

製品コード 3653 ~ 3658

研究用

Takara

pDON-AI-2 Neo DNA	(製品コード 3653)
pDON-AI-2 DNA	(製品コード 3654)
pMEI-5 Neo DNA	(製品コード 3655)
pMEI-5 DNA	(製品コード 3656)
pDON-5 Neo DNA	(製品コード 3657)
pDON-5 DNA	(製品コード 3658)

説明書

目次

- I. 内容
- II. 保存
- III. 製品説明
- IV. ベクターマップとマルチクローニングサイト
- V. レトロウイルスベクターの特長
- VI. pDON-AI-2 シリーズ、pMEI-5 シリーズおよび pDON-5 シリーズを用いた組換えレトロウイルスの作製方法
- VII. 使用例
 - 1. 方法
 - 2. 結果
 - 2-1. ウイルスタイターの比較
 - 2-2. 発現強度の比較
- VIII. 関連製品
- IX. 参考文献
- X. 注意

I. 内容

pDON-AI-2 Neo DNA	20 μg (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (製品コード 3653)
pDON-AI-2 DNA	20 μg (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (製品コード 3654)
pMEI-5 Neo DNA	20 μg (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (製品コード 3655)
pMEI-5 DNA	20 μg (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (製品コード 3656)
pDON-5 Neo DNA	20 μg (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (製品コード 3657)
pDON-5 DNA	20 μg (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (製品コード 3658)

[形状] 10 mM Tris-HCl, pH8.0、1 mM EDTA

II. 保存

− 20℃

III. 製品説明

【pDON-AI-2 シリーズ】

高効率遺伝子導入用レトロウイルスベクターを調製するためのレトロウイルスベクタープラスミドです。

本ベクターは、LTR とパッケージングシグナル (Ψ 配列) 以外の MoMLV 由来遺伝子 (*gag*, *pol*, *env* コード配列) を含まず、かつ 5' LTR の U3 領域がより強力なサイトメガロウイルス由来のプロモーターに置換されているので転写効率が高く、そのため高力価の組換えレトロウイルスを得ることが期待できる点が特徴です。さらに、細胞へ導入した後の目的遺伝子の発現効率を上げるために、クローニングサイトの上流にヒトアクチン由来のイントロンとスプライスアクセプターを搭載しています。また、pDON-AI-2 Neo DNA (製品コード 3653) は薬剤選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を有しています。

本製品を用いることで、pMEI-5 シリーズや pDON-5 シリーズに比べ、高力価の組換えレトロウイルスを得ることができ、効率的な遺伝子導入が可能になります。

【pMEI-5 シリーズ】

高発現遺伝子導入用レトロウイルスベクターを調製するためのレトロウイルスベクタープラスミドです。

本ベクターは、LTR とパッケージングシグナル (Ψ 配列) 以外の MoMLV 由来遺伝子 (*gag*, *pol*, *env* コード配列) を含まず、かつ、細胞へ導入した後の目的遺伝子の発現効率をさらに向上させるために、クローニングサイトの上流にスプライシング能の高いヒト EF1 α 由来のイントロンを持ち、非常に高い転写能が得られる点が特徴です。また、pMEI-5 Neo DNA (製品コード 3655) は薬剤選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を有しています。本製品を用いることで、pDON-AI-2 シリーズに比べ、高い遺伝子発現が期待でき、導入遺伝子を高発現させることが可能になります。

【pDON-5 シリーズ】

高効率かつ高発現遺伝子導入用レトロウイルスベクターを調製するためのレトロウイルスベクタープラスミドです。

本ベクターは、LTR とパッケージングシグナル (Ψ 配列) 以外の MoMLV 由来遺伝子 (*gag*, *pol*, *env* コード配列) を含まず、かつ目的遺伝子の発現効率をさらに向上させるために、クローニングサイトの上流にスプライシング能の高いヒト EF1 α 由来のイントロンを持ち、高い転写能が得られる点が特徴です。さらに、5' LTR の U3 領域がより強力なサイトメガロウイルス由来のプロモーターに置換されているため、高力価の組換えレトロウイルスを得ることが期待できる点が特徴です。また、pDON-5 Neo DNA (製品コード 3657) は薬剤選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を有しています。

