

Dharmacon™ Trans-Lentiviral packaging kitの使用法

製品説明

Dharmacon™ Trans-Lentiviral™ packaging systemは、複製能のないレンチウイルス粒子を効率的に作製するための試薬です。作製したレンチウイルス粒子は、分裂中または非分裂中の哺乳動物細胞に、shRNAまたはORF（オープンリーディングフレーム）を発現するコンストラクトを導入するために使用されます（文献1）。Trans-Lentiviral Packaging Systemは、パッケージングコンポーネントが5つのプラスミドに分離されているため、市販のレンチウイルスベクターシステムの中でも、優れた安全性プロファイルを提供します。Trans-Lentiviral Packaging Systemの詳細な説明は文献2にあります。10回のパッケージング反応用のキット（Dharmacon HEK293Tウイルス産生用細胞付き、または無し）、および50反応と100反応のより大きなバルクサイズが利用可能です。

キットの詳細な説明、コンポーネントの保管および出荷条件については、Appendix A（7ページ）を参照してください。

Dharmacon Trans-Lentiviral packaging systemのコンポーネント

1. Trans-Lentiviral packaging mix

パッケージングミックスには、HEK293Tウイルス産生用細胞へのコトランスフェクション後のトランスファーベクターのウイルスパッケージングを容易にするために、5つのパッケージングプラスミドの最適化された混合物が含まれています（文献3、4）。これらのプラスミドは、レンチウイルス粒子を作製するために必要なトランスのヘルパー機能と構造タンパク質および酵素タンパク質を提供します。パッケージングプラスミドのコンポーネントの詳細については、Trans-Lentiviral packaging systemのバイオセーフティ機能というタイトルのセクションを参照してください。

2. Calcium Phosphate Transfection Reagent

塩化カルシウムは、DNAと複合体を形成し、リン酸緩衝液を添加して共沈すると、形質転換された接着細胞へのDNAの取り込みを促進します。このキットには、塩化カルシウムと2xHEPES緩衝生理食塩水（2x HBSS）が含まれており、最適なpHと安定性について厳密にテストされています。トランスファーおよびパッケージングベクターの高効率リン酸カルシウムトランスフェクションは、HEK293T細胞で特異的に得られます。

3. Dharmacon HEK293T Packaging Cell Line（細胞付き10反応キットとして提供、または個別購入も可能）

HEK293T細胞は、レンチウイルス粒子のパッケージングに理想的であり、Trans-Lentiviral packaging mixとDharmacon™のshRNA/ORFトランスファープラスミドをコトランスフェクションすると、高力価のレンチウイルス粒子を作製することができます。これらの細胞はSV40ラージT抗原（Simian Vacuolating Virus 40 TAG）を安定して発現し、SV40複製起点を含むベクターからタンパク質を高レベルで発現させることができます。

4. Control Vector（10反応キットにのみ含まれる）

Dharmacon™ GIPZ™ Non-silencing Control は、shRNA packaging kitで提供されます。このNon-silencing Controlは、TurboGFP™（Evrogen、モスクワ、ロシア）レポーター遺伝子と、既知の哺乳類遺伝子と相同性のないshRNA配列（Cold Spring Harbor miR-30 expression scaffold内にある）を発現します。ORF packaging kitでは、Precision LentiORF RFP Controlが提供されます。Precision LentiORF RFP Controlは、ヒトORF配列の代わりにTurboRFP（Evrogen、モスクワ、ロシア）レポーター遺伝子が発現します。

Cat #	10 Reaction Kit	10 Reaction Kit (with Dharmacon HEK293T cells)	50 Reaction Kit	100 Reaction Kit
Dharmacon Trans-Lentiviral shRNA Packaging Kit with Calcium Phosphate Transfection Reagent	TLP5912	TLP5917	TLP5913	TLP5914
Dharmacon Trans-Lentiviral ORF Packaging Kit with Calcium Phosphate Transfection Reagent	TLP5916	TLP5918	TLP5919	TLP5920

Dharmacon HEK293T 細胞は単体で購入可能です（Cat#: HCL4517）。

Dharmacon Trans-Lentiviral packaging systemのバイオセーフティ機能

Dharmacon Trans-Lentiviral packaging systemは、他の市販のレンチウイルスベクターシステムと比較して優れた安全性プロファイルを提供します。パッケージングコンポーネントは5つのプラスミドに分離されています (Figure1)。さらに、gag-proおよびtat-revの発現は、条件付きテトラサイクリン応答性プロモーターエレメント (TRE) の制御下にあり、これらのウイルス成分の発現は、テトラサイクリントランス活性化因子を発現する細胞に厳密に制限されます。トランスレンチウイルスパッケージングシステムの詳細な説明は文献2にあります。

