

レンチウイルスベクターを用いる 遺伝子導入 = 製品ガイド =

(2020年9月版)

レンチウイルスベクターの特長

- ★ 初代培養細胞や幹細胞、神経細胞などの非分裂細胞を含む
ほぼすべての哺乳類細胞に遺伝子導入が可能
- ★ 長期にわたる安定した遺伝子発現を実現

that's
GOOD
science!

レンチウイルスベクター作製の流れ

Lentiviral High Titer
Packaging Mix

トランスフェクション

pLVSiN Vector

パッケージング細胞
Lenti-X™ 293T
Cell Line

1) ベクタープラスミドと Lentiviral High Titer
Packaging Mix のコトランスフェクション

2) 転写と翻訳

TransIT®-Lenti
Transfection
Reagent

3) ウイルス
タンパク質が
Ψを認識

RNA

4) ウイルスコアの形成

VSV-G

5) 感染性ウイルス粒子の出芽

6) 培養上清中のウイルスを回収
(48~72hr)

7) 標的細胞に感染

力価測定

Lenti-X™ GoStix™ Plus

Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit

Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit

ウイルス濃縮

Lenti-X™ Concentrator

ウイルス精製

Lenti-X™ Maxi Purification Kit

標的細胞への遺伝子導入効率の向上

RetroNectin®

レンチウイルス発現系の特長と各種製品の概要



レンチウイルスベクターは、初代培養細胞や幹細胞、神経細胞などの非分裂細胞を含むほぼすべての哺乳類細胞に遺伝子導入を実現する強力な多用途ベクターです。pLVSiNレンチウイルスベクタープラスミドとパッケージングミックスを、極めて効率的なトランスフェクション試薬を用いてLenti-X™ 293T細胞にコトランスフェクションすることで、48時間後には高力価の組換えレンチウイルスを含む培養上清が得られます。

