



GenTarget Inc
Gene-Delivery Made Easier!

Pre-made レンチウイルス粒子 製品カタログ

Contents

Pre-made レンチウイルス粒子とは？ …02

製品の選び方 …03

製品カテゴリー …05

蛍光・発光レポーターアッセイ …05

- ・ ルシフェラーゼ発現
- ・ SEAPレポーター発現
- ・ 蛍光マーカー発現

イメージング …07

- ・ 細胞内イメージング
- ・ 細胞骨格イメージング
- ・ 蛍光標的融合タンパク質発現
- ・ ミトコンドリアのpH感受性プローブ発現

細胞不死化 …09

- ・ 細胞不死化

Cre/LoxPシステム …10

- ・ Creリコンビナーゼ発現
- ・ Cre組換え効率モニター

任意誘導発現システム …11

- ・ TetR発現（tetCMV誘導システム用）
- ・ rtTA発現（Tet-On誘導システム用）

その他ターゲット …12

- ・ cDNA（ORF）発現
- ・ iPS幹細胞因子発現
- ・ Cas9エンドヌクレアーゼ発現
- ・ LacZ酵素発現

細胞・経路特異的プロモーター発現 …13

- ・ 細胞特異的レポーター
- ・ シグナル経路モニタリング
- ・ 熱誘導発現
- ・ 青色光依存発現

レンチウイルス作製サービス …15

よくあるご質問（FAQ） …17

【製品に関するご注意】

本製品は、カルタヘナ法規制対象製品です。

ご使用される実験によっては、研究開発等に係る遺伝子組換え生物等を第二種使用等における拡散防止措置の申請・主務大臣の確認が必要となる場合がございます。

ご使用に際しては、規制に即し適切にお取り扱いください。



Pre-made レンチウイルス粒子とは？

哺乳細胞への遺伝子導入ツール

Pre-made レンチウイルス粒子は、初代細胞や非分裂細胞を含む幅広い種類の細胞で、特定のターゲット発現させるための ready-to-use の遺伝子導入ツールです。他の試薬の混合や添加を必要とせず、培養細胞に特定の量のレンチウイルス粒子を直接加えるだけで、容易に遺伝子導入することができます。



様々な哺乳細胞で使用可能

幹細胞・初代培養細胞・非分裂細胞のような様々な種類の哺乳細胞に使用することができます。



簡単なプロトコル

培養した細胞に直接加えるだけの簡単な手順です。脂質やトランスフェクション試薬は不要です。



安全に使用可能

自己不活性化導入ベクターを使用しているため、複製不能ウイルスであり、安全に使用可能です。



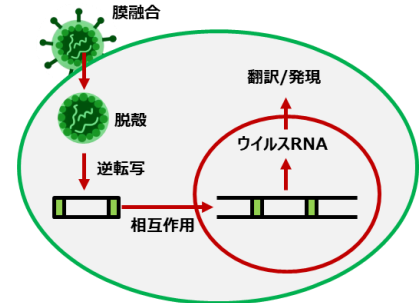
簡単に導入効率が確認可能

蛍光タンパク質を発現する製品ならば、蛍光顕微鏡で目的遺伝子の発現をリアルタイムでモニターできます。

導入遺伝子は、宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれる

レンチウイルスは、レトロウイルスとは異なり、非分裂細胞の核により積極的にインポートされ、細胞周期とは無関係に宿主細胞のゲノムに安定的に組み込まれます。HIVベースのレンチウイルスは、細胞毒性・免疫原性が低く、多くの細胞型においてより良好な形質導入効率を有しているため、遺伝子伝達剤として有用です。

Pre-madeレンチウイルス粒子は、レンチウイルスベクターの濃縮やレンチウイルスの生成といった手間がかからず、標的遺伝子発現のためのready-to-useで簡単な遺伝子導入ツールとなります。



レンチウイルス粒子による形質導入

アプリケーション例

- 神経細胞などのトランスフェクションが困難な細胞型への遺伝子導入
- 細胞内での遺伝子の発現量の制御が必要な実験での利用
- 長期間の高レベル発現を示す安定細胞株の作製
- 初代細胞または非分裂細胞での遺伝子発現
- トランスジェニック動物の作製
- オルガネラを標的とした、細胞内局在分析

使用期限について

- 使用するまで常に-80℃に保たれていれば、少なくとも1年間安定です。
- ウイルスカバレッジが1サイクルあたり5～10%減少するため、凍結融解の繰り返しは避けてください。
- 再保存する場合、レンチウイルス粒子を再凍結するか、または4℃で保存し3～5日以内に再使用してください。

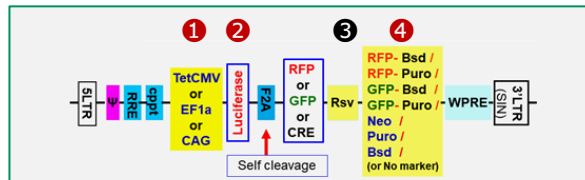


製品の選び方

あらゆる遺伝子導入のための豊富なラインアップをご用意しています。多くの場合、同じターゲットであっても、プロモーターや選択マーカの異なる複数の製品をご用意しています。各レンチウイルスは検証済みの特定の遺伝子標的の配列を含み、DMEMまたはPBSのいずれかのフォーマットで提供されます。PBSフォーマットは、in vivoアプリケーション、浮遊細胞への形質導入、無血清培養条件を必要とする細胞株における形質導入に適しています。また、薬剤耐性マーカ―や蛍光-薬剤耐性融合デュアルマーカ―を含みます。

発現カセットについて (ベクタースキームの見方)

- ① 目的遺伝子発現用のプロモーターです。
ガイドラインの「プロモーター」の項目をご参照ください。
- ② 発現させる目的の遺伝子です。
ガイドラインの「製品カテゴリー」の項目をご参照ください。
- ③ 選択マーカ―を発現させるためのプロモーターです。
ほとんどの製品ではRsvプロモーターが使用されます。
- ④ 選択マーカ―遺伝子です。
ガイドラインの「選択マーカ―」の項目をご参照ください。



① 2A配列 (F2A) について
自己切断配列です。P17ページをご参照ください。

製品選択ガイドライン

1 製品カテゴリー

まず、レンチウイルスのカテゴリーが特定のターゲット/マーカ―を選択します。同じターゲットであっても、プロモーターや選択マーカ―の違いにより複数の製品をラインアップしています。

蛍光・発光レポーターアッセイ

- ルシフェラーゼ発現
- SEAPレポーター発現
- 蛍光マーカ―発現

任意誘導発現システム

- TetR発現 (tetCMV誘導システム用)
- rtTA発現 (Tet-On誘導システム用)

イメージング

- 細胞内イメージング
- 細胞骨格イメージング
- 蛍光標的融合タンパク質発現
- ミトコンドリアのpH感受性プローブ発現

その他ターゲット

- cDNA (ORF)発現
- iPS幹細胞因子発現
- Cas9エンドヌクレアーゼ発現
- LacZ酵素発現

細胞不死化

- 細胞不死化

細胞・経路特異的プロモーター発現

- 細胞特異的レポーター
- シグナル経路モニタリング
- 熱誘導発現
- 青色光依存発現

Cre/LoxPシステム

- Creリコンビナーゼ発現
- Cre組換え効率モニター

2 プロモーター

同じターゲットの製品でも、異なるプロモーター駆動の製品をご用意しています。主にsuCMV、誘導性CMV (tetCMV)、EF1a、またはCAGプロモーターの製品があります（一部の製品は、組織特異的または経路特異的プロモーター）。特にプロモーターの指定がない場合は、CMVまたはEF1aプロモーターの製品をご選択ください。

- | | |
|---------------------|--|
| suCMVプロモーター | ほとんどの細胞型で最も強力なプロモーターであり、最も高い過剰発現を示します。 |
| tetCMVプロモーター | 任意で誘導性発現が可能なプロモーターです。そのまま使用する場合、suCMVプロモーターとして機能しますが、細胞にあらかじめTetRを導入することでテトラサイクリンまたはドキシサイクリンを使用した任意の発現誘導プロモーターとして使用できます。 |
| EF1aプロモーター | より少ない組織、細胞型特異的に修飾されており、すべての細胞型で活性があります。また、長期細胞中のプロモーターサイレンシング効果もありません。 |
| CAGプロモーター | 胚性細胞や一部の神経細胞、および一部の幹細胞で強力な活性を示します。 |

3 選択マーカー（薬剤耐性マーカー & 蛍光マーカー）

レンチウイルスの特徴の1つは、細胞のゲノムに組み込まれるため、長期的な発現またはノックダウンができることです。陽性の形質導入細胞を選択するために、レンチウイルスはしばしば、細胞選別用の蛍光マーカーや死滅選択用の抗生物質マーカーを含みます。

薬剤耐性マーカー

ブラストサイジン (Bsd)、ピューロマイシン (Puro)、ネオマイシン (Neo)、ゼオシン (Zeo)、ハイグロマイシン (Hygro) などのさまざまな抗生物質選択マーカー製品をご用意しています。各抗生物質は、各細胞型で異なる殺傷曲線を持っており、抗生物質を選択する前にテストする必要があります。ピューロマイシンとブラストサイジンでは、速やかに細胞が死滅するため、多くの場合、約1週間で選抜されます。ほとんどの細胞型はピューロマイシンに非常に敏感です。

蛍光マーカー

一部の製品には、GFP、RFP、BFP、CFP、またはYFPなどの蛍光マーカーやルシフェラーゼが含まれています。各蛍光マーカーは異なる波長 (ExとEm) を持っています。蛍光マーカーにより、蛍光顕微鏡下での簡単な形質導入効率チェックやFACSソーティングによる細胞選択が可能です。GenTarget社の製品のすべての蛍光マーカーは、最も強いシグナル強度になるように設計されています。