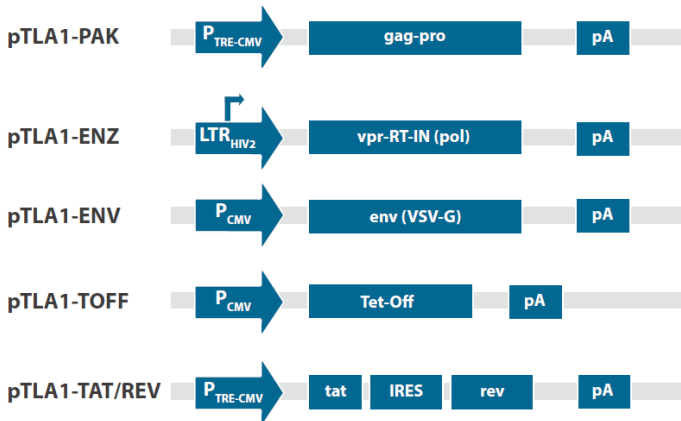


Figure1 Dharmacon Trans-Lentiviral packaging systemに含まれるプラスミドベクター

Dharmacon Trans-Lentiviral packaging systemに含まれる5つのプラスミドベクターは以下の通り：

1. pTLA1-PAK

gag-proパッケージングコンストラクトには、HIV-1分子クローンSG3 (座標258~8384) のDNAフラグメントが含まれています。これは、パッケージングシグナル (Ψ) の39塩基の欠失と、env遺伝子の1,357塩基の欠失 (座標5,827から7,184) により改変されています。RTおよびIN遺伝子のpolオープンリーディングフレーム (ORF) は、それぞれの最初のコドンを終止コドン (TAA) に置き換えることによって削除されました。Sall制限酵素切断部位での平滑末端ライゲーションによってフレームシフト変異がVprをコードする配列に導入されました。これらの変更により、RT、IN、およびアクセサリタンパク質であるVpr、Vif、Vpu、およびNefの発現が削除されます。Gag-Proの発現はTREプロモーターによって制御されています。

2. pTLA1-ENZ

RTおよびINタンパク質は、アクセサリタンパク質Vprとのインフレーム融合によってウイルス粒子にパッケージ化されます。Vpr-RT-IN融合ポリタンパク質の発現は、Tatタンパク質によってトランス活性化されるHIV-2 LTRの制御下にあります。

3. pTLA1-ENV

VSV-G発現ベクターには、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) の前初期プロモーターの制御化でVSV-gを発現するコンストラクトが含まれています。さらに、SV40ポリアダニル化シグナルがVSV-gの下流にクローン化されています。

4. pTLA1-TOFF

Clontech™ Tet-Off™発現ベクターには、hCMV前初期プロモーターの制御下にあるテトラサイクリン制御トランス活性化因子 (tTA) が含まれています。Tet-Offは、Gag-Pro発現 (pTLA1-PAK) およびTAT / REV発現 (pTLA1-TAT / REV) の転写活性化に必要です。

5. pTLA1-TAT / REV

HIV-1アクセサリタンパク質TatおよびRevは、内部リボソーム進入部位 (IRES) を含むバイシストロン性ベクターから発現します。その発現はTREプロモーターの制御下にあります。Tatの発現は、GIPZ shRNAやPrecision LentiORF、pTLA1-ENZウイルスベクター等に見られる5'LTRのトランス活性化に必要です。Revは、gag-proおよびvpr-RT-IN (pol) 遺伝子、および完全長のウイルスゲノムをコードするmRNA転写物の核外輸送および翻訳に必要です。

一般的な封じ込めに関する考慮事項

Dharmacon Trans-Lentiviral packaging systemを使用してレンチウイルス粒子を作製する場合、研究者は、適切な実験室の安全ガイドラインの下で安全に利用して、さまざまな哺乳類細胞で遺伝子発現を抑制または促進できるウイルス粒子を作製していることとなります。レンチウイルスベクターの使用に関連する主なリスクは、

- (1) 複製能力のあるレンチウイルス粒子を産生する可能性、および
- (2) 主要な調節遺伝子の挿入活性化/不活性化による発癌の可能性です。例えば、癌遺伝子の活性化または腫瘍抑制因子の不活性化です。

これらのリスクを軽減するには、レンチウイルスベクター粒子を取り扱う際にBSL-2または強化されたBSL-2封じ込めのいずれかが必要です。レンチウイルスベクターの封じ込めに関するガイダンスについては、組換えDNA諮問委員会 (RAC) のガイドラインを参照してください。

米国では、米国保健福祉省、米国疾病予防管理センター、および米国国立衛生研究所のBiosafety in Microbiological and Biomedical Laboratoriesをダウンロードしてください。

<https://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmb15/>

こちらも参照：組換えDNA分子を含む研究のためのNIHガイドライン (NIHガイドライン) もご参考ください。

<https://osp.od.nih.gov/biotechnology/nih-guidelines/>

References

1. Naldini, L. et al., In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Science* 272, 263-267 (1996).
2. Wu, X. et al., Development of a Novel Trans-Lentiviral Vector That Affords Predictable Safety. *Molecular Therapy* 2, 47-55 (2000).
3. Kappes J.C., Wu X, Safety considerations in vector development. *Somat Cell Mol Genet* 26, 147-58 (2001).
4. Kappes J.C. et al, Production of trans-lentiviral vector with predictable safety. *Methods Mol Med* 76, 449-65 (2003).