組換えレンチウイルス作製の流れ



目的遺伝子のクローニング

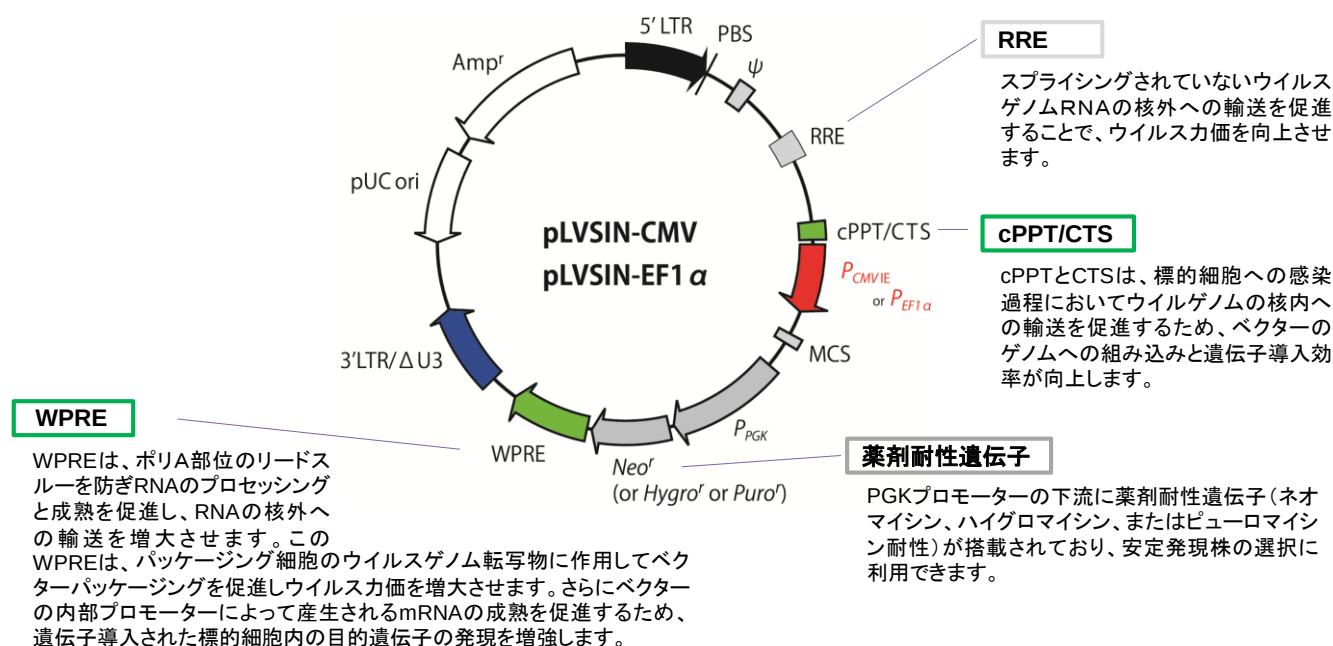
SIN型レンチウイルスベクタープラスミドシリーズ

- SIN型(自己不活性型)のレンチウイルスベクターを作製可能
- 作製したレンチウイルスベクターは初代培養細胞、非分裂細胞を含むほぼすべての哺乳類細胞に遺伝子導入可能
- 蛍光タンパク質搭載ベクターもラインナップ

目的遺伝子をレンチウイルスベクタープラスミドにクローニングします。その際、以下の変異を導入した**SIN型レンチウイルスベクター**を用いることで、感染力を維持したまま、複製・増殖能を欠いたウイルス粒子が作製でき、安全性の高い遺伝子導入が実現可能です。

- ・HIV-1由来の調節遺伝子およびアクセサリ遺伝子(*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*)と制限遺伝子(*tat*, *rev*)の機能を欠損
- ・構造遺伝子(*gag*, *pol*, *env*)の固有部分を全て欠損
- ・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、3'LTRのU3領域にあるエンハンサーとプロモーター部分を欠損

SIN型レンチウイルスベクターでは、ウイルス力価、ベクター機能向上のための各種配列(下図参照)を搭載した上でもなお、約4.5 kbまでの目的遺伝子の挿入が可能です。

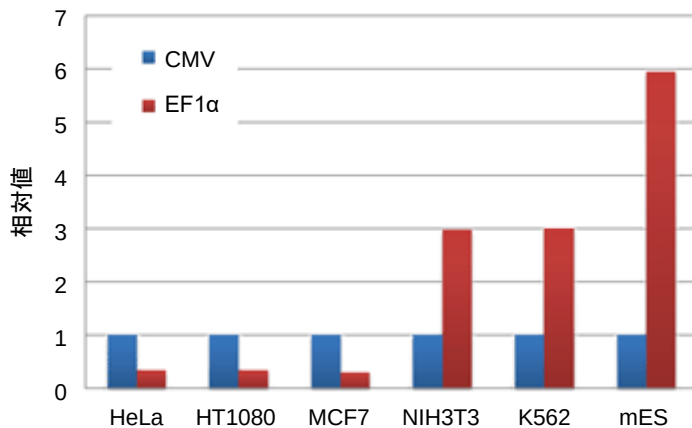


搭載プロモーターの特長	CMV	導入した遺伝子が安定して発現する。
	EF1α	CMVプロモーター等の他のプロモーターで発現レベルが低い場合や、胚性幹細胞のようにプロモーターがサイレンシングを受ける場合に有用である。

搭載蛍光タンパク質の特長	AcGFP1 (単量体)	目的タンパク質との融合発現に適している。
	ZsGreen1 (四量体)	遺伝子導入効率のモニタリングなどレポーター発現に適している。IRES配列により目的遺伝子とは独立して翻訳される。

