

遺伝子導入実験ハンドブック

—保存版—

目次

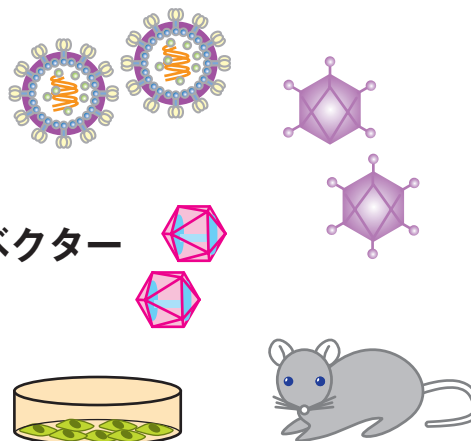
◆遺伝子導入実験を始める前に

- ・ 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

- ・ レトロウイルスベクター
- ・ 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
- ・ 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

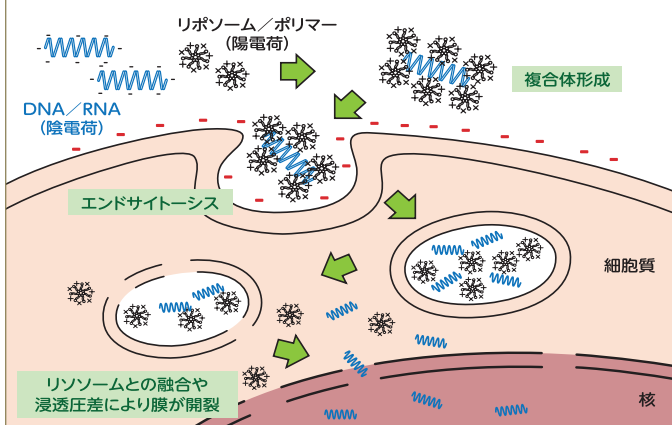
遺伝子導入の方法は、大きく3つ(化学的、物理的、生物学的な導入)に分類できます。目的を達成するために最適な手法を選択しましょう。

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

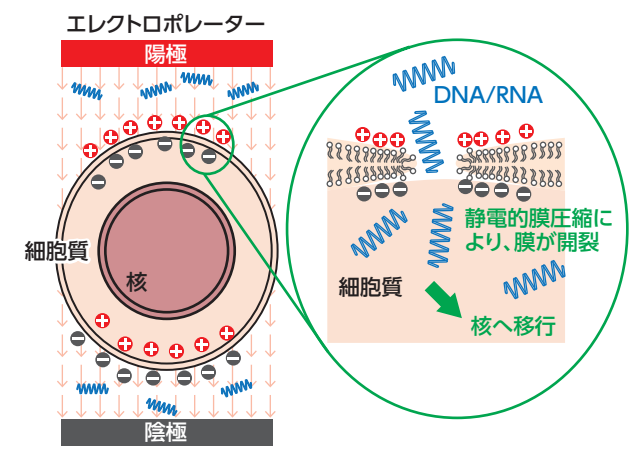
トランスフェクションによる遺伝子導入

核酸(DNAまたはRNA)は陰電荷であるため、陽電荷をもつ物質(リポ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。



