

Лентивирусные частицы LVT-FusionRed-H2B

Кат. # LP006

Версия 2 от 28 августа 2024 г.

Лентивирусные частицы LVT-FusionRed-H2B, несущие ген флуоресцентного белка FusionRed-H2B, готовы к использованию и предназначены для трансдукции клеток. Лентивирусный вектор эффективно встраивается в геном клеток-мишеней, вызывая стабильную экспрессию флуоресцентного белка FusionRed-H2B через 48–72 часа после добавления вируса к клеточной культуре.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

Состав

Компонент	LP001
Лентивирусные частицы в культуральной среде DMEM с 10% FBS с титром* не менее 0.5×10^6 Т.Е./мл	1 мл

* Титр — количество клеток, которые могут быть трансдуцированы 1 мл вирусных частиц (Т.Е. — трансдуцирующие единицы). Титр определен на клетках HeLa методом предельных разведений.

Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: -70°C .

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

Основные характеристики

- Способность интегрироваться в геном клетки-мишени, обеспечивая постоянную экспрессию трансгена.
- Возможность доставлять ДНК в труднотрансфецируемые неделящие-ся клетки, в том числе первичные дифференцированные клетки, такие как нейроны, макрофаги, гепатоциты.
- Широкий тропизм, благодаря упаковке в оболочку вируса везикулярного стоматита.
- Низкая иммуногенность при использовании в опытах на животных.
- Схема генома лентивирусного вектора, кодирующего флуоресцентный белок:



RSV/LTR — Tat-независимый LTR;

EF1 α — промотор фактора элонгации трансляции 1 α ;

FusionRed-H2B — ген флуоресцентного белка;

WPRE — посттранскрипционный регуляторный элемент вируса WHV;

SIN LTR — «самоинактивирующийся» LTR.

Меры предосторожности

При работе с лентивирусными векторами необходимо придерживаться правил работы с микроорганизмами II группы патогенности (опасности) (BSL-II: biosafety level II) в связи с риском инсерционного мутагенеза. Все манипуляции с препаратами лентивирусных частиц производятся в ламинарном шкафу второго класса безопасности с защитой оператора. При работе с вирусными частицами следует надевать защитные перчатки, очки и халат. Необходимо избегать контакта с вируссодержащей жидкостью и культуральной посудой, которая содержала лентивирусные частицы (пробирки, наконечники, чашки Петри и прочее). Вся посуду и клеточный супернатант, в которые добавлялись лентивирусные частицы, необходимо обрабатывать дезинфицирующим раствором (70% спирт, хлорамин и т.п.) и автоклавировать. При попадании вируссодержащей жидкости на кожные покровы или слизистые необходимо немедленно промыть большим количеством 70% этанола.

Протокол

1. Анализ чувствительности клеточной линии к трансдукции лентивирусами

- ▶ *Необходимое для трансдукции количество частиц определяется экспериментально, так как клеточные линии различаются по степени чувствительности к лентивирусным векторам. Поэтому при работе с новой клеточной линией рекомендуется провести оценку ее чувствительности к трансдукции (по экспрессии флуоресцентного белка) в сравнении со стандартной линией HeLa, для которой определен титр.*

1.1. Внесите в три лунки 6-луночного планшета клетки HeLa с плотностью 10^5 клеток на лунку. В другие три лунки — анализируемые клетки с той же плотностью. Первая лунка в каждой серии будет использоваться для отрицательного контроля трансдукции.

Для монослойных культур: перейдите к п. 1.2 после прикрепления клеток к пластику (обычно через 2–3 часа).

Для суспензионных культур: перейдите к п. 1.2 сразу после субкультивации клеток.

1.2. К каждой линии клеток добавьте во вторую и третью лунки по 10 и 20 мкл лентивирусных частиц соответственно.

1.3. Через 72 часа после трансдукции с использованием микроскопа определите долю флуоресцирующих клеток в лунках обеих клеточных линий. Рассчитайте титр лентивирусных частиц в анализируемой клеточной линии по формуле:

$$\text{Титр}_x = \frac{\text{Титр}_{\text{HeLa}} \times [\text{доля флуоресцирующих клеток в анализируемой линии}]}{[\text{доля флуоресцирующих клеток в стандартной линии HeLa}]}, \text{ где:}$$

Титр_x — титр частиц в анализируемой линии,

Титр_{HeLa} — титр частиц, указанный на упаковке (в линии HeLa).

- ▶ *Некоторые клетки могут потребовать более длительной инкубации до начала экспрессии трансгена и(или) добавления дополнительных соединений для повышения эффективности трансдукции (например, полибрена).*

2. Получение стабильных клеточных линий

Для получения трансдуцированной клеточной линии с высоким уровнем экспрессии флуоресцентного белка:

- Используйте для трансдукции 2–10 кратный избыток лентивирусных частиц по отношению к числу клеток, исходя из определенного значения титра (см. п. 1.3).

Например, для контрольной линии HeLa необходимо использовать 40–200 мкл частиц с титром 0.5×10^6 Т.Е./мл на 10^5 клеток.

- При необходимости смените ростовую среду через 24 часа.

Из полученной гетерогенной культуры, клетки которой содержат разное количество вирусных геномов, могут быть получены клональные клеточные линии (потомство отдельной клетки) с оптимальным уровнем экспрессии флуоресцентного белка.

В случае, если необходимо получить трансдуцированные клетки со строго одной копией вирусного генома, следует уменьшить количество трансдуцирующих единиц на одну клетку.

ЗАО Евроген

Москва 117997

ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15

Тел.: +7 (495) 784-7084

order@evrogen.ru

www.evrogen.ru