製品名	蛍光タンパク質	Promoter	MCSの位置	薬剤耐性	容量	製品コード	価格(税別)
pLV SIN-AcGFP1-N1 Vector	単量体	CMV	FPのN末端側	Puromycin	20 µg	6187	¥123,000
pLV SIN-AcGFP1-C1 Vector	単量体	CMV	FPのC末端側	Puromycin	20 µg	6188	¥123,000
pLV SIN-EF1α-AcGFP1-N1 Vector	単量体	EF1α	FPのN末端側	Puromycin	20 µg	6189	¥123,000
pLV SIN-EF1α-AcGFP1-C1 Vector	単量体	EF1α	FPのC末端側	Puromycin	20 µg	6190	¥123,000
pLV SIN-IRES-ZsGreen1 Vector	四量体	CMV	IRES配列の上流 (非融合発現タイプ)	なし	20 µg	6191	¥123,000
pLV SIN-EF1α-IRES-ZsGreen1 Vector	四量体	EF1α		なし	20 µg	6192	¥123,000

■ EF1αプロモーターとCMVプロモーターの発現強度の比較(1 copy/cellでの相対値)



ZsGreen1遺伝子を挿入したpLV SIN-CMV PurまたはpLV SIN-EF1α Purベクターと、Lenti-X HTX Packaging System(終売)、Lenti-X 293T細胞(製品コード 632180)を用いて組換えレンチウイルスを調製した。ウイルス上清の段階希釈液を用い、ポリブレン法、あるいはRetroNectin法で各細胞への感染を行い、2~3日後にフローサイトメーターを用いて遺伝子導入効率ならびにZsGreen1発現強度を測定した。遺伝子導入効率が20%以下のサンプルをsingle copy導入細胞とみなし、CMVプロモーターとEF1αプロモーターの発現強度を比較した。グラフではCMVプロモーターの発現強度を1とした場合の相対値を示している。

レンチウイルスのパッケージング

ウイルスのパッケージングとは・・・

目的遺伝子をクローニングした発現ベクターとウイルスを構成するための遺伝子を搭載した各種プラスミドをパッケージング用細胞株へトランスフェクションして、ウイルス粒子を作製することです。

レンチウイルス産生用トランスフェクション試薬

TransIT®-Lenti Transfection Reagent

- 機能性レンチウイルス粒子の高生産
- 動物由来成分不含
- 培地交換不要の簡便プロトコール

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
TransIT®-Lenti Transfection Reagent	0.3 ml	MIR6603	¥30,000

※本製品はMirus Bio社の製品です。

パッケージング用細胞株

Lenti-X™ 293T細胞株

- 高力価な組換えレンチウイルス産生を可能にするレンチウイルスパッケージング用細胞株
- 高い形質転換効率、高いウイルス力価(>10⁸ IFU/ml)を実現

Lenti-X 293T細胞株をレンチウイルスのパッケージングに用いることで、高力価の組換えレンチウイルスを産生することができます。本細胞株は、HEK293T細胞よりSV40 Large T Antigenを高レベルに発現する細胞株を限界希釈法により選別し、更にそこから高い形質転換能力と高いウイルス力価を得ることができる細胞株を単離したものです(他にアデノウイルスE1Aタンパク質を発現します)。

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Lenti-X™ 293T Cell Line	1 ml	632180	¥81,000

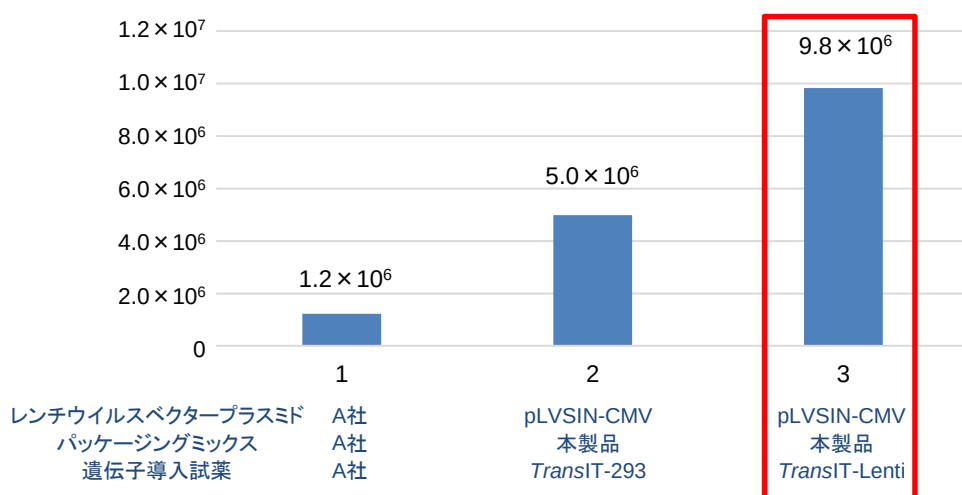
レンチウイルスのパッケージング (前ページから続く)

