

申請客製化病毒服務說明書

一、送件需知

DNA 純度與其完整性是影響 Transfection 效率與病毒力價高低因素之一。為了避免日後的爭議，本核心特訂定客製化 VSV-G pseudotyped lentivirus 需知如下：

1. 此服務只限制在核心領取的 shRNA 細菌株萃取之 Lentiviral Transfer Vectors 或來自核心之其他 Transfer Vectors 及其衍生物；如 Transfer Vectors 非來自本核心則需是 2.5 generation 以上的 lentivector.
2. 如 selection marker 為非 puromycin acetyltransferase 者，將不提供病毒力價資料；
3. 希望您能理解並不是每個 constructs 都可得到高力價的病毒，原因如下：
 - (1) shRNA/siRNA targeting 病毒生產細胞株 293T 或力價測定細胞株 A549 細胞株之細胞必須因子、存活因子、或因而影響細胞活性者，預期病毒力價將低於平均值或趨近於零。
 - (2) 根據 The RNAi Consortium (TRC) 未發表之資料顯示，在生產的 15,000 ORFs 慢病毒中約有 11% 之 ORF 無法產生病毒，原因不知但與 ORF 的長度沒有絕對關係。本核心亦得到類似結果。
4. 送件 DNA 經本核心執行病毒生產流程，不論最後結果如何（低力價或無力價）均需付費。
5. 欲申請客製化病毒服務之申請人，送件 DNA（只需送 Transfer Vector）至少需完成兩項測試（純度：OD_{260/280} and OD_{260/230} measurements；完整性：0.5% Agarose Gel Electrophoresis test）。如有必要，本核心亦會進行複測。欲送件之 DNA 必須符合下列說明條件，俟本核心審查通過後，始可提出申請。

二、送件說明與表單

1. Plasmid DNA 的製備與其送件的量

Plasmid DNA 建議使用 Transfection-Quality 純化試劑組或核心提供之純化方法 ([Purification of plasmid DNA by precipitation with PEG 10000](#)) 純化。

所需 DNA 量如下表。

服務項次	濃度 [#]	送件體積 (μl)	送件 DNA 量 (μg)
C6-9-1 (1mL virus)	50 ng/μl	30	1.5
C6-9-2 (2mL virus)	100 ng/μl	30	3
C6-9-3 (5mL virus)	200 ng/μl	25	5

[#]: 請以 autoclaved 0.1X TE Buffer [pH8.0]調整 DNA 濃度。

2. DNA 純度測定

DNA 在純化過程中，容易殘留 RNA、蛋白質或有機溶劑，這些殘留物將會影響 Transfection 效率與病毒力價的高低。光譜分析可測出 DNA 是否含有殘留物，並可測出 DNA 濃度。待客製化病毒之 Plasmid DNA 其 O.D.值必需符合下列條件：

- (1) Protein contamination test

$$OD_{260/280} = 1.8-2.0$$

- (2) Solvent contamination test

$$OD_{260/230} = 2.0-2.4$$

3. DNA 完整性& Plasmid Size

已知在自然界中，DNA 是以 Negatively Supercoiled Form 進行轉錄。Supercoiled form plasmid DNA 轉染到細胞中可達到最佳轉錄效率；反之，Nicked DNA or Linear DNA 轉錄效率則受到影響。因此，待客製化病毒之 Plasmid DNA 請以下列方法測試其完整性。另外，請以 plasmid 上的單一切點限制酶處理 DNA，以確認 plasmid size 是否正確，並將分析結果電泳圖上傳到線上審核單。以下為測試範例與實驗步驟：

