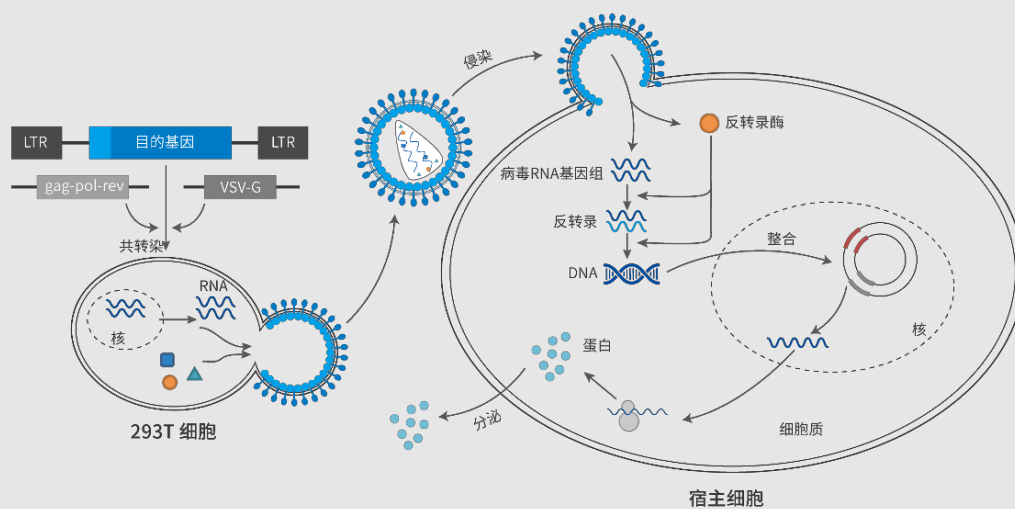


慢病毒包装和侵染

慢病毒载体(Lentivirus)是一类改造自人免疫缺陷病毒(HIV)的病毒载体,是逆转录病毒的一种,基因组是RNA,其毒性基因已经被剔除并被外源性目的基因所取代,属于假型病毒,可将外源基因整合到基因组中实现稳定表达,具有基因容量大、表达时间长、安全性高、免疫原性低的优势。

实验室目前有两套慢病毒体系,分别为pCDH和HushLap。本Protocol是实验室保留Protocol



前一天晚上: 准备293T细胞

1. 前一天晚上准备10 cm皿的293T细胞($6 - 7 \times 10^6$ 个细胞), 细胞贴壁后达到80%-90%密度后进行转染

第二天 早晨: 包病毒

! 以下操作, 只能在 **生物安全柜** 中进行, 实验严格带好手套和口罩, 凡是涉及病毒质粒的一切器材均需要回收到包装袋中, 实验结束后高压蒸汽灭菌

2. 用PEI转染体系转染293T细胞, 首先搭建转染体系:

PEI是 **聚乙烯亚胺**, 是一种廉价的转染试剂, 对于293T这类生长快, 易转染的细胞很好用

- **B液**: 250 μ L Opti-MEM + 24 μ L PEI复合体 (储液为1 μ g/ μ l), 涡旋混匀, 室温静置5 min
- **A液**: 使用250 μ L Opti-MEM稀释质粒, 混匀

有两种选择, 其配套辅助质粒不同 (可以混用), PMD2G和PSPAX2具有更高效率

HushLap:Delta8.91:VSVG=5:10:1, 即3.125 μ g, 6.25 μ g, 0.625 μ g (共10 μ g)

pCDH: PMD2G:PSPAX2=2:1:1, 即4 μ g, 2 μ g, 2 μ g (共约10 μ g, <20 μ g)

3. 将B液上上下下旋转加入A液, 并涡旋混匀, 室温静置20 min
4. 后逐滴加入细胞培养基中, 轻轻混匀
5. 6小时后换液, 换新鲜的预热的10 mL培养基 (含有10%或30%的FBS的培养基, 30%更佳)
! 包病毒的实验体系可以使用六孔板量的293T细胞, 并缩小转染体系和病毒沉降体系为原来的1/5, 收到的病毒全部用于侵染

第五天 中午: 沉降病毒颗粒

6. 72 h收病毒 (如果细胞有大范围脱落, 包毒效果不会太好。溶液变黄没有太大影响) , 3000 g, 15 min, 15 mL管离心去掉293T细胞, 将含有病毒的上清吸到新的管中
7. 用PEG-it 4°C沉降过夜 (上清:PEG-it=4:1), 10 mL上清+2.5 mL PEG, 水平混匀, 4°C过夜
8. 同时铺3.5 cm皿被侵染的细胞, 注意铺细胞的密度需要很低, 1.0×10^5 U2OS/Hela

第六天 早晨: 收病毒与病毒侵染

9. 第二天1500 g, 30 min, 离心沉降病毒
10. 去掉上清, 用600 μ L PBS重悬病毒, 分2份, 在被侵染细胞培养液中加入300 μ L病毒侵染 ! 侵染时细胞密度约为30%
11. 6小时后换成新鲜的培养基, 原培养基务必回收, 高压蒸汽灭菌
12. 48小时后加抗生素药物 (浓度可适量加倍), 继续培养1-2周, 获得阳性细胞系

修订日期 2023-10-08

JW Wang L5