

Solfect-v™ Transfection reagent protocol (Lentivirus Production)

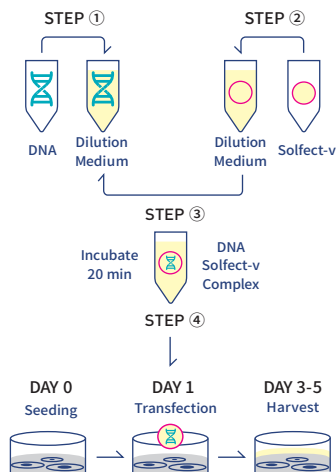
Biosolxy

• DAY 0 : Well 당 Cell seeding (실험 당일 Cell이 70~80% 되도록)

Culture ware	Surface Area(cm ²)	Number of Cells	Culture Medium (mL)
24 well	1.9	50,000~80,000	0.5
12 well	3.8	90,000~150,000	1
6 well	9.6	200,000~400,000	2
10-cm dish	58	1,000,000~2,000,000	10
T75 flask	75	1,200,000~2,600,000	15

[보관]
제품은 냉장보관 하시기 바랍니다. 냉동 보관 할 경우 transfection 효율이 떨어질 수 있습니다. 무균환경 하에서 개봉 및 사용하여 주시기 바랍니다.

• TRANSFECTION PROTOCOL (DAY 1)



[실험 방법 : Plasmid DNA Transfection]

Step ① : Transfer DNA, Packaging DNA, Envelope DNA 를 serum 없는 dilution medium 에 넣고 희석 후 pipetting
pDNA 사용량 예시) Transfer DNA : Packaging DNA : Envelope DNA = 2:2:1
• 각 pDNA 사용량은 경험적으로 조절이 필요합니다.

Step ② : Solfect-v 를 serum 없는 dilution medium 에 넣고 희석 후 pipetting
• pDNA와 Solfect-v 사용량은 아래 DAY 1 표를 참고하세요.

Step ③ : 희석해놓은 ② 를 희석액 ① 에 넣고 상온에서 20분간 반응
• Step ④ 이후 fresh medium 으로 교체할 필요 없음

Step ④ : DNA-Solfect-v complex 를 DAY 1에 각 well 당 일정량 첨가

Step ⑤ : 2~4 일 후 Harvest

Step ⑤-1 : Lentivirus 입자가 포함된 세포의 상등액 모으기

Step ⑤-2 : 모은 상등액을 500 x g 로 10분간 spin down 하고, 상등액만 모으기

Step ⑤-3 : 0.45 μm PVDF filter 로 필터하여 세포 제거 하기

Step ⑤-4 : cryogenic tube 에 덜어서 -80°C 에서 보관

• DAY 1 : DNA, Solfect, Dilution 사용 권장량 (Dilution medium 양은 DNA와 Solfect-v Solution을 포함)

Culture ware	DNA (μg)	Dilution Medium (μL)	Solfect-v (μL)	Dilution Medium (μL)	Complex (μL)	Total Volume (mL)	[권장] Dilution medium • Opti-MEM(Gibco) • TOM (Wegene) • Serum없는 growth basal medium도 가능
	STEP①		STEP②		STEP③	STEP④	
24 well	0.5	25	1.5	25	50	0.55	
12 well	1.0	50	3.0	50	100	1.1	
6 well	2.0	100	6.0	100	200	2.2	
10-cm dish	10	500	30	500	1000	11	
T75 flask	15	750	45	750	1500	16.5	

• DAY 3-5 : Harvest

Transfection reagent protocol (Lentivirus Production)

[실험 방법 예시 : Plasmid DNA Transfection, Harvest]

Ex) 6 well plate, HEK293T cell

DAY 0 [Cell seeding] HEK293T 세포를 6 well plate에 300,000개 분주 후 37°C, 5% CO₂ 상태에서 1일 incubation (medium = 2 mL) (transfection 실험 진행 당시 70% cell confluency)

DAY 1 [DNA, Reagent dilution] Transfection 에 사용할 DNA 와 Solfect-v 를 각각의 tube 에 희석하여 준비 (1개 well 기준)

- Step ① [DNA dilution] DNA 2 µg (0.8 µg transfer plasmid, 0.8 µg packaging plasmid, 0.4 µg envelope plasmid) 과 Opti-MEM 의 합이 100 µL 가 되도록 tube 에 희석 후 pipetting
- Step ② [Solfect-v dilution] Solfect-v 6 µL 을 Opti-MEM 94 µL 로 tube 에 희석 후 pipetting
- Step ③ [Mixing] 전 단계의 ② 를 ① 에 합쳐준 뒤 pipetting 하여 균일하게 섞기
- Step ④ [Complex forming] 20분간 상온에서 incubation
- Step ⑤ [Treatment] 섞어준 DNA-Solfect-v complex 200 µL 를 HEK293T 6 well plate 에 각 well 당 넣기

DAY 4 [Harvest] 72시간 이후 Harvest

- Step ① : Lentivirus 입자가 포함된 세포의 상등액을 모으기
- Step ② : 모은 상등액을 500 x g 로 10분간 spin down 하고, 상등액만 모으기
- Step ③ : 0.45µm PVDF filter 로 필터하여 세포 제거 하기
- Step ④ : cryogenic tube 에 덜어서 -80°C 에서 보관

2세대 pDNA 사용량

Plate	6 well	10-cm dish
Complete growth medium	2 ml	10 ml
Dilution medium	200 µl	1 ml
Transfer DNA : pLV-eGFP	0.8 µg	4 µg
Packaging DNA : psPAX2 gag-pol, rev	0.8 µg	4 µg
Envelope DNA : pMD2.G vsvg	0.4 µg	2 µg
Total DNA	2.0 µg	10 µg
Solfect-v	6.0 µl	30 µl
Total volume	2.2 ml	11 ml

3세대 pDNA 사용량

Plate	6 well	10-cm dish
Complete growth medium	2 ml	10 ml
Dilution medium	200 µl	1 ml
Transfer DNA : pLV-eGFP	0.8 µg	4 µg
Packaging DNA 1 : pMDLg/pRRE gag-pol	0.4 µg	2 µg
Packaging DNA 2 : pRSV-Rev rev	0.4 µg	2 µg
Envelope DNA : pMD2.G vsvg	0.4 µg	2 µg
Total DNA	2.0 µg	10 µg
Solfect-v	6.0 µl	30 µl
Total volume	2.2 ml	11 ml

• 각 pDNA 사용량(비율)은 경험적으로 조절이 필요합니다.