高性能レンチウイルスパッケージング試薬

Lentiviral High Titer Packaging Mix

- 高力価のレンチウイルスベクターを調製
- VSV-Gエンベロープにより広範囲な細胞種に導入可能
- pLV SINベクターとのセット製品もご用意 ⇒ 複製能を欠く安全な組換えレンチウイルスを産生

■ 本製品と他社キットで調製した組換えレンチウイルスの力価比較

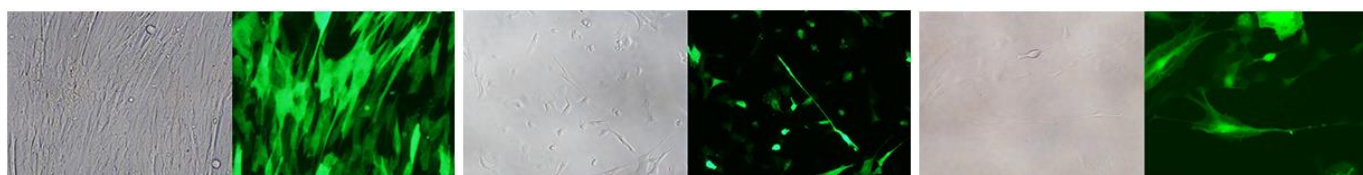


293T Cell Lineに、ZsGreen1発現レンチウイルスベクタープラスミドとパッケージングミックスをトランスフェクション試薬 TransIT-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2704) または TransIT-Lenti Transfection Reagent (MIR6603) を用いてコトランスフェクトし、組換えレンチウイルスを取得した。得られたレンチウイルスベクターの生物学的力価をHT-1080細胞にて評価した。条件3のpLV SIN-CMVベクター、Lentiviral High Titer Packaging MixおよびTransIT-Lentiを用いた条件で、最も高いウイルスタイターが得られた。(弊社比較データ)

■ 各種初代培養細胞への感染

Lentiviral High Titer Packaging Mixを用いて取得し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を含む培養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る。

ZsGreen1遺伝子を挿入したpLV SIN-CMV Pur Vectorと本製品を組み合わせで取得したZsGreen1発現組換えレンチウイルス上清を希釈し、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)、および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。感染にはRetroNectin (製品コード T100A) を使用し、RBV (RetroNectin bound virus)-Spin法を採用した。



初代ヒト腸筋線維芽細胞

<感染5日目: ZsGreen1陽性率 69.2%>

初代ヒトアストロサイト

<感染3日目: ZsGreen1陽性率 95.7%>

初代ラット脳皮質アストロサイト

<感染3日目: ZsGreen1陽性率 90.6%>

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Lentiviral High Titer Packaging Mix	60 回	6194	¥213,000
Lentiviral High Titer Packaging Mix (pLV SIN-CMV Neo Vector)	1 Set	6950	¥273,000
Lentiviral High Titer Packaging Mix (pLV SIN-CMV Hyg Vector)	1 Set	6951	¥273,000
Lentiviral High Titer Packaging Mix (pLV SIN-CMV Pur Vector)	1 Set	6952	¥273,000
Lentiviral High Titer Packaging Mix (pLV SIN-EF1α Neo Vector)	1 Set	6953	¥273,000
Lentiviral High Titer Packaging Mix (pLV SIN-EF1α Hyg Vector)	1 Set	6954	¥273,000
Lentiviral High Titer Packaging Mix (pLV SIN-EF1α Pur Vector)	1 Set	6955	¥273,000



