

製品コード 6165

研究用

---

**Takara**

**Retrovirus Constructive  
System Ampho**

---

説明書

v202012

---

# 目次

I.	本製品の使用について.....	3
II.	内容および保存.....	3
	II-1. 内容 .....	3
	II-2. 保存 .....	3
III.	製品説明 .....	4
IV.	本製品以外に必要な器具・装置および試薬 .....	4
	IV-1. 器具・装置 .....	4
	IV-2. 試薬.....	4
V.	細胞培養の手順.....	5
	V-1. 凍結ストックからの細胞培養.....	5
	V-2. 細胞の継代 .....	5
	V-3. 細胞の凍結 .....	5
VI.	ウイルス産生 .....	6
	VI-1. 一過性ウイルス産生.....	7
	VI-2. ウイルス力価の測定.....	8
VII.	レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験.....	9
	VII-1. RetroNectin® を用いる場合.....	10
	VII-1-1. RetroNectin コートプレートの準備.....	10
	VII-1-2. RetroNectin Bound Virus (RBV) 感染法.....	10
	VII-1-3. 遠心法を利用した RetroNectin Bound Virus (RBV) 感染法.....	11
	VII-1-4. Supernatant (SN) 感染法.....	11
	VII-2. ポリブレンを用いる場合 .....	12
VIII.	参考文献 .....	13
IX.	関連製品 .....	13
X.	注意 .....	14

---

## I. 本製品の使用について

本製品をご利用の際は、以下の点にご注意ください。

1. 本製品の使用は研究用に限定されています。臨床目的での使用および生体外診断に使用することはできません。(本製品により得られた生物材料を第三者に譲渡することもできません。) また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
2. 本製品を研究目的以外に使用される場合は、事前に弊社にお問い合わせください。商業目的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。
3. 本製品によって生産されるウイルス上清液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り扱いには、適切な処置をとる必要があります。本製品の使用には文部科学省の定める省令(「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」平成16年文部科学省、環境省令第一号)にあるP2レベル以上の施設が必要です。本製品ご利用の際は、省令及び組織内の委員会の指示に従い、安全には十分にご注意ください。
4. 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。

## II. 内容および保存

### II-1. 内容

Retrovirus Constructive System Ampho (製品コード 6165) は以下の製品を組み合わせたセット製品です。

- ・レトロウイルス調製細胞 G3T-hi 細胞 (製品コード 6163)  $2 \times 10^6$  cells/vial
- ・Retrovirus Packaging Kit Ampho (製品コード 6161) 10 回分
- ・RetroNectin (製品コード T100A) 0.5 mg (0.5 ml)

### II-2. 保存

レトロウイルス調製細胞 G3T-hi 細胞.....液体窒素中凍結保存

(細胞の輸送はドライアイス梱包のため、製品到着後ただちに液体窒素中で保存してください。液体窒素保存ができない場合は、ただちに細胞を融解し、培養を行ってください。)

Retrovirus Packaging Kit Ampho..... - 20℃保存

RetroNectin ..... - 20℃保存

### III. 製品説明

本製品は、レトロウイルス調製細胞 G3T-hi 細胞、Retrovirus Packaging Kit Ampho、RetroNectin\* がセットになっており、組換えレトロウイルスベクタープラスミドを用意するだけで組換えレトロウイルスの調製から標的細胞への遺伝子導入までを行うことができるよう構成されています。本製品に含まれる G3T-hi 細胞は、ヒト腎臓由来の細胞株 293T にヒト *N*-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ III<sup>1)</sup> (*N*-acetylglucosaminyltransferase III ; GnT-III) を導入した GnT-III 高発現細胞株です。

ネオマイシン耐性である 293T 細胞に、ハイグロマイシン耐性遺伝子を用いてヒト GnT-III 遺伝子を導入しています。

本細胞は 293T 細胞由来であるため、SV40 の T 抗原遺伝子が導入されており、この働きによってレトロウイルスの RNA が増幅され、高力価ウイルス液が得られます。<sup>2)</sup> 本細胞に、Retrovirus Packaging Kit Ampho に含まれる *gag-pol* 発現ベクタープラスミドおよび *env* (アンフォトロピック) 発現ベクタープラスミドと、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共導入することにより、迅速かつ一過性に多数の哺乳動物細胞に感染可能な高力価の組換えウイルスを産生することができます。通常、Retrovirus Packaging Kit を用いた一過性発現では  $10^5 \sim 10^7$  cfu/ml のウイルス液が得られます。また、本細胞は、細胞膜糖鎖が GnT-III により修飾されることを特徴とします。レトロウイルスは、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、本細胞を用いて調製した組換えレトロウイルスでは膜タンパク質糖鎖が GnT-III により修飾を受けていると考えられます。この糖鎖修飾により、本細胞による調製ウイルスは RetroNectin への親和性が高くなっており、RetroNectin 併用による標的細胞への遺伝子導入効率に有意に上昇することが確認されています。特に血球系細胞を標的とした遺伝子導入に有効です。

