

製品コード 6174

研究用

TAKARA

**Adenovirus Dual Expression Kit
(EF1 α)**

説明書

v202102Da

目次

| | |
|---|----|
| I. はじめに | |
| I-1. アデノウイルスベクター..... | 4 |
| I-2. 製品説明..... | 5 |
| II. 組換えアデノウイルスを作製するにあたって | 5 |
| III. 組換えアデノウイルス作製の原理：完全長 DNA 導入法 | 6 |
| IV. 内容 | |
| IV-1. 内容および保存..... | 8 |
| IV-2. コスミドベクターの構造..... | 9 |
| V. キット以外に必要な器具・試薬（主なもの） | |
| V-1. 器具・装置..... | 12 |
| V-2. 試薬類..... | 12 |
| VI. プロトコルの概略 | |
| <ウイルス株分離の重要性>..... | 13 |
| <コントロール実験>..... | 14 |
| VII. プロトコール | |
| A. 組換えコスミドの構築および調製..... | 14 |
| A-1. コスミドベクターへのインサートの挿入..... | 14 |
| A-2. 構築した組換えコスミドの構造確認..... | 15 |
| A-3. 構築した組換えコスミドの大量調製..... | 16 |
| B. 組換えアデノウイルスの作製および確認..... | 17 |
| B-1. 組換えアデノウイルスの作製：完全長 DNA 導入法..... | 17 |
| B-2. 組換えアデノウイルスの確認..... | 19 |
| C. 高力価組換えアデノウイルスの調製..... | 21 |
| D. 力価測定 [50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID ₅₀) 測定法]..... | 22 |
| E. 目的細胞への組換えウイルス感染..... | 24 |

VIII. Q & A

| | | |
|-------|---|----|
| Q 1. | 組換えウイルスの作製方法はどのようにして決めればよいか？ | 25 |
| Q 2. | 組換えコスミドの発現確認は必要か、どのように行えばよいか？ | 25 |
| Q 3. | 「完全長 DNA 導入法」でも、ウイルス株の分離操作は必要か？ | 25 |
| Q 4. | 組換えウイルスが現れない | 26 |
| Q 5. | コントロール実験と比較して、得られた 1 次ウイルスの数が極端に少ない | 26 |
| Q 6. | すべてのウェルで細胞変性が見られた | 26 |
| Q 7. | ウイルスの力価があがらない | 26 |
| Q 8. | 目的細胞に感染させるときにどのくらい希釈して使うのか？ | 26 |
| Q 9. | 発現はどれくらい持続するか？ | 27 |
| Q 10. | この製品を使いたい、文部科学省令の適用はどのようになるのか？ | 27 |
| Q 11. | 293 細胞内での継代で RCA (Replication Competent Adenovirus) が 混入してくることはあるのか？ | 28 |
| Q 12. | 万が一汚染があった場合、どれくらいの感染があるか？ | 28 |
| Q 13. | 汚染時の消毒はどのようにおこなうべきか？ (例えば培地がこぼれたときなど) | 28 |

IX. 付録

| | | |
|-------|-------------------------------|----|
| 付録 1. | 293 細胞のメンテナンス方法 | 29 |
| 付録 2. | 組換えアデノウイルスの取り扱いについて | 31 |
| 付録 3. | P2 レベルとは | 32 |
| 付録 4. | 組換えアデノウイルスの拡大調製 | 33 |
| 付録 5. | 精製組換えアデノウイルスの調製 | 34 |
| 付録 6. | RCA チェック< PCR 法> | 36 |
| 付録 7. | アデノウイルス Ad5/dIX、および組換えウイルスの構造 | 38 |

X. 参考文献

XI. 関連製品・各種サービス

XII. 注意

I. はじめに

I-1. アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクターは、以下のような多くの利点をもっていることから、基礎から応用における有用性の高い発現ベクターとして用いられ、培養細胞はもとより、動物個体への遺伝子導入・発現ツールとして、種々の機能解析に用いられています。

- (1) 一過性に強力に遺伝子発現するため、狙ったステージでの目的遺伝子の研究に使用することができる。
- (2) ヒトだけでなく、マウスやラットを含む広範囲の動物細胞に効率よく遺伝子導入できる。
増殖細胞だけでなく静止期の細胞に、また、神経系を含む多くの分化あるいは未分化の細胞にも感染・発現することができる。
- (3) 高力価のウイルスを得ることができる。
 $10^8 \sim 10^9$ PFU/ml 程度のウイルス液を容易に得ることができ、さらに 10^{11} PFU/ml 程度まで濃縮することも可能である。
- (4) 動物個体にも効率よく遺伝子導入することができる。特に肝臓、あるいは局所投与での遺伝子機能解析に有用である。

現在、最も汎用されているアデノウイルスベクターは、ヒトアデノウイルス 5 型由来のもので、E1 および E3 遺伝子が欠失されています。E1 遺伝子が欠失しているため、この組換えアデノウイルスは、E1 遺伝子を持続的に発現している 293 細胞¹⁾ (ヒト胎児腎細胞樹立株) では複製増殖することができますが、通常の細胞内では複製増殖することができないとされています。また、E3 遺伝子は、*in vitro* での増殖には必要ではなく、*in vivo* において免疫監視機構との関連が知られています。

本製品で作製できる組換えアデノウイルスは、E1 および E3 遺伝子が欠失しているヒトアデノウイルス 5 型由来の汎用型です。E1 遺伝子が欠失しているため通常の細胞では増殖できず、293 細胞でのみ増殖可能です。また約 7 kb までの外来遺伝子を導入することができます。

本製品の使用について

- ・ 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。
- ・ 本製品は、293 細胞中で哺乳動物に感染性を有する組換えアデノウイルスを作製するキットです。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。
- ・ 本キットで作製した組換えウイルスは 293 細胞以外では増殖できませんが、万一皮膚や気道などに付着した場合、効率よく細胞内に入り込んで目的遺伝子を発現します。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 実験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、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。

I-2. 製品説明

本製品は、組換えアデノウイルスを「完全長 DNA 導入法²⁾」により作製するためのキットです。

東京大学医科学研究所 斎藤博士らは COS-TPC 法で使用するコスミド^{3,4)}を改変して、E1 および E3 遺伝子を欠失させたアデノウイルスゲノムの全長を含むデュアルコスミド⁵⁾を構築し、より簡便な組換えアデノウイルス作製方法である「完全長 DNA 導入法」を開発しました⁶⁾。「完全長 DNA 導入法」では、293 細胞に完全長のアデノウイルスを含むプラスミドのみの導入で、目的のアデノウイルスを作製します。

本製品では完全長ウイルスゲノム両末端の外側に制限酵素 *Bsp*T104I 認識サイトおよび *Pac*I 認識サイトをデザインしたデュアルコスミドを用いています。デュアルコスミドに目的遺伝子を挿入し、得られた組換えコスミドを制限酵素 *Bsp*T104I あるいは *Pac*I で処理して 293 細胞に transfection することで、目的遺伝子の組換えアデノウイルスを取得することができます。

さらに、本製品に含まれるコスミドベクターは、ヒトポリペプチド鎖伸長遺伝子プロモーター (EF1 α プロモーター) を搭載しており、動物個体への投与時に炎症が軽減され、目的遺伝子の長期発現を可能にします。マウスでは、約 6 か月の持続発現が確認できました⁷⁾。

II. 組換えアデノウイルスを作製するにあたって

本製品では、次に示す流れで組換えウイルスの作製を行います。プロトコールの詳細については、「VII. プロトコール」をご参照ください。

組換えアデノウイルス作製の流れ

A. 組換えコスミドの作製

↓ 目的遺伝子をコスミドベクターに挿入し、組換えコスミドを作製する。

B. 組換えアデノウイルスの作製

↓ A. で作製した組換えコスミドを 293 細胞にトランスフェクションし、組換えアデノウイルスを作製する。

C. 組換えアデノウイルスの拡大調製

B. で作製した組換えアデノウイルスを拡大調製し、10⁹ PFU/ml 程度の力価の組換えウイルスを調製する。

A. 組換えコスミドの作製を始めるにあたり、挿入遺伝子の性質、および実験目的にあわせて使用するコスミドベクターを選択してください。ベクターの詳細は、「IV-2. コスミドベクターの構造」をご参照ください。

- ・動物個体で長期発現させたい場合→ **pAxEFwtit2**
免疫原性となるアデノウイルスタンパク質の発現を引き起こさない EF1 α プロモーター⁹⁾が含まれているため、動物個体での長期発現が期待できます⁷⁾。約 5 kb までの目的遺伝子を挿入することができます。
- ・任意のプロモーターを使用する場合→ **pAxcwit2**
プロモーターおよびポリ A 配列は含まれていません。約 7 kb までの発現ユニット (任意のプロモーター+目的遺伝子+ポリ A シグナル) を挿入することができます。

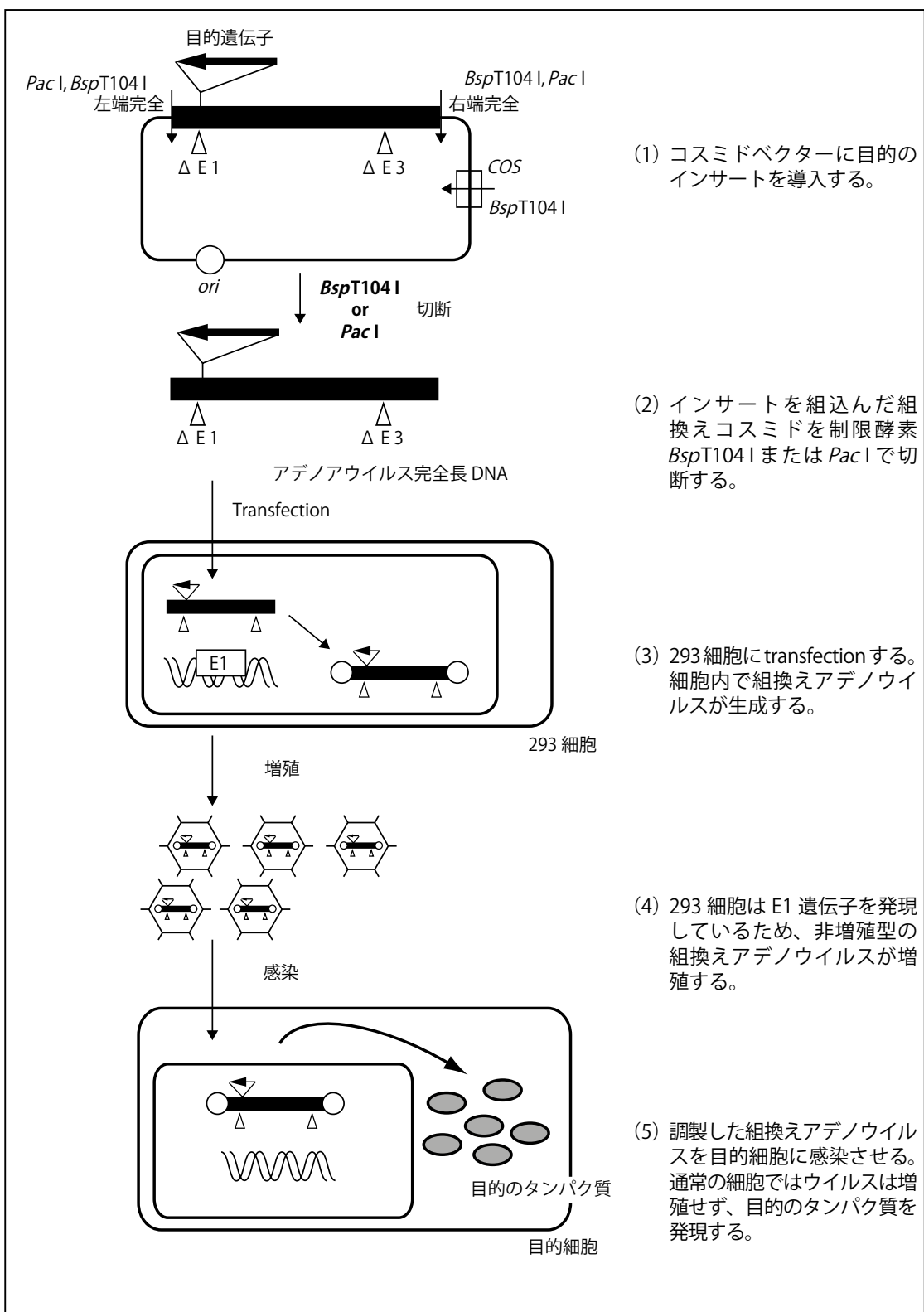
※ コスミドベクター **pAxcwit2** と **pAxEFwtit2** は、本製品に含まれています。

III. 組換えアデノウイルス作製の原理：完全長 DNA 導入法

「完全長 DNA 導入法」は、制限酵素処理した組換えコスミド（目的遺伝子を挿入したコスミドベクター）を 293 細胞に transfection することにより、組換えアデノウイルスを作製する方法です（図 1）。

本製品に含まれるデュアルコスミドは、E1、E3 遺伝子を欠失させた完全長のアデノウイルスゲノムをもつコスミドベクターです。また、ウイルスゲノム両端のすぐ外側には、制限酵素 *Bsp*T104I (*Csp*45I) および *Pac*I サイトがデザインされています。このコスミドベクターにインサートを挿入した組換えコスミドを制限酵素 *Bsp*T104I または *Pac*I で切断し、293 細胞に transfection するだけで組換えアデノウイルスを作製することができます。

細胞内での相同組換えが必要ないため、親ウイルスの混入はありません。得られる組換えアデノウイルスのほとんどが目的ウイルスです。ただ、遺伝子の性質等の影響によりウイルスの作製効率が低いことがあります（VIII. Q & A. Q1 参照）。



