

製品コード 6195、6962～6967

研究用

TAKARA

LVpro Packaging Mix with pLVpro シリーズ

説明書

I. はじめに

A. 組換えレンチウイルスを用いた遺伝子の導入と発現

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

SIN (Self Inactivating) 型の pLVpro Vector シリーズ (pLVpro-MSCV Vector, pLVpro-MSCV-EI Vector, pLVpro-EF1 α Vector; 製品コード 6956 ~ 6961) と LVpro Packaging Mix (製品コード 6195) を組み合わせて用いる発現システムでは、目的遺伝子を搭載した pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドと LVpro Packaging Mix を共に Lenti-X™ 293T 細胞 (Lenti-X 293T Cell Line; 製品コード 632180) にコトランスフェクトすることにより、複製能のない組換えビリオン (ウイルス粒子) を容易に調製できます。LVpro Packaging Mix は高力価のレンチウイルスベクター調製のために最適化されたプラスミド混合物であり、ほとんどのタイプの細胞に感染可能な VSV-G エンベロープを持つ高力価な pseudotype のレンチウイルスベクターの調製が可能です。本システムを使用することで広範囲の細胞種指向性を持ち、安全性が高く高力価の非増殖型レンチウイルスベクターが得られ、優れた導入遺伝子発現を実現することができます。

B. LVpro Packaging Mix

LVpro Packaging Mix は、レンチウイルスベクター調製に必要なコンポーネントを発現するプラスミドを最適な比率で混合し、ウイルスパッケージングに必要なコンポーネントを最適な比率で発現するよう設計することで、高力価のレンチウイルスベクターを得ることを可能にした製品です。導入したい pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドと Packaging Mix を Lenti-X 293T 細胞にコトランスフェクトすることで、Packaging Mix より HIV-1 由来の Gag, Pol, Rev のレンチウイルスタンパク質と、VSV-G エンベロープタンパク質が一過性に発現されます。そして、pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドから転写された組換えウイルス RNA は完全なウイルス粒子の中に取り込まれます (図 1)。この最適化された Packaging Mix と Lenti-X 293T 細胞、さらに高効率トランスフェクション試薬 *TransIT-VirusGEN* Transfection Reagent (製品コード MIR6700) もしくは *TransIT-293* Transfection Reagent (製品コード MIR2700) の組み合わせにより、高いウイルス力価を有するレンチウイルスベクター液を取得することができ、多くの場合、取得したレンチウイルスベクター液を濃縮することなく、直接、標的細胞の感染に使用できます。

C. pLVpro レンチウイルスベクタープラスミド

pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドは SIN 型のレンチウイルスベクタープラスミドで、HIV-1 LTR (CMV-5'LTR および 3'LTR/ Δ U3) とレンチウイルスパッケージングシグナル (Ψ) とともに、導入遺伝子の発現やウイルス力価、ベクター全体の機能を向上させる各種配列を含んでいます。なお、導入細胞の種類や導入遺伝子の違いにより内部プロモーターを選択できるように、MSCV-U3、MSCV-EI (MSCV-U3 プロモーター下流にヒト EF1 α 遺伝子由来のエキソンおよびイントロンを搭載)、EF1 α の 3 種類のプロモーターをラインナップしています。また、5'LTR の U3 領域を CMV プロモーターに置き換えた tat 非依存性の第 3 世代レンチウイルスベクターです。さらに、感染力価に影響のない範囲でパッケージングシグナル付近の HIV 由来配列を除いています。

• WPRE (ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント) :

WPRE はポリ A 部位のリードスルーを防ぎ、RNA のプロセッシングと成熟を促進し、RNA の核外への輸送を増大させます (Zufferey, *et al.*, 1999; Higashimoto, *et al.*, 2007)。この WPRE は、パッケージング細胞内のウイルスゲノム転写物に作用してベクターパッケージングを促進し、ウイルス力価を増大させます。さらにベクターの内部プロモーターによって産生される mRNA の成熟を促進するため、遺伝子導入された標的細胞内の目的遺伝子の発現を促進します。一方で、WPRE 配列内には発がん性が危惧される配列が存在するため、pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドではその配列の発現を防ぐ配列 (WPRE2) へ変更しています。

• cPPT/CTS (セントラルポリプリン配列/セントラルターミネーション配列) :

cPPT と CTS によって形成される“DNA フラップ”は、標的細胞への感染過程においてウイルスゲノムの核内への輸送を促進します。そのため、cPPT/CTS エレメントはベクターのゲノムへの組込みと遺伝子導入効率を向上させます (Zennou, *et al.*, 2000)。

• RRE (Rev 応答エレメント) :

スプライシングされていないウイルスゲノム RNA の核外への輸送を促進することで、ウイルス力価を向上させます (Cochrane, *et al.*, 1990)。

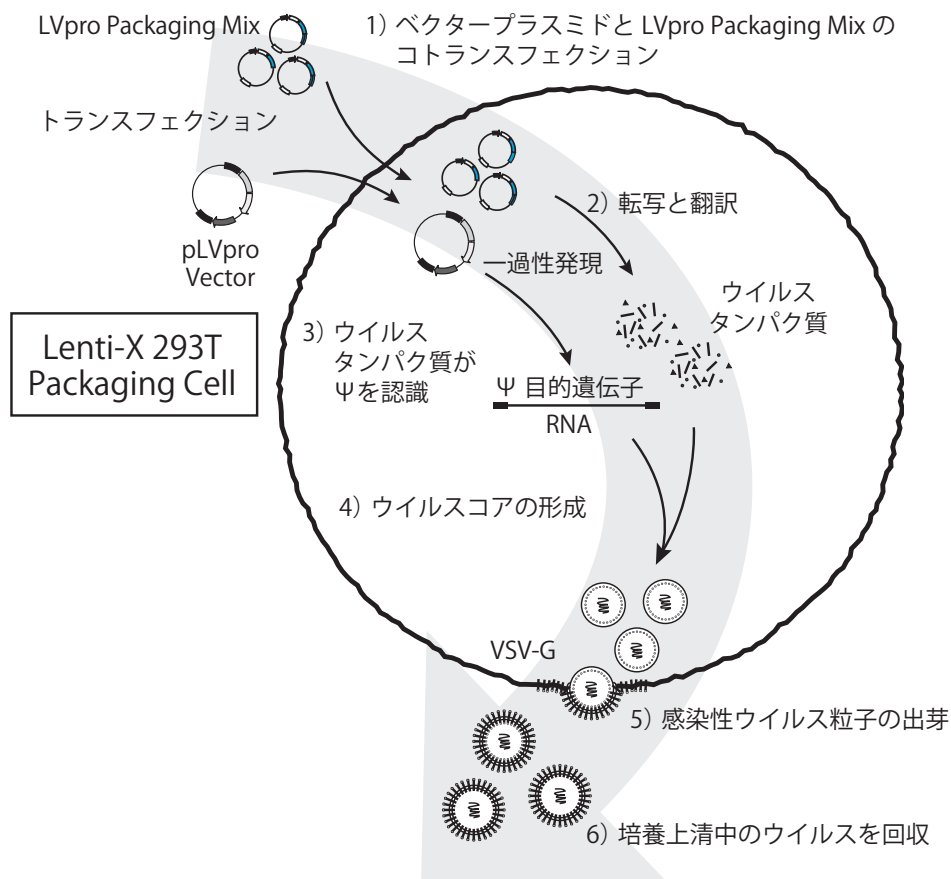


図 1. LVpro Packaging Mix と Lenti-X 293T 細胞を用いたレンチウイルスの産生

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

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

D. バイオセーフティーについて

pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドは、本製品により調製した遺伝子組換えレンチウイルスと野生型 Human immunodeficiency virus 1 型 (HIV-1) との予期せぬ重複感染などの特殊な条件下においても、自立的な増殖力および感染力を保持せず、かつ、哺乳動物等に対する病原性を獲得することがないように、カルタヘナ法令 研究開発二種省令 (平成 16 年文部科学・環境省令第 1 号) および告示 (令和三年二月文部科学省告示第十三号) における「HIV-1 の増殖力等欠損株」(実験分類クラス 2) に要求される以下の 3 つの要件をすべて満たした、安全性に十分配慮した設計となっています。

