

shRNA レンチウイルスの感染方法

必要な試薬

- Mission Lentiviral Transduction Particles
- Hexadimethrine bromide (製品番号 [H9268](#)) : 減菌水で 2 mg/ml に調製します。
- Puromycin dihydrochloride (製品番号 [P9620](#)) 10 mg/ml に調製済みの製品です。

プロトコール

Day 1

- 24 時間後に細胞密度が 50-80% になるように細胞を播種します。
細胞種により増殖速度が異なります。事前にご検討ください。
- 37°C、5-7% CO₂ 環境下で 18-20 時間培養します。

Day 2

- Mission Lentiviral Transduction Particles を氷上で溶解します。キャップを開ける前に優しくタッピングやスピンドウンを行います。
- Hexadimethrine bromide (最終濃度 8 μg/mL) を含む培地を細胞に静かに添加します。
※ Hexadimethrine bromide はウイルスの導入効率を上げるための試薬ですが、初代神経細胞などのいくつかの細胞では毒性を示すことがあります。その際は、Hexadimethrine bromide の使用を止めるか、代わりに Protamine sulfate (製品番号 [P3369](#), [P4020](#)) を使用してください。
- Mission Lentiviral Transduction Particles を細胞に静かに添加します。
至適 MOI^{注1)} が決定していない場合は、MOI=0.5~20 の間で条件を振ることを推奨します。
- 37°C、5-7% CO₂ 環境下で 18-20 時間培養します。
※ この間、毒性を示す場合は、感染後 4 時間で培地を交換してください。

Day 3

- 培地を除去し、あらかじめ温めておいた新しい培地を加えます。

Day 4 (一過性発現の場合)

- 細胞を回収し、qRT-PCR や western blot で遺伝子の発現を調べます。

Day 4~(安定発現の場合)

- puromycin^{注2)} を含む培地で培養し、puromycin 耐性細胞を選択します。
至適濃度の puromycin 含有培地で puromycin 耐性コロニーができるまで培養します。
培地は 3-4 日毎に交換してください。一般的に選択開始 10-12 日後にコロニーが形成されます。
- コロニーが解析に十分な大きさに形成されましたら、細胞を回収し、qRT-PCR や western blot で遺伝子の発現を調べます。

注1) MOIの計算方法

$$\text{レンチウイルス粒子の容量 (mL)} = \frac{(1 \text{ ウェル当たりの細胞数}) \times (\text{目的の MOI})}{(\text{CofA に記載されている VP/mL})}$$

注2) 各細胞に対するピューロマイシン濃度の使用例

- HeLa: 3 µg /mL
- HEK293: 3 µg /mL
- B16: 1-3 µg /mL
- PC1.0: 10 µg /mL
- A431: 1 µg /mL
- Jurkat: 4 µg /mL

使用する細胞により最適な抗生物質の濃度は異なります。初めて使用する細胞などで適切な抗生物質濃度がわからない場合は、本実験前にタイトレーションによる検討を行い、細胞ストレスを低減するためにできる限り低濃度で、かつ効率の高い抗生物質濃度を決定しておく必要があります。

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2022年6月時点の情報です。 ©2022 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.

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2022年6月時点の情報です。 ©2022 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.