(1) コスミドベクターに目的のインサートを導入する。

(2) インサートを組み込んだ組換えコスミドを制限酵素 *BspT104I* または *PacI* で切断する。

(3) 293細胞にtransfectionする。細胞内で組換えアデノウイルスが生成する。

(4) 293細胞はE1遺伝子を発現しているため、非増殖型の組換えアデノウイルスが増殖する。

(5) 調製した組換えアデノウイルスを目的細胞に感染させる。通常の細胞ではウイルスは増殖せず、目的のタンパク質を発現する。

図1. 「完全長 DNA 導入法」による組換えアデノウイルス作製の原理

IV. 内容

本製品は、コスミドベクター（デュアルコスミド）と必要な試薬が含まれています。「完全長 DNA 導入法」により組換えアデノウイルスを作製することができます。

IV-1. 内容および保存

| | | |
|--|-----------|----------|
| 1. Cosmid Vector pAxcwit2* ¹ | 0.3 μg/μl | 25 μl |
| 2. Cosmid Vector pAxEFwtit2* ² | 0.3 μg/μl | 25 μl |
| 3. 制限酵素 <i>Smi</i> I (<i>Swa</i> I) | 10 U/μl | 20 μl |
| 4. 10 × H Buffer | | 100 μl |
| 5. 制限酵素 <i>Bsp</i> T104 I | 10 U/μl | 30 μl |
| 6. 10 × L Buffer | | 100 μl |
| 7. DNA Dissolution Buffer [100 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM MgCl ₂ , 300 mM NaCl] | | 50 μl |
| 8. Ligation Solution | | 50 μl |
| 9. 10 × TNE [500 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 M NaCl, 100 mM EDTA] | | 1 ml × 2 |
| 10. Proteinase K | 20 mg/ml | 200 μl |
| 11. 10% SDS | | 200 μl |
| 12. Control Cosmid pAxEFiLacZit2* ³ | 0.3 μg/μl | 50 μl |

* 1：プロモーターなし

* 2：EF1 α プロモーター⁹⁾付

* 3：pAxEFwtit2 に β-gal 遺伝子を挿入したもの

保存

- 20°C

ただし、10% SDS は、使用時に 37°C で融解しその後は室温保存

以下の試薬は、代用可能な製品を別に販売しています。

- *Smi* I および 10 × H Buffer → *Smi* I (*Swa* I) (製品コード 1111A)
- *Bsp*T104 I および 10 × L Buffer → *Bsp*T104 I (*Asu* II, *Nsp* V) (製品コード 1225A)
*Bsp*T104 I のアイソシゾマーには、*Csp*45 I、*Nsp* V、*Bst*BI があります。これらの認識配列、Cutting Site は同一です。
- Ligation Solution → DNA Ligation Kit Ver.1 (製品コード 6021)
Enzyme Solution (B 液) をご使用ください。
同キットの Reaction Buffer (A 液) と Dissolution Buffer は異なるものです。
A 液は使用しないでください。
- Proteinase K → Proteinase K (製品コード 9034)

IV-2. コスミドベクターの構造

本製品には、2種類のデュアルコスミド pAxcwit2 と pAxEFwtit2 が含まれています (図 2-1、2-2)。これらは E1 および E3 遺伝子をのぞくアデノウイルスゲノム完全長が挿入されたコスミドベクターです。

- pAxcwit2²⁾ : 基本ベクターであり、プロモーターおよびポリ A 配列が含まれていません。約 7 kb までの発現ユニット (任意のプロモーター+目的遺伝子+ポリ A シグナル) を挿入できます。
- pAxEFwtit2²⁾ : 動物個体で長期発現が期待できるヒトポリペプチド鎖伸長因子遺伝子プロモーター (EF1 α promoter, rabbit β -globin polyA シグナル) が含まれています。約 5 kb までの目的遺伝子を挿入できます。

両ベクターともクローニングサイトとして *Sma*I (*Swa*I) と *Cla*I を持っています。構築した組換えコスミドは、「完全長 DNA 導入法」に用いることができます。図 2-1、2-2 に pAxcwit2、pAxEFwtit2 の構造を示します。

※ コスミドベクターの全塩基配列は、弊社ウェブサイトよりダウンロード可能です。
(<https://www-aws.takara-bio.co.jp/research/download/vector.htm>)

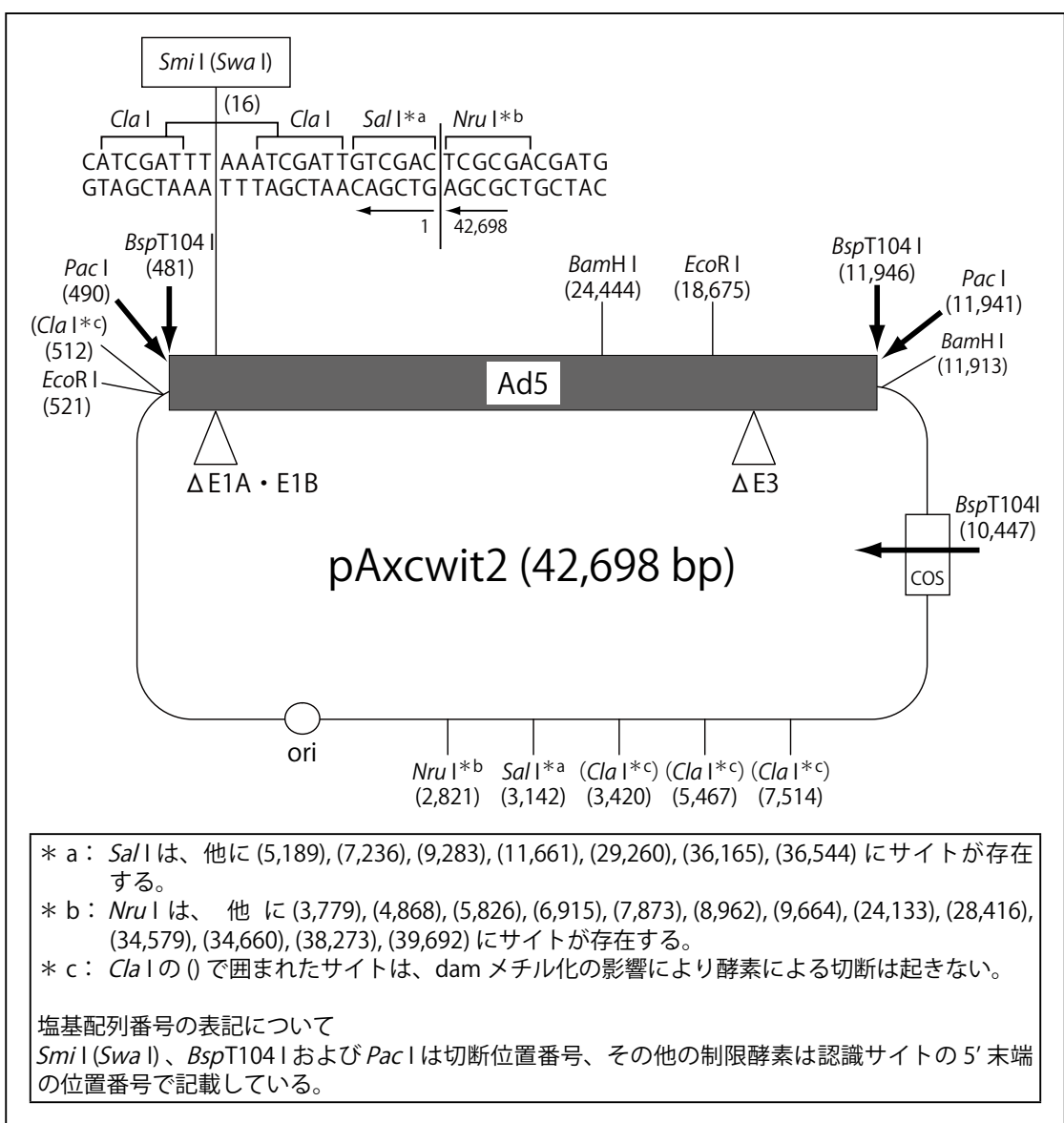


図 2-1. コスミドベクター pAxcwit2 の構造

pAxcwit2 は基本ベクターであり、プロモーター配列は含まれていない。

SmaI または *ClaI* サイトに、約 7 kb までの発現ユニット (任意のプロモーター+目的遺伝子+ポリ A シグナル) を挿入できる。

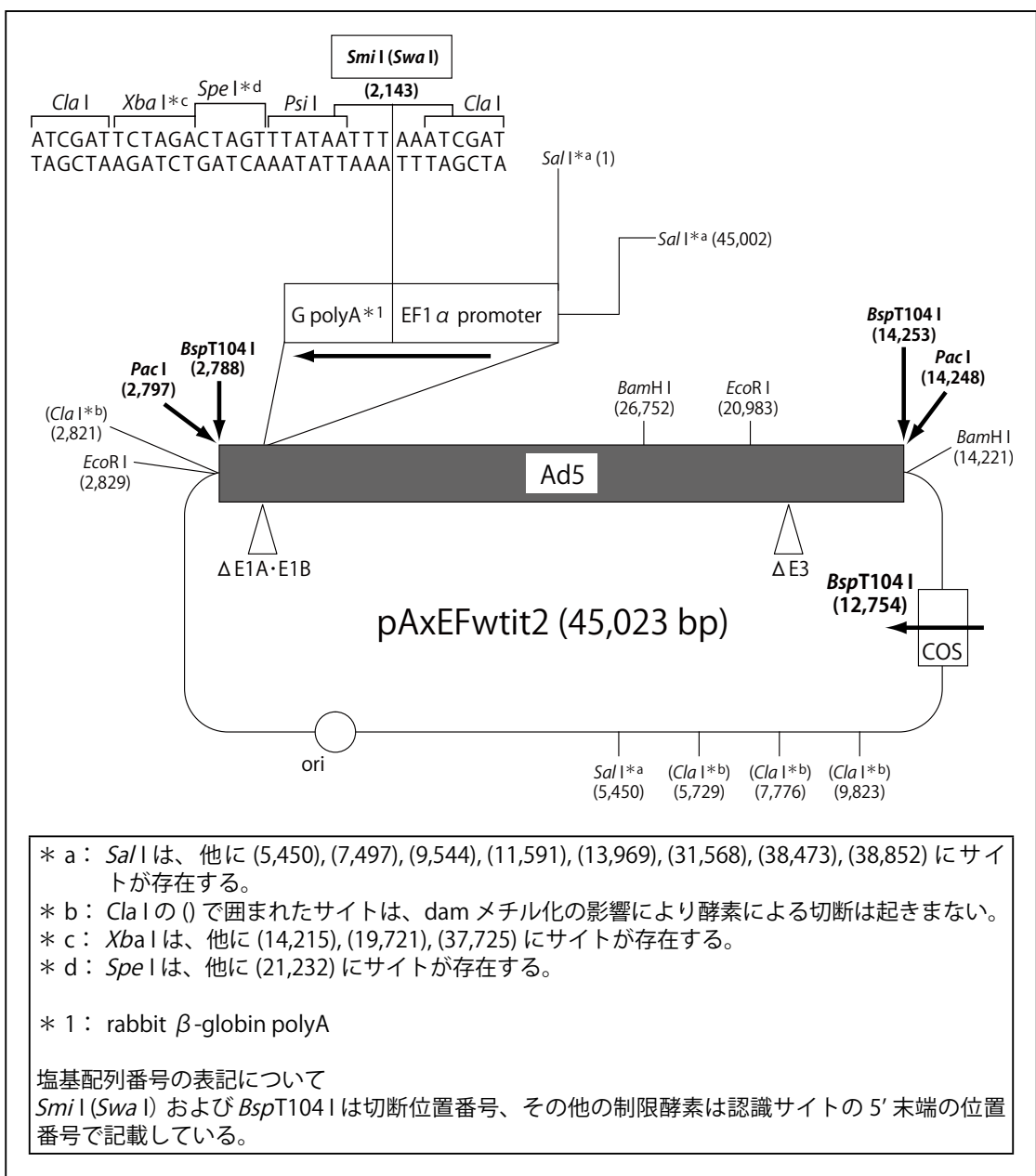


図 2-2. コスミドベクター pAxEFwtit2 の構造

pAxEFwtit2 はヒトポリペプチド鎖伸長因子遺伝子の EF1α プロモーター、rabbit β-globin polyA シグナルが含まれている。

Sma I または *Cla I* サイトに、約 5 kb までのインサート DNA を挿入できる。

V. キット以外に必要な器具・試薬 (主なもの)

V-1. 器具・装置

- ・安全キャビネット
- ・CO₂ インキュベーター
- ・細胞観察用顕微鏡
- ・微量高速遠心機
- ・冷却遠心機
- ・密閉型細胞破碎装置 (小規模の場合は不要)
- ・- 80°Cフリーザー
- ・恒温槽 (25 ~ 50°C)
- ・電気泳動装置
- ・ボルテックスミキサー
- ・オートクレーブ滅菌器
- ・オートピペッター
- ・滅菌済みピペット
- ・フィルター付き滅菌済みチップ
- ・50 ml 滅菌済み遠心チューブ
- ・滅菌済み遠心マイクロチューブ
- ・滅菌済みシーリングキャップつきマイクロチューブ (ウイルス液保存用)
- ・コラーゲンコート (タイプ I) 96 ウェルプレート
- ・コラーゲンコート (タイプ I) 24 ウェルプレート
- ・コラーゲンコート (タイプ I) 25 cm² フラスコ
- ・コラーゲンコート (タイプ I) 75 cm² フラスコ
- ・10 cm 細胞培養用シャーレ
- ・6 cm 細胞培養用シャーレ
- ・8 チャンネルマルチピペッター
- ・滅菌済みマルチピペッター用リザーバー

