

トランスフェクション試薬やウイルスによる導入がこの一冊で丸分かり!

遺伝子導入実験ハンドブック

2021年12月改訂

目次

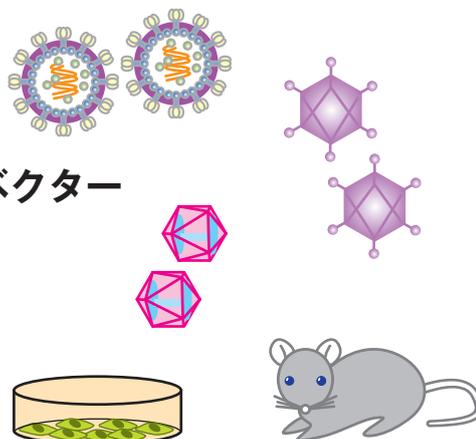
◆ 遺伝子導入実験を始める前に

- ・ 遺伝子導入の手法と特徴
- ・ 主要な遺伝子導入方法の原理
- ・ ベクターとして用いられる主なウイルスの特徴
- ・ ウイルスベクター選択ガイド

◆ トランスフェクション・エレクトロポレーション

◆ ウイルスベクター

- ・ レンチウイルスベクター
- ・ アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター
- ・ レトロウイルスベクター
- ・ アデノウイルスベクター



◆ お役立ち情報

関連製品リスト



遺伝子導入実験を始める前に

細胞や生体への遺伝子導入は、遺伝子や遺伝子産物の機能の研究に欠かせない必須の手法です。このハンドブックでは、遺伝子導入実験を行う皆様が実験目的に最適な遺伝子導入手法を選択し、実験を効率よく進めることができるよう、必要な知識やポイントをわかりやすくまとめました。遺伝子導入実験の手引書としてご活用ください。

遺伝子導入実験の目的と検討ポイント

- **遺伝子の機能解析**…過剰発現や調節発現による機能解析、発現抑制(RNAi)による機能解析、発現調節領域の解析
- **タンパク質の発現**…変異タンパク質の発現による病態解析、正常タンパク質の発現による機能修復、組換えタンパク質の大量生産

遺伝子の入手	発現ベクターの構築	解析方法の選択	標的の選択	導入方法の選択
<ul style="list-style-type: none"> ・プロモーターやマーカーの選択 ・目的遺伝子のクローニング ・変異体作製 	<ul style="list-style-type: none"> ・siRNA設計 など 	<ul style="list-style-type: none"> ・mRNAの発現定量 ・タンパク質の発現定量 	<ul style="list-style-type: none"> ・株化細胞/初代細胞 ・培養組織片/動物個体 	<ul style="list-style-type: none"> ・化学的方法 ・物理的方法 ・生物学的方法

遺伝子導入の手法と特徴

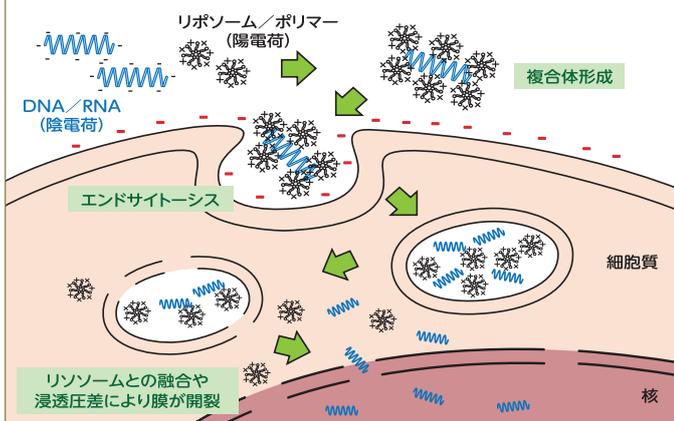
遺伝子導入の方法は、大きく3つ(化学的、物理的、生物学的な導入)に分類できます。目的を達成するために最適な手法を選択しましょう。

分類	方法	標的	長所	短所
化学的	トランスフェクション *カチオンポリマー *カチオン脂質 *リン酸カルシウム	培養細胞	<ul style="list-style-type: none"> ・比較的高効率 ・簡便 ・導入サイズに制限なし ・豊富な市販品 	<ul style="list-style-type: none"> ・化学毒性 ・細胞種や状態により導入効率が変動 ・特定細胞への選択的導入は困難
物理的	エレクトロポレーション マイクロインジェクション ソノポレーション レーザー照射	培養細胞	<ul style="list-style-type: none"> ・シンプルな原理 ・適所に導入可能 ・ベクター不要 ・導入サイズに制限なし 	<ul style="list-style-type: none"> ・特殊な器具や装置が必要 ・核酸が傷つきやすい ・経験が必要
生物学的	ウイルスベクター	培養細胞 動物個体	<ul style="list-style-type: none"> ・高効率 ・比較的簡便 	<ul style="list-style-type: none"> ・汚染の危険性 ・挿入変異 ・免疫による不活化

主要な遺伝子導入方法の原理

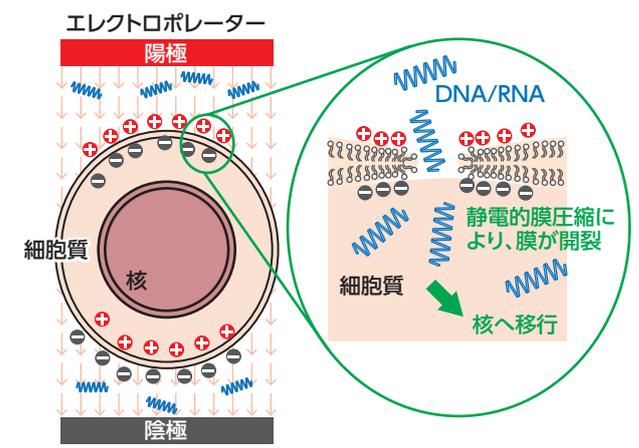
トランスフェクションによる遺伝子導入

核酸(DNAまたはRNA)は陰電荷であるため、陽電荷をもつ物質(リボソームやポリマーなど)に結合し複合体を形成します。その複合体が陰電荷を帯びた細胞表面に引きつけられ、エンドサイトーシスにより細胞に取り込まれます。



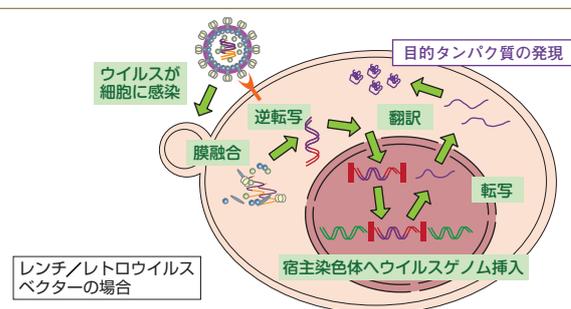
エレクトロポレーションによる遺伝子導入

核酸と細胞の懸濁液を陽極と陰極ではさみ、電気パルスをかけて細胞膜に小さな穴をあけることにより、細胞外にあった核酸が細胞内へ入り込みます。



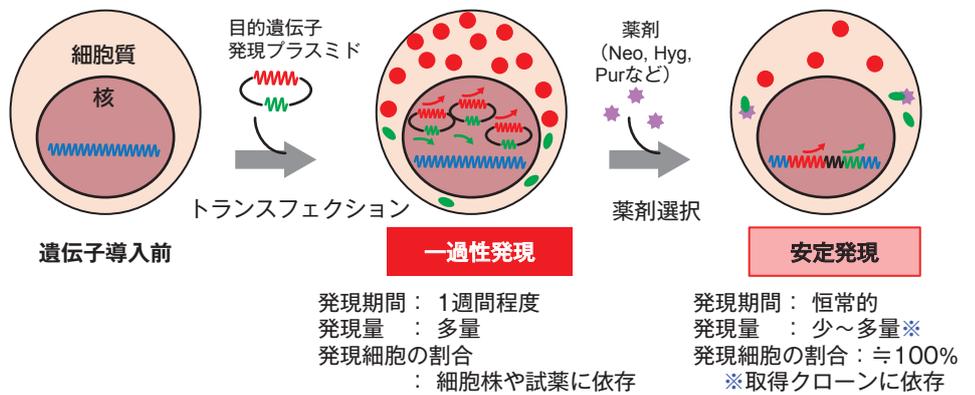
ウイルスベクターによる遺伝子導入

ウイルス粒子の表面タンパク質に結合する受容体が細胞膜表面に存在する場合、その細胞にウイルスが感染し、ウイルス粒子内にあった核酸が細胞内へ移行します。遺伝子導入のためのウイルスベクターとしてよく用いられるものには、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、アデノウイルスがあります。各ウイルスベクターの特徴、実験目的に最適なウイルスベクターの選択ガイドは2ページをご覧ください。



【一過性発現と安定発現について】

目的遺伝子を発現するプラスミドが導入された細胞は、一時的に多量のタンパク質を発現（一過性発現）しますが、細胞分裂と共に発現量は減少していきます。発現プラスミドの一部は細胞のゲノムに組み込まれるため、予め発現プラスミドに薬剤耐性遺伝子を載せておき、一過性発現確認後に薬剤選択を行うことで、恒常的に目的タンパク質を発現（安定発現）する細胞だけを選択することができます。