\* RetroNectin : ヒトフィブロネクチンの細胞接着ドメイン、ヘパリン結合ドメイン II および CSI 部位を含む組換えフィブロネクチンです。

### IV. 本製品以外に必要な器具・装置および試薬

#### IV-1. 器具・装置

- ・安全キャビネット
- ・細胞観察用顕微鏡
- ・CO<sub>2</sub> インキュベーター
- ・-80℃フリーザー
- ・滅菌済ピペット
- ・フィルター付滅菌チップ
- ・5 ml ポリスチレン丸底チューブ
- ・組織培養用ゼラチンまたはコラーゲンコートシャーレ
- ・0.45 μm 滅菌済フィルター (低吸着タイプ)
- ・2 ml 滅菌済チューブ (ウイルス保存用)
- ・電動ピペッター
- ・細胞凍結容器 (~1℃ / 分の温度低下可能なもの) (Thermo Fisher Scientific社 Code. 5100-0001 等)

#### IV-2. 試薬

- ・組換えレトロウイルスベクタープラスミド (高純度に精製されたもの)
- ・Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 4.5 g/L Glucose with L-Glutamine (584 mg/L) (Lonza社 Code. 12-604F)
- ・Fetal Bovine Serum (FBS)
- ・Panicillin-Streptomycin Mixture (Lonza社 Code. 17-602E)
- ・Trypsin/EDTA (1X) (Lonza社 Code. 17-161E)
- ・滅菌済み PBS (-) (1×)
- ・細胞凍結保存液 (CELLBANKER 1 ; 製品コード CB011/CB013)
- ・ポリブレン (臭化ヘキサジメトリン ; Merck社 Code. H9268)
- ・滅菌精製水

---

## V. 細胞培養の手順

G3T-hi 細胞は細胞凍結保存液中に凍結保存された状態でドライアイス詰めにお手元に届きます。製品が到着しましたらただちに液体窒素中で保存してください。液体窒素中で保存できない場合は、ただちに細胞を融解し以下の手順で培養を行ってください。

### V-1. 凍結ストックからの細胞培養

- (1) 15 ml の遠心管に 10% FBS/DMEM 培地を 5 ml 入れ、37°C に温めておく。
- (2) 凍結細胞バイアルを 37°C ウォーターバスに浸し、少し凍結塊が残る程度まで融解する。（この時スクリュウキャップの部分の水を水に浸さない様に注意する。）
- (3) 安全キャビネットまたはクリーンベンチ内で、バイアルを 70% エタノールで殺菌する。
- (4) 融解した細胞液を (1) で準備した培地に移して、1～2 回穏やかにピペティングし、 $120 \times g$ 、3 分間遠心分離する。
- (5) 上清を吸引除去し、細胞を 10 ml の培地で懸濁し、10 cm ゼラチンまたはコラーゲンコートシャーレに移し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養を開始する。

通常、2～3 日でコンフルエントになる。

### V-2. 細胞の継代

コンフルエンス率が 70～80% に達した細胞は以下の手順で継代してください。  
2～3 日毎に継代します（組織培養用 10 cm シャーレの場合\*）。

\*：G3T-hi 細胞は細胞融解後、ゼラチンあるいはコラーゲンコートシャーレに播種して融解後の細胞接着性を高めます。これらの細胞は、凍結からの回復後は通常の組織培養用シャーレで培養可能です。ただし接着性が悪い場合はウイルス産生なども含めた全ての培養に細胞接着性の良いゼラチンまたはコラーゲンコートシャーレを使用することをお勧めします。

- (1) 37°C に温めた培地（10% FBS/DMEM）および PBS（-）を準備する。
- (2) 培地を吸引し、5 ml の PBS（-）で細胞表面を 1 回洗浄する。
- (3) 1～2 ml のトリプシン-EDTA 液を加え、37°C インキュベーター内で 3 分間静置する。
- (4) 顕微鏡で観察して 90% 以上の細胞が丸くなっていることを確認して、シャーレを手のひら等に軽く打ちつけて細胞を分散させる。
- (5) 5 ml の培地を添加し、ピペティングにより細胞を分散させる。
- (6) 細胞数を計数し、 $2 \sim 4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> になるように新しいシャーレに播く。
- (7) 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養する。