4 フォーマット

GenTarget社のレンチウイルスは3つのフォーマットがあります。アプリケーションによって最適なフォーマットをご選択ください。ほとんどの製品はDMEMかPBSでのフォーマットをご用意しています。一部製品で超力価レンチウイルスフォーマットで提供可能です。

通常のレンチウイルス

10%FBSおよびポリブレン (10x) を含むDMEM培地で提供される未精製ウイルスです。ほとんどのアプリケーションに適用可能です。

In vivo ready レンチウイルス

より高い力価に精製済みで、血清 (FBS) を含有しないPBS溶液に再懸濁して提供されます。形質導入効率の低い細胞型 (感染しにくい細胞型) や、幹細胞などの血清感受性細胞や初代細胞に使用できます。また、in vivoアッセイのための直接注入にも使用することができます。

Ultra titer レンチウイルス

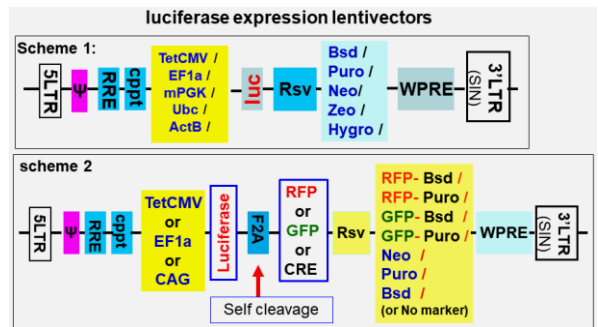
超高力価 ($\geq 10^9$ IFU/ml) の濃縮ウイルスがPBS溶液で提供されます。直接注射、遺伝子治療の研究、および極度の高力価レンチウイルスを必要とするアプリケーションのin vivo実験に最適です。

発光・蛍光レポーターアッセイ

ルシフェラーゼ酵素アッセイに ルシフェラーゼ発現

ルシフェラーゼは、遺伝子発現に関連する細胞イベントをモニタリングするためのレポーターアッセイで広く使用されています。

ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼは、デュアルレポーターアッセイで一般的である、異なる基質を使用した異なる発光波長でのエンドポイント分析に使用されます。ウミホタルルシフェラーゼは、分泌型ルシフェラーゼであり、細胞培養上清からリアルタイムおよび経時的に測定を行います。レッドルシフェラーゼは、in vivo生物発光イメージング用の赤方偏移したイタリア産ホタルのルシフェラーゼです。



ホタルルシフェラーゼ (Firefly Luciferase, F-Luc)

最も一般的に使用される生物発光レポーターです。この反応は、感度が高く、バックグラウンドが低く、in vitroおよびin vivoアッセイのどちらのハイスループットスクリーニングにも容易に適応可能です。

ウミホタルルシフェラーゼ (Cypridina luciferase, C-Luc)

ホタルルシフェラーゼよりも10~20倍明るく青色光を発します (蛍光ピーク462nm)。

ウミシイタケルシフェラーゼ (Renilla Luciferase, R-Luc)

ホタルルシフェラーゼと同じ特性の多くを持ち、生細胞アッセイに使用される36kDaの単量体酵素です。ただし、ウミシイタケルシフェラーゼはホタルルシフェラーゼとは異なる基質を触媒します。ウミシイタケルシフェラーゼはセレンテラジンの酸化を触媒して480nmの青色光を生成し、反応にATPを必要としません。一方、ホタルルシフェラーゼはルシフェリンの酸化を触媒して562nmのより長い波長の光を生成します。

レッドルシフェラーゼ (Red-Luciferase)

北米型ホタルルシフェラーゼよりも光活性が長く、D-ルシフェリンの注射後、生体内での組織への浸透に対してより明るくなることを示しています。発光はD-ルシフェリン注射後10分でピークに達し、1時間でシグナルの60%を保持します。

ルシフェラーゼ酵素の特性

異なるルシフェラーゼを一緒に使用して、単一の溶液で複数のレポーターアッセイを行うことが可能です。

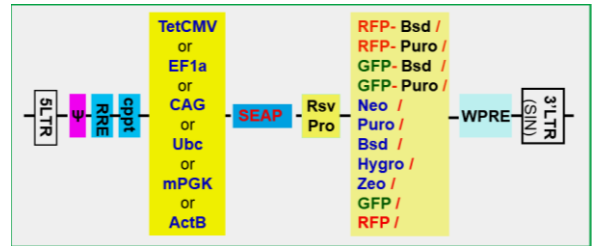
ルシフェラーゼの種類	基質	ピーク波長 (nm)	分泌	感度	ATP	測定
ホタルルシフェラーゼ	Dルシフェリン	562	×	中	必要	2秒でピークに達し、10秒まで継続
ウミホタルルシフェラーゼ	ウミホタルルシフェリン	465	○	高	-	生細胞上清由来のルシフェラーゼ活性測定に。ルシフェラーゼ活性はEDTAによって阻害される。~48時間の長い半減期
ウミシイタケルシフェラーゼ	セレンテラジン	480	×	中	-	2秒でピークに達し、10秒まで継続
レッドルシフェラーゼ	Dルシフェリン	614	×	中	必要	10分でピークに達し、1時間継続



プロモーター活性の調査に SEAPレポーター発現

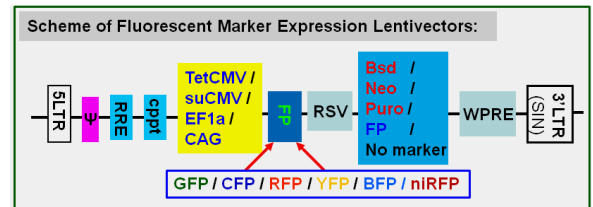
SEAP (Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase) は、導入された真核細胞のプロモーター活性を調べるための強力なレポーター遺伝子として一般的に使用されています。

SEAP発現レベル（そのプロモーター活性を反映）は、ジオキセタン CSPD (chloro-5-substituted adamantyl-1,2-dioxetane phosphate) に基づく化学発光レポーターアッセイを介して検出でき、転写活性の定量化に有用です。



形質導入効率、細胞追跡、安定細胞株構築、in vivo/in vitroでの酵素アッセイに 蛍光マーカー発現

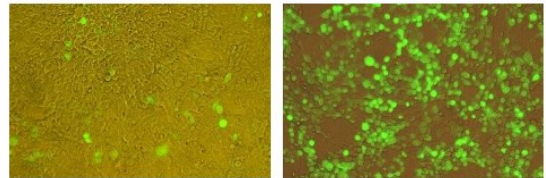
様々なプロモーター下でGFP、RFP、BFP、YFP、CFP、niRFP、Unstable GFPなどの蛍光タンパク質を発現します。各蛍光タンパク質は、可能な限り強い蛍光シグナルを示すように最適化されています。形質導入効率テスト、細胞追跡テスト、安定した細胞株構築、およびin vivo / in vitroでの酵素アッセイに理想的です。



使用例

Hela細胞でのGFP発現

Hela細胞は、24wellプレート上で、5 μ l (右図) または50 μ l (左図) のレンチウイルス (品番LVP001) を用いて形質導入されました。GFPシグナルは形質導入後72時間後に視覚化されました。



蛍光タンパク質の励起波長/蛍光波長 (Ex/Em)

- GFP (450/520nm)
- RFP (545/620nm)
- BFP (390/450nm)
- YFP (500/535nm)
- CFP (450/780nm)
- niRFP (670-690/710-770nm)
- Unstable GFP (450/520nm)

Unstable GFP (不安定化GFP)

GFPは、広く使用されているレポーターであり、生細胞での容易な検出を可能にします。しかし、非常に安定しており、半減期が長く、細胞に蓄積されるため、迅速な代謝反応を必要とするシグナル経路アッセイおよびノックダウン/ノックアウト検出などのアプリケーションでの利用が制限されます。そのような場合、不安定化GFP (uGFP) が有用です。uGFPは、時間経過誘導、動態解析、ノックダウンまたはノックアウトへの迅速な応答に最もよく用いられます。



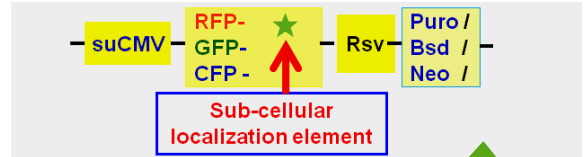
niRFP (近赤外RFP)

近赤外蛍光タンパク質 (niRFP) は、スペクトルの遠赤色部分で高い輝度と光安定性を特徴とした、優れた蛍光マーカーです。他の蛍光タンパク質よりもコントラストが高く明るい全体画像に使用できます。最大の明るさを得るために、細胞にビリベルジン (ビリベルジン IXa) の補給が必要な場合があります。また、niRFPシグナルを視覚化するには、フルスペクトルカメラが必要です。

イメージング

生細胞イメージングおよび細胞内シグナル経路の動的研究に 細胞内イメージング

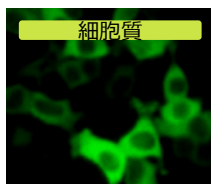
蛍光タンパク質-オルガネラターゲティングシグナル融合遺伝子を発現します。蛍光タンパク質は細胞に対して無毒であり、細胞構造を損なうことも、シグナル伝達経路を妨害することはありません。そのため、生細胞イメージングおよび細胞内シグナル経路の動的研究に最適です。



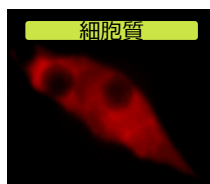
★可視化対象 (融合している標的遺伝子)