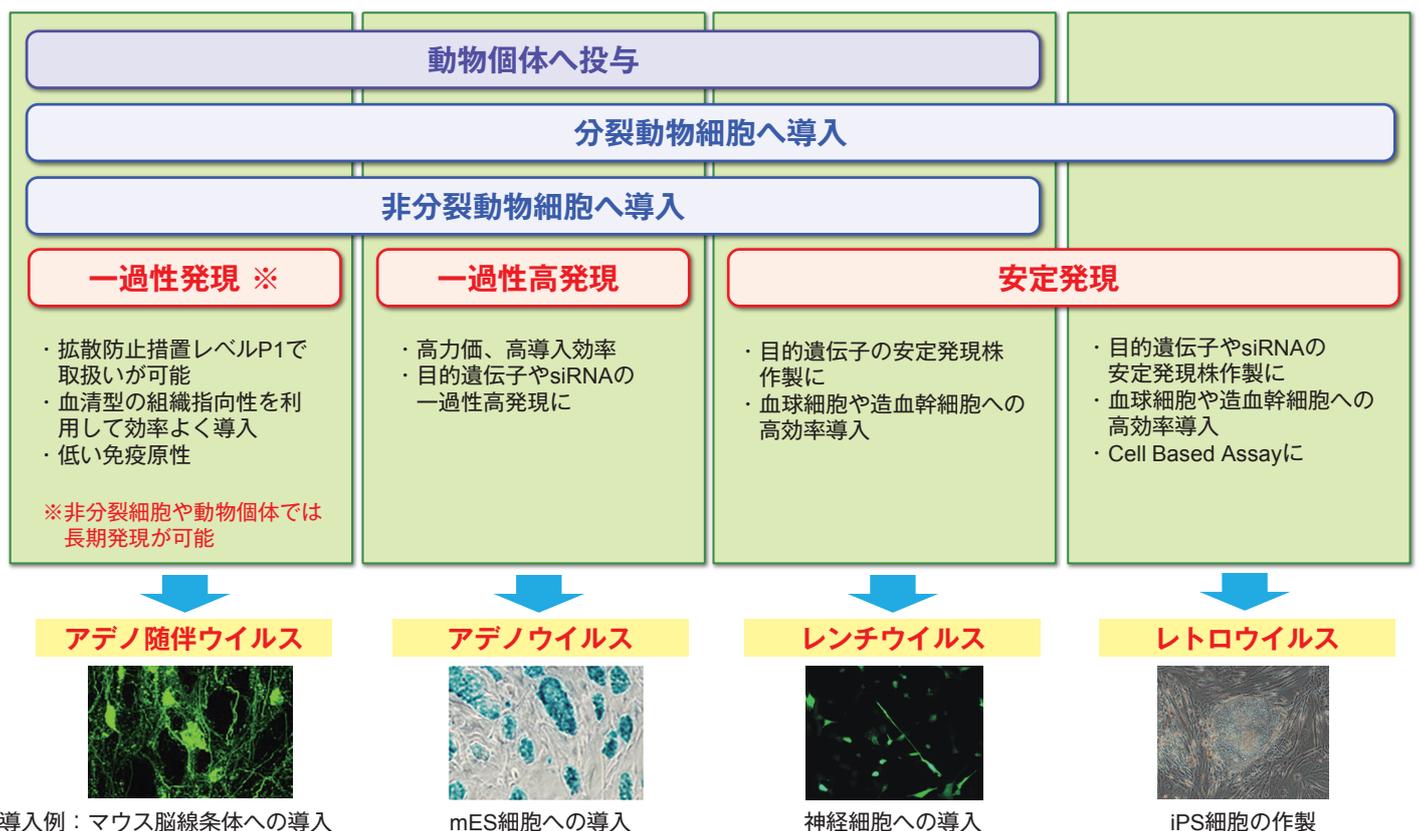
■ ベクターとして用いられる主なウイルスの特徴

		アデノ随伴ウイルス (AAV)	アデノウイルス	レンチウイルス/ レトロウイルス
分類 (Family)		Parvoviridae	Adenoviridae	Retroviridae
				
ウイルスゲノム	構造	ssDNA	dsDNA	ssRNA
	サイズ	約5 kb	約36 kb	8～9 kb
殻の外被(エンベロープ)		—	—	+
ウイルス粒子直径		18～26 nm	70～90 nm	80～130 nm
宿主染色体へのゲノムの組み込み		—	—	+
感染した細胞における遺伝子の発現		長期可能(非分裂細胞)	一過性	長期
実験の際に執るべき拡散防止措置レベル★		P1	P2	P2

★ 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）に記載されています。P2レベルの実験環境の整備について詳細は14ページをご覧ください。

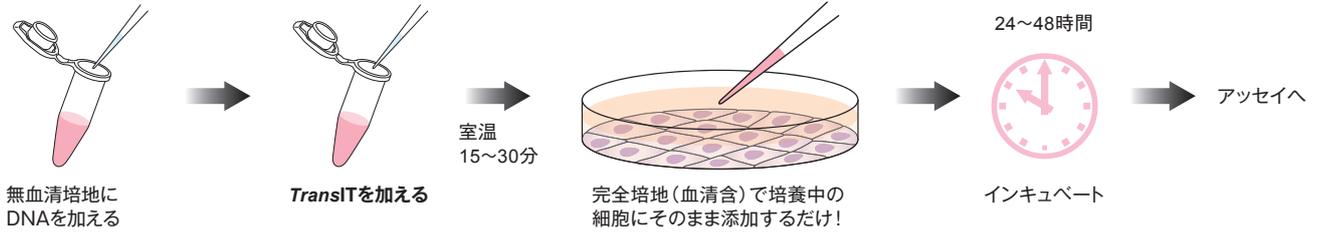
■ ウイルスベクター選択ガイド

遺伝子導入の標的(培養細胞、動物個体)、遺伝子発現の仕方(一過性、安定)から、実験目的に最適なウイルスを選択しましょう。



核酸を哺乳類細胞へ化学的に導入するトランスフェクションは、最も簡便な遺伝子導入方法です。トランスフェクション試薬 **TransIT®** シリーズや **Xfect™** シリーズは、細胞毒性が非常に低く、かつ高効率に核酸の導入が可能な試薬です。下記リスト以外にも多種類の試薬をラインナップしています。詳しくはタカラバイオウェブカタログをご覧ください。

操作方法の概要



用途	製品名	容量	製品コード	価格(税別)
広範囲の細胞種にDNAを高効率に導入	TransIT®-LT1 Transfection Reagent	0.4 ml	MIR2304	¥36,000
DNAやsiRNA/miRNAをさまざまな細胞種に高効率に導入。また、Cas9とsgRNAの複合体(RNP)の導入にも使用可能	TransIT-X2® Dynamic Delivery System	0.3 ml	MIR6003	¥23,000
広範な哺乳類細胞用の高効率・低毒性トランスフェクション試薬	Xfect™ Transfection Reagent	50回×2	631317	¥31,000
浮遊系HEK細胞またはCHO細胞に最適化。タンパク質高発現用	TransIT-PRO® Transfection Reagent	1 ml	MIR5740	¥63,000

TransIT-X2® の一般的なプロトコール

★ 6 well plate使用の場合(1ウェルあたりの分量を示す)

プレート種別によりウェル表面積が異なるため、トランスフェクション試薬とプラスミドDNAにより形成するComplexの1ウェルあたりの添加量が異なります。また、ターゲットの細胞株により、トランスフェクション試薬:プラスミドDNAの最適な混合比率が異なります。4ページの使用推奨量を量比の初期条件として、トランスフェクション条件を検討してください。

A. 細胞の用意

- (1)トランスフェクション前日(トランスフェクションの18~24時間程度前)に、目的細胞を2.5 mlの完全培地(血清含)に播種する。
- (2)一晩培養する。

B. Complexの形成(トランスフェクション直前に行う)

- (1) TransIT-X2試薬を室温に戻し、使用前に穏やかにボルテックスする。
- (2)滅菌済チューブに250 μ lの無血清培地(Opti-MEM I低血清培地等)を用意する。
- (3)2.5 μ lのプラスミドDNAを添加する(1 μ g/ μ lストック)。
- (4)完全に混ざるまでピペットで穏やかに混合する。
- (5)7.5 μ lのTransIT-X2試薬を(4)に添加する。
- (6)完全に混ざるまでピペットで穏やかに混合する。
- (7)室温で15~30分間インキュベートする。

C. トランスフェクション

- (1)ステップBで調製したTransIT-X2/DNA complexを目的細胞に滴下し、プレートをゆっくりゆすってcomplexを均一に行き渡らせる。
- (2)24~72時間、インキュベートする。
- (3)細胞を回収してレポーターアッセイ等で遺伝子導入効率を確認する。

! ポイント

播種する細胞数の目安は、
 接着系細胞の場合：0.8~3.0×10⁵ cells/ml
 浮遊系細胞の場合：2.5~5.0×10⁵ cells/ml
 が一般的です。
 トランスフェクション時に、細胞が>80%コンフルエントとなることが理想です。
 トランスフェクションを最も効率よく行うためには、それぞれの細胞に適した細胞数を検討することが必要です。

! 参考

TransIT-X2でのトランスフェクション操作は、血清を含む完全培地のままで行えるため、多くの場合、無血清培地への交換は不要です。
 トランスフェクション前に新鮮な培地に交換することは必ずしも必要ではありませんが、もし必要があれば、前日から培養している細胞の培地を新鮮な完全培地(血清含)に交換してください。

安定発現株を取得する場合は、トランスフェクション後48~72時間後の継代時の培地に、G418やHygromycin Bなどの適切な選択用の抗生物質を加えてください。この培地で1~2週間培養することで、安定発現株を取得することが可能です。

★ 1ウェル、ディッシュ、フラスコあたりの使用推奨量

	96 well plate	48 well plate	24 well plate	12 well plate	6 well plate	10 cm dish	T75 flask
培養面積/ウェル	0.35 cm ²	1.0 cm ²	1.9 cm ²	3.8 cm ²	9.6 cm²	59 cm ²	75 cm ²
完全培地(血清含)量/ウェル	92 μ l	263 μ l	0.5 ml	1.0 ml	2.5 ml	15.5 ml	19.7 ml
無血清培地(Complex作作用)	9 μ l	26 μ l	50 μ l	100 μ l	250 μl	1.5 ml	1.9 ml
TransIT-X2	0.3 μ l	0.78 μ l	1.5 μ l	3 μ l	7.5 μl	45 μ l	57 μ l
プラスミドDNA (1 μ g/ μ l)	0.1 μ l	0.26 μ l	0.5 μ l	1 μ l	2.5 μl	15 μ l	19 μ l

