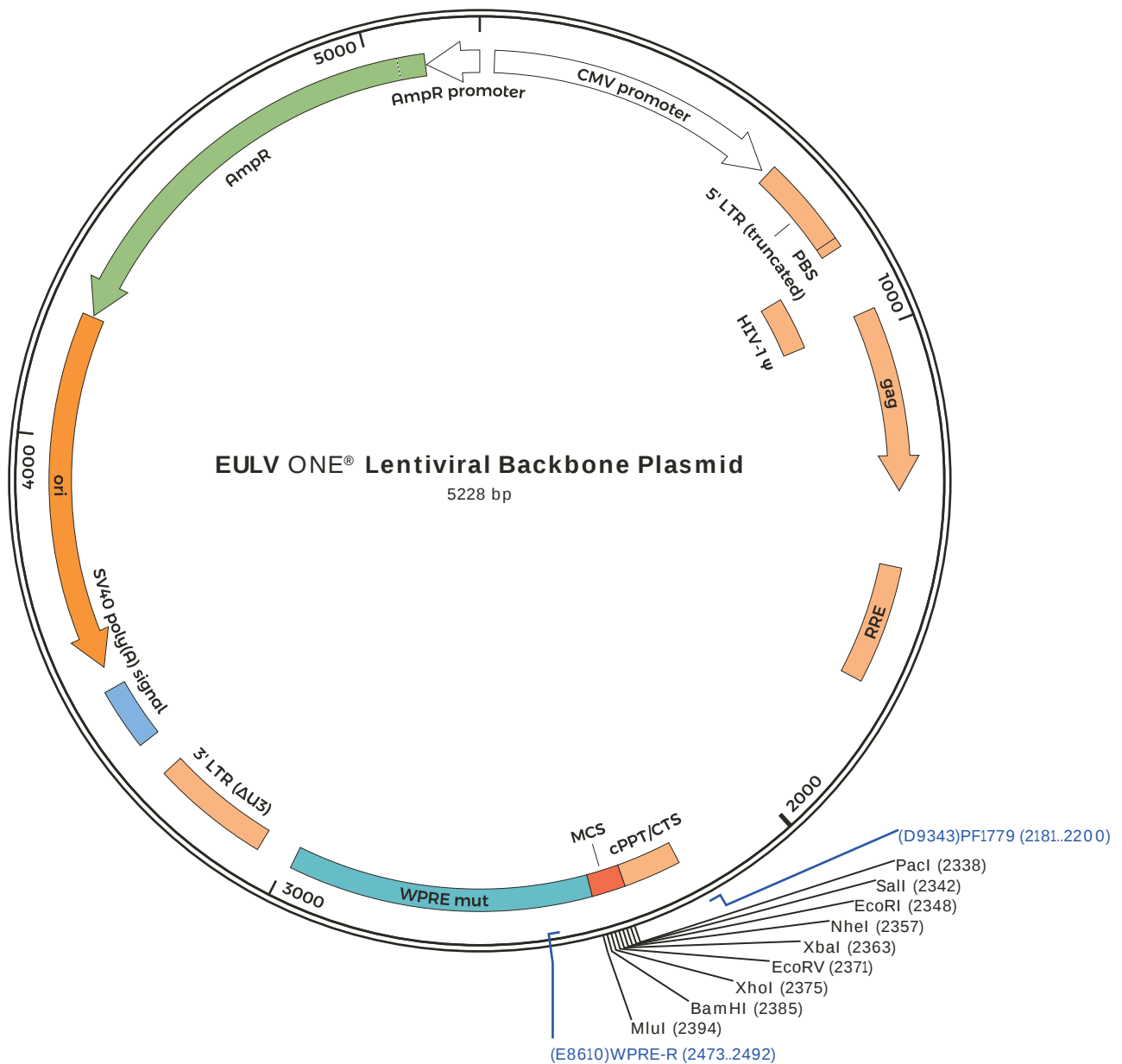
The **EuLV ONE®** Packaging Cell Line 源自HEK293T细胞系，并适应悬浮培养。

特性：

- 细胞倍增时间约20小时。
- 在细胞传代3至20代之间具有高慢病毒生产能力。

1.2.2. EuLV ONE® Lentiviral Vector Backbone Plasmid

The **EuLV ONE®** Lentiviral Vector Backbone Plasmid 用于构建单质粒瞬时转染所需的转移载体骨架质粒。可将目的基因（GOI）序列插入其中，以生产慢病毒载体。



