

## Product Information

## MISSION™ Lentiviral Packaging Mix

製品番号 SHP001

保存温度 -20 °C

## TECHNICAL BULLETIN (使用説明書)

## 製品概要

MISSION Lentiviral Packaging Mix は HIV パッケージング遺伝子と異種ウイルスエンベロープ遺伝子を発現する 2 つのプラスミドの混合液です。

MISSION レンチウイルス粒子は 3 つの主要なコンポーネントからなります。

1. パッケージングベクターにはウイルス粒子構造タンパクおよびパッケージング機能に必要なレンチウイルス遺伝子の最小セットが含まれます。
2. 水疱性口内炎ウイルス G-タンパク (pCMV-VSV-G) エンベロープベクターは pseudo-typing のための異種エンベロープを提供します。
3. shRNA トランスファーベクターは目的のシーケンスならびに RNA 産生とパッケージングに必要な cis 作動配列を含んでいます。

Lentiviral Packaging Mix にはこれらのうち前 2 者のコンポーネントが含まれており、レンチウイルスのトランスファーベクターとともにコトランスフェクションされるようにデザインされ、その後の形質導入アプリケーションに使用する高力価なシュードタイプのレンチウイルス粒子を産生します。

MISSION shRNA 製品ラインは、Lentiviral Packaging Mix とあわせて利用できるアノテーションされたマウスおよびヒト遺伝子に対する、トランスファーベクターに基づく RNAi ライブラリを主に取扱っています。本パッケージングシステムにより、VSV-G によるシュードタイプングによりウイルスに関連した親和性の幅が広がります<sup>1</sup>。そのためこれらのレンチウイルス粒子は初代細胞および非分裂細胞などの様々なタイプの細胞に目的のトランスファーシーケンスを効率的に送達できます<sup>2,3</sup>。

粒子は第 3 世代パッケージングシステムを用いて産生され、これはバイオセーフティーを向上させる多くの特徴を持っています<sup>4</sup>。これらの特徴の例を表 1 に示します。

表 1.

## 第 3 世代レンチウイルスパッケージングシステムのバイオセーフティーの特徴

特徴	結果
マルチプラスミド法	単一のプラスミドに、パッケージされたレンチウイルスを産生するのに必要なすべての遺伝子は含まれていません。生成する粒子は複製能力がありません。
3'LTR に存在する U3 領域の欠失によりプロモーターエンハンサー領域の除去	プロモーター干渉問題が回避され、ウイルス複製の可能性がさらに解消されます。
大半のレンチウイルス遺伝子 ( $\Delta$ vpr, vif, vpu, nef) の除去 <sup>5</sup>	shRNA パッケージングシステムに必要な病原性遺伝子が除去されています。

MISSION Lentiviral Packaging Mix とレンチウイルス shRNA トランスファーベクターは、哺乳類の産生細胞株に容易にコトランスフェクトできます。弊社は HEK293T 細胞、ATCC® Number CRL-11268 を推奨しますが、その理由はトランスフェクトが容易で一貫した高力価ウイルス産生が示されているためです<sup>6</sup>。

MISSION Lentiviral Packaging Mix で作製されたリコンビナントレンチウイルスは、安全性の特徴を持つ設計のため、複製能力のあるウイルス粒子を産生することは示されていません。これらのウイルスシステムを用いる際にはユーザーは各施設のガイドラインを参照し遵守してください。

## 試薬

Lentiviral Packaging Mix, 0.25 または 1.7 mL  
製品番号 SHP001

### 本製品以外にご用意いただく試薬および器具

- レンチウイルス用トランスファーベクター
- FuGENE® 6 トランスフェクション試薬、Roche Diagnostics 社
- HEK293T producer cells  
ATCC 番号 CRL-11268
- 無血清 DME 培地
- 10% ウシ胎児血清および 4 mM L-グルタミン添加 DME 培地
- HIV-1 p24 Antigen ELISA Kit、ZeptoMetrix、ZMC 製品番号 0801111

産生細胞株の培養および維持については販売者の説明書に従ってください。トランスフェクション実験には可能な限り継代番号の最も小さい細胞を用いることを推奨します。

### ご使用前の注意と免責事項

弊社の製品は試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。生成されたレンチウイルス形質導入粒子は複製能力がありませんが、これらは**リスクグループレベル 2 (RGL-2)** 生物として扱うことを強く推奨します<sup>7</sup>。取り扱いおよび汚染物廃棄の際は発表されているすべての RGL-2 ガイドラインに従ってください。また、腫瘍抑制遺伝子などの細胞周期制御に関与する shRNA 標的遺伝子を発現するレンチウイルスをパッケージングする際には特にご注意ください。

