

RetroNectin®に高い親和性を示すレトロウイルス調製用 G3T-hi細胞が登場!! 便利なシステムをご利用ください

Retrovirus Constructive System Eco

製品コード 6164 1 Set ¥120,000

Retrovirus Constructive System Ampho

製品コード 6165 1 Set ¥120,000

レトロウイルス調製用 G3T-hi 細胞と、Retrovirus Packaging Kit、RetroNectin®がセットになり、ウイルス調製から遺伝子導入までを一貫して行うことが可能。一過性トランスフェクションにより、 $10^5 \sim 10^7$ cfu/ml の高力価組換えレトロウイルスが短時間で調製可能。

GnT- 高発現の G3T-hi 細胞で調製することにより、RetroNectin® 高親和性を示す組換えレトロウイルスが産生。

調製レトロウイルスはRetroNectin法での遺伝子導入効率が2倍に上昇。

レトロウイルスベクターは、目的遺伝子を標的細胞の染色体に組み込むことができ、長期に安定して目的遺伝子を発現させることができます。そのため、遺伝子導入のツールとして、遺伝子治療だけでなく多くの研究分野で幅広く用いられています。

タカラバイオではこれまでに、レトロウイルス関連製品としてレトロウイルスベクタープラスミド pDON-AI DNA、siRNA 発現用レトロウイルスベクタープラスミド pSINsi シリーズ¹⁾、一過性レトロウイルス産生システム Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho²⁾、およびレトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率を飛躍的に高めることができる RetroNectin^{®3)}を開発・販売してきました。

このたび、新たに RetroNectin® に高い親和性をもつ組換えレトロウイルスを調製するための G3T-hi 細胞を開発し、本細胞と Retrovirus Packaging Kit、RetroNectin® がセットになったレトロウイルス調製用キットをラインアップしました。目的遺伝子を導入した組換えレトロウイルスベクタープラスミドをご準備いただくだけで、組換えレトロウイルスの調製から血球系細胞を含む各種標的細胞への高効率遺伝子導入まで、トータルでのご利用が可能です。マウス、ラット細胞への遺伝子導入用に Retrovirus Constructive System Eco、哺乳動物細胞への遺伝子導入用に Retrovirus Constructive System Ampho の 2 種類のセットを用意しております。また、レトロウイルス調製細胞 (G3T-hi 細胞) 単品でのご購入も可能です。

本稿では、今回発売の新製品についてご紹介します。

製品の内容

Retrovirus Constructive System Eco
マウス、ラットの細胞に感染可能な ecotropic ウイルスの調製用システムです。

• G3T-hi 細胞	2 × 10 ⁶ cells/vial
• RetroNectin®	0.5 mg
• Retrovirus Packaging Kit Eco	
pGP Vector(1 µg/µl)	50 µl
pE-eco Vector(1 µg/µl)	50 µl
Transfection Buffer	500 µl × 10 本
2 M CaCl ₂	620 µl
25 mM Chloroquine	40 µl

Retrovirus Constructive System Ampho
哺乳動物細胞に感染可能な amphotropic ウイルスの調製用システムです。

• G3T-hi 細胞	2 × 10 ⁶ cells/vial
• RetroNectin®	0.5 mg
• Retrovirus Packaging Kit Ampho	
pGP Vector(1 µg/µl)	50 µl
pE-ampho Vector(1 µg/µl)	50 µl
Transfection Buffer	500 µl × 10 本
2 M CaCl ₂	620 µl
25 mM Chloroquine	40 µl

G3T-hi 細胞の特性

本システムに含まれる G3T-hi 細胞はトランスフェクションにより組換えレトロウイルスを一過性に産生させるために開発された細胞です。本細胞は 293T 細胞にヒト N-アセチルグルコサミンルトランスフェラーゼ III (N-acetylglucosaminyltransferase III : GnT-III)³⁾を導入した GnT-III 高発現細胞株で、細胞膜タンパク質糖鎖が GnT-III により修飾されることを特徴とします。