よくある質問

[Q1] DNAの純度は細胞への遺伝子導入効率に影響しますか？

[A1] DNAの純度が低い場合 (DNAが部分分解を受けていたり、インヒビターやエンドトキシンが混入しているもの等)、トランスフェクション効率が落ちる場合がありますので、高度に精製したDNAを用いてください。エンドトキシン除去には、**MiraCLEAN Endotoxin Removal Kit** (製品コード MIR5910) が便利です。

[Q2] トランスフェクションする場合、培地に抗生物質が含まれていてもいいか？

[A2] カナマイシン等の陽イオン性の抗生物質は、複合体の形成を阻害することがありますので、複合体形成時には抗生物質を除くことをお勧めします。10 units/mlのペニシリンおよびストレプトマイシンは培地に含まれていても問題ありません。

[Q3] 実験のコントロールは？

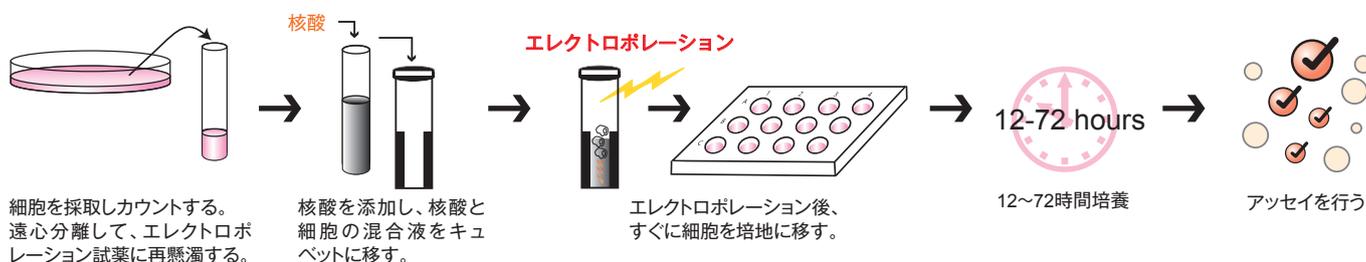
[A3] プラスミドDNAの効率測定には、**Label IT Plasmid Delivery Controls** (製品コード MIR7904ほか) をお使いいただけます。

エレクトロポレーション

★ 試薬の無料サンプルご提供中

化学的なトランスフェクションでは核酸導入が困難な哺乳類細胞、幹細胞、初代細胞に対して、物理的な導入方法であるエレクトロポレーションの利用は、高い核酸導入効率を期待できます。Ingenio[®] Electroporation Kitは、細胞へのダメージを最小限に抑えつつ高効率な導入を実現する試薬です。

操作方法の概要



製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Ingenio [®] Electroporation Kit with 0.2 cm cuvettes	50回	MIR50115	¥69,000
Ingenio [®] Electroporation Kit with 0.4 cm cuvettes	50回	MIR50116	¥69,000
Ingenio [®] Electroporation Solution	50回	MIR50114	¥42,000

※Ingenio Electroporation Kit は、Lonza社 (amaxa Nucleofector Device)、Bio-Rad社 (Gene Pulser Xcell Electroporator)、BTX社などが販売するキュベット式エレクトロポレーション装置に適合します。詳細はウェブカタログをご覧ください。

★ オンラインツール…ウェブサイトのタイトル(下記の青字)で検索、もしくは、以下のQRコードを読み取り、アクセスしてください。

「遺伝子導入試薬 選択ガイド

(Mirus Bio社)

実験目的別に、標的細胞に最適なトランスフェクション試薬がぱっとわかる表を掲載!



「TransIT[®]シリーズ

無料サンプルお申込みフォーム

小容量サイズを無料でお試しいただけます。複数の種類のお申込みも可能です。



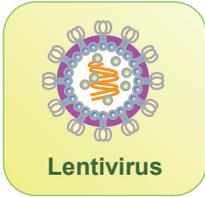
「遺伝子導入試薬 検索ツール Reagent Agent」

細胞と導入する核酸の種類を選択して入力すれば、推奨試薬を表示します。

※TransITシリーズの各製品ページからご利用いただけます。

※TransIT、IngenioはMirus Bio社の製品です。

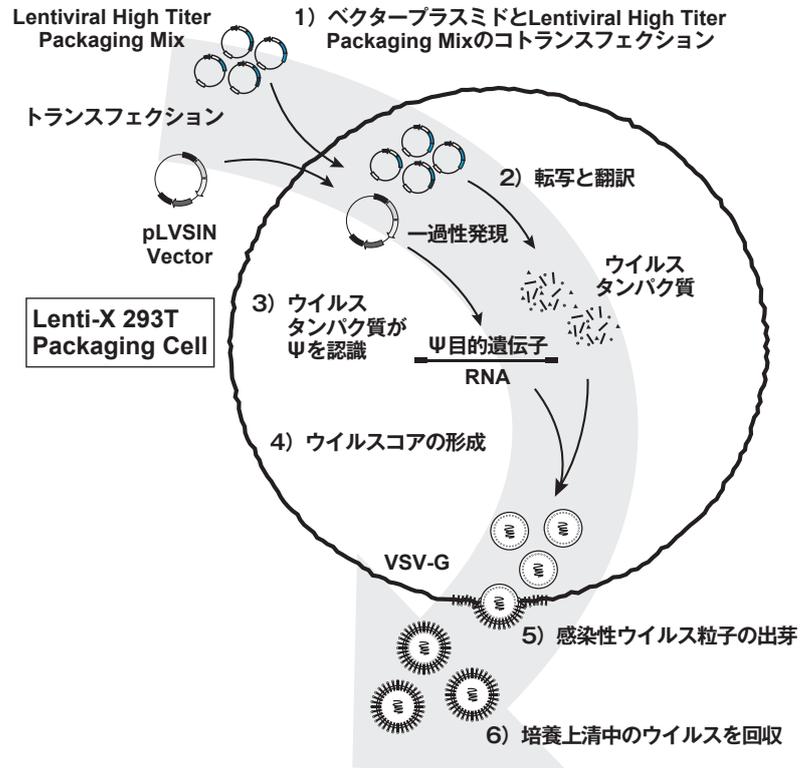
★レンチウイルスベクターの特徴と使用上の留意点



現在一般的に利用されているレンチウイルスベクターは、HIV-1 (Human immunodeficiency virus 1 型) を基に開発されており、レトロウイルスベクターでは困難であった造血幹細胞や神経細胞などの非分裂細胞を含めた**ほぼすべての哺乳類細胞への遺伝子導入が可能**です。

また、レトロウイルスベクター同様、レンチウイルスベクターを用いて導入された目的遺伝子は宿主細胞ゲノムに組み込まれるため、**長期にわたる安定した遺伝子発現が可能**です。

加えて、安全性を高める工夫として、HIV-1ウイルス由来の修飾・制御遺伝子の機能と構造遺伝子を欠損した増殖力等欠損株に該当するレンチウイルスベクターが広く利用されている他、プロウイルスにおいてLTR (Long Terminal Repeat) のプロモーター活性を喪失するよう改変されたSIN (Self Inactivating) 型レンチウイルスベクターについては、国内においても**P2レベルの実験施設にて取扱いが可能**です。



レンチウイルスベクターの産生フロー

操作方法の概要

1. 目的遺伝子のクローニング

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を作製でき、安全性の高い遺伝子導入の実現が可能です。

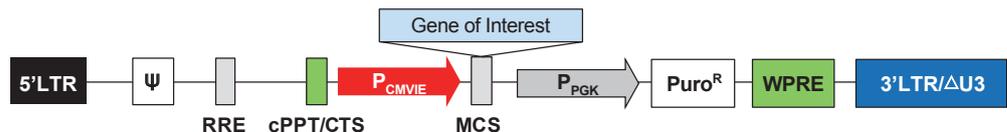
- HIV-1由来の修飾遺伝子 (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) と制御遺伝子 (*tat*, *rev*) の機能を欠損
- 構造遺伝子 (*gag*, *pol*, *env*) の固有部分を全て欠損
- プロウイルスにおいてLTRのプロモーター活性を持たないよう、3'LTRのU3領域にあるエンハンサーとプロモーター部分を欠損

タカラバイオの

LVSIN Vector

シリーズは、このようなSIN型のレンチウイルスベクタープラスミドです。本Vector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、なお約4.5 kbまでの目的遺伝子の挿入が可能です。

pLVSIN Vectorの構造



- cPPT/CTS : cPPTとCTS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するため、ベクターのゲノムへの組み込みと遺伝子導入効率が向上します。
- RRE : 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。
- WPRE : 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。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増強します。

2. ウイルスのパッケージング

目的遺伝子を入れたレンチウイルスベクタープラスミドを、パッケージングに必要な *gag*, *pol*, *tat*, *rev* のレンチウイルスタンパク質、およびエンベロープタンパク質 (VSV-G など) を発現するプラスミドとともに **Lenti-X 293T Cell Line** などのパッケージング細胞にコトランスフェクションします。

その結果、レンチウイルスベクタープラスミドより転写された組換えウイルスRNAゲノムは、そのパッケージングシグナル (Ψ) によりパッケージングタンパク質に取り込まれ、ウイルスコアが形成されます。次に、このウイルスコアは細胞膜に輸送され、エンベロープタンパク質を含む細胞膜に封入された後、感染性のウイルス粒子として細胞膜から出芽し培地中に放出されます (左図)。ウイルス粒子は未成熟粒子で出芽し、体液や培養液中で成熟します。

レンチウイルスのパッケージングには、必要なコンポーネントを効率良く発現するプラスミドを最適な比率で混合した **Lentiviral High Titer Packaging Mix** やパッケージングプラスミドとトランスフェクション試薬をプレミックスにした簡便操作の **Lenti-X Packaging Single Shots (VSV-G)** などが利用できます。