プロトコール

HEK293T細胞でのレンチウイルス粒子の作製

以下は、Trans-Lentiviral Packaging Kitを使用してレンチウイルス粒子を作製するためのプロトコールです。レンチウイルス粒子の作製は、リン酸カルシウム試薬を使用して、Dharmacon Trans-Lentiviral packaging mixを、shRNAまたはORFトランスファーベクターとともにHEK293Tパッケージング細胞にコトランスフェクションすることから始まります。コトランスフェクションすると、複製能力のないビリオンが培地に放出されるため、それらを収集し使用します。以下に示す例は、6ウェルまたは100 mmの細胞培養プレートにおいて、平均力価（約 10^6 TU/mL）のレンチウイルス粒子の作製に最適化されており、超遠心分離による濃縮により高力価（約 10^8 TU/mL）レンチウイルス粒子となります。

トランスファーベクターとパッケージングプラスミドDNAのコトランスフェクションを成功させるためのいくつかの一般的なガイドラインは次のとおりです。

- 定期的な継代され、活発に分裂している指数関数的に増殖する細胞を使用することが重要です。トランスフェクションの前日に細胞をプレATINGすると、最高のトランスフェクション効率を得られます。細胞が継代から回復するのに十分な時間を与える必要があります（通常 12時間以上）。トランスフェクションの前に、細胞培養ディッシュで細胞を約70%のコンフルエンスまで増殖させ、1:2の比率で少なくとも2日間連続継代することにより、Dharmacon HEK293T細胞が迅速な複製状態にあることを確認します。この方法で細胞を準備することは、再現性良く最大のレンチウイルス粒子収量を確保するのに役立ちます。
- 低純度のプラスミドDNAは、夾雑物の抑制効果によりトランスフェクションが不十分になる場合があります。プラスミドDNAを注意深く調製および精製することにより、細胞毒性の影響を回避します。260 nm / 280nmの吸光度比を元にDNAの品質を評価します。一般に、1.8~2.0の比率が許容できると見なされま

細胞のプレATING

レンチウイルス粒子にパッケージする各トランスファーベクターについて、6ウェルプレートの少なくとも1つのウェルまたは100 mm細胞培養プレートに細胞を準備します。

- HEK293T細胞をトリプシン処理後、細胞を数えます。
- 通常の増殖培地（DMEM高グルコース、ピルビン酸ナトリウム、10%FBS、1%Pen / Strep）で細胞を希釈し、選択した細胞培養プレートに最適な細胞密度にします（トランスフェクションの時点で最適な細胞コンフルエンスは85-95%でなければなりません）。
 - 6ウェルプレートの各ウェルについて、2 mL中で 1.2×10^6 個の細胞を準備します。
 - 100 mmの細胞培養プレートごとに、14 mL中で 5.5×10^6 個の細胞を準備します。
- 37°C、二酸化炭素5%にて細胞をオーバーナイト培養します。

トランスフェクション

CaCl₂と2x HBSSを37°Cのウォーターバス中で短時間にて解凍します。解凍後、両方の試薬を4°Cで数週間保存しても、機能が失われることはありません。トランスフェクションを進める前に、試薬を常温に戻す必要があります。

- 6ウェルプレートの各ウェルまたは100 mm細胞培養プレートについて、5 mL（Fisher Scientific Cat # 14-959-1A）または50 mL（Fisher Scientific Cat # 14-432-22）のポリスチレンチューブ中で、表に示した量のトランスファーベクターDNAおよびTrans-Lentiviral Packaging Mixを調製します。滅菌水を使用して、DNA混合物を指定の総液量にします。

	Lentiviral transfer vector DNA (shRNA or ORF)	Trans-Lentiviral packaging mix	Total volume (with sterile water)
One well of a 6-well plate	6 µg	4.3 µL	135 µL
100 mm plate	42 µg	30 µL	945 µL

- 上記の希釈したDNA溶液に、表に示した量のCaCl₂を加えます。

	CaCl ₂
One well of a 6-well plate	15 µL
100 mm plate	105 µL

- こぼすことなく試薬を完全に混合するのに十分な速度でチューブをボルテックスします。ボルテックスしながら、表に示した量の2x HBSSを滴下（drop-wise）します。

	2x HBSS
One well of a 6-well plate	150 µL
100 mm plate	1050 µL

- 室温で3分間インキュベートします。このインキュベーション中に、軽いチョークのような白色沈殿物が現れるはずですが（沈殿物は必ずしも明白ではない場合があります）。
- トランスフェクションミックスの総量（300 µLまたは2.1 mL）を細胞に滴下（drop-wise）します。注：ピペッティングロスのために実際の量がわずかに少なくなる場合がありますが、これはトランスフェクション効率に悪影響を与えることはありません。
- 37°C、二酸化炭素5%にて細胞を10~16時間培養します（この時間を延長しないでください）。
- 16時間以上の培養後、レンチウイルストランスファーベクターがEvrogen TurboGFPなどの蛍光レポーターを有する場合は、それらの蛍光レポータータンパク質を細胞が発現しているか顕微鏡を用いて調べ、トランスフェクション効率の指標とします。注：培地の色はオレンジまたはオレンジ/黄色の場合があります。これはウイルスの産生には影響しません。
- Reduced Serum Mediumを調製します。
 - High Glucose DMEM (Fisher Scientific Cat #SH30243.LS)
 - 5% Fetal Bovine Serum (Fisher Scientific Cat #SH30070.03)
 - 2 mM L-glutamine (Fisher Scientific Cat #SH30034.01)
 - 1x Penicillin/Streptomycin (Fisher Scientific Cat #SV30010)
- リン酸カルシウム含有培地を細胞から除去し、表に示した量のReduced Serum Mediumと交換します。