V-2. 試薬類

- ・λパッケージングキット (Agilent Technologies : Gigapack III XL Packaging Extract など)
- ・プラスミド調製用キット (NucleoBond Xtra Midi (製品コード 740410.10/.50/.100) など)
- ・トランスフェクション試薬 (*TransIT*-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2700) など)
- ・*recA*⁻の大腸菌株 (DH5 α など)
- ・LB 液体培地、LB 寒天プレート
- ・Ampicillin (濃度 50 ~ 100 μ g/ml で使用する)
- ・フェノール/クロロホルム、クロロホルム
- ・エタノール
- ・滅菌精製水
- ・TE Buffer
- ・EDTA 溶液
- ・DNA Blunting Kit (製品コード 6025)
- ・電気泳動用アガロースゲル (PrimeGel™ Agarose LE 1-20K GAT (製品コード 5801A) など)
- ・分子量マーカー (Wide-Range DNA Ladder (50-10,000 bp) (製品コード 3415A) など)
- ・293 細胞 (ATCC CRL-1573 など)
- ・HeLa 細胞 (ATCC CCL-2 など)
- ・Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (glucose 1 g/L)
- ・L-Glutamine (200 mM)
- ・Fetal Bovine Serum (FBS)
- ・ペニシリン/ストレプトマイシン (Lonza : Code. 17-602E など)
- ・0.02% EDTA/PBS (-)
- ・RNase A
- ・制限酵素 *Cla*I (製品コード 1034A)
- ・制限酵素 *Pac*I (New England Biolabs など : 必要に応じて使用)
- ・NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)
- ・ドライアイス

VI. プロトコールの概略

| 作業内容 | プロトコール | 必要日数 |
|---|------------------|------|
| 組換えコスミドの構築および調製 | | 4～5日 |
| ↓ | | |
| コスミドベクターへのインサートの挿入 | A-1 (14 ページ) | |
| 構築した組換えコスミドの構造確認 | A-2 (15 ページ) | |
| ↓ | | |
| 構築した組換えコスミドの大量調製 | A-3 (16 ページ) | |
| 組換えアデノウイルスの作製および確認 | | 約3週間 |
| ↓ | | |
| 組換えアデノウイルスの作製：完全長 DNA 導入法 | B-1 (17 ページ) | |
| ↓ | | |
| 組換えアデノウイルスの確認 | B-2 (19 ページ) | |
| 高力価組換えアデノウイルスの調製 | C (21 ページ) | 約1週間 |
| ↓ | | |
| 品質検定 | | |
| (力価測定 [50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID ₅₀) 法]) | D (22 ページ) | 約2週間 |
| ↓ | | |
| (RCA チェック) | IX. 付録 6(36 ページ) | 約1週間 |
| 目的細胞へのアデノウイルスの感染 | E (24 ページ) | |

※ いずれのコスミドベクターでも、「VII. プロトコール」に記載の方法により、組換えアデノウイルスを作製することができます。組換えアデノウイルスの作製ステップのプロトコールは、「完全長 DNA 導入法」で行う場合は B-1. をご参照ください。

< ウイルス株分離の重要性 >

本プロトコールでは、組換えアデノウイルス作製の最初のステップにおいてウイルス株を分離することをお勧めしています。

293 細胞に組換えコスミドを transfection し、翌日に細胞を回収、希釈して 96 ウェルプレートに播きます。18 日間、培地を加えながら CO₂ インキュベーター内で培養し、8 日目以降に細胞が完全に変性するウェルを 1 次ウイルスとして採用します。約 2 週間半（その構造確認も含めると 3 週間）の時間が必要ですが、このようにして得られる組換えウイルスは、シングルクローンである確率が高いと考えられます。

ウイルス株を分離する工程は、大変重要です。「完全長 DNA 導入法」では、理論上、親ウイルスの混入はありませんが、インサートの一部が欠失したウイルスが生じる可能性が、低くてもあります。万が一、微量でも一部欠失ウイルスが存在すると、拡大調製時や実験系において突然優勢になる可能性もありますので、transfection して得たウイルス液をそのまま増幅して用いることはお勧めできません。ウイルス株の分離は「完全長 DNA 導入法」において、必ず、プロトコールどおりに実施されることをお勧めいたします。

また、得られたウイルスを各ステップで確認することも大切です。本プロトコールでは、2 次ウイルスの調製後（「VII. B-2. 組換えアデノウイルスの確認」）および、4 次ウイルスの調製後（「VII. C. 高力価組換えアデノウイルスの調製」）に構造確認を行います。特に、非常に多くの時間と労力を要する動物実験等に進まれる場合は、より確実に、信頼性のある結果を得るためにも、プロトコール通りに、確実に高品質な組換えウイルスを作製、調製されることをお勧めいたします。

<コントロール実験>

目的とする組換えアデノウイルスを作製する際には、コントロール実験を行うことを強くお勧めします。(VIII. Q & A. Q4 参照)

本製品にはコントロールコスミド pAxEFiLacZit2 が含まれています。pAxEFiLacZit は、大腸菌の β -ガラクトシダーゼ (*lacZ*) 遺伝子がコスミドベクター pAxEFwtit2 の *Smi*I (*Swa*I) サイトに挿入されています。そのため、「完全長 DNA 導入法」でも組換えアデノウイルス AxEFiLacZ を作製することができます。

このようにして、作製した組換えアデノウイルス AxEFiLacZ は、 β -ガラクトシダーゼ (*lacZ*) 遺伝子を発現するため、目的細胞への感染条件の検討実験 (「VII E. 目的細胞への組換えウイルスの感染」) にも使用することができます。

VII. プロトコール

A. 組換えコスミドの構築および調製

【A-1. コスミドベクターへのインサートの挿入】

組換えアデノウイルスを得るために、コスミドベクターにインサートを挿入し、組換えコスミドを作製します。コスミドベクターはいずれもクローニングサイトとして *Smi*I および *Cla*I を持っています。通常は目的遺伝子を平滑化して、*Smi*I サイトにクローニングします。

(*Cla*I サイトをクローニングサイトとして使用することも可能です。その場合は、ベクター、インサートともに *Cla*I で切断したものををご用意ください。)

1. インサート DNA 断片を 0.5 μ g 程度調製する。末端が平滑でない場合、DNA Blunting Kit (製品コード 6025) 等を用いて末端を平滑化する。
2. インサート DNA 断片を精製する。フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行う。
3. コスミドベクターを制限酵素 *Smi*I で完全に切断する。
以下の反応液を調製し、30°C で 2 時間インキュベーションする。

| | |
|-----------------------------------|------------------|
| コスミドベクター | 5 μ l |
| 制限酵素 <i>Smi</i> I (10 U/ μ l) | 2 μ l |
| 10 \times H Buffer | 5 μ l |
| 滅菌精製水 | up to 50 μ l |

4. 切断したコスミドベクターを精製する。最終濃度 10 mM になるように EDTA を加えた後、フェノール/クロロホルム抽出を行う。
5. A-1-2. で調製したインサート DNA 0.1 ~ 0.2 μ g を A-1-4. に加える。
6. エタノール沈殿を行う。
※ コスミドを完全に乾かすと溶けなくなります。キムワイブの先などで残存エタノールを除去した後、直ちに次の操作を行ってください。
7. インサート DNA 断片と切断したコスミドベクターとをライゲーション反応により結合させる。DNA Dissolution Buffer を 5 μ l 加えて溶解し、Ligation Solution を 5 μ l 加える。25°C で 10 分間インキュベートする。
8. エタノール沈殿を行う。
※ DNA を完全に乾燥させないでください。
9. 制限酵素 *Smi*I で切断し、インサートを持たないコスミドを線状化する。ライゲーションした DNA に以下の試薬を加え、30°C で 2 時間消化する。

| | |
|-----------------------------------|------------------|
| 制限酵素 <i>Smi</i> I (10 U/ μ l) | 2 μ l |
| 10 \times H Buffer | 5 μ l |
| 滅菌精製水 | up to 50 μ l |

※ この反応はインサートを持たないコスミドの出現を抑えるために重要です。ただし発現ユニット内に *Smi*I 部位が存在する場合、この操作は行えません。(A-1-13. 参照)

10. 適当量を入パッケージングキットでパッケージングする。
 - ※ 比較的大きなサイズの DNA を選択的にパッケージングするようなキット (Agilent Technologies : Gigapack III XL Extract など) を用いると、後の選択が容易になります。
 - ※ パッケージングキットは、ご使用されるキットの方法に従ってください。ご参考の下記に使用の一例を示します。
 - 1) 2 × 菌液を準備する。recA⁻の大腸菌株 (DH5α など) を前々日にプレーティングしておき、前日にシングルコロニーをピックアップして LB 培地で一晩振とう培養する。使用当日、50 ~ 100 μl を 5 ml の 0.2% マルトース添加 LB に接種、OD₆₅₀ が約 1.0 になるまで 37°C で振とう培養する (約 4 ~ 6 時間)。1 ml を滅菌チューブに取り、遠心し上清を除く。ペレット (菌体) を 500 μl の 10 mM MgSO₄ に懸濁し、2 × 菌液とする。
 - 2) パッケージングを行う。A-1-9. の制限酵素処理後の溶液のうち 1 μl をパッケージングエクストラクトと混合して室温 (22°C) で 1.5 時間静置する。
 - 3) 2) に SM buffer* を 100 μl 加える。
 - * : SM buffer : NaCl 5.8 g, MgSO₄ · 7H₂O 2.0 g, 1 M Tris-HCl (pH7.5) 50 ml, 2% (w/v) gelatin 5.0 ml を精製水に加え 1 L とし、オートクレーブ滅菌を行う。
 - 4) 3) 100 μl と 1) 2 × 菌液を 100 μl 混合し、室温で 10 分静置し、感染を行う。
 - 5) LB 培地を 1 ml 加え 37°C、20 分静置する。
11. 感染させた大腸菌の 1/100、1/10、残りを、アンピシリンを含む LB 寒天プレートに播く。37°C で一晩培養する。
12. 適切なプラスミド調製用キット (NucleoBond Xtra Midi (製品コード 740410.10 / .50 / .250) など) を用いてコスミド DNA の調製を行う。寒天培地ごとコロニーをピックアップし、アンピシリンを含む LB 培地 1.5 ml で培養し、コスミド DNA の調製をする。2 ~ 5 μg のコスミド DNA が調製できる。
 - ※ コスミドは大腸菌内で長く継代すると欠失しますので、大腸菌の状態でのストックは作製しないでください。
 - ※ ライゲーション後に *Smi*I 切断した場合には、ほとんどのクローンはインサートを含んでいますので、10 個程度のコロニーについて調べれば目的のクローンを得ることができます。*Smi*I 切断を行うことができなかつた場合でも、通常、24 ~ 36 個のコロニーを調べれば目的のクローンが得られます。
13. 制限酵素切断等により、インサートの向きと構造を確認する。(「A-2. 構築した組換えコスミドの構造確認」)。

【A-2. 構築した組換えコスミドの構造確認】

組換えウイルスの作製には時間がかかりますので、この時点で目的どおりに組換えコスミドが構築できているか、十分に確認を行っておくことが重要です。

1. インサートの入っているコスミドクローンを選択する。*Cl*aI で切断することによりインサートを切り出すことができる。
2. インサートの向きの確認を行う。インサートの方向は、適当な制限酵素で切断することにより確認できる。(「IV-2. コスミドベクターの構造」)
 - ※ *Nru*I または *Sa*lI で切断し、ライゲーションすることにより、アデノウイルスゲノムのほとんどを欠失したプラスミドを得ることができます(「アデノ落とし」、図 3)。構築確認のための適当な制限酵素サイトがない場合、得られたプラスミド(「アデノ落としプラスミド」)を用いて構造を確認することもできます。
 - ※ コスミドベクターの全塩基配列は、弊社ウェブサイトよりダウンロード可能です。
3. この時点で適当な transfection 法により細胞に作製した組換えコスミドまたは「アデノ落としプラスミド」を導入し、目的遺伝子の発現を確認しておく。
 - ※ 「アデノ落としプラスミド」は発現プラスミドとしても有用です。

【A-3. 構築したコスミドの大量調製】

組換えアデノウイルスの作製のために必要な量の組換えコスミドを調製します。コスミドは大腸菌内で長く継代すると欠失しますので、以下に示す方法で増やして DNA の状態で保存してください。

1. 0.3 ~ 0.5 μg のコスミド (環状のまま) DNA と λ パッケージングエキストラクトを混合し、A-1-10. と同様にパッケージングを行う。
2. 1/100 量をアンピシリン添加 LB 寒天プレートに播き、37°C で一晩培養する。残りはアンピシリンを含む 50 ml の LB 液体培地に加え 37°C で一晩振とう培養する。
3. 翌日、プレートのコロニーが 10 個以上なら、50 ml の液体培地からコスミド DNA を調製する。プレートのコロニーが 10 個以下なら、液体培地の *E. coli* が増殖していても (長く継代しすぎていることになるので) 廃棄してやり直す。
※ 50 ml の培養から、通常 50 ~ 100 μg のコスミド DNA が回収できます。
4. ウイルス作製を「完全長 DNA 導入法」で行う場合は、コスミド DNA を調製後「B-1. 組換えアデノウイルスの作製：完全長 DNA 導入法」に進む。
※ 「完全長 DNA 導入法」には、1 回の実験に組換えコスミドが 15 μg が必要です。