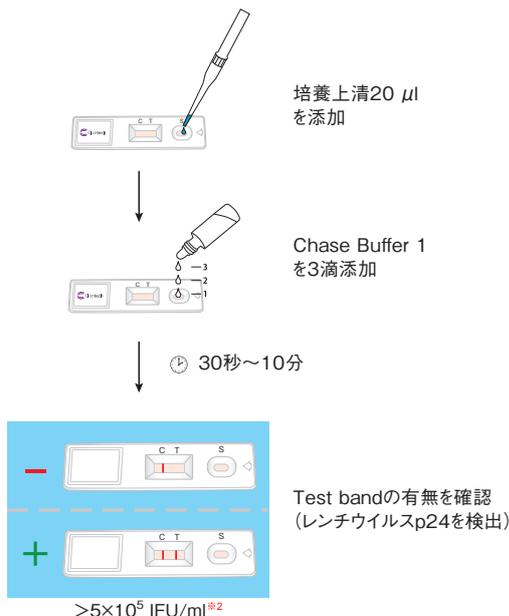
3. ウイルス粒子の回収

パッケージング細胞にコトランスフェクションしてから48時間後に培養上清を回収し、0.45 μm フィルターでろ過してウイルス粒子を回収します。十分なタイター (5×10^5 IFU/ml) が得られる培養上清回収のタイミングは、**Lenti-X GoStix Plus** を用いた簡易的な力価測定により確認することができます。

GoStix Plus カセットに20 μl の上清を滴下すると、レンチウイルス p24 の量に応じたバンドが10分後に検出されます。従来品のGoStixは定性的な判定用でしたが、**GoStix Plus** は得られたバンドの強度をスマートフォンアプリ^{※1}で解析することにより、レンチウイルス量を測定することができます。

※1: 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、弊社ウェブカタログをご確認ください。

Lenti-X™ GoStix™ Plusの操作手順

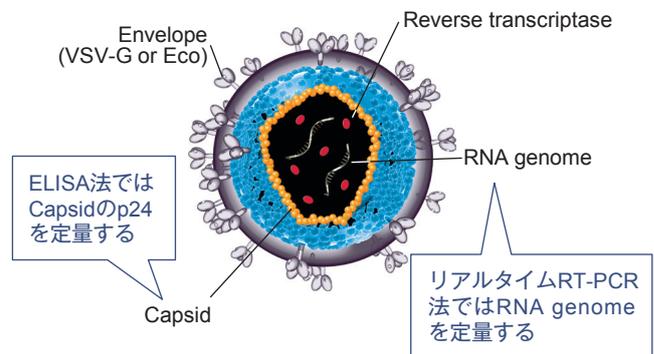


※2: 検出感度は、ウイルス力価 (IFU) の測定法やウイルス調製法により異なる場合があります。

4. ウイルスベクターの力価測定

最適な多重感染度 (MOI) を調べて再現性のある遺伝子導入結果を得るために、回収したウイルスの力価を正確に算出します。レンチウイルスベクターの力価測定方法として、リアルタイムRT-PCRやELISA法により測定したウイルスのゲノムRNA量やタンパク質量からウイルス粒子数を算出する方法と、蛍光タンパク質や薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子により評価した遺伝子導入効率による方法 (生物学的タイター) の大きく2種類が挙げられます。

このうち、遺伝子導入効率に基づいた生物学的タイターでは、細胞にウイルスベクターを感染させて力価測定を行うため、より実際に近い評価結果が得られる一方、その評価には数日~数週間の時間を要します。これに対して、リアルタイムRT-PCRによるRNAタイター、ELISA法によるウイルス粒子数の測定では、比較的短時間で力価測定が可能です。また、リアルタイムRT-PCRで求められるRNAタイター (IFU/ml) と生物学的タイターとの相関値 (copies/IFU) をあらかじめ求めておけば、短時間で得られるRNAタイターから生物学的タイターを推定して、MOIを決定することも可能です。

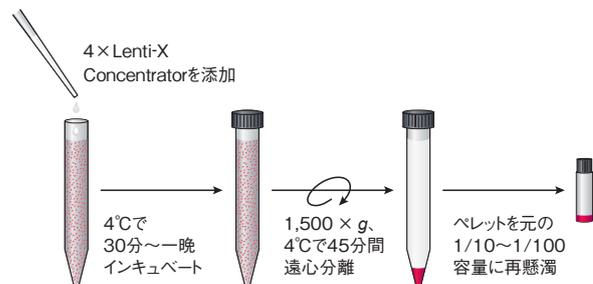


5. ウイルスベクターの精製・濃縮

回収した培養上清中には、残存するプラスミドDNAや培地中の血清成分、強い免疫原性を示すウイルスタンパク質や核酸などのウイルス感染・導入を阻害する物質が含まれています。*in vivo* や感受性の高い繊細な細胞にレンチウイルスを使用する場合、それらの不純物を除くことは極めて重要です。

Lenti-X Maxi Purification Kit を用いることで、簡便に高収量・高純度のウイルスを得ることができます。

また、回収したレンチウイルスベクターの力価が十分でなかった場合や大容量のウイルス上清を回収した場合には、ウイルス上清を濃縮することによって高力価のレンチウイルスベクターを得ることができます。**Lenti-X Concentrator** を用いれば45分遠心するだけで簡単に約100倍の濃縮が可能です。



6. レンチウイルスベクターによる遺伝子導入

レンチウイルスベクターを用いる細胞への高効率な遺伝子導入方法として以下の方法を推奨します。

・Polybrene法

Polybrene (ポリブレン)法は接着性細胞株 (HT-1080、HeLaなど) においてレンチウイルスベクターやレトロウイルスベクターを導入する一般的な方法です。細胞表面とウイルス粒子は通常マイナスに帯電しています。ここにポリブレンを加えるとウイルスとの非特異的な結合に伴って、ポリブレンのプラス電荷がウイルスのマイナス電荷を中和し、細胞表面と結合しやすくなります。細胞表面がウイルスのエンベロープと接触しやすくなることで、遺伝子導入効率が著しく上昇します。ポリブレンの一般的な濃度は2~12 µg/mlであり、過剰に(24時間以上)細胞をポリブレンにさらすと毒性が現れるため、培地交換を行ってポリブレンを除去する必要があります。

・RetroNectin法

レンチウイルスベクター/レトロウイルスベクターによる遺伝子導入時に**RetroNectin**をコートしたプレートやディッシュを用いる手法は、リンパ球等の浮遊細胞や遺伝子導入が困難な造血幹細胞、ポリブレン等の遺伝子導入補助剤では毒性がある細胞への遺伝子導入効率の向上に最適な方法です(12ページのコラム参照)。

! この製品に注目

Lenti-X Acceleratorは、磁性ビーズを用いてレンチウイルスおよびMMLV、MSCVベースのレトロウイルスを効率良く、迅速に細胞へ導入するための試薬です。

ウイルスと磁性ビーズをあらかじめ20分間プレインキュベーションした後、ウイルス・磁性ビーズ混合液を細胞に添加して5分間インキュベートするだけの簡単操作で、感受性細胞にも適しています。

※ TransIT、TransducelTはMirus Bio社の製品です。

用途	製品名	容量	製品コード	価格(税別)	備考
SIN型レンチウイルスベクタープラスミド	pLV5IN-CMV Neo Vector ※	20 µg	6181	¥64,000	
レンチウイルスパッケージング試薬	Lentiviral High Titer Packaging Mix	60回	6194	¥183,000	
ワンショットタイプのレンチウイルスパッケージング試薬	Lenti-X™ Packaging Single Shots (VSV-G)	16回	631275	¥148,000	*
パッケージング用細胞株	Lenti-X™ 293T Cell Line	1 ml	632180	¥70,000	
トランスフェクション試薬	TransIT®-Lenti Transfection Reagent	0.3 ml	MIR6603	¥23,000	
簡易力価測定	Lenti-X™ GoStix™ Plus 無料サンプルご提供中	20回	631280	¥55,000	
qRT-PCR法による力価測定	Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit	200回	631235	¥115,000	
ELISA法による力価測定	Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit	96回	632200	¥91,000	
レンチウイルス精製	Lenti-X™ Maxi Purification Kit	2回	631233	¥47,000	
レンチウイルスベクターの濃縮	Lenti-X™ Concentrator	100 ml	631231	¥36,000	
標的細胞への遺伝子導入促進	RetroNectin®	0.5 mg (0.5 ml)	T100A	¥30,000	
	Lenti-X™ Accelerator	400 µl	631256	¥64,000	
	TransducelT™ Transduction Reagent	1 ml	MIR6620	¥4,200	

※ EF1αプロモータータイプ、蛍光タンパク質融合発現タイプなど多数のラインナップがあります。

* ご購入前にMTA (Material Transfer Agreement) をご確認ください。詳細は弊社ウェブカタログで確認ください。

【関連製品】

用途	製品名	容量	製品コード	価格(税別)	備考
SARS-CoV-2スパイクタンパク質エンベロープを持つシュードタイプレンチウイルスの作製に	Lenti-X™ SARS-CoV-2 Packaging Single Shots (WT Spike, Full Length)	12回	632668	¥170,000	
	Lenti-X™ SARS-CoV-2 Packaging Single Shots (WT Spike, Truncated)	12回	632670	¥170,000	
	Lenti-X™ SARS-CoV-2 Packaging Single Shots (D614G Spike, Full Length)	12回	632669	¥170,000	
	Lenti-X™ SARS-CoV-2 Packaging Single Shots (D614G Spike, Truncated)	12回	632671	¥170,000	
SARS-CoV-2シュードウイルスの宿主細胞に	Human ACE2 293T Cell Line	1 ml	631289	¥280,000	

★アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの特徴と使用上の留意点



Adeno-Associated Virus

アデノ随伴ウイルス(Adeno-Associated Virus : AAV)は、アデノウイルスやヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルス存在下で増殖する非エンベロープウイルスです。

AAVベクターは**P1レベルの施設で取扱い可能**であり、取扱いが容易です。AAVベクターは**分裂細胞／非分裂細胞を問わず遺伝子導入ができ、特に非分裂細胞においては長期間の発現が可能**です。また、免疫原性が低く、**動物個体への遺伝子導入**にも適しています。非常に安定なウイルスであり、精製操作も簡便に行うことができます。

