

レンチウイルスベクターは、初代培養細胞や幹細胞、神経細胞などの非分裂細胞を含む、ほぼすべての哺乳類細胞に遺伝子導入を実現する強力な多用途ベクターである。レンチウイルスベクタープラスミドとパッケージングプラスミドをトランスフェクション試薬を用いて 293T 細胞にコトランスフェクションすることで、高力価の組換えレンチウイルスを含む培養上清が得られる。

Lentivirus production

1. 6 well plate に HEK293T 細胞を播種（～70% confluent cells / 1.5 mL / well）し、37℃にて一晩静置する。
2. クローニングにて得られた目的の遺伝子の pLenti ベクタープラスミドと、コアパッケージングプラスミド 3 種をコトランスフェクションし、37℃ にて 24 h インキュベートする。

[6 well plate の場合]

(DNA 2 µg / Opti-MEM 250 µL) + (PEI-MAX 8 µL / Opti-MEM 250 µL) / well

*DNA 組成

発現コンストラクト / pLenti-virus vector	1.00 µg
#113 MD2G	0.25 µg
#114 MDLg/RRE	0.50 µg
#115 RSV-Rev	0.25 µg

☞ 導入する DNA の総量は、適宜調節する（2～4 µg / well）。

ただし、以下の比率は変えないこと（pLenti-virus vector : #113 : #114 : #115 = 4 : 1 : 2 : 1）

☞ φ10 cm dish の場合は 6 well plate の 6 倍量（DNA : PEI-MAX = 12 µg : 48 µL）で同様の手順で行う。

☞ ここから先の作業は必ずフィルターチップを用いて作業すること。培地交換等のために回収した培養上清はウイルス専用のアスピレーターを用いて処分し、回収に用いた遠沈管等はオートクレーブにて不活化処理を行う。

3. トランスフェクション 24 h 後、メディアウムチェンジを行い、さらに 37 °C にて 48 h インキュベートする。
4. レンチウイルスを含む培養上清を 15 mL あるいは 50 mL 遠沈管に回収し、2500 rpm にて 10 min 遠心分離を行う。
5. 上清を 0.45 µm のフィルターにて濾過する。

☞ PEG による精製濃縮を行わない場合は、そのまま 1.5 mL チューブに分注し、-80℃にて保存する。

Lentivirus purification

必要に応じてレンチウイルスを精製濃縮する。

1. フィルター濾過したレンチウイルスを含む培養上清に4×PEG を添加(細胞上清 :4×PEG=3:1)し、4℃にて一晩静置する。
2. 1500 g にて30 min 遠心分離を行う(4℃)。
3. ピペットマンやオートピペッターを用い、上清を残液1 mL以下になる程度まで大部分除去する。
4. 再度1500 g にて5 min 遠心分離を行う(4℃)。
5. 上清を完全に除去し、目的の濃縮倍率(10~100倍)になるようにOPTI-MEMを添加し、ペレット(レンチウイルス)をピペットマン(P1000)を用いて穏和に懸濁する。
6. 必要に合わせて1.5 mL チューブに分注し、-80℃にて保存する。

4×PEG solution (500 mL分)

1. PEG6000 160 g を MilliQ に溶かし、320 mL にメスアップする。
☞溶けるのに時間が掛かる。細かい気泡を含んだ水飴状になったら OK。
2. 5 M NaCl を 40 mL 加える。
3. 1 M HEPES pH7.4 を 20 mL 加える。
4. MilliQ で 500 mL にメスアップし、オートクレーブ滅菌する。

Lentivirus infection

1. 遺伝子導入の前日に、標的細胞を播種する。
2. レンチウイルス(培養上清あるいはPEG濃縮済み)と、最終濃度10 µg/mLのポリブレンを細胞に添加し、37℃にて24~48 h インキュベートする。
☞一度溶解したウイルス溶液は力価が大幅に低下するため、なるべく再凍結せずに処分する。
☞インフェクションするウイルスの液量は、適宜条件検討にて決定する。
☞インフェクション後回収した細胞については、抽出液を調製するまではフィルターチップ及びウイルス専用のアスピレーターを用いて洗浄する。