### V-3. 細胞の凍結

再生可能な細胞源を確保するため、後で使用できるように細胞凍結ストックを作製しておきます。凍結ストックは、できるだけ細胞の継代回数が少ない状態で作製することをお勧めします。

細胞の凍結保存液には、CELLBANKER 1（製品コード CB011/CB013）の使用を推奨します。CELLBANKER の使用方法に従って、 $2 \times 10^6$  cells/ml、1 ml/vial で凍結ストックを作製してください。

## VI. ウイルス産生

G3T-hi 細胞は、ヒト 293T 細胞由来です。一過性のトランスフェクションには、293T 細胞に対して優れた導入効率を示すリン酸カルシウム法が適しています。<sup>2)</sup> 本システムを用いてリン酸カルシウム法による一過性トランスフェクションを行った場合、トランスフェクションから 48 時間後の上清を回収することによって、通常  $10^5 \sim 10^7$  cfu/ml の高価価ウイルス液を得ることができます (図 1)。

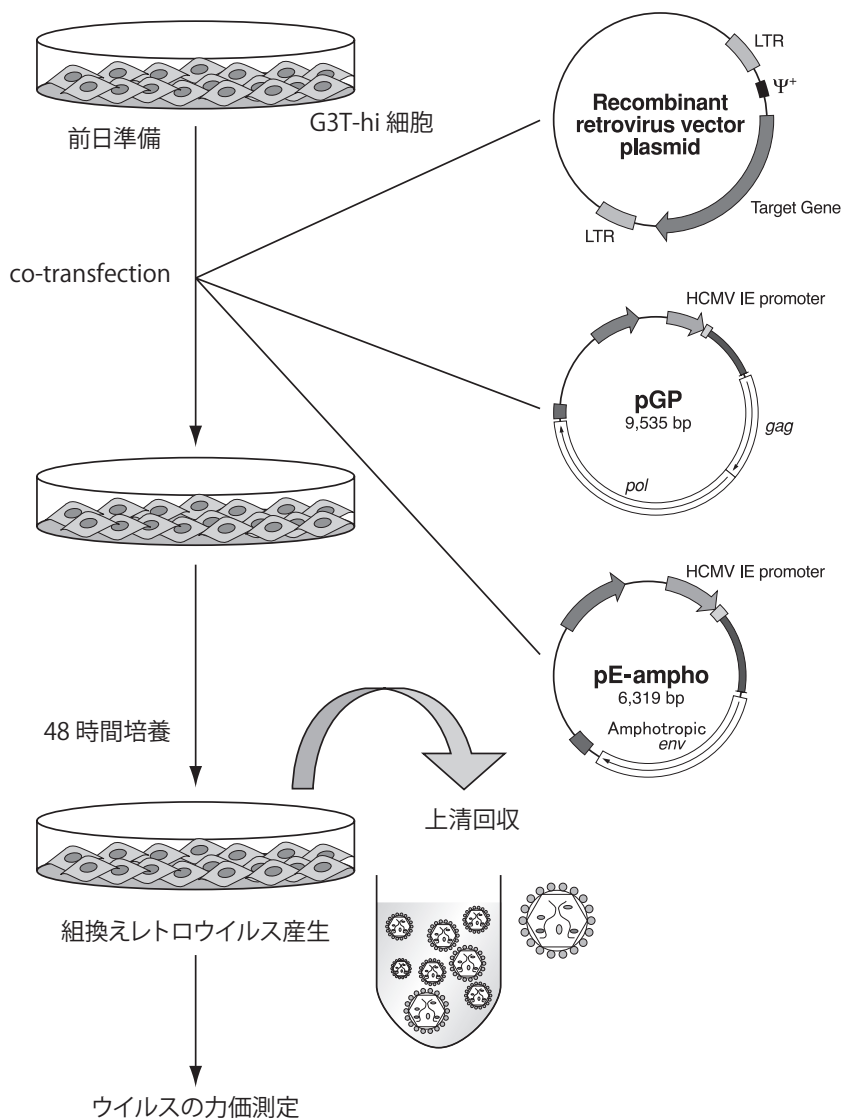


図 1. Retrovirus Packaging Kit による G3T-hi 細胞を用いた組換えレトロウイルスの調製法概要

- (1) トランスフェクション前日に G3T-hi 細胞を準備する。
- (2) 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 co-transfection する。
- (3) トランスフェクションから 24 時間後に培地交換を行い、更に 24 時間後、培養上清を採取し  $0.45 \mu\text{m}$  フィルターでろ過する。
- (4) 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  $-80^\circ\text{C}$  で保存する。
- (5) ウイルス力価の測定を行う。