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

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

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

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

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

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

II. 内容

LVpro Packaging Mix (製品コード 6195)

LVpro Packaging Mix 60 回* (140 μ l \times 3)

* : 100 mm dish 使用の場合の回数です。

LVpro Packaging Mix (pLVpro-MSCV Vector) (製品コード 6962)

LVpro Packaging Mix (pLVpro-MSCV-EI Vector) (製品コード 6963)

LVpro Packaging Mix (pLVpro-EF1 α Vector) (製品コード 6964)

LVpro Packaging Mix (pLVpro-MSCV-ZsGreen1 Vector) (製品コード 6965)

LVpro Packaging Mix (pLVpro-MSCV-EI-ZsGreen1 Vector) (製品コード 6966)

LVpro Packaging Mix (pLVpro-EF1 α -ZsGreen1 Vector) (製品コード 6967)

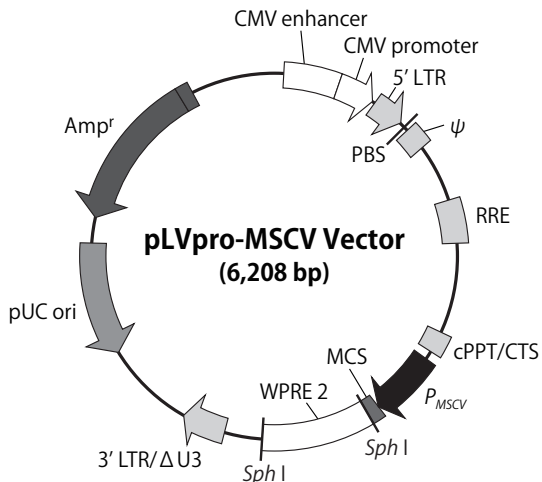
製品コード 6962 ~ 6967 は、LVpro Packaging Mix (製品コード 6195) と各 pLVpro Vector (製品コード 6956 ~ 6961) のセットです。

注：pLVpro Vector (製品コード 6956 ~ 6961) は個別に販売していません。

pLVpro Vector (製品コード 6956 ~ 6961)

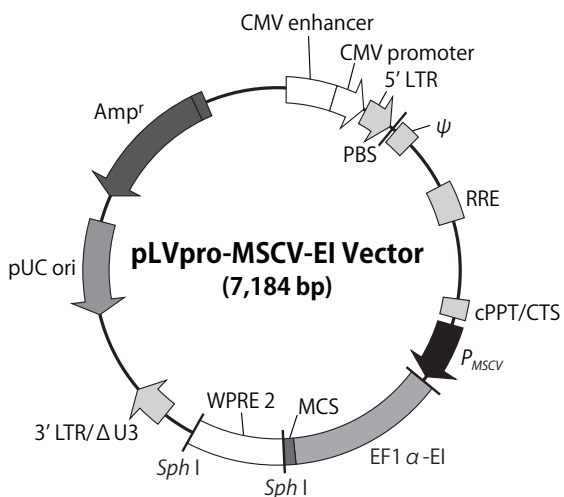
容量：20 μ g 濃度：0.5 μ g/ μ l

<ベクターマップ>



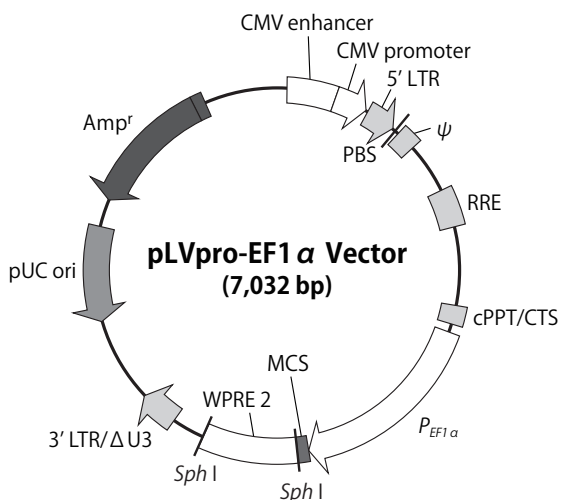
※ 製品コード 6962 に含まれています。

MCS : Sse8387 I Not I Xho I Cla I Sma I
BamH I Hpa I Mlu I Apa I Smi I
 GGATCCTGCAGGTTAACGCGGCCGCACGCGTCTCGAGGGCCCATCGATTTAAATCTAGACCCGGG
 CCTAGGACGTCCAATTGCGCCGGCGTGCGCAGAGCTCCCGGGTAGCTAAATTTAGATCTGGGCC



※ 製品コード 6963 に含まれています。

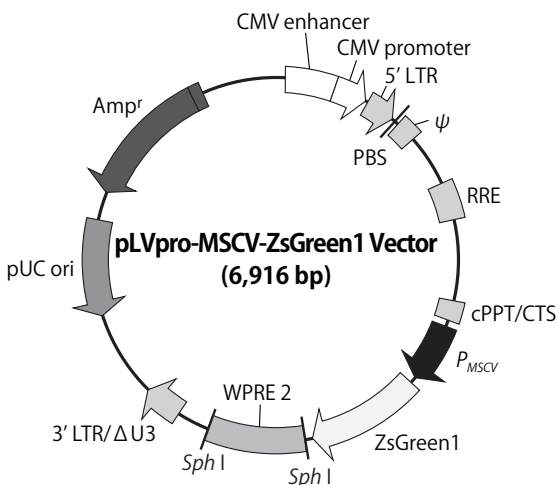
MCS : Sse8387 I Hpa I Not I Mlu I Smi I
Cla I Sma I
 CCTGCAGGTTAACGCGGCCGCACGCGTCTCGAGGGCCCATCGATTTAAATCTAGACCCGGG
 GGACGTCCAATTGCGCCGGCGTGCGCAGAGCTCCCGGGTAGCTAAATTTAGATCTGGGCC



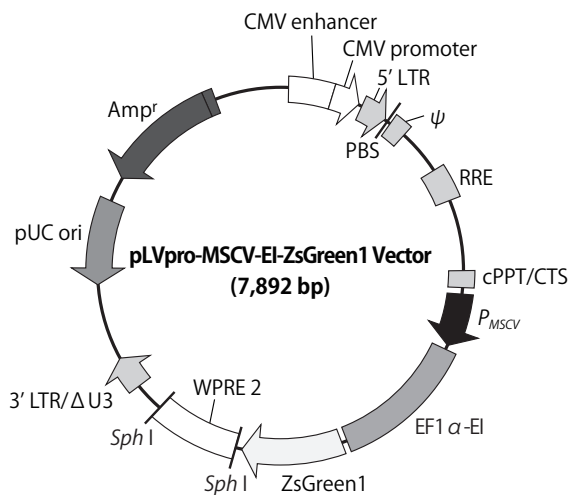
※ 製品コード 6964 に含まれています。

MCS :

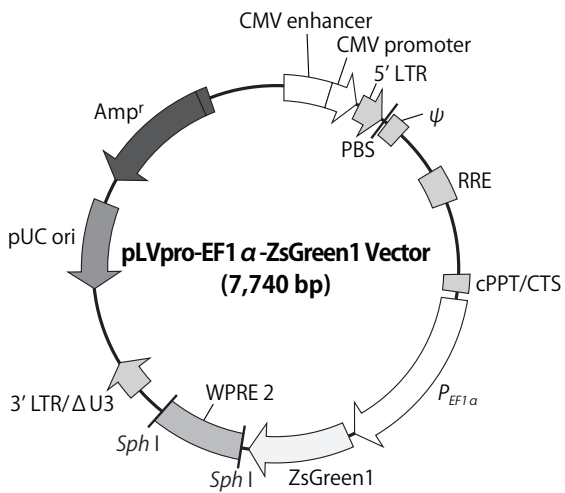
Sse8387 I Not I Cla I Xba I
BamH I Hpa I Mlu I Smi I Sma I
GGATCCTGCAGGTTAACGCGGCCGCACGCGTCTCGAGGGCCCATCGATTAAATCTAGACCCGGG
CCTAGGACGTCCAATTGCGCCGGCGTGCGCAGAGCTCCCGGTAGCTAAATTTAGATCTGGGCC



