

クリスタルバイオレット染色による レンチウイルス粒子の力価測定

以下のプロトコールは、6ウェルフォーマットのプレートにおいて、クリスタルバイオレット染色を使用してレンチウイルス粒子の力価測定を行い、1 mLあたりのトランスダクションユニット (TU/mL) の値を取得する例を示しています。レンチウイルス粒子をパッケージして回収したら、少量を -80°C で凍結する必要があります。1つのアリコートを上で解凍し、レンチウイルス粒子の力価を測定するために使用する必要があります。



レンチウイルス粒子は -80°C で保存する必要があります。繰り返しの凍結融解サイクルは避けるべきです。繰り返しの凍結融解サイクルは力価に悪影響を与えることが予想されます。解凍後、未使用のレンチウイルス粒子は氷上で保管し、必要に応じて少量に分け、すぐに -80°C に戻します。

必要な材料

- レンチウイルス粒子
- マルチウェル組織培養プレートまたは組織培養皿
- プラストサイジンS (英: Blasticidin S、Fisher Scientific、Cat#: BP2647-25; InvivoGen、Cat#: ant-bl-1) またはピューロマイシン (英: Puromycin、Fisher Scientific、Cat#: BP2956-100; InvivoGen、Cat#: ant-pr-1)
- クリスタルバイオレット (英: Crystal Violet、Fisher Scientific、Cat#: C581-25) または細胞生存率を評価するための同様のアッセイ
- 増殖培地: 使用する細胞の維持に推奨される、抗生物質を含まない細胞培養培地 (血清および/またはサプリメントを含む)
- 形質導入培地: レンチウイルス粒子の形質導入のための基本細胞培養培地 (必要に応じて、形質導入添加剤および血清を含む)。

1日目

1. 使用する細胞用の標準増殖培地を使用して、6ウェルプレートにウェルあたり適切な数の細胞を播種します。
2. 細胞を加湿 CO_2 インキュベーター内で 37°C にて一晩インキュベートします。

2日目

1. 形質導入培地 (必要に応じて血清および必要なサプリメントを添加) を調製し、培地を 37°C に平衡化します。
2. レンチウイルス粒子を氷上で解凍します。
3. 1.5 mLの形質導入培地中でレンチウイルス粒子の10倍連続希釈を実行し、 $10^{-2} \rightarrow 10^{-3} \rightarrow 10^{-4} \rightarrow 10^{-5} \rightarrow 10^{-6}$ の希釈液を得ます (初めに、100分の1希釈により 10^{-2} 希釈液を調製する)。
4. 細胞から増殖培地を取り除き、レンチウイルス粒子の希釈液を含む1.5 mLの形質導入培地を加えます。6番目のウェルに、レンチウイルス粒子を含まない1.5 mLの形質導入培地を加えます (非形質導入コントロール)。プレートを一晩インキュベーターに戻します。

3日目

1. ピューロマイシンまたはプラスチックジンなどの抗生物質を所定の濃度で含む培地に交換します。




力価測定のための形質導入の前に、抗生物質選択のための用量反応曲線 (kill curve) を作成することにより、3 ~ 10 日の間で非形質導入細胞を殺すために必要な抗生物質の最小濃度を決定します。

5~14日目

- 形質導入されていない細胞がすべて死滅し、形質導入されたコロニーが成長するまで、抗生物質を含む培地を 2 ~ 3 日ごとに交換します。

12～16日目

1. 培地を取り除き、細胞を PBS で穏やかに洗浄します。
2. 1 mL のクリスタルバイオレット溶液（10% EtOH 中の 1% クリスタルバイオレット）を加えます。
3. 室温で 10 分間インキュベートします。
4. PBS で 2～3 回優しく洗浄します。
5. カウントに妥当なウェル中のコロニーをカウントし（図 1 を参照）、力価を計算します: # コロニー/mL × 希釈 = TU/mL

 感染多重度 (MOI) が高すぎる（細胞あたりのウイルス粒子が多すぎる）か、未精製の上清中のレンチウイルス粒子を直接用いた場合は、細胞死が起こり、コロニーの形成されない可能性があります。この場合、さらに希釈して、力価計算のためにコロニーを数えます。

計算例

57 コロニー / 1.5 mL × 10⁵ = 3.8 × 10⁶ TU/mL

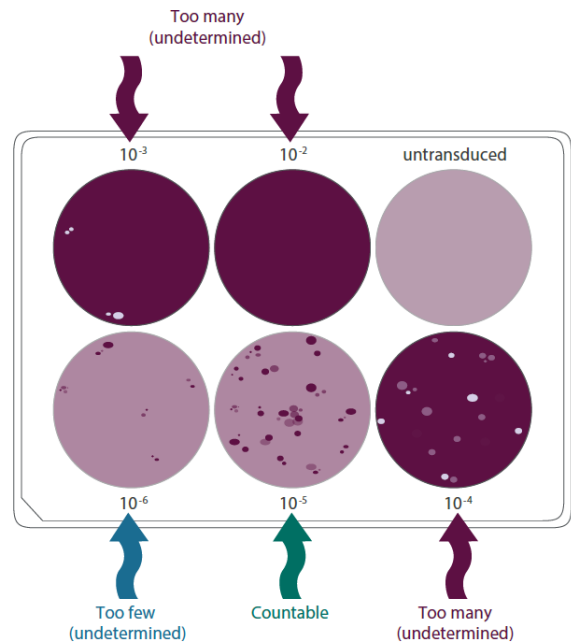


図 1. レンチウイルス粒子を滴定するためのクリスタルバイオレット染色された細胞コロニー
形質導入されていないウェル内のすべての細胞は死んでいます。10⁻²、10⁻³、および 10⁻⁴の希釈液で形質導入されたウェルでは、コロニーが多すぎて識別またはカウントできません。10⁻⁵希釈のウェルには、カウントするのに妥当な数のコロニーがありますが、10⁻⁶希釈ではコロニーが少なすぎます。

For more information

ホライゾン・ディスカバリー株式会社
horizondiscovery.com/contact-us

©2022 Horizon Discovery Group Ltd and its affiliated companies. All rights reserved.

PerkinElmer is a trademark of PerkinElmer, Inc., registered in the United States and other countries. Horizon Discovery is a trademark mark of Horizon Discovery Ltd. Dharmacon is a trademark of Dharmacon, Inc.. All PerkinElmer, Inc., Horizon Discovery Ltd and Dharmacon, Inc. trademarks are used with permission. Other product names and brand names may be trademarks or registered trademarks of their respective owners.

本文書は英語版プロトコルを元にした日本語版です。内容は英語版プロトコルの最新バージョンとは異なることがあります。

B050-2010-v2

horizon
a PerkinElmer company