- 核 (Nuclear localization sequence)
- 細胞質 (nuclear export signal)
- 小胞体 (ER retention signal (KDEL))
- ゴルジ体 (1, 4-galactosyltransferase)
- 細胞膜 (ADP-ribosylation factor 6)
- 微小管 (MAP4)
- ヒストン (H2B)
- リソソーム (LAMP1)
- ミトコンドリア (Leader sequence of the engineered E1 alpha pyruvate dehydrogenase)
- 核膜 (inner nuclear membrane localization signal from lamin B membrane receptor)
- ペルオキシソーム (Peroxisomal C-terminal SKL targeting sequence)
- エンドソーム (RAB5A)
- コントロール (Null配列)

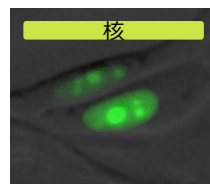
使用例



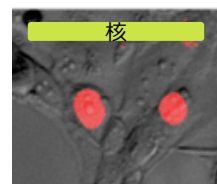
▲ Cyto-GFP
(品番 LVP450-G)



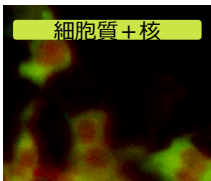
▲ Cyto-RFP
(品番 LVP450-R)



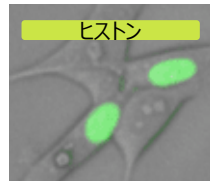
▲ Nuc-GFP
(品番 LVP360-G)



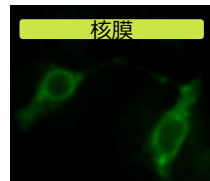
▲ Nuc-RFP
(品番 LVP360-R)



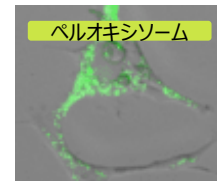
▲ Cyto-GFP + Nuc-RFP
(品番 LVP450-G+LVP360-R)



▲ GFP-H2B
(品番 LVP440-G)



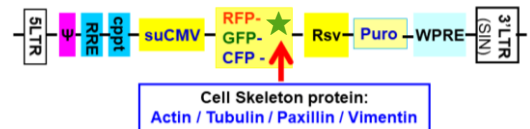
▲ Nuc-membrane-GFP
(品番 LVP453-G)



▲ Peroxisome-GFP
(品番 LVP454-G)

生理学的および病理学的治療条件下での細胞骨格構造およびダイナミクスの可視化に 細胞骨格イメージング

細胞構造との蛍光マーカー融合は、生組織または固定組織および細胞における、さまざまな生理学的および病理学的治療条件下での細胞骨格構造およびダイナミクスの可視化に便利なツールとなります。



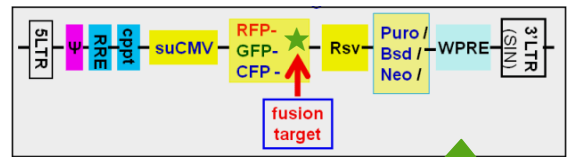
★可視化対象 (融合している標的遺伝子)

- マイクロフィラメント (β -actin)
- 微小管 (α -tubulin)
- 接着点 (paxillin)
- 中間径フィラメント (vimentin)



細胞内イベントや遺伝子発現を可視化に 蛍光標的融合タンパク質発現

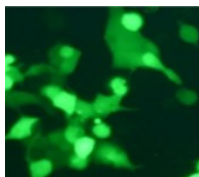
緑、青、赤、またはシアンの蛍光タンパク質を融合した標的タンパク質を発現します。ターゲットの機能と局在化に伴い強い蛍光シグナルを示します。



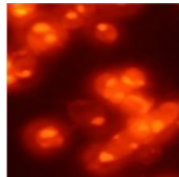
★アプリケーション例 (融合している標的遺伝子)

- 哺乳細胞のオートファジー活性の測定 (LC3)
- 初期アポトーシス細胞の検出 (Annexin5)
- 有糸分裂染色体と間期クロマチンのイメージング (Histone2B)
- P53が結合または標的となる細胞内経路の視覚化 (hP53)
- tatが標的とする細胞内経路の視覚化 (TAT)
- 接着刺激による遺伝子発現とアクチン束の細胞骨格組織化が起こった際の細胞内シグナル伝達経路の可視化 (Zyxin)
- 細胞膜でのCLCN2発現の視覚化 (CLCN2)
- 細胞膜でのKCNN4発現の視覚化 (KCNN4)
- 細胞膜でのTRPV1発現の視覚化 (TRPV1)
- 細胞膜でのTRPC3発現の視覚化 (TRPC3)
- 細胞内局在で発現するCSF1の視覚化 (CSF1)
- 筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、アルツハイマー病、ハンチントン病の疾患モニタリング (NEFL)
- ルシフェラーゼシグナルのモニタリング (Luciferase)
- コントロール (Null配列)

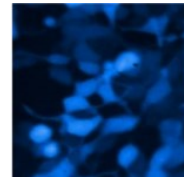
使用例



◀ GFP-RFP
(品番 LVP442)



◀ RFP-HIV1 TAT
(品番 LVP447-R)



◀ CFP-hP53
(品番 LVP448-C)

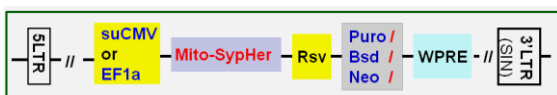


生細胞でのミトコンドリアでのpH変化の動的研究に ミトコンドリアのpH感受性プローブ発現

ミトコンドリアは、溶質を透過する外膜と呼吸鎖複合体をもつ内膜を備えた二重膜オルガネラです。ミトコンドリアは、内膜を越えてプロトンを押し出し、ATP合成を促進するpH勾配を生成します。

本製品で発現するMito-SypHerプローブは、ミトコンドリアを標的としたpH感受性プローブです。Mito-SypHerは、生細胞のミトコンドリアでのpH変化を動的に測定するためのツールとして使用できます。Mito-SypHerはレシオメトリックプローブで、420/480nmおよび505nmのダイクロイックと535nm (+/- 25nm)発光フィルターで励起されます。

※SypHerは、過酸化水素と特異的に反応するタンパク質性の蛍光プローブであるHyperの変異型で、過酸化水素には非感受性です。



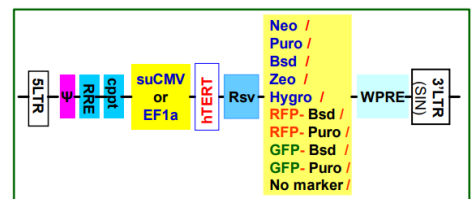
細胞不死化

網膜芽細胞腫 (Rb) やp53遺伝子 (腫瘍抑制タンパク質) などの細胞周期の制御遺伝子の抑制は、細胞不死化の方法のひとつです。がん細胞を誘導する多くのウイルスは、「腫瘍抑制タンパク質」を抑制するウイルス遺伝子をもち、細胞を不死化させます。このようなウイルス遺伝子の過剰発現は、初代細胞の不死化を可能にします。この中では、シミアンウイルス (SV-40) のラージT抗原が最も一般的です。この他に、ヒトパピローマウイルス (HPV) のE6/E7遺伝子、エプスタイン・バーウイルス (EBV)、ヒトアデノウイルス5型のE1A遺伝子、Ras_V12変異体、cMycなどがあります。また、p53またはRbノックダウン用siRNAも使用することができます。

細胞不死化のもう一つの方法は、不死化のための遺伝子を過剰発現させる方法です。最もよく知られている遺伝子は、ヒト腫瘍でよく過剰発現する遺伝子であるテロメラーゼ (hTERT) です。このほかに、HOX遺伝子やCDK4などがあります。

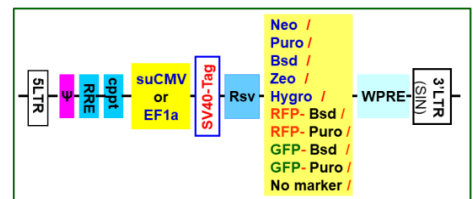
hTERT発現レンチウイルス

ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) は、細胞老化において役割を果たし、染色体修復にも関与します。hTERTが外因的に発現される場合、細胞はテロメアの長さを維持し、細胞老化を回避することができます。したがって、hTERTは、様々な細胞型の初代細胞の不死化に広く用いられています。



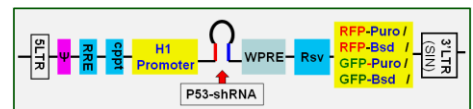
SV40ラージT抗原発現レンチウイルス

SV40ラージT抗原 (Simian Vacuolating Virus 40 T-Ag) は、ウイルスゲノム複製およびホストの細胞周期の制御に関与する六量体のタンパク質です。核局在化シグナルや他のウイルスアプリケーションを研究するモデルタンパク質として利用されています。また、様々な細胞型の不死化に広く利用されています。



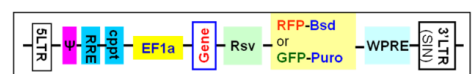
p53 siRNAレンチウイルス

p53のようなヒトの「腫瘍抑制タンパク質」をノックダウンまたは抑制することで、多種多様な細胞型を不死化することができます。本製品は、ヒトp53遺伝子をノックダウンするshRNAレンチウイルス粒子です。これらのノックダウンレンチウイルスは、75%以上のノックダウンレベルが検証されています (80%~97%は細胞型に依存します)。