	Reduced Serum Medium
One well of a 6-well plate	2 µL
100 mm plate	14 µL

- 37°C、二酸化炭素5%にて細胞をさらに48時間培養します。

ウイルス粒子の回収と濃縮

- 培地交換の48時間後に、培地を15 mLの滅菌済みのキャップ付きコニカルチューブに移して、ウイルス粒子を含む上清を回収します。

注意：この段階では、感染性のウイルス粒子（複製能を持たない）を扱っていることを忘れないでください。BSL-2生物を扱うための推奨ガイドラインに従ってください。
- 1,600×g、4°Cで10分間遠心分離して、付着していない細胞や細胞の破片をペレット化します。

- 6ウェルまたは100 mmプレートのいずれかで作製された平均的な力価の未濃縮ウイルス粒子の場合、上清をゆっくりと除去し、新しいチューブに移します。ピペティングにより混合し、必要に応じてレンチウイルス粒子を分注します。力価測定のために1つの小さなアリコート（～20μL）を準備します。レンチウイルス粒子は常に-80°Cで保管してください。
- 濃縮された高力価ウイルス粒子を作製するには、低速での遠心分離により残りの細胞破片を除去した後、上清を滅菌済み0.22～0.45 μmタンパク質低結合フィルター（Millipore Millex-HV 0.45 μm PVDFフィルター等）を用いてろ過することをお勧めします。スイングバケット超遠心ローターでの超遠心分離により濃縮します。ろ過した上清を滅菌超遠心チューブに移します。血清を含まないDMEMを使用して、ローターバケットの必要な最小容量まで容量を調整します。SW28ローターの場合、23,000 rpmで1.5～2時間、4°Cで遠心分離します。
- 遠心分離後、上清を注意深く吸引し捨てます。
- チューブの底にあるペレットに、必要量のDMEM（血清なし）をピペットで加えます。
- 目に見えるペレットは、トランスフェクトされた細胞の培地からの血清タンパク質で主に構成されています。ウイルス粒子は、このタンパク質ペレットから取り外す必要があります。DMEMをペレットに加えた後、4°Cで5～10分間インキュベートします。次に、泡の形成を避けつつ、約30回ゆっくりと上下にピペティングします。
- 再懸濁したペレットを滅菌マイクロフュージチューブに移し、フルスピードで3～4分間遠心分離します。この遠心分離により、チューブの底に付着した血清タンパク質がペレット化されます。遠心分離後、上清を新しいマイクロフュージチューブに移し、必要に応じて分注します。力価測定のために1つの小さなアリコート（～20 μL）を準備します。レンチウイルス粒子は常に-80°Cで保管してください。

レンチウイルス粒子ストックの力価測定

ウイルス産生用細胞株（HEK293Tなど）だけでなく、実際の実験で使用する細胞株でもレンチウイルス粒子ストックの力価を決定することが重要です。このプロトコールは、Evrogen TurboGFPや TurboRFPなどのレポーター遺伝子を発現するレンチウイルスベクターの力価を決定する際に使用できます。Dharmacon™ TRIPZ™ shRNA製品のように、レポーターがTet誘導性プロモーターシステムの制御下にある場合は、細胞培養液にドキシサイクリンを必ず含めてください。

- 形質導入の前日、24ウェル組織培養プレートにHEK293T細胞をウェルあたり 5×10^4 の密度でDMEM（10%FBS、1%Pen / Strep）中にて播種します。翌日、ウェルは40～50%のコンフルエントになります。細胞プレートング密度は、他の細胞株については経験的に決定する必要があります。
- 無血清培地を使用して、丸底96ウェルプレートでウイルスストックを希釈します。テストするウイルス粒子ストックごとに1行を使用して、Figure 2に示すようにプレートを利用します。ウイルスストックの希釈は、以下の手順（ステップ4から開始）で行います。目標は、一連の5倍希釈液を作製して、390,625倍の最終希釈に到達することです。
- 各ウェルに80 μLの無血清培地を加えます。
- 20 μLの解凍したウイルス粒子ストックを1列目の対応する各ウェルに加えます（5倍希釈）。ウェルの内容物を10～15回ピペットで上下させます。ピペットチップを廃棄します。
- 新しいピペットを使用して、1列目の各ウェルから2列目の対応するウェルに20 μLを移します。ウェルの内容物を上下に10～15回ピペティングにすることで混合後、ピペットチップを廃棄します。
- 新しいピペットチップを使用して、2列目の各ウェルから3列目の対応するウェルに20 μLを移します。ウェルの内容物を10～15回ピペティングにすることで混合後、ピペットチップを廃棄します。

