

製品コード 6194、6950 ~ 6955

研究用

---

# Takara

**Lentiviral High Titer Packaging Mix  
with pLVSIN シリーズ**

---

説明書

## I. はじめに

### A. 組換えレンチウイルスを用いた遺伝子の導入と発現

組換えレンチウイルスは、初代培養細胞、幹細胞、神経細胞、非分裂細胞などを含めたほぼすべての哺乳類細胞に遺伝子導入可能なウイルスベクターです。

SIN (Self Inactivating) 型の pLVSIN シリーズ (pLVSIN-CMV Vector、pLVSIN-EF1  $\alpha$  Vector ; 製品コード 6181 ~ 6186) と Lentiviral High Titer Packaging Mix (製品コード 6194) を組み合わせて用いる発現システムでは、目的遺伝子を搭載した pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドと Lentiviral High Titer Packaging Mix を共に Lenti-X™ 293T 細胞 (Lenti-X 293T Cell Line ; 製品コード 632180) にコトランスフェクトすることにより、複製能のない組換えビリオン (ウイルス粒子) を容易に調製できます。Lentiviral High Titer Packaging Mix は高力価のレンチウイルスベクター調製のために最適化されたプラスミド混合物であり、ほとんどのタイプの細胞に感染可能な VSV-G エンベロープを持つ高力価な pseudotype のレンチウイルスベクターの調製が可能です。本システムを使用することで広範囲の細胞種指向性を持ち、安全性が高く高力価の非増殖型レンチウイルスベクターが得られ、優れた導入遺伝子発現を実現することができます。

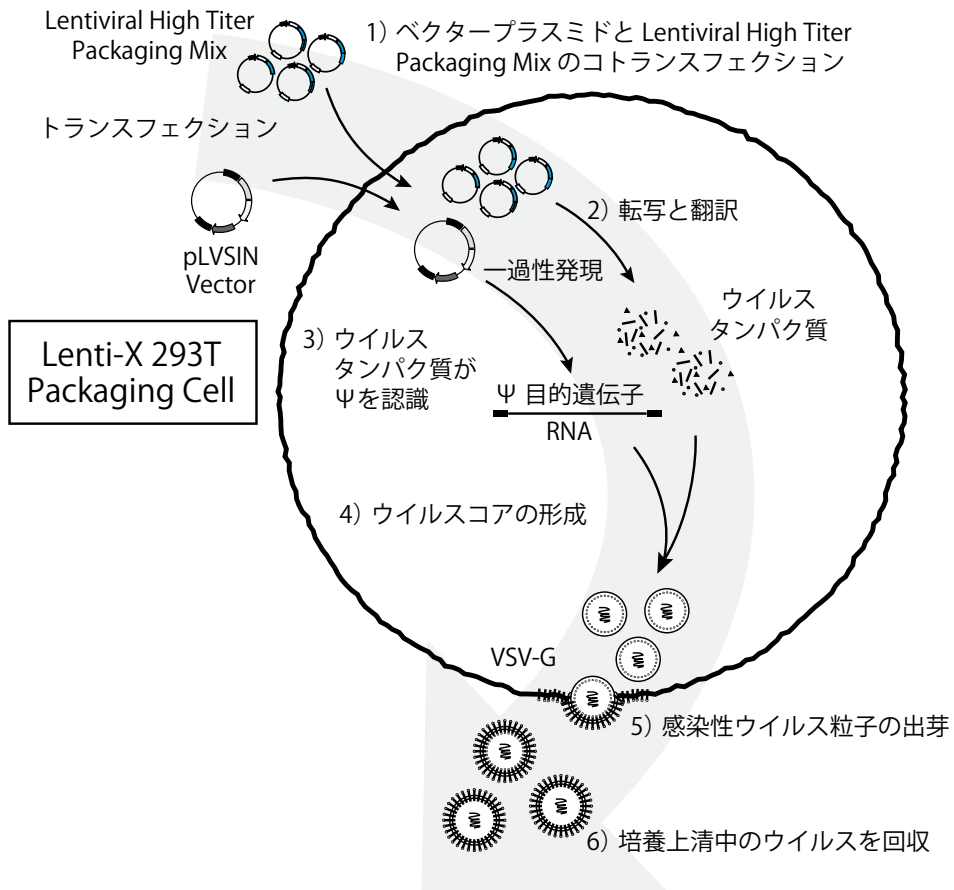
### B. Lentiviral High Titer Packaging Mix

Lentiviral High Titer Packaging Mix は、レンチウイルスベクター調製に必要なコンポーネントを発現するプラスミドを最適な比率で混合し、ウイルスパッケージングに必要なコンポーネントを最適な比率で発現するよう設計することで、高力価のレンチウイルスベクターを得ることを可能にした製品です。導入したい pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドと Packaging Mix を Lenti-X 293T 細胞にコトランスフェクトすることで、Packaging Mix より HIV-1 由来の Gag、Pol、Tat、Rev のレンチウイルスタンパク質と、VSV-G エンベロープタンパク質が一過性に発現されます。そして、pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドから転写された組換えウイルス RNA は完全なウイルス粒子の中に取り込まれます (図 1)。この最適化された Packaging Mix と Lenti-X 293T 細胞、さらに高効率トランスフェクション試薬 *TransIT-293 Transfection Reagent* (製品コード MIR2700) の組み合わせにより、高いウイルス力価を有するレンチウイルスベクター液を取得することができ、多くの場合、取得したレンチウイルスベクター液を濃縮することなく、直接、標的細胞の感染に使用できます。

### C. pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミド

pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドは SIN 型のレンチウイルスベクタープラスミドで、HIV-1 LTR (5'LTR および 3'LTR/ $\Delta$ U3) とレンチウイルスパッケージングシグナル ( $\Psi$ ) とともに、導入遺伝子の発現やウイルス力価、ベクター全体の機能を向上させる各種配列を含んでいます。

- **WPRE** (ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント) :  
WPRE はポリ A 部位のリードスルーを防ぎ、RNA のプロセッシングと成熟を促進し、RNA の核外への輸送を増大させます (Zufferey, *et al.*, 1999; Higashimoto, *et al.*, 2007)。この WPRE は、パッケージング細胞内のウイルスゲノム転写物に作用してベクターパッケージングを促進し、ウイルス力価を増大させます。さらにベクターの内部プロモーターによって産生される mRNA の成熟を促進するため、遺伝子導入された標的細胞内の目的遺伝子の発現を促進します。
- **cPPT/CTS** (セントラルポリプリン配列/セントラルターミネーション配列) :  
cPPT と CTS によって形成される "DNA フラップ" は、標的細胞への感染過程においてウイルスゲノムの核内への輸送を促進します。そのため、cPPT/CTS エレメントはベクターのゲノムへの組込みと遺伝子導入効率を向上させます (Zennou, *et al.*, 2000)。
- **RRE** (Rev 応答エレメント) :  
スプライシングされていないウイルスゲノム RNA の核外への輸送を促進することで、ウイルス力価を向上させます (Cochrane, *et al.*, 1990)。



**図 1. Lentiviral High Titer Packaging Mix と Lenti-X 293T 細胞を用いたレンチウイルスの産生**

Lentiviral High Titer Packaging Mix と目的遺伝子を挿入した pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドをコトランスフェクトする (ステップ 1) と、対応する組換えレンチウイルスゲノム RNA 転写物とウイルスパッケージングタンパク質が産生される (ステップ 2)。組換えウイルス RNA ゲノム上のパッケージング配列 (Ψ) がパッケージングタンパク質に認識されると (ステップ 3)、組換えウイルス RNA ゲノムがパッケージングタンパク質に取り込まれてウイルスコアが形成され、コアが細胞膜に輸送される (ステップ 4)。その場所で、コアは VSV-G エンベロープタンパク質を含む細胞膜によって包まれる。成熟した感染性のビリオン (ウイルス粒子) が細胞から出芽し (ステップ 5)、培地中に放出される。培地からウイルス粒子を回収する (ステップ 6)。

ウイルス粒子は感染力があるが、標的細胞内での複製・増殖に必要ないくつかの遺伝子を欠いている。ウイルスタンパク質を発現するのに必要なプラスミドを複数用いているため、頻度の低い組換えが何度も起こらないと、複製能をもつウイルスは生成しない。その意味で、この方法は非常に安全なウイルス生産法といえる。

