

組換えレンチウイルスを用いる遺伝子発現システム Lentivirus Expression System

- 初代培養細胞、幹細胞、神経細胞、非分裂細胞などを含む
ほぼすべての哺乳類細胞へ遺伝子導入が可能
- 長期にわたる安定した遺伝子発現を実現

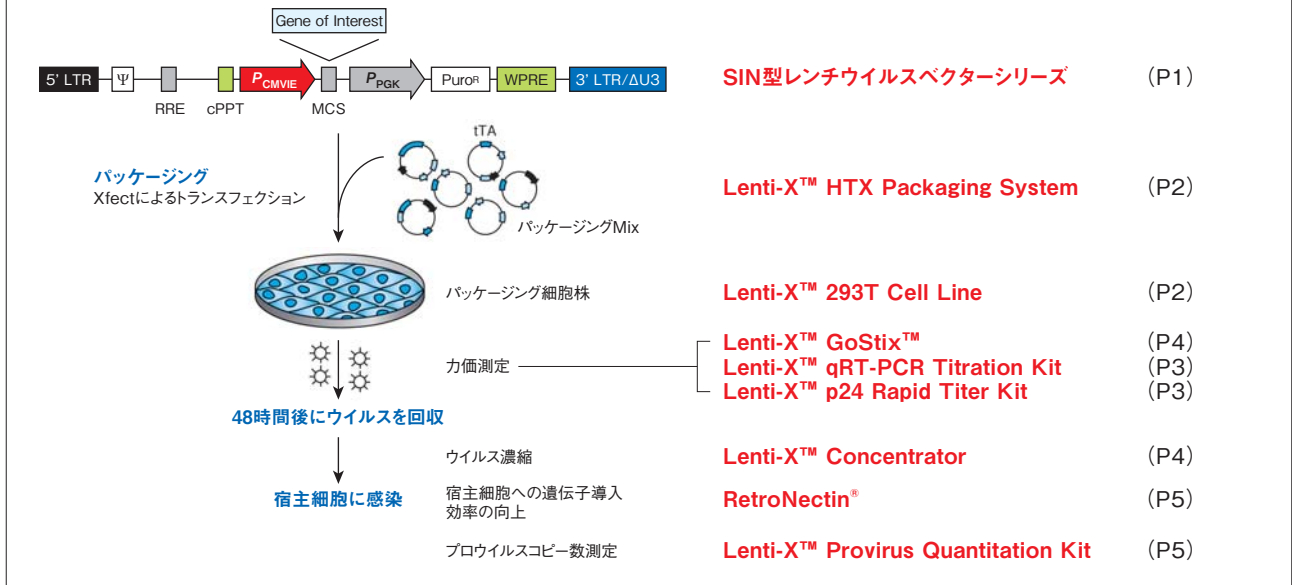


レンチウイルス発現系の特長と各種製品の概要



組換えレンチウイルスは、初代培養細胞、幹細胞、神経細胞、非分裂細胞などを含むほぼすべての哺乳類細胞に遺伝子導入を実現する強力な多用途ベクターです。pLVSINレンチウイルスベクタープラスミドとLenti-X™ HTX Packaging SystemのパッケージングMixを、Xfect™ Transfection Reagentを用いてLenti-X™ 293T細胞株に効率よくコトランスフェクションすることで、48時間後には高力価の組換えレンチウイルス上清が得られます。

