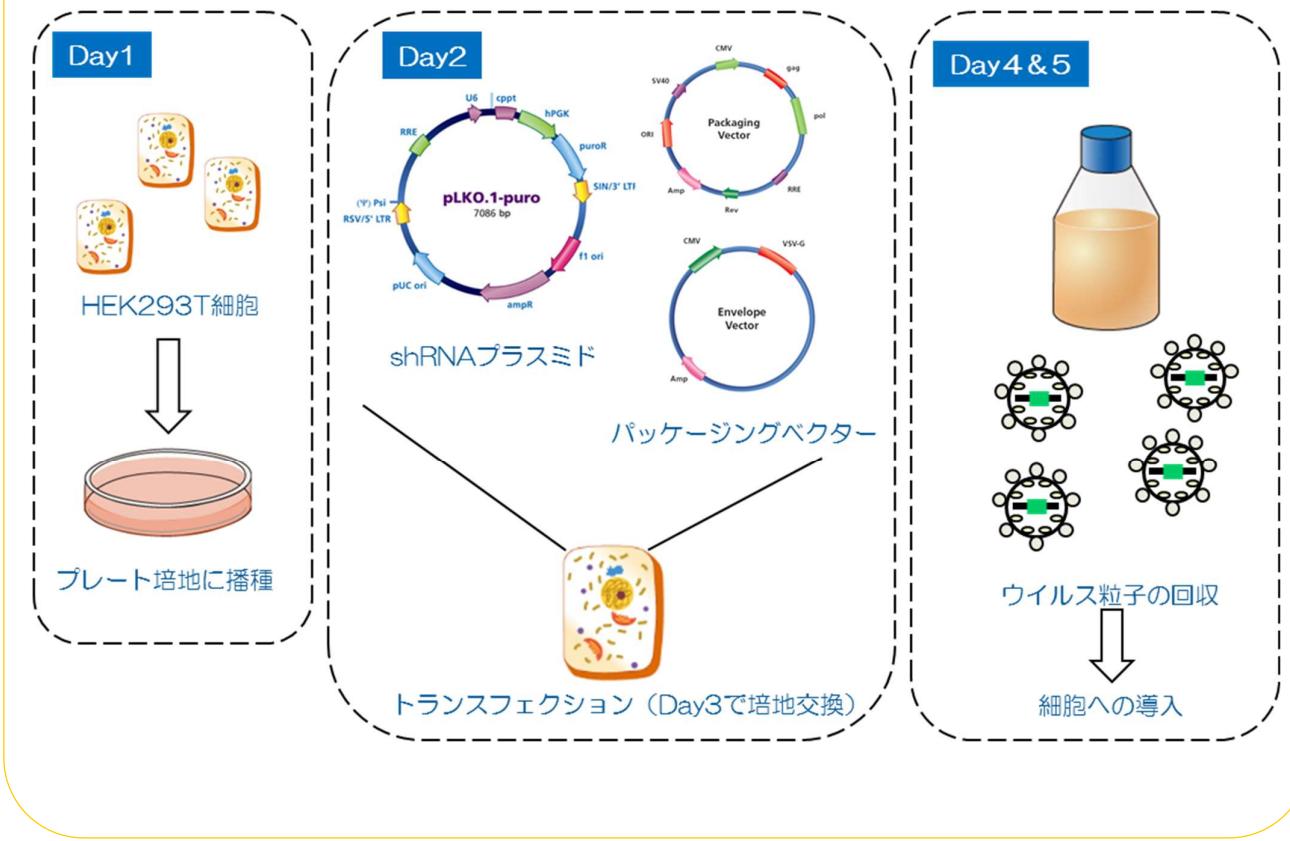


Mission shRNA レンチウイルス粒子の調製方法

概要

MISSION[®] Lentiviral Packaging Mix（製品番号 [SHP001](#)）を使用してレンチウイルス粒子を作製します。MISSION[®] Lentiviral Packaging Mix は Mission TRC shRNA コレクションに最適化したパッケージング用プラスミドのプレミックスです。本製品には、レンチウイルスの構造および複製に関与する遺伝子（GAG および POL）を有するパッケージングベクター、VSV-G エンベロープ遺伝子（広範な親和性）を有するエンベロープベクターから成ります。