- 3列目から8列目まで20 μLの溶液の移動を繰り返し、10～15回上下にピペティングし、各希釈間でピペットチップを交換します。高品質のマルチチャンネルピペッターを使用することを強くお勧めします。ウイルス粒子ストックの希釈液を室温で5分間ブレインキュベートします。
- Figure 3に示すように、テストするウイルス粒子ストックごとに1行を使用して、24ウェルプレートにラベルを付けます。
- 24ウェルプレートの細胞から培地を取り除きます。
- 225 μLの無血清培地を各ウェルに加えます。
- 細胞を含む24ウェルデスティネーションプレート（Figure 3）の各ウェルに、96ウェルプレート（Figure 2）から25 μLの希釈ウイルス粒子を加えて細胞を形質導入します。たとえば、96ウェルプレートのウェルA2から24ウェルプレートのウェルA1に25 μLを移します（Table 1）。
- 形質導入した培養物を37°Cで4時間培養します。
- 形質導入ミックスを培養液から取り除き、1 mLのDMEM（10%FBS、1%Pen / Strep）を静かに加えます。TRIPZなどのTet誘導性レンチウイルストランスファーベクターの場合、培地に1 μg / mLのドキシサイクリンを加えます。
- 細胞を72時間培養します。
- TurboGFPまたはTurboRFPを発現している細胞のコロニーを数えるために、適切な数の蛍光細胞を含むデスティネーションプレートのウェルを選択します。細胞は48時間の培養期間にわたって分裂するため、各マルチセルコロニーを1つの形質導入細胞として数えます。Figure 4はこの原理を示しています。
- 1 mLあたりのトランスダクションユニット（TU / mL）は、次の式を使用して決定できます。カウントされたEvrogen TurboGFPまたはTurboRFP陽性コロニーの数 × 希釈係数 × 40 = #TU / mL。
 - 例: 55個のEvrogen TurboGFP陽性コロニーをウェルA3でカウント
 - 55 (Evrogen TurboGFP陽性コロニー) × 625 (希釈係数) × 40 = 1.38×10^6 TU / mL

力価の単位は1 mLあたりのトランスダクションユニット（TU）で示されるため、40という数字は、力価測定に使用した25 μL（「使用される希釈ウイルスの量」、Table 1）を1ミリリットルに変換するために使用されます。

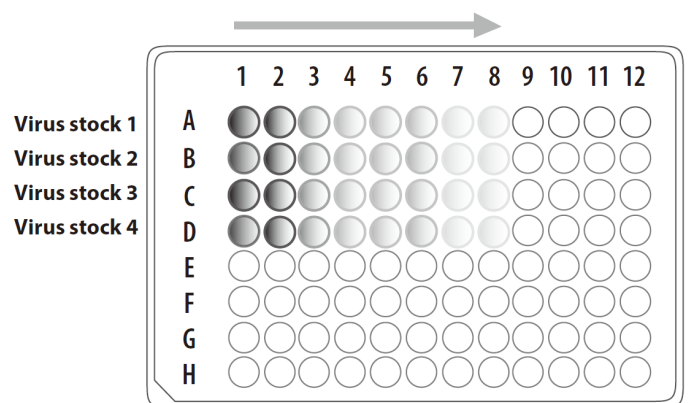


Figure 2. ウイルスストックの5段階希釈

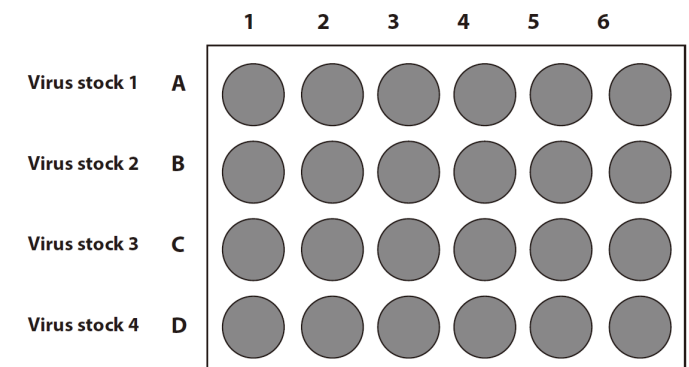


Figure 3. ウイルスの力価を測定するために使用されるDharmacon HEK293T細胞を播種した24ウェル組織培養プレート

Table 1. ウイルス粒子の希釈系列の作成

Well		Volume of diluted viral particles used	Dilution factor
Originating (96-well plate)	Destination (24-well plate)		
A1		25 µL	5*
A2	A1	25 µL	25
A3	A2	25 µL	125
A4	A3	25 µL	625
A5	A4	25 µL	3125
A6	A5	25 µL	15625
A7	A6	25 µL	78125
A8		25 µL	390625*

*非常に低い力価または非常に高い力価を期待する場合は、それぞれウェル1またはウェル8のいずれかを含めることをお勧めします。

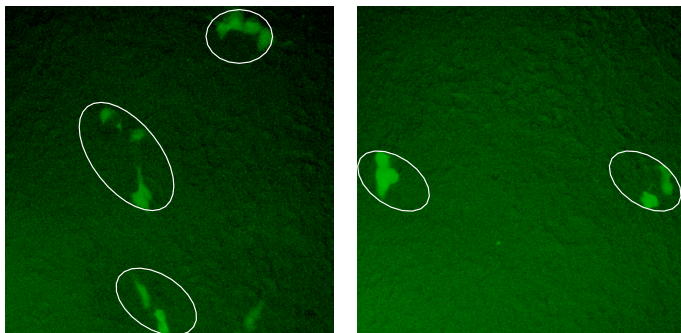


Figure 4. コロニーカウントによるウイルス力価の決定

HEK293T細胞に、段階希釈したGIPZレンチウイルス粒子を形質導入しました。形質導入の72時間後に細胞を蛍光顕微鏡で観察しました。各円は個々のコロニーを表します。