### 保存安定性

適切に保存した場合、使用期限は配送日から2年です。Lentiviral Packaging Mix は-20 °Cで保存してください。凍結解凍サイクルを何回も行わないでください。

### 手順の概要

1日目	2日目	3日目	4日目	5日目
HEK293T 細胞をプレートに播きます。	パッケージングミックスとトランスファーベクターで細胞をトランスフェクトします。	細胞に新鮮な培地を再び与えます。	レンチウイルス粒子の1回目の回収を行います。	レンチウイルス粒子の2回目の回収を行います。 p24 アッセイ

## 手順

### 1日目:

HEK293T 細胞を完全 DME 培地に播き、10%ウシ胎児血清および 4 mM の L-グルタミンを、トランスフェクションの 24 時間前に添加します。トランスフェクション当日の細胞は 70~80%コンフルエントに達している必要があります。種々のプレート形状に対して推奨される細胞接種密度の概要を表 2 に示します。

表 2.

### 種々の形状に推奨される細胞接種密度

形状	最初にプレートに播く細胞数	最終のウイルス回収体積 (2 回の回収を仮定)
96 ウェルプレート	16,000~20,000 細胞/ウェル	200 µL
60 mm 皿	$5 \times 10^5$ 細胞/皿	8.0 mL
100 mm 皿	$1 \times 10^6$ 細胞/皿	22 mL
T75 フラスコ	$1.8 \times 10^6$ 細胞/フラスコ	30 mL
T225 フラスコ	$5.4 \times 10^6$ 細胞/フラスコ	90 mL

### 2日目:

1. Lentiviral Packaging Mix のバイアルを室温で解凍します。解凍後、氷冷します。

#### 準備する Lentiviral Packaging Mix の量 (µL)

実験に必要な Lentiviral Packaging Mix の量の算出については表 3 をご参照ください。ピペッティングエラーを補うために、用いる形状に基づき過剰量の Lentiviral Packaging Mix を準備します。

2. 滅菌したポリプロピレンチューブに、各トランスフェクション用に算出された量の Lentiviral Packaging Mix を加えます。
3. チューブを氷冷します。

表 3.

### 種々の形状に必要な Lentiviral Packaging Mix の量

形状	Lentiviral Packaging Mix
96 ウェルプレート	1 µL/ウェル
60 mm 皿	10 µL/皿
100 mm 皿	26 µL/皿
T75 フラスコ	34 µL/フラスコ
T225 フラスコ	107 µL/フラスコ

#### 準備するトランスファーベクターの量 (µg)

実験に必要なトランスファーベクターの量の算出については表 4 をご参照ください。ピペッティングエラーを補うために、用いる形状に基づき過剰量のトランスファーベクターを準備します。

- 滅菌したポリプロピレンチューブに、各トランスフェクション用に算出された量のトランスファーベクターを加えます。
- チューブを氷冷します。

**表 4.**  
種々の形状に必要なトランスファーベクターの量

形状	トランスファーベクター
96 ウェルプレート	0.1 µg/ウェル
60 mm 皿	1.0 µg/ウェル
100 mm 皿	2.6 µg/ウェル
T75 フラスコ	3.4 µg/フラスコ
T225 フラスコ	10.7 µg/フラスコ

#### 準備する FuGENE 6 トランスフェクション試薬/無血清培地の量

**注意:** FuGENE 6 トランスフェクション試薬は無血清 DME 培地とあわせて調製する必要があります。

FuGENE 6 トランスフェクション試薬/無血清培地の量の算出は、表 5 をご参照ください。ピペッティングエラーを補うために用いる形状に基づき過剰量を準備してください。

**表 5.**  
無血清 DME 培地および種々の形状に必要な FuGENE 6 トランスフェクション試薬の量

形状	無血清 DME 培地	FuGENE 6 トランスフェクション試薬
96 ウェルプレート	15 µL/ウェル	0.6 µL/ウェル
60 mm 皿	70 µL/皿	6 µL/皿
100 mm 皿	182 µL/皿	16 µL/皿
T75 フラスコ	237 µL/フラスコ	21 µL/フラスコ
T225 フラスコ	710 µL/フラスコ	62 µL/フラスコ

- 滅菌したポリプロピレンチューブにまず算出した量の無血清 DME 培地を加えます。

- 培地に FuGENE 6 トランスフェクション試薬を加えます。

**注意:** FuGENE 6 トランスフェクション試薬はポリスチレンに吸着する傾向があるため、ポリスチレンではなくポリプロピレン材質のチューブをご使用ください。

- 穏やかに混合します。

#### トランスフェクション混合液の調製

トランスフェクション混合液の全成分を 1 本のポリプロピレンバイアルで混ぜます。

- 表 3 の推奨値に基づき 1 サンプル分の Lentiviral Packaging Mix を加えます。
- 表 4 の推奨値に基づき 1 サンプル分のトランスファーベクターを加えます。
- 表 5 の推奨値に基づき 1 サンプル分の無血清 DME 培地/FuGENE 6 を加えます。
- 上下にピペッティングして穏やかに混合します。
- トランスフェクション混合液を 15 分間室温でインキュベートします。
- それぞれのポリプロピレン製ウェル、プレート、皿、フラスコから、HEK293T を含む対応するウェル、プレート、皿、フラスコへトランスフェクション混合液の全量を加えます。