※ 製品コード 6965 に含まれています。



※ 製品コード 6966 に含まれています。



※ 製品コード 6967 に含まれています。

IV. その他必要な試薬など

A. レンチウイルスのパッケージングと力価測定に必要な細胞株

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

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

• HT-1080 cell line

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

B. 試薬類

• 下記のうちいずれかのトランスフェクション試薬*1

- TransIT-VirusGEN Transfection Reagent* (製品コード MIR6700)
- TransIT-293 Transfection Reagent* (製品コード MIR2704)
- CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (製品コード 631312)

• ポジティブコントロール用ベクター*2

- pLVpro-MSCV-ZsGreen1 Vector (製品コード 6965 に含まれています。)
- pLVpro-MSCV-EI-ZsGreen1 Vector (製品コード 6966 に含まれています。)
- pLVpro-EF1 α -ZsGreen1 Vector (製品コード 6967 に含まれています。)

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

* 2 : d、e、f は蛍光タンパク質である ZsGreen1 を発現するレンチウイルスベクタープラスミドであり、トランスフェクション効率の確認や、調製したレンチウイルスの生物学的力価を確認するためのポジティブコントロールとして使用するのに便利です。感染させる細胞の種類によって搭載プロモーターをご選択いただくことをお勧めいたします。

C. 哺乳動物細胞培養用の培地など

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

D. 器具・装置

- ・細胞培養用プレート (100 mm、12 ウェルなど)、フラスコ
- ・滅菌チューブ (1.5 ml、2.0 ml、15 ml など) およびウイルス液凍結保存用バイアル
- ・ウイルス液濾過用 0.45 μm フィルター

※ ろ過を行う場合は、タンパク質の吸着力が弱い PolyVinylidene DiFluoride (PVDF)、酢酸セルロースまたは polyethersulfone (PES) フィルターを用います。ニトロセルロースはレンチウイルスのエンベロープ上の表面タンパク質と結合してウイルスを破壊するため、使用しないでください。

- ・細胞培養に必要な一般的器具および設備

E. レンチウイルス力価測定

正確で再現性のある遺伝子導入のために、レンチウイルスストック液の力価測定を強く推奨します。Lenti-X qRT-PCR Titration Kit (製品コード 631235) は、qRT-PCR を利用した迅速・簡便な力価測定キットです (*Clontechiques*, January 2008; Quinn, *et al.*, 1997)。本キットではインターカレーター法のリアルタイム PCR によりウイルス RNA ゲノムの存在量 (RNA タイター) を調べることで、ウイルスストック液の力価を約 4 時間で測定できます。

Lenti-X p24 Rapid Titer Kit (製品コード 632200) では、ELISA 法を用いてウイルス上清中の p24 キャプシドタンパク質の量を測定します。測定した p24 キャプシドタンパク質量はウイルス力価と相関します。

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

F. レンチウイルスの精製

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

G. レンチウイルスの濃縮

Lenti-X Concentrator (製品コード 631231/631232) を用いると、超遠心を行わずにウイルス力価を 100 倍まで濃縮できます。濃縮されたレンチウイルスを用いることで高い MOI で標的細胞に感染できます。

(詳細は「Appendix：補足のプロトコール」参照)

H. レンチウイルスによる遺伝子導入の促進に用いるポリブレン

組換えレンチウイルスによる遺伝子導入の促進には、ポリブレン (Polybrene : hexadimethrinebromide; Sigma-Aldrich, No. H9268) の添加が有効です。ポリブレンはポリカチオンで、ウイルスと細胞膜の電荷的反発を減少させます。標的細胞に対するポリブレンの最適濃度 (感染力が最大で毒性が最少となる濃度) を 2 ~ 12 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で実験的に求めておく必要があります。ポリブレンに特に悪影響を受ける細胞や造血系細胞の場合は RetroNectin® 試薬の使用をご検討ください。

I. レンチウイルスによる遺伝子導入の促進に用いる RetroNectin

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

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

1. プラスミド DNA を増幅する場合には、大腸菌宿主株、例えば *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (製品コード 9028) などに導入し、市販のプラスミド精製キットを用いて精製します。
2. 標準的なクローニング技術を用いて、目的の遺伝子コード配列を pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドのマルチクローニングサイト (MCS) に挿入します。また、In-Fusion® Snap Assembly Master Mix (製品コード 638943 など) も使用できます。このキットを用いると、PCR 産物をどのような直鎖状ベクターにも容易にクローニングできます。
pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドの配列情報は、タカラバイオウェブカタログからダウンロードできます。

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

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

(参考) NucleoBond Xtra Midi Plus/Maxi Plus (製品コード 740412.10/740416.10 など) および NucleoBond Xtra Midi/Maxi (製品コード 740410.10/740414.10 など) の使用を推奨します。また、同キットを用いた場合でも、取得したプラスミド DNA を $14,000 \times g$ で 10 分間遠心し、その上清をプラスミド DNA 溶液として回収することで、トランスフェクションに適した、さらに高純度のプラスミド DNA 溶液の取得が可能です。

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

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

- LVpro Packaging Mix を用いて高力価のレンチウイルスを得るには、Lenti-X 293T 細胞を使用し、以下のプロトコールに厳密に従う必要があります。特に、(1) 培養サイズと容量、(2) DNA の量とトランスフェクションに適した品質、(3) インキュベーション時間は厳守してください。
- 以下のプロトコールは、pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドと LVpro Packaging Mix を用いて、Lenti-X 293T 細胞へ導入してウイルス産生を行うことを前提に最適化されています。
- すべてのステップは安全キャビネットの中で行ってください。レンチウイルスの取扱いには、レンチウイルスの使用を承認されたバイオセーフティーレベルの設備が必要です。HIV-1 由来ベクターでパッケージングされた組換えレンチウイルスは、ヒト細胞への感染力があります。適切な安全措置を講じてください。

VI-1. Lenti-X 293T 細胞播種

Lenti-X 293T 細胞を 100 mm 細胞培養用ディッシュに 5.0×10^6 cells/10 ml/dish で播種*し、5% CO₂ インキュベーター内で 37°C にて一晩培養する。
培地には 10% FBS 含有 DMEM 培地を使用する。1% Penicillin-Streptomycin を添加した DMEM 培地も使用できる。

*：トランスフェクション試薬に CalPhos Mammalian Transfection Kit (製品コード 631312) を使用する場合は 2.5×10^6 cells/10 ml/dish で播種してください。

VI-2. トランスフェクション (細胞播種翌日)

pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドと LVpro Packaging Mix を Lenti-X 293T 細胞へトランスフェクションする。

トランスフェクション試薬は以下の3種類を推奨。

- TransIT-VirusGEN Transfection Reagent* (製品コード MIR6700)
- TransIT-293 Transfection Reagent* (製品コード MIR2704)
- CalPhos Mammalian Transfection Kit (製品コード 631312)

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

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

a. *TransIT-VirusGEN Transfection Reagent* (製品コード MIR6700) を使用する場合

(手順の詳細は *TransIT-VirusGEN Transfection Reagent* の取扱説明書をご参照ください)

- 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。
- 2.0 ml チューブを使用し、以下の混合比で無血清の DMEM とプラスミド DNA を混合し、穏やかにピペッティングして完全に混合する。

| 試薬 | 使用量 |
|------------------------------------|---------------|
| LVpro Packaging Mix | 7 μ l |
| 0.5 μ g/ μ l pLVpro Vector | 10 μ l |
| 無血清 DMEM | 1,000 μ l |
| Total | 1,017 μ l |