レンチウイルス粒子作製の流れ



方法

※詳細なプロトコールは、弊社ウェブサイト（製品番号 [SHP001](#)）からご確認ください。

本製品以外にご用意いただく試薬および器具

- ・レンチウイルス用トランスファーベクター (shRNA)
- ・FuGENE® 6 トランスフェクション試薬
- ・HEK293T 細胞株
- ・無血清 DMEM
- ・DMEM (10% ウシ胎児血清および 4mM L-グルタミン添加)
- ・HIV-1 p24 Antigen ELISA Kit、ZeptoMetrix、ZMC 製品番号 0801111

Day 1

1. トランスフェクションの 24 時間前までに HEK293T 細胞を DMEM（10% ウシ胎児血清および 4mM L-グルタミン添加）で播種します。細胞密度はトランスフェクション時に 50-70% コンフルエントとなるようにします。

推奨される細胞接種密度

形状	最初にプレートに播く細胞数	最終のウイルス液量 (2 回の回収を仮定)
96 ウェルプレート	$1.6 \sim 2.0 \times 10^4$ 細胞/ウェル	200 μL
60mm ディッシュ	5.0×10^5 細胞/ディッシュ	8.0 mL
100mm ディッシュ	1.0×10^6 細胞/ディッシュ	22 mL
6 ウェルプレート	2.3×10^5 細胞/ウェル	6.0 mL
T75 フラスコ	1.8×10^6 細胞/フラスコ	30 mL
T225 フラスコ	5.4×10^6 細胞/フラスコ	90 mL

Day 2

2. Lentiviral Packaging Mix の準備

Lentiviral Packaging Mix を室温で解凍し、その後氷上に置きます。下表を参考にチューブに分注し氷冷します。
ピッティングエラーを補うため、使用分より多めに準備します。

Lentiviral Packaging Mix 必要量

形状	Lentiviral Packaging Mix
96 ウェルプレート	1 μL / ウェル
60mm ディッシュ	10 μL / ディッシュ
100mm ディッシュ	26 μL / ディッシュ
6 ウェルプレート	4.6 μL / ウェル
T75 フラスコ	34 μL / フラスコ
T225 フラスコ	107 μL / フラスコ

3. トランスマルクターの準備

同様に shRNA ベクターを室温で解凍し、その後氷上に置きます。下表を参考にチューブに分注し氷冷します。
ピペットイングエラーを補うため、使用分より多めに準備します。

トランスマルクターの必要量

形状	トランスマルクター
96 ウエルプレート	0.1 µg / ウエル
60mm ディッシュ	1.0 µg / ディッシュ
100mm ディッシュ	2.6 µg / ディッシュ
6 ウエルプレート	0.5 µg / ウエル
T75 フラスコ	3.4 µg / フラスコ
T225 フラスコ	10.7 µg / フラスコ

4. FuGENE 6 トランスマクション試薬の準備

※FuGENE 6 トランスマクション試薬はポリスチレンに吸着する傾向があるため、ポリプロピレン材質のチューブをご使用ください。

下表を参考に、チューブに無血清 DMEM を入れ、そして FuGENE 6 トランスマクション試薬を加えて、穏やかに混合します。

無血清 DMEM および FuGENE® 6 トランスマクション試薬の必要量

形状	無血清 DMEM	FuGENE® 6
96 ウエルプレート	15 µL / ウエル	0.6 µL / ウエル
60mm ディッシュ	70 µL / ディッシュ	6 µL / ディッシュ
100mm ディッシュ	182 µL / ディッシュ	16 µL / ディッシュ
6 ウエルプレート	30.3 µL / ウエル	2.7 µL / ウエル
T75 フラスコ	237 µL / フラスコ	21 µL / フラスコ
T225 フラスコ	710 µL / フラスコ	62 µL / フラスコ