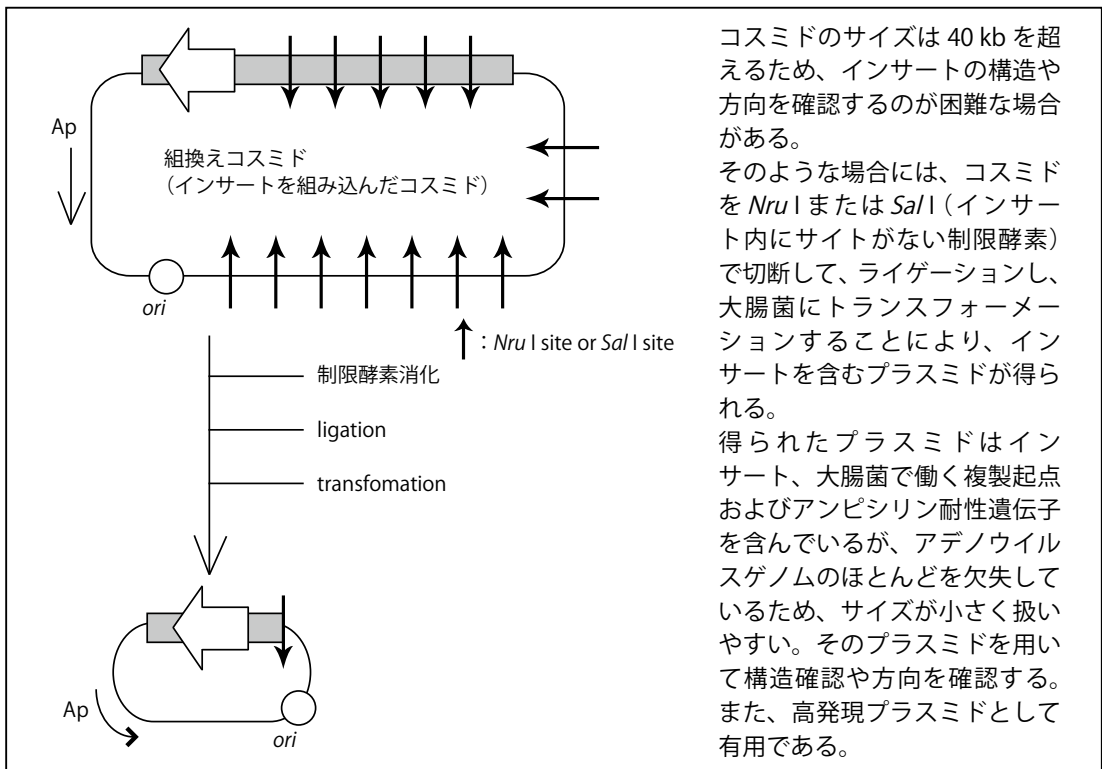


図 3. アデノ落とし

B. 組換えアデノウイルスの作製および確認

組換えアデノウイルスの作製および調製には 293 細胞が不可欠です。293 細胞のメンテナンス方法、注意事項については、「IX. 付録 1」をご参照ください。また、作製した組換えアデノウイルスの取扱い、注意事項については「IX. 付録 2」をご参照ください。

【B-1. 組換えアデノウイルスの作製：完全長 DNA 導入法】

(注意) ゲノム DNA の切り出しは、アデノウイルスゲノムの末端により近い位置で行うほうが、効率よく組換えアデノウイルスを作製することができます。インサート配列中に *Bsp*T104I 認識配列 (TTCGAA) および *Pac*I 認識配列 (TTAATTAA) がともに存在しない場合は、アデノウイルスゲノム末端により近い位置に認識配列がある *Bsp*T104I で切断してください。インサート配列中に *Bsp*T104I 認識配列が存在し、*Pac*I 認識配列が存在しない場合のみ、*Pac*I で切断してください。

1. A-3. で調製した組換えコスミド DNA を制限酵素 *Bsp*T104I で切断する。以下の反応液を調製し、37°C で 2 時間インキュベーションする。

| | |
|----------------------------------|-------------------|
| 組換えコスミド DNA | 15 μ g |
| <i>Bsp</i> T104I (10 U/ μ l) | 5 μ l |
| 10 × L Buffer | 10 μ l |
| 滅菌精製水 | up to 100 μ l |

2. フェノール/クロロホルム抽出後、クロロホルム抽出を 2 回行う。エタノール沈殿後 30 μ l の滅菌精製水に溶解する。
3. 1 μ l を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、制限酵素 *Bsp*T104I による消化を確認する。完全に切断された場合、1.49 kb、9.96 kb および 33.5 kb 以上*の 3 本のバンドが確認できる。1.49 kb のバンドの濃さを既知濃度 DNA のバンドの濃さと比べて収量を計算する。
*：例えば、pAxEFwtit2 に 1 kb のインサートを挿入した場合、34.5 kb になります。(図 2-1、2-2. 参照)
4. 6 cm 細胞培養用シャーレ 2 枚に 293 細胞を用意する。
※ 1 枚は、B-1-5. で使用、もう 1 枚は、B-1-7. で使用します。各々使用時に、100% コンフルエントになるように用意してください。
5. *Bsp*T104I 消化済みコスミド 10 μ g を 6 cm のシャーレで培養した 293 細胞 1 枚にリポフェクション法、またはリン酸カルシウム法などで transfection する。
※ ご参考までに下記に *TransIT*-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2700) を使用した例を示します。
 - 1) 6 cm シャーレで培養した 293 細胞の培地を除き、無血清培地 (Life Technologies : Opti-MEM など) 2.5 ml を加える。
 - 2) 15 μ l の *TransIT*-293 Transfection Reagent と 250 μ l の無血清培地を混合し、ボルテックスミキサーで懸濁する。室温で 5 分静置する。
 - 3) B-1-3. で調製した制限酵素切断済み組換えコスミド DNA 10 μ g に滅菌精製水を加えて 30 μ l とする。
 - 4) 2) に 3) を加え、穏やかに混合した後、室温で 5 分静置する。
 - 5) 1) のシャーレに滴下し、均一になるように穏やかに混合し、37°C、CO₂ インキュベーター内で培養する。
6. 翌日の午前中、継代時と同じく EDTA-PBS (-) を用いて細胞を剥がし、回収する。
※ 剥がれにくい時は、通常より薄い濃度 (0.025% 程度) のトリプシンをご使用ください。

-
7. 回収した細胞懸濁液原液、10倍希釈液のそれぞれをコラーゲンコート96ウェルプレート2枚に播き直す。細胞数が各プレートで大きく変わらないように10倍希釈液には、6cmシャーレで培養しておいたtransfectionしていない293細胞を以下の割合で混ぜて細胞数をそろえ、1ウェルあたり100 μ lずつまく。

| | |
|--------------------------------|-------------------|
| transfectionした6cmシャーレの293細胞 | → 11 mlの培地に懸濁；(A) |
| transfectionしていない6cmシャーレの293細胞 | → 11 mlの培地に懸濁；(B) |
| 10倍プレート = 1 ml (A) + 10 ml (B) | |
| 原液プレート = 10 ml (A) | |

8. 5～6日後と10～11日後に各ウェルに10% FCS-DMEMを50 μ l加える。ウェルごとにチップを替える。
※ ウイルスサンプル間のコンタミや汚染を防ぐため、フィルター付き滅菌チップをご使用ください。
9. ウイルスが増殖し細胞が変性したウェルが7～15日の間に現れる。すべての細胞が変性したウェルごとに、培養液ごと細胞を滅菌1.5 mlチューブに無菌的に移して、ドライアイスで急凍し、 -80°C に保存する。
※ ウイルスが増殖すると細胞は接着能力が低下し丸く浮き上がって見えまます (IX. 付録 1-6)。ウェル内のすべての細胞がこのような状態になったらチューブに移してください。
10. 15～18日で判定を終了する。8日目以降、細胞が完全に変性したウェルから回収した培養液のチューブ (B-1-9.) を優先して4個程度を選ぶ。
※ ウイルスの増殖が早く起こったウェルは、複数のウイルスクローンが混入している可能性が高いので選ばないでください。
11. 凍結融解する。ドライアイス中で急凍、 37°C 温浴で溶解を6回繰り返す。
12. 凍結融解後、5,000 rpm、5分、 4°C で遠心した上清を1次ウイルス液として -80°C で保存する。

【B-2. 組換えアデノウイルスの確認】

1. コラーゲンコート 24 ウェルプレートにそれぞれ 70 ~ 100% コンフルエントまで培養した 293 細胞と HeLa 細胞を用意する。
2. 1 次ウイルス液の各サンプルを、2 ウェルの 293 細胞および 1 ウェルの HeLa 細胞に感染させるため培地を除き、ウェルあたり 10 μ l の 1 次ウイルス液と 0.1 ml の 5% FCS-DMEM を加える。
※ 細胞が乾燥しないように操作を行ってください。
3. プレートをしーソーのように数回、ゆっくりと振とうさせ、ウイルス液をすべての細胞にいきわたらせ感染を行う。この操作を 15 ~ 20 分ごとに 3 ~ 4 回行う。この間、細胞は CO₂ インキュベーター内 (37°C、5% CO₂) においておく。
4. 1 時間の感染後、5% FCS-DMEM を 0.4 ml 加える。
5. 3 日後に HeLa 細胞で変性が認められず、293 細胞が完全に変性したクローンを選ぶ。
※ 本来の組換えアデノウイルスは 293 細胞以外では増殖しません。HeLa 細胞で変性が認められるクローンは、E1 部分をもつウイルスの混在の可能性があるのでこの段階で除外します。
6. 各サンプルについて感染させた 293 細胞のウェルの 1 つから培養液ごと細胞を回収し、凍結融解を 6 回行う。
7. 5,000 rpm、5 分、4°C で遠心した上清を、シーリングキャップ付マイクロチューブに移し、ドライアイスで急凍後、-80°C で保存する (2 次ウイルス液)。
※ ウイルス液の保存には、コンタミ防止や安全性の面から、O-リングなどのついたシーリングキャップのマイクロチューブの使用をお勧めします。
8. 293 細胞のもう 1 つのウェルからは、培養液ごと細胞を回収し、5,000 rpm、5 分、4°C で遠心して上清を除き、細胞だけを -80°C で保存する (cell pack)。
9. cell pack から以下の方法で全 DNA を抽出し、組換えアデノウイルス DNA の構造を確認する。
以下の 10 ~ 15. の DNA 抽出操作のかわりに、NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10 / .50 / .250) を用いると、簡便、迅速に DNA 抽出を行うことが可能です。
※ 293 細胞では組換えウイルスが細胞あたり、10,000 コピーにまで増殖するため、以下のように感染細胞の総 DNA を抽出し、制限酵素で処理することにより、組換えウイルスの構造確認を行うことができます。
10. cell pack に以下の試薬を加え、全量を 400 μ l とする。

| | |
|-------------------------|-------------------|
| 10 × TNE Buffer | 40 μ l |
| Proteinase K (20 mg/ml) | 4 μ l |
| 滅菌精製水 | up to 400 μ l |
11. ボルテックスミキサーで cell pack を十分に懸濁する。
12. 10% SDS を 4 μ l 加え、ボルテックスミキサーでさらに十分に懸濁する。
13. 50°C、1 時間インキュベートする。
14. フェノール/クロロホルム抽出を 2 回行った後、クロロホルム抽出を 2 回行う。
※ このときボルテックスミキサーで十分に攪拌します。
15. エタノール沈殿後、20 μ g/ml RNase A を含む 50 μ l の TE Buffer に溶解する。
※ エタノール沈殿の後、沈殿を完全に乾かしてしまうと溶けにくくなります。

-
16. 15 μ l を用いて、インサートを切断する制限酵素で処理し、アガロースゲル電気泳動を行い、泳動パターンを調べる。このとき、同時に *Cla*I 切断を行い、左端断片の確認も行う。

<泳動パターンの確認 (*Cla*I 反応)>

| 反応液 | |
|----------------------|---------------------|
| 全 DNA | 15 μ l |
| <i>Cla</i> I | 2 μ l (約 20 U) |
| 10 \times M Buffer | 2 μ l |
| 滅菌精製水 | up to 20 μ l |
| インキュベート | 30 $^{\circ}$ C 2時間 |

<左端断片の確認 (図 2、IX. 付録 7 もあわせてご参照ください。)>

| 使用コスミドベクター | <i>Cla</i> I 切断 |
|------------|-----------------|
| pAxcwit2 | 0.46 kb |
| pAxEFwtit2 | 0.6 kb |
| wild type | 0.92 kb |

- ※ pAxEFwtit2 を使用した場合、*Cla*I 消化による左端断片のサイズは 0.6 kb です。
- ※ 「A-2. 構築した組換えコスミドの構造確認」と同様、*Cla*I 消化によりインサート DNA を確認することができます。
- ※ コントロールとしてインサートを挿入したコスミド DNA を *Cla*I で切断したものを同時に泳動すると判定が容易になります。コスミドのパターン+アデノウイルスゲノムの左端のバンドが正確に出現しているものを選択します。
- ※ 説明できないバンドが薄く見えるクローンは、欠失のあるウイルスとの混合の可能性があるので、絶対に避けてください。
- ※ 細胞のゲノム DNA のために判断しづらいときには、ウイルスを感染していない 293 細胞のゲノム DNA をネガティブコントロールとして用います。

C. 高力価組換えアデノウイルスの調製

1. コラーゲンコート 25 cm² フラスコに 70～100% コンフルエントまで培養した 293 細胞を用意する。
2. B-2. の解析で選択した目的のウイルス株の 2 次ウイルス液を感染させる。15 μl のウイルス液と 0.5 ml の 5% FCS-DMEM を、培地を除いたフラスコに静かに加える。
3. フラスコをシーソーのように数回、ゆっくりと振とうさせ、ウイルス液をすべての細胞にいきわたらせ感染を行う。この操作を 15～20 分ごとに 3～4 回行う。この間、細胞は CO₂ インキュベーター (37℃、5% CO₂) においておく。
4. 1 時間の感染後、5% FCS-DMEM を 4.5 ml 加える。
5. 3～4 日後、すべての細胞が変性したら、培地ごと細胞を無菌的に滅菌チューブに回収し、凍結融解または密閉型ソニケーターで破碎してウイルスを遊離させる。
※ 容量が大きい場合密閉型ソニケーターを使用されることをお勧めします。なお、開放型のソニケーターはエアロゾルが発生するので使用しないでください。
6. 3,000 rpm、10 分、4℃ で遠心し、上清を回収する。1 ml ずつ 5 本のシーリングキャップ付マイクロチューブに分注し、ドライアイスで急凍して -80℃ で保存する (3 次ウイルス液)。
7. 50 μl の 3 次ウイルス液と 2 ml の 5% FCS-DMEM を、コラーゲンコート 75 cm² フラスコで 70～100% コンフルエントまで培養した 293 細胞に、C-3. と同様に感染させる。
8. 1 時間の感染後、5% FCS-DMEM を 13 ml 加える。
9. 3～4 日後、すべての細胞が変性したら、3 次ウイルス液と同様にウイルス液を調製する。
10. シーリングキャップ付マイクロチューブに 1 ml ずつ 15 本に分注し、ドライアイスで急凍して -80℃ で保存する (4 次ウイルス液)。4 次ウイルス液は、実際に実験に用いるもので 10⁹ PFU/ml 程度の高力価となる。
11. 4 次ウイルス液は最初の使用時に 1 本を 0.1 ml ずつ分注して、ドライアイスで急凍後 -80℃ に保存する (working stock)。凍結融解はなるべく避ける。
12. 5 μl の 4 次ウイルス液を、24 ウェルプレート 1 ウェルの 293 細胞に感染させ、増殖したウイルス DNA の制限酵素パターンを B-2. の方法で確認する。
※ もし欠失ウイルスあるいは親ウイルスとの混合物であることが疑われたら、2 次ウイルスの段階で既にわずかに混在していたウイルスが増殖が速いために表れてきた可能性があります。全ての 3 次、4 次ウイルス液を破棄し、別の 2 次ウイルス液から改めてウイルス液の調製をやりなおすか、1 次ウイルス液から限界希釈法により目的ウイルスを純化してください。
※ 実際に感染実験に使用するウイルス液は、継代ごとに欠失ウイルスや親ウイルスが生じていないことを確認してから用いることをお勧めします。(IX. 付録 6)