よくある質問

リン酸カルシウム試薬を使用してトランスファーベクターとDharmacon Trans-Lentiviral packaging mixをコトランスフェクトすると、トランスフェクション後にすべてのHEK293T細胞が死滅しました。何が起ったのでしょうか？

細胞死は、トランスフェクションの36~48時間後に一般的に観察されることがあります。ウイルスの回収時近くで細胞が死ぬのは、実際にはレンチウイルス粒子が活発に生産されていることの肯定的な兆候です。Trans-Lentiviral packaging mixコンポーネントの高発現が原因である可能性があります。逆に、トランスフェクション後24時間以内に高度の細胞死が観察されるべきではありません。これは多くの場合、トランスフェクション中の取り扱いエラーが原因です。トランスフェクション試薬の添加および培地の交換中に細胞が除去される可能性があります。試薬は必ずゆっくりと穏やかに細胞に加えてください。トランスフェクション前のコンフルエンスが85~95%であることを確認し、細胞培養フードからインキュベーターに輸送する際はプレートを慎重に取り扱ってください。

トランスフェクション後にHEK293T細胞の形態が変化するのなぜですか？

VSV-g糖タンパク質の発現により、HEK293T細胞が融合し、多核融合細胞が出現します。この形態学的変化は正常であり、レンチウイルス粒子の産生には影響しません。

リン酸カルシウム-DNA複合体を形成するために各試薬を追加する順序に違いはありますか？

示された順序で試薬を追加することにより、トランスフェクションプロトコルを最適化しました。試薬の添加順序を変更してもトランスフェクションは成功する可能性があります。プロトコルに示されている順序でトランスフェクション反応を組み立てることをお勧めします。

HBSSを追加しながらサンプルをボルテックスすることは本当に必要ですか？

いいえ、DNA反応ミックスをボルテックスすることは必須ではありませんが、可能な限り最高のトランスフェクション効率を達成するのに役立つはずで

リン酸カルシウム-DNA複合体は室温でどのくらいの時間インキュベートできますか？

リン酸カルシウムによるDNAの沈殿は、時間と温度に依存します [M. Jordan, A. Schallhorn, Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. Nucleic Acids Res. 24, 596-601 (1996)]. 私たちの経験では、最適なトランスフェクション効率は、HBSSの添加後約3分で得られます。

リン酸カルシウムを使用したHEK293T細胞へのDNAのトランスフェクションにはどの程度の効率が期待できますか？

通常、90~95%のトランスフェクション効率が得られます。

回収した上清において、どの程度のウイルス力価を期待することができますか？

達成可能なウイルス力価は、トランスファーベクター間で異なります。GIPZ shRNAコンストラクトをパッケージ化する場合、通常、106 TU / mL以上の力価が得られます。レンチウイルス粒子を濃縮するためにここで説明したプロトコルに従うと、通常、108 TU / mLの範囲の力価を得ることができます。多くの場合、トランスフェクトされたプレートの数を増やしたり、再懸濁量を減らしたりすることで、109 TU / mL以上の力価を達成できます。

ウイルス粒子の濃縮に備えてウイルス上清をろ過するために、どのミリポアフィルターを使用しますか？

ろ過する容量に応じて、さまざまなフィルターを使用します。

- ≤ 50 mL: Millipore Cat #SCGP00525, Steriflip™-GP Filter Unit, 0.22 µM PES membrane Or, Millipore Cat #SE1M003M00, Steriflip-HV Filter Unit, 0.45 µM PVDF membrane
- ≤ 150 mL: Millipore Cat #SCGPU01RE, Stericup-GP Filter Unit, 0.22 µM PES membrane
- ≤ 500 mL: Millipore Cat #SCGPU05RE, Stericup-GP Filter Unit, 0.22 µM PES membrane
- ≤ 1000 mL: Millipore Cat #SCGPU10RE, Stericup-GP Filter Unit, 0.22 µM PES membrane

ウイルスを濃縮するためのプロトコルに記載されているのと同じ種類のローターがありません。私のローターが機能することをどのように知ることができますか？

SW28ローターシステムの使用は必要ありません。他のローターサイズも使用できます。別のローターを使用する場合は、ローターのG力と実行時間を相互参照します。さらに、次のジャーナル記事は、レンチウイルスを濃縮するためのSW32Tiローター (19,500 rpmで2時間) の使用について言及しています: [F. Di Nunzio, B. Piovani, Transduction of human hematopoietic stem cells by lentiviral vectors pseudotyped with the RD114-TR chimeric envelope glycoprotein. Hum. Gene Ther., 18, 811-820 (2007)]. 以下のURLのウェブサイトからrpmからrcfへの変換ができます:

http://insilico.ehu.es/mini_tools/rcf_rpm.php

Use of Product and Label Licenses

The Products, use and applications, are covered by pending and issued patents. The following Label Licenses govern all use of the Products. It is each Purchaser's responsibility to determine if patent or other intellectual property rights held by third parties may restrict the use of Products for a particular application.