## D. バイオセーフティーについて

pLV SIN レンチウイルスベクタープラスミドは、本製品により調製した遺伝子組換えレンチウイルスと野生型 Human immunodeficiency virus 1 型 (HIV-1) との予期せぬ重複感染などの特殊な条件下においても、自立的な増殖力および感染力を保持せず、かつ、哺乳動物などに対する病原性を獲得することがないように、カルタヘナ法令 研究開発二種省令 (平成 16 年文部科学・環境省令第 1 号) および告示 (平成 16 年文科省告示第 7 号) における「HIV-1 の増殖力等欠損株」(実験分類クラス 2) に要求される以下の 3 つの要件をすべて満たした、安全性に十分配慮した設計となっています。

1. HIV-1 由来の調節遺伝子およびアクセサリ遺伝子 (*nef, vif, vpr, vpu*) および制御遺伝子 (*tat, rev*) のすべての機能を欠損している。
2. 構造遺伝子 (*gag, pol, env*) の固有部分をすべて欠損している。
3. プロウイルスにおいて LTR のプロモーター活性を持たないように、3'LTR の U3 領域にあるエンハンサー配列とプロモーター配列を欠損している。

「HIV-1 の増殖力等欠損株」としての要件は、平成 17 年 10 月 14 日付 科学技術・学術審議会 生命倫理・安全部会 遺伝子組換え技術等専門委員会によるポジションペーパー「Human immunodeficiency virus (HIV) 1 型の増殖力等欠損株の解釈について」に示されています。従って、pLV SIN レンチウイルスベクタープラスミドに、哺乳動物等に対する病原性もしくは伝達性に関係しないクラス 2 以下の供与核酸 (発現目的の遺伝子) をクローニングし、Lentiviral High Titer Packaging Mix を用いて組換えレンチウイルスのパッケージング形成を行う遺伝子組換え実験は機関実験 (P2) とすることが可能です。

Lentiviral High Titer Packaging Mix は、RCL (replication-competent lentivirus) の出現の可能性を最小化するための安全な設計が行われています。

注：本ベクター製品を改変した組換えレンチウイルスを利用される場合、改変内容によっては、実験分類がクラス 3 以上に分類される場合があります。こうした遺伝子組換え実験を行う場合は、事前に文部科学大臣による拡散防止措置の確認 (承認) が必要となりますのでご注意ください。

製品使用の際には「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律 (通称カルタヘナ法)」と関連政省令、告示および所属機関内の安全委員会の規定に従い、執るべき拡散防止措置施設の下で実験を開始してください。組換えウイルスの保管、運搬についても法令を順守してください。研究開発二種省令の詳細は文部科学省研究振興局ライフサイエンス課のホームページをご確認ください。

<https://www.lifescience.mext.go.jp/bioethics/anzen.html#kumikae>

## II. 製品の内容

### Lentiviral High Titer Packaging Mix (製品コード 6194)

Lentiviral High Titer Packaging Mix 60 回\* (140  $\mu$ l  $\times$  3)

\*：100 mm dish 使用の場合の回数です。

### Lentiviral High Titer Packaging Mix (pLV SIN-CMV Neo Vector) (製品コード 6950)

### Lentiviral High Titer Packaging Mix (pLV SIN-CMV Hyg Vector) (製品コード 6951)

### Lentiviral High Titer Packaging Mix (pLV SIN-CMV Pur Vector) (製品コード 6952)

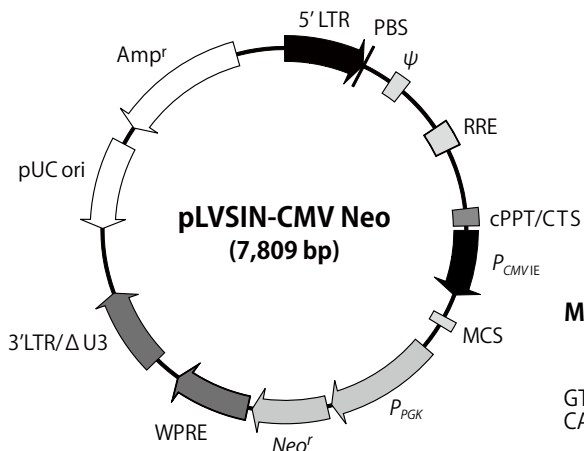
### Lentiviral High Titer Packaging Mix (pLV SIN-EF1 $\alpha$ Neo Vector) (製品コード 6953)

### Lentiviral High Titer Packaging Mix (pLV SIN-EF1 $\alpha$ Hyg Vector) (製品コード 6954)

### Lentiviral High Titer Packaging Mix (pLV SIN-EF1 $\alpha$ Pur Vector) (製品コード 6955)

製品コード 6950 ~ 6955 は、Lentiviral High Titer Packaging Mix (製品コード 6194) と各 pLV SIN Vector (製品コード 6181 ~ 6186) のセットです。

<ベクターマップ>

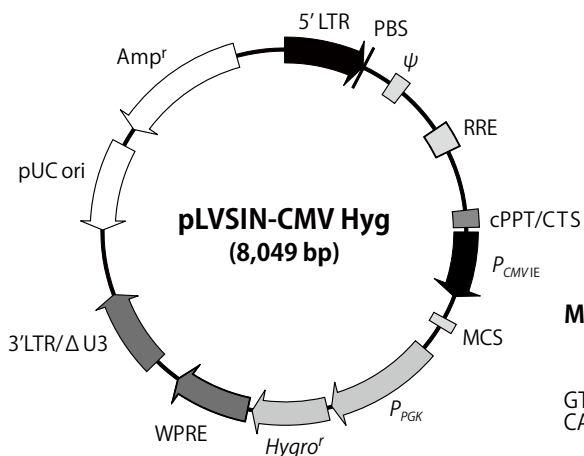


※製品コード 6950 に含まれています。

**MCS :**

EcoRI XhoI (SpeI) XbaI NotI BamHI  
 GTGAATTCC TCGAGACTAGTTCTAGAGCGGCCGCGGATCC  
 CACTTAAGGAGCTCTGATCAAGATCTCGCCGGCGCCTAGG

( ) : 他にもサイトが存在するため、  
クローニングには使用できない。

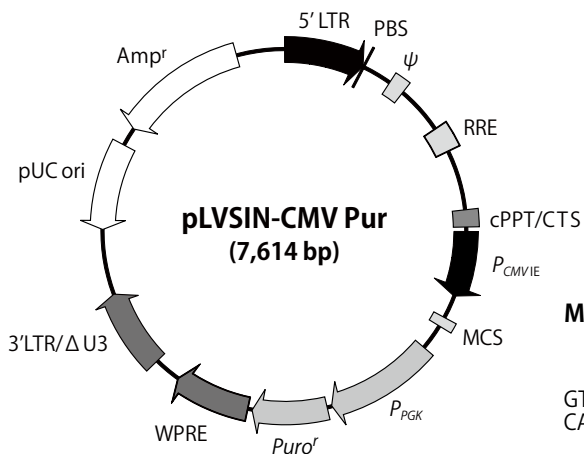


※製品コード 6951 に含まれています。

**MCS :**

EcoRI XhoI (SpeI) XbaI NotI BamHI  
 GTGAATTCC TCGAGACTAGTTCTAGAGCGGCCGCGGATCC  
 CACTTAAGGAGCTCTGATCAAGATCTCGCCGGCGCCTAGG

( ) : 他にもサイトが存在するため、  
クローニングには使用できない。

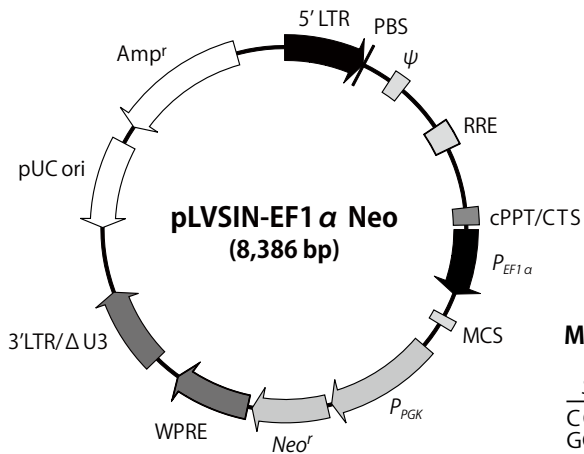


※製品コード 6952 に含まれています。

**MCS :**

EcoRI XhoI (SpeI) XbaI NotI BamHI  
 GTGAATTCC TCGAGACTAGTTCTAGAGCGGCCGCGGATCC  
 CACTTAAGGAGCTCTGATCAAGATCTCGCCGGCGCCTAGG