D. 力価測定 [50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀) 測定法]

力価測定には、寒天培地上でのプラークの形成を観察する方法（プラーク形成法）を用いるのが一般的ですが、この方法と以下に示した TCID₅₀ 法との結果はよく一致します。

1. 10 cm² 細胞培養用シャーレ 1 枚に 70 ～ 100%コンフルエントまで培養した 293 細胞を用意する。
2. ウイルス液を 5% FCS-DMEM で 10 倍ずつ段階希釈し、10⁴ 倍希釈ウイルス液を用意する。
例えば、ウイルス液 0.1 ml に 5% FCS-DMEM を 0.9 ml 加えて希釈する。
3. コラーゲンコート 96 ウェルプレート 1 枚の全てのウェルに 50 μl ずつ 5% FCS-DMEM を入れる。
4. 第 1 列目に 10⁴ 希釈したウイルス液を 25 μl ずつ加える。
5. 8 チャンネルピペッターを用いて 25 μl を 2 列目のウェルに移す。
以下同じ操作を 11 列目まで繰り返し最後の 25 μl を捨てる。結果として 3ⁿ の段階希釈液を 10⁴ × 3¹¹ の希釈段階まで作製することができる。12 列目は非感染細胞のコントロールとする。チップは 1 列ごとに替える。
6. 培養しておいた 293 細胞 (D-1) を 6 ml の 5% FCS 添加 DMEM に懸濁する。
7. D-6. の細胞懸濁液を 50 μl ずつ各ウェルに加える。
8. 4 ～ 5 日後と 7 ～ 8 日後に各ウェルに 10% FCS-DMEM を 50 μl ずつ穏やかに加える。
9. 11 ～ 13 日後に細胞変性の終末点を顕微鏡で判定する。
※ ウイルスが存在しているウェルの細胞は変性を起こして剥がれます (IX. 付録 1 ～ 6)。14 日まで細胞を維持できれば判定は容易ですが、細胞が傷むと難しくなります。
10. Käber の式を用いて統計学的に 50%細胞変性終末点 (TCID₅₀) を計算する。293 細胞を用いて本法で算出した TCID₅₀ の値と、プラーク形成法で求めた PFU の値とはよく一致する。実際の例を図 4 に示す。
$$TCID_{50} = (1 \text{ 列目の希釈率}) \times (\text{希釈率})^{\Sigma} - 0.5$$

ただし Σ = 各希釈段階における (変性ウェル数) / (検体数) の総和

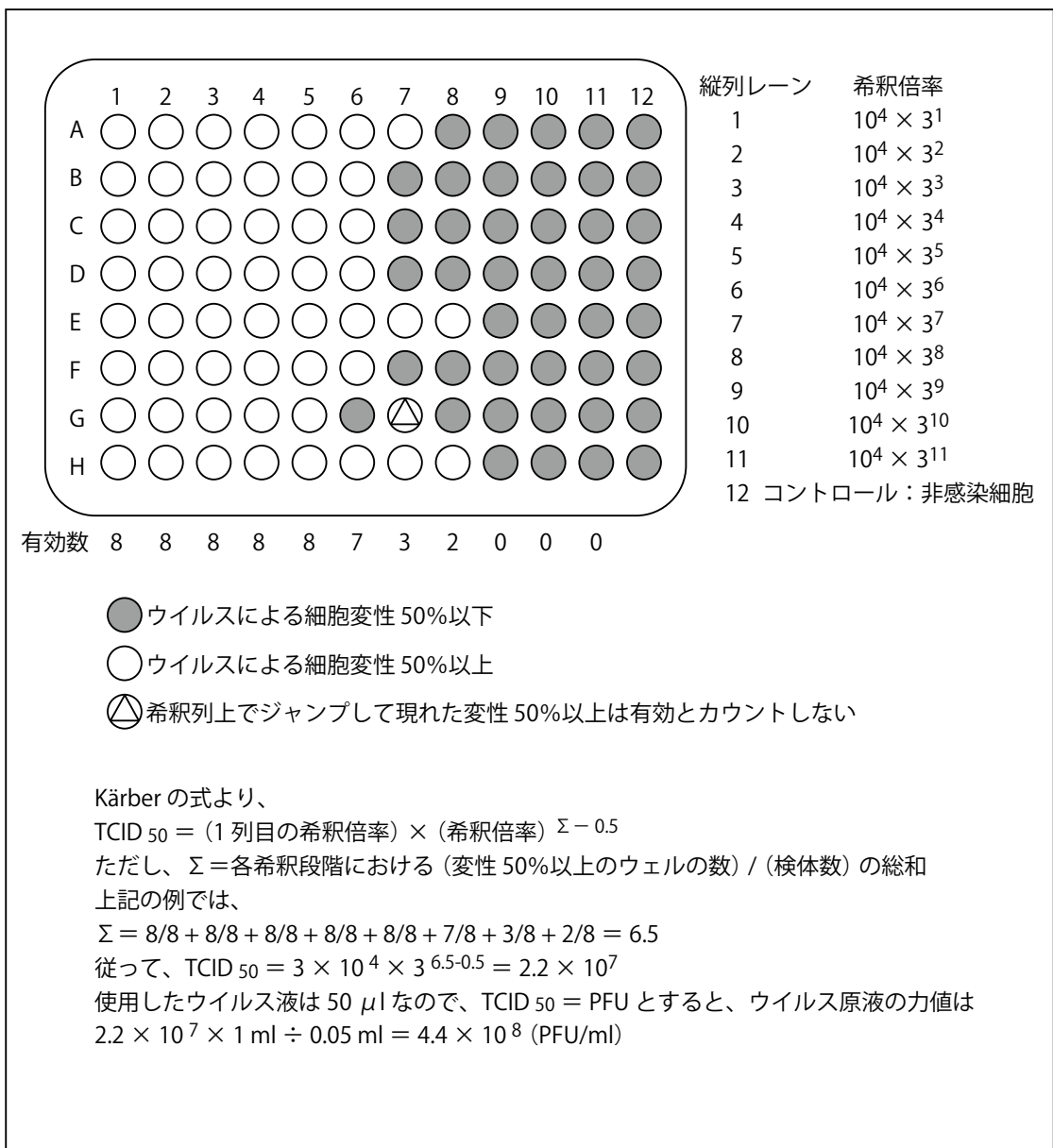


図 4. 50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀) 測定法の実際

E. 目的細胞への組換えウイルス感染

接着細胞に感染させる場合の一般的な方法を示します。浮遊細胞の場合は細胞を遠心して集めウイルス液に懸濁し、同様の操作を行います。

1. 70～100% コンフルエントまで培養した目的細胞を1種類のウイルスあたり5ウェル以上（以下に示すウイルスの希釈の数だけ）用意する。
2. 培地を除く。培地の血清がFCSでない場合（例えばCS）は、無血清の培地で2度細胞を洗い、培地を除く。
3. 4次ウイルスの原液と、これを無血清またはFCS添加の培地で3倍、10倍、20倍および40倍に希釈したウイルス希釈液を、目安として96ウェルプレートで30～40 μ l/ウェル、24ウェルプレートで50～70 μ l/ウェル、10cmシャーレで100～200 μ l程度加える。
※ 目的の遺伝子を効率よく発現させる条件は、目的細胞の性質によって異なります。まずは、数段階のウイルス希釈液を用いて至適条件を検討する必要があります。
4. プレートをシーソーのように数回、ゆっくり振とうし、ウイルス液を全ての細胞にいきわたらせ、CO₂ インキュベーター（37℃、5% CO₂）に静置する。この操作を15～20分ごとに3～4回行う。
5. 4次ウイルスを添加して1時間後、培地を適当量加えて培養する。
※ 感染時間は通常1時間、長くても2時間程度で充分である。
6. 0、1、2、3日後に蛍光抗体法やウエスタン法など、適当な方法で目的とするタンパク質の発現を検出する。

VIII. Q & A

Q1. 組換えウイルスの作製方法はどのようにして決めればよいか？

A1. 目的遺伝子の性質によって異なります。

まず、コスミドベクター pAxcwit2 または pAxEFwtit2 に目的遺伝子を挿入し組換えコスミドを作製した後、「完全長 DNA 導入法」で組換えウイルスを作製してください。ほとんどの場合、この方法で、組換えアデノウイルスを作製することができます。ただ、目的遺伝子産物の影響、transfection の効率、あるいは 293 細胞の状態などの要因により、ウイルス作製効率が低く目的ウイルスが得られにくいことがあります。また、挿入遺伝子配列内に制限酵素 *Bsp*T104I または *Pac*I 認識サイトが存在している場合は「完全長 DNA 導入法」は行えません。

(ご注意) コントロールコスミド pAxEFiLacZit を用いたコントロール実験を行ってください。組換えウイルスの作製効率が悪い、あるいは、組換えウイルスが得られない場合、コントロール実験を並行して行うことで、その原因が、目的遺伝子にあるのか、あるいは、transfection 効率や 293 細胞の状態など、実験環境にあるのかを容易に判断することができます。(VI. <コントロール実験>、VIII. Q & A. Q4 参照)

Q2. 組換えコスミドの発現確認は必要か、どのように行えばよいか？

A2. 確認実験を行っていただくことをお勧めいたします。

組換えアデノウイルス作製には時間がかかるため、面倒なようでも、各ステップで確認実験を行いながら進めていただくほうが、より確実に結果を得られます。組換えコスミド、あるいは、組換えコスミドより調製した「アデノ落としプラスミド」(図 3 参照) を、目的細胞に transfection し、適切な方法によって遺伝子の発現を確認してください。目的細胞への transfection が困難な場合には、transfection 効率の高い細胞 (293 細胞など) を利用されてもいいと思います。組換えコスミドのサイズは、プラスミドと異なり約 40 kb とかなり大きいので、プラスミドと同じ量 (重量) を使用しても、分子数としては少なくなります。組換えコスミドを transfection される際には、その点にご注意ください。

Q3. 「完全長 DNA 導入法」でも、ウイルス株の分離操作は必要か？

A3. 必要です。

「完全長 DNA 導入法」では、親ウイルスの混入はないとされていますが、一部を欠失したウイルスクローンが含まれてくる可能性があります。もし、欠失したウイルスクローンの増殖が速い場合には、実際に実験を行うとき、あるいは、拡大調製を行うときに、欠失したクローンが優勢になることがあります。早い段階で、これらの目的ウイルスではないクローンを除くためにもウイルス株の分離操作は必要です。この操作には約 3 週間という時間がかかりますが、より確実に、結果を得るために必要な操作とお考えください (VI. <ウイルス株分離の重要性>)。

Q4. 組換えウイルスが現れない

- A4. コントロールコスミド pAxEFiLacZit を用いたコントロール実験を行ってください。コントロール実験で組換えアデノウイルスが現れる場合、コスミドの純度が低かった可能性があります。コスミドの純度は transfection の効率に重大な影響を与えます。コントロール実験で組換えウイルスが現れない場合、transfection がうまく行われていない可能性があります。transfection の条件を検討してください。また、なるべく継代数が少なく、状態の良い 293 細胞を用いてください。2 か月以上継代した 293 細胞では、アデノウイルス感染増殖効率が低下することがあります。(IX. 付録 1 参照)

(ご参考) コントロールコスミド pAxEFiLacZit を用いた場合、「完全長 DNA 導入法」では、10 倍希釈のプレートで 10 ~ 20 個のウェルで細胞の変性が現れ、1 次ウイルスを調製することができます。そのほとんどが目的ウイルスです。細胞変性が現れるウェルの個数 (得られる 1 次ウイルスの個数) は、transfection 効率や、293 細胞の状態によって変動することがあります。

Q5. コントロール実験と比較して、得られた 1 次ウイルスの数が極端に少ない

- A5. 挿入遺伝子による影響が考えられます。得られた組換えウイルスに変異が入るなど、目的ウイルスと異なっている可能性があります。構造確認 (VII. B-2. 組換えアデノウイルスの確認) を正確に行ってください。

Q6. すべてのウェルで細胞変性が見られた

- A6. 本製品では、コントロールコスミド pAxEFiLacZit2 などのマーカー遺伝子を挿入した組換えコスミドを使用した場合に、「完全長 DNA 導入法」では 10 倍希釈のプレートで、10 ~ 20 個ウェルで細胞変性が認められるように、つまり 1 次ウイルスが得られるように設定されています。ただ、293 細胞の状態によっては、18 日目には細胞が死滅してしまい、ウイルスによる変性と区別がつきにくくなる可能性があります。293 細胞は、継代数が少なく状態の良いものをご使用ください (IX. 付録 1)。また、transfection する組換えコスミド量の変更、transfection の方法や条件によっては、ほぼすべてのウェルで細胞の変性が見られることがあります。この場合は、ウイルス液中に複数のクローンが混在している可能性があるため、初めからやり直すか、構造確認の後、限界希釈法により純化することをお勧めします。