## VI-1. 一過性ウイルス産生

[前日：細胞準備]

G3T-hi 細胞を 6 cm ゼラチンまたはコラーゲンシャーレに  $3 \times 10^6$  cells 播く。

[1 日目：トランスフェクション]

- (1) Retrovirus Packaging Kit の中から pGP Vector、pE-ampho Vector、Chloroquine、および必要数量の Transfection Buffer を溶解する。
- (2) Transfection Buffer、滅菌精製水を室温に戻す。
- (3) 血清培地 (10% FBS/DMEM) に Chloroquine を 1,000 分の 1 量添加し、培地を 37°C で温めておく。
- (4) 細胞が 70 ~ 80% コンフルエントであることを確認し、Chloroquine 入り培地 3 ml と交換する。
- (5) DNA 混合液の調製 (以下の溶液を 5 ml ポリスチレン丸底チューブで混合する。)

組換えレトロウイルスベクタープラスミド (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 水溶液)	10 $\mu\text{l}$
pGP Vector	5 $\mu\text{l}$
pE-ampho Vector	5 $\mu\text{l}$
2 M $\text{CaCl}_2$	62 $\mu\text{l}$
滅菌精製水	418 $\mu\text{l}$

- (6) リン酸カルシウム沈殿の作製およびトランスフェクション
  - (6)-1. Transfection Buffer を 500  $\mu\text{l}$  はかりとる (電動ピペッターを使用)。
  - (6)-2. (5) の液に緩やかに加える (チューブを振りながら混ぜる)。添加後、直ちにピペッターの排出を利用してバブリングする (10 ~ 20 秒)。
  - (6)-3. 1 ~ 2 分以内にシャーレに均一に滴下し、培地と混合する (長時間の放置は大きな結晶形成の原因となるためできるだけ避けること)。
  - (6)-4. 37°C、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターで培養する (7 ~ 11 時間)。  
(顕微鏡観察で細胞に粉雪が降りかかったような状態が見えればリン酸カルシウム沈殿の形成は成功している。)
  - (6)-5. トランスフェクションから 7 ~ 11 時間後、シャーレから培地 3 ml を除き、新たに血清培地を 4 ml 加える。

[2 日目：培地交換]

トランスフェクションから 24 時間後、培地を交換する (10% FBS/DMEM、4 ml)

[3 日目：ウイルス液の回収]

トランスフェクションから 48 時間後、上清を 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過し、組換えレトロウイルス液とする。調製したウイルス液を直ちに使用しない場合は、小分けして -80°C 保存し、凍結融解の繰り返しを避ける。

---

## VI-2. ウイルス力価の測定

VI-1. で採取したウイルス液中の感染性ウイルス粒子数を見積もるため、ウイルス力価の測定を行います。これにより細胞に対する感染性ウイルスの相対量 (multiplicity of infection ; M.O.I.) が推定され、標的細胞に適切な導入条件を決定することができます。ウイルス力価の測定には、一般的に、NIH/3T3 細胞が広く利用されています。ここではネオマイシン耐性遺伝子を利用した 6 ウェルプレートでの力価測定法を示します。

[前日：細胞準備]

標的細胞 (NIH/3T3 など) を 6 ウェルプレートに  $5 \times 10^4$  cells/ ウェルで播種する。

[1 日目：感染]

- (1) 37°C に温めた血清培地 (10%FBS/DMEM) を準備する。
- (2) ポリブレン 9  $\mu\text{g/ml}$  含有の血清培地を調製し、900  $\mu\text{l}$ / ウェルで細胞の培地を交換する。
- (3) ウイルス上清を血清培地で  $10^{-1} \sim 10^{-5}$  に希釈し、それぞれ 100  $\mu\text{l}$  をウェルに添加して感染させる。ポリブレン終濃度は 8  $\mu\text{g/ml}$ 、最終ウイルス希釈倍率は  $10^{-2} \sim 10^{-6}$  となる。
- (4) 37°C、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターで 4 ~ 6 時間培養後、ポリブレン\*を希釈するために 1 ml の培地を加える。

\*：ポリブレンに過剰に曝すと細胞毒性を示すことがあります。

[2 日目：培地交換]

培地を G418 (400 ~ 800  $\mu\text{g/ml}$ ) を含む血清培地 (10% FBS/DMEM) と交換し、以後 3 ~ 4 日おきに G418 含有培地と交換する。

[約 2 週間後：細胞のコロニー染色]

