

製品コード 6161

研究用

Takara

**Retrovirus
Packaging Kit Ampho**

説明書

v202002Da

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。

- 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。
- 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。
- 本レトロ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。
- 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。

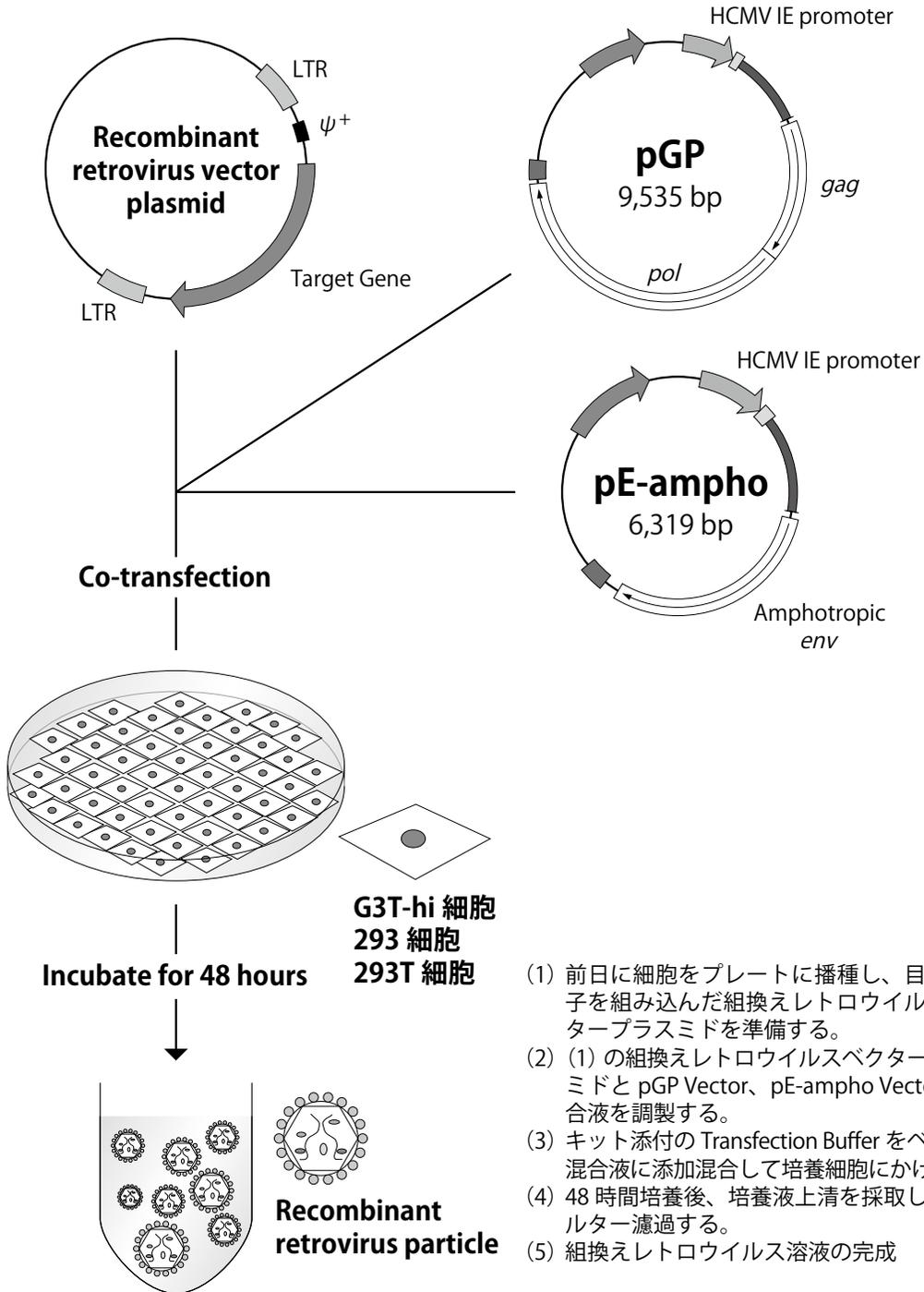
本製品は目的遺伝子を組み込んだ組換えレトロウイルスベクタープラスミドをパッケージングベクターとともにリン酸カルシウム法により同時に細胞に導入するだけで、一過性に高タイトーの組換えウイルス粒子を産生できるキットです。