Q7. ウイルスの力価が上がらない

- A7. 力価を上げようとして 293 細胞に濃いウイルス液を感染させると、細胞毒性のため細胞が死滅してしまいかえって力価が下がってしまうことがあります。力価の高いウイルス液を得るためには、至適な感染条件でウイルス感染を行う必要があります。293 細胞に感染を行い、ウイルスを調製する際には、10 ~ 20 PFU/cell の重複感染度 (MOI : multiplicity of infection) で感染することをお勧めします (IX. 付録 4)。プロトコールどおりに行っても、挿入した遺伝子によっては力価が上がらない場合は、ウイルスを精製して、濃縮してください。ウイルスの精製法に関しては「IX. 付録 5」、X. 参考文献 10、11、12 をご参照ください。

Q8. 目的細胞に感染させるときにどのくらい希釈して使うのか？

- A8. アデノウイルスベクターによる遺伝子導入は、エレクトロポレーションやリン酸カルシウム法などの他の遺伝子導入法に比べると毒性が低く、細胞の正常機能を損なわずに目的遺伝子を発現させることが可能です。しかし、濃いウイルス液を用いて感染を行うと過剰生産されたウイルスのコートタンパク質が細胞毒性を示すこともあります。細胞が傷んでも高い発現が必要な場合は 10 倍希釈、細胞の正常機能を損なわないように発現させる場合は、20 倍を希釈の限界の目安としてください。ただし目的細胞の特性により至適条件は異なりますので、「VII. E. 目的細胞への組換えウイルス感染」に従い、条件検討を行ってください。

-
- Q9. 発現はどのくらい持続するのか？
- A9. EF1 α プロモーターを利用したアデノウイルスベクターを動物個体へ投与した場合、マウスでは約6か月の持続発現を確認しています。培養細胞で細胞分裂が顕著でない場合は、発現は1日後から観察され、2、3日でピークに達して1週間程度持続し、以後低下しますが、3～8週目あたりでも一部は発現していると考えられます。なお、アデノウイルスベクターは細胞のゲノムとは独立して複製しないため、細胞が分裂すると希釈され、発現の持続は短くなってしまいます。従って、可能ならば細胞分裂を抑制するような条件で（例えば full sheets になってから）感染させる方が発現は高く持続します。

- Q10. この製品を使いたい、遺伝子組換え生物の使用等を規制するカルタヘナ法の適用はどのようになるのか？

- A10. 本製品の使用は、「遺伝子組換え生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）」（平成15年法律第97号）の第2条の6および7に定められる第二種使用等に当たります。よって、本製品を研究目的に使用される場合には、「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2月19日施行）の適用を受けます。本省令に定められる拡散防止措置は、組換えコスミドを作製する段階と組換えアデノウイルスの作製・感染実験の段階で異なり、それぞれ以下ようになります。なお、目的遺伝子が毒性あるいは病原性等を有する恐れのある場合または、その核酸供与体の実験分類がクラス3を超え、高度の拡散防止措置を必要とする場合は、より厳しい基準が適応され、文部科学大臣による確認実験になる場合もあります。いずれにせよ、個人で判断せずにご所属研究機関の安全委員会の判断に従ってください。

（ご参考）

- ・組換えコスミドベクター作製
 - 宿主ベクター系：EK1系（Escherichia coli K12株又はこの誘導株を宿主とする場合）
 - 宿主の実験分類：認定宿主ベクター系区分 B1
 - 核酸供与体の実験分類：クラス1またはクラス2（クラス3もありえる）
 - 拡散防止措置の区分：P1またはP2（核酸供与体のクラスによりP3もありえる）
 - 実験に係わる手続き：機関実験
 - 大臣確認実験（二種省令第4条関係別表第1の1に該当する場合）
- ・組換えアデノウイルス作製・組換えアデノウイルス感染
 - 宿主：ヒトアデノウイルス5型由来非増殖型ベクター
 - 宿主としての実験分類：クラス2
 - 核酸供与体の実験分類：クラス1またはクラス2（クラス3もありえる）
 - 拡散防止措置の区分：P2（核酸供与体によりP3もありえる）
 - 実験に係わる手続き：機関実験
 - 大臣確認実験（二種省令第4条関係別表第1に該当する場合）
- ・拡散防止措置施設以外での遺伝子組換え生物の運搬、保管
 - 漏出、逃亡その他拡散しない構造の容器に入れて運送すること。
 - 容器又は包装に遺伝子組換え生物等である旨を表示すること。
 - 保管場所に遺伝子組換え生物等を保管している旨を表示すること。

-
- Q11. 293 細胞内での継代で RCA (Replication Competent Adenovirus) が混入してくることはあるのか？
- A11. アデノウイルスベクターは、力価が極めて高いため、5～6 回以上の継代が必要なケースは稀です。従って、本取扱説明書に従い作製したウイルスにおいて RCA が問題になることはほとんどありません。
ただ、10 回以上継代を続けると、293 細胞との相同組換えなどにより、E1A、E1B 遺伝子を獲得した複製機能をもつアデノウイルス (RCA) が混入してくることが報告されています。RCA の出現頻度、検出法などについても多数報告があります^{14,15)}。そのため、継代を繰返してアデノウイルスベクターを使用される場合には、RCA のチェックを行うことをお勧めいたします。RCA の検出は、HeLa 細胞や A549 細胞に感染させた後、しばらく維持してこれらの細胞に変性が認められないことで確認を行う方法が一般的ですが、PCR 法を用いれば短期間で高感度に検出することもできます (IX. 付録 6)。
- Q12. 万が一汚染があった場合、どれくらいの感染があるか？
- A12. この製品で作製する組換えアデノウイルスはアデノウイルス 5 型由来ではありませんが、E1 遺伝子を欠失させているため、293 細胞以外では実際上増殖しません。そのため、一般のウイルスのようにヒトで感染増殖してカゼ症状を起こすなど、ヒトからヒトへ伝播することは有りえないと考えられます。しかし、万一、ヒト細胞に感染すれば、核内へ遺伝子を運び、組み込んだ遺伝子を発現することが考えられます。P2 レベルのウイルス (通常のカゼのウイルスから B 型肝炎ウイルスまでを含む) 取扱いの作業手順を必ず遵守してください。
なお、野生型のアデノウイルス 5 型はありふれたものです。ほとんどの人は、3 歳くらいまでにアデノウイルス 5 型の風邪に感染するため、中和抗体を持っています。
- Q13. 汚染時の消毒はどのようにおこなうべきか？ (例えば培地がこぼれたときなど)
- A13. 一般的な消毒法でよいのですが、アデノウイルスの知識も役立つと思います。アデノウイルスはエンベロープ (細胞膜由来) を持たず、タンパク質の殻をかぶっています。従って、タンパク質を変性させれば失活します。安全キャビネット内にて作業を行い、消毒は 10% SDS で拭いた後、さらに 70% エタノールで拭いてください。また、アデノウイルスは熱に弱く、56℃、30 分で失活するとされていますが、実際の消毒には、オートクレーブを 10 分以上行ってください。さらに、ウイルスを取り扱う場合には、フィルター付きのチップを使用してください。安全キャビネット内でアデノウイルスを扱った後は必ず UV ランプを 30 分～1 時間つけてください。

IX. 付録

付録 1. 293 細胞のメンテナンス方法

293 細胞は、ATCC 等から購入することができます。できるかぎり継代数の少ないものを購入し、継代数の少ない段階でストックを作製してください。

293 細胞の培養状態は、組換えアデノウイルス調製において、非常に重要なファクターであり、常に良い状態に保たねばなりません。弊社では、下記の要領で培養を行っています。

1. 細胞の戻し方

凍結細胞の入ったバイアルを液体窒素保存用タンクから取り出し、37℃の温浴中に移します。そのまま保持し半分くらい溶けたところで取り出し余熱で最後まで融解します。新鮮な培地の入った細胞培養用フラスコ、またはシャーレに、約 5×10^4 cells/cm² 程度の密度になるように戻します。密度が低すぎると戻りが悪くなります。また、高すぎてもよくありません。

37℃、5% CO₂ インキュベーター内で培養し、ほぼコンフルエントになったら継代します。

2. 細胞の継代

2～3 日に 1 回程度の頻度で継代を行います。

細胞がほぼコンフルエントになったら、約 1：2～1：4 の割合で継代します。培地を吸引除去した後、PBS（－）で 1 回洗浄します（293 細胞は剥がれやすいのでご注意ください）。PBS（－）を吸引除去した後、0.02% EDTA-PBS を添加し（T-75 フラスコで 1.0 ml 程度）、1～5 分、室温（離れにくいときには 37℃、CO₂ インキュベーター内）に置き、細胞を完全に剥離させます。5～10 ml の培養用培地を加え、細胞を穏やかにピペッティングすることにより完全に均一にします。必要量を、新しい培地の入った細胞培養用フラスコ、またはシャーレに加え、均一になるよう穏やかに振とうしたのち、37℃、5% CO₂ インキュベーター内で培養します。

3. 培養条件

本製品使用時には、293 細胞を以下の条件で培養してください。

培養用培地：10% FCS-DMEM

| | | |
|---|----------------------------|--------|
| { | DMEM (low glucose : 1 g/L) | 500 ml |
| | 非働化済み FCS | 50 ml |
| | L-Glutamine | 5 ml |
| | Penicillin-Streptomycin | 5 ml |

感染用培地：5% FCS-DMEM

| | | |
|---|----------------------------|--------|
| { | DMEM (low glucose : 1 g/L) | 500 ml |
| | 非働化済み FCS | 25 ml |
| | L-Glutamine | 5 ml |
| | Penicillin-Streptomycin | 5 ml |

継代：0.02% EDTA/PBS（－）

培養条件：5% CO₂、37℃

4. 培養時の注意点

細胞は、コンフルエントになった状態のまま放置すると傷んで状態が悪くなり、もとの状態に戻すことが困難になることがあります。継代時の密度が低すぎても増殖速度に影響があります。

また、2ヵ月以上継代培養した細胞を実験に使用することは控えてください。細胞の継代数が増えると、その均一性が失われ、ウイルスの感染効率が下がります。総継代数も重要です。購入時の継代数は必ずチェックするようにし、継代数が少ない段階で、ストックを作製しておかれることをお勧めします。実験に用いる細胞は、購入時の継代数+研究施設内での継代数が50以下が望ましいとされています。

これらの操作は、すべて無菌的に行ってください。また、ウイルスを使用する安全キャビネットとは別のキャビネットを使用することが理想的です。同じキャビネットを使用する場合には、ウイルス使用後、エタノール殺菌を行い、1時間以上UV照射したのち使用するようになしてください。

5. 保存の方法

80～90%コンフルエントになったところで、細胞を剥がし、培地で1度洗浄した後、10% DMSO-90% FCS（または、市販の細胞保存液）に懸濁し、クライオチューブ（細胞保存用チューブ）に分注します。プログラムフリーザーを用いて凍結します。プログラムフリーザーがない場合には、発泡スチロールの箱などに入れて、-80℃で一晩凍結した後、液体窒素内で保存します。チューブあたりの細胞数は、 4×10^6 cells程度とします。あまり薄い状態で保管すると、細胞回復率が悪くなります。液体窒素に保存2～3日後、1本を戻して細胞状態を確認するようになしてください。

また、凍結時までの継代数を記録として残しておかれることをお勧めいたします。

6. アデノウイルスが感染した293細胞の見分け方

アデノウイルスを感染させると、ウイルス粒子は10,000個に達します。ウイルスが増殖すると、293細胞は、接着能力が低下し、丸く浮き上がって見えます（図5）。培養フラスコやシャーレの壁面を軽くタッピングすることで簡単に剥がすことができるようになります。

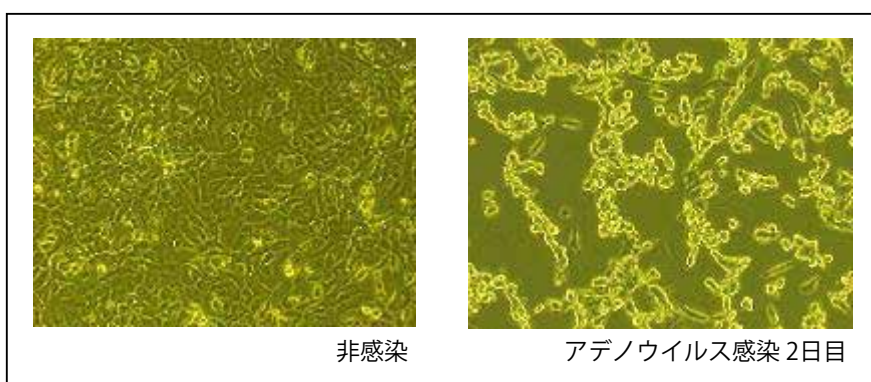


図5. 293細胞

付録 2. 組換えアデノウイルスの取り扱いについて

1. 実験施設

組換えアデノウイルスの取扱いは、「(VII B-1. 組換えアデノウイルスの作製：完全長 DNA 導入法)」のステップから) P2 の封じ込めレベルの実験施設が必要です。挿入遺伝子によっては、それ以上の封じ込めレベルが必要となります。組織内の安全委員会の組換え DNA 実験指針に従ってください¹³⁾。

2. 保管

ウイルス液の保存容器は、安全性およびコンタミの防止の観点から、機密性の高い O-リングなどのついたシーリングキャップ付きのマイクロチューブをご使用ください。また、これらのマイクロチューブは、P2 施設内のディープフリーザー(−80℃)内で保管してください。液体窒素タンク内に保管されると、チューブが破損して汚染する恐れがあるためお勧めできません。

3. 凍結融解

凍結時は、ウイルス液の入ったマイクロチューブのキャップを強くしめ、粉末、あるいは砕いたドライアイスにうずめ、急速に凍結します。液体窒素は、チューブが破裂したりする恐れがありますので使用しないでください。

融解時は、37℃の温浴に浸けて融解します。そのまま保持し、半分くらい溶けたところで取り出し、余熱で最後まで溶かします。融解した後は、使用するまで氷上に保持してください。

また、凍結融解を繰り返すことにより、力価が下がることがあります。複数回の凍結融解を避けるため、実験目的にあわせた容量でウイルス液を保存するようにしてください。

4. 組換えウイルスの保存期間

アデノウイルスは構造が堅牢なため、−80℃に適切に保管すれば半永久的にお使いいただくことができます。しかし、調製から1年を過ぎて使用する場合には、力価を再度測定しなおしてからご使用されることをお勧めします。