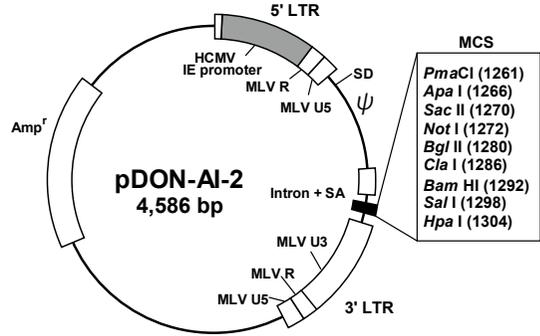
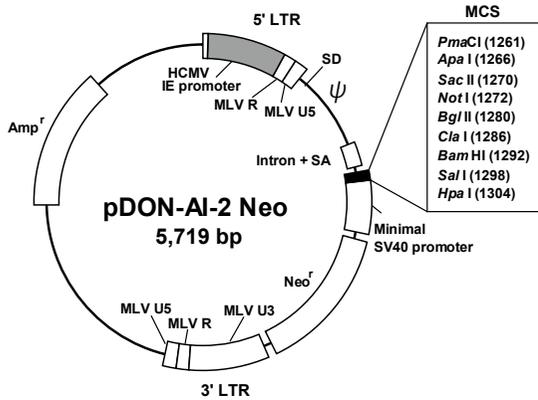
本製品を用いることで、pMEI-5 シリーズよりも高力価の組換えレトロウイルスを得ることができ、さらに pDON-AI-2 シリーズに比べ、高い遺伝子発現が期待できます。効率的な遺伝子導入および導入遺伝子の高発現が可能になります。

本製品は、共通した 9 種類のマルチクローニングサイト (VI. 図 1) を有する (pMEI-5 DNA および pDON-5 DNA のみさらに 1 種類のサイトを持つ) ため、目的の遺伝子の挿入が容易となり、さらに各ベクター間での比較が容易です。

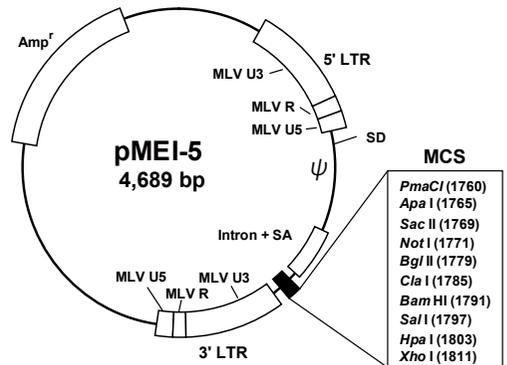
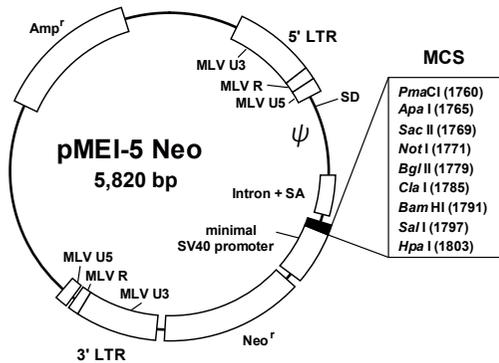
IV. ベクターマップとマルチクローニングサイト

<ベクターマップ>

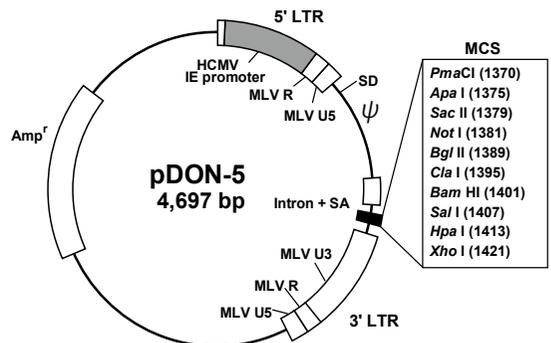
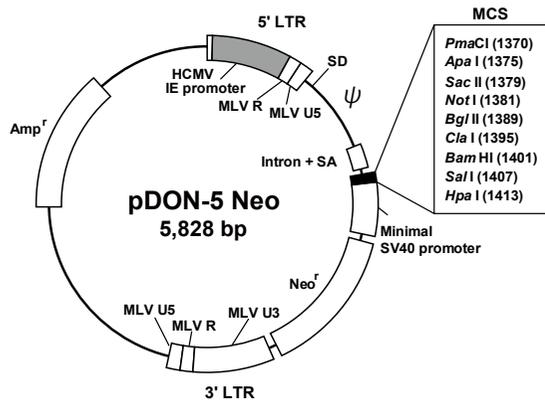
● pDON-AI-2 シリーズ