AAVは**血清型(セロタイプ)の違いによって宿主域やウイルスの持つ特徴が異なる**ことが知られています。標的の細胞・組織に合わせて血清型を選択してください。

※遺伝子導入の程度は実験条件によって異なる場合がありますので、文献を参照してください。

血清型と主な標的組織 (血清型1、2、5、6の場合)

血清型	主な標的組織
AAV1	筋肉、肝臓、気道、中枢神経系
AAV2	広範囲の細胞・組織
AAV5	中枢神経系、肝臓、網膜
AAV6	心臓、筋肉、肝臓

【参考文献】

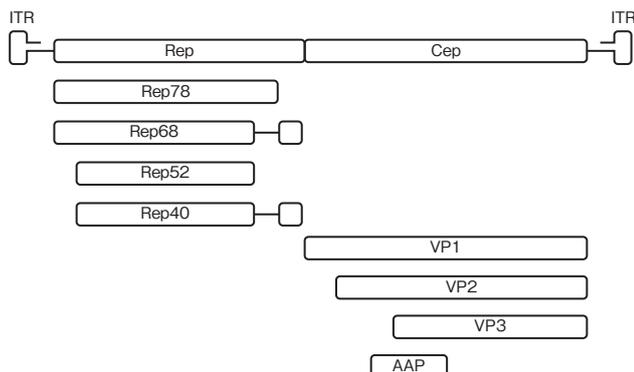
Miyake K, Miyake N, Yamazaki Y, Shimada T, Hirai Y. Serotype-independent method of recombinant adeno-associated virus (AAV) vector production and purification. : *J Nippon Med Sch.* (2012);**79**(6):394-402.

小澤敬也
AAVベクターの開発と遺伝子治療への応用：蛋白質核酸酵素Vol.52 No.10 (2007) 1288-1293.

Ellis BL, Hirsch ML, Barker JC, Connelly JP, Steininger RJ 3rd, Porteus MH. A survey of *ex vivo/in vitro* transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. : *Virology*. (2013) Mar 6;**10**:74.

AAVのゲノム構造

AAVのゲノムは約4.7 kbの1本鎖DNAで、両末端にITR (Inverted Terminal Repeat) と呼ばれるT字型のヘアピン構造が存在します(下図)。このITRが複製の開始点となり、プライマーとして機能するほかウイルス粒子へのパッケージングにも寄与します。AAVのゲノムには3つのORFがコードされており、1つ目は複製、転写に関連しているRep、2つ目はウイルス粒子の外殻タンパク質をコードするCap、3つ目は非構造タンパク質であり、ウイルス粒子形成に必須の因子であるAAPです。Rep領域には4種類の異なるタンパク質 (Rep78、Rep68、Rep52、Rep40) がコードされており、またCap領域には3種類の異なるタンパク質 (VP1、VP2、VP3) がコードされています。



野生型AAVゲノム構造とコードするタンパク質

■ AAV Helper Free Systemとは…

AAVベクターをヘルパーウイルスを使用せずに安全に作製するシステムです。タカラバイオでは各種血清型のAAVベクター作製システム **AAVpro Helper Free System** を販売しています。このシステムでは、AAVベクターの作製に必要な複数のプラスミドをHEK293細胞にトランスフェクションすることで、簡便にAAVベクターを作製することができます。

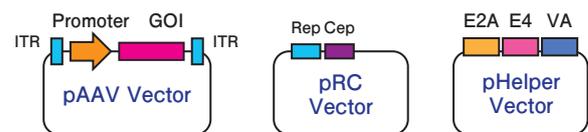
■ AAVpro® Helper Free SystemによるAAVベクターの作製

操作方法の概要

1. 目的遺伝子のクローニング

AAVベクターの作製に必要なコンポーネントは、以下の3種類のプラスミドです。

- ・ pAAV Vector : 目的遺伝子の発現カセットと2つのITRを含むベクタープラスミド
- ・ pRC Vector : AAV2のRep遺伝子と各血清型のCap遺伝子を含むプラスミド
- ・ pHelper Vector : アデノウイルス由来のE2A、E4、VAを含むプラスミド



標準的なクローニング方法を用いて、目的の遺伝子配列 (Gene of Interest : GOI) をpAAV Vectorのマルチクローニングサイト (MCS) に挿入します。クローニングにはIn-Fusion Snap Assembly Master Mix (製品コード 638947など) も使用できます。目的遺伝子を含むpAAV Vectorは細胞へのトランスフェクションに適したグレードに精製し、DNA濃度 1 µg/µl に調整します。

※クローニングする目的遺伝子サイズ：最大2.5 kbまで

2. ウイルスのパッケージング

HEK293細胞またはHEK293T細胞を、直径100 mmの細胞培養用ディッシュに2.5~4.0×10⁶ cells/dishで播種して培養します。細胞播種の翌日に、精製pAAV Vector、本キットのpRC VectorおよびpHelper Vectorを細胞へトランスフェクションします。

トランスフェクション試薬として、**TransIT-VirusGEN Transfection Reagent**を使用する場合は以下の通りです。

- ① TransIT-VirusGEN Transfection Reagentを室温に戻し、使用前にボルテックスで混合する。

②以下の混合比で無血清のDMEM、プラスミドDNAを加え、穏やかにピペティングして完全に混合する。

pAAV Vector (1 µg/µl)	5 µl
pRC Vector (1 µg/µl)	5 µl
pHelper Vector (1 µg/µl)	5 µl
無血清DMEM or PBS	1,000 µl
Total	1,015 µl

- ③ ②に30 µlのTransIT-VirusGEN Transfection Reagentを添加し、穏やかにピペティングして混合し、15~30分間、室温で静置する。
- ④前日に播種したHEK293またはHEK293T細胞に③の混合液を滴下し、さらに培養する。
- ⑤37°C、5% CO₂で48~72時間培養しウイルスを回収する（新しい培地への交換不要）。

3. ウイルス粒子の回収

AAVベクター産生細胞の回収（トランスフェクションから2~3日後）

- ①0.5 M EDTA (pH8.0)を培養液の1/80容量で添加し、よく混合した後、10分間室温で静置して、細胞をディッシュ表面から剥離させる。
- ②剥離させた細胞を遠心管に回収し、1,750×gで10分間遠心後、上清を除いて細胞を回収する。

AAVベクター産生細胞からのベクター抽出

キット添付のAAV Extraction Solutionの使用により、簡便にAAVベクターを抽出することができます。従来行われていた凍結融解法や超音波破碎法のように液体窒素や超音波破碎機を準備する必要がありません。

- ①回収した細胞ペレットをボルテックスもしくはタッピングにより十分にほぐす。
- ②0.5 mlのAAV Extraction Solution Aを添加する。
- ③ボルテックスで15秒間懸濁する。
- ④室温で5分間静置後、さらに15秒間ボルテックスして懸濁する。
- ⑤2,000~14,000×g、4°Cで10分間遠心する。
- ⑥上清を新しいチューブに回収する。
- ⑦50 µlのAAV Extraction Solution Bを添加してピペティングにより混合する。

※回収したAAVベクターは-80°Cで保存可能

4. ウイルスベクターの精製・濃縮

回収したAAVベクター溶液の純度は、特に動物個体へ投与する際に大きく影響します。抽出液から夾雑物を除去するためには、超遠心法など長時間を要する手法が従来から用いられてきましたが、フィルターろ過で簡単かつ短時間で操作できるAAVpro Purification Kit (All Serotypes)により、同程度の精製が可能です。

- ①AAVベクター産生細胞からのベクター抽出⑦で得られた溶液に、Cryonase Cold-active Nucleaseを1/100量（終濃度200 U/ml）添加し、37°Cで1時間反応させる。
- ②①の溶液にPrecipitator Aを1/10量添加し、ボルテックスで10秒間混和後、37°Cで30分間反応させ、再度ボルテックスで10秒間混和する。
- 注1) Precipitator Aは低温保存により白色沈殿物が生じることがありますが、品質、性能には問題ない。
37°Cで温めて完全に溶解させてから使用する。
- 注2) 反応中に沈殿物が生じることがあるが、問題はない。そのまま次のステップへ進む。
- ③②の溶液に1/20量のPrecipitator Bを添加して速やかにボルテックスで10秒間混和し、5,000~9,000×g、4°Cで5分間遠心する。
- 注) Precipitator B添加後に沈殿物が生じるが、問題ない。
そのまま遠心操作に進む。
- ④上清をMillex-HV 0.45 µmを用いてろ過する。
- ⑤④でろ過したAAVベクター溶液を、Amicon Ultra-15,100 kDaに移して2,000×g、15°Cで5分間遠心する。AAVベクター溶液が1.5 ml以下になったことを確認する。
- 注) AAVベクター溶液が1.5 ml以下になっていない場合は、⑤の遠心操作を繰り返し実施する。

⑥ろ液を除去後、5 mlのSuspension Bufferをカップ内に添加し、ピペティングで溶液を均一化し、2,000×g、15°Cで5分間遠心する。AAVベクター溶液が1.5 ml以下になったことを確認する。

注) AAVベクター溶液が1.5 ml以下になっていない場合は、⑥の遠心操作を繰り返し実施する。

⑦⑥の操作を4回（total 5回）繰り返し、最終的に任意の容量まで濃縮する。

⑧ろ液を除去後、ボルテックスで30秒間、もしくはピペティングで十分に懸濁し、Amicon Ultra-15,100 kDaカップ内のAAVベクター溶液をチューブに移す。

※⑤、⑥、⑦の遠心操作はスイングローターを使用してください。



また、AAVpro Concentratorを用いることで、簡便に効率よくAAVベクター培養上清（血清の有無にかかわらず）の濃縮や、AAVベクターを含む溶液のバッファー交換などの様々な用途に使用することができます。

5. ウイルスベクターの力価測定

ウイルスベクターの力価測定法には、AAVベクターゲノムをリアルタイムPCRで定量するベクターゲノム定量法と、力価測定用細胞への感染試験を行う生物学的力価測定法があります。