付録3. P2 レベルとは

組換えアデノウイルスを使用する実験は、「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)(平成16年2月19日施行)により、P2以上の拡散防止措置が求められています。省令に記載の拡散防止措置に従って実験を行ってください。
なお、詳細は、各研究施設における組換えDNA委員会の判断に従ってください¹³⁾。

<参考；省令別表第二(第四条第二号関係)より抜粋>

拡散防止の区分：二、P2 レベル

イ 施設等について、次に掲げる要件を満たすこと。

- 1) 施設等について、実験室が、通常の生物の実験室としての構造及び設備を有すること。
- 2) 実験室に研究用安全キャビネットが設けられていること(エアロゾルが生じやすい操作をする場合に限る。)
- 3) 遺伝子組換え生物等を不活化するために高圧滅菌器を用いる場合には、実験室のある建物内に高圧滅菌器が設けられていること。

ロ 遺伝子組換え実験の実施に当たり、次に掲げる事項を遵守すること。

- 1) 遺伝子組換え生物等を含む廃棄物(廃液を含む。以下同じ。)については、廃棄の前に遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。
- 2) 遺伝子組換え生物等が付着した設備、機器および器具については、廃棄または再使用(あらかじめ洗浄を行う場合にあっては、当該洗浄。以下「廃棄等」という。)の前に遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。
- 3) 実験台については、実験を行った日における実験の終了後、及び遺伝子組換え生物等が付着したときは直ちに、遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。
- 4) 実験室の扉については、閉じておくこと(実験室に出入りするときに除く)。
- 5) 実験室の窓等については、昆虫等の侵入を防ぐため、閉じておく等の必要な措置を講ずること。
- 6) すべての操作において、エアロゾルの発生を最小限にとどめること。
- 7) 実験室以外の場所で遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講じようとするときその他の実験の過程において遺伝子組換え生物等を実験室から持ち出すときは、遺伝子組換え生物等が漏出その他拡散しない構造の容器に入れること。
- 8) 遺伝子組換え生物等を取り扱う者に当該遺伝子組換え生物等が付着し、または感染することを防止するため、遺伝子組換え生物等の取扱い後における手洗い等必要な措置を講ずること。
- 9) 実験の内容を知らない者が、みだりに実験室に立ち入らないための措置を講ずること。
- 10) エアロゾルが生じやすい操作をするときは、研究用安全キャビネットを用いることとし、当該研究用安全キャビネットについては、実験を行った日における実験の終了後に、及び遺伝子組換え生物等が付着したときは直ちに、遺伝子組換え生物等を不活化するための措置を講ずること。
- 11) 実験室の入口及び遺伝子組換え生物等を実験の過程において保管する設備(以下「保管設備」という。)に、「P2 レベル実験中」と表示すること。
- 12) 執るべき拡散防止措置がP1 レベル、P1A レベルまたはP1P レベルである実験を同じ実験室で同時に行うときは、これらの実験の区域を明確に設定すること、またはそれぞれP2 レベル、P2A レベル若しくはP2P レベルの拡散防止措置を執ること。

付録 4. 組換えアデノウイルスの拡大調製

以下は、最適な条件で、効率よく組換えウイルスを拡大調製するための方法です。さらに組換えウイルスを増やしたいという場合は、このプロトコールに従って拡大調製を行ってください。

効率よく組換えウイルスを増やすためには、ウイルス力価の値が必要です。ウイルス力価がわからない場合には、「VII. D. 力価測定」に従い、種ウイルスの力価を測定する必要があります。

1. コラーゲンコート 75 cm² フラスコに 70 ~ 100% コンフルエントまで培養した 293 細胞を用意する。
※ ここでは、75 cm² フラスコスケールでの調製を示します。さらに量が必要な場合には、スケールアップしてください。
2. 5% FCS-DMEM で、組換えウイルス液を希釈し 0.5 ~ 1.0 × 10⁸ PFU/ml のウイルス液を調製する。
3. フラスコから培地を除いた後、2. のウイルス液 2 ml を静かに加える。
※ アデノウイルスを 293 細胞に感染、増殖させるとき、MOI (重複感染度; Multiplicity of infection) = 10 ~ 20 (PFU/cell) で感染を行うと効率よくウイルスを増殖させることができます。高い力価のウイルス液を得るために、293 細胞に濃いウイルス液を感染させると、細胞が死滅してしまい、かえって力価が低下してしまうことがあります。
4. フラスコをシーソーのように数回、ゆっくりと振とうさせ、ウイルス液をすべての細胞にいきわたらせ感染を行う。この操作を 15 ~ 20 分ごとに 3 ~ 4 回行う。この間、細胞は CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) においておく。
5. 1 時間の感染後、5% FCS-DMEM を 13 ml 加える。
6. 3 ~ 4 日後、完全に細胞が変性したら、培地ごと細胞を無菌的に滅菌チューブに移し、凍結融解または密閉型ソニケーターで破碎して、ウイルスを遊離させる。
7. 3000 rpm、10 分、4°C で遠心し上清を回収する。
8. シーリングキャップ付マイクロチューブに、使用目的にあわせて必要量ずつ分注し、ドライアイスで急凍して -80°C で保存する。
9. 分注したチューブの 1 本を融解し、力価を測定 (VII. D. 力価測定) したのち実験に用いる。
※ 「VII. C. 高力価組換えアデノウイルスの調製」と同様、「VII. B-2. 組換えアデノウイルスの確認」の方法で構造確認、および RCA チェックを行った後に実験に用いることをお勧めします。

付録 5. 精製組換えアデノウイルスの調製

動物個体への投与実験 (*in vivo* 実験) を行う場合には、精製した組換えウイルスの使用をお勧めしています。ここでは、X. 参考文献 10、11、12 をもとに、塩化セシウムステップ勾配法による組換えウイルスの精製方法を記載します。

必要な器具・試薬

組換えアデノウイルスの精製には、さらに以下の器具・試薬が必要です。

- ・ 超遠心機
- ・ 超遠心機ローター
最高回転速度 28 krpm 対応スウィングローター
最高回転速度 40 krpm 対応スウィングローター
- ・ 超遠心用クリアチューブ
各ローター対応 超遠心用クリアチューブ
- ・ 滅菌済み透析カセットまたは、滅菌済み透析チューブ (10 kD)
- ・ 4.0 M 塩化セシウム /10 mM HEPES (pH7.4)
- ・ 2.2 M 塩化セシウム /10 mM HEPES (pH7.4)
- ・ 飽和塩化セシウム /10 mM HEPES (pH7.4)
- ・ 10% グリセロール -PBS (-)

感染ウイルス粒子は、pH が大きく変わることにより感染性を失うおそれがあるので、これらの試薬はオートクレーブ後使用前に pH を確認する必要があります。またすべての操作は無菌的に行ってください。

4 次ウイルスの段階で、 10^9 PFU/ml 以上の力価が得られる組換えウイルスの場合、以下のスケールで、 $10^{10} \sim 10^{11}$ PFU/ml の精製組換えウイルスを 4～5 ml 得ることができます。

1. コラーゲンコート 225 cm² フラスコ 6 本に、70～100% コンフルエントまで培養した 293 細胞を用意する。
2. 5% FCS-DMEM で、組換えウイルス液を希釈し $0.6 \sim 1.2 \times 10^8$ PFU/ml とする。
3. フラスコから培養液を除いた後、フラスコ 1 本あたり 2. のウイルス液を 5 ml 静かに加える。
※ アデノウイルスを 293 細胞に感染、増殖させるとき、MOI (重複感染度; Multiplicity of infection) = $10 \sim 20$ (PFU/cell) で感染を行うと効率よくウイルスを増殖させることができます。高い力価のウイルス液を得るために、293 細胞に濃いウイルス液を感染させると、細胞が死滅してしまい、かえって力価が低下してしまうことがあります。
4. フラスコをシーソーのように数回、ゆっくりと振とうさせ、ウイルス液をすべての細胞にいきわたらせ感染を行う。この操作を 15～20 分ごとに 3～4 回行う。この間、細胞は CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) においておく。
5. 1 時間の感染後、フラスコ 1 本あたり 5% FCS-DMEM を 30 ml 加える (トータルで 35 ml)。
6. 3～4 日培養し、細胞が完全に変性したら、培養液ごと細胞を 6 本の滅菌チューブに移し、3,000 rpm、10 分、4°C で遠心する。
7. 上清を、各チューブ 10 ml ずつ残して除去し、密閉系ソニケーターで破碎して、ウイルスを遊離させる。
※ 密閉型ソニケーターを使用されることをお勧めします。開放型のソニケーターはエアロゾルが発生するので使用しないでください。
8. 3,000 rpm、10 分、4°C で遠心し、上清を回収する。
※ このように“濃く作った”ウイルス液は、細胞毒性が強いので、精製せずに使わないでください。(VIII. Q & A. Q7 参照)

-
9. 塩化セシウム密度勾配を用いてウイルス精製を行う。最高回転速度 28 krpm 用スウィングローター対応クリアチューブに以下の順で、重層する。

| | |
|---------------------------|-------|
| 4.0 M 塩化セシウム /10 mM HEPES | 10 ml |
| 2.2 M 塩化セシウム /10 mM HEPES | 5 ml |
| ウイルス液 | 20 ml |

- ※ チューブは上端から 0.5 ～ 1 mm まで液体が入っていないと遠心中につぶれるおそれがあるので注意してください。
10. 最高回転速度 28 krpm 用スウィングローターを用いて 25,000 rpm、2 時間、4℃で遠心する。
11. ウイルスバンドをキャピラリーなどで回収する。
※ 黒色背景にすると、ウイルスバンドは見やすくなります。高い位置に濃く白く見えるのは細胞タンパクです。8. のウイルス液 20 ml あたり 2 ～ 3 ml のウイルス液が回収できます。
12. 11. の回収ウイルス液に、等量の飽和塩化セシウムを加える。
13. 2 回目の塩化セシウム密度勾配を用いたウイルス精製を行う。最高回転速度 40 krpm 用スウィングローター対応クリアチューブに以下の順で、重層する。

| | |
|---------------------------|----------|
| 回収ウイルス + 飽和塩化セシウム | 4 ～ 5 ml |
| 4.0 M 塩化セシウム /10 mM HEPES | 2 ml |
| 2.2 M 塩化セシウム /10 mM HEPES | 3 ～ 4 ml |

14. 最高回転速度 40 krpm 用スウィングローターを用いて 35,000 rpm、3 時間、4℃で遠心する。
15. ウイルスバンドをキャピラリーなどで回収する。
※ このとき 2 本のバンドが見えることがありますが、下のバンドがウイルスです。(上のバンドはタンパク質)。
16. 滅菌済み透析カセット (または、滅菌済み透析チューブ) に無菌的に移し、1 L の 10%グリセロール添加 PBS (-) で透析する。2 時間後透析外液を交換し、一晚透析する。
17. 透析済みウイルス液を回収、1 回の使用量ずつ分注し、- 80℃で保存する。
18. 分注したチューブの 1 本を融解し、力価を測定 (「VII. D. 力価測定」) した後、実験に用いる。
※ 「VII. C. 高力価組換えアデノウイルスの調製」と同様、「VII. B-2. 組換えアデノウイルスの確認」の方法での構造確認、および RCA チェックもあわせて行われることをお勧めします。
-

付録 6. RCA チェック< PCR 法>

RCA の検出は、HeLa 細胞や A549 細胞などに感染させた後、しばらく維持し、これらの細胞に変性が認められないことで確認する方法が一般的です。ここでは、斉藤博士らが考案された PCR 法による RCA の検出方法をご紹介します。この方法を用いれば、短期間で高感度に検出を行うことが可能です。

PCR による RCA 検出方法は、X. 参考文献 14、15 などにも報告されています。

必要な器具・試薬

PCR 法による RCA チェックには、さらに以下の器具・試薬が必要です。

- ・ PCR Thermal Cycler
 - TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600) など
- ・ *TaKaRa Taq*™ (製品コード R001A)
- ・ dNTP Mixture (製品コード R001A に含まれている)
- ・ 10 × PCR Buffer (製品コード R001A に含まれている)
- ・ Primer Set
 - 例 1：E1A の開始コドンから 415 bp を増幅するプライマーセット
 - sense : 5'-ATGAGACATATTATCTGCCACGGAGGTGTTATTAC-3'
 - (Adenovirus type5 560-594 bp)
 - antisense : 5'-CCTCTTCATCCTCGTCGTCCTGGTGGAAAGCCA-3'
 - (Adenovirus type5 974-940 bp)
 - 例 2：E1A の開始コドンから 240 bp を増幅するプライマーセット
 - sense : 5'-ATGAGACATATTATCTGCCAC-3'
 - (Adenovirus type5 560-580 bp)
 - antisense : 5'-GTAAGTCAATCCCTTCCTGCAC-3'
 - (Adenovirus type5 800-779 bp)

1. 24 ウェルプレートに、80～90% コンフルエントになるように、HeLa 細胞を準備する。
2. 培地を吸引除去する。
3. 10 μ l の組換えウイルスサンプル (精製ウイルスの場合には 1 μ l) と 0.1 ml の 5% FCS-DMEM を加える。
4. プレートをシーソーのように数回、ゆっくりと振とうさせ、ウイルス液をすべての細胞にいきわたらせ感染を行う。この操作を 15～20 分ごとに 3～4 回行う。この間、細胞は CO₂ インキュベーター (37°C、5% CO₂) においておく。
5. 1 時間の感染後、5% FCS-DMEM を 0.4 ml 加える。
6. 3 日間培養する。
 - ※ 3 日後、細胞に変性がみられないことを顕微鏡で観察し確認する。
7. 培地を吸引除去しトリプシンを用いて細胞を剥離し、細胞ペレットを回収する。細胞を PBS 1 ml で 3 回洗浄する。HeLa 細胞から以下の方法で全 DNA を抽出し PCR により E1 遺伝子を検出することで RCA を検出します。
 - 以下の 8～13. の DNA 抽出操作のかわりに、NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10 /50/.250) を用いると、簡便、迅速に DNA 抽出を行うことが可能です。
 - ※ 十分な洗浄が必要です。このステップでの洗浄が不十分であると、未精製ウイルスサンプルの場合は、特にサンプル溶液中に含まれる 293 細胞由来の E1 遺伝子を除くことができず、得られる結果の判定が難しくなります。
8. PBS を吸引除去し、HeLa 細胞に下記の溶液を加え、全量を 400 μ l とする。

| | |
|-------------------------|-------------------|
| 10 × TNE Buffer | 40 μ l |
| Proteinase K (20 mg/ml) | 4 μ l |
| 滅菌精製水 | up to 400 μ l |
9. 滅菌チューブに回収し、ボルテックスミキサーで十分に懸濁する。
10. 10% SDS を 4 μ l 加え、ボルテックスミキサーでさらに十分に懸濁する。
11. 50°C で 1 時間インキュベートする。