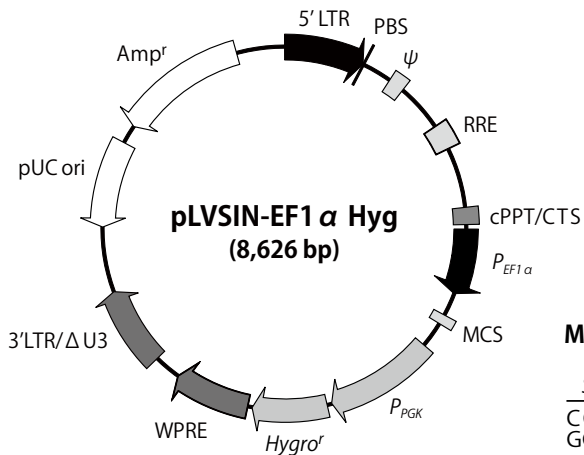
( ) : 他にもサイトが存在するため、  
クローニングには使用できない。



※製品コード 6953 に含まれています。

**MCS :**

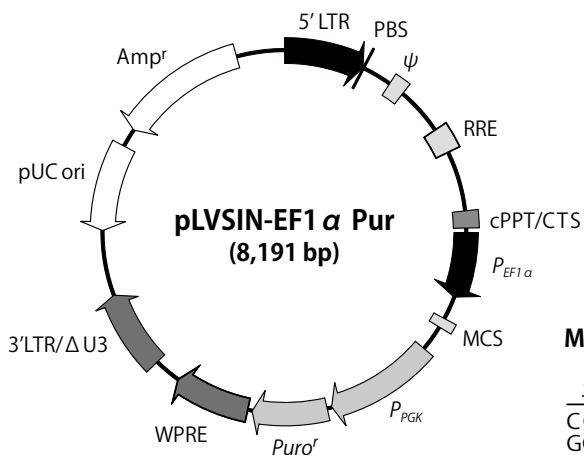
Sse8387 I Smi I (Swa I) Xba I Not I BamH I  
 CCTGCAGGATTTAAATCTAGAGCGGCCCGGGATCC  
 GGACGTCCTAAATTTAAGATCTCGCCGGCGCCTAGG



※製品コード 6954 に含まれています。

**MCS :**

Sse8387 I Smi I (Swa I) Xba I Not I BamH I  
 CCTGCAGGATTTAAATCTAGAGCGGCCCGGGATCC  
 GGACGTCCTAAATTTAAGATCTCGCCGGCGCCTAGG



※製品コード 6955 に含まれています。

**MCS :**

Sse8387 I Smi I (Swa I) Xba I Not I BamH I  
 CCTGCAGGATTTAAATCTAGAGCGGCCCGGGATCC  
 GGACGTCCTAAATTTAAGATCTCGCCGGCGCCTAGG

#### IV. その他必要な試薬など

##### A. レンチウイルスのパッケージングと力価測定に必要な細胞株

###### • Lenti-X 293T Cell Line (製品コード 632180)

ウイルス生産に最適化された HEK 293T 由来細胞株であり、高いトランスフェクション効率を示します (*Clontechniques*, October 2008)。高力価の感染性レンチウイルスを得るために、Lentiviral High Titer Packaging Mix と目的遺伝子を挿入した pLV SIN レンチウイルスベクタープラスミドを *TransIT-293 Transfection Reagent* を用いて Lenti-X 293T 細胞にコトランスフェクトします。トランスフェクトされた細胞は、高力価の組換えレンチウイルスを一過性に生産します。本細胞の代わりに HEK 293T 細胞株、例えば American Type Culture Collection (ATCC No. CRL-121) の HEK 293T/17 細胞株も使用できます。HEK293T 株にはいくつかの系統が市販されていますが、高いトランスフェクション効率の実績がある系統の使用をお勧めします。

###### • HT-1080 cell line

American Type Culture Collection HT-1080 (ATCC No. CCL-121) (推奨)。この細胞株は組換えレンチウイルスにより容易に遺伝子導入されるため、しばしばレンチウイルスの力価測定に用いられます。

##### B. 試薬類

- 下記のうちいずれかのトランスフェクション試薬\*1
  - a. *TransIT-293 Transfection Reagent* (製品コード MIR2704)
  - b. *CalPhos™ Mammalian Transfection Kit* (製品コード 631312)
- pLV SIN-AcGFP1-N1 Vector (ポジティブコントロール用：製品コード 6187)\*2

\* 1 : a は安定して高力価のレンチウイルスを取得するのに適しており、b は比較的安価にトランスフェクションを行うことができます。本製品を使用して高力価のレンチウイルスを取得するには *TransIT-293 Transfection Reagent* の使用を強く推奨します。

\* 2 : pLV SIN-AcGFP1-N1 Vector は蛍光タンパク質である AcGFP1 を発現するレンチウイルスベクタープラスミドであり、トランスフェクション効率の確認や、調製したレンチウイルスの生物学的力価を確認するためのポジティブコントロールとして使用するのに便利です。

##### C. 哺乳動物細胞培養用の培地など

- Lenti-X 293T Cell Line (製品コード 632180) および HT-1080 cell line 培養培地  
高濃度グルコース (4.5 g/L) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に 10% FBS を添加して使用します。
- 標的細胞の培養培地および添加物
- Penicillin/Streptomycin solution (10,000 units/ml Penicillin G sodium salt, 10,000  $\mu$ g/ml Streptomycin sulfate)
- Trypsin-EDTA
- Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)
- 細胞凍結保存液 (セルバンカーシリーズなど)

---

## D. 器具・装置

- ・細胞培養用プレート (100 mm、12 ウェルなど)、フラスコ
- ・滅菌チューブ (1.5 ml、2.0 ml、15 ml など) およびウイルス液凍結保存用バイアル
- ・ウイルス液濾過用 0.45  $\mu\text{m}$  フィルター  
注：ろ過を行う場合は、タンパク質の吸着力が弱い PolyVinylidene DiFluoride (PVDF)、酢酸セルロースまたは polyethersulfone (PES) フィルターを用います。ニトロセルロースはレンチウイルスのエンベロープ上の表面タンパク質と結合してウイルスを破壊するため、使用しないでください。
- ・細胞培養に必要な一般的な器具および設備

## E. レンチウイルス力価測定

正確で再現性のある遺伝子導入のために、レンチウイルスストック液の力価測定を強く推奨します。Lenti-X qRT-PCR Titration Kit (製品コード 631235) は、qRT-PCR を利用した迅速・簡便な力価測定キットです (*Clontechiques*, January 2008; Quinn, *et al.*, 1997)。本キットではインターカレーター法のリアルタイム PCR によりウイルス RNA ゲノムの存在量 (RNA タイター) を調べることで、ウイルスストック液の力価を約 4 時間で測定できます。Lenti-X p24 Rapid Titer Kit (製品コード 632200) では、ELISA 法を用いてウイルス上清中の p24 キャプシドタンパク質の量を測定します。測定した p24 キャプシドタンパク質量はウイルス力価と相関します。

また、Lenti-X GoStix™ Plus (製品コード 631280/ 631281) を用いると、ウイルス上清を 20  $\mu\text{l}$  使用して 10 分でレンチウイルス p24 を検出してウイルス量を簡易判定できます。ウイルス上清を回収するか、まだ培養を続けるかを判断するために有用です。

## F. レンチウイルスの精製

ウイルスを精製することで、遺伝子導入実験に悪影響を及ぼすおそれがある細胞夾雑物を除去することができます。Lenti-X Maxi Purification Kit (製品コード 631233/631234) は、クルードな上清から高純度レンチウイルスを精製するためのキットで、自然落下カラムを用いたプロトコールにより、インタクトで機能的なレンチウイルスを簡単、迅速、高効率で得ることができます。