前者は迅速で定量性のある力価測定法であり、後者は実際の細胞への感染試験を行うことから、より正確で実質的な力価測定法です。

よくある質問

[Q1] 一般的に動物実験に必要なAAVベクター量は？

[A1] セロタイプや標的組織、投与方法により異なりますが、マウスの場合、 $1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ vg/マウス程度のAAVベクター量となります。ただし、ここで挙げた投与量はあくまで参考値です。文献等でご確認いただき、投与量を決定してください。

(Vg=Vector genome;リアルタイムPCR法により測定)

[Q2] AAVpro Purification Kit (All Serotypes)で処理できる細胞量はどのくらいか？

[A2] 精製操作1回につき、MaxiはT225フラスコ5本まで、Midiは1本までの細胞からAAV粒子の精製が可能です。

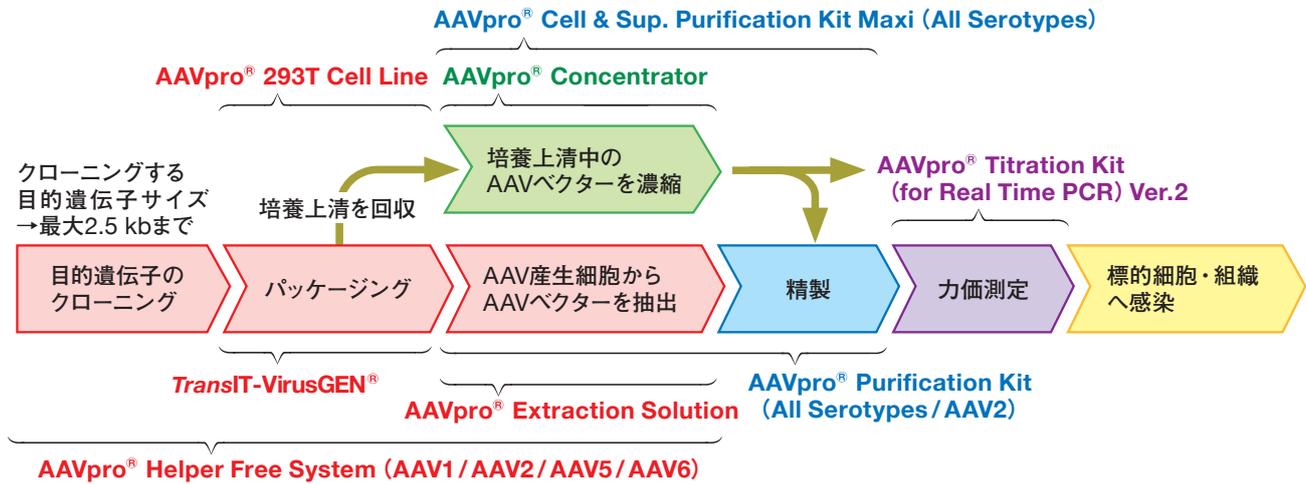
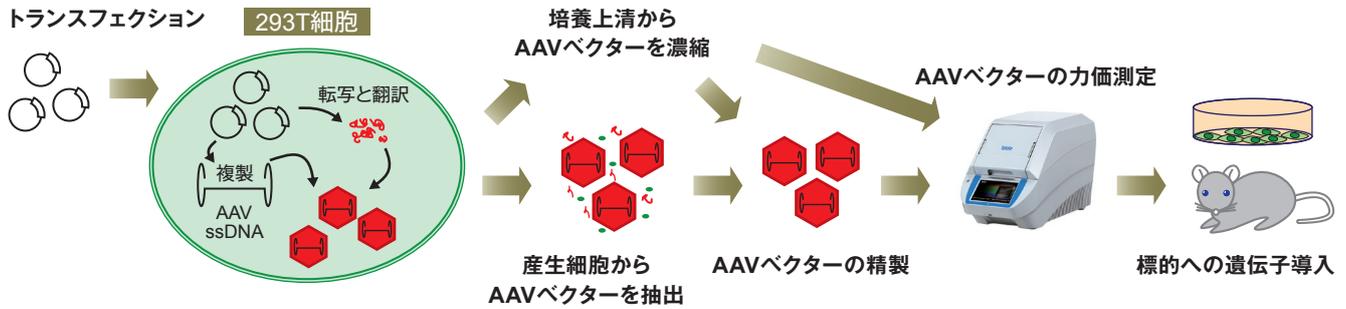
※1キットは精製4回分の容量です。

トラブルシューティング

パッケージング細胞にAAVベクター作製用のプラスミドを導入しても力価が確認できない場合、AAVベクターの産生量が低いことが考えられます。高力価のAAVベクターを得るために、以下の項目をご確認ください。

- HEK293やHEK293T細胞にはいくつかの系統が知られています。弊社ではAAVpro 293T Cell Line（製品コード632273）もしくはHEK293T/17（ATCC CRL 11268）を使用することでAAVベクター産生が安定して行えることを確認しており、AAVベクター産生にはこれらの細胞の使用をお勧めします。
- トランスフェクション効率が低い可能性が考えられます。高タイトアのAAVベクターを取得するために、高いトランスフェクション効率が不可欠となります。ユーザーマニュアル記載のトランスフェクション法でお試ください。

AAV ベクター作製の実験フローと対応製品



用途	製品名	容量	製品コード	価格(税別)
血清型2のAAVベクターを調製	AAVpro [®] Helper Free System (AAV2) ※	1 Kit	6230	¥158,000
簡便操作でAAVベクターを効率的に抽出	AAVpro [®] Extraction Solution	1 Set	6235	¥31,500
様々な血清型のAAVベクター精製に	AAVpro [®] Purification Kit Maxi (All Serotypes)	4回	6666	¥126,000
様々な血清型AAVベクターに適用できる高効率な精製キット	AAVpro [®] Purification Kit Midi (All Serotypes)	4回	6675	¥53,000
AAV産生細胞と培養上清の両方から同時にAAVベクターの精製が可能	AAVpro [®] Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes)	4回	6676	¥159,000
AAVベクター産生細胞（生細胞および凍結細胞）からウイルスベクターを抽出するための細胞懸濁液	AAVpro [®] Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes)	20 ml×2	6679	¥29,000
AAV2ベクターの高純度精製	AAVpro [®] Purification Kit (AAV2)	2回	6232	¥103,000
AAVベクターの力価測定	AAVpro [®] Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2	100回	6233	¥79,000
AAVベクターを効率的よく濃縮	AAVpro [®] Concentrator	1 Kit	6674	¥63,000

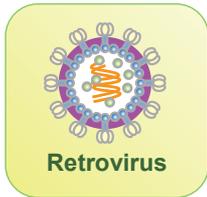
【関連製品】

※ TransITはMirus Bio社の製品です。

用途	製品名	容量	製品コード	価格(税別)
トランスフェクション試薬	TransIT-VirusGEN [®] Transfection Reagent	0.3 ml	MIR6703	¥24,000
	TransIT-VirusGEN [®] SELECT Transfection Reagent	30 ml	MIR6730	¥1,650,000
血清型2の各種AAVベクターを調製（コントロール用、shRNA発現用）※	AAVpro [®] Helper Free System (AAV2-LacZ)	1 Kit	6655	¥158,000
	AAVpro [®] Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase)	1 Kit	6652	¥158,000
	AAVpro [®] Helper Free System (AAV2-2xU6)	1 Kit	6661	¥158,000
	AAVpro [®] Helper Free System (AAV2-U6-ZsGreen1)	1 Kit	6658	¥158,000
AAV産生に最適化した293T細胞	AAVpro [®] 293T Cell Line	1 ml	632273	¥70,000
SaCas9を用いた組換えAAVによるゲノム編集システム（ワンベクタータイプ）	AAVpro [®] CRISPR/SaCas9 Helper Free System (AAV2)	1 Kit	632619	¥150,000

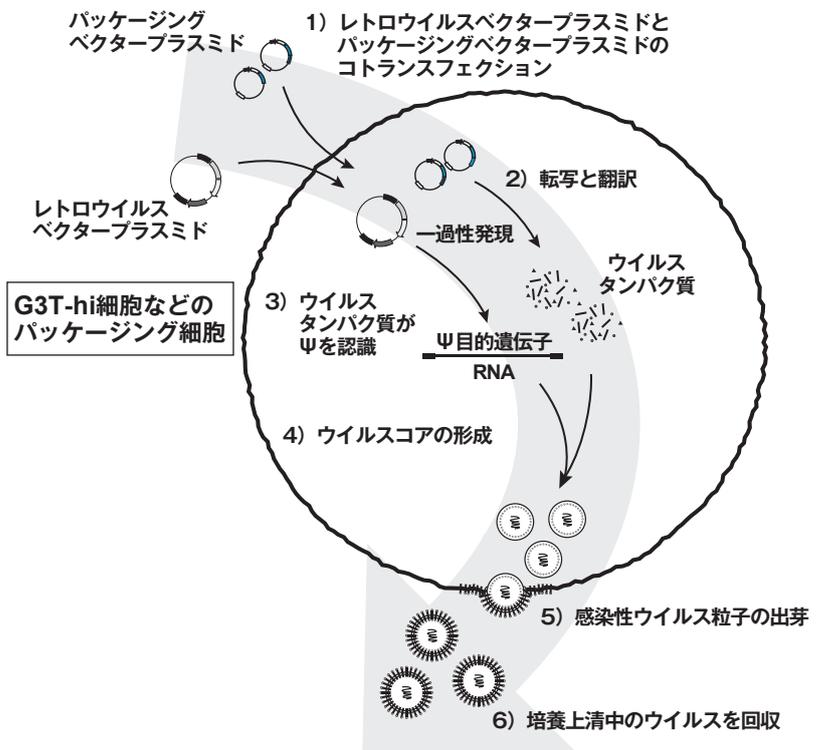
※ AAV1、AAV5、AAV6に対応した製品もラインナップしています。詳しくはウェブサイトの各製品ページをご覧ください。