12. フェノール・クロロホルム抽出を2回行った後、クロロホルム抽出を2回行う。
※ このときボルテックスミキサーで十分に攪拌します。
13. エタノール沈殿後、20 µg/ml RNase A を含む 50 µl の TE Buffer に溶解する。
※ エタノール沈殿後、沈殿を完全に乾かしてしまうと溶けにくくなります。
14. PCR 反応液を以下のように調製する。

| 試薬 | 使用量 |
|---|--------|
| DNA サンプル* | 2 µl |
| <i>TaKaRa Taq</i> (5 U/µl) | 0.5 µl |
| dNTP mix (各 2.5 mM) | 4 µl |
| 10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ plus) | 5 µl |
| sense primer (20 pmol/µl) | 0.5 µl |
| antisense primer (20 pmol/µl) | 0.5 µl |
| 滅菌精製水 | |
| Total | 50 µl |

* : DNA サンプル ; 13. で調製した DNA 溶液

<ネガティブコントロール>

- DNA サンプルの代わりに、滅菌精製水を 2 µl 加えた反応液
- DNA サンプルの代わりに、ウイルス感染を行っていない HeLa 細胞から、7 ~ 13. と同様に DNA 抽出操作を行い回収した DNA サンプルを 2 µl 加えた反応液

<ポジティブコントロール>

- DNA サンプルの代わりに、ウイルス感染を行っていない 293 細胞から、7 ~ 13. と同様に DNA 抽出操作を行い回収した DNA サンプルを 2 µl 加えた反応液

15. 以下の PCR 反応を行う。

| | | |
|------|---------|--|
| 94°C | 30 sec. | } 25 cycles (primer pair 例 1) or 30 cycles (primer pair 例 2) |
| 55°C | 30 sec. | |
| 72°C | 30 sec. | |

※ 30 cycles 以上は行わないでください。バックグラウンドが高くなり検出が困難になります。

16. PCR 産物 7 µl をアガロースゲル電気泳動し、増幅産物のサイズを確認する。
※ 相当のバンドが存在すれば、RCA 混入の可能性が高いと判断できます。

付録7. アデノウイルス Ad5/dIX、および組換えウイルスの構造

本製品で取り扱うすべての組換えアデノウイルスの基本となる Ad5/dIX などの構造を示します。

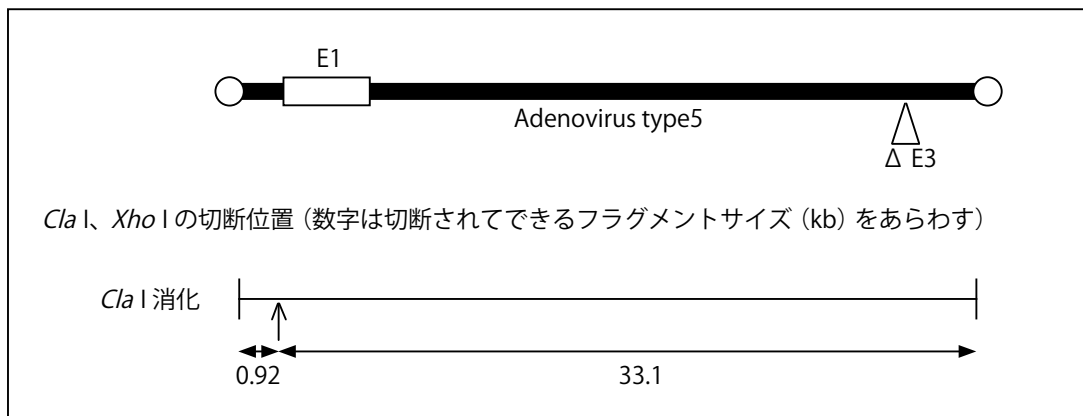


図 6-1. アデノウイルス Ad5/dIX¹⁶⁾ の構造

本製品で取り扱うすべての組換えアデノウイルスの見本となる増殖型アデノウイルスの構造。E3 遺伝子は欠失している。

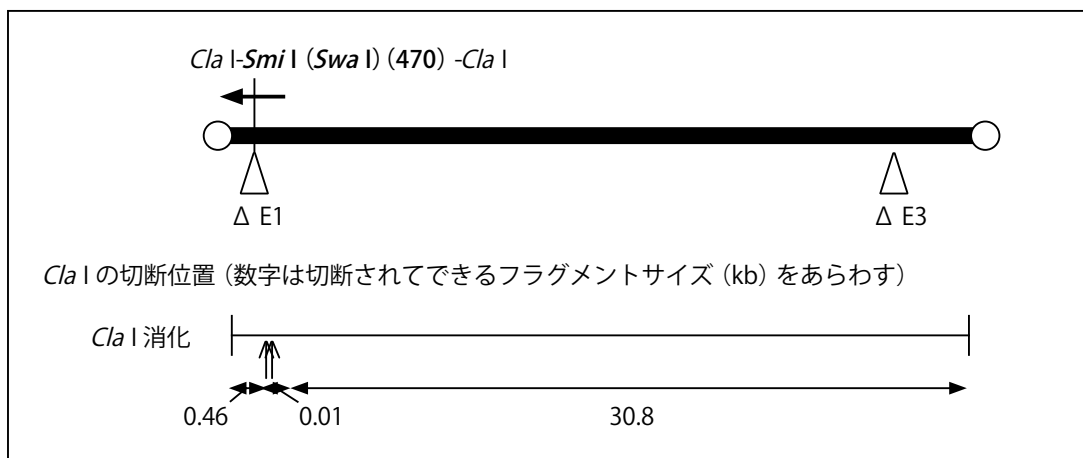


図 6-2. コスミドベクター pAxcwit2 をもとに作製した挿入遺伝子を持たない組換えアデノウイルスの構造

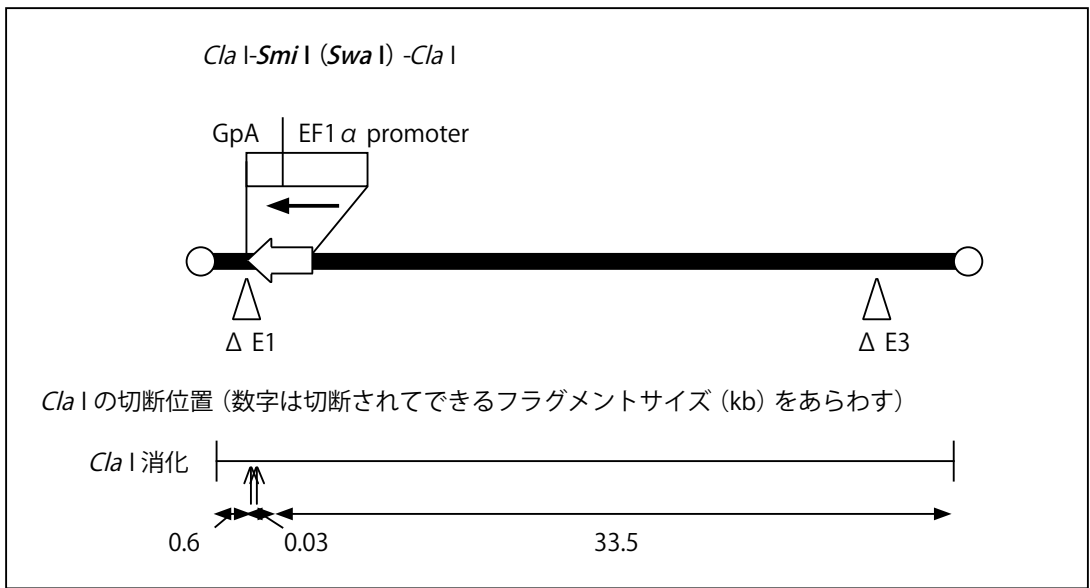


図 6-3. コスミドベクター pAxEFwtit2 をもとに作製した挿入遺伝子を持たない組換えアデノウイルスの構造

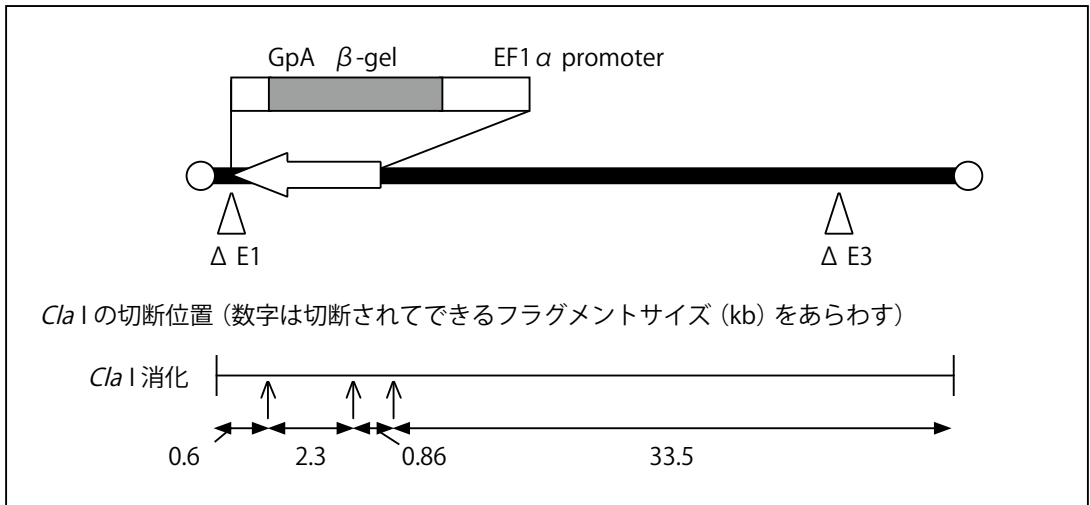


図 6-4. 組換えコスミド pAxEFiLacZit をもとに作製したβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を持つ組換えアデノウイルスの構造

X. 参考文献

- 1) Graham, F L., Smiley, J., Russell, W C., and Nairn, R. *J Gen Virol.* (1977) **36**: 59.
- 2) 寺島美保、近藤小貴、鐘ヶ江裕美、斎藤泉 実験医学 (2003) **21**(7): 931.
- 3) 佐藤友美、鐘ヶ江裕美、斎藤泉 別冊実験医学「ザ・プロトコールシリーズ遺伝子導入&発現解析実験法」(1997) p27.
- 4) 鐘ヶ江裕美、高森晃一、斎藤泉 細胞工学 (1994) **13**(8): 757.
- 5) Fukuda, H., Terashima, M., Koshikawa, M., Kanegae, Y., and Saito, I. *Microbiol Immunol.* (2006) **50**(8): 643.
- 6) Berkner, K L. and Sharp, P A. *Nucl Acids Res.* (1983) **11**: 6003.
- 7) Nakai *et al.* *Human Gene Therapy.* (2007) **18**: 925-936.
- 8) 佐藤友美、李光、出口裕、鐘ヶ江裕美、斎藤泉 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) p91.
- 9) Kim, D W., Uetsuki, T., Kaziro, Y., Yamaguchi, N., and Sugano, S. *Gene.* (1990) **91**: 217-223.
- 10) Kanegae, Y., Makimura, M., and Saito, I. *Jpn J Med Sci Biol.* (1994) **47**: 153.
- 11) 鐘ヶ江裕美、斎藤泉 実験医学別冊「新訂 新遺伝子工学ハンドブック 改訂 第3版」(1999) p202.
- 12) 鐘ヶ江裕美、斎藤泉 実験医学別冊「新訂 新遺伝子工学ハンドブック 改訂 第4版」(2003) p166.
- 13) 斎藤泉 実験医学別冊「必ず上手くいく遺伝子導入と発現解析プロトコール」(沖嶋一範、北村義浩 編) (2003) p212.
- 14) Zhang, W W., Koch, P E., and Roth, J A. *BioTech.* (1995) **18**: 444.
- 15) Dion, L D., Fang, J., and Garver Jr., Rl. *J of Virological Methods.* (1996) **56**: 99.
- 16) Saito, I., Oya, Y., Yamamoto, K., Yuasa, T., and Shimojo, H. *J of Virology.* (1995) **54**: 711.

XI. 関連製品・各種サービス

IX-1. 組換えアデノウイルス作製受託サービス

本製品を使用した組換えアデノウイルス作製受託サービスを行っております。

- A. 組換えコスミドの作製
- B. クローン化組換えアデノウイルスの作製
- C. 精製組換えアデノウイルスの調製

これらは、独立したサービスとなっております。詳しくは、弊社ウェブサイト「<https://catalog.takara-bio.co.jp/jutaku/#B1001106>」をご覧ください。

IX-2. 関連試薬

Adenovirus Dual Expression Kit (製品コード 6170)
TransIT-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2700)
DNA Blunting Kit (製品コード 6025)
PBS (Phosphate Buffered Salts) Tablets (製品コード T900)
NucleoSpin Tissue (製品コード 740952.10/.50/.250)
NucleoBond Xtra Midi (製品コード 740410.10/.50/.100) など

[制限酵素]

Clal (製品コード 1034A)

[siRNA 発現用基本ベクター]

pBAsi ベクターシリーズ (製品コード 3220 ~ 3228)

XII. 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。
- ・Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。PrimeGel、*TaKaRa Taq* 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