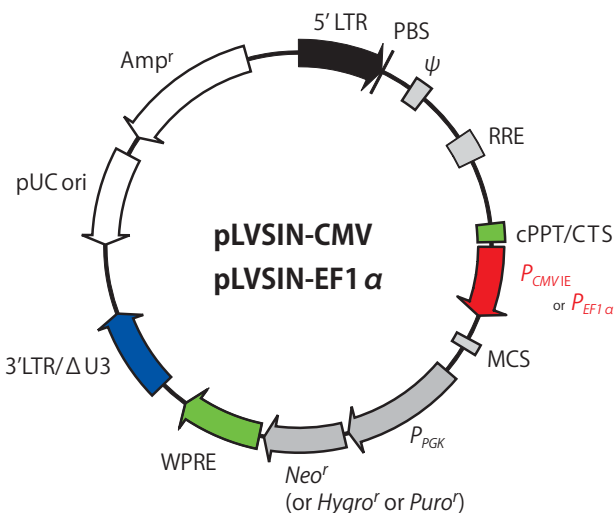
組換えレンチウイルス作製の流れ



SIN型レンチウイルスベクターシリーズ

製品ラインナップは最終ページでご確認ください。

- 初代培養細胞、非分裂細胞を含むほぼすべての哺乳類細胞に遺伝子導入可能な組換えレンチウイルスを作製
- SIN型 (自己不活性型) のレンチウイルスベクタープラスミド
- EF1αプロモーター搭載ベクター、蛍光タンパク質搭載ベクターもラインナップ



WPRE配列: mRNAを安定化する
cPPT配列: ウイルスゲノムの核移行や宿主染色体への組換え効率を高める

本製品とクローンテックのLenti-X™ HTX Packaging Systemを組み合わせることで、 $10^5 \sim 10^6$ 感染単位 (IFU) / mlの組換えレンチウイルス上清を安定に得ることができます。

目的タンパク質との融合発現に適したAcGFP1やレポーター発現に適したZsGreen1といった緑色蛍光タンパク質を搭載したpLVSIN Fluorescent Vector (製品コード 6187~6192)もラインナップしています。

■ 搭載プロモーターの特長

プロモーター	特長
CMV	導入した遺伝子を構造的に安定発現する
EF1α	他のプロモーター (CMVプロモーター等) で発現レベルが低い場合や、胚性幹細胞のようにプロモーターがサイレンシングを受ける場合に有用である

※PGKプロモーターの下流には薬剤耐性遺伝子 (ネオマイシン耐性、ハイグロマイシン耐性、またはピューロマイシン耐性) が搭載されており、安定発現株の選択に利用できます。

■ 搭載蛍光タンパク質の特長

蛍光タンパク質	特長
AcGFP1 (単量体)	目的タンパク質との融合発現に適している
ZsGreen1 (四量体)	遺伝子導入効率のモニタリングなどレポーター発現に適している (IRES配列により、目的遺伝子とは独立して翻訳される)

レンチウイルスパッケージングシステム

Lenti-X™ HTX Packaging System (製品コード 631247/631249/631251)

- 高力価を実現するレンチウイルスパッケージングシステム
- パントロピック (VSV-G) およびエコトロピック (gp70) の2種類のシステムを用意
- Packaging Mixに加え、遺伝子導入試薬、専用FBS、ウイルス力価の簡易測定試薬を含んだセット

Lenti-X™ HTX Packaging Mixには、レンチウイルス産生に必要なすべての遺伝子を搭載した複数のプラスミドDNAが、最大のウイルス産生を実現するよう理想的な比率で含まれています。また、これら複数のプラスミドDNAにウイルス遺伝子を分断化して搭載することで、複製可能なウイルスの産生を効果的に抑制しています。

なお、システムには簡易版のレンチウイルス力価判定試薬Lenti-X™ GoStix™ が3テスト分含まれており、ウイルス回収の最適なタイミングを迅速に確認することができます。



〈製品内容〉

Lenti-X™ HTX Packaging System (製品コード 631247/631249)

実質的にすべての細胞種に感染できるパントロピックなエンベロープタンパク質 (VSV-G viral envelope protein) を持つレンチウイルスを産生

- ・Lenti-X HTX Packaging Mix (VSV-G)
- ・Xfect Transfection Reagent
- ・Tet System Approved FBS, US-Sourced (50 ml)
- ・Lenti-X GoStix (3テスト分)

Lenti-X™ HTX Ecotropic Packaging System (製品コード 631251)