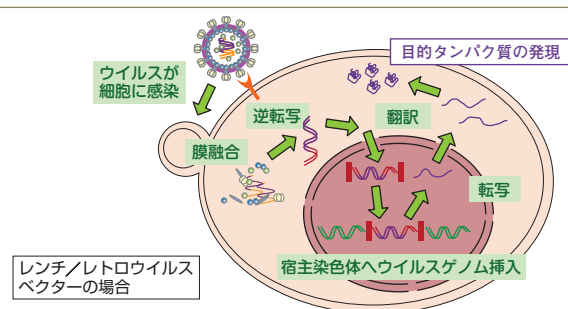
エレクトロポレーションによる遺伝子導入

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。



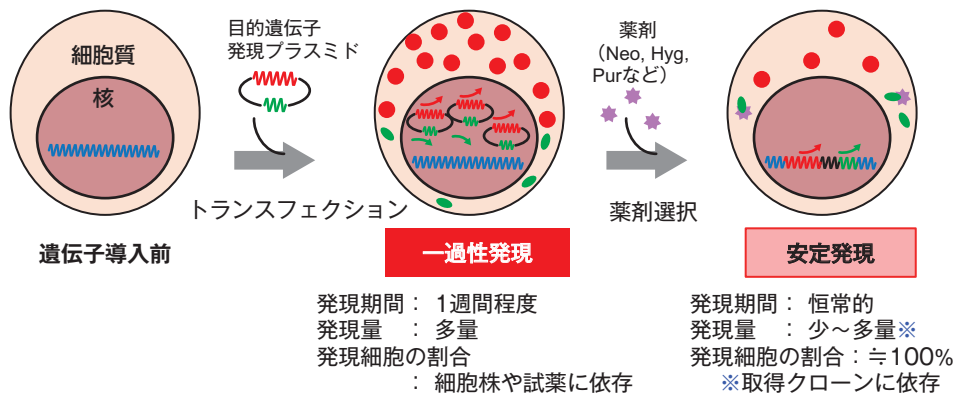
ウイルスベクターによる遺伝子導入

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。



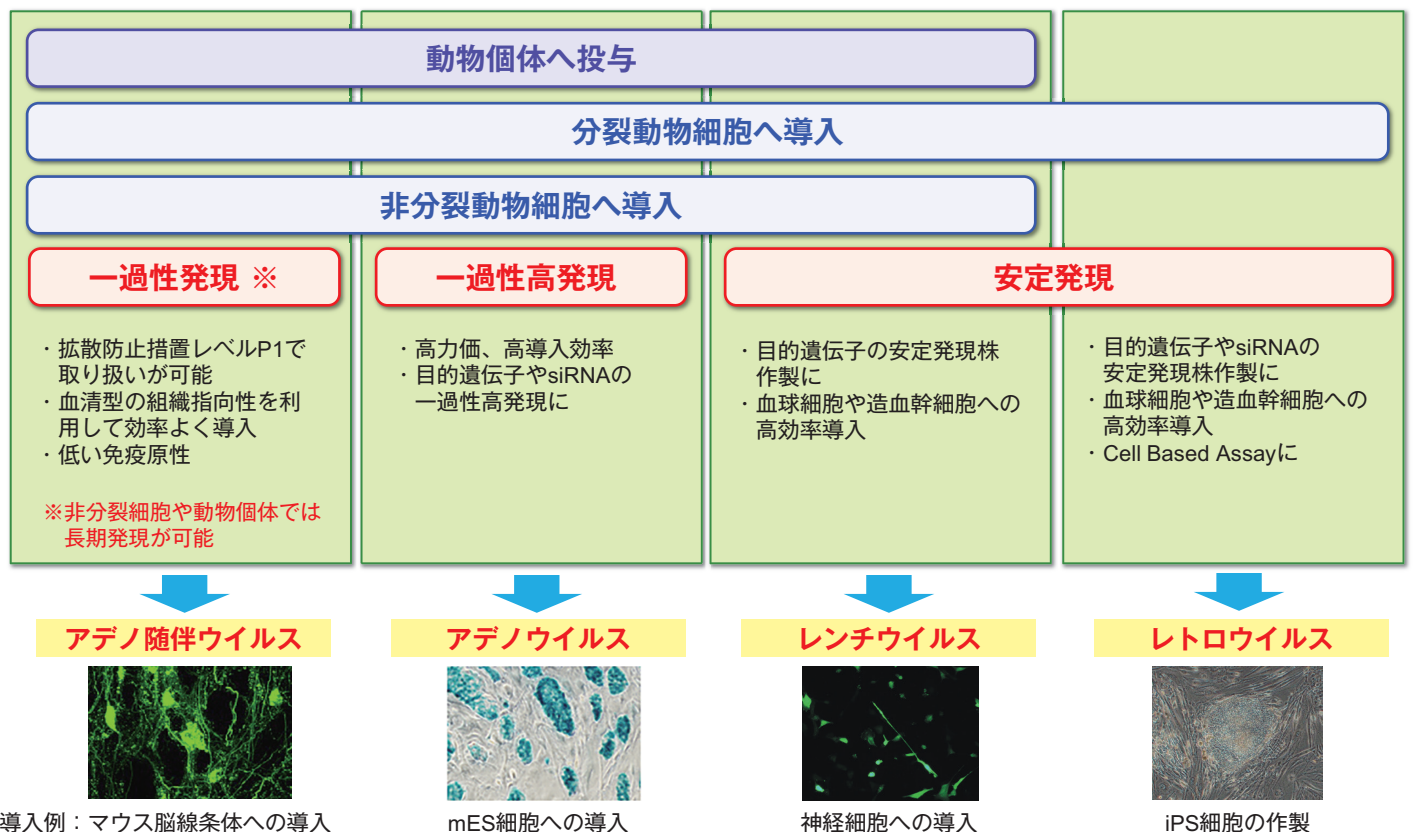
■ ベクターとして用いられる主なウイルスの特徴

		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10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。