プレミックスタイプやハイスループットタイプをお探しの方に！

ワンステップ操作のレンチウイルスパッケージングシステム Lenti-X™ Packaging Single Shots

Easy To Use

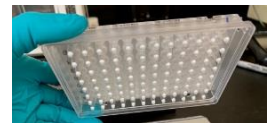
- レンチウイルスベクタープラスミド溶液を加えて293T 細胞に添加するだけの簡便・安心プロトコール
- 高タイター（最大 10^8 IFU/ml）のレンチウイルス溶液を作製
- エンベロープに、**パントロピック型 (VSV-G)**と**エクトロピック型 (gp70)**をご用意。
さらに**インテグラーゼ欠損型 (VSV-G)**も加えた豊富なラインナップ
- ハイスループットアプリケーションに使える**96-well Plateタイプ**が新登場



本製品は、最適化されたLenti-X packaging plasmidとトランスフェクション試薬 Xfect Transfection Reagentを1本のチューブ内にプレミックスした製品です。

各チューブには、10 cmディッシュでのトランスフェクション試薬とパッケージングプラスミドが含まれており、血清存在下でもトランスフェクションができます。

また、96-well Plateタイプは各ウェルにプレミックスが分注されており、ハイスループットアプリケーションにそのままご使用いただけます。

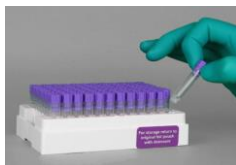


エンベロープの種類について・・・

パントロピックなエンベロープタンパク質 (VSV-G viral envelope protein) を持つレンチウイルスは、実質的にすべての細胞種に感染可能です。

エクトロピックなエンベロープタンパク質 (MLV ecotropic envelope glycoprotein: gp70) をもつレンチウイルスは、マウス細胞とラット細胞にだけ感染できます。

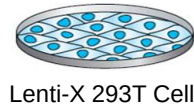
操作手順



目的遺伝子を
搭載したプラスミドを本製品に添加



80～90%コンフルエント
の細胞へアプライ



培地交換



高タイターの
レンチウイルス
上清を回収
(48～72hr)

※631275～631277を用いた場合の操作手順

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Lenti-X™ Packaging Single Shots (VSV-G)	16回	631275	¥172,000
	96回	631276	¥377,000
Lenti-X™ Packaging Single Shots (Ecotropic)	16回	631278	¥172,000
Lenti-X™ Packaging Single Shots (Integrase Deficient)	16回	631277	¥172,000
Lenti-X™ Packaging Single Shots (96-well, VSV-G)	4 × 96-well plates	631282	¥184,000

■ その他の関連製品

製品名	概要	容量	製品コード	価格(税別)
TransIT®-293 Transfection Reagent ※	HEK 293細胞に最適化されたトランスフェクション試薬	0.4 ml	MIR2704	¥54,000
CalPhos™ Mammalian Transfection Kit	哺乳類細胞用のトランスフェクション試薬(リン酸カルシウム法)	1 Set	631312	¥60,000
Lenti-X™ Integration Site Analysis Kit	GenomeWalker法により、プロウイルスのゲノム挿入部位を同定するキット	1 Kit (3解析分)	631263	¥171,000

※Mirus Bio社の製品です。

レンチウイルスの力価測定

目的に合わせて最適な力価の測定方法を選びましょう！

■ 力価測定のための製品一覧

製品名	測定法	概要	容量	製品コード	価格(税別)
Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit	qPCR法	・わずか 4時間 で組換えレンチウイルスのRNAタイターを正確に測定	200回	631235	¥134,000
Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit	抗体法	・簡便なELISA法。HRP-発色試薬で測定	96回	632200	¥107,000
Lenti-X™ GoStix™ Plus	イムノクロマト法	・組換えレンチウイルス力価をわずか 30秒～10分 で判定 ・回収に最適なタイミングを判断	20回	631280	¥76,000
			50回	631281	¥158,000
Lenti-X™ Provirus Quantitation Kit	qPCR法	・プロウイルスコピー数測定キット	200回	631239	¥100,000