細胞をメチレンブルー液、ギムザ液などで染色し、コロニーを計数し、力価を算出する。

$$\text{力価 (cfu/ml)} = (\text{得られたコロニー数}) \times (\text{希釈倍率})$$

ここでは、メチレンブルーによるコロニー染色を示す。

- (1) 0.2%メチレンブルー/メタノール溶液と PBS (-) を準備する。
- (2) 細胞の培地を吸引し、1 ml の PBS (-) で 1 回洗浄する。
- (3) PBS (-) を吸引し、細胞を風乾する。
- (4) 0.2% メチレンブルー/メタノール溶液を 0.5 ml/ ウェルで添加し、室温で 10 ~ 15 分静置する。
- (5) メチレンブルー染色液を除き、水道水等の流水を利用して洗浄後、風乾する。
- (6) コロニーカウンター等を利用して細胞のコロニーを計数する。

※ MLV ベースのレトロウイルスベクターを用いた場合、Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) (製品コード 6166) を用いると、リアルタイム RT-PCR により迅速に力価 (RNA タイター) を測定することが可能です。



## VII. レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入実験

G3T-hi 細胞は 293T 細胞由来であるため、SV40 の T 抗原遺伝子が導入されています。この働きにより、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。したがって、本細胞から調製されたウイルスは、力価測定法でも示したポリプレックス法を用いて遺伝子導入することが可能ですが、RetroNectin を用いることにより (図 2)、標的細胞への遺伝子導入効率を有意に向上させることが可能です。これは標的細胞あたりの感染ウイルス粒子数を揃えて行った感染実験により示されています (12 ページ 図 3)。また、血球系の浮遊細胞は一般的にポリプレックス法での遺伝子導入効率が悪いいため、RetroNectin を用いた方法を推奨しています。<sup>4,7)</sup>

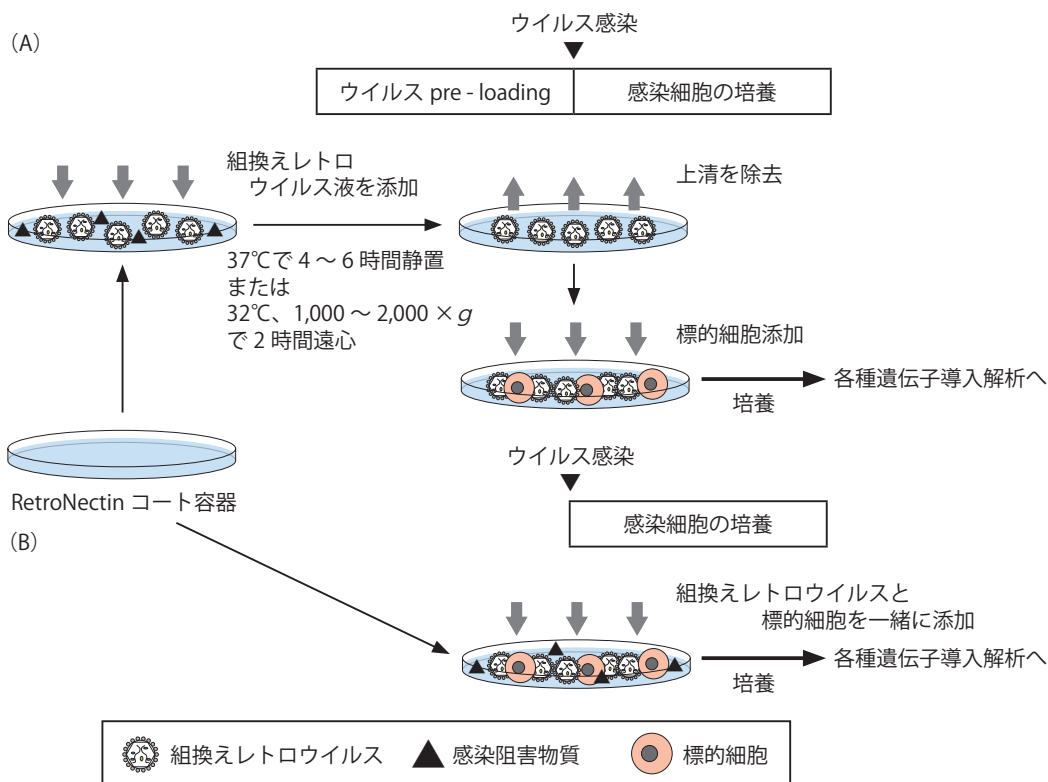


図 2. RetroNectin を用いた標的細胞への感染法の概要

### (A)-1. RetroNectin Bound Virus (RBV) 感染法

- (1) RetroNectin コートプレートに組換えレトロウイルスを添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 4 ~ 6 時間静置する。
- (2) 上清を除去した後、1 × PBS (-) で一回洗浄し、細胞懸濁液を添加する。
- (3) 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。
- (4) 感染後、目的に応じた遺伝子導入解析等を行う。