● 质粒说明

元件名称	元件说明	元件位置
CMV promoter	巨细胞病毒早期启动子	31..614
5' LTR (truncated)	慢病毒长末端重复序列	629..809
PBS	启动逆转录的引物结合区域	811..828
HIV-1 Psi (Ψ)	慢病毒RNA基因组包装的信号元件	856..981
gag	HIV-1 gag蛋白编码序列5'端1-337bp区域	965..1326
RRE	Rev反应元件	1480..1713

1.2.4. Polybrene

Polybrene是一种转导增强剂，用于在慢病毒转导滴度检测过程中提高慢病毒转导效率。

1.2.5. Transfection Reagent

专门配制用于将转移质粒高效、低毒地转染到**EuLV ONE®** Packaging Cell Line中。

1.2.6. EuLV Inducer, adherent

一种化学成分明确、无动物源、无血清且无蛋白的配方，用于启动贴壁的**EuLV ONE®** Packaging Cell Line的慢病毒载体生产。

1.2.7. EuLV Medium I

EuLV Medium I是一种化学成分明确、无动物源、无血清且无蛋白的配方，专门为**EuLV ONE®** Packaging Cell Line的生长和转染而开发。使用前，应向培养基中添加6 mM谷氨酰胺。



注意

若需要反复预热培养基，建议分装使用。

1.2.8. EuLV PCL Inducer, suspension

一种化学成分明确、无动物源、无血清且无蛋白的配方，用于启动悬浮的**EuLV ONE®** Packaging Cell Line的慢病毒载体生产。

02

复苏、传代和冻存



重要提示

- ➔ 避免细胞受到短期的极端温度变化。
- ➔ 细胞通过干冰运输收到后，在液氮中储存3~4天后再进行解冻。
- ➔ 对于所有细胞操作，通过轻轻旋转混匀细胞，避免剧烈振荡或吹打。

■ 复苏：

将冻存的细胞恢复到有活率和增殖能力的状态，用于实验，确保冰晶形成和二甲基亚砜 (DMSO) 等冷冻保护剂的细胞毒性对细胞造成的损伤最小化。

■ 传代：

通过在最佳汇合度和细胞密度下对贴壁或悬浮细胞进行传代培养，维持细胞的健康增殖，防止接触抑制、细胞衰老或过度生长诱导的应激。

■ 冻存：

使用冷冻保护剂（如DMSO）在超低温（-196℃）下长期保存细胞，以维持细胞活率、遗传稳定性和功能，用于未来应用，同时将污染或遗传变异的风险降至最低。

2.1. 贴壁细胞

■ 2.1.1. 复苏

a	EuLV ONE® Packaging Cell Line液氮中取出EuLV ONE® Packaging Cell Line冻存管，快速置于37℃水浴锅中，轻轻摇晃至冻存管内无可见冰块。 注意：避免浸没冻存管盖，以防污染。
b	将细胞转移至含有9 mL DMEM完全培养基（含10%胎牛血清）的15 mL离心管中。
c	以190×g离心3分钟。
d	吸除并丢弃上清液，加入3 mL DMEM完全培养基，轻柔吹打至细胞分散均匀。
e	使用细胞计数器测定活细胞密度和细胞活率。按照 2×10^5 活细胞/mL，计算在10 cm培养皿中接种所需的细胞悬液体积（培养体积为10 mL），加入培养基补齐至10 mL。将复苏后的细胞标记为第1代。
f	将培养皿置于37℃、5% CO ₂ 培养箱中培养两天。

2.1.2. 传代

a	培养两天后，吸弃溶液中原有培养基，沿培养皿内壁缓慢加入5 mL PBS，缓慢晃动培养皿使PBS浸润整个培养皿底部，然后吸弃培养皿中的PBS。
b	加入2 mL重组胰酶覆盖培养皿底部。在37°C孵育3分钟，直至约80%的细胞脱离（在显微镜下观察细胞变圆形态，必要时轻轻敲击培养皿）。
c	加入5 mL DMEM完全培养基终止消化并将细胞悬液转移至离心管中。
d	以190×g离心3分钟。
e	吸除并丢弃上清液，加入3 mL DMEM完全培养基，轻柔吹打至细胞分散均匀。
f	使用细胞计数器测定活细胞密度和细胞活率。按照2×10^5活细胞/mL，计算在10 cm培养皿中接种所需的细胞悬液体积（培养体积为10 mL），加入培养基补齐至10 mL。 可接受标准：细胞活率≥80%
g	将培养皿置于37°C、5% CO ₂ 培养箱中进一步培养扩增。