キットにはパッケージングベクターとして *gag-pol* 発現ベクターとアンフォトロピック *env* 発現ベクター(両種指向性)が含まれており、ラット、マウスのみならずヒトを含めた多くの哺乳動物細胞に感染可能な組換えレトロウイルスを産生できます。本パッケージングベクターは、ウイルス粒子形成・複製に必要なレトロウイルスの構造遺伝子である *gag-pol* または *env* を含みますが、 ψ (パッケージングシグナル) と LTR 配列を含みません。 ψ と LTR を持つ組換えレトロウイルスベクタープラスミドと共に、本パッケージングベクターを添付のトランスフェクション試薬により G3T-hi 細胞、293 細胞、293T 細胞等に共導入することによって、48 時間後には一過性に高タイトーの組換えウイルス粒子が産生されます。

なお、本パッケージングベクターはそのままトランスフェクションに使用できるよう高純度に精製しています。

パッケージングベクターは *gag-pol* または *env* 以外にはレトロウイルス由来の配列を持たないため、組換えレトロウイルスベクターとの組換えによる自己複製能のあるレトロウイルス産生の可能性は非常に低くなっています。

【原理】



- (1) 前日に細胞をプレートに播種し、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準備する。
- (2) (1) の組換えレトロウイルスベクタープラスミドと pGP Vector、pE-ampho Vector の混合液を調製する。
- (3) キット添付の Transfection Buffer をベクター混合液に添加混合して培養細胞にかける。
- (4) 48 時間培養後、培養液上清を採取し、フィルター濾過する。
- (5) 組換えレトロウイルス溶液の完成

図 1. 組換えレトロウイルスの作製の概略

I. 内容 (10 回分)

本製品には、2 種類のパッケージングベクターと、トランスフェクションに必要な試薬が含まれています。

1. pGP Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	50 μg (50 μl)
2. pE-ampho Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	50 μg (50 μl)
3. Transfection Buffer	500 μl \times 10
4. 2 M CaCl_2	620 μl
5. 25 mM Chloroquine	40 μl

II. 保存

− 20°C

ただし、キット内容 3、4、5 は融解後 4°C で保存する。

※ − 20°C で適切に保存した場合、未開封であれば 2 年間安定です。

開封後 (融解後) はそれぞれ指定の温度で保存し、コンタミネーションに注意してなるべく早めにご使用ください。

III. キット以外に必要な器具・試薬

1. 器具・装置

- ・安全キャビネット
- ・細胞観察用顕微鏡
- ・− 80°C フリーザー
- ・CO₂ インキュベーター
- ・滅菌済ピペット
- ・フィルター付滅菌済チップ
- ・5 ml ポリスチレン丸底チューブ
- ・6 cm ϕ ゼラチンコート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

2. 試薬類

- ・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's Medium (DMEM) 4.5 g/L Glucose with L-Glutamine (584 mg/L) (Lonza Code. 12-604F/12-604Q)
- ・Fetal Bovine Serum (FBS)
- ・Panicillin-Streptomycin Mixture (Lonza Code. 17-602E)
- ・Trypsin/EDTA (1X) (Lonza Code. 17-161E)
- ・レトロウイルス調製細胞 G3T-hi 細胞* (製品コード 6163)、293 細胞、293T 細胞* 他
- ・滅菌精製水

* : 293 細胞に SV40 の T 抗原遺伝子を導入した 293T 細胞⁵⁾ は一過性トランスフェクション効率に優れた細胞であり、293 細胞より高い力価のウイルス液を得ることが出来ます。

293T 細胞にヒト N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ III (GnT-III) を導入した G3T-hi 細胞は 293T 細胞と同等の高い力価のウイルス液を得ることが出来ます。さらに、本細胞を用いて調製した組換えレトロウイルスは RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (製品コード T100A/B) への親和性が高く、RetroNectin との併用により標的細胞への遺伝子導入効率が有意に向上します。特に血球系細胞への遺伝子導入を行う場合に有効です。

IV. 操作

[前日：準備]

細胞 (G3T-hi 細胞、293 細胞、293T 細胞など) を 60 mm φ ゼラチンコートまたはコラーゲンコートに $2 \sim 3 \times 10^6$ cells/dish で接種し培養する。(組織培養用シャーレを用いても同等のウイルスは得られるが、トランスフェクションのダメージにより、細胞がはがれることがある。)

[1 日目：トランスフェクション]

(トランスフェクション試薬、滅菌精製水は室温に戻しておき、以下の操作は無菌的に行ってください。)