その他の細胞不死化レンチウイルス

エプスタイン・バーウイルス (EBV) 遺伝子 (EBNA1とEBNA2) は、B細胞とT細胞の不死化に使用されたことが報告されています。また、HPV16ウイルスのE6/E7遺伝子 (ケラチノサイト)、アデノウイルス5型のE1A遺伝子 (初代げっ歯類細胞)、ヒトHOX遺伝子 (マクロファージを含む様々な造血細胞、造血前駆細胞、骨髄前駆細胞)、ヒトCDK4 (気管支細胞や筋芽細胞)、ヒトKRas V12 変異体、cMyc (多種多様な細胞) などがあります。



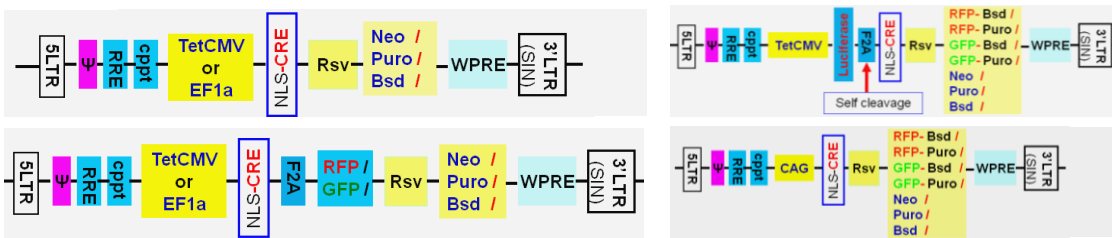
不死化遺伝子と細胞型

不死化遺伝子	不死化する細胞型	不死化遺伝子	不死化する細胞型
SV40 Large T-antigen	ほとんどの細胞型	Kras_G12V	腺管細胞
hTERT	ほとんどの細胞型	HOXA9	造血細胞、骨髄前駆細胞
EBV Genes(EBNA1/EBNA2)	B細胞	CDK4	気管支上皮細胞
HpV16-E6/E7	ケラチノサイト	p53-siRNA	多種多様な細胞型
Adenovial E1A	ラット組織由来の上皮細胞	cMyc	前立腺上皮細胞

Cre/LoxPシステム

in vivoでの lox 部位の結合を触媒するためのCre発現に Creリコンビナーゼ発現

Creリコンビナーゼは、バクテリオファージP1に由来し、lox部位と呼ばれる34bpの標的配列間の組換えを触媒します。精製されたCre酵素は、lox部位を含む個々のプラスミドに結合することができます。発現するCreは、N末端にSV40 large T抗原由来の核局在化シグナル (NLS) であるPKKKRKVを含みます。そのため、核膜を透過し、in vivoでの組換えイベント数を増加させます。

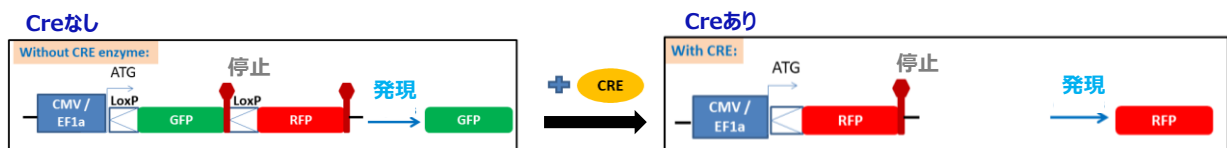


in vivoでのCreを介した組換えのパフォーマンスを検証に Cre組換え効率モニター (LoxP GFP/RFP ColorSwitch)

Cre組換えは、遺伝子型 (ゲノムDNAの変化) を生物学的結果 (表現型) に関連付けるトランスジェニック動物モデリングによる条件付き遺伝子ターゲティングのための優れたツールです。Creレポートレンチウイルスは、in vivoでのCreを介した組換えのパフォーマンスを検証するための非常に効果的な方法です。

本製品は、強化されたCMVプロモーターまたはEF1aプロモーター下で「LoxP-GFP-stop-LoxP-RFP-Stop」カセットを構成的に発現するように設計されており、カラースイッチメカニズムを介してCre酵素の存在が確認できるようになっています。それにより、in vivoまたは細胞培養における Cre組換え効率の簡単な確認が可能で、また、Cre loxベースのシステムを検証するためのコントロールとしても使用できます。

原理



哺乳細胞への感染後に強いGFP蛍光を示しますが、RFP蛍光は示しません。Creタンパク質が核内に存在すると、Creは2つのloxP部位間のDNA断片を切除/削除します。その結果、GFPが除去され、RFPが発現し、RFP蛍光に切り替わります。RFP発現細胞とGFP発現細胞の比率は、蛍光セルソーティングや蛍光顕微鏡、またはGFP/RFPフィルター搭載の蛍光光度計で簡単に確認できます。

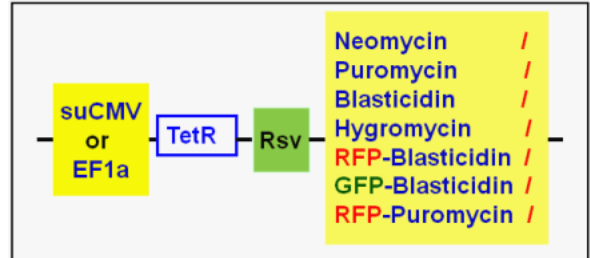
使用例



任意誘導発現システム

tetCMV誘導システムを使用するためのTetRの導入に TetR発現 (tetCMV誘導システム用)

TetR (テトラサイクリンレギュレーター) は、テトラサイクリン制御の誘導性遺伝子発現システムにおける重要な調節タンパク質です。TetRタンパク質が存在する場合、TetRはプロモーターに結合し、発現をブロックします。プロモーターからTetRを除去するテトラサイクリン (またはドキシサイクリン) を添加することで、任意の誘導発現を開始できます。

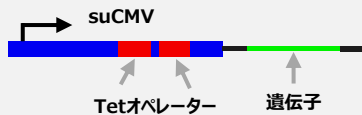


tetCMV誘導システムとは？

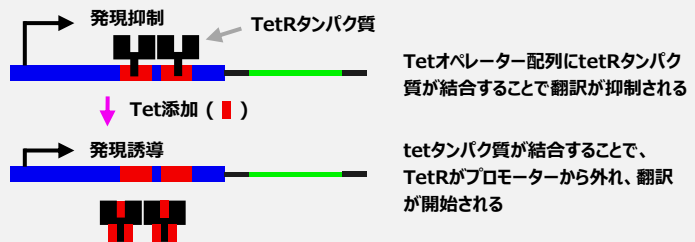
TetCMVプロモーター (Inducible CMVプロモーター) は、テトラサイクリンを利用する任意誘導発現のCMVプロモーターです。そのまま発現させる場合、suCMVプロモーター (構成的に高発現させるプロモーター) としてご使用いただけますが、TetRを導入することでテトラサイクリンまたはドキシサイクリンを使用した任意の発現誘導を行うことができます。

※詳細は、18ページをご確認ください。

① suCMVプロモーターとして使用する場合

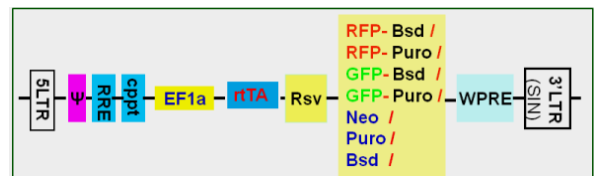


② 任意誘導性プロモーターとして使用する場合 (TetRを発現している細胞で使用)



Tet-On誘導システムを使用するためのrtTAの導入に rtTA発現 (Tet-On誘導システム用)

rtTA (逆テトラサイクリン転写活性化因子) は、ドキシサイクリン (Dox) の存在下でテトラサイクリンオペレーター要素 (TetO) に結合します。TetO配列が埋め込まれたプロモーターは、インデューサー (Dox またはテトラサイクリン) が存在する場合にrtTAタンパク質に結合し、下流の遺伝子の転写を活性化します (Tet-On 誘導システム)。

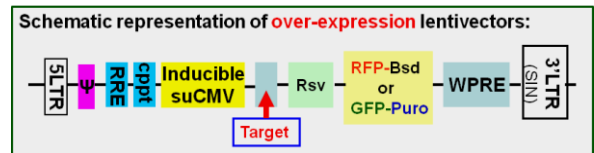


本製品で導入されるrtTA-M2 (ABC65845.1) は、テトラサイクリンまたはDoxの非存在下で安定性の向上、バックグラウンド発現の減少、Tet/Doxの存在下での誘導性の改善を示したrtTAの変異体です。

+ その他ターゲット

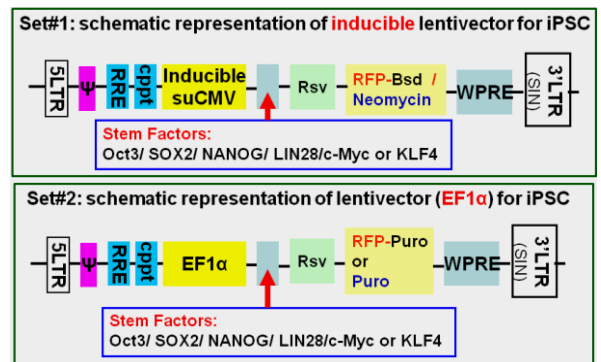
+ 目的遺伝子の過剰発現に cDNA (ORF)発現

ヒト、マウス、ラットのcDNAターゲットを、オプションの誘導性 TetCMVプロモーターの下で発現します。各遺伝子は完全に配列検証され、コーディングDNA配列 (CDS) は個々のNCBIアクセッションIDと100%一致します。RSVプロモーター下のRFP-Bsd またはGFP-Puro 融合デュアルマーカーにより、RFPまたはGFPでの選択、または抗生物質による殺傷での選択が可能です。