## G. レンチウイルスの濃縮

Lenti-X Concentrator (製品コード 631231/631232) を用いると、超遠心を行わずにウイルス力価を 100 倍まで濃縮できます。濃縮されたレンチウイルスは高い MOI で標的細胞に感染できるため、さらにレンチウイルスを調製する必要がありません。(詳細は Appendix をご参照ください。)

## H. 遺伝子導入細胞の選択に用いる抗生物質

各耐性遺伝子をもつ LVSIN レンチウイルスによって遺伝子導入された標的細胞の薬剤選択、および対応するウイルスストック液の薬剤選択による力価測定には、G418 (製品コード 631307/631308)、Hygromycin B (製品コード 631309)、Puromycin (製品コード 631305/631306) をそれぞれ使用します。これらの抗生物質を使用する前に、Appendix に記載している方法に従って使用する細胞株に最適な選択濃度を求めておきます。

## I. レンチウイルスによる遺伝子導入の促進に用いるポリブレン

組換えレンチウイルスによる遺伝子導入の促進には、ポリブレン (Polybrene : Hexadimethrine bromide; Sigma-Aldrich Code. H9268) の添加が有効です。ポリブレンはポリカチオンで、ウイルスと細胞膜の電荷的反発を減少させます。標的細胞に対するポリブレンの最適濃度 (感染力が最大で毒性が最少となる濃度) を 2 ~ 12  $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲で実験的に求めておく必要があります。ポリブレンに特に悪影響を受ける細胞や造血系細胞の場合は RetroNectin® 試薬の使用を検討してください。



---

## J. レンチウイルスによる遺伝子導入の促進に用いる RetroNectin

RetroNectin (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (製品コード T100A/B) は組換えフィブロネクチン断片 (CH-296) で、レトロウイルスやレンチウイルスによる遺伝子導入効率を大きく向上させることができます (*Clontechniques*, October 2008)。RetroNectin は、組織培養プレート (ノントリートメント) にコーティングすることで、ウイルスと細胞の両方が結合する基質 (substratum) となります。この基質にウイルスと細胞が同時に接着することにより、細胞とウイルスの接触が増大し、遺伝子導入が促進されます。RetroNectin は、特に浮遊細胞 (リンパ球やリンパ球細胞株など) や遺伝子導入が困難な細胞 (造血幹細胞など)、あるいはポリブレンに特に弱い細胞に有用です。

## V. 目的遺伝子を搭載した pLV5IN レンチウイルスベクタープラスミドの構築

1. プラスミド DNA を増幅する場合には、大腸菌宿主株、例えば *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (製品コード 9028) などに導入し、市販のプラスミド精製キットを用いて精製します。
2. 標準的なクローニング技術を用いて、目的の遺伝子コード配列を pLV5IN レンチウイルスベクタープラスミドのマルチクローニングサイト (MCS) に挿入します。また、In-Fusion® HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer (製品コード 639634 など) も使用できます。このキットを用いると、PCR 産物をどのような直鎖状ベクターにも容易にクローニングできます。  
pLV5IN レンチウイルスベクタープラスミドの配列情報は、タカラバイオウェブカタログからダウンロードできます。

**注:** 目的遺伝子配列 (cDNA あるいは遺伝子断片) は ATG 開始コドンと終始コドンを含む配列で挿入します。Kozak consensus ribosome binding site (Kozak, 1987) を付加すると発現レベルが向上する可能性があります。一方、遺伝子断片あるいは cDNA にポリ A シグナルは不要です。このような配列をウイルス LTR 間に挿入すると、ウイルスゲノムの転写過程で未成熟の分解とポリ A 化が起こり、機能的な組換えビリオン (ウイルス粒子) の産生が妨げられることがあります (Coffin, *et al.*, 1997)。

3. パッケージング細胞のトランスフェクションに適したグレードのプラスミド DNA 調製を行います。

(参考) NucleoBond Xtra Midi/Maxi (製品コード 740410.10、740414.10 など) の使用を推奨します。また、同キットを用いた場合でも、取得したプラスミド DNA を  $14,000 \times g$  で 10 分間遠心し、その上清をプラスミド DNA 溶液として回収することで、トランスフェクションに適した、さらに高純度のプラスミド DNA 溶液の取得が可能です。

## VI. pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドからの組換えレンチウイルスの産生

### プロトコール：Lenti-X 293T 細胞と Lentiviral High Titer Packaging Mix を用いた組換えレンチウイルスの産生

Lentiviral High Titer Packaging Mix を用いて高力価のレンチウイルスを得るには、Lenti-X 293T 細胞を使用し、以下のプロトコールに厳密に従う必要があります。特に、(1) 培養サイズと容量、(2) DNA の量とトランスフェクションに適した品質、(3) インキュベーション時間は厳守してください。

以下のプロトコールは、pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドと Lentiviral High Titer Packaging Mix を用いて、Lenti-X293T 細胞へ導入してウイルス産生を行うことを前提に最適化されています。

すべてのステップは安全キャビネットの中で行ってください。レンチウイルスの取扱いには、レンチウイルスの使用を承認されたバイオセーフティーレベルの設備が必要です。HIV-1 由来ベクターでパッケージングされた組換えレンチウイルスはヒト細胞への感染力があります。適切な安全措置を講じてください。

#### VI-1. Lenti-X 293T 細胞播種

Lenti-X 293T 細胞を 100 mm 細胞培養用ディッシュに  $5.0 \times 10^6$  cells/10 ml/dish で播種\*1し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C にて一晩培養する。培地には 10% FBS 含有 DMEM 培地を使用する。1% Penicillin-Streptomycin を添加した DMEM 培地も使用できる。

\* 1：トランスフェクション試薬に CalPhos Mammalian Transfection Kit (製品コード 631312) を使用する場合は  $2.5 \times 10^6$  cells/10 ml/dish で播種する。

#### VI-2. トランスフェクション (細胞播種翌日)

pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドと Lentiviral High Titer Packaging Mix を Lenti-X 293T 細胞へトランスフェクトする。トランスフェクション試薬は以下の 2 種類を推奨。

- TransIT-293* Transfection Reagent (製品コード MIR2704)
- CalPhos Mammalian Transfection Kit (製品コード 631312)

注：a は安定して高力価のレンチウイルスを取得するのに適しており、b は比較的安価にトランスフェクションを行うことができます。本製品を使用して高力価のレンチウイルスを取得するには *TransIT-293* Transfection Reagent の使用を強く推奨します。

以下に、それぞれの試薬を使用した場合のトランスフェクションプロトコールを紹介します。

##### a. *TransIT-293* Transfection Reagent (製品コード MIR2704) を使用する場合 (手順の詳細は *TransIT-293* Transfection Reagent の取扱説明書をご参照ください。)

- TransIT-293* Transfection Reagent を室温に戻し、使用前にボルテックスで混合する。
- 2.0 ml チューブを使用し、以下の混合比で無血清の DMEM とプラスミド DNA を混合し、穏やかにピペティングして完全に混合する。

試薬	使用量
Lentiviral High Titer Packaging Mix	7 $\mu$ l
0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l pLVSIN Vector	11 $\mu$ l
無血清 DMEM	1,500 $\mu$ l
Total	1,518 $\mu$ l

3. 2. で作製した混合液に 45  $\mu$ l の TransIT-293 Transfection Reagent を添加し、穏やかにピペティングして混合し、15 ~ 30 分、室温で静置する。
4. 前日に播種した Lenti-X 293T 細胞に 3. の混合液をすべて滴下し、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C にて培養を続ける。

#### b. CalPhos Mammalian Transfection Kit (製品コード 631312) を使用する場合

より高力価なレンチウイルスを取得するため、以下のプロトコールは CalPhos Mammalian Transfection Kit に添付のプロトコールを、本キットへの使用に合わせて一部改良しています。

1. 2 × HEPES-Buffered Saline、2 M Calcium Solution、Sterile H<sub>2</sub>O を室温に戻しておく。
2. 以下の混合比でプラスミド DNA とカルシウム溶液を 15 ml チューブ中で混合する。

試薬	使用量
Lentiviral High Titer Packaging Mix	7 $\mu$ l
0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l pLV5IN Vector	11 $\mu$ l
2 M Calcium Solution	87 $\mu$ l
Sterile H <sub>2</sub> O	595 $\mu$ l
Total	700 $\mu$ l