- (1) 細胞が 70 ~ 80% コンフルエントであることを確認する。(細胞密度が極端に低い場合や密度の片寄りが目立つ場合は細胞をまく工程からやり直す。)
- (2) 10% FBS/DMEM 培地に添付の 25 mM Chloroquine を 1,000 分の 1 量加え、37°C で温めておく。必要な培地量は 6 cm シャーレ 1 枚当たり 3 ml である。
- (3) DNA 混合液の調製
以下の溶液を 5 ml 容のポリスチレン製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 μl
pGP Vector	5 μl
pE-ampho Vector	5 μl
2 M CaCl ₂	62 μl
滅菌精製水	418 μl

- (4) 培地交換
細胞から培地を吸引除去し、(2) で用意した培地 3 ml を加える。
- (5) 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
Transfection Buffer を 500 μl はかりとる (電動ピペットを使用)。
 - (3) 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、直ちにピペットの排出を利用してバブリングする (10 ~ 20 秒)。
 - 1 ~ 2 分以内にシャーレに均一に滴下し、培地と混合する。
 - 37°C、5% CO₂ 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) 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 10% FBS 含有 DMEM を 4 ml 加える。

注：培地を完全に除くとトランスフェクション効率が低下することがあるので、1 ml 程度残して培地を交換する。

[2 日目：培地交換]

トランスフェクションから 24 時間後にさらに培地を交換する (10% FBS 含有 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 μm 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 で保存し、凍結融解の繰り返しを避ける。

得られたウイルス液の力価は、ウイルス粒子にパッケージングされる組換えベクターの大きさや、トランスフェクション効率などによって左右されますが、通常、一過性に $10^5 \sim 10^7$ 感染ユニット/ml の力価が得られます。

V. 参考：ウイルス力価の測定

レトロウイルスベクタープラスミドとして pDON-AI-2 Neo DNA を使用して調製した場合のウイルス力価の測定法を下記に示します。

[前日：細胞準備]

力価測定用細胞 (NIH/3T3 など) を 6 穴プレートに 5×10^4 個 / ウェルで接種し、培養する。

[1 日目：感染]

細胞の培地をポリブレン 9 $\mu\text{g/ml}$ を含有する血清培地 900 μl と交換する。

↓

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 μl をウェルに添加して感染させる。(ポリブレン終濃度 8 $\mu\text{g/ml}$)

↓

37°C、CO₂ インキュベーターで 4 ~ 6 時間培養後、1 ml の血清培地を加える。

[2 日目：培地交換]

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

[約 2 週間後：染色～コロニー計数]

プレート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、得られたコロニー数に希釈倍率を乗じた値を力価 (cfu/ml) とする。

※ 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。

VI. 参考文献

- 1) 卜部匡司、小澤敬也 実験医学別冊 バイオマニュアルアップシリーズ「遺伝子治療の基礎技術」(島田隆、斎藤泉、小澤敬也 編) (1996) 40-50 (羊土社)
- 2) 島田隆 実験医学別冊 バイオマニュアルアップシリーズ「遺伝子治療の基礎技術」(島田隆、斎藤泉、小澤敬也 編) (1996) 51-57 (羊土社)
- 3) 恵美宣彦 実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ (4)「遺伝子導入と発現・解析法」(横田崇、新井賢一 編) (1995) 74-80 (羊土社)
- 4) Pear W S, Nolan G P, Scott M L, and Baltimore D.
Proc Natl Acad Sci USA. (1993) **90**: 8392-8396.
- 5) DuBridge R B, Tang P, Hsia H C, Leong P M, Miller J H, and Calos M P.
Mol Cell Biol. (1987) **7**: 379-387.

VII. 関連製品

- [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)

- [レトロウイルスベクターを介する標的細胞への遺伝子導入の促進]
 - 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)

- [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)

- [レトロウイルス調製細胞]
 - G3T-hi 細胞 (製品コード 6163)

- [レトロウイルス調製システム]
 - Retrovirus Constructive System Eco/Ampho (製品コード 6164/6165)
 - <製品内容>
 - レトロウイルス調製細胞 G3T-hi 細胞 2×10^6 cells/vial
 - Retrovirus Packaging Kit Eco または Ampho 10 回分
 - RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment) 0.5 mg

- [レトロウイルスの力価測定試薬]
 - 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)
 - Human iPS Cell Generation™ Vector Set (製品コード 3670)

VIII. 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 <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社