2. で作製した混合液に 30 μ l の *TransIT-VirusGEN Transfection Reagent* を添加し、穏やかにピペッティングして混合し、15 ~ 60 分、室温で静置する。
- 前日に播種した Lenti-X 293T 細胞に 3. の混合液をすべて滴下し、5% CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養を続ける。

b. *TransIT-293 Transfection Reagent* (製品コード MIR2704) を使用する場合

(手順の詳細は *TransIT-293 Transfection Reagent* の取扱説明書をご参照ください。)

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

| 試薬 | 使用量 |
|------------------------------------|---------------|
| LVpro Packaging Mix | 7 μ l |
| 0.5 μ g/ μ l pLVpro Vector | 10 μ l |
| 無血清 DMEM | 1,500 μ l |
| Total | 1,517 μ l |

2. で作製した混合液に 45 μ l の *TransIT-293 Transfection Reagent* を添加し、穏やかにピペッティングして混合し、15 ~ 30 分、室温で静置する。
- 前日に播種した Lenti-X 293T 細胞に 3. の混合液をすべて滴下し、5% CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養を続ける。

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

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

1. 2 × HEPES-Buffered Saline、2 M Calcium Solution、Sterile H₂O を室温に戻しておく。
2. 以下の混合比でプラスミド DNA とカルシウム溶液を 15 ml チューブ中で混合する。

| 試薬 | 使用量 |
|------------------------------------|-------------|
| LVpro Packaging Mix | 7 μ l |
| 0.5 μ g/ μ l pLVpro Vector | 10 μ l |
| 2M Calcium Solution | 87 μ l |
| Sterile H ₂ O | 595 μ l |
| Total | 699 μ l |

3. 2 × HEPES-Buffered Saline が室温に戻っていることを確認し、2. の総量と等量 (699 μ l) の 2 × HEPES-Buffered Saline を添加し、チューブにフタをして上下に 15 回激しく振って混和する。
4. 5 分間室温にて静置する。
注：静置時間は 5 分間を厳守し、5 分経過後は速やかに次の工程に進んでください。静置時間が長くなるとリン酸カルシウム-DNA の結晶が大きくなりすぎて、トランスフェクション効率が低下することがあります。
5. 前日に播種した Lenti-X 293T 細胞に 4. の混合液を滴下し、5% CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養を続ける。

VI-3. 培地交換

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

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

VI-4. レンチウイルス液の回収

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

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

VII. 組換えレンチウイルスの力価測定

A. 各種力価測定方法

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

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

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

• qRT-PCR

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

• p24 ELISA

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

• フローサイトメトリー

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

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

B. フローサイトメーターを用いた生物学的力価測定法

生物学的力価の測定では、導入する遺伝子発現を検出してその力価を算出します。以下に蛍光タンパク質である ZsGreen1 遺伝子を搭載した pLVpro-MSCV-ZsGreen1 Vector (製品コード 6959) と LVpro Packaging Mix、TransIT-VirusGEN Transfection Reagent (製品コード MIR6700) を使用して調製したレンチウイルスベクターの生物学的力価測定法を紹介します。

B-1. HT-1080 細胞播種

HT-1080 細胞を 12 ウェル細胞培養用プレートに 2.5×10^4 cells/1 ml/well で播種し、5% CO₂ インキュベーター内で 37°C にて培養する。

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

B-2. レンチウイルス感染 (細胞播種翌日)

1. 10% FBS 含有 DMEM 培地にポリブレンを添加する。(培地 450 μ l に対して 8 mg/ml ポリブレン溶液 0.5 μ l)
2. B-1. にて播種した HT-1080 細胞の培地を 450 μ l のポリブレン含有培地と交換する。
3. 調製したレンチウイルス液を 10% FBS 含有 DMEM で段階希釈する。希釈倍率はウイルス力価にもよるが、20 ~ 2,000 倍での段階希釈が望ましい。
4. 希釈したレンチウイルス液 50 μ l を 2. の HT-1080 細胞に滴下し、感染させる。(ポリブレン終濃度 8 μ g/ml、ウイルス最終希釈倍率 200 ~ 20,000 倍)
5. 5% CO₂ インキュベーター内で 37°C にて一晩培養する。

B-3. 培地交換

1. 翌日にウイルス含有培地を 1 ml の 10% FBS 含有 DMEM に交換する。
2. 5% CO₂ インキュベーター内で 37°C にて二晩培養する。

B-4. フローサイトメーターで評価

翌々日 (感染から 3 日後)、細胞を Trypsin/EDTA で剥がして回収し、フローサイトメーターにて ZsGreen1 陽性率を測定する。

B-5. Viral biological titer の算出

得られた ZsGreen1 陽性率を以下の式に当てはめて生物学的力価 (IFU/ml) を算出する。計算に使用する ZsGreen1 陽性率は 1.0 ~ 20.0% が望ましい。

$$\text{Titer (IFU/ml)} = \text{感染細胞数} \times \text{ZsGreen1 陽性率 (\%)} / 100 \times \text{ウイルス希釈倍率} / \text{感染時液量 (0.5 ml)}$$

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

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

レンチウイルスベクターを標的細胞へ遺伝子導入する方法として、ポリブレン法、静置感染法、遠心感染法や RetroNectin (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (製品コード T100A/B) を使用した RBV-spin 法などの方法があります。レンチウイルスの感染方法により導入効率や導入後の細胞生存率に影響を与えるため、最適な方法を選択することが重要です。以下にプロトコールを示します。

VIII-1. ポリブレン法

接着性細胞株 (HT-1080、HeLa など) に遺伝子導入する場合は、ポリブレンを用いた手法が一般的です。標的細胞に対するポリブレンの最適濃度を実験的に求めて使用しますが、通常、2～12 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲に入ります。しかし、ポリブレンに過剰 (24 時間よりも長く) にさらすと、細胞毒性が現れます。本プロトコールを参考に、使用する標的細胞への遺伝子導入最適条件を検討してください。

1. 遺伝子導入の前日に標的細胞を播種する。
2. 力価測定したレンチウイルスストック液を融解する。あるいは、パッケージング細胞から調製した直後のウイルス液を用いる。融解したレンチウイルスを穏やかに混合する。
注：ボルテックスで攪拌しないでください。また、凍結融解のたびに力価が減少するので注意が必要です。
3. レンチウイルス液とポリブレンを添加できるように、標的細胞の培地の容量を調整する。遺伝子導入の過程で目的の最終濃度 (例えば 4 $\mu\text{g/ml}$) となるようにポリブレンを添加する。
4. 目的の多重感染度 (MOI) が得られるように、レンチウイルス液を培地で希釈する。ウイルス力価が不明な場合は、レンチウイルス液の段階希釈系列を用いる。この場合、ウイルス液の全量が、遺伝子導入に用いる培地の最終容量の 1/2 以下となるようにする。
5. 4. で調製したウイルス希釈液を細胞に加え、8～24 時間、37℃、5% CO₂ インキュベーターで培養する。感染効率を向上させたい場合は、培養液を遠心後 (プレートを 32℃ で 1,200 × g、60～90 分遠心すると、感染率が著しく増大する。32℃ が使えない場合は、室温遠心でもよい)、37℃、5% CO₂ インキュベーターで培養する。ポリブレンあるいはウイルス液 (パッケージング細胞によってコンディショニングされた培地を含む) に細胞を長くさらすことが心配な場合は、遺伝子導入の時間を 6～8 時間に短縮してもよい。
6. ウイルスを含む遺伝子導入培地 (トランスダクション培地) を除去して、新しい培地を加える。
注：廃棄する培地には感染能を持ったウイルスが含まれているので適切な処理を行ってください。
7. 十分な導入遺伝子発現が確認できるまで (通常、24～48 時間)、感染細胞を培養する。
8. 解析のために細胞を回収する。