+ 幹細胞研究に iPS幹細胞因子発現

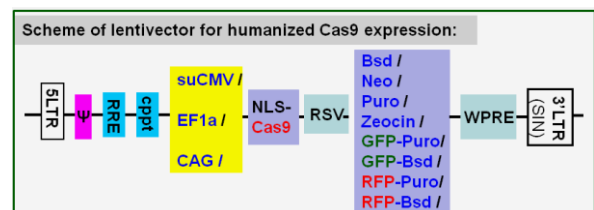
完全に分化したマウスまたはヒトの体細胞を胚様細胞 (多能性幹細胞、iPSC) に変化させることが大きな注目を集めています。iPSC細胞は、発現ウイルスまたは発現タンパク質を介して導入される転写因子または幹細胞因子のセットを用いて生成されることが実証されています。主な幹細胞因子は、OCT3/4、SOX2、NANOG、LIN28、c-Myc、およびKLF4ですが、リプログラミング因子の組み合わせはわずかに異なる可能性があります。iPSCsは、多くのヒト疾患の治療と幹細胞研究の加速させる可能性を秘めています。



+ 遺伝子編集に Cas9エンドヌクレアーゼ発現

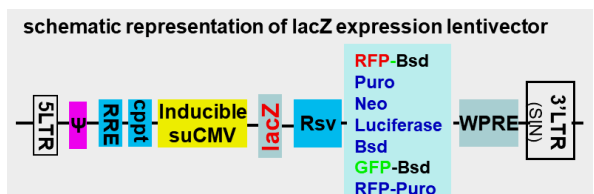
核透過性ヒト野生型Cas9遺伝子 (Streptococcus pyogenes に由来) を発現する独自の高力価レンチウイルスベクターから生成されています。「標的遺伝子発現カセット」(U6/H1-crRNAtracrRNA)の合成または、標的特定の「crRNA-tracrRNA」をデザインgRNAベクター(cas9なし)にクローニングすることでガイドベクター (gRNA) の構築を簡単に行うことができます。

※CRISPR/Casベースのゲノムノックイン/アウト編集には、本製品の他に、標的特定のガイドRNA (gRNA) とドナー-DNAテンプレート (ノックインの場合) が必要です。



+ LacZ酵素発現

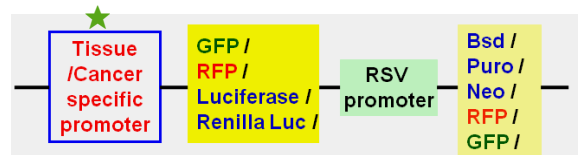
b-ガラクトシダーゼ (LacZ) は、ベータガラクトシド単糖への加水分解を触媒する加水分解酵素です。In vivoおよびin vitroの両方で、老化バイオマーカーとして使用されます。



細胞・経路特異的プロモーター発現

プロモーター強度テストや、特定の細胞の標識に 細胞特異的レポーター

ネイティブプロモーターは、組織によって異なる強度を有します。多くの場合、いくつかのがん細胞においてはプロモーターの発現が向上します。ホタルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、RFPマーカー、GFPマーカーなどの蛍光レポーターを細胞特異的プロモーター下で発現させることで、プロモーター強度をテストしたり、特定の細胞を標識することができます。



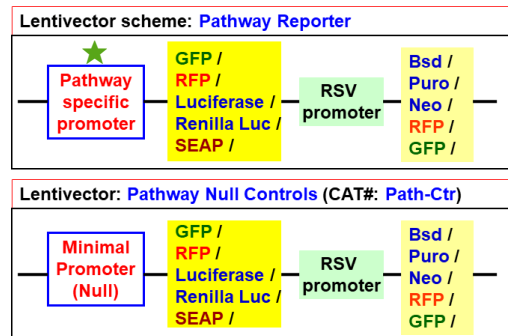
★カテゴリー(プロモーター)

- 星状細胞レポーター (human GFAP プロモーター)
- B細胞レポーター (B29 (CD79b)プロモーター)
- 脳組織レポーター (CaMKIIプロモーター)
- がん細胞レポーター (Survivinプロモーター)
- 内皮細胞レポーター (FLT1プロモーター)
- 造血細胞レポーター (CD45プロモーター)
- 肝細胞レポーター (aFPプロモーター)
- 神経細胞レポーター (SYN1プロモーター)
- 膵がんレポーター (CCKARプロモーター)
- 幹細胞レポーター (GATA2プロモーター)
- 腎細胞レポーター (Nephrinプロモーター)
- 白血球レポーター (CD43レポーター)
- 肺組織レポーター (SPBプロモーター)
- マクロファージレポーター (CD68プロモーター)
- 巨核球レポーター (FLT1プロモーター)
- 単球レポーター (CD14プロモーター)
- 筋細胞レポーター (MBプロモーター)
- 卵巣がんレポーター (HE4プロモーター)
- 前立腺細胞レポーター (PSAプロモーター)

生細胞での遺伝子調節研究や、薬物スクリーニング細胞シグナル伝達アッセイなどに シグナル経路モニタリング

本製品は、経路特異的プロモーターまたは経路特異的転写因子結合モチーフの複数の反復配列を埋め込んだ最小プロモーター (mCMV) 下で、ホタルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、RFP、GFPなどの発光または蛍光レポーターを発現します。そのため、さまざまな経路の活性化を迅速、高感度、定量的にモニタリング可能です。

レポーター活性を測定することで、生きている哺乳細胞での遺伝子調節研究や、機能ゲノクスおよび薬物スクリーニング細胞シグナル伝達アッセイ、目的の細胞型での細胞ベースアッセイ用に独自の経路スクリーニングアッセイ細胞株作製などに使用できます。



★カテゴリー(プロモーター)

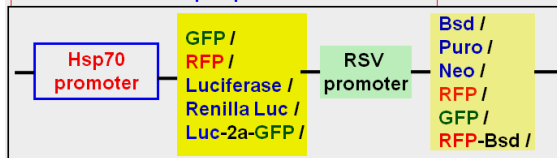
- アンドロゲン経路 (A-RE x4 mCMV)
- 抗酸化経路 (ARE x4 mCMV)
- C/EBP経路 (C/EBP-TRE x8 mCMV)
- CD44CR1経路 (CD44プロモーター)
- CREB (cAMP-PKA)経路 (CRE-TRE x8 mCMV)
- EGR1プロモーター経路 (EGR1プロモーター)
- エストロゲン受容体経路 (ER-RE x4 mCMV)
- グルココルチコイド経路 (G-RE x4 mCMV)
- ヘッジホッグ経路 (GII-RE x8 mCMV)
- ハイポキシア (低酸素) 経路 (H-RE x6 mCMV)
- JAK-STAT経路 (ISRE x8 mCMV)
- JNK / AP1経路 (AP1 x8 mCMV)
- MAPK/ERK経路 (SRE x8 mCMV)
- NFkB経路 (NFkB-TRE x4 mCMV)
- TP53経路 (P53-RE x3 mCMV)
- Wntシグナル経路 (Tcf x8 mCMV)
- Notchシグナル経路 (RBP-JK x4 mCMV)
- シグナル経路コントロール※ (最小プロモーター Null)

※最小プロモーターにNull配列が挿入されています。Null配列は、シグナル経路の刺激に反応しません。シグナル経路モニタリング用レンチウイルスを使用する際、刺激に対する無反応コントロールのプロファイルを確立するために使用されます。

金属イオン、近赤外光照射、加熱処理などの刺激下での Hsp プロモーター強度の研究に熱誘導発現

本製品によって形質導入された細胞では、レポータータンパク質（ルシフェラーゼまたは蛍光マーカー）がHsp70プロモーターによって発現されます。レポータータンパク質の発現は、通常の培養条件では中程度であり、1時間の温熱処理（42℃）などの刺激でアップレギュレーションされます。プロモーターの活性化は、熱ショック後約24時間でピークに達し、徐々に低下しながら3日間維持することができます。

Core scheme of Hsp70 promoter lentivector:



Hsp70プロモーターとは？

Hsp70プロモーターは、熱ショックタンパク質70（Hsp70）の発現を駆動する熱誘導性プロモーターです。熱ショックタンパク質は、保存された普遍的に発現するタンパク質のファミリーで、タンパク質の折り畳みのための細胞の機構の重要な部分であり、ストレスから細胞を保護するのに役立っています。熱ショックタンパク質は、熱ストレスや有毒化学物質、特にヒ素、カドミウム、銅、水銀などの重金属、近赤外光によって強くアップレギュレートされます。

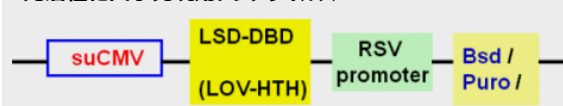
Hsp70プロモーターには、少なくとも2つの調節ドメインが含まれています。熱ショックまたは重金属に応答する遠位ドメインと、血清による刺激に応答する近位ドメインです。Hsp70プロモーターの活性は、中等度の温熱処理（39℃～43℃）によって誘発され、CMVプロモーターと同じ発現レベルに達します。

in vitro および in vivo での光誘導性発現メカニズムの研究に青色光依存発現

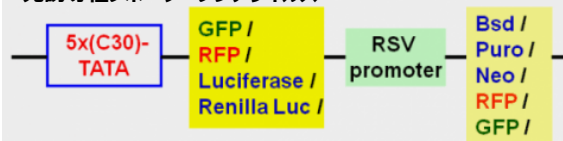
青色光（465nm）に依存した遺伝子発現用のレンチウイルスです。レンチウイルスは、光誘導性プロモーター（転写応答エレメントとして5x C30タンデムリピートを含む）の下に発光または蛍光レポーター遺伝子を持ちます。このプロモーターは、光活性化因子が結合するまで不活性化状態です。光活性化因子は、青色光の照射時にのみ光誘導性プロモーターに結合します。そのため、可逆的（誘導/非活性化）発現、正確なタイミングで局所的な誘導発現が可能です。