3. 2 × HEPES-Buffered Saline が室温に戻っていることを確認し、2. の総量と等量 (700  $\mu$ l) の 2 × HEPES-Buffered Saline を添加し、チューブにフタをして上下に 15 回激しく振って混和する。
4. 5 分間室温にて静置する。  
注：静置時間は 5 分間を厳守し、5 分経過後は速やかに次の工程に進んでください。静置時間が長くなるとリン酸カルシウム-DNA の結晶が大きくなりすぎて、トランスフェクション効率が低下することがあります。
5. 前日に播種した Lenti-X 293T 細胞に 4. の混合液を滴下し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C にて培養を続ける。

#### VI-3. 培地交換

トランスフェクションから約 24 時間後に新しい 10% FBS 含有 DMEM 10 ml に交換する。1% Penicillin-Streptomycin を添加した DMEM 培地も使用できる。

注：CalPhos Mammalian Transfection Kit を使用してトランスフェクションを実施した場合は、顕微鏡観察により、リン酸カルシウムの結晶を確認することができます。

#### VI-4. レンチウイルス液の回収

1. トランスフェクションから約 48 時間後にレンチウイルスを含む培養上清を回収する。
2. 回収した培養上清を 0.45  $\mu$ m フィルターでろ過し、これをレンチウイルス液とする。

調製したレンチウイルス液は、直ちに使用しない場合、- 80°C で長期間保存することができます。凍結融解を繰り返すごとにウイルス力価は低下しますので少量ずつ分注して保存することをお勧めします。(Higashikawa, et al., 2001)

---

## VII. 組換えレンチウイルスの力価測定

### A. 各種力価測定方法

最適な多重感染度 (MOI) を調べて再現性のある遺伝子導入 (トランスダクション) 結果を得るためには、調製したレンチウイルスストック液の力価を測定することが必要です。回収したばかりのレンチウイルスストック液を用いて力価を直ちに測定することもできますし、少量ずつ分注して  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存してから力価を測定することもできます。凍結融解を繰り返すたびにウイルスストック液の力価が  $1/2 \sim 1/4$  低下することに注意してください。力価の値は、細胞のタイプと使用する力価測定法に大きく依存します。さらに、力価測定に一般的に用いられる細胞 (例えば HT-1080 細胞株) で求めた力価と最終的に遺伝子導入された標的細胞の数との間で、大きな差が出ることもあります。しかし力価測定は、種々のベクターから調製されたストック液の相対的なウイルス含量の決定のほか、以下のために重要です。

- ウイルスストック液の生存率の確認
- 最適な遺伝子導入条件の決定
- 遺伝子導入される細胞中のウイルスコピー数を制御するための MOI の調整
- ウイルスストック液によって感染させることができる細胞の最大数の決定

力価測定は、マーカーの存在やそのタイプに応じて、種々の方法で行うことができます。

#### • qRT-PCR

Lenti-X qRT-PCR Titration Kit (製品コード 631235) を用いれば、インターカレーター法の 1 ステップ qRT-PCR で上清中の RNA タイターを迅速に約 4 時間で測定することができます。この方法は、マーカーに関係なく、どのようなレンチウイルスベクターにも使用でき、種々のベクターの力価比較や、回収したばかりのウイルスストック液の力価測定に有用です。

#### • p24 ELISA

Lenti-X p24 Rapid Titer Kit (製品コード 632200) は ELISA 法を用いてウイルス上清中の p24 キャプシドタンパク質の量を測定します。p24 の量はウイルス力価と相關します。本アッセイの所要時間は約 4 時間です。

#### • フローサイトメトリー

蛍光タンパク質搭載のレンチウイルスベクターの場合、フローサイトメトリーにより蛍光値を測定することで、導入効率を測定することができます。(B. フローサイトメーターを用いた生物学的力価測定法参照。)

#### • 抗生物質選択

選択マーカーを含むレンチウイルスベクターの場合、ウイルスストック液の段階希釈系列を作製してそれぞれを細胞に感染させ、適切な抗生物質を用いて安定な遺伝子導入細胞を選択します。選択終了後に増殖する薬剤耐性コロニーの数から力価を計算します。

[備考] Lenti-X GoStix Plus は、ウイルス上清  $20 \mu\text{l}$  と Chase Buffer を GoStix に加えるだけの簡単な操作で 10 分でレンチウイルス量を簡易判定できます。パッケージング細胞の培養上清からウイルスを回収するか培養を続けるかを判断する際に非常に便利です。

## B. フローサイトメーターを用いた生物学的力価測定法

生物学的力価の測定では、導入する遺伝子発現を検出してその力価を算出します。以下に蛍光タンパク質である AcGFP1 遺伝子を搭載した pLVSIN-AcGFP1-N1 Vector (製品コード 6187) と Lentiviral High Titer Packaging Mix、TransIT-293 Transfection Reagent を使用して調製したレンチウイルスベクターの生物学的力価測定法を紹介します。

### B-1. HT-1080 細胞播種

HT-1080 細胞を 12 ウェル細胞培養用プレートに  $2.5 \times 10^4$  cells/1 ml/well で播種し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C にて培養する。

培地は 10% FBS 含有 DMEM 培地を使用する。1% Penicillin-Streptomycin を添加した DMEM 培地も使用できる。

### B-2. レンチウイルス感染 (細胞播種翌日)

1. 10% FBS 含有 DMEM 培地にポリブレンを添加する。(培地 450  $\mu$ l に対して 8 mg/ml ポリブレン溶液 0.5  $\mu$ l)
2. B-1. にて播種した HT-1080 細胞の培地を 450  $\mu$ l のポリブレン含有培地と交換する。
3. 調製したレンチウイルス液を 10% FBS 含有 DMEM で段階希釈する。希釈倍率はウイルス力価にもよるが、20 ~ 2,000 倍での段階希釈が望ましい。
4. 希釈したレンチウイルス液 50  $\mu$ l を 2. の HT-1080 細胞に滴下し、感染させる。(ポリブレン終濃度 8  $\mu$ g/ml、ウイルス最終希釈倍率 200 ~ 20,000 倍)
5. 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C にて一晩培養する。

### B-3. 培地交換

1. 翌日にウイルス含有培地を 1 ml の 10% FBS 含有 DMEM に交換する。
2. 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C にて二晩培養する。

### B-4. フローサイトメーターで評価

翌々日 (感染から 3 日後)、細胞を Trypsin/EDTA で剥がして回収し、フローサイトメーターにて AcGFP1 陽性率を測定する。

### B-5. Viral biological titer の算出

得られた AcGFP1 陽性率を以下の式に当てはめて生物学的力価 (IFU/ml) を算出する。計算に使用する AcGFP1 陽性率は 1.0 ~ 20.0% が望ましい。

$$\text{Titer (IFU/ml)} = \text{感染細胞数} \times \text{AcGFP1 陽性率 (\%)} / 100 \times \text{ウイルス希釈倍率} / \text{感染時液量 (0.5 ml)}$$

注：厳密に生物学的力価を算出したい場合は、HT-1080 細胞を播種する際にセルカウント用のウェルを作製することをお勧めします。レンチウイルスの感染日に HT-1080 細胞をセルカウントすることで感染時の正確な細胞数が得られます。

## VIII. 組換えレンチウイルスを用いた標的細胞への遺伝子導入（トランスダクション）例

### VIII-1. ポリブレン法

以下に示すプロトコールは、ポリブレンを用いて接着性細胞株（HT-1080、HeLa など）に遺伝子導入する一般的な方法です。標的細胞に対するポリブレンの最適濃度を実験的に求めて使用しますが、通常、2～12  $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲に入ります。しかし、ポリブレンに過剰（24 時間よりも長く）にさらすと、細胞毒性が現れます。本プロトコールを参考に、使用する標的細胞への遺伝子導入最適条件を検討してください。遺伝子導入が困難な細胞あるいはポリブレンに弱い細胞の場合は、RetroNectin (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (製品コード T100A/B) を用いると、遺伝子導入効率を著しく向上させることができます。（詳細は VIII-2. をご参照ください。）