マウスやラットの細胞だけに感染できるエコトロピックなエンベロープタンパク質 (MLV ecotropic envelope glycoprotein : gp70) を持つレンチウイルスを産生

- ・Lenti-X HTX Ecotropic Packaging Mix (Ecotropic)
- ・Xfect Transfection Reagent
- ・Tet System Approved FBS, US-Sourced (50 ml)
- ・Lenti-X GoStix (3テスト分)

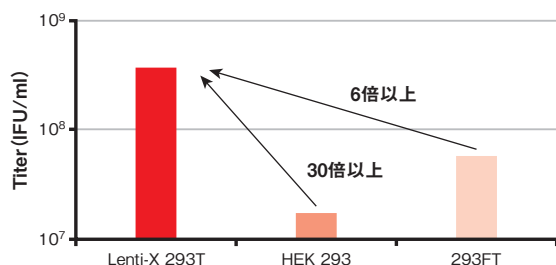
パッケージング用細胞株

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

- 組換えレンチウイルスの高力価産生を可能にするレンチウイルスパッケージング用細胞株

Lenti-X™ 293T細胞株をレンチウイルスのパッケージングに用いることで、高力価のウイルスを産生することができます。

本細胞株は、HEK 293T細胞からSV40 Large T Antigenを高レベルに発現する細胞株を限界希釈法により選別し、さらに高い形質転換能と高いウイルス力価を得ることができる細胞株を単離したものです (他にアデノウイルスE1Aタンパク質を発現します)。



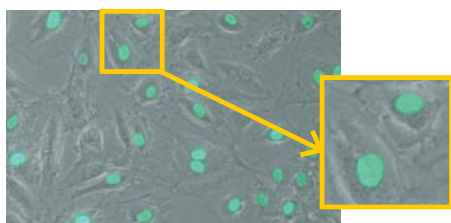
Lenti-X 293T細胞の優れたウイルス産生能

Lenti-X™ HTパッケージングシステムとクローンテックのpLVX-ZsGreen1ベクター*を用いて、3種類のパッケージング細胞から組換えレンチウイルスを含む上清を調製した。各ウイルス液を用いてHT1080細胞への感染を行い、フローサイトメーターで導入効率を測定した。

Lenti-X™ 293T細胞株は、一般的な細胞株と比較して、対293FT細胞比で6倍以上、対野生型HEK 293細胞比で30倍以上の高力価組換えレンチウイルスを得ることができた。

*本製品のご購入には拡散防止措置に関する確認書が必要です。

実施例：HUVEC細胞への遺伝子導入



遺伝子導入48時間後のHUVEC細胞

pLV5IN-AcGFP1-C1 Vectorに核局在タンパク質Cdt1の遺伝子をクローニングし、Lenti-X™ HTX Packaging System、Lenti-X™ 293T細胞株を用いて組換えレンチウイルスを調製 (力価: 3.6 × 10⁹ copeis/ml のRNAタイター)。このレンチウイルス上清150 μlを用いて、ポリブレン法によりHUVEC細胞へ遺伝子導入を行った。

導入から48時間後に蛍光顕微鏡により確認したところ、HUVEC細胞の核の部分に、核局在タンパク質Cdt1と融合発現したAcGFP1の存在が確認できた。(左図は、明視野および蛍光顕微鏡写真を重ねて表示したもの)

力価測定キット(qPCR法)

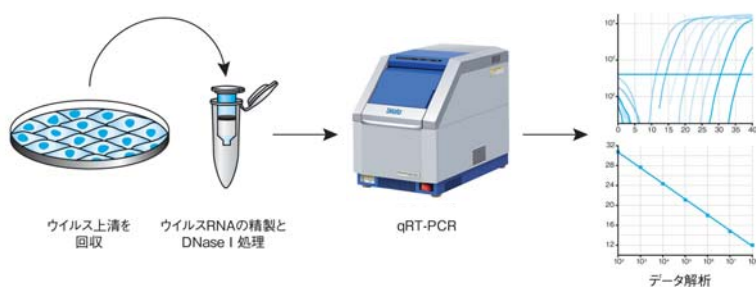
Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit (製品コード 631235 容量 200回)