※「光活性化因子発現用レンチウイルス」と「光誘導性レポーターレンチウイルス」を組み合わせてご使用ください。

光活性化因子発現用レンチウイルス



光誘導性レポーターレンチウイルス



原理

光活性化因子は、エリスロバクター・リトリスのタンパク質EL222に由来する感光性タンパク質です。これは、光センサードメイン（LSDまたはLOVと呼ばれる：光酸素電圧）とDNA結合ドメイン（DBDまたはHTHと呼ばれる：ヘリックスターンヘリックス）の2つのドメインで構成されています。

暗闇の中で、2つのドメインは互いに相互作用して、「光誘導性プロモーター配列」への結合を防ぎます。青色光（465nm）が照射された場合、光はこれらの相互作用を遮断し（タンパク質形成の変化）、LSDドメインからDBDドメインを露出させます。これにより、DBDが光誘導性プロモーター配列へ結合し、下流にある遺伝子を発現させます。



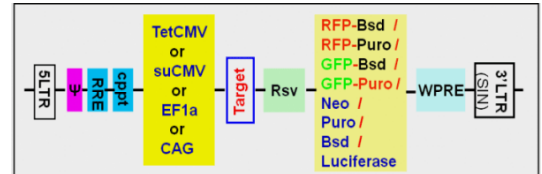


レンチウイルス作製サービス

「目的の遺伝子用のレンチウイルスがない」「選択マーカを変更したい」など、ご要望に応じてレンチウイルスの作製サービスを承っております。biosupport@filgen.jp までお気軽にご相談ください。

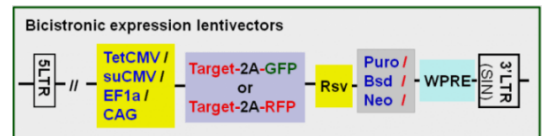
ターゲット発現用レンチウイルス

ご希望のプロモーター下で目的遺伝子を発現します。プロモーターは TetCMV、suCMV、EF1a、CAGプロモーターからご選択いただけます。また、選択マーカとして、Rsvプロモーター下に薬剤耐性マーカ、蛍光タンパク質マーカ、蛍光タンパク質-薬剤耐性融合マーカを追加可能です。より力価の高い濃縮フォーマット(PBS溶液)もご利用いただけます。



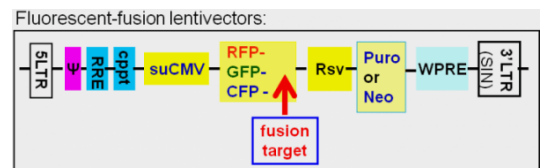
バイシストロン発現用レンチウイルス

ターゲットと蛍光マーカタンパク質が同じプロモーター下で発現されるバイシストロン発現のレンチウイルスも対応可能です。1つのORFから同じプロモーターによって転写されたターゲットと蛍光タンパク質遺伝子は、翻訳過程の最中に、2A配列によって分断され、最終的に2つの分離したタンパク質になります。プロモーター、発現する蛍光タンパク質、薬剤選択マーカをご選択ください。



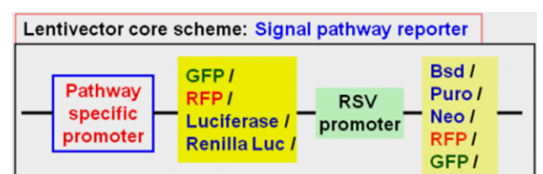
蛍光-標的融合タンパク質発現レンチウイルス

ターゲットのN末端に蛍光タンパク質 (GFP、RFP、CFP) を融合します。蛍光融合タンパク質は suCMVプロモーター下で発現します。融合させる蛍光タンパク質と薬剤選択マーカをご選択ください。



シグナルレポーターレンチウイルス

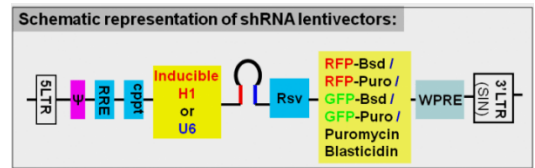
目的のプロモーターをプロモーターのないレンチウイルスベクターにサブクローンすることでレンチウイルスベクターを構築し、レンチウイルス産生します。目的のプロモーターで発現させる蛍光タンパク質と、薬剤選択マーカをご選択ください。



shRNA発現用レンチウイルス

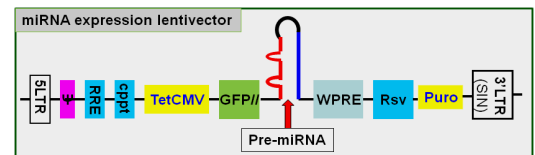
目的の遺伝子に対して設計されたshRNA配列を使用して、shRNAターゲットノックダウンレンチウイルスベクターを構築します。次に、各shRNAレンチウイルス（3つのターゲット特異的、1つのユニバーサルネガティブコントロール）を生成します。

shRNAおよびネガティブコントロールshRNAレンチウイルスベクタープラスミドDNA、shRNAレンチウイルスおよびネガティブコントロールshRNAレンチウイルスを提供します。



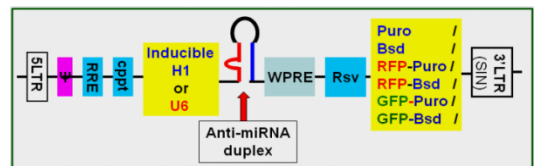
miRNA発現用レンチウイルス

発現レンチウイルスベクターを構築し、miRBase データベースにリストされているヒトまたはマウスのmiRNAの前駆体マイクロRNA発現用のレンチウイルスを作製します。特定のmiRNAレンチウイルスとネガティブコントロールmiRNAレンチウイルスが提供されます。



anti-miRNAレンチウイルス

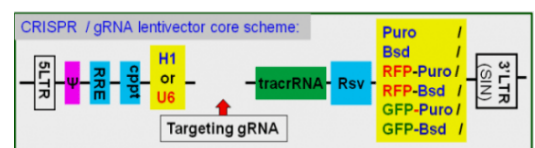
Anti-miRNAレンチウイルスベクターを構築し、miRBaseデータベースにリストされているmiRNAまたは任意のmiRNAを阻害するためのレンチウイルスを作製します。anti-miRNAレンチウイルス（目的のmiRNAに特異的）とネガティブコントロールanti-miRNAレンチウイルスが提供されます。



CRISPR/Cas9レンチウイルス

さまざまな抗生物質/蛍光マーカーを備えたPre-madeのCAS9発現レンチウイルスを提供します。そして、遺伝子特異的ガイドRNA（gRNA）レンチウイルスベクターを設計および構築し、遺伝子ノックアウト用のターゲティングgRNAレンチウイルスを生成します。

オプションで一本鎖、遺伝子編集用の二本鎖遺伝子座特異的修復インサート、ノックインカセットを合成します。



よくあるご質問 (FAQ)

Pre-madeレンチウイルス粒子はどのように作製されますか？

GenTarget社のPre-made過剰発現レンチウイルスは、独自のSureTiter™レンチウイルスベクターシステムを用いた選択的誘導性suCMVベクターから生成されます。まず選択された遺伝子をレンチウイルスベクターにクローン化し、次いで、そのレンチウイルスベクターをGenTarget社独自のパッケージングミックス（品番 HT-pack）を用いて293T細胞（品番 TLV-C）に同時に形質導入します。生成されたVSV-G偽型レンチウイルスは、複製不能のウイルスです。

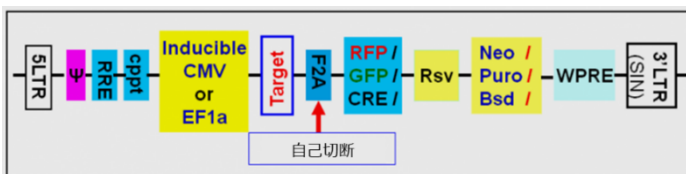
レンチウイルス粒子は、レンチウイルスベクターから生成されたレンチウイルス上清であり、特定の遺伝子またはRNAi構築物を発現します。レンチウイルスベクターはHIV-1（ヒト免疫不全ウイルス1）由来のプラスミドです。このレンチウイルスベクターから生成された複製不能レンチウイルスは、ほぼすべての哺乳細胞（初代細胞および非分裂細胞を含む）に形質導入することができます。そのため、遺伝子発現やノックダウンのために使用されます。

SureTiter™ レンチウイルスシステムとは何ですか？

より簡便で信頼できるレンチウイルスの力価モニタリングのために、GenTarget社が構築した新しいレンチウイルスベクターです。レンチウイルスの力価を測定する上で、目的配列と蛍光タンパク質を共発現するベクターを用いて、その蛍光タンパク質の蛍光を測定する方法は、簡便で直接的な方法です。しかし、これは、レンチウイルス粒子の構造に依存するという難点があり、目的遺伝子の発現量と蛍光タンパク質の発現量のより正確な関係を得るためには、目的遺伝子と蛍光タンパク質遺伝子が同じプロモーターから転写される必要があります。さらに、発現後のそれらのモル比が等しくなければなりません。