1. 遺伝子導入の前日に標的細胞を播種する。
2. 力価測定した少量のレンチウイルスストック液を融解する。あるいは、パッケージング細胞から調製した直後のウイルス液を用いる。融解したレンチウイルスを穏やかに混合する。  
注：ボルテックスで攪拌しないでください。また、凍結融解のたびに力価が減少するので注意が必要です。
3. レンチウイルス液とポリブレンを添加できるように、標的細胞の培地の容量を調整する。遺伝子導入の過程で目的の最終濃度（例えば 4  $\mu\text{g/ml}$ ）となるようにポリブレンを添加する。
4. 目的の多重感染度 (MOI) が得られるように、レンチウイルス液を培地で希釈する。ウイルス力価が不明な場合は、レンチウイルス液の段階希釈系列を用いる。この場合、ウイルス液の全量が、遺伝子導入に用いる培地の最終容量の 1/3 以下となるようにする。
5. ウイルス上清を細胞に加え、8～24 時間、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。感染効率を向上させたい場合は、培養液を遠心後（プレートを 32°C で 1,200 × g、60～90 分遠心すると、感染率が著しく増大する。32°C が使えない場合は、室温遠心でもよい）、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。ポリブレンあるいはウイルス上清（パッケージング細胞によってコンディショニングされた培地を含む）に細胞を長くさらすことが心配な場合は、遺伝子導入の時間を 6～8 時間に短縮してもよい。
6. ウイルスを含む遺伝子導入培地（トランスダクション培地）を除去して、新しい培地を加える。  
注：廃棄する培地には感染能を持ったウイルスが含まれているので適切な処理を行ってください。
7. 十分な導入遺伝子発現が確認できるまで（通常、24～48 時間）、感染細胞を培養する。
8. 解析のために細胞を回収する。あるいは、適切な抗生物質を用いて選択を始める。  
注：遺伝子導入効率を求めるために、感染細胞の一部を抗生物質選択に供し、残りの細胞を回収して分析に用いることをお勧めします。

## VIII-2. RBV-spin 法

### A. RetroNectin コートプレートの作製

1. RetroNectin 溶液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）。使用時に滅菌済み PBS で適当な濃度（20～100  $\mu\text{g/ml}$ ）<sup>\*1</sup> となるように希釈する。  
\* 1：フィルターに吸着する可能性があるため、希釈後の RetroNectin 溶液はフィルターろ過しない。
2. クリーンベンチ内で、0.25～0.5  $\text{ml/cm}^2$ （プレート底面が溶液で浸る程度）となるように RetroNectin 希釈液をプレート<sup>\*2</sup> に加えてプレート全底面に広げ、室温で2時間または4℃で一晩放置する。24ウェルプレートの場合には1ウェルあたり0.5 ml、6ウェルプレートの場合には1ウェルあたり2 ml の RetroNectin 希釈液を加える。  
\* 2：プレートは必ずノントリートメントタイプのものを使用する。
3. RetroNectin 希釈液を除き、適当量の2% BSA/PBS 溶液を加えてブロッキングを行う。室温で30分間放置する<sup>\*3</sup>。24ウェルプレートの場合には0.5 ml/well、6ウェルプレートの場合には2 ml/well のブロッキング液を加える。  
\* 3：すぐに使用する場合は、2% BSA/PBS 溶液によるブロッキング操作は省くことができる。この場合、ステップ4のPBSまたはHBSS/HEPESによる洗浄を2回繰り返す。
4. 2% BSA/PBS 溶液を除き、適当量のPBSまたはHBSS/HEPESで一度洗浄し、それらを除いた後、プレートを保存する。このプレートをRetroNectin コートプレート<sup>\*4</sup> とする。  
\* 4：2% BSA/PBS 溶液によるブロッキング操作を行った場合は、容器のふたをパラフィルムなどでシールし、4℃で1週間の保存が可能である。

### B. RetroNectin Bound Virus (RBV) -Spin 法（遠心感染）

注：マルチウェルプレートの場合、ウェル位置により導入率に差が生じることがある。できる限りプレート中央に近いウェルを使用することをお勧めします。

1. 目的遺伝子を持つ組換えウイルス液の原液、あるいは希釈液を RetroNectin コートプレート上に125～250  $\mu\text{l/cm}^2$  となるように加える。
2. 32℃で2,000  $\times g$ 、2時間の遠心を行い、RetroNectin へウイルス粒子を吸着させる。
3. プレート上が乾燥しないように注意しながら、ウイルス液を除去し、適当量のPBSまたは0.1～2%のアルブミン（BSAやHSA）を含むPBSを添加する（溶液は細胞へのウイルス感染直前まで除かない）。
4. 標的細胞懸濁液を調製する。適切な細胞濃度は標的細胞の大きさや増殖率によって異なる。細胞に応じて、0.05～5  $\times 10^5$  cells/ $\text{cm}^2$  の範囲で検討する。
5. 3. で作製したウイルス結合プレートの溶液を除去し、速やかに細胞懸濁液を加える。標的細胞とウイルスベクターの接触を促す目的で、細胞添加後、遠心操作を行っても良い。例えば500  $\times g$ 、1分間遠心など。
6. 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。

## IX. 参考データ

### IX-1. Lentiviral High Titer Packaging Mix と他社 Kit で調製した組換えレンチウイルスの力価比較

#### 【HT-1080 細胞】

本製品の Lentiviral High Titer Packaging Mix と pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドを使用することで高力価のレンチウイルスが得られます。以下に参考データとして他社のレンチウイルスベクタープラスミドおよびパッケージング Mix を使用した場合との比較データを示します。

#### <実験方法>

Lenti-X 293T 細胞に ZsGreen1 発現レンチウイルスベクタープラスミドとパッケージングプラスミドをコトランスフェクトしてレンチウイルスを取得した。レンチウイルスベクター調製条件は下記のとおりである。

	レンチウイルスベクタープラスミド	パッケージングプラスミド	遺伝子導入試薬
1	A 社	A 社	A 社
2	A 社	Lentiviral High Titer Packaging Mix	TransIT-293
3	pLVSIN-CMV-Pur-ZsG*	Lentiviral High Titer Packaging Mix	TransIT-293

\* : pLVSIN-CMV-Pur (製品コード 6183) に ZsGreen1 を搭載したベクタープラスミド

得られたレンチウイルスベクターの生物学的力価を HT-1080 細胞にて評価した。その結果を図 2. に示す。全てタカラバイオ製品を使用することにより、A 社製品と比較して約 5 倍以上高い力価のレンチウイルス液が得られた。また A 社レンチウイルスベクタープラスミドをタカラバイオ製品 (Lentiviral High Titer Packaging Mix と TransIT-293 Transfection Reagent) と組み合わせて使用することで約 4 倍高い力価のレンチウイルス液が得られた。

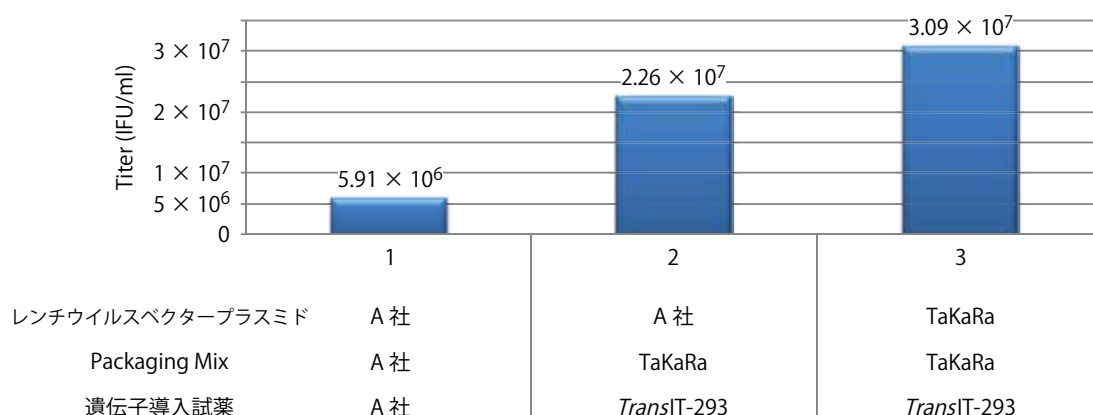


図 2. Lentiviral High Titer Packaging Mix と他社 Kit で調製したレンチウイルスの力価比較

(弊社比較データ)