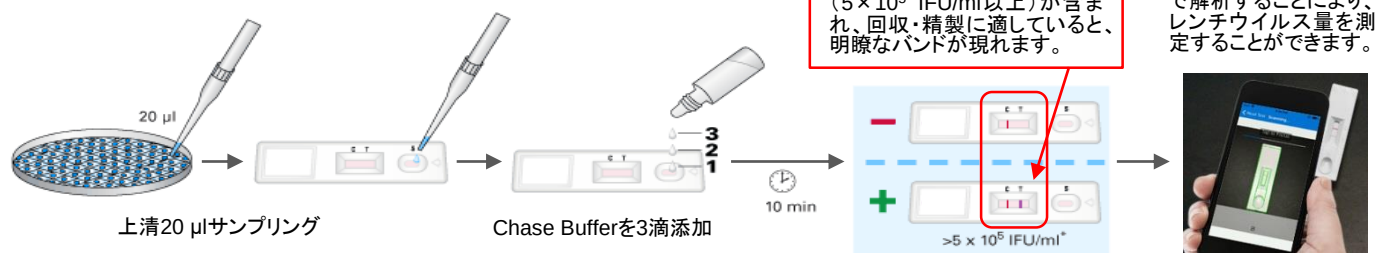
簡易レンチウイルス量測定試薬

Lenti-X™ GoStix™ Plus

直ぐに力価を知りたい！

- わずか10分で判定可能。異なるウイルスの力価の比較にも！
- ウイルスを回収するか培養を続けるかの判断にも使える

操作手順



※スマートフォンアプリのダウンロードや使用方法に関しては、弊社ウェブサイトの製品ページでご確認ください。

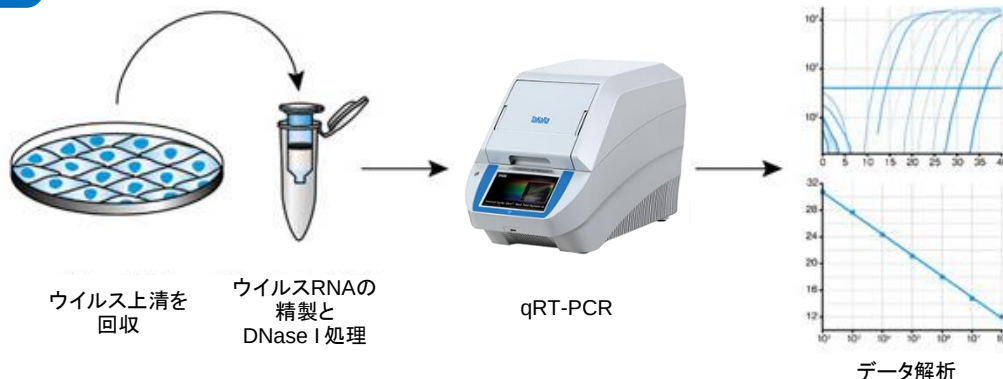
レンチウイルスqRT-PCR迅速タイター測定キット

Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit

正確な力価を知りたい！

- 4時間で、組換えレンチウイルスのRNAタイターを測定
- 正確なタイターを得ることができ、安定した感染実験が可能

操作手順



Lenti-Xタイター測定キットには、ウイルスサンプルまたはキットに同梱のコントロールRNAを用いるqRT-PCR反応200回分の試薬が含まれます。本キットは、すべてのHIV-1ベースのレンチウイルスベクターに使用できます。発現カセット(cDNA、shRNA)やウイルスバックボーンに左右されることなく正確な力価が得られるため、複数のウイルス試料の同時測定が可能です。RNA精製ステップおよびDNase I 処理ステップがあるため、一過性トランスフェクションで産生したウイルス中にプラスミドDNAが残留していても、安定産生株から産生したウイルスと同様、少量のサンプルで正確な力価測定を行うことができます。

