

SRV™ Vector は、他の試薬を必要とせず、細胞に添加するだけで感染が成立します。

細胞や培養条件にもよりますが、ベクター添加後 24 時間から 48 時間で、蛍光顕微鏡下で EGFP が観察されます。

A. ベクターの感染

【必要なもの】

細胞： 感染対象の各細胞

試薬： SRV™ control Vector

ベクター、ベクターを含んだ培地、それが付着したチップやチューブ、プレートは全て UV 照射した後、オートクレーブをかけて処理すること。

対象細胞の各培地

PBS(-)

器具： 培養プレート

12-well plate 他

1.5mLチューブ (スクリュウキャップ)

ピペッター、ピペットマン、ピペット、チップ

セルカウンター

【手順】

接着細胞

Day -1

1. 翌日 70-80%の密度になる様にプレートに播種する。

Day 0

2. 1.で播種した細胞数に対し、MOI=1 - 3 となるように SRV™ control Vector のタイターからベクター量を計算する。
例) 1×10^5 cells x MOI=3 \rightarrow 3×10^5 CIU 分を計算
ベクターのタイターが 3×10^7 CIU/mL の場合、10 μ L となる。
3. 2.で計算したベクター量と合わせて 500 μ L になるように培地量を計算する。
4. ベクターを室温の水で素早く解凍後、スピンドウンし使用するまで氷上におく。
5. 1.で準備した細胞の培地を除去し、2.3.で算出した通りベクター及び培地を添加する。
6. 室温(安全キャビネット内が望ましい)で 2 時間インキュベートした後、37°C, 5%CO₂で一晩培養する。

Day 1

7. ベクター液を除去し、1mLのPBS(-)で3回洗浄後、新しい培地を添加する。
8. 37°C, 5%CO₂インキュベータで培養する。

以後、蛍光顕微鏡下で細胞を観察し、EGFPを指標にベクターの感染を確認する。

補足

感染しにくい細胞については、MOIを上げたり、感染温度を変えて検討してください。

- ・ MOIが高すぎるとダメージを受ける細胞もありますのでご注意ください。
- ・ 37°Cの代わりに32°Cで一晩培養すると感染しやすい傾向があります。なお、低温(室温・32°C)条件によりダメージを受ける細胞もありますのでご注意ください。

浮遊細胞

Day 0

1. 細胞を 1×10^5 cells/tubeで1.5mLチューブに分注し、遠心 (200 x g, 5min, 4°C) する。
2. 注意深く上清を吸引除去し、タッピングしてほぐしておく。
3. 1×10^5 cellsに対しMOI=1 - 3となるように、SRV™ control Vectorのタイターからベクター量を計算する。
 1×10^5 cells x MOI=3 → 3×10^5 CIU分を計算
例) 3×10^7 CIU/mLの場合、10 μ Lとなる。
4. 3.で計算したベクターと合わせて20-33 μ Lになるように、培地の量を計算する。
 3×10^6 - 5×10^6 cells/mLの細胞密度での感染となる。
5. ベクターを室温の水で素早く解凍後、スピンドウンし使用するまで氷上におく。
6. 2.で準備した細胞に、3.4.で計算した通りに培地とベクターを添加し、2,3回ピペッティングする。
7. 細胞の入った1.5mLチューブを37°Cインキュベーターに入れ、途中2,3回タッピングしながら2時間静置する。
8. 培地を1mL加え、遠心 (200 x g, 5min, 4°C) する。
9. ベクター液を含んだ上清を除去し、細胞をタッピングしてほぐす。
10. 8.9.を2回繰り返す。(合計3回洗浄)
11. 細胞をよく懸濁してプレートに播種する。
12. 37°C, 5%CO₂インキュベーターで培養する。

以後、蛍光顕微鏡下で細胞を観察し、EGFPを指標にベクターの感染を確認する。

補足

- (a) 細胞数を増やして感染する場合には、4.で示した細胞密度に合うように計算してください。
- (b) 感染しにくい細胞については、MOIを上げて検討してください。
MOIが高すぎるとダメージを受ける細胞もありますのでご注意ください。
- (c) 培養中の細胞にベクターを添加して培養しても感染できませんが、上記の方法よりも感染率が低下する可能性があります。
37°Cか32°Cで一晩培養し、翌日ベクターを除去して洗浄してください。なお、32°C培養で感染しやすい傾向がありますが、ダメージを受ける細胞もあるためご注意ください。

使用上の注意

- ・ 本製品は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)」の対象品です。
- ・ Biosafety Level 2 (BSL2)での取扱が必要ですので、必ず BSL2 準拠の安全キャビネットをご使用ください。
- ・ 本製品は研究用試薬です。使用は研究目的に限られ、医療・診断目的に使用することはできません。

B. ベクターの除去

継代時にsiRNAを導入することにより、ベクター感染細胞からベクターを除去することが可能です。

HeLa細胞を用いた検討では、siRNA(siTB1)導入を3回行い、siRNA導入から10日程度で確認できるEGFP陽性細胞はごく僅かとなりました。(siTB1*の配列は以下に記載)

なお、その他の接着細胞、浮遊細胞に関しては、各自の検討が必要となりますのでご注意ください。

実施例 ベクターが感染したHeLa細胞からベクターを除去するプロトコル

【必要なもの】

細胞 : ベクターが感染した HeLa 細胞

試薬 : HeLa 細胞用培地

PBS(-)

TrypLE™ Select Enzyme (ThermoFisher SCIENTIFIC, 12563011)

Opti-MEM™ I Reduced Serum Free Medium (ThermoFisher SCIENTIFIC, 31985070)

Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (ThermoFisher SCIENTIFIC, 13778075)

10μM siTB1* [siTB1 はキットに含まれていないため、以下の情報をもとにご自身で合成を発注してください。]

センス鎖 : 5' - CAAUAGUUCACGCGUGAAAGug - 3'

アンチセンス鎖 : 5' - CUUUCAGCGUGAACUAUUGcu - 3'

(小文字はオーバーハング。アニーリングしてから使用のこと。)

トリパンブルー溶液

器具 : 培養プレート

24-well plate

15/50 mL コニカルチューブ、1.5mL チューブ

ピペッター、ピペットマン、ピペット、チップ

セルカウンター

【手順】

1. 培地を吸引除去後、PBS(-)で洗浄し、TrypLE Select を適量を加え、37°Cインキュベータで 5 分反応させる。
2. HeLa 細胞用培地を適量添加し、ピペティングして細胞を剥がしてチューブに回収し、細胞数をカウントする。
3. 24-well plate へ、培地量が合計 500μL になるように 0.5-1X10⁵ cells/well で播種する。
4. 同時に siRNA transfection を行う。Final 40nM となる。

siRNA を opti-MEM に添加し混和 → Lipofectamine RNAiMAX を添加し混和 → 室温で 20 分静置 → 細胞へ添加

24-well plate	10μM siRNA	RNAi MAX	Opti-MEM	AK02N
1well 当たりの量	2.5μL	1.25μL	125μL	500μL

5. 以後、蛍光顕微鏡下で細胞を観察し、EGFPを指標にベクターの感染を確認する。
必要であれば、4日おきに1.-5.を繰り返す。

ご不明な点がございましたら、メールにてお問い合わせください。

お問い合わせ先 : tech@tokiwa-bio.com