## IX-2. Lentiviral High Titer Packaging Mix と他社 Kit で調製した組換えレンチウイルスの感染効率比較

### 【PBMC】

以下に参考データとしてヒト末梢血単核球 (PBMC) への感染効率について他社製品との比較データを示します。

#### <実験方法>

Lenti-X 293T 細胞に ZsGreen1 発現レンチウイルスベクタープラスミドとパッケージングプラスミドをコトランスフェクトしてレンチウイルスを取得した。レンチウイルスベクター調製条件は下記のとおりである。

	レンチウイルスベクタープラスミド	パッケージングプラスミド	遺伝子導入試薬
1	A 社	A 社	A 社
2	pLV5IN-CMV-Pur-ZsG	Lentiviral High Titer Packaging Mix	TransIT-293

得られたレンチウイルスベクターを 90 倍希釈し、ヒト末梢血単核球 (PBMC) に RetroNectin を使用して、RetroNectin Bound Virus (RBV)-Spin 法\*にて感染させた。その結果を図 3. に示す。CD8 陽性細胞中の ZsGreen1 陽性率が A 社の製品で調製したレンチウイルスベクターでは 10.3% であるのに対し、本製品で調製したレンチウイルスベクターでは 42.7% と約 4 倍の陽性率を示した。

\* RBV-Spin 法：RetroNectin コートプレートへ希釈したレンチウイルス液を添加し、32℃で 2,000 × g、2 時間遠心する。ウイルス液を除いた後、細胞懸濁液を添加して感染させる。

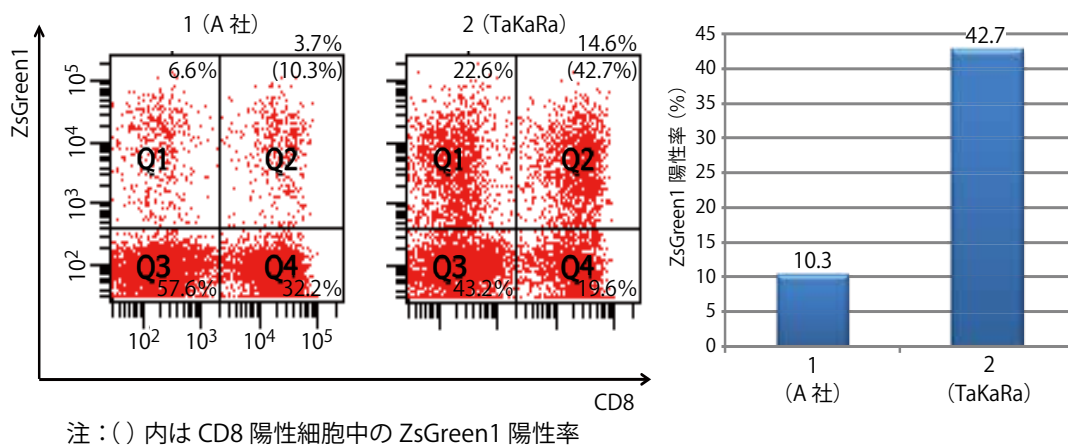


図 3. Lentiviral High Titer Packaging Mix と他社 Kit で調製したレンチウイルスの感染効率比較 (弊社比較データ)

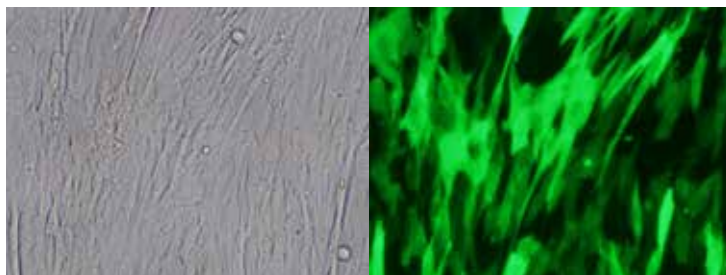
### IX-3. 各種初代培養細胞への感染

本製品により得られた組換えレンチウイルスは多くの場合、取得したレンチウイルス上清を濃縮することなく、直接、標的細胞の感染に使用できます。以下に初代ヒト腸筋線維芽細胞、初代ヒト神経細胞（アストロサイト）、初代ラット神経細胞（脳皮質アストロサイト）に感染させたデータを示します。

#### <実験方法>

本製品により得られた ZsGreen1 発現レンチウイルスベクターを 90 倍希釈し、 $MOI = 12.4$  (HT-1080 細胞への感染効率より算出) で初代ヒト腸筋線維芽細胞に感染させた。感染には RetroNectin を使用し、RBV-Spin 法を採用した。

図 4. に初代ヒト腸筋線維芽細胞へウイルス感染 5 日後の顕微鏡写真を示す。



- 90 倍希釈したレンチウイルス ( $MOI = 12.4$ ) を感染
- ZsGreen1 陽性率 69.2%

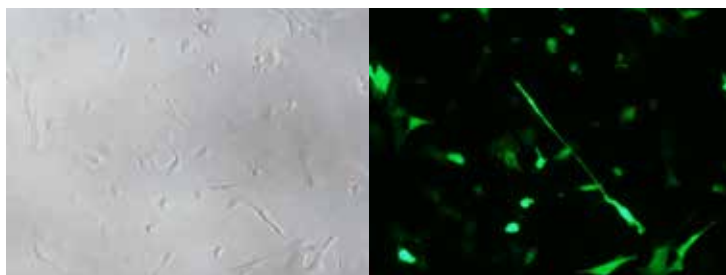
図 4. 初代ヒト腸筋線維芽細胞への感染

#### <実験方法>

本製品により得られた ZsGreen1 発現レンチウイルスベクターを 270 倍希釈し、 $MOI = 4.3$  (HT-1080 細胞への感染効率より算出) で各種初代神経細胞に感染させた。感染には RetroNectin を使用し、RBV-Spin 法を採用した。

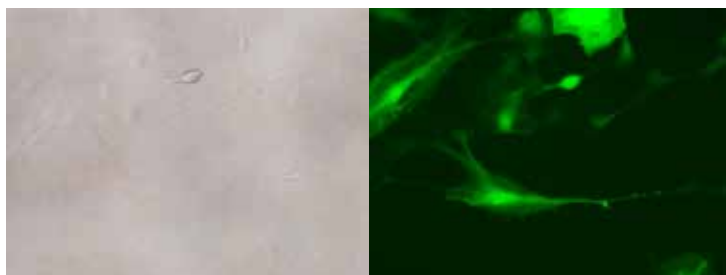
図 5. に初代ヒトアストロサイトへウイルス感染 3 日後の顕微鏡写真を示す。

図 6. に初代ラット脳皮質アストロサイトへウイルス感染 3 日後の顕微鏡写真を示す。



- 270 倍希釈したレンチウイルス ( $MOI = 4.3$ ) を感染
- ZsGreen1 陽性率 95.7%

図 5. ヒトアストロサイトへの感染



- 270 倍希釈したレンチウイルス ( $MOI = 4.3$ ) を感染
- ZsGreen1 陽性率 90.6%

図 6. ラット脳皮質アストロサイトへの感染

#### IX-4. レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法の比較

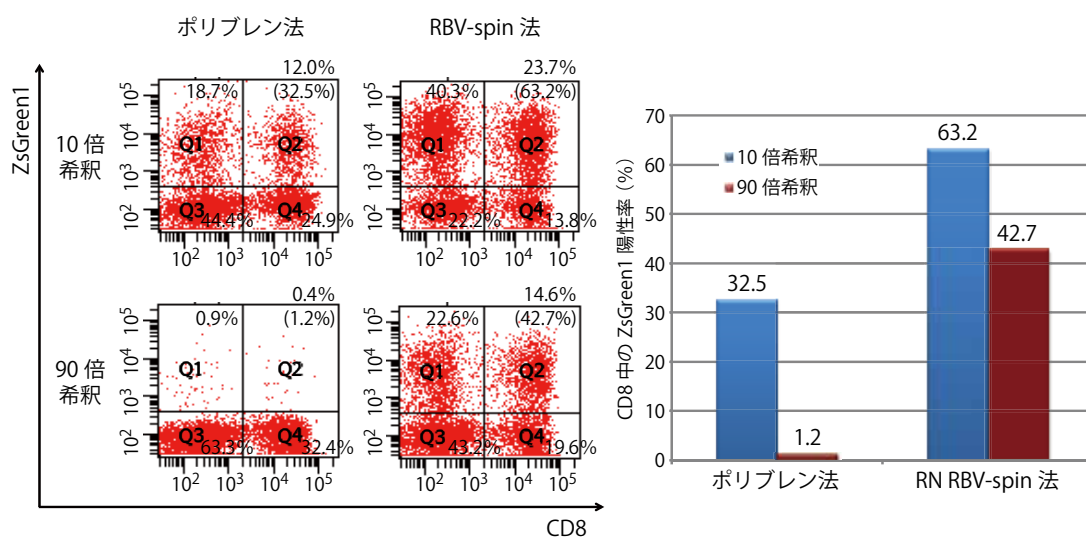
RetroNectinを使用することで、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入効率を大きく向上させることができ、特に浮遊細胞（リンパ球やリンパ球細胞株など）や遺伝子導入が困難な細胞（造血幹細胞など）に有用です。遺伝子導入が困難な細胞には RetroNectin を使用した RBV-Spin 法を推奨します。