2.1.3. 冻存

a	按照胎牛血清:DMEM 完全培养基:DMEM=5:4:1的体积比配制含有10% DMSO的冻存液，并放入2-8°C冰箱预冷。 注意：冷冻保存液必须现配现用，配制后1小时内使用。
b	步骤同2.1.2 a-2.1.2 d。
c	吸除并丢弃上清液。使用适量体积的冻存液重悬细胞，按每个冻存管1 mL进行分装。 例如：接种2×10^6活细胞至10 cm培养皿培养两天，细胞数达到8×10^6活细胞，应加入4 mL冷冻保存液重悬细胞。
d	使用细胞计数器测定活细胞密度和细胞活率。 可接受标准：细胞活率≥90%，细胞密度≥2×10^6活细胞/mL。
e	将1 mL细胞悬液分装到预先标记的冻存管中。密封冻存管盖，防止液氮泄漏。
f	将冻存管转移至预冷的程序降温盒（提前在2-8°C存放30分钟）中进行程序降温。

g	将程序降温盒转移至-80℃超低温冷藏箱中储存20小时以上。
h	将细胞转移至液氮罐中进行长期保存。

2.2. 悬浮细胞

2.2.1. 复苏

a	从液氮中取出EULV ONE® Packaging Cell Line冻存管，快速置于37℃水浴锅中，轻轻摇晃至冻存管内无可见冰块。 注意：避免浸没冻存管盖，以防污染。
b	将细胞转移至含有9 mL EuLV Medium I 的15 mL离心管中。
c	以190×g离心3分钟。
d	吸除并丢弃上清液，加入3 mL EuLV Medium I，轻柔吹打至细胞分散均匀。
e	使用细胞计数器测定活细胞密度和细胞活率。将所有细胞转移至含有27 mL培养基的125 mL摇瓶中。将复苏后的细胞标记为第1代。 可接受标准：细胞活率≥80%
f	将摇瓶置于37℃、170 rpm和8% CO ₂ 培养箱中培养三天。

2.2.2. 传代

a	培养三天后，使用细胞计数器测定活细胞密度和细胞活率。 可接受标准：细胞活率≥90%。
b	按照4×10 ⁵ 细胞/mL，计算125 mL摇瓶所需的细胞悬液体积（培养体积为30 mL）并将细胞转移至离心管中。
c	以190×g离心3分钟。
d	吸除并丢弃上清液，加入3 mL EuLV Medium I，轻柔吹打至细胞分散均匀。
e	将所有细胞转移至含有27 mL培养基的125 mL摇瓶中。

f	将125mL摇瓶置于37°C、170rpm和8% CO ₂ 培养箱中培养。
g	重复步骤2.2.2 a-2.2.2 f，以维持或扩大细胞培养规模。

2.2.3. 冻存

a	按照培养基：DMSO=9:1的体积比配制含有10% DMSO的冷冻保存液，并放入2-8°C冰箱预冷。 注意：冻存液必须现配现用，配制后1小时内使用。
b	细胞培养三天后，使用细胞计数器测定活细胞密度和细胞活率。 可接受标准：细胞活率≥90%。
c	根据 1.5×10^7 活细胞/冻存管的要求，计算所需的总活细胞数，并将相应的细胞悬液转移至离心管中。
d	以190×g离心3分钟。
e	吸除并丢弃上清液。使用适量体积的冻存液重悬细胞，按每个冻存管1mL进行分装。 例如：需要冻存5支细胞，则将总数为 7.5×10^7 的活细胞转移至离心管中，吸除并丢弃上清液，使用5 mL冻存液重悬细胞。
f	步骤同2.1.3 e-2.1.3 h。

2.3. 操作提示

- ➡ 刚复苏的细胞不可用于细胞转染。建议使用代次为3~20。
- ➡ 在所有细胞操作过程中，通过轻轻吹打混匀细胞；避免剧烈混匀或吹打。细胞状态对最佳实验效果至关重要。
- ➡ 转染试剂的配制及静置过程在室温下进行。

2.4. 设备指南

- ➡ 确保设备的温度已校准。在某些情况下，过高的温度可能会导致细胞生长减缓、聚集或细胞死亡。
- ➡ 确保设备的CO₂浓度已校准。CO₂浓度应在8%±1%的范围内。