一方、レトロウイルスベクターは宿主細胞から出芽する際、宿主細胞膜を纏った形で出芽するため、G3T-hi 細胞より得られた組換えレトロウイルスの膜タンパク質糖鎖は GnT-III による修飾を受けています。この糖鎖修飾により、本細胞を用いて調製した組換えレトロウイルスは RetroNectin® (フィブロネクチンの細胞接着ドメインとヘパリン結合ドメインの

両者を有する組換えフィブロネクチンフラグメント)³⁾への親和性が高くなり、標的細胞への遺伝子導入効率が大きく向上します。血球系細胞を標的とした遺伝子導入にも大変有効です。また、G3T-hi細胞にはSV40のT抗原遺伝子が導入されているためレトロウイルスのRNAが増幅され、高力価ウイルス液が得られます。通常、本製品を用いてウイルス調製した場合、 $10^5 \sim 10^7$ cfu/mlのウイルス液が得られます。

G3T-hi細胞を用いた組換えレトロウイルスの産生

G3T-hi細胞を用いたトランスフェクションにより組換えレトロウイルスを一過性に産生するためには、Retrovirus Packaging Kit Eco または Ampho²⁾を用います。キットにはウイルス粒子の形成に必要な *gag-pol* および *env* の各発現ベクタープラスミドとトランスフェクションに必要な試薬が含まれています。*gag-pol* および *env* の発現ベクターと目的遺伝子を組み込んだ組換えレトロウイルスベクタープラスミドを本細胞に共導入することにより、トランスフェクションから48時間後には一過性に高力価の組換えウイルス粒子を得ることができます(図1A)。

実験例：G3T-hi細胞および293T細胞を用いて調製した組換えレトロウイルスの各種標的細胞への遺伝子導入効率の比較

【方法】

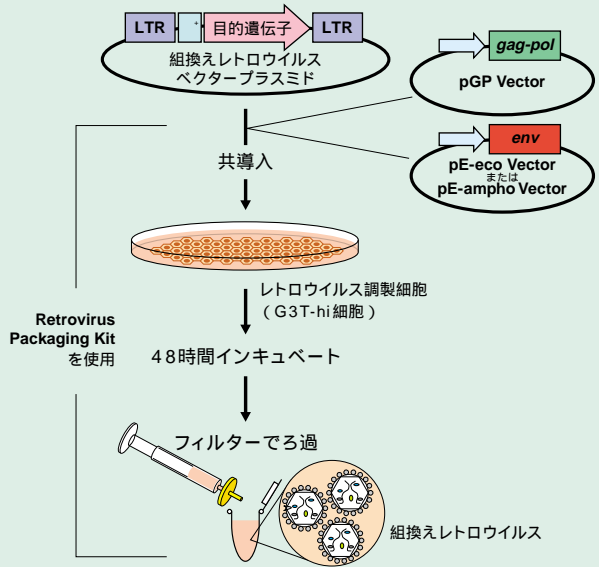
GFP遺伝子をpDON-AI DNAに挿入した組換えレトロウイルスベクタープラスミドpDON-AI-GFPを、Retrovirus Packaging Kit Amphoを用いてG3T-hi細胞と293T細胞に導入し、一過性にウイルス液を調製した。力価測定はNIH/3T3細胞を用いてポリブレン法にて行った。それぞれM.O.I.(multiplicity of infection)=0.2の条件で、MKN-1細胞、HT1080細胞、293細胞、NIH/3T3細胞、MDA-MB-435S細胞、A375M細胞ならびに血球系細胞であるK-562細胞、TF-1細胞へRetroNectin[®]を用いたSupernatant infection(SN)法^{3,5)}で感染させた(図1B)、3日後にフローサイトメーターでGFP陽性細胞率を測定し、遺伝子導入効率を算出した。