The Broad Institute Inc. and Massachusetts Institute of Technology

Limited License to Use. The purchase of this product from Dharmacon or its Affiliates conveys to the final purchaser ("Limited Licensee") a non-transferable right to use the CRISPR Products solely for research conducted by Limited Licensee in accordance with all of the following requirements: (i) The Limited Licensee shall not sell or otherwise transfer products (including without limitation any material that contains a CRISPR Product in whole or part) to any other person or entity, or use CRISPR Products to perform services for the benefit of any other person or entity, provided however, that a Limited Licensee that is an academic, nonprofit, or government entity or person may perform core facility services for its academic and teaching purposes; (ii) the Limited Licensee shall use only the amount of the CRISPR Products purchased from Dharmacon, and components of such CRISPR Products, and shall use any materials made using the CRISPR Products by such Limited Licensee, only for its internal research as a research tool for research purposes, and not for any commercial purposes, (iii) the Limited Licensee shall use CRISPR Products in compliance with all applicable laws and regulations, including without limitation applicable human health and animal welfare laws and regulations, (iv) Broad, MIT and Harvard shall provide no warranties of any kind to the Limited Licensee (statutory or implied concerning certain patent rights owned by Broad, MIT and Harvard or the CRISPR Products), including without limitation, as to product quality, condition, description, merchantability, fitness for a particular purpose, noninfringement of intellectual property rights or the absence of latent or other defects, and all such warranties are hereby expressly disclaimed, (v) Broad, MIT and Harvard shall also expressly disclaim any warranty regarding results obtained through the use of the CRISPR Products, including without limitation any claim of inaccurate, invalid or incomplete results, (vi) Broad, MIT and Harvard, and their directors, trustees, officers, employees, agents, faculty, affiliated investigators, and students, shall have no liability to the Limited Licensee, including, without limitation, for any loss of use or profits, business interruption or any consequential, incidental, special or other indirect damages of any kind, regardless of how caused and regardless of whether an action in contract, tort, strict product liability or otherwise, (vii) the Limited Licensee shall indemnify, defend and hold harmless MIT, Harvard and Broad against any liability, damage, loss, or expense (including without limitation reasonable attorneys' fees and expenses) incurred by or imposed upon MIT, Harvard and Broad in connection with any claims, suits, investigations, actions, demands or judgments arising out of or related to the exercise of any rights granted to the Limited Licensee under the Limited License or any breach of the Limited License by such Limited Licensee; provided, however, that the foregoing shall not apply to a Limited Licensee that is an academic, non-profit, or government entity or person, and such Limited Licensee instead agrees that it, and not MIT, Harvard and Broad, shall be responsible for any liability, damage, loss or expense arising out of or related to the exercise of any rights granted to the Limited Licensee under the Limited License or any breach of the Limited License by the Limited Licensee, and (viii) the CRISPR Product and its use may be the subject of one or more issued patents and/or pending patent applications owned by Broad, MIT and Harvard and the purchase of the CRISPR Product does not convey a license under any claims in the foregoing patents or patent applications directed to the CRISPR Product or use, production or commercialization thereof.

Salk Institute Restricted Use Label License

THE SALK INSTITUTE
PURCHASER NOTIFICATION

- The Nature of the LICENSEE License: Licensee has a license to sell the Product containing WPRE, under the terms described below. Any use of WPRE outside of Licensee's Product or the Product's intended use, requires a license as detailed below. Before using the Product containing WPRE, please read the following license agreement. If you do not agree to be bound by its terms, contact Licensee within 10 days for authorization to return the unused Product containing WPRE and to receive a full credit.
- Patents: The WPRE technology is covered by patents issued to The Salk Institute for Biological Studies.
- Individual License: The WPRE technology is covered by patents issued to The Salk Institute for Biological Studies.
- Agreement: Licensee grants you a non-exclusive license to use the enclosed Product containing WPRE in its entirety for its intended use. The Product containing WPRE is being transferred to you in furtherance of, and reliance on, such license. Any use of WPRE outside of Licensee's Product or the Product's intended use, requires a license from the Salk Institute for Biological Studies.
- Termination of License: This license agreement is effective until terminated. You may terminate it at any time by destroying all Products containing WPRE in your control. It will also terminate automatically if you fail to

comply with the terms and conditions of the license agreement. You shall, upon termination of the license agreement, destroy all Products containing WPRE in your control, and so notify Licensee in writing. This License shall be governed in its interpretation and enforcement by the laws of the State of California.