03

慢病毒载体生产

■ 接种

达到贴壁细胞的最佳密度（目标汇合度为60%-80%），以确保有足够的表面积用于转染和慢病毒载体生产。对于悬浮细胞，达到最佳密度和细胞活率，以实现高效转染。

■ 瞬时转染

将单个转移载体导入细胞，简化了慢病毒载体的生产过程，同时保持高滴度并最小化批次间差异。

■ 诱导

诱导包括：（a）使用可诱导启动子（如四环素响应元件）激活慢病毒基因；或（b）应用增强剂，通过提高转染效率和降低细胞毒性来提高慢病毒滴度。

■ 收获

转染后48小时收集上清液（此时慢病毒滴度可达峰值），经离心去除细胞碎片后，用于后续滴度检测。

3.1. 贴壁细胞操作

■ 3.1.1. 接种（10cm培养皿）

a	步骤同2.1.2 a-2.1.2 e。
b	测定活细胞密度和细胞活率。根据总细胞数 4×10^6 计算10cm培养皿所需的细胞悬液体积。 可接受标准：细胞活率 $\geq 90\%$ 。
c	将细胞置于37°C、5% CO ₂ 培养箱中孵育。

3.1.2. 瞬时转染

- a 接种后24小时，在显微镜下观察细胞汇合度，60%-80%范围内最佳。
- b 根据下表制备转染复合物，并根据所需10cm培养皿的数量按比例调整。

表1: 10cm培养皿转染复合物制备步骤

DMEM完全培养基	质粒	Transfection Reagent
加至 900μL	25μL	75μL

- c 按照表中顺序混合质粒和试剂，在室温下静置15分钟，将转染复合物缓慢加入至10cm培养皿中，轻轻摇晃培养皿以确保均匀分布。
- d 将细胞置于37°C、5% CO₂培养箱中孵育6小时。

3.1.3. 诱导

- a 转染后6小时，吸除并丢弃上清液。加入10 mL含有10% EuLV Inducer,adherent的DMEM完全培养基（使用前配制使用）。
- b 将细胞置于37°C、5% CO₂培养箱中孵育42小时。

3.1.4. 收获

- a 请参考3.3。

3.2. Suspension Cells

3.2.1. 接种（125mL摇瓶）

- a 重复步骤2.2.2 a-2.2.2 f完成细胞接种。

3.2.2. 瞬时转染

- a 接种后3天，测定活细胞密度和细胞活率。
可接受标准：细胞活率≥90%，活细胞密度： 4×10^6 - 6×10^6 /mL。
- b 将含有EuLV Medium I 和质粒的离心管（如下表所示）轻轻倒置4-5次进行混合。

表2: 125 mL摇瓶转染复合物配制(30 mL)

EuLV Medium I	质粒	Transfection Reagent
2.76 mL	60 μ L	180 μ L

- c 向混合物中加入Transfection Reagent后，将离心管涡旋4-5次。
注意：如果需要使用其他培养体系，可按比例调整试剂用量。
- d 将转染混合物在室温下静置15分钟，然后缓慢滴加至摇瓶中。
- e 将细胞置于37°C、170rpm和8% CO₂的振荡培养箱中继续培养。

3.2.3. 诱导

- a 转染后6小时，加入8% EuLV PCL Inducer, suspension（如30 mL生产体积加入2.4 mL）。
- b 将细胞置于37°C、170rpm和8% CO₂的振荡培养箱中继续培养24小时。

3.2.4. 阳性率检测

- a 转染后24小时，从摇瓶中取出200 μ L细胞悬液以检测阳性率。
可接受标准：阳性率≥30%。
- b 剩余细胞继续培养24小时。

3.2.5. 收获

- a 请参考3.3。

3.3. 收获慢病毒载体

- a 转染后48小时收获慢病毒载体，将细胞悬液收集至离心管中，以1500×g离心10分钟。
- b 收获后立即将慢病毒载体按200μL分装至EP管中并储存在-80℃，或进行"慢病毒载体滴度检测"。