VIII-2. 静置感染法

浮遊性細胞株 (SupT1、J45.01 など) に遺伝子導入する場合や、ウイルス力価の高いウイルスベクターを使用する場合は、静置感染法での感染も可能です。

1. レンチウイルス液を添加できるように、標的細胞の培地の容量を調整して標的細胞を播種する。
2. 力価測定した少量のレンチウイルスストック液を融解する。あるいは、パッケージング細胞から調製した直後のウイルス液を用いる。融解したレンチウイルスを穏やかに混合する。
注：ボルテックスで攪拌しないでください。また、凍結融解のたびに力価が減少するので注意が必要です。
3. 目的の多重感染度 (MOI) が得られるように、レンチウイルス液を培地で希釈する。ウイルス力価が不明な場合は、レンチウイルス液の段階希釈系列を用いる。この場合、ウイルス液の全量が遺伝子導入に用いる培地の最終容量の 1/2 以下となるようにする。
4. ウイルス上清を細胞に加え、8～24 時間、37℃、5% CO₂ インキュベーターで培養する。
5. 新しい培地を加える。

VIII-3. 遠心感染法

ポリブレンに弱い接着性細胞株、静置感染法では感染効率の低い浮遊性細胞株に遺伝子導入する場合は、遠心感染法での感染も有効です。さらに RetroNectin を用いた Supernatant 法 (遠心感染) はヒト末梢血単核球 (PBMC) へ高い効率で感染が可能です。

1. レンチウイルス液を添加できるように、標的細胞の培地の容量を調整して標的細胞を播種する。
注：RetroNectin を用いた Supernatant 法 (遠心感染) の場合は、RetroNectin コートプレート (VIII-4. 参照) に細胞を播種する。
2. 力価測定した少量のレンチウイルスストック液を融解する。あるいは、パッケージング細胞から調製した直後のウイルス液を用いる。融解したレンチウイルスを穏やかに混合する。
注：ボルテックスで攪拌しないでください。また、凍結融解のたびに力価が減少するので注意が必要です。
3. 目的の多重感染度 (MOI) が得られるように、レンチウイルス液を培地で希釈する。ウイルス力価が不明な場合は、レンチウイルス液の段階希釈系列を用いる。この場合、ウイルス液の全量が遺伝子導入に用いる培地の最終容量の 1/2 以下となるようにする。
4. ウイルス上清を細胞に加え、プレートを 32℃ で 1,200 × g、60～90 分遠心 (32℃ が使えない場合は、室温遠心でもよい) する。
5. 8～24 時間、37℃、5% CO₂ インキュベーターで培養する。
6. 新しい培地を加える。

VIII-4. RBV-spin 法

遺伝子導入が困難な細胞あるいはポリブレンに弱い細胞の場合は、RetroNectin を用いると、遺伝子導入効率を著しく向上させることができます。特にヒト末梢血単核球 (PBMC) に遺伝子導入する場合、RBV-spin 法を用いると遺伝子導入後の細胞増殖への影響が少なく、ウイルス液の持ち込みが少ないため感染時のウイルスベクター以外の影響を受けにくい方法となります。

A. RetroNectin コートプレートの作製

1. RetroNectin 溶液を融解し均一になるように混合する (ボルテックスによる攪拌は避けてください)。使用時に滅菌済み PBS で適当な濃度 (20 ~ 100 $\mu\text{g/ml}$) *1 となるように希釈する。

* 1 : フィルターに吸着する可能性があるため、希釈後の RetroNectin 溶液はフィルターを過さないでください。

2. クリーンベンチ内で、0.25 ~ 0.5 ml/cm² (プレート底面が溶液で浸る程度) となるように RetroNectin 希釈液をプレート *2 に加えてプレート全底面に広げ、室温で 2 時間または 4°C で一晩放置する。24 ウェルプレートの場合には 1 ウェルあたり 0.5 ml、6 ウェルプレートの場合には 1 ウェルあたり 2 ml の RetroNectin 希釈液を加える。

* 2 : プレートは必ずノントリートメントタイプのものを使用してください。

3. RetroNectin 希釈液を除き、適量の 2% BSA/PBS 溶液を加えてブロッキングを行う。室温で 30 分間放置する *3。24 ウェルプレートの場合には 0.5 ml/well、6 ウェルプレートの場合は 2 ml/well のブロッキング液を加える。

* 3 : すぐに使用する場合は、2% BSA/PBS 溶液によるブロッキング操作は省くことができます。この場合、ステップ 4 の PBS または HBSS/HEPES による洗浄を 2 回繰り返してください。

4. 2% BSA/PBS 溶液を除き、適量の PBS または HBSS/HEPES で一度洗浄し、それらを除いた後、プレートを保存する。このプレートを RetroNectin コートプレート *4 とする。

* 4 : 2% BSA/PBS 溶液によるブロッキング操作を行った場合は、容器のふたをパラフィルム等でシールし、4°C で 1 週間の保存が可能です。

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

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

1. 目的遺伝子を持つ組換えレンチウイルス液の原液、あるいは希釈液を RetroNectin コートプレート上に 125 ~ 250 $\mu\text{l/cm}^2$ となるように加える。
2. 4°C で 2,000 × g、2 時間の遠心を行い、RetroNectin へウイルス粒子を吸着させる。
3. プレート上が乾燥しないように注意しながら、ウイルス液を除去し、適量の PBS または 0.1 ~ 2% のアルブミン (BSA や HSA) を含む PBS を添加する (溶液は細胞へのウイルス感染直前まで除かない)。
4. 標的細胞懸濁液を調製する。適切な細胞濃度は標的細胞の大きさや増殖率によって異なる。細胞に応じて、0.05 ~ 5 × 10⁵ cells/cm² の範囲で検討する。
5. 3. で作製したウイルス結合プレートの溶液を除去し、速やかに細胞懸濁液を加える。標的細胞とウイルスベクターの接触を促す目的で、細胞添加後、遠心操作を行っても良い (例 : 500 × g、1 分間遠心など)。
6. 37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養する。

IX. 参考データ

IX-1. LVpro Packaging Mix (pLVpro) と Lentiviral High Titer Packaging Mix (pLVSIN) で調製した組換えレンチウイルスの力価比較 (HT-1080 細胞)

本製品の LVpro Packaging Mix と pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドを使用することで、Lentiviral High Titer Packaging Mix (製品コード 6194) と pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドを使用した場合と同等の高力価のレンチウイルスが得られます。以下に参考データとして Lentiviral High Titer Packaging Mix と pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドを使用した場合との比較データを示します。

<実験方法>

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

| | レンチウイルスベクタープラスミド | パッケージングプラスミド |
|---|--|-------------------------------------|
| 1 | pLVpro-MSCV-ZsGreen1 Vector | LVpro Packaging Mix |
| 2 | pLVpro-MSCV-EI-ZsGreen1 Vector | LVpro Packaging Mix |
| 3 | pLVpro-EF1 α -ZsGreen1 Vector | LVpro Packaging Mix |
| 4 | pLVSIN-MSCV-ZsGreen1 Vector*1 | Lentiviral High Titer Packaging Mix |
| 5 | pLVSIN-EF1 α -ZsGreen1 Vector*2 | Lentiviral High Titer Packaging Mix |

* 1 : pLVSIN-EF1 α -IRES-ZsGreen1 Vector (製品コード 6192) の IRES と EF1 α プロモーター配列を除いて、MSCV-U3 プロモーターを搭載したベクタープラスミド

* 2 : pLVSIN-EF1 α -IRES-ZsGreen1 Vector (製品コード 6192) の IRES 配列を除いたベクタープラスミド

※ 遺伝子導入試薬は全て *TransIT-VirusGEN Transfection Reagent* を使用しました。

※ LVpro Packaging Mix と pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドとの組み合わせでは、高力価のレンチウイルスは取得できません。

得られたレンチウイルスベクターの生物学的力価を HT-1080 細胞にて評価した。

その結果を図 2. に示す。LVpro Packaging Mix と pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドを使用することで、Lentiviral High Titer Packaging Mix と pLVSIN レンチウイルスベクタープラスミドを使用した場合と同等の高力価のレンチウイルス液が得られた。