- わずか4時間で組換えレンチウイルスの力価(RNAタイター)を測定。ウイルス回収を行った同日中に宿主細胞への感染が可能
- 正確なタイターを測定でき、安定した感染実験が可能

Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kitを用いると、組換えレンチウイルスの力価(RNAタイター)をわずか4時間で測定できます。RNAの簡易精製を行った後、One-Step qRT-PCRとSYBR® Green I法を組み合わせ、添付の校正用RNAを用いて作成した検量線からウイルスゲノム量を測定します。

ウイルスストックの生物学的タイター(IFU/ml)を独立した他の方法で決定し、RNAタイター(copies/ml)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。

操作手順



〈製品内容〉

- ・Lenti-X RNA Control Template
- ・Forward and Reverse Titer Primers
- ・DNase I およびDNase I Buffer (10×)
- ・EASY Dilution Buffer for RT-PCR
- ・Quant-X One-Step qRT-PCR SYBR Kit (200回用)
Quant-X Enzyme
Quant-X Buffer (2×)
RT Enzyme Mix
RNase-Free Water
ROX Reference Dye LSR (50×)
ROX Reference Dye LMP (50×)
- ・NucleoSpin RNA Virus (10回用)

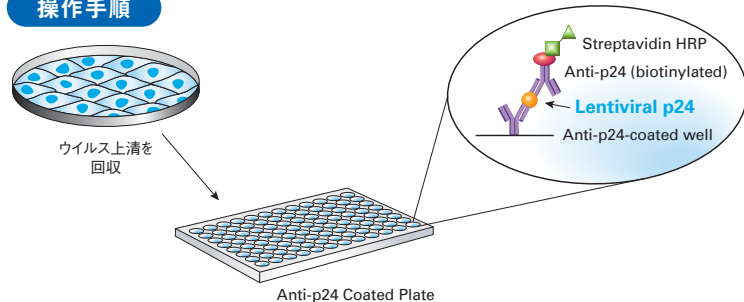
力価測定キット(抗体法)

Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit (製品コード 632200 容量 96回)

- 培養上清中のレンチウイルス力価を測定
- 簡便なELISA法、HRP-発色試薬で測定

組換えレンチウイルスは現在、第3または第4世代が研究用に使用されています。これらはキャプシドタンパク質(p24)、核キャプシドタンパク質(p6とp7)、マトリクスタンパク質(p17)の4つの遺伝子をコードするgag遺伝子を共通に保持しています。Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kitは、ウイルス上清を用いてp24タンパク質量を測定するためのキットです。キャプシド(殻)中に存在するp24タンパク質の濃度は、レンチウイルスの実際のタイターと相関しています。

操作手順



〈製品内容〉

- ・Anti-p24 Coated Plate (96 wells × 1)
- ・p24 Control (10 ng/ml)
- ・Lysis Buffer
- ・Anti-p24 (Biotin Conjugate)
- ・Streptavidin HRP
- ・Wash Buffer (20×)
- ・TMB Substrate
- ・Stop Solution

- ① 上清中の組換えレンチウイルスを添付のバッファーで溶解し、p24タンパク質を含んだサンプルを調製する。
- ② サンプルを96ウェルフォーマット(分割可能な8連ウェル×12、抗p24マウス抗体をコート済み)の各ウェルに加え、p24タンパク質を抗体に結合させる。
- ③ 結合しなかったライゼートを洗い流し、ビオチン化二次抗体とストレプトアビジン-HRP、発色試薬でp24タンパク質の濃度を測定する。