導入例：マウス脳線条体への導入

mES細胞への導入

神経細胞への導入

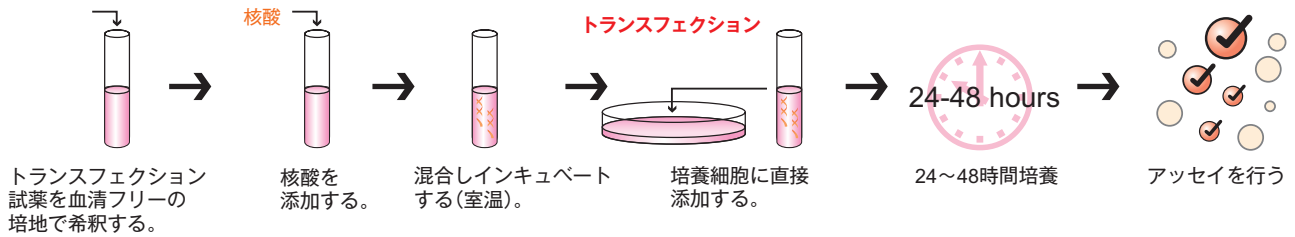
iPS細胞の作製

トランスフェクション

★ 試薬の無料サンプルご提供中

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



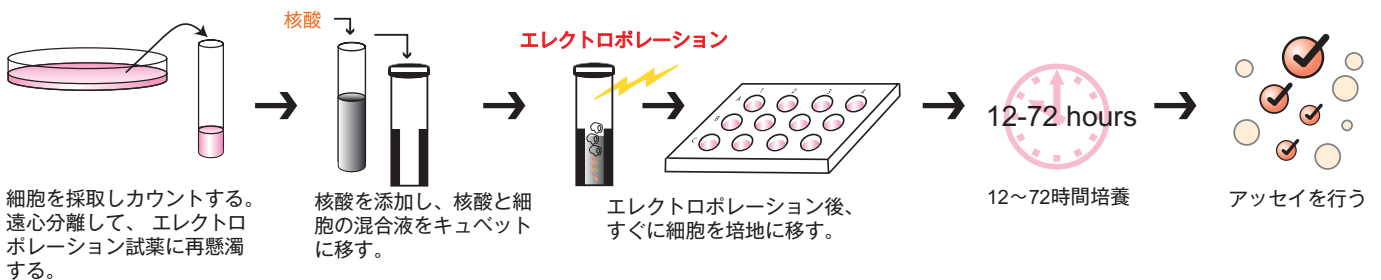
製品名	容量	製品コード	価格(税別)
TransIT-X2® Dynamic Delivery System	0.3 ml (6 wellプレート使用で40回分)	MIR6003	¥21,000
Xfect™ Transfection Reagent	50回×2 (6 wellプレート使用の場合)	631317	¥28,800

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	¥64,000
Ingenio® Electroporation Kit with 0.4 cm cuvettes	50回	MIR50116	¥64,000
Ingenio® Electroporation Solution	50回	MIR50114	¥40,000

※Ingenio Electroporation Kit は、Lonza社(amaxa Nucleofector Device)、Bio-Rad社(Gene Pulser Xcell Electroporator)、BTX社、Eppendorf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 社)』

実験目的別に、標的細胞に最適な試薬がぱっとわかる表を掲載！
無料サンプルお申込みフォームともリンクしています。



『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。

Mirus

Search Reagent Agent®
The Mirus Transfection Database

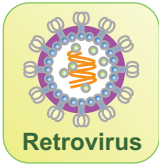
Enter Cell Type:

Select Nucleic Acid:

Show Recommendations

※ TransIT、IngenioはMirus Bio社の製品です。

★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。

操作方法的概要

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。



2. ウイルスのパッケージング

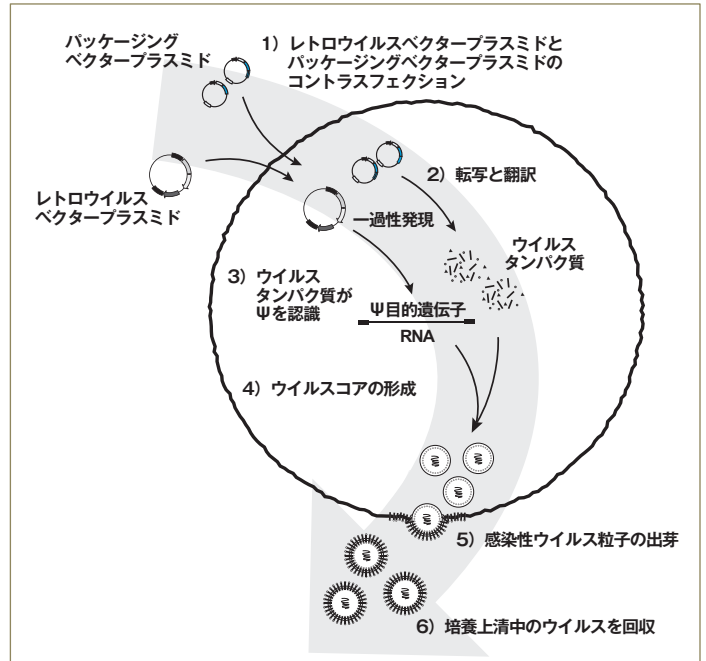
293T細胞等に目的遺伝子を搭載したレトロウイルスベクタープラスミドとpGP vector (*gag*および*pol*遺伝子を搭載)、pE vector (VSV-G / Ecotropic / Amphotropic等エンベローブをコードする*env*遺伝子を搭載)をコトランスフェクションすることで、48時間後には一過性の組換えレトロウイルスを得ることができます。また、パッケージング遺伝子の一部あるいは全てがゲノム中に組み込まれたパッケージング細胞(製品コード 631510等)を用いる方法もあります。

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、エンベローブ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. レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

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。

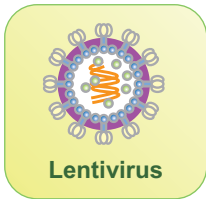
また、**RetroNectin**を用いることにより、物理的・化学的手法では導入が困難な造血幹細胞等への遺伝子導入が可能となります(10ページのコラム参照)。

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 DNA	20 μ g	3658	¥57,000
	pDON-5 Neo DNA	20 μ g	3657	¥57,000
組み合わせパッケージングに使用し、効率よく組換えウイルスを調製	Retrovirus Packaging Kit Eco ※	10回	6160	¥57,000
	レトロウイルス調製細胞 G3T-hi細胞	2×10^6 cells/vial	6163	¥68,000
ウイルス力価の測定	Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR)	100回	6166	¥47,000
標的細胞への遺伝子導入促進	RetroNectin ®	0.5 mg (0.5 ml)	T100A	¥28,000
遺伝子導入効率の向上	Ecotropic Receptor Booster ※	20回	631471	¥42,200

※ Amphotropicに対応した製品もラインナップしています。

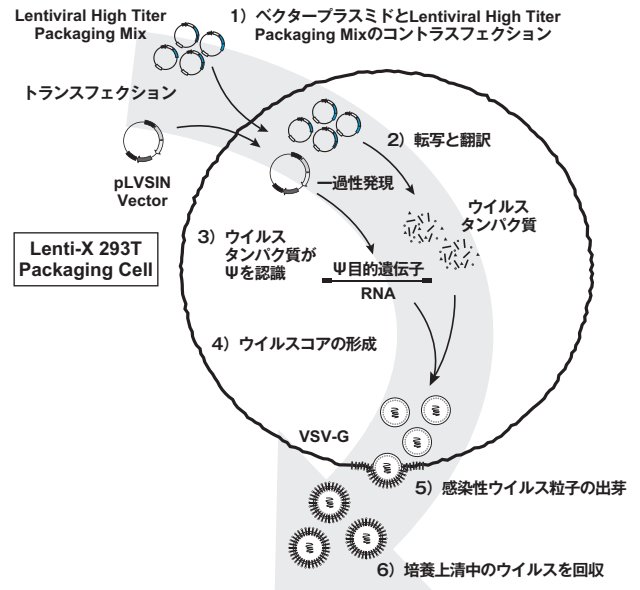
★レンチウイルスベクターの特徴と使用上の留意点



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り扱いが可能**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に、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pLV SIN 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。

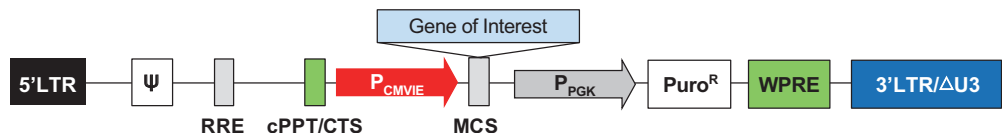
2. ウイルスのパッケージング

目的遺伝子を挿入し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 293 Cell Line**などのパッケージング細胞にコントラフエクションします。

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、ウイルススコアが形成されます。次に、このウイルス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(上図。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。