● pMEI-5 シリーズ

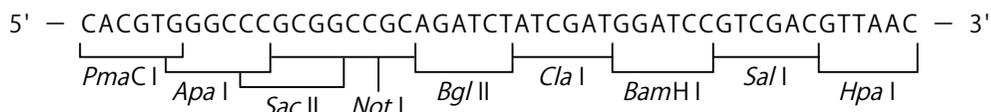


● pDON-5 シリーズ

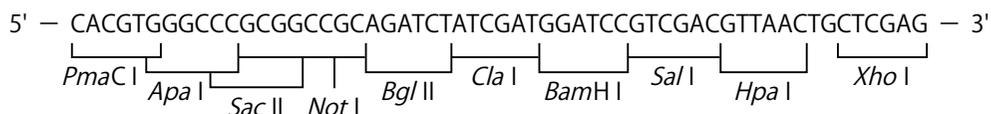


<マルチクローニングサイト>

pDON-AI-2 Neo, pDON-AI-2, pMEI-5 Neo, pDON-5 Neo



pMEI-5, pDON-5



V. レトロウイルスベクターの特長

標的細胞へ目的遺伝子を導入し発現させる方法としてレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入には、次のような利点があります。

- 1) 導入遺伝子が染色体に組み込まれるため、長期間、安定に遺伝子の発現ができる。導入遺伝子を染色体に組み込む能力のない他のベクターでは、導入遺伝子が細胞内で分解されたり、細胞分裂にともない希釈されてしまう。そのため、遺伝子発現は一過性で持続しない。レトロウイルスベクターは、染色体に組み込まれるため、安定で分裂後も確実に伝搬される。
- 2) レトロウイルスを除いた他のウイルスベクターの作製には複雑な作製手順が必要だが、レトロウイルスの場合は、比較的容易にウイルスベクターを作製することが可能である。
- 3) 増殖期にある多くの細胞種への遺伝子導入が可能である。とりわけ、物理・化学的手法ではほとんど遺伝子導入できなかった造血幹細胞にも、フィブロネクチンフラグメント (RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (製品コード T100A/B)) を用いることにより、レトロウイルスベクターを介した高効率での遺伝子導入が可能となった。

VI. pDON-AI-2 シリーズ、pMEI-5 シリーズおよび pDON-5 シリーズを用いた組換えレトロウイルスの作製方法

Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho (製品コード 6160/6161) を用いて、G3T-hi 細胞 (製品コード 6163) へ導入することによる、一過性の組換えレトロウイルスの産生手順を図 1 に示します。