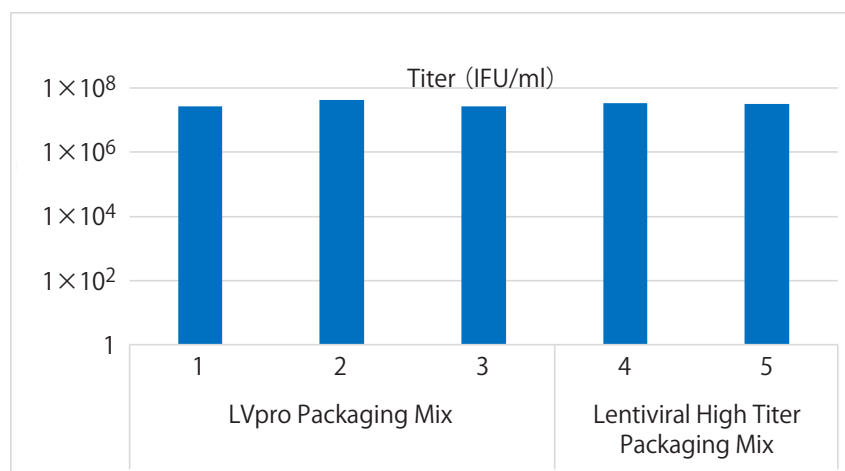


図 2. LVpro Packaging Mix と Lentiviral High Titer Packaging Mix で調製したレンチウイルスの力価比較

IX-2. *TransIT-293* と *TransIT-VirusGEN* Transfection Reagent で調製した組換えレンチウイルスの力価比較 (HT-1080 細胞)

本製品の LVpro Packaging Mix と pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドを *TransIT-293* もしくは *TransIT-VirusGEN* Transfection Reagent を使用することで高力価のレンチウイルスが得られます。以下に参考データとして *TransIT-293* と *TransIT-VirusGEN* Transfection Reagent を使用した場合の力価測定データを示します。

<実験方法>

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

| | レンチウイルスベクタープラスミド | 遺伝子導入試薬 |
|---|--------------------------------------|-------------------------|
| 1 | pLVpro-MSCV-ZsGreen1 Vector | <i>TransIT-293</i> |
| 2 | pLVpro-MSCV-EI-ZsGreen1 Vector | <i>TransIT-293</i> |
| 3 | pLVpro-EF1 α -ZsGreen1 Vector | <i>TransIT-293</i> |
| 4 | pLVpro-MSCV-ZsGreen1 Vector | <i>TransIT-VirusGEN</i> |
| 5 | pLVpro-MSCV-EI-ZsGreen1 Vector | <i>TransIT-VirusGEN</i> |
| 6 | pLVpro-EF1 α -ZsGreen1 Vector | <i>TransIT-VirusGEN</i> |

※ パッケージングプラスミドは全て LVpro Packaging Mix を使用しました。

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。その結果を図 3. に示す。*TransIT-293* もしくは *TransIT-VirusGEN* Transfection Reagent を使用することで高力価のレンチウイルスが得られた。

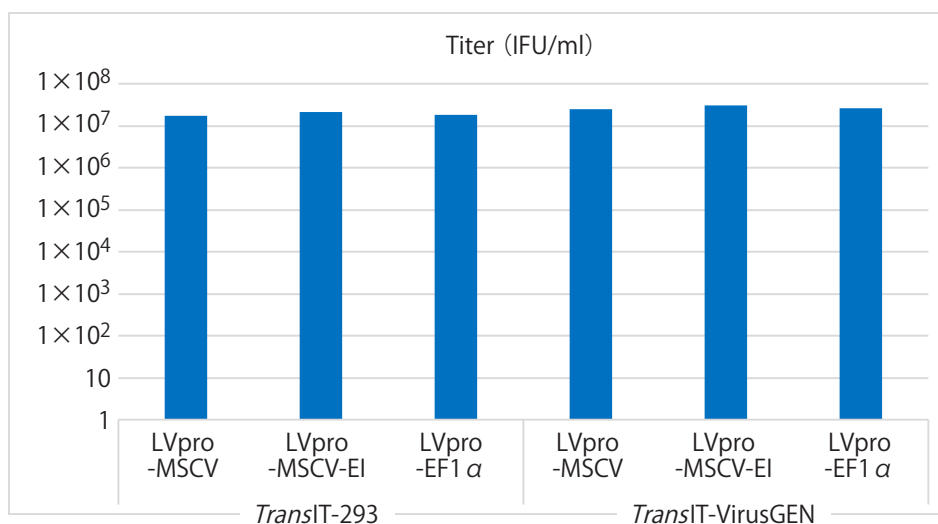


図 3. *TransIT-293* と *TransIT-VirusGEN* Transfection Reagent で調製したレンチウイルスの力価比較

IX-3. LVpro Packaging Mix と他社 Kit で調製した組換えレンチウイルスの力価比較 (HT-1080細胞)

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

<実験方法>

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

| | レンチウイルスベクタープラスミド | パッケージングプラスミド | 遺伝子導入試薬 |
|---|-----------------------------|---------------------|------------------|
| 1 | A 社ベクター* | A 社 | A 社 |
| 2 | A 社ベクター* | LVpro Packaging Mix | TransIT-VirusGEN |
| 3 | pLVpro-MSCV-ZsGreen1 Vector | A 社 | A 社 |
| 4 | pLVpro-MSCV-ZsGreen1 Vector | LVpro Packaging Mix | TransIT-VirusGEN |

* : A 社製品に ZsGreen1 遺伝子を搭載したベクタープラスミド (CMV プロモーター搭載)

得られたレンチウイルスベクターの生物学的力価を HT-1080 細胞にて評価した。その結果を図 4. に示す。全て A 社製品を使用した場合と比較して、A 社レンチウイルスベクタープラスミドと LVpro Packaging Mix・Trans IT-VirusGEN を組み合わせた場合、または pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドと A 社パッケージングプラスミド・遺伝子導入試薬を組み合わせた場合に、約 10 倍高い力価のレンチウイルス液が得られた。さらに、全てタカラバイオ製品を使用することにより、最も高い力価のレンチウイルス液が得られた。

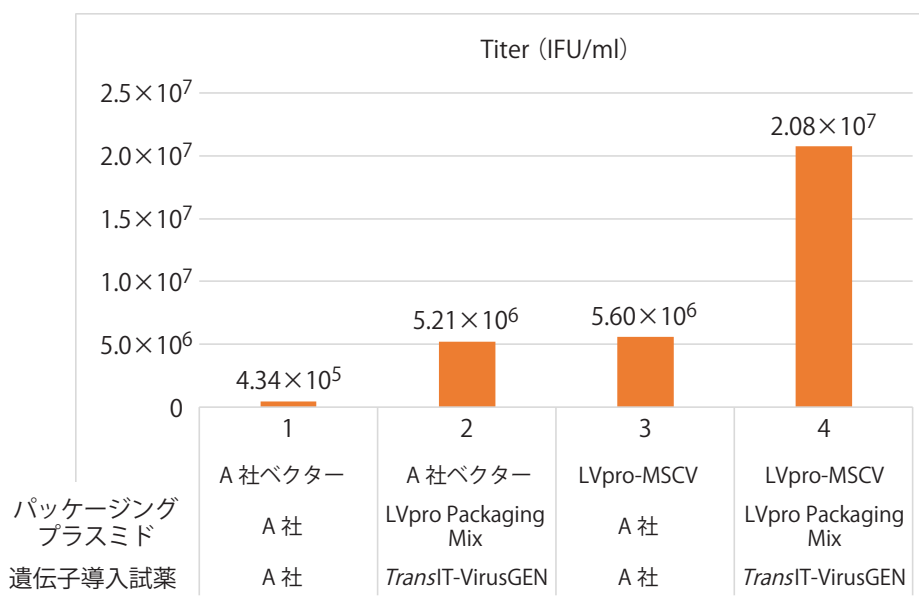


図 4. LVpro Packaging Mix と他社 Kit で調製したレンチウイルスの力価比較

IX-4. レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法の比較

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

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

<実験方法>

本製品により得られた ZsGreen1 発現レンチウイルスベクターを 30 倍希釈し、ヒト末梢血単核球 (PBMC) に RBV-Spin 法またはポリブレン法で遺伝子導入を行った。感染から 3 日後の細胞を回収し、フローサイトメーターを用いて CD8 陽性細胞率と ZsGreen1 陽性細胞率を測定した。