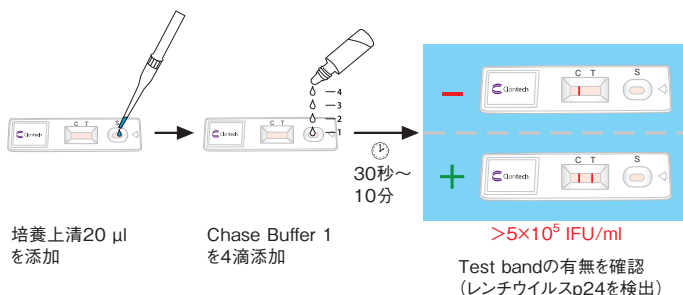
pLV SIN Vectorの構造



- 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。

3. ウイルス粒子の回収

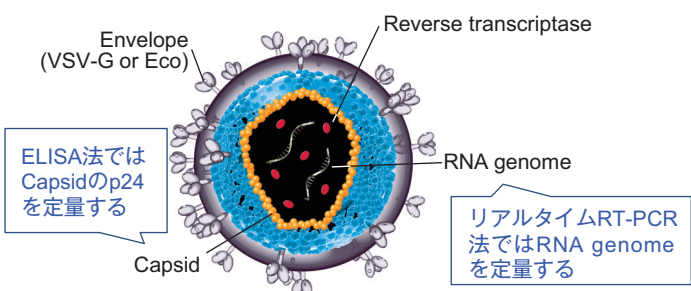
パッケージング細胞にコトランスフェクションしてから48時間後に培養上清を回収し、0.45 μmフィルターでろ過してウイルス粒子を回収します。十分なタイター(5×10⁵ IFU/ml)が得られる培養上清回収のタイミングは、**Lenti-X GoStix**を用いた簡易的な力価測定により確認することができます。**Lenti-X GoStix**では、ウイルス上清20 μlとChase BufferをGoStixに加えるだけでTest Bandの有無により最短30秒(～10分)で力価測定が可能です。



4. ウイルスベクターの力価測定

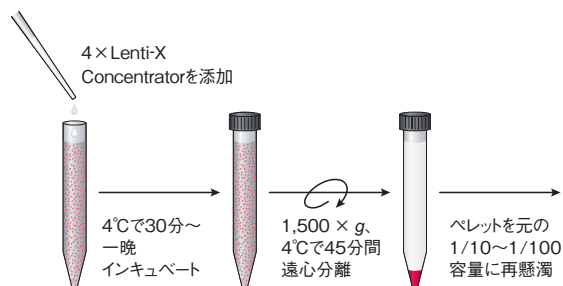
最適な多重感染度(MOI)を調べて再現性のある遺伝子導入結果を得るために、回収したウイルスの力価を正確に算出します。レンチウイルスベクターの力価測定方法として、リアルタイムRT-PCRやELISA法により測定したウイルスのゲノムRNA量やタンパク質量からウイルス粒子数を算出する方法と、蛍光タンパク質や薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子により評価した遺伝子導入効率による方法(生物学的タイター)の大きく2種類が挙げられます。

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濃縮

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(10ページのコラム参照)。

概要	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	pLV SIN-CMV Neo Vector ※	20 μg	6181	¥61,000	
レンチウイルスパッケージング試薬	Lentiviral High Titer Packaging Mix	60回	6194	¥174,000	
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	¥140,000	*
パッケージング用細胞株	Lenti-X™ 293T Cell Line	1 ml	632180	¥65,900	
トランスフェクション試薬	TransIT®-293 Transfection Reagent	0.4 ml	MIR2704	¥36,000	
簡易力価測定	Lenti-X™ GoStix™	20回	631243	¥36,100	
qRT-PCR法による力価測定	Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit	200回	631235	¥108,200	
ELISA法による力価測定	Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit	96回	632200	¥85,500	
レンチウイルスベクターの濃縮	Lenti-X™ Concentrator	100 ml	631231	¥34,000	
標的細胞への遺伝子導入促進	RetroNectin®	0.5 mg (0.5 ml)	T100A	¥28,000	

※ 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ご確認ください。

★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】

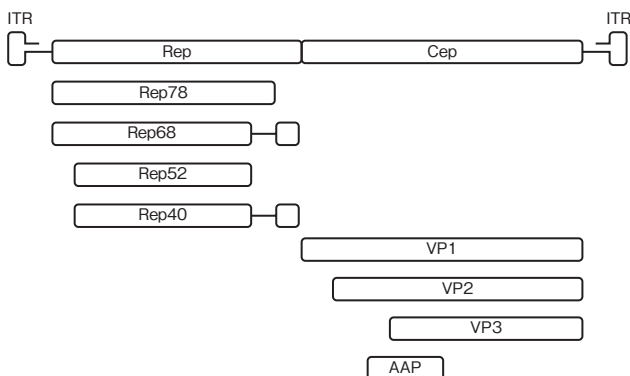
Miyake K, Miyake N, Yamazaki Y, Shimada T, Hirai Y. Serotype-independent method of recombinant adeno-associated virus (AAV) vector production and purification. : *J Nippon Med Sch.* 2012;**79**(6):394-402.