また、パッケージング細胞にトランスフェクションすることで、組換えレトロウイルスを作製することも可能です。

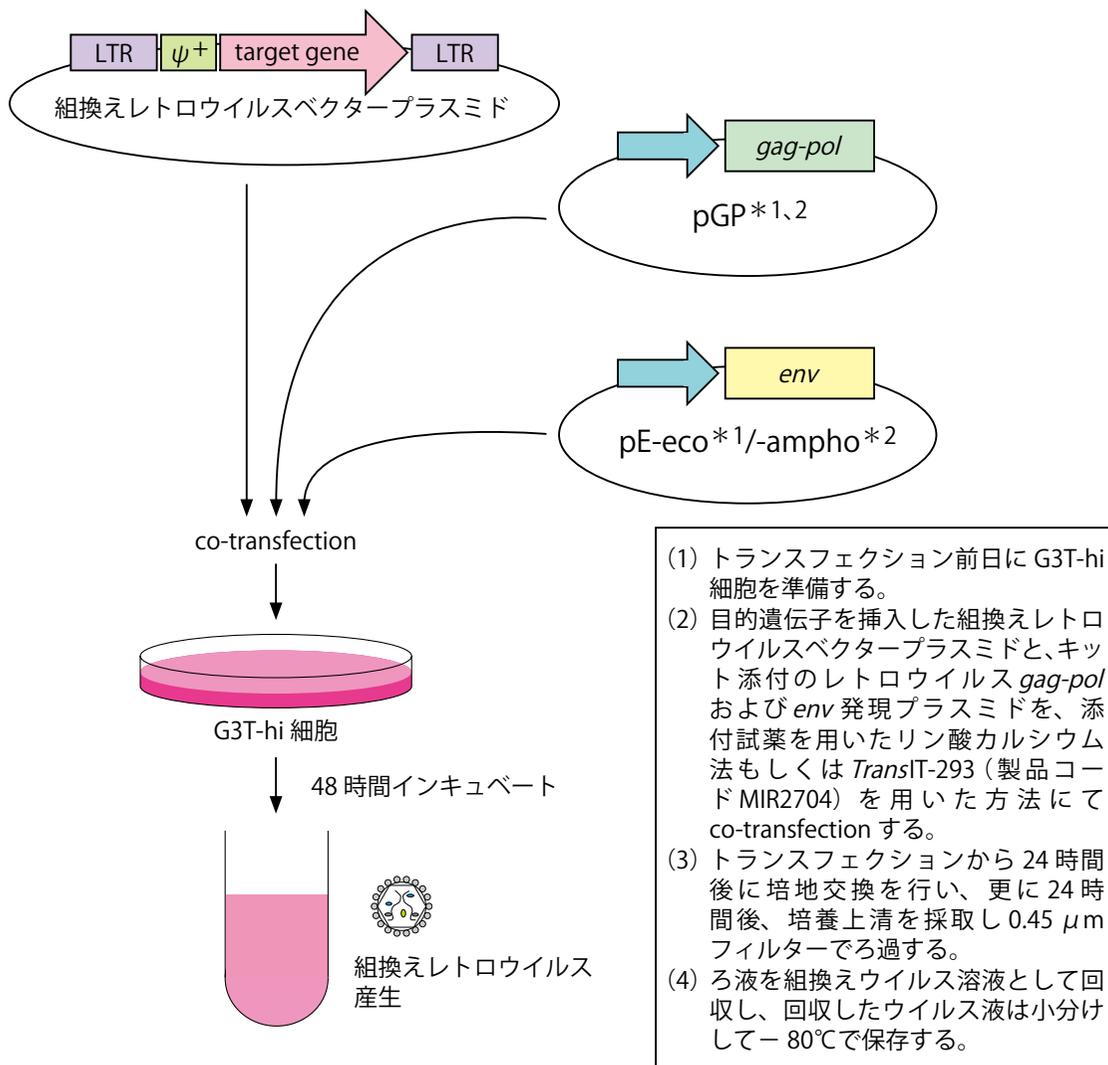


図 1. Retrovirus Packaging Kit を用いた一過性組換えレトロウイルスの産生手順

* 1 : Retrovirus Packaging Kit Eco (製品コード 6160) に含まれます。

* 2 : Retrovirus Packaging Kit Ampho (製品コード 6161) に含まれます。

VII. 使用例

以下に、pDON-AI-2 Neo DNA、pDON-AI-2 DNA、pMEI-5 Neo DNA、pMEI-5 DNA、pDON-5 Neo DNA、pDON-5 DNA を用いた組換えレトロウイルス作製の一例を紹介します。

1. 方法

pDON-AI-2 Neo DNA、pDON-AI-2 DNA、pMEI-5 Neo DNA、pMEI-5 DNA、pDON-5 Neo DNA、pDON-5 DNA の *Bam*HI/*Hpa*I サイトに ZsGreen 遺伝子を挿入し、pDON-AI-2 Neo-ZsGreen、pDON-AI-2-ZsGreen、pMEI-5 Neo-ZsGreen、pMEI-5-ZsGreen、pDON-5 Neo-ZsGreen、pDON-5 DNA-ZsGreen ベクターを作製した。Retrovirus Packaging Kit Ampho (製品コード 6161) を用いて、G3T-hi 細胞 (製品コード 6163) へ導入し、一過性の組換えレトロウイルスを産生した。

2. 結果

2-1. ウイルスタイターの比較 (表 1、図 2)

- (1) HT1080 細胞へ段階希釈したレトロウイルスベクターをポリブレン存在下にて感染させ、フローサイトメーターにて ZsGreen の導入効率を測定し、ウイルスタイターを算出した。
- (2) HT1080 細胞へ段階希釈したレトロウイルスベクターを感染させ、G418 にて薬剤選択を行い形成されたコロニー数よりウイルスタイターを算出した。(Neo シリーズのみ)
- (3) Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) (製品コード 6166) を使用し、レトロウイルスベクターの RNA ゲノム量を測定し、RNA タイターを算出した。タイター算出用のスタンダードとして、(1) の方法にてあらかじめ生物学的タイターを算出した DON-AI-2-ZsGreen レトロウイルスを使用した。

表 1. ウイルスタイターの比較

	(1) ZsGreen / HT1080	(2) G418 / HT1080	(3) RNA titer
	ivp/ml	cfu/ml	ivp/ml
DON-AI-2 Neo	4.08×10^6	4.43×10^6	1.01×10^7
DON-AI-2	7.35×10^6	-	2.23×10^7
MEI-5 Neo	3.96×10^5	5.88×10^5	8.47×10^5
MEI-5	1.31×10^6	-	2.48×10^6
DON-5 Neo	2.65×10^6	3.83×10^6	6.81×10^6
DON-5	3.26×10^6	-	8.59×10^6