### (A)-2. 遠心法を利用した RetroNectin Bound Virus (RBV) 感染法

- (1) 96 ウェルプレート対応遠心機を 1,000 ~ 2,000 × g、32°C にセットして運転しておき、チャンバー内を 32°C に加温しておく (加温機能がなくても発熱により 32°C に加温できる)。
- (2) RetroNectin コートプレートに組換えレトロウイルスを添加し、32°C、1,000 ~ 2,000 × g、2 時間遠心する。
- (3) 上清を除去した後、1 × PBS (-) で洗浄し、細胞懸濁液を添加する。
- (4) 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。
- (5) 感染後、目的に応じた遺伝子導入解析等を行う。

### (B) Supernatant (SN) 感染法

- (1) 標的細胞をウイルス希釈液で懸濁する。
- (2) RetroNectin コートプレートに (1) の細胞懸濁液を添加する。
- (3) 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。
- (4) 感染後、目的に応じた遺伝子導入解析等を行う。

---

## VII-1. RetroNectin を用いる場合

### VII-1-1. RetroNectin コートプレートの準備

[24 ウェル RetroNectin コートプレートの作製例]

- (1) RetroNectin 溶液 (1 mg/ml) を融解し均一になるように混合する。(ボルテックスによる攪拌は避けてください。)
- (2) RetroNectin 溶液を PBS で希釈して 20  $\mu\text{g/ml}$  に調製する。
- (3) 表面未処理 24 ウェルプレートに、1 ウェルあたり 500  $\mu\text{l}$  の RetroNectin/PBS 溶液を添加し (5  $\mu\text{g/cm}^2$ )、室温 2 時間または 4°C で一晩放置する。
- (4) RetroNectin/PBS 溶液を除去し、2% BSA/PBS を 1 ウェルあたり 500  $\mu\text{l}$  添加して室温にて 30 分間ブロッキングする。
- (5) ブロッキング溶液を除去し、1 ウェルあたり 500  $\mu\text{l}$  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\*とする。

\* : 容器のふたをパラフィルム等でシールした場合、RetroNectin コートプレートは 4°C で 1 週間の保存が可能です。

### VII-1-2. RetroNectin Bound Virus (RBV) 感染法

採取した調製ウイルス液は細胞の培養上清です。このためウイルス液中には培養上清中の夾雑物質が含まれています。感染にウイルス原液を用いた場合、この夾雑物質中に含まれる感染阻害物質により、期待される遺伝子導入効率が得られない可能性があります。このような場合は RBV 感染法が推奨されます。本感染方法では、得られたウイルスをまず、ウイルス結合活性をもつ RetroNectin に結合させた後、洗浄操作を行うため、感染阻害物質を除去することが可能です。得られたウイルスを 4 ~ 10 倍以上に希釈して用いる場合は、次項に示す SN 感染法でも同等の遺伝子導入効率が得られますが、ウイルスベクターの力価や標的細胞によっても阻害の影響は異なってくるため、安定な導入効率を得るには RBV 感染法を推奨しています。

[VII-1-1. で示した 24 ウェル RetroNectin コートプレートを用いた場合]

- (1) 得られたウイルス液を血清培地で希釈し、1 ウェルあたり 250 ~ 500  $\mu\text{l}$  のウイルス原液、あるいは希釈液を添加する。
- (2) 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 4 時間静置し、RetroNectin 上へのウイルス粒子の吸着を促す。
- (3) RetroNectin 上に結合させたウイルスが乾燥しないように注意しながら、ウイルス液を除去し、1 ウェルあたり 500  $\mu\text{l}$  の PBS を添加して洗浄する。
- (4) 標的細胞 (K562 細胞など) の懸濁液を調製し、1 ウェルあたり 1 ~ 5 × 10<sup>4</sup> 個となるように添加する。

(注) 細胞密度は実験の目的に応じて、標的細胞が RetroNectin に接着する範囲で実施してください。

- (5) 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。

---

### VII-1-3. 遠心法を利用した RetroNectin Bound Virus (RBV) 感染法

レトロウイルスベクターの力価が十分高い場合、VII-1-2. で示したように、静置によって RetroNectin 上へのウイルスの吸着を促すことも可能です。しかし、レトロウイルスベクターの力価が低い場合、あるいはより高効率に細胞への遺伝子導入を行いたい場合には、次に示すような遠心による RetroNectin 上へのウイルス結合法も有効です。この場合、レトロウイルスベクターを結合させる時間は静置の場合の 4～6 時間から 2 時間へ短縮することが可能です。