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。

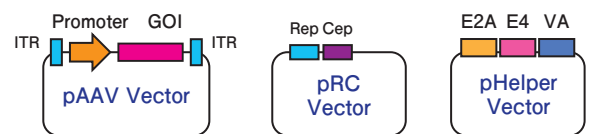
■ AAVpro® Helper Free SystemによるAAVベクターの作製

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 HD Cloning Kit(製品コード 639648)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、精製pAAV Vector、本キットのpRC VectorおよびpHelper Vectorを細胞へコ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-293 Transfection Reagent**を使用する場合は以下の通りです。

- ① **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 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 Opti-MEM	1,500 µl
Total	1,515 µl

- ③ ②に45 µlのTransIT-293 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。
 ⑤ トランスフェクションから6時間後~翌日に、新しい2% FBS含有DMEMで培地を全量交換する。

3. ウィルス粒子の回収

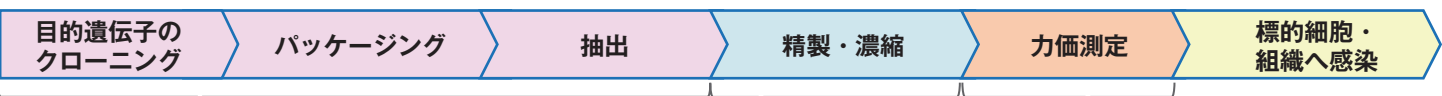
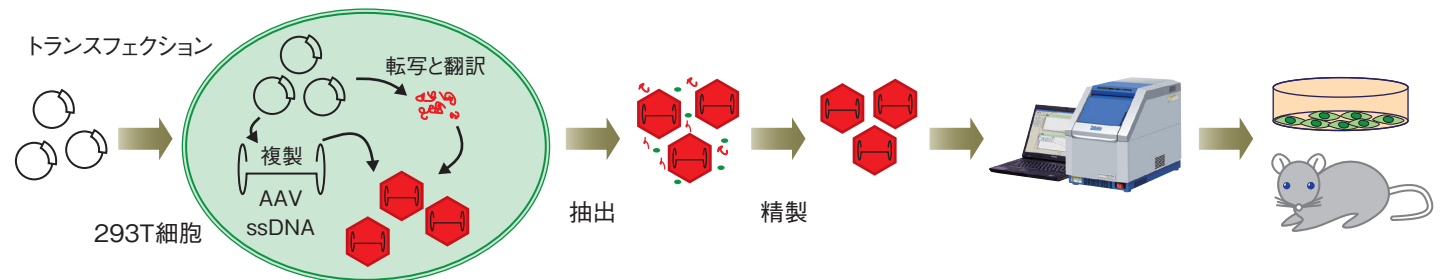
AAVベクター産生細胞の回収(トランスフェクションから2~3日後)

- ① 0.5 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。

AAVベクター作製の実験フローと対応製品



AAVpro® Helper Free System (AAV1 / AAV2 / AAV5 / AAV6)

AAVpro® Purification Kit (All Serotypes / AAV2)

AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2

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	¥150,000
様々な血清型のAAVベクター精製に	AAVpro® Purification Kit (All Serotypes)	4回	6666	¥120,000
AAV2ベクターの高純度精製	AAVpro® Purification Kit (AAV2)	2回	6232	¥98,000
AAVベクターの力価測定	AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2	100回	6233	¥75,000

【関連製品】

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®-293 Transfection Reagent	0.4 ml	MIR2704	¥36,000
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	¥150,000
	AAVpro® Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase)	1 Kit	6652	¥150,000
	AAVpro® Helper Free System (AAV2-2xU6)	1 Kit	6661	¥150,000
	AAVpro® Helper Free System (AAV2-U6-ZsGreen1) ラ 営	1 Kit	6658	¥150,000
AAV産生に最適化した293T細胞	AAVpro® 293T Cell Line NEW	1 ml	632273	¥65,900

※AAV1 NEW、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。

ラ ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。 営 営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。

- 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。
 ② 0.5 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。
 ⑤ 2,000~14,000×g、4℃で10分間遠心する。
 ⑥ 上清を新しいチューブに回収する。
 ⑦ 50 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℃で保存可能