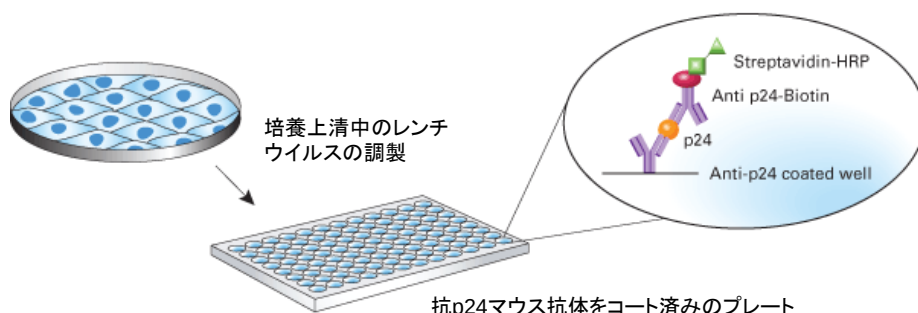
ELISA法による簡易レンチウイルス量測定

Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit

● 培養上清中のレンチウイルスカ価を測定

● ウイルス上清を用いてp24(キャプシドタンパク質)量を測定

操作手順



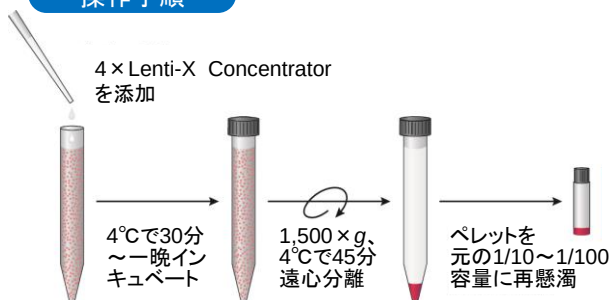
培養上清中の組換えレンチウイルスを添付のバッファーで溶解し、p24タンパク質を含んだサンプルを調製します。サンプルを96ウェルフォーマット(分割可能な8連ウェル×12、抗p24マウス抗体をコート済み)の各ウェルに加え、p24タンパク質を抗体に結合させます。結合しなかったライゼートを洗い流し、ビオチン化二次抗体とストレプトアビジン-HRP、発色試薬でp24タンパク質の濃度を測定します。本キットにはp24タンパク質が陽性コントロールとして含まれており、検量線の作成、サンプルのウイルス濃度の算出に使用できます。

レンチウイルスの濃縮・精製

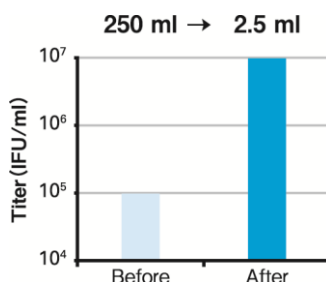
■ レンチウイルス濃縮試薬

製品名	概要	容量	製品コード	価格(税別)
Lenti-X™ Concentrator	・超遠心が不要。組換えレンチウイルス上清と混合して遠心するだけの簡便操作 ・大容量へのスケールアップも簡単	100 ml	631231	¥42,000
		500 ml	631232	¥154,000

操作手順



■ 実施例: 大容量のウイルス上清の濃縮

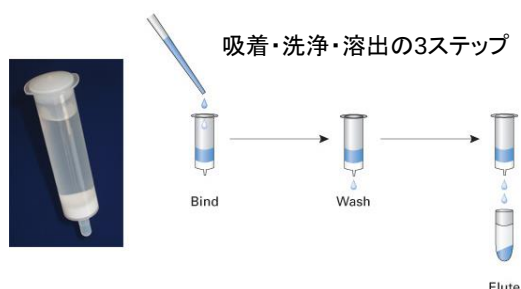


組換えレンチウイルス上清を250 mlに希釈し、本試薬を用いて2.5 mlに濃縮した。ウイルスカ価は、ZsGreen1発現レンチウイルスベクターをHT1080細胞株に感染させ、フローサイトメリーにより求めた。その結果、効率よく濃縮されたことが確認できた。

