**T75转染病毒计算**

T75培养基量：8-15ml

A液配置：取1.5 ml灭菌旋盖EP管，根据质粒的浓度（前期测定得到），将**包装质粒（dR8.9/pSPAX2）、包膜质粒（VSVG/pMD2.G）、转移质粒（目的基因）配比为7.5μg：5μg：10μg（3：2：4），**添加至500μL opti-MEM（无血清无双抗）中，移液枪轻柔混匀20次后室温静置5min；

**【此处为T75的细胞培养瓶，T25则用量减半，T150用量翻倍】**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 包装质粒pCMV-dR8.9 (psPAX2) | 7.5μg | x μL |
| 包膜质粒pCMV-VSV-G (pMD2.G) | 5μg | y μL |
| 目的基因 | 10μg | z μL |
| Opti-MEM |  | 500μL |

B液配置：取1.5ml灭菌旋盖EP管，取PEI（一般配成1μg/mL）50μg（50μL）添加到500μL opti-MEM（无血清无双抗）中，移液枪轻柔混匀20次后室温静置5min；

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| PEI | 50μg | 50μL |
| Opti-MEM |  | 500μL |

将B液逐滴滴加至A液中，每加一次移液枪轻柔混匀一遍，室温静置20min（这个时间处理细胞：对于T25瓶，取10mL DMEM培养基（最好无血清）37℃预热，在加转染试剂前吸掉原有培养基，用PBS洗一遍）；

细胞加样：将静置好的转染试剂（A+B）缓缓滴加到293T细胞中（p10或T25），在滴加过程中轻柔晃动培养板，使转染试剂均匀扩散；

在培养6-7h时，将培养基预热至37℃；培养6-8h后将培养基更换为新鲜的含2-5%FBS的培养基（10-12mL），换液时贴壁加，动作轻柔以防细胞漂起。