#### 3 日目

新鮮な培地を再び与えます。

- 細胞に与えるために、十分量の完全培地を 37 °C に予備加温します。
- トランスフェクションから 16 時間後に、トランスフェクト細胞 (細胞を破壊しないように) から培地を除去し予備加温した同量の完全培地で置換します。
- 表 6 の推奨値に基づく体積の DME 完全培地を各ウェル、皿またはフラスコに加えます。

**表 6.**  
様々な形状に必要な DME 完全培地の量

形状	DME 完全培地
96 ウェルプレート	100 µL/ウェル
60 mm 皿	5 mL/皿
100 mm 皿	10 mL/皿
T75 フラスコ	15 mL/フラスコ
T225 フラスコ	45 mL/フラスコ

- インキュベーターで細胞を 24 時間インキュベート (37 °C、5% CO<sub>2</sub>) します。

#### 4 日目

##### ウイルス粒子の最初の回収

19. 細胞に与えるために、十分量の完全培地を 37 °C に予備加温します。
20. トランスフェクションから 36～48 時間後に、培地を注意深く取り、それをコレクションチューブに入れることによりウイルス粒子を回収します。

最初に回収したウイルス粒子は 2～8 °C で 24～48 時間保存できます。長期保存するには -70 °C で冷凍してください。

**注意:** ウイルス粒子の凍結解凍サイクルを何回も繰り返すと、感染可能なウイルス力価が 1 サイクル当り 20～50% 減少する場合があります。

**注意:** 回収タイミングはトランスフェクション時点における細胞の健康、継代数、および培地組成に基づき最適化する必要があります。

21. 同量の新鮮な予備加温した完全培地を細胞に加え、さらに 24 時間インキュベートします。

#### 5 日目

##### ウイルス粒子の 2 回目の回収

22. トランスフェクションから 60～72 時間後にウイルス粒子を回収します。培地は注意深く除去してください(希望される場合は最初の回収品と集積してください)。

2 回目に回収したウイルス粒子は 2～8 °C で 24～48 時間保存できます。長期保存するには -70 °C で冷凍してください。

**注意:** ウイルス粒子の凍結解凍サイクルを何回も繰り返すと、感染可能なウイルス力価が 1 サイクル当り 20～50% 減少する場合があります。

23. ウイルス粒子を HIV p24 抗原 ELISA アッセイ で集積後すぐに力価決定してください (メーカーの実験法をご参照ください)。

#### 参考文献

1. Burns, J.C., *et al.*, Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein Pseudotyped Retroviral Vectors: Concentration to a Very High Titer and Efficient Gene Transfer into Mammalian and Non-mammalian Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8033-8037 (1993).
2. Abbas-Terki, T., *et al.*, Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum. Gene Ther.*, **13**, 2197-2201 (2002).
3. Stewart, S.A., *et al.*, Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*, **9**, 493-501 (2003).
4. Dull, T., *et al.*, A third generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.*, **72**, 8463-8471 (1998).
5. Zufferey, R., *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **15**, 871-875 (1997).
6. Pear, W.S., *et al.*, Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8392-8396 (1993).
7. NIH Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules (NIH Guidelines) 2002 (<http://www4.od.nih.gov/oba>).
8. Whither RNAi? *Nature Cell Biology*, **5**, 489-490 (2003).

ATCC は American Type Culture Collection の登録商標です。

FuGENE は Roche Diagnostics 社の登録商標です。

GenElute は Sigma-Aldrich Biotechnology 社の商標です。

LentiVector は Oxford BioMedica plc. 社の米国および欧州共同体の登録商標です。

MISSION は Sigma-Aldrich Biotechnology 社の商標です。

TurboGFP は Evrogen Co. 社の商標です。

#### 限定使用ライセンス情報

本製品は米国特許番号 5,817,491、5,591,624、5,716,832、6,312,682、6,669,936、6,235,522、6,924,123 および Oxford BioMedica 社 (英国)、(英国オックスフォード) の外国特許を取得している、研究用および商業用の *in vitro* および *in vivo* 研究用であり、遺伝子機能解明、ならびに遺伝子産物候補および医薬品探索・開発の経路の検証に用いるためのものです。LentiVector® 技術を用いてトランスジェニックトリを作製し有用あるいは価値あるタンパクを卵から生産したり、遺伝子療法のデリバリーに用いたり、製品にレンチウイルスベクターが含まれていないかあるいは組み入れられていない場合には治療・診断その他の研究目的以外の製品の商業生産に用いてはなりません。このライセンスに含まれていない商業使用のライセンス情報は、Oxford BioMedica (UK), Ltd., Medawar Centre, Oxford Science Park, Oxford OX4 4GA UK [enquiries@oxfordbiomedica.co.uk](mailto:enquiries@oxfordbiomedica.co.uk)、または BioMedica Inc., 11622 El Camino Real #100, San Diego CA 92130-2049 USA から入手可能です。