- Contact for WPRE Licensing: The Salk Institute for Biological Studies, 10010 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037
Attn.: Office of Technology Management
Phone: (858) 453-4100 extension 1703
Fax: (858) 546-8093

Sigma-Aldrich Restricted Use Label License

These Products are For Research Use Only - Not for any Clinical, Therapeutic or Diagnostic use in Humans. These Products may be subject to the following patents (issued or pending):

Oxford technology

PCT Application (filing date)	Priority Application(s) (filing date)	National Application	Issued Patents
	US 07/586,603 (21 Sept 1990)	US 08/361,839	5,817,491
PCT/US91/05699 (9 Aug 1991)	US 07/658,632 (19 Feb 1991)	EP 91915104.3 JP 3-514518 AU 84302/91 CA 2,104,396	0572401 3547129 663470 2,104,396
	US 07/1 70,515 (21 March 1988) US 07/1 70,515 (21 March 1988)	US Continuation 08/156,789 US Continuation 08/462,492 US Continuation 10/205,179	5,591,624 5,716,832
PCT/US91/06852 (20 Aug 1991) WO 92/05266	US 07/586,603 (21 Sept 1990)	AU 88424/91 AU Divisional 47984/96	665176 690427
PCT/GB97/02857 (17 Oct 1997) WO 98/1 7815	GB 9621680.9 (17 Oct 1996) GB 962445739 (25 Nov 1996)	EP 97909436.4 EP Divisional 00202432.1 US 09/224.014 US Divisional 09/91 5,169 US CIP 10/661,761 US Continuation 11/646,041 JP 10-519086 AU 47122/97 CN97198767.X NZ 334860	0904392 6,312,682 6,669,936 7,198,784 725143 2L97198767.X 334860
PCT/GB97/02858 (17 Oct 1997) WO 98/17816	GB 9621680.9 (17 Oct 1996)	GB 9903117.1 EP 97909437.2 US 09/284,011 JP 10-519087 AU 47123/97 CN 97198883.8 NZ 334522	2331522 6,235,522 737801 ZL971 98883.8 334522
PCT/GB97/02696 (28 Oct 1997) WO 98/1 8934	GB 9622500.8 (29 Oct 1996)	US CIP 10/324,616 US Continuation 11/155,043 US Continuation 11/726,679 JP 10-520197	6,924,123 7,056,699

Benitec technology licensed patents

Name Inventor	Title	Patent No.	Application No.
Graham/Rice	Control of Gene Express	ZA 2000/4507* AU2001100608* SG75542* US 6,573,099* GB2353282* AU 743316* NZ 506648* US 10/346853* PCT/AU/99/00195* BR P19908967-0* CA 2323726* CB 99804255-2* CZ PB2000-3346* EP 99910039.9* US10/646,070 US 10/759,841* EP 04015041.9* AU2005211538	HK 01105904.3* HU P0101225* IN 2000/00 169/DEL* JP P2000-537990 KR 7010419/2000* MX008631* PL P.343064* SK PV 1372-2000* AU 35647/02* NZ 525941* SG200205122-5* US 09/646807* PP2492/98* AUPP2499/98* US 10/821,710* US 10/821,726* AU 2005209648
Graham/Rice/M/R	Genetic Silencing	WO 01/70949 GB 237722 AU PQ6363	SG 91678 ZA2002/7428 AU2001240
Graham, et al.	Double-Stranded Nucleic Acid	AU 2003906281 AU 2003906281 US 10/861,191	AU 2004902279 PCT/AU04/000759

*Indicates a "Co-Owned Patents" are jointly owned by Benitec and CSIRO.

Appendix A

Dharmacon Trans-Lentiviral ORF Packaging Kit with Calcium Phosphate Transfection Reagent

Kit contents	TLP5916 (10 rxn)	TLP5918 (10 rxn + cells)	TLP5919 (50 rxn)	TLP5920 (100 rxn)	Shipping condition	Storage
Dharmacon Trans- Lentiviral Packaging Mix	285 µg	285 µg	285 µg x 5	285 µg x 10	Wet ice	-20 °C
Dharmacon HEK293T Packaging Cell Line	not included	1.0 mL	not included	not included	Dry ice	Liquid N ₂
CaCl ₂ Reagent	1.2 mL	1.2 mL	6 mL	6 mL x 2	Wet ice	-20 °C
2x HBSS Reagent	12 mL	12 mL	60 mL	60 mL x 2	Wet ice	-20 °C
Dharmacon Precision LentiORF RFP Control DNA	45 µg (0.45 µg/µL)	45 µg (0.45 µg/µL)	not included	not included	Wet ice	-20 °C

Dharmacon Trans-Lentiviral shRNA Packaging Kit with Calcium Phosphate Transfection Reagent

Kit contents	TLP5912 (10 rxn)	TLP5917 (10 rxn + cells)	TLP5913 (50 rxn)	TLP5914 (100 rxn)	Shipping condition	Storage
Dharmacon Trans- Lentiviral Packaging Mix	285 µg	285 µg	285 µg x 5	285 µg x 10	Wet ice	-20 °C
Dharmacon HEK293T Packaging Cell Line	not included	1.0 mL	not included	not included	Dry ice	Liquid N ₂
CaCl ₂ Reagent	1.2 mL	1.2 mL	6 mL	6 mL x 2	Wet ice	-20 °C
2x HBSS Reagent	12 mL	12 mL	60 mL	60 mL x 2	Wet ice	-20 °C
Dharmacon GIPZ Non-Silencing Control DNA	45 µg (0.45 µg/µL)	45 µg (0.45 µg/µL)	not included	not included	Wet ice	-20 °C

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 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。

B048-2106-v2

horizon
a PerkinElmer company