5. トランスマクション混合液の調製

トランスマクション混合液の全成分を 1 本のポリプロピレンチューブで混合します。

すなわち、2. Lentiviral Packaging Mix、3. トランスマルクターおよび 4. FuGENE 6 トランスマクション試薬を各推奨量加え、穏やかに混合します。

6. 室温で 15 分間、静置します。

7. トランスマクション混合液を培養中の DMEM に添加します。

Day3 培地交換

8. DMEM (10% ウシ胎児血清および 4mM L-グルタミン添加) を 37°Cで加温します。
9. トランスフェクション 16 時間後に、細胞を剥がさないように培地を除去し、下表を参考に加温した DMEM を加えます。

DMEM 量

形状	DMEM
96 ウエルプレート	100 μL / ウエル
60mm ディッシュ	5 mL / ディッシュ
100mm ディッシュ	10 mL / ディッシュ
6 ウエルプレート	2-3 mL / ウエル
T75 フラスコ	15 mL / フラスコ
T225 フラスコ	45 mL / フラスコ

10. 24 時間培養します。

Day4 ウイルス粒子の回収（1 回目）

11. DMEM (10% ウシ胎児血清および 4mM L-グルタミン添加) を 37°Cで加温します。
12. トランスフェクション 36~48 時間後に、細胞を剥がさないように培地を回収し、加温した DMEM を加えます。
13. 回収した培地に、細胞が含まれている場合、遠心で細胞を除去してください。
14. ウイルス粒子は 2-8°Cで 24-48 時間保存ができます。長期保存する場合は、-70°Cで冷凍保存してください。
※ウイルス粒子は凍結融解を繰り返すと、感染可能なウイルス力値が 20-50%減少します。
※回収タイミングはトランスフェクション時における細胞の生存状態、継代数、および培地組成に基づき最適化する必要があります。

Day5 ウイルス粒子の回収（2回目）

15. トランスフェクション 60~72 時間後に、細胞を剥がさないように培地を回収します。必要に応じて、1回目と2回目のウイルス液を混合します。

16. 回収したウイルス粒子について、ELISA 法にて力価を測定します。
※ウイルス粒子は凍結融解を繰り返すと、感染可能なウイルス力価が 20-50% 減少します。
※回収タイミングはトランスフェクション時における細胞の生存状態、継代数、および培地組成に基づき最適化する必要があります。

トラブルシューティングガイド

問題	原因	対策
ウイルス力価が低い、または HIV p24 ELISA アッセイで確認できない。	Lentiviral Packaging Mix がトランスフェクションミックスに加えられていない。	再実験してください。
	Lentiviral Packaging Mix が適切に保存されていない。	-20°C で保存されていたか確認してください。
	Lentiviral Packaging Mix の凍結解凍を繰り返している。	適量に分注し、-20°C で保存してください。
	標的遺伝子が細胞の成育および生存能力に不可欠である。	標的遺伝子が細胞の成育および生存能力に不可欠でないか確認してください。
	shRNA コンストラクトが 2kb 以上ある。	2kb 以上ある shRNA クローンはレンチウイルス粒子の產生に悪影響する場合があります。
	shRNA プラスミド DNA の収量が低い。	ウイルス性ベクターは精製が難しいことが知られています。細菌ストックを LB/カルベニシリンプレート上に画線培養して単一コロニーを分離し、GenElute HP Midiprep Kit (製品番号 NA0200 または GenElute HP Maxiprep Kit (製品番号 NA0300) で DNA を精製することを推奨します。
	プラスミド DNA の品質が良くない。	前述 GenElute HP plasmid purification kits を用いて DNA を精製してください。 弊社取扱いのプラスミド DNA 精製キット
	細胞接種密度が最適でなかった。	推奨細胞密度に従ってください。
	培地および試薬の保存が不適切。	培地および試薬はメーカーの指定する温度で保存してください。

シグマ アルドリッヂ ジャパン リサーチ事業部 〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

シグマ アルドリッヂ ジャパン合同会社はメルクのグループ会社です。

E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-6756-8245

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2020年8月時点の情報です。 ©2020 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Merck, the vibrant M, and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.

Lit. No. TSM005A-2308-?