※本キットにはp24タンパク質が陽性コントロールとして含まれており、検量線の作成、サンプルのウイルス濃度の算出に使用できます。

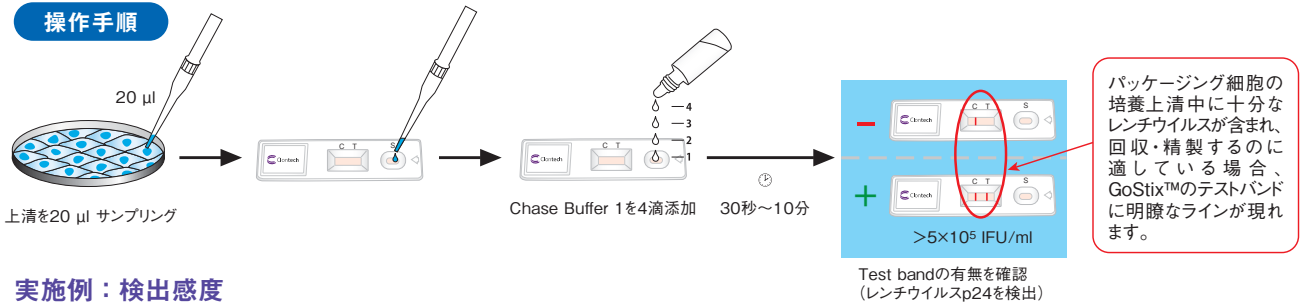
簡易レンチウイルス力価判定試薬

Lenti-X™ GoStix™

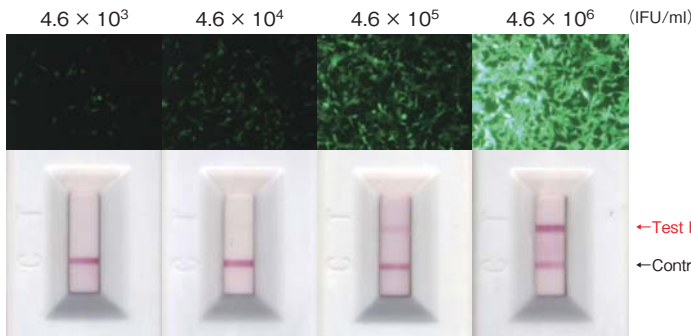
(製品コード 631243/631244/631241 容量 20回/50回/200回)

- レンチウイルス力価をわずか30秒～10分で簡易判定
- ウイルス回収の最適なタイミングを判断

Lenti-X™ GoStix™を用いれば、最短30秒でレンチウイルスの力価を判定できるため、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。組換えレンチウイルス調製操作の成否を簡単に知ることができ、手間やコストを低減できます。



実施例：検出感度



注：ウイルス力価 (IFU/ml) はHT1080細胞に感染させフローサイトメーターで測定

Lenti-X™ HT Packaging System, Lenti-X™ 293T 細胞株、pLVX-ZsGreen1の組み合わせでウイルス調製を行った場合、5×10⁵ IFU/ml以上の力価を検出することができた(約5分後の検出結果)。

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

〈製品内容〉

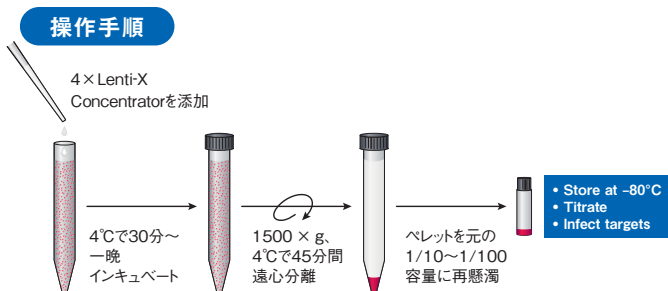
- ・Lenti-X GoStix
- ・Chase Buffer 1
- ・p24 Control

レンチウイルス濃縮試薬

Lenti-X™ Concentrator

(製品コード 631231/631232 容量 100 ml/500 ml)

