

Solfect-v™ Transfection reagent protocol (Lentivirus Production)

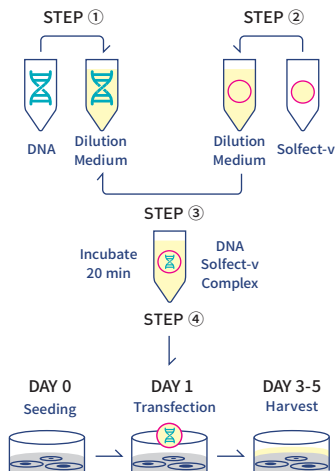
Biosolys

• DAY 0 : Well 당 Cell seeding (실험 당일 Cell이 75~85% 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 1 : Plasmid DNA Transfection]

Step ① : Envelope DNA, packaging DNA, transfer DNA를 serum 없는 dilution medium 에 넣고 희석 후 pipetting
• 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 : DNA-Solfect-v complex 를 DAY 1에 각 well 당 일정량 첨가
• Step ④ 이후 fresh medium 으로 교체할 필요 없음

Step ⑤ : 2~4 일 후 Harvest

• 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)
	STEP ①			STEP ②	STEP ③	STEP ④
24 well	0.5~0.6	25	DNA량의 2~3배 (2~3 uL/ug DNA)	25	50	0.55
12 well	1.0	50		50	100	1.1
6 well	2.0	100		100	200	2.2
10-cm dish	10	500		500	1000	11
T75 flask	15	750		750	1500	16.5

[권장]
Dilution medium
• Opti-MEM(Gibco)
• TOM (Wegene)
• Serum없는 growth basal medium도 가능

Solfect-v™

Transfection reagent protocol (Lentivirus Production)

Biosolyx

• DAY 3-5 : Harvest

[실험 방법 2 : Harvest]

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

[실험 방법 3 : Lentivirus Transduction and Titering]

※ Titering

- Step ① : 실험2. 에서 모아놓은 virus 포함 용액을 Titer Kit 제품을 이용하여 titer 를 측정
- Step ② : Lentivirus 포함 용액을 바로 infection 하거나 필요시 농축용 시약으로 virus 포함 용액을 농축하여 infection 한다.
 - Titer 값이 $1 \sim 2 \times 10^7$ TU/ml 정도 예상되면 lentivirus 포함 용액을 각 well 당 20-30 µL 사용

1. Plate cells

- Step ① : 사용할 well plate 에 18-24 시간 후 cell이 50% 정도 되도록 cell seeding
- Step ② : 37°C, 5% CO₂ 상태에서 overnight 배양

2. Transduce recombinant lentivirus

- Step ① : 실험2. 에서 모아놓은 virus 포함 용액을 상온에서 녹인 후 적당량 tube에 덜어 넣기
- Step ② : ①의 tube에 8mg/ml 의 hexadimethrine bromide 을 적당량(총 medium 1 ml 당 1 µL 의 polybrene) 넣기
- Step ③ : virus + polybrene 용액을 세포로 transduction
- Step ④ : 48-72 시간 후 다음 실험 진행

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 350,000개 분주 후 37°C, 5% CO₂ 상태에서 1일 incubation (medium = 2 mL) (transfection 실험 진행 당시 75~85% 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 2.0 µg (0.4 µg envelope plasmid, 0.8 µg packaging plasmid, 0.8 µg transfer plasmid) 과 Opti-MEM 의 합이 100 µL 가 되도록 tube 에 희석 후 pipetting

Step ② [Solfect-v dilution] Solfect-v 4 ~ 6 µL 과 Opti-MEM 의 합이 100 µL 가 되도록 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 3-5 [Harvest] 48~96시간 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

Plate	6 well	10-cm dish
Complete growth medium	2 ml	10 ml
Dilution medium	200 µl	1 ml
Envelope DNA: pMD2.G VSVG	0.4 µg	2 µg
Packaging DNA: psPAX2 gag-pol, rev	0.8 µg	4 µg
Transfer DNA pLV-eGFP	0.8 µg	4 µg
Total DNA	2.0 µg	10 µg
Solfect-v	5.0 µg	25 µg
Total volume	2.2 ml	11 ml

• 각 pDNA 사용량(비율)은 경험적으로 조절이 필요합니다.

Solfect-v™

Transfection reagent protocol (Lentivirus Production)

Biosolyx

[실험 방법 예시 : Lentivirus Transduction and Titering]

Ex) 24 well plate, HEK293T cell

DAY 0 [Cell seeding] HEK293T 세포를 24 well plate에 30,000개 분주 후 37°C, 5% CO₂ 상태에서 1일 incubation (medium = 0.5 mL) (transfection 실험 진행 당시 50% confluency)

DAY 1 [Transduction]

Step ① : 모아놓은 virus 포함 용액을 상온에서 녹인 후 tube에 30 µL 덜어 넣기 (1개 well 기준)

Step ② : ①의 tube에 8mg/ml 의 hexadimethrine bromide 을 0.53 µL

(growth medium 0.5 ml + virus 포함 용액 0.03 ml 의 0.1%) 넣기

Step ③ : virus + polybrene 용액 30.53µL 를 HEK293T 24 well plate 로 transduction 하기

Step ④ : 48-72 시간 후 다음 실험 진행