【結果】

各種標的細胞への遺伝子導入効率の結果を図2に示します。G3T-hi細胞を用いて調製したウイルスの場合、293T細胞を用いて調製したウイルスに比べ、RetroNectin[®]を用いた遺伝子導入効率が約2倍となっていることがわかります(図2)。ポリブレン法によりウイルス粒子数をそろえて感染を行っていることから、この導入効率の上昇はウイルス膜表面がGnT-IIIによる糖鎖修飾を受けることでRetroNectin[®]への親和性が向上したためと考えられます。

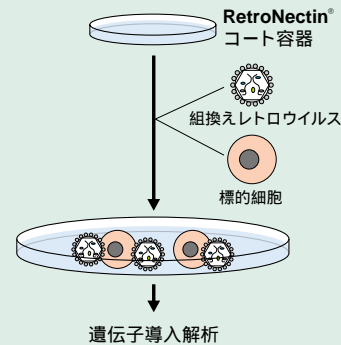
なお、本稿ではSN法をご紹介しましたが、感染に組換えレトロウイルス原液を使用する場合には、RetroNectin[®]コートプレートにウイルスをまずブロードし、ウイルス溶液に含まれる感染阻害物質を除去した後、標的細胞を加える方法(RetroNectin[®] bound virus infection: RBV法)を推奨しています^{3,5)}。

(A)組換えレトロウイルスの調製法(Retrovirus Packaging Kitを用いる方法)



トランスフェクション前日にG3T-hi細胞を準備する。目的遺伝子を挿入した組換えレトロウイルスベクタープラスミドと、キット添付のレトロウイルス *gag-pol* および *env* 発現ベクターを添付試薬を用いてリン酸カルシウム法にて共導入する。トランスフェクションから24時間後に培地交換を行い、さらに24時間後、培養上清を採取し0.45 μmフィルターでろ過する。ろ液をウイルス溶液として回収し、回収したウイルス液は小分けして-80℃で保存する。

(B)組換えレトロウイルスの感染法(SN法)



ここでは24ウェルプレートでの遺伝子導入法を示す。

[RetroNectin[®]コートプレートの作製]

表面未処理24ウェルプレートに、PBSで20 μg/mlに調製したRetroNectin[®](RetroNectin[®]/PBS)溶液を1ウェルあたり500 μlで添加し(5 μg/cm²)、4℃で一晩放置する。RetroNectin[®]/PBS溶液を除去し、2% BSA/PBSを1ウェルあたり500 μl添加して室温にて30分間ブロッキングする。ブロッキング溶液を除去し、1ウェルあたり500 μlのPBSで1回洗浄し、PBSを除去した状態で保存する。このプレートをRetroNectin[®]コートプレートとし、必要に応じて作製する。

[SN法]