- 超遠心は不要。レンチウイルス上清と混合して遠心するだけの簡便操作
- 大容量へのスケールアップも簡単

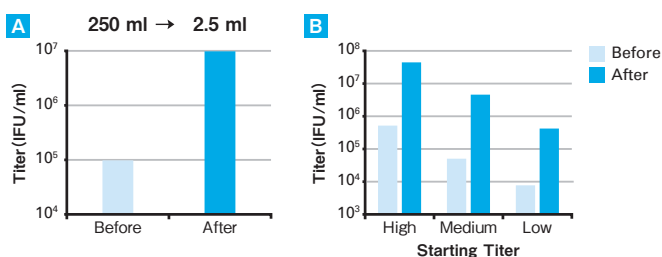


Lenti-X™ Concentratorは超遠心分離を行うことなく、簡便、迅速、しかも高効率にレンチウイルス上清の濃縮を行うことができる試薬です。

プロトコールは極めて簡便で、ウイルス上清に本試薬を混合してインキュベート後、標準的な遠心機を用いて遠心し、上清を除いたペレットを1/10～1/100容量に再懸濁するだけです。

本試薬100 mlでウイルス上清300 mlを処理できます。

実施例：大容量やさまざまな力価のウイルス上清の濃縮



(A) レンチウイルス上清を250 mlに希釈し、本試薬を用いて2.5 mlに濃縮した。

(B) 10倍ずつ連続希釈した高力価レンチウイルス上清各10 mlを、本試薬を用いて100 µlに濃縮した。

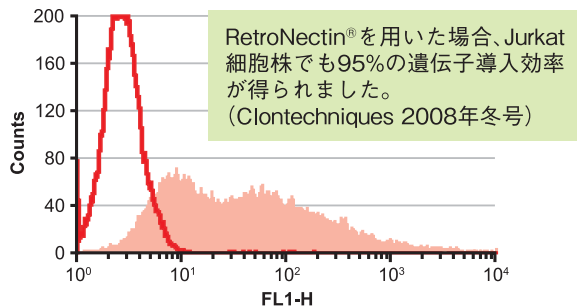
ウイルス力価は、ZsGreen1発現レンチウイルスをHT1080細胞株に感染させ、フローサイトメーターにより求めた。

どちらの実験からも、効率よく濃縮されたことが確認できた。

組換えレンチウイルスの感染効率の向上に

RetroNectin[®] (製品コード T100A/B 容量 0.5 ml/2.5 ml)

- 組換えレンチウイルス、組換えレトロウイルスを介する遺伝子導入の効率を効果的にアップ
- 血球系細胞や造血幹細胞への遺伝子導入に特に有用



RetroNectin[®]は、ヒトフィブロネクチンの3種類の機能性ドメインを含む組換えタンパク質です。組換えレンチウイルスまたは組換えレトロウイルスを介した哺乳類細胞への遺伝子導入時に、本試薬をコートした培養プレートを用いることで、遺伝子導入効率を大きく高めることができます。

プロウイルスコピー数測定キット

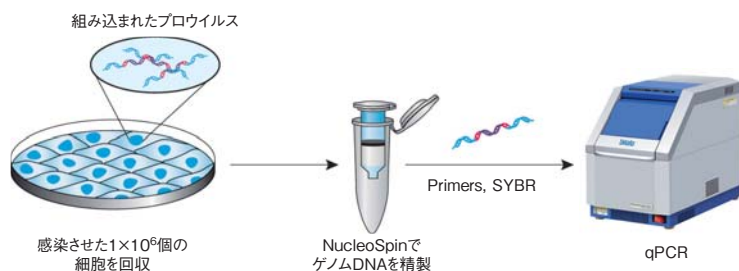
Lenti-X[™] Provirus Quantitation Kit (製品コード 631239 容量 200回)