★レトロウイルスベクターの特徴と使用上の留意点



レトロウイルスベクターはモロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV) を基に開発されており、**遺伝子治療での使用など豊富な実績**を有しています。増殖期にある多くの細胞種への遺伝子導入が可能であり、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可能**です。

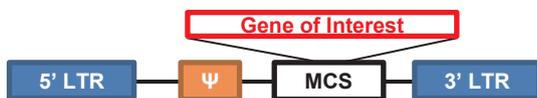
ウイルスベクターの調製は比較的容易ですが、**P2レベルの施設での取扱いが必要**です。



操作方法の概要

1. 目的遺伝子のクローニング

LTR、パッケージングシグナル (Ψ) および目的遺伝子を搭載したレトロウイルスベクタープラスミドとパッケージングに必要な *gag*、*pol*、*env* 遺伝子を搭載したベクタープラスミドを別々に準備し、これらをコトランスフェクション (共導入) することにより、自己複製能を欠く安全性の高い組換えレトロウイルスを得ることができます。レトロウイルスベクタープラスミドには、標準的なクローニング方法を用いて目的の遺伝子配列 (Gene of Interest: GOI) をマルチクローニングサイト (MCS) に挿入します。



また、自己不活化タイプの **Retro-X Q Vector** は高いウイルス力価と確実な発現レベルを実現し、プロモーターの干渉を少なくするように設計されています。

2. ウイルスのパッケージング

293T細胞等に目的遺伝子を搭載したレトロウイルスベクタープラスミドと pGP vector (*gag* および *pol* 遺伝子を搭載)、pE vector (VSV-G / Ecotropic / Amphotropic 等エンベロープをコードする *env* 遺伝子を搭載) を G3T-hi細胞などのパッケージング細胞にコトランスフェクションすることで、48時間後には一過性の組換えレトロウイルスを得ることができます。また、パッケージング遺伝子の一部あるいは全てがゲノム中に組み込まれたパッケージング細胞 (製品コード 631510 等) を用いる方法もあります。

パッケージング細胞例	<i>gag</i> 遺伝子	<i>pol</i> 遺伝子	<i>env</i> 遺伝子
293T細胞	-	-	-
GP2-293細胞	+	+	-
PT67細胞	+	+	+

(+: 細胞のゲノムに組み込み済み、 -: プラスミドにて導入)

組換えレトロウイルスの感染は、エンベロープによって規定されるため、pE vector は標的細胞に応じて選択します。

指向性	Env	レセプター	標的細胞
Ecotropic	gp70	mCAT1	マウス、ラット
Amphotropic	4070A	rPit-2	広範な哺乳類細胞
Dualtropic	10A1	Pit-1, Pit-2	広範な哺乳類細胞
Pantropic	VSV-G	不要	すべての動物細胞

3. ウイルス粒子の回収

産生された組換えレトロウイルスは培養上清中へ放出されるため、培養上清をフィルターろ過し、ウイルス液とします。

4. ウイルスベクターの力価測定

レトロウイルスベクターの力価は、リアルタイムRT-PCRにより測定します。**Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR)**ではほとんどすべてのMoMLVベースのレトロウイルスベクターのRNAゲノム量を測定し、力価(RNAタイター)を算出することができます。

5. ウイルスベクターの濃縮

Retro-X Concentratorは超遠心分離を行うことなく、簡便、迅速しかも高効率に、さまざまなエンベロープを持つレトロウイルス上清を濃縮できる試薬です。

6. レトロウイルスによる遺伝子導入

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入では、一般にウイルス液とプラス荷電の遺伝子導入補助剤の混合液を標的細胞に添加して培養するPolybrene法またはProtamine法が用いられます。遺伝子導入補助剤によってマイナス荷電の細胞とマイナス荷電のウイルスの結合を容易にし、遺伝子導入効率を上昇させます。

また、**RetroNectin**を用いることにより、物理的・化学的手法では導入が困難な造血幹細胞等への遺伝子導入が可能となります(下記コラム参照)。

その他、**Receptor Booster**を用いることにより標的細胞表面上のウイルスレセプター濃度を一過性に高めることで、遺伝子導入効率を改善する方法もあります。

用途	製品名	容量	製品コード	価格(税別)
レトロウイルスベクタープラスミド	pDON-5 Neo DNA	20 µg	3657	¥60,000
自己不活性化タイプのベクタープラスミド	Retro-X™ Q Vector Set	20 µg×4	631516	¥156,000
パッケージング試薬	Retrovirus Packaging Kit Eco ※	10回	6160	¥60,000
ウイルス力価の測定	Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR)	100反応分	6166	¥49,000
ウイルスの濃縮	Retro-X™ Concentrator	100 ml	631455	¥36,000
標的細胞への遺伝子導入促進	RetroNectin®	0.5 mg (0.5 ml)	T100A	¥30,000
遺伝子導入効率の向上	Ecotropic Receptor Booster	20回	631471	¥45,000

※Amphotropicに対応した製品もラインナップしています。

! この製品に注目

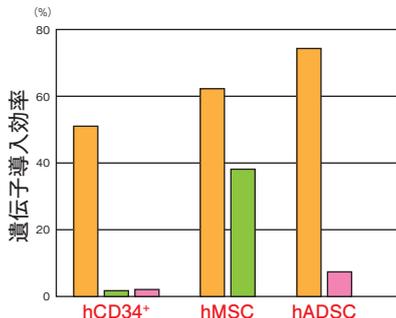
RetroNectin® (製品コード T100A/B)

- ✔レトロウイルス/レンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入している
 - ✔血球系細胞や間葉系幹細胞など導入が難しい細胞が標的である
- こんな場面で遺伝子導入効率をあげたい方にお勧めです!

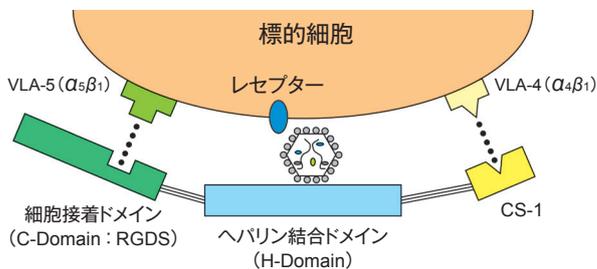
【使用方法】 細胞培養プレートにコーティングして使用します。

【幹細胞への遺伝子導入例】

ヒト造血幹細胞(hCD34⁺)、ヒト間葉系幹細胞(hMSC)、およびヒト脂肪由来細胞(hADSC)へのレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入効率を、RetroNectin法、Polybrene法、Protamine法で測定した。RetroNectin法では他の方法に比べて高効率で遺伝子導入ができた。

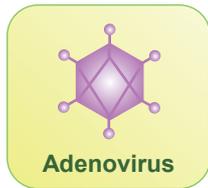


★ RetroNectinの製品情報についてはタカラバイオウェブカタログをご覧ください。



RetroNectinはインテグリンVLA-4、VLA-5を発現している哺乳類細胞に対してレトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターを介した遺伝子導入を行う際に有用です。VLA-4を発現している細胞はCS-1部位と、またVLA-5を発現している細胞は細胞接着ドメインと接着し、一方、ウイルスベクターはヘパリン結合ドメインに結合することによってRetroNectin上に共配置されます。これにより、局所的に両者の濃度が高められ、遺伝子導入が促進されると考えられています。

★アデノウイルスベクターの特徴と使用上の留意点



組換えアデノウイルスは、細胞側の受容体CARを介したエンドサイトーシスにより細胞内に侵入し、エピソードとして留まり、ゲノムに組み込まれずに**目的遺伝子産物を一過性に大量に発現**させることができます。またヒトを含む広範囲の哺乳類細胞に感染する能力をもち、**分裂細胞、非分裂細胞を問わず、株化細胞や初代培養細胞、動物個体にも感染させることが可能**です。

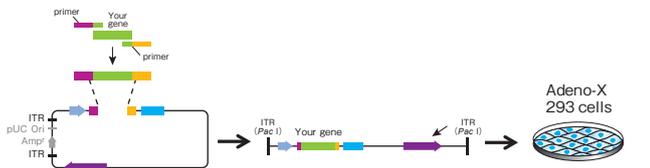
※CARの発現レベルが低い血球細胞では感染が起こりにくい傾向があります。

操作方法の概要

1. 目的遺伝子のクローニング

アデノウイルスベクターへの目的遺伝子のクローニングは、従来制限酵素によって行われていましたが、アデノウイルスベクターは36 kbの直鎖状二本鎖DNAウイルスであるため、通常のクローニング法では目的遺伝子の効率の良いクローニングは困難でした。

そこで、**Adeno-X Adenoviral System 3**ではIn-Fusionクローニング法を用いて線状化済みのpAdenoX Vectorと目的遺伝子を連結し、簡便かつ迅速な高効率クローニングを可能にしました。クローニング後、目的遺伝子を含む精製済みアデノウイルスベクタープラスミドは制限酵素(Pac I)などで線状化します。



アデノウイルスベクターに目的遺伝子(~6.4 kb)をIn-Fusion Cloning

プラスミドを精製後、Pac Iで制限酵素処理して線状化

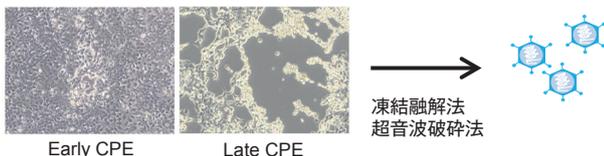
ウイルスのパッケージング

2. ウイルスのパッケージング

線状化したアデノウイルスベクターはE1Aを発現する**Adeno-X 293 Cell Line**などのパッケージング細胞へ導入します(E1A欠損型であるため)。ウイルスの構造タンパク質は細胞質で翻訳後、核内に移行しウイルス粒子を構成し、ウイルスゲノムのパッケージングシグナル(Ψ)を認識してゲノムをパッケージングします。