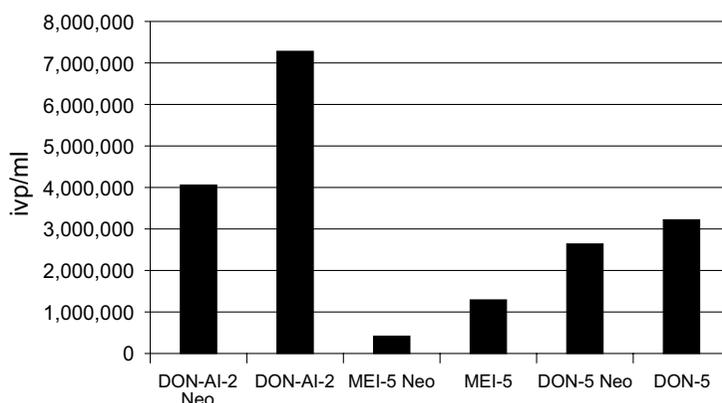


図 2. ウイルスタイター比較 (ZsGreen/HT1080)

2-2. 発現強度の比較 (図 3)

レトロウイルスベクターを種々の希釈倍率にてポリブレンを用いた方法で HT1080 細胞へ感染させた。感染 3 日後に、フローサイトメーターを用いて遺伝子導入効率および ZsGreen 発現強度を測定した。遺伝子導入効率が 20%以下の希釈倍率での発現強度を single copy 導入細胞とみなし、発現強度の比較を行った。各細胞での DON-AI-2 ウイルスベクターの発現強度を 1 とした時の値を示す。

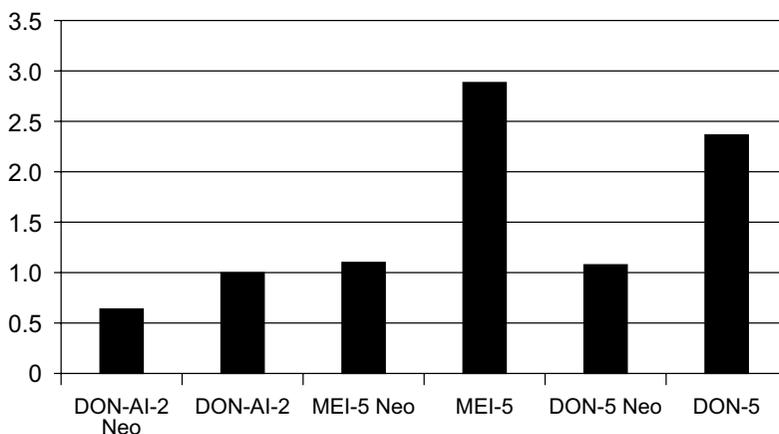


図 3. ZsGreen 発現強度 (1 copy/cell の蛍光強度平均値の相対値)

VIII. 関連製品

RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (製品コード T100A/B)
RetroNectin® Dish (RetroNectin Pre-coated Dish, 35 mm φ) (製品コード T110A)
Retrovirus Constructive System Eco/Ampho (製品コード 6164/6165)
Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho (製品コード 6160/6161)
レトロウイルス調製細胞 G3T-hi 細胞 (製品コード 6163)
Retro-X™ Universal Packaging System (製品コード 631530)
TransIT-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2704)
Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) (製品コード 6166)
Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time PCR) (製品コード 6167)
Retro-X™ Integration Site Analysis Kit (製品コード 631467)

IX. 参考文献

- 1) Kim, S. H., Yu, S. S., Park, J. S., Robbins, P. D., and An, C. S. *J Virol.* (1998) **72**: 994-1004.
- 2) Yu, S. S., Kim, J. M., and Kim, S. *Gene Ther.* (2000) **7**: 797-804.
- 3) Lee, J. T., Yu, S. S., Han, E., Kim, S., and Kim, S. *Gene Ther.* (2004) **11**: 94-99.

X. 注意

- 本製品を研究目的以外に使用される場合は、個別にライセンス契約の締結が必要です。事前に弊社にお問い合わせください。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本レトロウイルスベクターの系によって生産されるウイルス上清は、挿入断片によっては危険なウイルスを含む恐れがあるため、組換えレトロウイルスの生産と取扱いには、適切な処置をとる必要があります。ご利用の際は、管轄省庁および組織内安全委員会の定める組換え DNA 実験指針に従ってください。
- RetroNectin はタカラバイオ株式会社の登録商標です。Retro-X は Takara Bio USA, Inc. の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。
- 本製品の使用によって生じたいかなる事故、損害についても、弊社では責任を負いかねますので、ご了承の上で使用ください。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社