## トラブルシューティングガイド

問題	原因	対策
ウイルス力価が低い かまたは HIV p24 抗原 ELISA アッセイで確認できない。	Lentiviral Packaging Mix がトランスフェクションミックスに加えられていない。	再実験してください。
	Lentiviral Packaging Mix が適切に保存されていない。	Lentiviral Packaging Mix が受入れ後-20 °C で保存されていたかどうかご確認ください。
	Lentiviral Packaging Mix が複数回の凍結解凍サイクルが行われている。	製品受け取り後、Lentiviral Packaging Mix を適量に分注し、-20 °C で使用まで保存してください。
	標的遺伝子が細胞の成育および生存能力に不可欠である。	標的遺伝子が細胞の成育および生存能力に不可欠でないかご確認ください。
	shRNA コンストラクトが 2 kb 以上ある。	2 kb 以上ある shRNA クローンはレンチウイルス粒子の産生に悪影響する場合があります。
	shRNA プラスミド DNA の収量が低い。	ウイルス性ベクターは精製が難しいことが知られています。細菌ストックを LB/カルベニシリンプレート上に画線培養して単一コロニーを分離し、GenElute™ HP Midiprep Kit (製品番号 NA0200 または GenElute HP Maxiprep Kit (製品番号 NA0300) で DNA を精製することを推奨します。
	用いたプラスミド DNA の品質が良くなかった。	トランスフェクションに mini-prep を用いたプラスミド DNA を使用しないでください。前述の Sigma 社の GenElute plasmid purification kits を用いて DNA を精製してください。
	細胞接種密度が最適でなかった。	表 1 の推奨細胞密度に従ってください。
培地および試薬の保存が不適切。	培地および試薬はメーカーの指定する温度で保存してください。	

### コントロール選択表

あらゆる shRNA 実験に対して Sigma 社が推奨するコントロールを、このコントロール選択表に示します。これは *Nature Cell Biology* 誌の論説で提唱されたコントロールと厳密に一致したものです<sup>8</sup>。

推奨されるコントロール	対象
ネガティブコントロール： 未処理細胞	未処理細胞は培養細胞の生育状態をモニターし、他の全サンプルの比較ポイントとなります。
ネガティブコントロール： shRNA が挿入されていない 空の pLKO.1 ベクターによる トランスフェクション	MISSION pLKO.1-puro Control Vector、製品番号 SHC001。 このベクターには shRNA が挿入されていません。このコンストラクトにより生成した粒子は形質導入の際に有用なネガティブコントロールとなります。これは、後に RNAi 経路を活性化させることなく、形質導入効果のコントロールとなります。
ネガティブコントロール： 標的でない shRNA による形 質導入	MISSION Non-Target shRNA Vector Control、製品番号 SHC002 このベクターには、ヒトまたはマウスのいずれの遺伝子をも標的としない shRNA 挿入配列を含んでいます。これはこれらのゲノムの既知遺伝子と 5 塩基のミスマッチを持つことによりです。これは、形質導入の際の非特異的事象、および RNAi 経路活性化についてのコントロールとなります。
ポジティブコントロール： ポジティブレポーターベクター によるトランスフェクション	MISSION TurboGFP Control Vector、製品番号 SHC003 これはトランスフェクション効率および形質導入の最適性の評価における有用なポジティブコントロールとなります。TurboGFP Control vector は、CMV プロモーターの制御を受ける TurboGFP をコードする遺伝子を含むレンチウイルスバックボーンベクターである pLKO.1-puro からなります。Lentiviral Packaging Mix とこのコントロールとをコトランスフェクションすることにより、トランスフェクションおよび形質導入の成功が迅速にビジュアル的に確認できます。

Sigma ブランド製品は Sigma-Aldrich, Inc.を通じて販売されています。

Sigma-Aldrich, Inc.は同社製品がこの文書およびその他の Sigma-Aldrich 発行文書に含まれる情報に合致していることを保証します。お客様の個別の用途と製品の適合性についてはお客様にてご判断ください。掲載の品目、製品情報、価格などは予告なく変更される場合がございます。納品伝票または同梱の内容明細書の裏面をご覧ください。