4. ウィ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。



5. ウィルスベクターの力価測定

ウィ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。

★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。

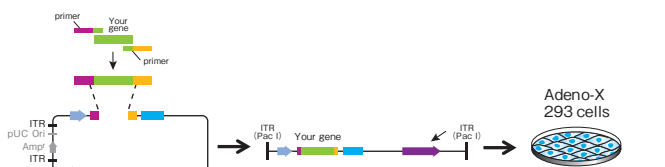
※CARの発現レベルが低い血球細胞では感染が起こりにくい傾向があります。

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。



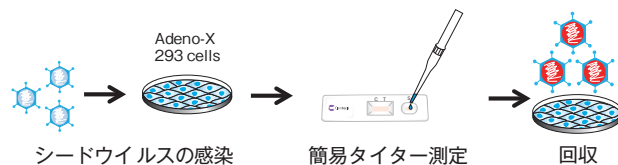
アデノウイルスベクターに目的遺伝子(~6.4 kb)をIn-Fusion Cloning

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

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タイトー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砕法によって高力価ウイルスベクターを回収します。

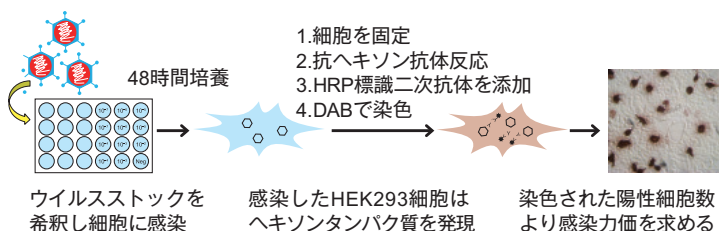


5. ウイルスベクターの精製

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。



ウイルスストックを希釈し細胞に感染

感染したHEK293細胞はヘキソンタンパク質を発現

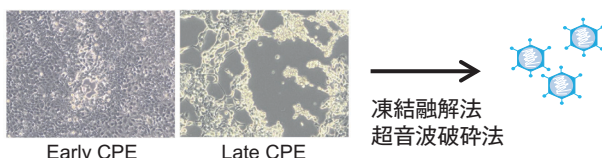
染色された陽性細胞数より感染力価を求め

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ですが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砕によってシードウイルス粒子を取り出します(下図)。



凍結融解法
超音波破砕法

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。

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	¥177,200
パッケージング用細胞株	Adeno-X™ 293 Cell Line	1 ml	632271	¥65,900
簡易力価測定	Adeno-X™ GoStix™	20回	632270	¥43,300
アデノウイルスベクター精製	Adeno-X™ Maxi Purification Kit	2回	631532	¥88,600
免疫測定法による力価測定	Adeno-X™ Rapid Titer Kit	120回	632250	¥103,000
qRT-PCR法による力価測定	Adeno-X™ qPCR Titration Kit	200回	632252	¥81,400

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。

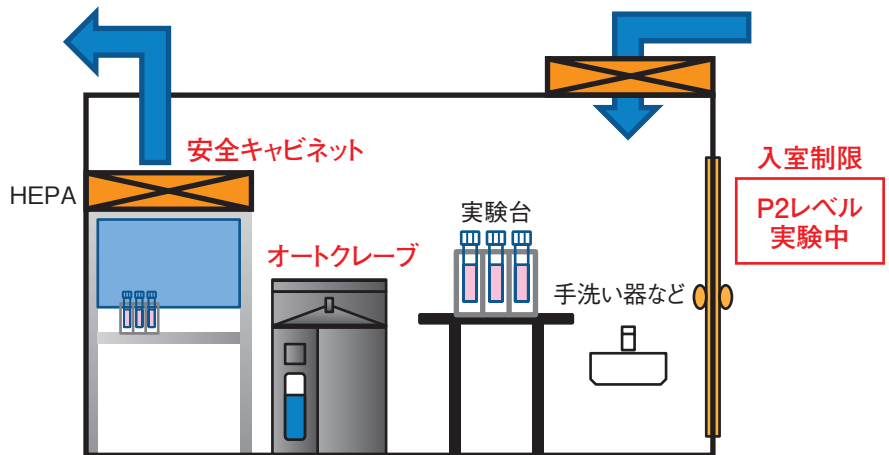
文部科学省の定める省令(「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」平成16年文部科学省・環境省令第1号)に記載されているP2レベルの施設とは、大腸菌の組換え体などを取扱い可能なP1レベルの実験施設に加え、実験室内に安全キャビネットがあること、実験室のある建物内にオートクレーブがあること、実験室入り口に「P2」レベルの施設であることを明記した表示(入室制限)があることが必要です。