- プロウイルスコピー数を正確に求めることで、ウイルスストックの実際のタイターを測定
- 細胞種、実験操作、ウイルス調製操作間で感染力価の校正が可能

本製品は、組換えレンチウイルスを感染させた細胞のゲノムDNA中に組み込まれたレンチウイルス(Provirus: プロウイルス)のコピー数を迅速に測定するためのキットです。本キットにはプロウイルスコピー数測定用のプライマーのほか、ゲノムDNA精製キット、検量線作成用コントロールDNA、およびSYBR[®] Green I検出リアルタイムPCR用試薬(200回用)が含まれています。

プロウイルスコピー数を正確に求めることで、ウイルスストックの実際に有効なタイターを知ることができ、正確なMOI(感染多重度)でのターゲット細胞への感染が可能となり、ゲノムDNAにどの程度のウイルスが組み込まれるかをあらかじめ予想することもできます。

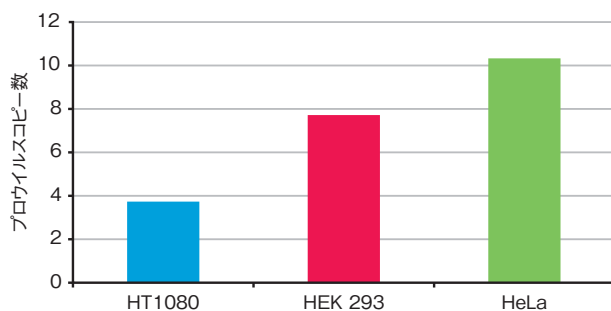
操作手順



(製品内容)

- ・Lenti-X Provirus Quantitation Components
 - ・Lenti-X Provirus Control Template (5 × 10⁵ copies/μl)
 - ・Lenti-X Provirus Forward Primer
 - ・Lenti-X Provirus Reverse Primer
 - ・EASY Dilution Buffer
- ・NucleoSpin Tissue (10回)
- ・SYBR Advantage qPCR Premix

実施例: 同量のウイルスを感染した時の細胞種によるプロウイルスコピー数の違い



等量(100 μl)のレンチウイルス上清を用いてHT1080、HeLa、HEK 293の各細胞に感染を行った。1週間後、安定形質導入クローンのゲノム中のプロウイルスコピー数を本製品を用いて解析した。

各細胞種には異なるコピー数のプロウイルスが組み込まれていたことが確認できた。

組換えウイルス発現系の比較

タカラバイオでは本パンフレットでご紹介した組換えレンチウイルス発現システムのほか、組換えレトロウイルス、組換えアデノウイルスを用いた発現システム各種を取り揃えており、研究者の皆様の実験目的にあわせて、最適なシステムを選択していただくことができます。

これらの遺伝子発現システムを用いれば、実質的にはほぼすべての哺乳類細胞で目的遺伝子の導入と発現が可能になります。

〈組換えウイルス発現系の比較〉

	レンチウイルス発現系	レトロウイルス発現系	アデノウイルス発現系
感染可能な標的細胞			
株化細胞(分裂細胞)	○	○	○
初代培養細胞(分裂細胞)	○	○	○
初代培養細胞(非分裂細胞)	○		○
神経細胞	○		○
幹細胞	○	○	○
血球系細胞	○ (RetroNectinとの併用を推奨)	○ (RetroNectinとの併用を推奨)	
<i>in vivo</i> への適用	○		○
導入遺伝子の発現			
安定発現	○	○	(※1)
一過性発現	△	△	○
Tet発現誘導システム	○	○	○
shRNA/RNAi	(※2)	○	○
バイストロニック・デュアル発現	(※2)	○	
蛍光タンパク質を融合発現	○	○	
発現系の特長			
高いタイターを実現	○	○	◎
高発現を実現	○	○	◎
安全性が高い	○	○	○
宿主指向性が広い	○	○	○
RetroNectin®の併用で感染効率アップ	○	○	
ウイルスベクターの長期安定性			○
関連製品			
力価測定キット	○	○	○
精製キット	○		○
濃縮試薬	○	○	