この方法では 32℃、1,000～2,000 × *g*、2 時間の遠心に耐え得る容器が必要で、たとえばノントリートマルチウェルプレートやポリスチレン遠心管、ポリプロピレン遠心管が使用できますが、エアロゾルの発生があり得ることを十分注意して封じ込めの措置を講じて使用してください。

[VII-1-1. で示した 24 ウェル RetroNectin コートプレートを用いる場合]

- (1) 96 穴プレート対応遠心機を 1,000～2,000 × *g*、32℃にセットして運転しておき、チャンバー内を 32℃に加温しておく（加温機能がなくても発熱により 32℃に加温できる）。
- (2) ウイルス液を必要に応じて血清培地等で希釈し、1 ウェルあたり 250～1,000  $\mu$ l のウイルス液を添加する（遠心力をかけてウイルスを沈降させるため、液量が多いほど、高効率の遺伝子導入が期待できる）。遠心機にセットし、32℃、1,000～2,000 × *g*、2 時間遠心し、RetroNectin 上へのウイルス粒子の結合を促す。
- (3) RetroNectin 上に結合されたウイルスが乾燥しないように注意しながら、ウイルス液を除去し、1 ウェルあたり 500  $\mu$ l の PBS を添加して洗浄する。
- (4) 標的細胞の懸濁液を調製し、1 ウェルあたり 1～5 × 10<sup>4</sup> 個となるように添加する。  
(注) 細胞密度は、実験の目的に応じて標的細胞が RetroNectin に接着する範囲で実施してください。
- (5) 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。

### VII-1-4. Supernatant (SN) 感染法

得られたウイルス液を原液で使用する場合は、VII-1-2. で示した RBV 感染法を推奨していますが、4～10 倍以上に希釈して用いる場合には本 SN 感染法で、RBV 感染法と同等の遺伝子導入効率を得ることができます。状況に応じて選択してください。SN 感染法は RBV 感染法と比較し、ウイルス感染に要する時間が非常に短縮されているのが特徴です。なおウイルスベクターの力価や標的細胞によっては希釈したウイルスでも阻害の影響が出る場合がありますのでご注意ください。

- (1) 標的細胞 (K562 細胞など) を血清培地で希釈したウイルス液で 4 × 10<sup>4</sup> cells/ml に調製する。
- (2) RetroNectin コートプレートの 1 ウェルに上記の細胞懸濁液を 500  $\mu$ l 添加する (1 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>)。
- (3) 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。

## VII-2. ポリブレンを用いる場合

- (1) 感染前日、 $0.5 \sim 2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> (細胞株によって異なる) で組織細胞培養用シャーレに細胞を播種する。
- (2) 希釈ウイルス液に終濃度が 8  $\mu$ g/ml となるようポリブレンを添加する。ウイルス液は原液を使用すると感染阻害が起こる可能性があるため、血清培地で 4 ~ 10 倍以上に希釈したものをを用いる。(ウイルスベクターの力価や標的細胞によっては希釈したウイルスでも阻害の影響が出る場合がありますのでご注意ください。)
- (3) シャーレから培地を吸引除去し、速やかに (2) で調製したウイルス液を 100 ~ 250  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> で加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。
- (4) 4 ~ 6 時間後、ポリブレンの細胞毒性を避けるために必要に応じて血清培地を添加する。