その結果を図 5 に示す。ポリブレン法では 10% 程度の陽性率を示すが、RBV-Spin 法で 20% 以上とポリブレン法と比較して高い陽性率を示した。

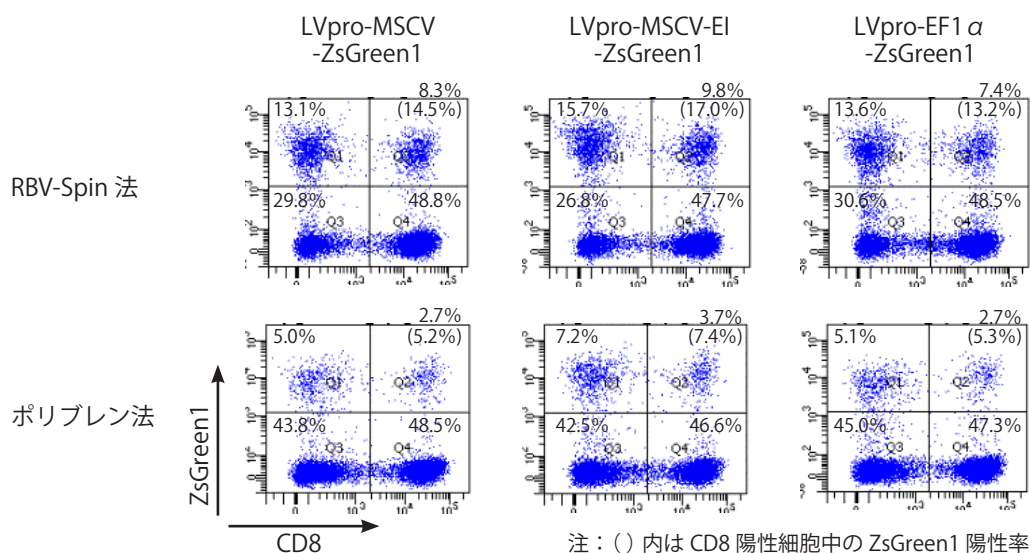
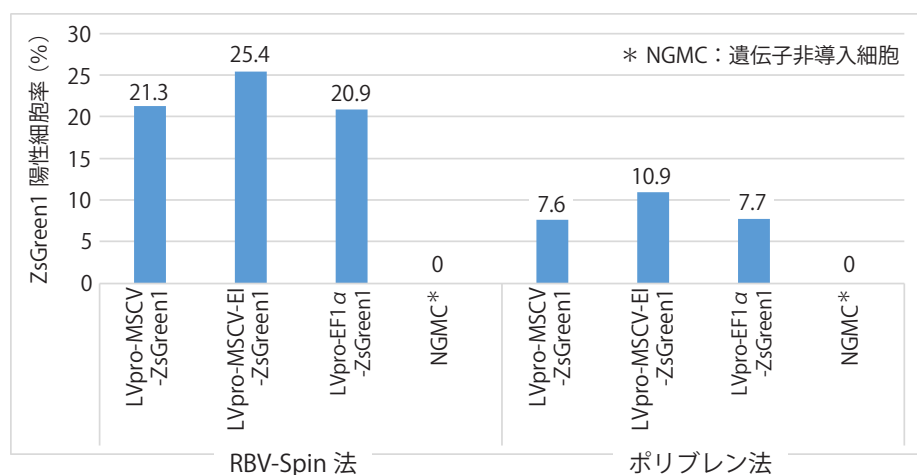


図 5. レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法の比較

IX-5. レンチウイルスベクタープラスミドの WPRE2 の有無の比較

本製品の pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドには WPRE2 が挿入されていますが、遺伝子を導入する細胞によって WPRE2 の影響が異なるため、本製品では制限酵素 (*Sph* I) 処理することで容易に WPRE2 を取り出すことが可能となっています。以下に参考データとして pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドから WPRE2 を除いた場合との比較データを示します。

<実験方法>

本製品の pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドを *Sph* I (製品コード 1246A) と反応させ、WPRE2 を除いたレンチウイルスベクタープラスミドを作製した。作製した WPRE2 を除去した ZsGreen1 発現レンチウイルスベクタープラスミドおよび pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドと LVpro Packaging Mix をコントロールとしてレンチウイルスを取得した。得られた ZsGreen1 発現レンチウイルスベクターを段階希釈し、各種の細胞に適宜、ポリブレン法、静置感染法、RetroNectin を用いた Supernatant 法 (遠心感染) により遺伝子導入を行い、生物学的力価の測定を実施した。

その結果から WPRE2 を除去したレンチウイルスベクターを 100% として、WPRE2 を挿入した pLVpro レンチウイルスベクターの生物学的力価とその際の MFI を比較した結果を図 6、図 7 に示す。ほとんどの細胞種では生物学的力価は WPRE2 を挿入した pLVpro レンチウイルスベクターの方が高くなるが、一部の細胞種では ZsGreen1 平均蛍光強度の低下がみられた。

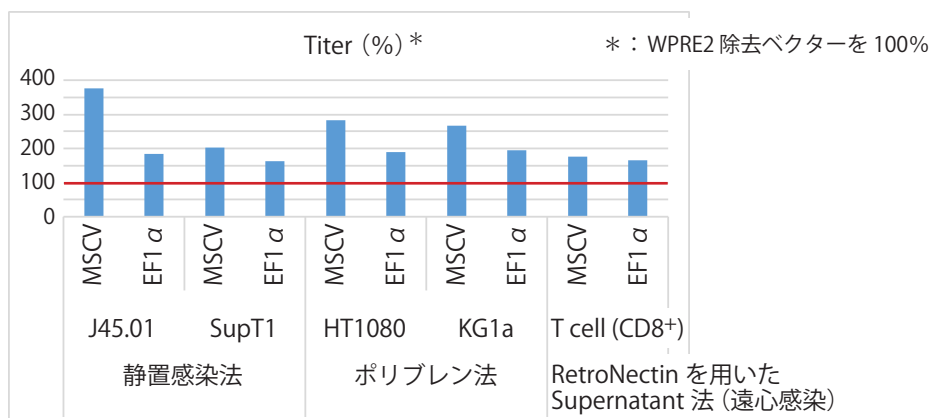


図 6. レンチウイルスベクタープラスミドの WPRE2 の有無のタイターの比較

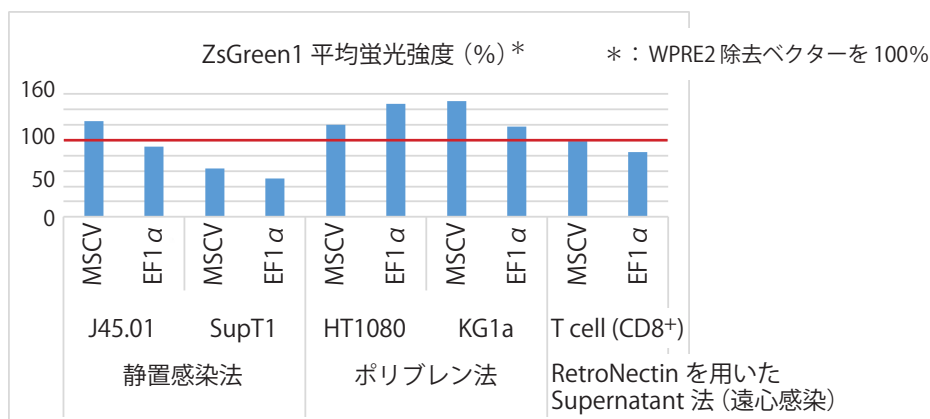


図 7. レンチウイルスベクタープラスミドの WPRE2 の有無の蛍光強度の比較

IX-6. 搭載プロモーターの選択について

本製品のpLVpro レンチウイルスベクタープラスミドは、3種類のプロモーター (MSCV-U3、MSCV-EI、EF1 α) をラインナップしています。遺伝子導入する細胞の種類や、挿入するTransGeneによって、その導入効率や発現が異なりますので、目的によりプロモーターの種類を選択いただくことをお勧めいたします。