04

慢病毒载体滴度检测



重要提示

慢病毒载体的处理必须按照机构指南进行。所有材料在使用后必须用10%漂白剂溶液灭活处理。

4.1. 操作提示

- ➔ 轻柔吹打混合慢病毒载体。请勿涡旋，避免剧烈混合。
- ➔ 刚复苏的细胞不可用于细胞转导。建议使用代次为3~20。

4.2. 转导Jurkat细胞（第1天）

- a 转导当天，测定Jurkat的活细胞密度和细胞活率。
可接受标准：细胞活率≥90%。
- b 向离心管中加入RPMI1640完全培养基（含10%胎牛血清），将Jurkat细胞稀释至最终活细胞密度为 2×10^5 细胞/mL。加入0.1% Polybrene（如15mL培养体积加入15μL），轻柔吹打混匀。
- c 转导前，将Jurkat细胞接种24孔培养板，培养体积为500μL/孔。

d	若使用冻存慢病毒载体，请提前取出并恢复至室温。 注意：不要加速慢病毒载体的解冻过程，可能会降低慢病毒载体的滴度。
e	在每个EP管中，将150μL慢病毒载体依次稀释到150μL培养基中，制备12个连续稀释倍数（2^1至2^{12}）。（用于慢病毒载体阳性对照）
f	在每个EP管中，将150μL慢病毒载体依次稀释到150μL稀释培养基中，制备9个连续稀释倍数（2^1至2^9）。（用于慢病毒载体样品） 注意：如果您的慢病毒载体经过纯化浓缩，可能需要更多的稀释倍数。
g	将100μL稀释后的慢病毒载体转移至24孔板对应的孔中转导Jurkat细胞。
h	将24孔培养板置于37℃、5% CO₂培养箱中培养48小时。

4.3. 滴度检测（第3天）

a	轻柔吹打使细胞分散均匀。
b	使用流式细胞仪处理细胞样品。
c	计算慢病毒滴度。
d	选取阳性范围为5%~35%，根据EGFP⁺细胞的百分比确定对应的稀释倍数。

表3: 慢病毒滴度计算示例

慢病毒载体稀释倍数	EGFP ⁺ 阳性细胞率
2^5	80%（超出范围，不可用）
2^6	60%（超出范围，不可用）
2^7	36%（超出范围，不可用）
2^8	18%

使用以下公式计算滴度：

滴度 = (F×C/V)×D	F	EGFP ⁺ 阳性细胞率
	C	转导时每孔的细胞数（每孔）
	V	病毒加入量(mL)
	D	慢病毒载体稀释倍数
示例	F	18%
	C	1×10 ⁵
	V	0.1
	D	2 ⁸
计算: 滴度 = (0.18×100,000 / 0.1) × 2 ⁸ = 4.6×10 ⁷ TU/mL		

描述	建议	
慢病毒滴度低	a	细胞质量保证 重点：关注细胞密度和细胞活率，以确保最佳细胞状态。
	b	试剂有效期管理 重点：关注试剂效期（例如，转染效率>30%），避免适用过期试剂导致实验失败。
	c	质粒用量优化 重点：调整质粒比例（例如，目的基因：转染试剂=1:3、1:2、1:1）以获得更高的转染效率。
细胞质量保证	a	微生物污染筛查 重点：对细菌、真菌和支原体进行系统污染筛查。
细胞质量保证	b	诱导剂和添加剂区分 重点：注意诱导剂和添加剂的使用顺序。
	c	细胞传代质量评估 重点：验证传代数是否超过规定限制，以及传代培养期间细胞密度是否超过 7×10^6 活细胞/mL。

6.1. 生物安全等级要求

慢病毒载体被归类为生物安全等级2（BSL-2/P2）制剂。所有操作，包括废物处理，必须在BSL-2设施内的II级生物安全柜（BSC）中进行。废物容器必须标有生物危害标志并进行高压灭菌（121℃，30分钟）。

6.2. 毒性风险警示



慢病毒载体的毒性本质上与转移载体中携带的转基因有关。对于编码癌基因（如HER2、RAS突变体）或肿瘤抑制基因（如p53、PTEN）的载体：

- ➔ 废物必须在高压灭菌前进行化学灭活（例如，1%次氯酸钠≥1小时）。
- ➔ 操作人员必须佩戴双层手套+防刺实验服，并在操作后72小时内监测症状。

6.3. 意外泄漏措施

a

处理慢病毒载体时要小心防止飞溅。如果操作过程中生物安全柜被慢病毒载体污染，立即用含有75%乙醇和1% SDS的灭活溶液擦拭干净。接触慢病毒载体后，将移液枪头、离心管、培养板和培养基浸泡在含有75%乙醇和1% SDS的灭活溶液中。

b

慢病毒载体相关废物需要专门收集，并进行高温灭菌统一处理。





深圳市深研生物科技有限公司

电话：0755-86562586

网址：www.eurekabio.com

地址：深圳市南山区招商街道南海大道
1079号花园城数码大厦A栋8楼