### 【ウイルス調製細胞、感染方法の違いによる遺伝子導入効率の比較】

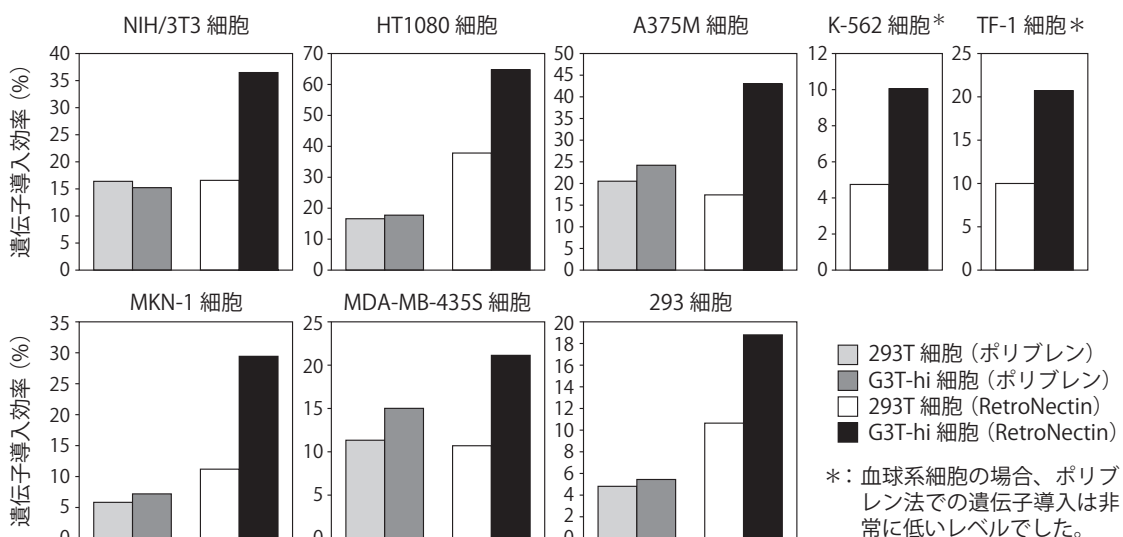


図 3. 293T 細胞と G3T-hi 細胞を用いて調製したウイルス液の各種標的細胞への遺伝子導入効率の比較

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 Amphi を用いて 293T 細胞と G3T-hi 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 K562 細胞、TF-1 細胞へ、ポリブレン法および RetroNectin を用いた Supernatant (SN) 感染法で感染させた。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。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うけることにより、RetroNectin への親和性が向上し、標的細胞への遺伝子導入効率が上昇することが示された。

---

## VIII. 参考文献

- 1) Ihara Y, Nishikawa A, Tohma T, Soejima H, Niikawa N, and Taniguchi N. cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of human *N*-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III). *J Biochem.* (1993) **113**: 692-698.
- 2) Pear W S, Nolan G P, Scott M L, and Baltimore D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transduction. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1993) **90**: 8392-8396.
- 3) Kimizuka F, Taguchi Y, Ohdate Y, Kawase Y, Shimojo T, Hashino K, Kato I, Sekiguchi K, and Titani K. Production and characterization of functional domains of human fibronectin expressed in *Escherichia coli*. *J Biochem.* (1991) **110**: 284-291.
- 4) Hanenberg H, Xiao X L, Dilloo D, Hashino K, Kato I, and Williams D A. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med.* (1996) **2**: 876-882.
- 5) Hanenberg H, Hashino K, Konishi H, Hock R A, Kato I, and Williams D A. Optimization of fibronectin-assisted retroviral gene transfer into human CD34+ hematopoietic cells. *Hum Gene Ther.* (1997) **8**: 2193-2206.
- 6) Chono H, Yoshioka H, Ueno M, and Kato I. Removal of inhibitory substance with recombinant fibronectin-CH-296 plates enhances the retroviral transduction efficiency of CD34+CD38- bone marrow cells. *J Biochem.* (2001) **130**: 331-334.
- 7) BIO VIEW 47 号 13 ~ 15 ページ

## IX. 関連製品

- [ 細胞凍結保存液 ]  
CELLBANKER 1 (製品コード CB011/CB013)
- [ レトロウイルスベクタープラスミド ]  
pDON-5 Neo DNA (製品コード 3657)  
pDON-5 DNA (製品コード 3658)  
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)
- [ siRNA 発現用レトロウイルスベクター ]  
pSINsi-hH1 DNA (製品コード 3660)  
pSINsi-hU6 DNA (製品コード 3661)  
pSINsi-mU6 DNA (製品コード 3662)
- [ ダブルノックアウトタイプの siRNA 発現用レトロウイルスベクター ]  
pSINsi-DK I DNA Set (製品コード 3663)  
pSINsi-DK II DNA Set (製品コード 3664)
- [ 標的細胞への遺伝子導入 ]  
Retrovirus Constructive System Eco (製品コード 6164)  
Retrovirus Packaging Kit Eco (製品コード 6160)  
Retrovirus Packaging Kit Ampho (製品コード 6161)  
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)
- [ レトロウイルスカバレッジの測定試薬 ]  
Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) (製品コード 6166)
- [ ヒト iPS 細胞誘導用組換えレトロウイルスの調製 ]  
Human iPS Cell Generation™ All-in-One Vector (製品コード 3671)

## X. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- 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。
- RetroNectin はタカラバイオ株式会社の登録商標です。Cell Generation はタカラバイオ株式会社の商標です。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。

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**