範例

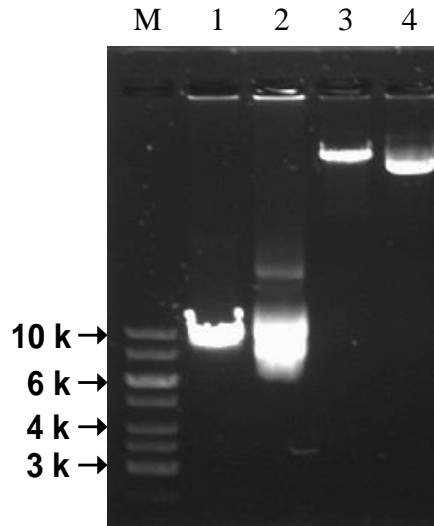


Figure legend: 1000ng of plasmid with the size of 9000 bp was linearized with a restriction enzyme (one cutting site). 500ng of linearized plasmid (lane 1) and uncut plasmid (lane 2) were subjected to electrophoresis (0.5% agarose gel with SYBR safe staining, run at 50 volts in 0.5X TBE running buffer) for 2 hours, and then the equal amounts of these two plasmid DNAs are loaded into lane 3 and 4, and ran for another 30-min. Please note that the size of the major band of lane 2 are smaller than 9000 bp, indicating that those DNAs are supercoiled form DNAs in nature. In addition, there are no other signals detected in lane 3 and lane 4 except major band (DNA), suggesting that there are no RNA contaminations in DNA preparation.

附註事項：

1. 申請本服務，請至“服務項目訂購”選取 C6-9 線上填寫 DNA 樣本測試結果，申請 shRNA 細菌株萃取之 lentivector 者請務必寫上 TRC Clone ID (這是 TRC 定義的菌株識別碼，每個菌株都有一個唯一的識別碼，以 "TRCN" 開頭，接著 10 個數字，此數字串開頭通常有數個 0，例如：TRCN0000008763)，如是 cDNA expressing lentivector，請填寫基因名稱。待核心評估您的 DNA 樣本後，將以系統 email 通知您的 DNA 樣本是否審核通過。
2. 收到審核結果後，請登入本核心系統的 C6-9 服務項目訂購，將欲製備病毒的 DNA 樣本勾選加入購物車，如有需要亦可同時申請病毒濃縮服務(項目編號 C6-9-6 or 7)或加購 control 病毒(項目編號 C6-4) 並完成訂購流程，列印形成之 RNAi 試劑申請與同意證明單，於計畫主持人、乙方、乙方研發人欄位簽章，傳真 02-27885420 或 email (RNAiCore@imb.sinica.edu.tw)至本核心。
3. 完成線上訂購流程後就可先寄送 DNA 樣本(請用 1.5mL eppendorf，並包裝妥善以免壓破)，請務必根據所申請病毒體積調整 DNA 濃度，並於管子上標示與申請單上相符之 DNA 名稱及調整後的 DNA 濃度(i.e. 50ng/ul, 100ng/ul or 200ng/ul)。如管子上未標示 DNA 濃度又未依規定調整濃度，導致病毒包裹效果不佳(低 titer 或無 titer)，申請者均需付費。
4. 病毒製備流程需經兩周連續的五個工作天(一個星期生產病毒，另一個星期測定病毒力價)。
5. 收到已簽章的同意單後，本核心將 email 繳費通知給計劃主持人及聯絡人。在領取病毒前，需完成繳費。
6. 病毒製備完成後將以核心系統 email 通知領取，因生物安全考量，病毒無法郵寄，請自行到本核心領取。
7. 領取病毒時請攜帶繳費收據影本並自備乾冰及保麗龍盒，如需本核心代購乾冰請來電預訂。乾冰及保麗龍盒只有在星期一及星期四的中午送達，需要在前一天預訂。

DNA樣本請寄送到以下地址(避開週末送達):

台北市南港區115
研究院路二段128號
中央研究院
基因體研究中心
RNAi Core 4L09A

聯絡

信箱: RNAiCore@imb.sinica.edu.tw (請注意大小寫需相符)

傳真: 02-27885420

電話: 02-27899724, 02-27898763, 02-27899856

行政相關問題: 鍾穎麗 分機 15

實驗相關問題: 許真妮 分機 11