標的細胞をウイルス希釈液で懸濁する。RetroNectin[®]コートプレートの1ウェルに細胞懸濁液を添加する。37℃、5% CO₂インキュベーターで培養する。

図1 G3T-hi細胞を用いた組換えレトロウイルスの調製法と感染法

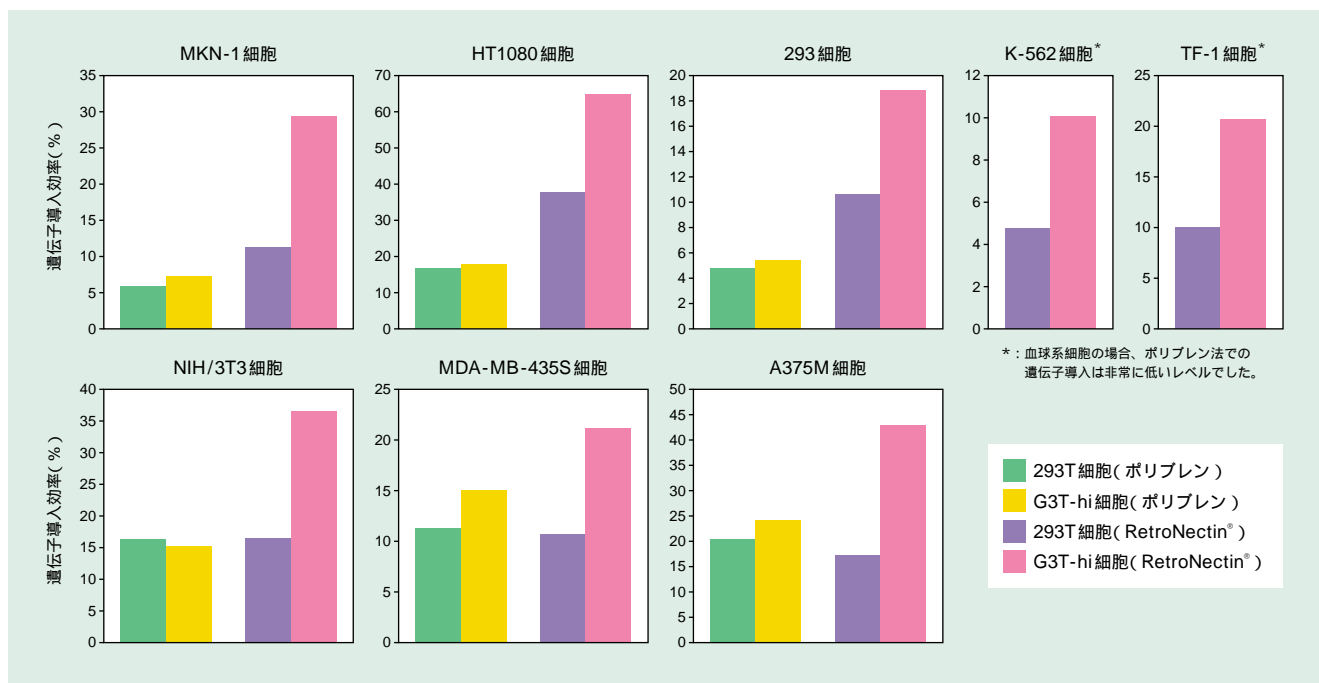


図2 G3T-hi細胞および293T細胞を用いて調製したウイルス液の各種標的細胞への遺伝子導入効率の比較

G3T-hi細胞あるいは293T細胞を用いて一過性に組換えレトロウイルスを調製し、ポリブレン法およびRetroNectin®を用いたSN法により各種標的細胞へウイルスを感染させた。G3T-hi細胞を用いて調製したウイルスは、GnT-IIIによってウイルス膜表面に糖鎖修飾を受けることにより、RetroNectin®への親和性が向上し、標的細胞への遺伝子導入効率が増加することが示された。

【参考文献】

- 1) BIO VIEW 45号8～11ページ*
 - 2) BIO VIEW 36号12～13ページ
 - 3) BIO VIEW 47号13～15ページ*
 - 4) Ihara, Y. *et al.* (1993) *J. Biochem.*, 113, 692-698.
 - 5) Chono, H. *et al.* (2001) *J. Biochem.*, 130, 331-334.
- *: ホームページよりPDFでご覧いただけます。

関連製品

製品名	製品コード	容量	価格
レトロウイルス調製細胞 G3T-hi細胞	6163	2 × 10 ⁶ cells/ vial	¥60,000
組換えレトロウイルス産生システム			
Retrovirus Packaging Kit Eco	6160	10回分	¥50,000
Retrovirus Packaging Kit Ampho	6161	10回分	¥50,000
レトロウイルスベクターを用いた高効率遺伝子導入に			
RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment)	T100A	0.5 mg	¥25,000
RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment)	T100B	2.5 mg	¥100,000
RetroNectin® Dish (RetroNectin® Pre-coated Dish, 35 mm)	T110A	10 dishes	¥50,000
高効率遺伝子導入用レトロウイルスベクター			
pDON-AI DNA	3650	20 µg	¥50,000
siRNA 発現用レトロウイルスベクター			
pSINsi-hH1 DNA	3660	20 µg	¥35,000
pSINsi-hU6 DNA	3661	20 µg	¥35,000
pSINsi-mU6 DNA	3662	20 µg	¥35,000

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は48ページをご覧ください。 [10](#) [11](#)