1. 293T细胞状态良好（代数建议小于10代），提前一天使用10-12ml培养液铺板于p10 dish中，24小时后汇合度达到约70%-80%可开始进行转染，转染前换全培10 ml。
2. 每p10对应体系为：

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 质量 |
| 目的序列质粒 | 15 µg |
| psPAX2 | 9 µg |
| pMD2.G | 6 µg |
| PEI（为总体质粒质量的两倍） | 60 µg / 240 ul |
| opti-MEM | 1-2 ml |

将上述成分一次性混合均匀于管内，静置20 min。静置结束后滴入p10。

1. 24小时后，转染换液，加入10-12 ml全培，48 h/72 h后收集上清，注意轻柔换液防止细胞漂浮，使用0.45 µm PVDF滤膜过滤（不可使用NC滤膜）；（常规病毒不浓缩，省去4-9步）
2. 在超净台中提前紫外消毒电子天平、开盖的超离套筒（SW28）、超离管；
3. 在超离管中加入过滤后病毒上清，每管体积需要达到35 mL左右，体积不足使用培养基或者PBS补充，电子天平配平；
4. 将装有病毒上清的超离管装入套筒，拧紧筒盖后送去4℃、15000×g超离2 h，（升6降9减少沉淀扰动）。
5. 超离结束后再次将超离套筒转移至超净台，倒出上清，在超离管回正之前用1 mL枪头吸尽上清，避免上清回流重悬病毒颗粒影响稀释；
6. 用0.22 µm过滤的1% BSA（in PBS）重悬病毒，每p10对应的病毒沉淀量用50-100 µL重悬（可能无法看见沉淀），病毒重悬后进行分装，推荐分装50 ul/管。
7. 浓缩后的病毒保存在-80 ℃，避免冻融（每次冻融约使病毒滴度降低一半），使用前冰上解冻。
8. 使用一定量慢病毒进行侵染，加入病毒的同时加入polybrene（推荐量4-8 µg/ml）进行破膜，增加病毒转染效率。

挑选稳转株时，提前在6孔板内进行铺板，细胞贴壁良好，汇合度约50%-60%时，开始进行慢病毒转染：每孔换1 ml全培，滴入病毒浓缩液，静置培养24小时，等待细胞增殖。24小时后，将含有病毒颗粒的培养液替换为1 ml全培，此后每隔24小时依据细胞增殖量选择换液或传代。

1. 病毒侵染96 h后即可加入抗生素进行筛选，后续根据需要可选择转96孔板或流式分离单克隆。推荐杀伤浓度：Blasticidin 10 µg/ml，Puromycin 1.5 µg/ml。

杀伤48小时后，Ctrl组细胞应出现大量悬浮，病毒转染组47-72小时后有部分或大量贴壁（细胞贴壁量依赖病毒滴度）。96小时后，细胞出现成簇生长，为单细胞扩增形态。杀伤至只有少量细胞死亡时可进行下一步分选及目的基因表达检测（qPCR/WB/PCR）。