従来、同じプロモーターからの2つのタンパク質の発現（バイストロンな発現）は、IRES（Internal Ribo-somal Entry Sites）が使用されてきましたが、IRESは、翻訳過程において、2番目の遺伝子の発現量がかなり低くなる特徴があります。そのため、IRESによる蛍光タンパク質の発現量は、必ずしもウイルスの力価を反映することができないということになります。SureTiter™レンチウイルス導入ベクターは、口蹄疫ウイルスに由来する2A self-processing peptide（短い自己プロセッシング性ペプチド）によって、目的遺伝子と蛍光タンパク質遺伝子が結合された構造をしています。

2A配列は、切断部位で、酵素反応とは別のプロセスによって、自身の最後の2つのアミノ酸の間で自身を切断します。SureTiter™レンチウイルス導入ベクターにおいて、1つのORFから同じプロモーターによって転写された目的遺伝子と蛍光タンパク質遺伝子は、翻訳過程の最中において、2A配列によって分断され、最終的に2つの分離したタンパク質として発現します。これにより、目的遺伝子と蛍光タンパク質遺伝子は、等しいモル比で発現することができ、より信頼性のある力価の測定ができます。



Enhanced super CMV プロモーターとは何ですか？

GenTarget社は、最も強力な転写/翻訳効率をもつ改変したスーパーCMVプロモーターを選択し、GenTarget社のレンチウイルスとEco-PCRクローニング発現ベクターに組み込みました。

GenTarget社独自のsuCMVプロモーターは、① エンハンサー領域の6つの変異、② コアプロモーター領域の3つの変異、③ 転写開始領域と翻訳開始領域の間の最適なスパーサー距離、④ 転写領域の下流の人工イントロンをもちます。細胞型に依存して、suCMVプロモーターはpCDA3.1よりも4~6倍、pcDNA3.3よりも2~3倍高い転写効率を示します。

TetCMVプロモーターとは何ですか？

いくつかの遺伝子では、毒性をもつなどにより、構成的な発現が望ましくない場合があります。そういった場合に、誘導性の発現システムを使用します。

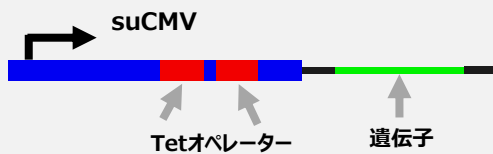
TetCMVプロモーター (Inducible CMVプロモーター) は、テトラサイクリンを利用する任意誘導発現のCMVプロモーターです。そのまま発現させる場合、suCMVプロモーター (構成的に高発現させるプロモーター) としてご使用いただけますが、TetRを導入することでテトラサイクリンまたはドキシサイクリンを使用した任意の発現誘導を行うことができます。

本プロモーターには、テトラサイクリン (tet) オペレーター配列 (TetO) の2つのコピーが組み込まれています。Tet-On/Offシステムのような他のテトラサイクリン誘導系とは異なり、このプロモーター修飾は構成的発現を妨げません。tetリプレッサータンパク質 (TetR) の存在下では、TetRがプロモーターへ結合することで転写が抑制されます。テトラサイクリンまたはドキシサイクリン (Dox, テトラサイクリンの誘導体) を添加することで、DoxがTetRに結合し、TetRはプロモーターから外れ、転写が開始されます。この任意の誘導性システムは、テトラサイクリン用量依存的です。一般に使用される最終的なテトラサイクリン濃度は1.0 μ g/mlで、発現誘導は、基本発現レベルに依存して1000倍になる可能性があります。

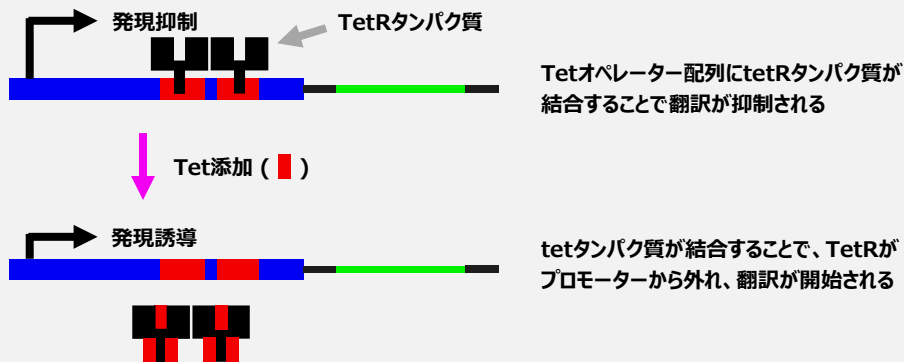
※誘導性プロモーターとして使用したい場合は、事前にTetRを導入して構成的な発現を止める必要があります。

① TetRタンパク質を恒常的に発現するTetR安定細胞株で使用する、② TetR発現プラスミドおよび標的誘導性発現ベクターをトランスフェクションする、③ TetR発現のPre-madレンチウイルス粒子により形質導入するなど、事前にTetRを導入可能です。

① suCMVプロモーターとして使用する場合



② 任意誘導性プロモーターとして使用する場合 (TetRを発現している細胞で使用)



Pre-madeレンチウイルスの使い方は？

GenTarget社のPre-madeレンチウイルス粒子はすぐに使用することができます。24wellプレート中の培養細胞に50 μ lのレンチウイルス粒子を加えるだけです。48～72時間以内に、蛍光シグナルを顕微鏡で視覚化して、ウイルスの形質導入効率を確認することができます（注：一部の細胞型は蛍光シグナルを見るのに最大10日間かかります）。蛍光マーカーが利用できない場合にも、標的遺伝子発現をテストすることができます。

ポリブレンなどのいくつかの添加剤は、形質導入効率を高めめます。そして、多くの要因が形質導入効率に影響する可能性があります。主な要因は細胞型によるものです。活発に分裂する細胞株は、分裂しない株よりもはるかに形質導入率が高くなります。したがって、分裂していない細胞に形質導入する場合は、最適な発現のために、より高いMOIのウイルスを使用する必要があります。詳細については、推奨されるトランスダクションプロトコルを参照してください。

（注：ポリブレンはウイルスの形質導入を促進することが報告されています。ほとんどのGenTargetのPre-made非濃縮レンチウイルス粒子にはすでに60 μ g/mlのポリブレン（10倍）が含まれています。ポリブレンはいくつかの細胞型で有毒であることに注意してください）

下記は標準的な使用手順ですので、ご使用の際は、製品に付属するマニュアルの手順に従ってご使用ください。

接着細胞のトランスフェクション

Pre-madeレンチウイルスはすぐに使用できる状態で提供されているため、細胞培養に追加するだけで使用できます。追加するウイルスの量は、細胞の種類によって異なります。迅速な形質導入のために、細胞密度が50～90%の24wellプレートに50 μ l/wellのウイルスを追加します。72時間後（培地を交換不要）、蛍光顕微鏡で陽性の形質導入率を確認します。安定した細胞株生成のために、抗生物質を含む培地に細胞を入れるか、蛍光細胞選別を行ってから抗生物質選別します。

0日目

- ① 適切な密度で完全培地に細胞を播種し、一晩インキュベートします。
※形質導入時には、細胞は50～90%コンフルエントである必要があります。たとえば、24wellプレートの各wellにHeLa細胞を 0.5×10^5 /ml x 0.5ml で播種します。

1日目

- ① 培養液を取り除き、0.5mlの新鮮で温かい完全培地を追加します。
- ② Pre-madeレンチウイルスストックを室温で解凍し、目的のMOIを取得するための適切な量のウイルスストックを追加します（または単純に行う場合は、50 μ lのウイルスを追加します）。
- ③ 細胞を37°C、CO₂インキュベーターに戻します。
※凍結融解は避けてください。一度にすべてのウイルスを使用しない場合は、-80°Cでウイルスを再凍結します。ウイルスカ価は凍結/解凍サイクルごとに約10%減少します。

3日目

- ① 形質導入後約72時間で、蛍光顕微鏡により形質導入率を確認するか、フローサイトメトリー（FACSまたはGuava）で正確な形質転換率を計算します。

3日目+ (オプション)

- ① 形質導入された細胞をFACSで選別し、抗生物質耐性で選択します。特定の細胞株に対する抗生物質の死滅曲線を決定するために、パイロット実験を行う必要があります（安定した細胞株の生成に関する関連文献を参照してください）。

フィルターの 波長設定

- BFPフィルター：～Ex380～Em460
- CFPフィルター：～Ex436～Em480
- GFPフィルター：～Ex450-490～Em525
- YFPフィルター：～Ex500～Em535
- RFPフィルター：～Ex545～Em620
- iRFPフィルター：～Ex690～Em715

浮遊細胞のトランスフェクション

必要に応じてCO₂インキュベーター内で、短時間プレート内の完全な懸濁培養培地で細胞を成長させ、細胞密度を測定します。密度が $\sim 3 \times 10^6$ 細胞/mlに達した場合、測定された生存率は90%を超えることが予想されます。完全培地で細胞を 1×10^6 細胞/mlに希釈します。

1日目

- ① レンチウイルス粒子を室温で解凍します。
- ② Pre-madeレンチウイルス粒子を、0.5mlの細胞あたり50～100 μ lのウイルスの比率で希釈細胞に追加します（※細胞の種類によっては、より多くのレンチウイルスを使用するか、PBS溶液中の濃縮レンチウイルスを使用する必要があります）。
- ③ CO₂インキュベーターで細胞を成長させます。

2-3日目

- ① 形質導入後48～72時間で、関連する抗生物質を含む新鮮な培地に細胞を入れます。
※抗生物質の量は細胞の種類によって異なります（細胞の種類によって、抗生物質の殺傷曲線をテストする必要があります）。CO₂インキュベーターで細胞を成長させ続けます。

