pMD2.G 质粒说明书

【产品组分】

货号	名称	规格	数量	保存条件
P0262	pMD2.G	100 μg	5 支	-20℃

【质粒简介】

质粒类型：慢病毒包装质粒

质粒用途：包装辅助

启动子：CMV

复制子：pUC

拷贝数：高

原核抗性：氨苄青霉素（Amp）

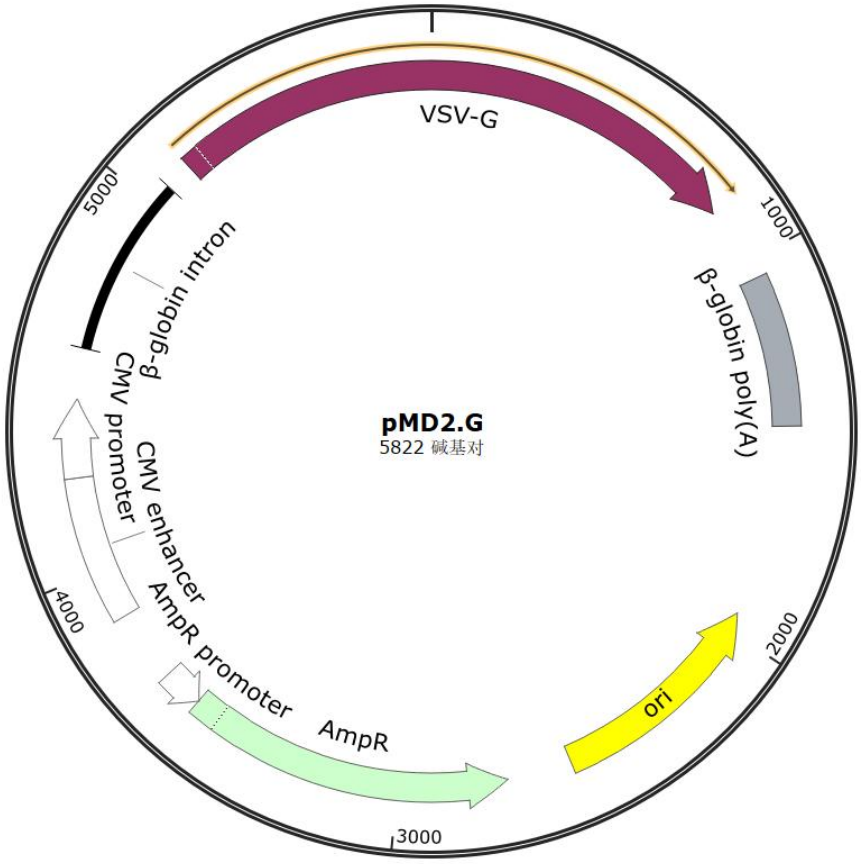
克隆菌株：大肠杆菌 DH5α

测序引物：CMV-F：CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG

Forward (left ITR)：CCTCTGACTTGAGCGTCGAT

慢病毒属于一种工具病毒，感染目的细胞即可实现基因敲除、敲降和过表达等目的。pMD2.G 是一种广泛应用于慢病毒包装系统的辅助质粒。该质粒载体中携带来源于水疱性口炎病毒（VSV）的 G 蛋白基因，其编码的 VSV-G 包膜蛋白在病毒包装过程中替换慢病毒原有的包膜，VSV-G 可识别细胞膜上广泛存在的磷脂酰丝氨酸等受体，使包装出的慢病毒能够感染绝大多数哺乳动物细胞类型，包括难转染的原代细胞、干细胞、甚至非分裂细胞。同时 VSV-G 包膜蛋白显著增强病毒颗粒的物理稳定性，是获得高滴度、高感染效率慢病毒的关键。

【元件信息】

CMV promoter	高效表达 VSV-G 包膜蛋白
β-globin 内含子	主要用于增强基因表达的稳定性和效率
VSV-G	编码病毒包装所需要的包膜蛋白
β-globin poly(A)	增强 mRNA 稳定性，促进翻译效率
pUC 复制起始点	允许在大肠杆菌中进行高拷贝数复制和生长
AmpR	氨苄青霉素抗性基因，允许在大肠杆菌中筛选转化体
质粒图谱	 详细序列请参考淼灵质粒平台官网 http://www.miaolingbio.com