※1：非分裂細胞では安定発現

※2：クロンテックのLenti-Xシリーズにはこれらのベクターも揃っているが、拡散防止措置に関する確認書が必要である。

各ウイルス発現システムの製品ラインナップおよび詳細については、弊社ウェブカタログをご確認ください。

また、それぞれを紹介したパンフレットを発行しています。

各パンフレットも弊社ウェブサイトからご請求いただけます。

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



製品リスト

製品名	容量	製品コード	価格(税別)	
SIN型レンチウイルスベクター				
pLVSIN-CMV Neo Vector	各20 µg	6181	¥56,000	
pLVSIN-CMV Hyg Vector		6182	¥56,000	
pLVSIN-CMV Pur Vector		6183	¥56,000	
pLVSIN-EF1α Neo Vector		6184	¥56,000	
pLVSIN-EF1α Hyg Vector		6185	¥56,000	
pLVSIN-EF1α Pur Vector		6186	¥56,000	
蛍光タンパク質搭載SIN型レンチウイルスベクター				
pLVSIN-AcGFP1-N1 Vector	各20 µg	6187	¥92,000	
pLVSIN-AcGFP1-C1 Vector		6188	¥92,000	
pLVSIN-EF1α-AcGFP1-N1 Vector		6189	¥92,000	
pLVSIN-EF1α-AcGFP1-C1 Vector		6190	¥92,000	
pLVSIN-IRES-ZsGreen1 Vector		6191	¥92,000	
pLVSIN-EF1α-IRES-ZsGreen1 Vector		6192	¥92,000	
レンチウイルスパッケージングシステム				
Lenti-X™ HTX Packaging System	20回	631247	¥133,000	
	60回	631249	¥272,000	
Lenti-X™ HTX Ecotropic Packaging System	20回	631251	¥133,000	
レンチウイルスパッケージング用細胞株				
Lenti-X™ 293T Cell Line	1 ml	632180	¥65,000	
組換えレンチウイルス濃縮試薬				
Lenti-X™ Concentrator	100 ml	631231	¥30,000	
	500 ml	631232	¥110,000	
宿主細胞への遺伝子導入を促進				
RetroNectin®	0.5 ml (0.5 mg)	T100A	¥26,000	
	2.5 ml (2.5 mg)	T100B	¥103,000	
Lenti-X™ Accelerator Starter Kit	1 Kit	631254	¥124,000	
Magnetic Separator for Cell Culture	1 Set	631255	¥93,000	
Lenti-X™ Accelerator	400 µl	631256	¥54,000	
	1000 µl	631257	¥108,000	
組換えレンチウイルス精製キット				
Lenti-X™ Maxi Purification Kit	2回	631233	¥39,000	
	5回	631234	¥75,000	
Lenti-X™ Maxi Purification Kit (with Rack)	5回	631245	¥81,000	
Collection Rack L	1個	631246	¥12,000	
組換えレンチウイルスカパ測定キット				
Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit	200回	631235	¥95,000	
Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit	96回	632200	¥75,000	
Lenti-X™ GoStix™	20回	631243	¥32,000	
	50回	631244	¥69,000	
	200回	631241	¥223,000	
プロウイルスコピー数測定キット				
Lenti-X™ Provirus Quantitation Kit	200回	631239	¥72,000	

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。

Living Colors Fluorescent Protein Productsやその他のライセンス(最新のライセンス情報)に関しては弊社ウェブサイトにてご確認ください。

本パンフレットに記載されている商品名等は、特に記載はなくても各社の商標、または登録商標です。

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。

・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

・本パンフレット記載の価格は2011年9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。

販売元

タカラバイオ株式会社

製造元

Clontech

東日本販売課 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

西日本販売課 TEL 077-543-7297 FAX 077-543-7293

TaKaRa テクニカルサポートライン

製品の技術的なご質問に専門の係がお応えします。

TEL 077-543-6116 FAX 077-543-1977

クローンテックウェブサイト <http://clontech.takara-bio.co.jp>

タカラバイオウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

取扱店