■ レンチウイルス精製キット

製品名	概要	容量	製品コード	価格(税別)
Lenti-X™ Maxi Purification Kit	・パッケージング細胞の培養上清から不純物を除き、高い収量と純度でレンチウイルス精製が可能 ・自然落下式プロトコールによる簡便操作	2回	631233	¥55,000
		5回	631234	¥107,000

操作手順

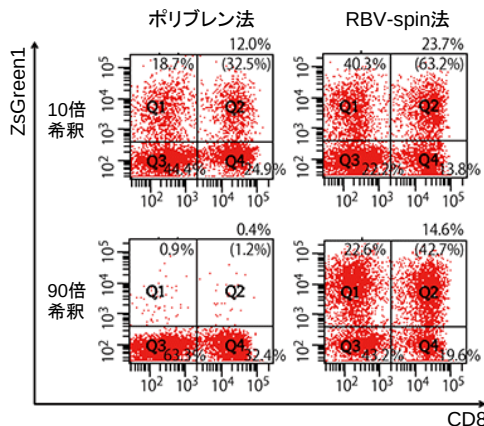


レンチウイルスの標的細胞への感染

RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment)

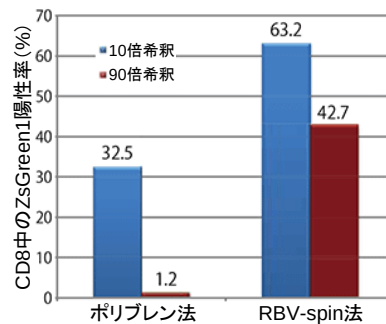
- レンチウイルスベクターによる哺乳類細胞への遺伝子導入効率を向上
- リンパ球などの浮遊細胞や遺伝子導入が困難な造血幹細胞、Polybreneなどの遺伝子導入補助剤では毒性を示す細胞への遺伝子導入に最適

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment)	0.5 mg (0.5 ml)	T100A	¥35,000
RetroNectin® Dish (RetroNectin® Pre-coated Dish, 35 mmφ)	10 dishes	T110A	¥70,000



末梢血単核球への遺伝子導入例

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RetroNectin法 (RBV-spin法) にて測定した。



その他の関連製品

製品名	概要	容量	製品コード	価格(税別)
Lenti-X™ Accelerator Starter Kit	磁性ビーズによりレンチウイルスを効率良く迅速に細胞へ導入	1 Kit	631254	¥173,000
TransducelT™ Transduction Reagent ※ 取寄	臭化ヘキサジメトリン溶液。ウイルスによる遺伝子導入効率の向上に利用	1 ml	MIR6620	¥6,000

※Mirus Bio社の製品です。

オンラインツールのご紹介

弊社ウェブサイトにてタイトル(下記の青色文字)で検索いただくか、以下のQRコードを読み取ってアクセスしてください。

レンチウイルスベクター調製試薬のモニター結果をご紹介

モニター結果を掲載しています。実験のご参考に！



動画ライブラリー LentiVirus

レンチウイルスベクターの作製から濃縮・簡易力価測定までをご覧ください。



レンチウイルスベクターによる遺伝子導入<製品選択ガイド>

レンチウイルスベクター作製のフローに沿って製品をご紹介します。レンチウイルス粒子に興味がある方も！



レンチウイルスベクターによる遺伝子導入使用文献

使用文献一覧をまとめています。是非ご覧ください。随時アップ中！



組換えレンチウイルスの作製受託も承ります。詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください。

- ・本チラシで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。
- ・ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブサイトをご覧ください。
- ・本チラシ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。
- ・本チラシ記載の価格は2023年12月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2023年12月修正N

タカラバイオ株式会社

東日本支店・西日本支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
 関西支店・営業第2部 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995
 テクニカルサポートライン

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <https://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <https://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店