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。

知ってて良かった！この逸品

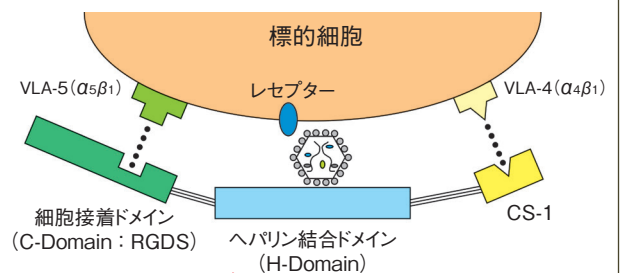
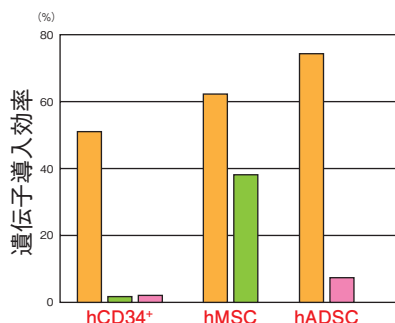
RetroNectin® (製品コード T100A/B)

- ✓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。

★ RetroNectinの製品情報については次ページをご覧ください。

【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
トランスフェクション試薬					
Xfect™ mESC Transfection Reagent	マウスES細胞に最適化	50回×2	631320	¥36,100	
CalPhos™ Mammalian Transfection Kit	哺乳類細胞用(リン酸カルシウム法)	1 Set	631312	¥48,400	
TransIT-PRO® Transfection Kit	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	1 ml	MIR5700	¥61,000	
レトロウイルスベクター関連					
Retro-X™ Universal Packaging System	標的細胞に適したエンベロープタンパク質を 選択可能なレトロウイルス作製システム	1 Set	631530	¥165,800	
Retro-X™ Tet-One™ Inducible Expression System	レトロウイルスベクター型Tetシステム	1 Kit	634304	¥288,400	 
Knockout™ Tet RNAi System H	レトロウイルスベクター型Tet誘導性shRNA 発現システム	1 Kit	630925	¥183,300	 
Retro-X™ Concentrator	レトロウイルスベクターの濃縮	100 ml	631455	¥34,000	
Retro-X™ qRT-PCR Titration Kit	レトロウイルスベクターのRNAタイターを測定	200回	631453	¥108,200	
pMEI-5 DNA	レトロウイルスベクタープラスミド(高発現)	20 µg	3656	¥57,000	
Retrovirus Constructive System Eco	ウイルス調製から遺伝子導入までトータルに サポートするシステム	1 Set	6164	¥136,000	
レトロネクチン					
RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment)	溶液品(ろ過滅菌処理済)	0.5 mg (0.5 ml) 2.5 mg (2.5 ml)	T100A T100B	¥28,000 ¥113,000	
RetroNectin® Dish	あらかじめRetroNectinがコートされた培養用 35 mmディッシュ	10 dishes	T110A	¥57,000	
レンチウイルスベクター関連					
Lenti-X™ HTX Ecotropic Packaging System	エコトロピック(gp70)のレンチウイルスベクター 作製システム	20回	631251	¥150,400	*
Lenti-X™ Maxi Purification Kit	培養上清からレンチウイルスベクターを精製	2回	631233	¥44,300	
Ecotropic Receptor Booster	細胞表面に一過的にmCAT-1受容体を導入し エコトロピックウイルスの形質導入を可能に	20回	631471	¥42,200	
アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター関連					
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	
AAVpro® Tet-One™ Inducible Expression System (AAV2)	AAVベクター型のTetシステム	1 Kit	634310	¥160,000	 
pAAV-ZsGreen1 Vector	蛍光タンパク質発現AAVベクター作製に	20 µg	6231	¥105,000	 
アデノウイルスベクター関連					
Adeno-X™ Adenoviral System 3 (Universal)	任意プロモーターおよびpolyAシグナルの使用 に適したアデノウイルスベクターシステム	1 Set	632266	¥177,200	
クローニング用試薬とPCR酵素					
In-Fusion® HD Cloning Kit	簡単・便利なディレクショナルクローニング	10回	639648	¥23,000	
DNA Ligation Kit <Mighty Mix>	高いライゲーション効率を実現する1液タイプ のライゲーションキット	1 Kit	6023	¥27,000	
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	

 ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。

 営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。

* 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ご確認ください。

- ・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た社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。
- ・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。
- ・本パンフレット記載の価格は2015年11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

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

TaKaRa テクニカルサポートライン
TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <http://www.takara-bio.co.jp>
Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店