慢病毒包装

1. 文库的慢病毒包装

物品准备：无抗生素的DMEM全培、Gibico血清、文库质粒、辅助质粒、拿0.2/0.5ml的EP管子**分装1个**（**1个16ug-32ul**、原管剩余69ug；）

文库质粒：浓度500ng/ul；文库质粒15ug需加30ul。

目前分装的psPax2 4.6ug/ul， PMD2.G 4.2ug/ul，所以 psPax2：9/4.6=**1.96ul**；pMD2.G：6/4.2=**1.43ul**

a）提前24小时将HEK293T细胞接种于10cm培养皿中，每皿3x106细胞，置于37℃、5%的CO2细胞培养箱中培养，待细胞汇合度70％-80％，准备转染；文库质粒解冻分装；

b）转染前30-60min/2h更换为新鲜的完全培养基(不含抗生素)。

c）配置转染混合液:

质粒mix体系：文库质粒(15ug)、辅助质粒psPax2(9μg)、pMD2.G(6μg)、700ul的Opti-MEM培养基（Opti-MEM加到混合的质粒里）；

Lipo2000 mix体系：lipo2000转染试剂(30μl)、700ul的Opti-MEM培养基；

将上述液体轻柔混合均匀后在室温孵育20分钟后逐滴加入到培养基中。

d）转染4-6小时后，更换为10mL新鲜完全培养基。

e）收集病毒上清:分别于转染后48小时或72小时收集病毒上清于50mL离心管中。收集上清并使用0.45μm滤膜滤过，分装于ep管中，于-80℃冰箱保存。(注意:病毒使用前应该在冰上缓慢融化，切勿反复冻融)

**备注：**

血研所这边常用质粒配比：

10cm - 700ul质粒mix- 700ul lipo2000mix；质粒15:9:6；lipo2000 30ul；6cm则10cm的基础上除以2.5。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Component | 质粒Mix | Lipo2000mix |
| Opti-MEM | 700ul | 700ul |
| psPAX2 | 9ug |  |
| pMD2.G | 6ug |  |
| pLV | 15ug |  |
| Lipo2000 |  | 30ul |

PEI体系

|  |  |
| --- | --- |
| Component | Mix |
| Opti-MEM | 1400ul |
| psPAX2 | 9ug |
| pMD2.G | 6ug |
| pLV | 15ug |
| PEI | 60ug |