

## MISSION® shRNA レンチウイルスパーティクル用プロトコール

MISSION shRNAレンチウイルスを感染させる基本的なプロトコールを記載しております。

### MISSION shRNA Lentiviral Transduction Particles (製品番号SHCLNV)

.....

#### 1日目

1. トランスダクションの24時間前に哺乳動物細胞をプレートに撒いて培養
2. (トランスダクションは50~80%コンフルエントで行う)

#### 2日目

1. ウイルスパーティクルストックを氷上に出してゆっくり解凍
2. Hexadimethrine bromide※を細胞に添加(最終濃度8 µg/ml)して揺する  
※トランスダクション効率を高める(ただし、神経の初期培地などには不適)
3. 適した量(MOI)のウイルスパーティクルを添加※して揺する  
※初めての場合は、幾つかのmultiplicity of infection (MOI)を試す(0, 1, 10, 50など)  
※MOI(multiplicity of infection): 細胞1個に対するウイルスの数  
 $(1\text{ウエル中の全細胞数}) \times (\text{目的のMOI}) = (\text{必要なTU})$   
 $(\text{必要なTU}) / (\text{CoAに書かれているTU/ml}) = (1\text{ウエルに入れるレンチウイルス粒子のml})$
4. 37°Cで一晩インキュベート  
※一晩のインキュベートで害が生じる場合は、最低でも4時間はインキュベーション必要

#### 3日目

1. ウイルスパーティクルを含む培地を除去
2. 新しい培地を入れる

#### 4日目

- a. トランジェント(一過性発現)で実験する場合  
細胞を回収してqRT-PCRなどでノックダウンを検証する
- b. ステابل(安定発現)で実験する場合  
培地を適当な量のピューロマイシンを含む培地に交換(方法は末尾に記載)  
細胞によって濃度は異なるが、0.15~10 µg/mlが標準的

#### 5日目以降(ステアブルの場合のみ)

- 3~4日ごとに培地を適当な量のピューロマイシンを含む培地に交換  
(一般的には10~12日後くらいにはクローンが確立できる)  
5クローン以上をピックしてノックダウンを検証する
- .....

#### ピューロマイシンによるセレクション

1. 96穴プレートに各ウエルに1.6x10<sup>4</sup>細胞と120ulの培地を用意する。
2. 次の日に0.5~10ug/mlのピューロマイシンを分注する。
3. 2日後に生存している細胞を調べる。
4. 3日間ごとにピューロマイシン入りの培養液で培地交換をし、3~14日間培養し、最適な選択期間を検討する。