【使用说明】

1. 慢病毒包装

(1) 准备细胞

提前一天接种 HEK 293T 细胞至 10 cm 培养皿。

(2) 制备 DNA-PEI 混合物

1.5 mL EP 管中加入 0.25 mL 无血清 DMEM，按一定比例加入总量 16 μg 的 P0262 和其他包装质粒，涡旋振荡仪 3000 rpm，5~10 s 震荡混匀，另取一个 1.5 mL EP 加入 0.25 mL 无血清 DMEM 和 48 μL PEI Pro（转染试剂加之前要涡旋混匀），用枪头轻吹混匀，将 PEI Pro 混合物加入质粒混合物中，轻吹混匀后静置 15 min。

(3) 转染细胞

将制备好的 DNA-PEI Pro 混合物滴加入培养皿中。加完后放置于 37℃，5% CO_2 培养箱培养 4-6 h。培养时间到后换新鲜的完全培养基，放置于 37℃，5% CO_2 培养箱培养。

(4) 病毒收集

转染 48 h 后收集上清于 50 mL 离心管，4℃，5000 rpm 离心 10 min。上清液用 30 mL 注射器和 0.45 μm 过滤器过滤到新的离心管中。

2. 慢病毒滴度测定

慢病毒滴度测定的方法有多种，如流式细胞、ELISA 以及 RT-qPCR 等检测方法，本说明以 RT-qPCR 方法阐述慢病毒滴度测定操作。

(1) 细胞准备

提前一天接种 HEK 293T 细胞至 24 孔板：将细胞消化计数后稀释至 $1*10^5$ 个/mL，每孔加入 500 μL 细胞悬液，按标准品 4 个孔，Control 组 1 个孔，待测病毒 2 个孔，设定待测试样本为 N，准备的细胞孔数为 5+（2×N）。

(2) 标准品病毒稀释

无菌操作台中，准备 4 个无菌 1.5 mL 的 EP 管，按标 1-4 做好标记，再向标记为标 2，标 3 和标 4 的 EP 管各加入 90 μL 完全培养基。取轻柔吹打混匀的标准品病毒液 50 μL 加入标记为标 1 的 1.5 mL EP 管中；取标记为 1 的 EP 管的病毒液 10 μL 加入标记为标 2 的 1.5 mL EP 管中，轻柔吹打混匀，依次以 10 倍梯度稀释至标记为标 3 和标 4 的 EP 管。

(3) 待测病毒稀释

无菌操作台中，准备 2 个无菌 1.5 mL 的 EP 管，按 a-b 做好标记后每管加入 90 μL 完全培

养基，取混匀的病毒原液 10 μL 加入装有 90 μL 完全培养基标记为 a 的 1.5 mL EP 管中，轻柔吹打混匀 5 次左右；取标记为 a 的 EP 管的病毒稀释液 10 μL 加入标记为 b 的 1.5 mL EP 管中，轻柔吹打混匀 5 次左右。

(4) 标准品病毒感染

将标 1 至标 4 管内的病毒液各取 10 μL 加入铺有细胞的 24 孔板中，留一孔不加病毒处理，作为 Control 组。

(5) 待测病毒感染

同时将标 a 和 b 的病毒稀释液各取 10 μL 加入铺有细胞的 24 孔板中，加完后将孔板放置于培养箱于 37℃，5% CO_2 条件中培养 72 h。

(6) 按试剂盒说明书的步骤提取细胞总 RNA。

(7) 按试剂盒说明书步骤反转录 cDNA。

(8) 配制样本上机进行 RT-qPCR 检测。

(9) 根据标准品滴度和 Ct 制作的标准曲线公式计算待测样本的慢病毒滴度。

【注意事项】

1. 本产品仅供科研使用，不能用于临床试验，包括人体口服、注射或者体外用药。
2. 质粒溶液可以根据需求加无内毒水稀释至目标浓度。
3. 质粒使用量不足时可以转化大肠杆菌扩增抽提或者淼灵购买。
4. 操作说明仅供参考，实际使用过程中严格按照各个试剂说明书操作。
5. 质粒使用过程中细胞相关操作严格控制无菌环境。
6. 本质粒提取可能形成二聚体，大小 11kb 左右，不影响后续使用。
7. 转染时的细胞密度一般控制在 80%左右比较合适，不同细胞的最佳转染密度可能有差异。
8. 转染效率低：检查质粒质量、细胞状态、转染试剂用量及细胞密度，优化转染条件。
9. 转染后细胞异常：减少转染试剂用量，或更换转染试剂，优化转染的细胞密度。
10. 慢病毒需要注意保存温度，并且避免多次反复冻融。
11. 使用慢病毒感染细胞时，严格控制细胞密度以及最佳使用 MOI。