3. シードウイルス粒子の回収

アデノウイルスは細胞を壊死させながら増殖するため、パッケージング後、細胞の壊死(CPE=cytopathic effect)の状態を観察できます。遺伝子導入効率によりますが1週間程度培養し続けることで細胞のCPEの割合が多くなっていくので、Late CPEまで培養後、培地と細胞を回収し、凍結融解法または超音波破碎法によってシードウイルス粒子を取り出します(下図)。



Early CPE

Late CPE

凍結融解法
超音波破碎法

4. 高力価ウイルスベクターの産生と回収

シードウイルスの段階では遺伝子導入できるほどの力価は得られないため、シードウイルスを細胞に導入し自己複製させることで高力価のウイルスを得ます。シードウイルスは自己複製に必要なE1Aを欠損させているため、E1Aが常時発現しているAdeno-X 293 Cell Lineなどに感染させ、3~4日間培養し、50%程度細胞が浮いている状態で培地と細胞を回収します。このとき**Adeno-X GoStix**を用いれば、簡易的に培養上清の力価チェックが可能です。回収した細胞および培養上清から凍結融解法や超音波破碎法によって高力価ウイルスベクターを回収します。



5. ウイルスベクターの精製

回収したウイルス液中には多くの夾雑物が含まれているため、実験目的によってはウイルスの精製が必要になります。**Adeno-X Maxi Purification Kit**を用いれば、アデノウイルスベクターをフィルター吸着させ簡便に精製できるため、わずか2時間足らずで高純度な精製アデノウイルスベクターを得ることができます。

6. ウイルスベクターの力価測定

精製後のアデノウイルスベクターの力価(IFU=infection units)を**Adeno-X Rapid Titer Kit**を用いて抗体染色法にて求めます。



7. アデノウイルスベクターによる遺伝子導入

アデノウイルスベクターの感染条件はMOI=10~100(1個の細胞に対して10~100のウイルス感染単位を加える)が適当です。アデノウイルスは細胞毒性があるため、過剰なMOIで感染すると細胞にダメージを与えます。**CAR Receptor Booster**を用いることにより、遺伝子導入が難しい様々な細胞におけるアデノウイルス形質導入効率を向上させることができます。

用途	製品名	容量	製品コード	価格(税別)
アデノウイルス調製システム	Adeno-X™ Adenoviral System 3 (CMV)	1 Set	632269	¥188,000
パッケージング用細胞株	Adeno-X™ 293 Cell Line	1 ml	632271	¥70,000
簡易力価測定	Adeno-X™ GoStix™	20回	632270	¥46,000
アデノウイルスベクター精製	Adeno-X™ Maxi Purification Kit	2回	631532	¥94,000
免疫測定法による力価測定	Adeno-X™ Rapid Titer Kit	120回	632250	¥109,000
qRT-PCR法による力価測定	Adeno-X™ qPCR Titration Kit	200回	632252	¥86,000
アデノウイルスの形質導入効率を向上	CAR Receptor Booster	20回	631470	¥45,000

お役立ち情報

■ ウイルスベクターを使用する場合の実験環境整備について

ウイルスベクターを取り扱う際には、ウイルスの環境への拡散防止のため、使用する実験施設がそのウイルスの取扱いに適した閉鎖系になっているかに注意する必要があります。

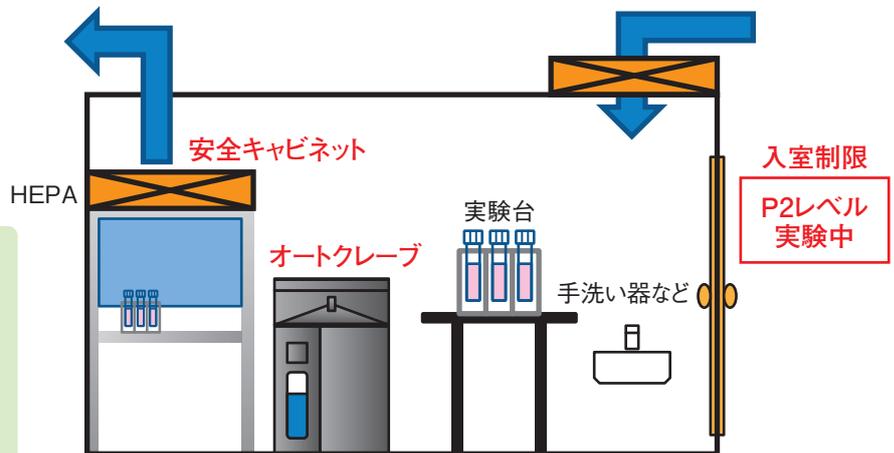
文部科学省の定める省令(「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」平成16年文部科学省・環境省令第1号)に記載されているP2レベルの施設とは、大腸菌の組換え体などを取扱い可能なP1レベルの実験施設に加え、実験室内に安全キャビネットがあること、実験室のある建物内にオートクレーブがあること、実験室入り口に「P2」レベルの施設であることを明記した表示(入室制限)があることが必要です。

P2レベル実験施設(右図)

P1実験施設に加え必要になるもの

- 安全キャビネット
- オートクレーブ
- 入口に「P2レベル実験中」と表示

実験操作は安全キャビネットの中で行います。
<エアロゾルを発生する可能性のある実験>
内向きの気流の流れを維持し、キャビネット外への微生物等の漏洩を防止します。
排気は、HEPAフィルターを通して外部に排出することにより、外部への病原体等の漏洩を防止します。



<実験操作の注意点>

- ① エアロゾル発生(ウイルス粒子が微小な水滴に含まれた状態で空中を浮遊する状態)を防ぐ
- ・ 容器は蓋をし、必要な時だけ蓋をあける。
 - ・ ピペット中の試料液を滴下する際は、ピペットの先を容器に接するようにする。
 - ・ 試験管やチューブを攪拌するときは注意する。
 - ・ 使用したチップを放置しない⇒残存する液からエアロゾルが発生する。

② 廃液処理を適切に行う

ウイルスベクター作製時、培地には活性のあるウイルスが含まれています。廃棄時にオートクレーブ処理で不活化してください。



注：ウイルスベクター製品を改変した組換え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。

■ タカラバイオウェブサイトのお役立ち情報

タカラバイオ技術セミナー —TGCA— Takara Gene & Cell Academy

「ポイントがわかる! 遺伝子導入実験」

WEBセミナーで開催中!

遺伝子導入実験についてさらに詳細を知りたい方、情報収集したい方は是非ご参加ください!

動画ライブラリーでは、製品の操作手順などの動画をご覧いただけます。

弊社ウェブサイトのバイオ産業支援TOPページの

遺伝子導入関連では…

- ▶ LentiVirus
- ▶ トランスフェクション
- ▶ AAV



から!

【遺伝子導入】その他の関連製品

製品名	概要	容量	製品コード	価格(税別)	備考
“第三世代”のレンチウイルスベクター関連					
LVpro Packaging Mix (pLVpro-MSCV Vector)	HIV-1 tat非依存性の安全性を高めた“第三世代”の高力価レンチウイルスベクター調製キット。臨床での使用を想定し、HIV-1由来配列を極限まで排除し安全性を向上。高力価のレンチウイルスベクター調製のためにパッケージングシステムを最適化。 構成品の3'LTR/ΔU3のpLVproベクターと組み合わせることでP2実験が可能(注:挿入遺伝子による)	1 Set	6962	¥250,000	*1
LVpro Packaging Mix (pLVpro-MSCV-EI Vector)		1 Set	6963	¥250,000	
LVpro Packaging Mix (pLVpro-EF1 α Vector)		1 Set	6964	¥250,000	
LVpro Packaging Mix (pLVpro-MSCV-ZsGreen1 Vector)		1 Set	6965	¥250,000	
LVpro Packaging Mix (pLVpro-MSCV-EI-ZsGreen1 Vector)		1 Set	6966	¥250,000	
LVpro Packaging Mix (pLVpro-EF1 α-ZsGreen1 Vector)		1 Set	6967	¥250,000	
LVpro Packaging Mix	パッケージングミックス単品	60回	6195	¥200,000	
トランスフェクション試薬					
Xfect™ Protein Transfection Reagent	目的タンパク質を高効率かつ低毒性に、機能を保持した状態で細胞に導入することが可能	30回	631323	¥47,000	
TransIT®-2020 Transfection Reagent	正常初代細胞など広範囲な哺乳動物細胞にプラスミドDNAを高効率で導入可能	0.4 ml	MIR5404	¥36,500	
CalPhos™ Mammalian Transfection Kit	安価で効率の良いリン酸カルシウムトランスフェクション	1 Set	631312	¥51,000	
レンチウイルスベクター関連					
Lenti-X™ Packaging Single Shots (Integrase Deficient)	ゲノム非組み込み型のレンチウイルス作製用	16回	631277	¥148,000	*2
Lenti-X™ Provirus Quantitation Kit	プロウイルスのコピー数を迅速に測定	200回	631239	¥86,000	
Lenti-X™ Integration Site Analysis Kit	プロウイルスのゲノム挿入部位を同定	1 Kit (3解析分)	631263	¥147,000	
アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター関連					
pAAV-ZsGreen1 Vector	蛍光タンパク質発現AAVベクター作製に	20 μg	6231	¥110,000	
AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2)	AAVベクター型のCRISPR/Cas9システム	1 Kit	632608	¥150,000	
クローニング用試薬とPCR酵素					
In-Fusion® Snap Assembly Master Mix	簡単・便利なディレクショナルクローニングキット	10回	638947	¥23,000	
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	非常に高い正確性と良好な反応性を両立するPCR酵素(ヒトゲノムを鋳型に~6 kbを増幅)	100回	R045A	¥31,500	

*1 ご注文の際には購入確認書をご提出ください。 *2 ご購入前にMTA (Material Transfer Agreement)をご確認ください。

詳細は弊社ウェブカタログでご確認ください。

※TransITはMirus Bio社の製品です。

- ・本パンフレット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。
- ・本パンフレット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。
- ・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。
- ・本パンフレット記載の価格は2021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。

タカラバイオ株式会社

首都圏支店・東日本支店・西日本支店 TEL 03-3271-8553
関西支店・営業第2部 TEL 077-565-6969

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