**慢病毒包装-瑞金医院血液学研究所**

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**

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)、700 ul 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)、700 ul 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。

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| component | A tube | B tube |
| Opti-MEM medium | 700 μl | 700 μl |
| Lenti plasimid | 15μg |  |
| psPax2 | 9μg |  |
| pMD2.G | 6μg |  |
| Lipofetamine 2000 |  | 30μl |

可替换方案：

使用PEI时，可以直接混合AB tube成分，混合后轻柔吹打混匀，

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| component | A tube | B tube |
| Opti-MEM medium | 700 μl | 700 μl |
| Lenti plasimid | 15 μg |  |
| psPax2 | 9 μg |  |
| pMD2.G | 6 μg |  |
| PEI |  | 30 μg |

d）转染4-6小时后，更换为10mL新鲜完全培养基。（也可以24小时后换液）

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 0.45 μm 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：**

瑞金血研常用质粒配比：

10cm-700ul 质粒mix-700ul lipo2000 mix；质粒15:9:6；lipo2000 30ul；

6cm则10cm的基础上除以2.5。

6 well plate: 1/6 10cm dish量：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| component | A tube | B tube |
| Opti-MEM medium | 150 μl | 150 μl |
| Lenti plasimid | 2.5 μg |  |
| psPax2 | 1.5 μg |  |
| pMD2.G | 1 μg |  |
| PEI |  | 5 μg |