以下に参考データとして、細胞の種類とプロモーターの比較結果を示します。

<実験方法>

本製品のZsGreen1 発現pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドとLVpro Packaging Mix をコトランスフェクトしてレンチウイルスを取得した。得られたZsGreen1 発現レンチウイルスベクターを段階希釈し、各種の細胞に適宜、ポリブレン法、静置感染法、RetroNectinを用いたSupernatant法 (遠心感染) により遺伝子導入を行い、細胞を回収しフローサイトメーターを用いてZsGreen1 陽性細胞率を測定した結果を図8に示す。

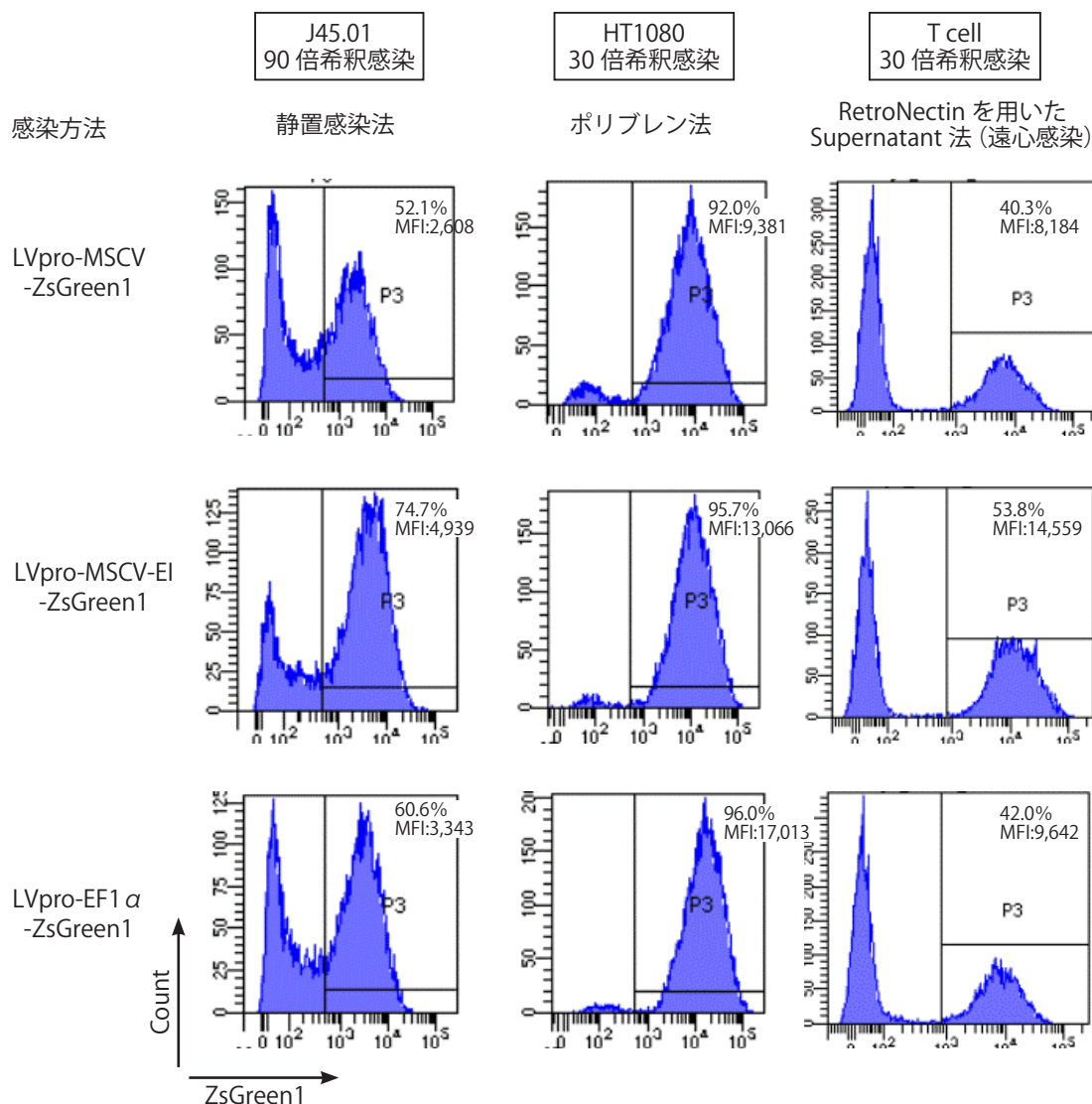


図 8. pLVpro レンチウイルスベクタープラスミドのプロモーター比較

Appendix : 補足のプロトコール

<ウイルスの濃縮>

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

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

X. 参考文献

- Cochrane, A. W., Chen, C. H., and Rosen C. A. Specific interaction of the human immunodeficiency virus Rev protein with a structured region in the env mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1990) **87**: 1198-202.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H. and Varmus, H. E., eds. *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY) (1997).
- Higashikawa, F. and Chang L. Kinetic Analysis of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology*. (2001) **280**: 124-131.
- Higashimoto, T., Urbinati, F., Perumbeti, A., Jiang, G., Zarzuela, A., Chang, L-J., Kohn, D. B. and Malik, P. The woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element reduces readthrough transcription from retroviral vectors. *Gene Ther*. (2007) **14**(17): 1298-1304.
- Improve Viral Transductions with RetroNectin® Reagent (October 2008) *Clontechiques*. (2008 年冬号): 11-12.
- Kozak, M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol*. (1987) **196**: 947-50.
- Lenti-X™ 293T Cells for Superior Lentivirus Packaging (October 2008) *Clontechiques*. (2008 年冬号): 10.
- Quinn, T. P. and Trevor, K. T. Rapid quantitation of recombinant retrovirus produced by packaging cell clones. *Biotechniques*. (1997) **23**: 1038-1044.
- Rapid Lentiviral and Retroviral Titration Kits (January 2008) *Clontechiques*. (2008 年早春号): 19-21.
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L. and Charneau, P. HIV- 1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell*. (2000) **101**: 173-185.
- Zufferey, R., Donello, Trono, D. and Hope, T. J. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol*. (1999) **73**: 2886-2892.

XI. 関連製品

[トランスフェクション試薬]

TransIT-VirusGEN Transfection Reagent (製品コード MIR6700/MIR6703 ~ MIR6706)

TransIT-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2700/MIR2704 ~ MIR2706)

CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (製品コード 631312)

[パッケージング細胞]

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

[力価測定]

Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit (製品コード 631235)

Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit (製品コード 632200)

Lenti-X™ GoStix™ Plus (製品コード 631280/631281)

[組換えレンチウイルスの精製]

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

[組換えレンチウイルスの濃縮]

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

[組換えレンチウイルスの感染効率アップ]

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

XII. 注意

- ・本製品の使用には遺伝子工学と細胞培養に関する基本的な技術が必要です。
- ・本製品の使用には文部科学省の定める省令（「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」平成16年文部科学省・環境省令第1号）にあるP2レベル以上の施設が必要です。詳しくは4ページ、「バイオセーフティーについて」を参照してください。
- ・本レンチウイルスベクターの系によって生産されるウイルス上清は、挿入断片によっては危険なウイルスを含む恐れがあるため、組換えレンチウイルスの生産と取扱いには、適切な処置をとる必要があります。吸入や付着を防ぐため、必ず、安全キャビネットを使用してください。
- ・本製品の使用はすべて研究用に限定されています。臨床目的での使用および生体外診断に使用することはできません。
- ・本製品ご利用の際は省令および組織内の組換えDNA安全委員会の指示に従い、安全には十分ご注意ください。
- ・本製品の使用によって生じたいかなる事故、損害についても、弊社では責任を負いかねますので、ご了承の上で使用ください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・RetroNectinはタカラバイオ株式会社の、In-FusionはTakara Bio USA, Inc.の登録商標です。Lenti-X、CalPhos、GoStixはTakara Bio USA, Inc.の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社