以下に参考データとして、レンチウイルスベクターによるヒト末梢血単核球（PBMC）への遺伝子導入効率をポリブレン法と RBV-Spin 法にて比較したデータを示します。

##### <実験方法>

本製品により得られた ZsGreen1 発現レンチウイルスベクターを段階希釈し、ヒト末梢血単核球（PBMC）にポリブレン法または RBV-Spin 法で遺伝子導入を行った。

その結果を図 7. に示す。ポリブレン法では 10 倍希釈したレンチウイルスで 32.5% の高い陽性率を示すが、RBV-Spin 法では 10 倍希釈したウイルスを使用した場合 63.2% の高い陽性率を示し、また 90 倍希釈したウイルスを用いても 42.7% の高い陽性率を示した。



注：( ) 内は CD8 陽性細胞中の ZsGreen1 陽性率

図 7. レンチウイルスを用いた遺伝子導入方法の比較

## Appendix : 補足プロトコール

### 1. 安定な細胞株を選択するための抗生物質の力価測定

LVSIN レンチウイルスで遺伝子導入した細胞を、抗生物質 G418 (製品コード 631308)、Hygromycin B (製品コード 631309)、Puromycin (製品コード 631306) を用いて選択する前に、各選択抗生物質の力価を測定して標的細胞株に対する最適濃度を求めておく必要があります。

抗生物質	ワーキングレンジ	選択	維持
G418	50 ~ 800	400 ~ 500	100
Hygromycin	50 ~ 800	200	100
Puromycin	0.25 ~ 2	0.5 ~ 10	0.25

- G418 および Hygromycin B で安定な形質転換体を選択する場合、約 5 日で細胞の多くが死滅し 2 週間以内にすべての細胞が死滅する最小濃度を使用します。
- Puromycin 選択はより速く起こります。3 ~ 4 日以内にすべての細胞が死滅する濃度を使用します。
- すべての選択抗生物質において力価はロット間で変動しますので、新たなロットの抗生物質を使うたびに力価を測定する必要があります。

- (1) 各抗生物質の力価を測定するために、各濃度の G418 あるいは Hygromycin B (0、50、100、200、400、800  $\mu\text{g/ml}$ ) を添加した 3 ml の完全培地を含む 6 ウェルプレートの各ウェルに、 $2 \times 10^5$  個の細胞を播種する。Puromycin の場合は、濃度がそれぞれ 0、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0  $\mu\text{g/ml}$  となるよう培地に添加する。
- (2) G418 および Hygromycin B の場合は、5 ~ 10 日間あるいはすべての細胞が死滅するまで細胞を培養する。2 日ごとにディッシュを観察し、細胞が生存しているかどうか確認する。4 日ごとに (必要であれば、さらに頻繁に) 選択培地を交換する。最適濃度が決まるまで、その操作を続ける。
- (3) Puromycin の場合は、4 ~ 7 日間細胞を培養する。2 日後に培地を交換し、死滅した細胞を除去する。

### 2. ウイルスの濃縮

Lenti-X Concentrator (製品コード 631231) は、超遠心を行わずに、レンチウイルスストック液を簡単、迅速かつ効率的に濃縮することができる安価な試薬です。

- (1) レンチウイルス上清に Lenti-X Concentrator を添加し混合する。(上清が 30 ml の場合、Concentrator を 1/3 量の 10 ml 使用)
- (2) 4°C で 30 分 ~ O/N インキュベートする。
- (3) 1,500  $\times g$ 、4°C で 45 分間遠心する。
- (4) 上清を除いた後のペレットを 1/10 ~ 1/100 量の PBS などに再懸濁する。  
(10 ~ 100 倍の濃縮が可能)

---

## X. 参考文献

- Cochrane, A. W., Chen, C. H., and Rosen C. A. Specific interaction of the human immunodeficiency virus Rev protein with a structured region in the env mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1990) **87**: 1198-1202.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E., eds. *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY) (1997).
- Higashikawa, F. and Chang L. Kinetic Analysis of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology*. (2001) **280**: 124-131.
- Higashimoto, T., Urbinati, F., Perumbeti, A., Jiang, G., Zarzuela, A., Chang, L-J., Kohn, D. B., and Malik, P. The woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element reduces readthrough transcription from retroviral vectors. *Gene Ther*. (2007) **14**(17): 1298-1304.
- Improve Viral Transductions with RetroNectin® Reagent (October 2008) *Clontechiques*. (2008 年冬号): 11-12.
- Kozak, M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol*. (1987) **196**: 947-950.
- Lenti-X™ 293T Cells for Superior Lentivirus Packaging (October 2008) *Clontechiques*. (2008 年冬号): 10.
- Quinn, T. P. and Trevor, K. T. Rapid quantitation of recombinant retrovirus produced by packaging cell clones. *Biotechniques*. (1997) **23**: 1038-1044.
- Rapid Lentiviral and Retroviral Titration Kits (January 2008) *Clontechiques*. (2008 年早春号): 19-21.
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell*. (2000) **101**: 173-185.
- Zufferey, R., Donello, Trono, D., and Hope, T. J. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol*. (1999) **73**: 2886-2892.

---

## XI. 関連製品

### レンチウイルスベクタープラスミド

- pLVSIN-CMV Neo/Hyg/Pur Vector (製品コード 6181/6182/6183)
- pLVSIN-EF1  $\alpha$  Neo/Hyg/Pur Vector (製品コード 6184/6185/6186)
- pLVSIN-AcGFP1-N1 Vector (製品コード 6187)
- pLVSIN-AcGFP1-C1 Vector (製品コード 6188)
- pLVSIN-EF1  $\alpha$ -AcGFP1-N1 Vector (製品コード 6189)
- pLVSIN-EF1  $\alpha$ -AcGFP1-C1 Vector (製品コード 6190)
- pLVSIN-IRES-ZsGreen1 Vector (製品コード 6191)
- pLVSIN-EF1  $\alpha$ -IRES-ZsGreen1 Vector (製品コード 6192)

### トランスフェクション試薬

- TransIT*-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2700/MIR2704/MIR2705/MIR2706)
- CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (製品コード 631312)

### パッケージング細胞

- Lenti-X™ 293T Cell Line (製品コード 632180)

### 力価測定

- Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit (製品コード 631235)
- Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit (製品コード 632200)
- Lenti-X™ GoStix™ Plus (製品コード 631280/631281)

### 組換えレンチウイルスの精製

- Lenti-X™ Maxi Purification Kit (製品コード 631233/631234)

### 組換えレンチウイルスの濃縮

- Lenti-X™ Concentrator (製品コード 631231/631232)

### 組換えレンチウイルスの感染効率アップ

- RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (製品コード T100A/B)

## XII. 使用上の注意

- ・ 本製品の使用には遺伝子工学と細胞培養に関する基本的な技術が必要です。
- ・ 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 1 号）にある P2 レベル以上の施設が必要です。詳しくは 4 ページ、「バイオセーフティーについて」をご参照ください。
- ・ 本レンチ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、組換えレンチ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。吸入や付着を防ぐため、必ず、安全キャビネットを使用してください。
- ・ 本製品の使用はすべて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。
- ・ 本製品ご利用の際は省令および組織内の組換え DNA 安全委員会の指示に従い、安全には十分ご注意ください。
- ・ 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。
- ・ 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、In-Fusion は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。Lenti-X、CalPhos、GoStix 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。

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**