2-3日目

- ① 形質転換後48～72時間で、蛍光顕微鏡で蛍光を確認するか、FACSやGuavaなどのセルソーターを使用して形質転換効率を計算します。蛍光陽性細胞を選別し、抗生物質の選択を維持して、安定した細胞株を生成します。

フィルターの 波長設定

- BFPフィルター: \sim Ex380 \sim Em460
- CFPフィルター: \sim Ex436 \sim Em480
- GFPフィルター: \sim Ex450-490 \sim Em525
- YFPフィルター: \sim Ex500 \sim Em535
- RFPフィルター: \sim Ex545 \sim Em620
- iRFPフィルター: \sim Ex690 \sim Em715

安定発現株の作成にPre-madeレンチウイルス粒子を使用できますか？

安定発現株の作製に使用可能です。

Pre-madeレンチウイルス粒子は、異なる選択マーカを含むので、形質導入後に薬剤選抜できます。

恒常的に発現する安定細胞株を作製するためには、標的遺伝子は宿主細胞のゲノムに組み込まなければなりません。ランダムな組み込み（例えばプラスミドトランスフェクション）は、組み込み部位の転写レベルに応じて発現の大きな変動性を示します。また、ランダムな組み込みは、しばしば、標的遺伝子と選択マーカ-の独立した組み込みとなり、陽性クローンの選択のために大規模スクリーニングが必要となります。一般に、耐性クローンの10%未満が導入遺伝子を発現します。対照的に、レンチウイルスは、完全なウイルスゲノムを活性転写部位またはホットスポットに組み込みます。その結果、ほとんどの耐性クローンは導入遺伝子の発現を示し、コロニー選択をより容易にします。

従来の安定発現株作成と比較して、レンチウイルスは、標的遺伝子は選択マーカ-と共発現し、はるかに高い陽性クローン率を示します。費用、労力、時間は、トランスフェクションに基づく安定発現株の作製よりも実質的に低いといえます。

GenTarget社のレンチウイルスベクターシステムを使用するのは安全ですか？

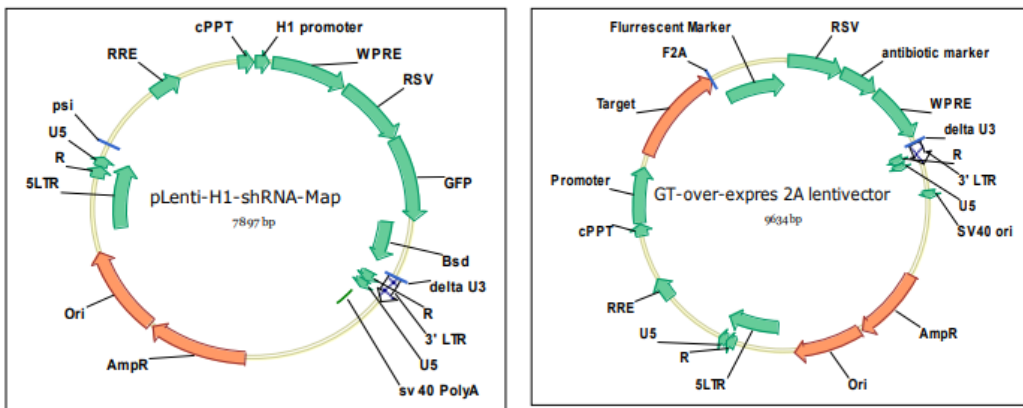
本製品は、自己複製能力欠損型のレンチウイルスです。

使用されているレンチウイルスベクターは、HIV-1（ヒト免疫不全ウイルス1）由来のプラスミドで、目的の遺伝子をこのレンチウイルスベクターにクローン化し、メーカー独自のパッケージングミックスを用いて、293T細胞に形質導入して生産します。本製品のレンチウイルスベクターには、レンチウイルスベクター用に開発された最も高度なバイオセーフティー機能が含まれています。

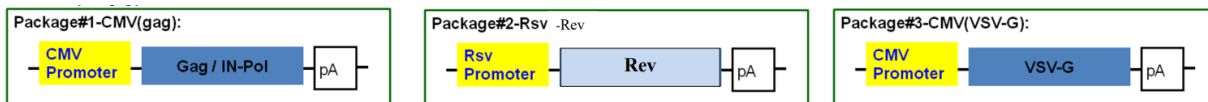
- ウイルスエンベロップ（VSVG）およびアクセサリタンパク質（gag-polおよびrev）は、発現レンチウイルスベクターと分けられており、相同組換えの可能性を最小限にしています。一度ウイルス粒子がパッケージされると、複製に必要なパッケージング成分は除外されます。Sf1t-1、vif、nefなどの病原性遺伝子、HIV-1ウイルスに由来するその他の有害な遺伝子は含まれていません。
- SIN（3'-LTR self-inactivation）機構を含む第3世代のレンチウイルスシステムに由来します。これらの機能は、Pre-madeレンチウイルス粒子が自己複製不能であることを保証します。

▶ GenTarget社の発現レンチウイルスベクターマップ

※プロモーターはCMVまたはEf1aまたは他のプロモーターである可能性があり、ターゲットは任意のORFまたはレポーター遺伝子である可能性があります。



▶ パッケージングプラスミド



※レンチウイルス粒子は注意してお取り扱いください。CDCは、レンチウイルス粒子がバイオセーフティーレベル2の生物として扱われることを示唆しています。本製品に使用されるレンチウイルスベクターは複製不能レンチウイルスのみを生成しますが、バイオセーフティーレベル2（BSL-2）の施設が必要です。人間の細胞に感染する形質導入レンチウイルス粒子を使用しているということに、十分注意してください。レンチウイルス粒子を取り扱うときは常に手袋を着用してください。安全上の問題の詳細については、CDCおよびNIHのウェブサイトを参照してください。これらの製品は、治療用途、臨床用途、またはその他の用途ではなく、研究用途にのみ使用されます。

MOIとは何ですか？

MOI（感染効率）は、感染細胞集団における標的細胞ゲノム当たりのレンチウイルス粒子の平均コピー数、または細胞当たりのウイルス粒子数です。全ての粒子が細胞に感染するわけではないので、MOIは感染した細胞の割合に直接関係するわけではありません。

MOIは、形質導入に使用される細胞数およびウイルス粒子数を数えることによって算出されます。MOIが高ければ、より多くの組込みが起こり、より高レベルの発現が生じます。特定の用途に最適な発現を得るには、MOIの範囲（例：1～20）をテストする必要があります。理論的には、単一コピーの組込みを達成するために、MOIは1未満（MOI = 0.3など）であるべきです。しかし実際には、MOI = 0.3では、わずか5～20%の細胞にしか形質導入されず、細胞型に依存し、形質導入細胞の大部分はインサートのコピーを1つしかもちません。ほとんどの実験では、24wellプレートで50 μ l/well 使用すれば、MOIの計算は不要です。

レンチウイルスの力価はどのように測定されますか？

Pre-madeレンチウイルス粒子の各ロットの力価は、Guava細胞選択または顕微鏡を用いた蛍光細胞計数によって測定します。そして、各蛍光陽性細胞は、1つの感染機能ユニット（IFU）として数えられます。全体の陽性蛍光細胞は、蛍光細胞の割合および形質導入時の全細胞数に基づいて計算されます。

最終力価は、ウイルスストック1ml中のトータルのIFUです。非蛍光粒子の場合、力価はP24タンパク質レベルをELISAによってng/mlとして測定しました。P24値は、TU単位、IU単位またはIFU単位に変換することができます。しかし、異なる細胞型は異なる変換比率を有し、P24値は真のIFU単位と一致しない場合があります。一般的に、すべての力価（IFU、TU、IU）は参考に用いられ、実際の生物力価は細胞型に依存します。GenTarget社の蛍光標識レンチウイルス粒子は、蛍光シグナルの可視化により、真の形質導入効率の迅速かつ容易な測定を可能にします。

使用できる細胞型について

本製品による遺伝子導入は、細胞のレンチウイルス感染効率に依存します。そのため文献等であらかじめ目的の細胞のレンチウイルス感染効率をご確認ください。

本製品は、HEK293細胞で機能することがメーカーでテストされています。

感染効率が未知である場合は、実験時にHeLa細胞などのレンチウイルスが感染可能なことが確認されている一般的な細胞（できればメーカーが検証済みのHEK293細胞）を感染コントロールとしてご用意いただくことをお勧めいたします。

一般的な細胞で感染が確認できない場合は、製品不良の可能性がございますので、ご購入代理店または弊社までご連絡ください。
お問い合わせ先：試薬部 biosupport@filgen.jp

注文時に必要な書類はありますか？

本製品はカルタヘナ法該当製品のため、ご注文の際に「ご使用者確認書」のご提出をお願いしております。フォーマットは下記URLよりダウンロード可能です。

ご使用者確認書：<https://filgen.jp/Product/Bioscience4/GenTarget/kakuninsho.pdf>

ユーザー様の使用施設における使用申請に際し、必要な情報が不足していないかどうか、注文前にご確認いただくことをお勧めいたします。（※配列情報等、開示不可の場合があります。）

製造元



GenTarget Inc
Gene-Delivery Made Easier!

Gentarget Inc.

7930 Arjons Drive, Suite B San Diego, CA 92126

TEL : 858-6788683 FAX : 800-3804198

URL : www.gentarget.com

輸入販売元



フィルジェン 株式会社

【お問い合わせ】

〒459-8011 愛知県名古屋市緑区定納山1丁目1409番地

TEL : 052-624-4388 FAX : 052-624-4389

E-mail : biosupport@filgen.jp URL : <https://filgen.jp/>

代理店

(Sep. 2022)