高速冷却遠心機 Avanti JXN-30 を使用したレンチウイルス・ベクターの調製法

高速冷却遠心機
Avanti™ JXN-30

高速冷却遠心機 Avanti JXN-30 およびスウィングロータ JS-24.38 を使用したレンチウイルス・ベクターの調製法

ウイルスベクターは、哺乳類動物細胞への遺伝子発現や遺伝子抑制などの遺伝子操作によく使用されます。中でもレンチウイルスは、幹細胞などの分裂細胞や非分裂細胞によく使用されるウイルスベクターです。ウイルスベクターを細胞に感染させる際に、タイター（力価）が高くなるようにウイルス粒子を濃縮する必要があり、特に多数の細胞への感染や、トランスダクションに耐性がある細胞に使用する際は重要になります。遠心法は、簡単で効果的なウイルスの精製方法です。本アプリケーションノートでは、2 例の方法を紹介します。また、これらの方法は、核酸サンプル調製又は電子顕微鏡法のような他の研究のためにウイルス粒子を濃縮するためにも使用できます。

Polyethylene Glycol (PEG) を用いたレンチウイルスの濃縮

1. トランスフェクトした細胞を培養して得たウイルス含有培養上清を回収し、0.45 μm フィルターに通して浮遊細胞やデブリスを除去します。
2. 最終 PEG 濃度が 10%になるように 40% PEG 溶液を加え、混合します。混合液を氷上で 3 ～ 6 時間インキュベートします。
3. 2,000 xg で 30 分間遠心します。（卓上遠心機 Allegra X-30R, スウィングロータ SX4400 等を使用）
4. 上清を廃棄します。ウイルス粒子のペレットに、最初のサンプル液量の 1/20 量の溶媒（PBS など）を加えて、ピペッティングで撹拌します。
5. さらに濃縮するために、滅菌した超遠心用チューブにサンプルを移します（製品番号 326823 PA チューブ 38.5 mL, 製品番号 358126 コニカル PA チューブ 31.5 mL などの オートクレーブ可能チューブをご使用ください。詳細は裏面のチューブ欄をご参照ください）。
6. チューブをバケットに入れ、バランスをとります。
7. JS-24.38 を用いて 100,000 xg（23,600 rpm）で 4℃ 90 分間遠心します（Avanti JXN-30 を使用）。
8. ペレットを崩さないように、デカンテーションまたはピペットを用いて上清を除きます。
9. PBS などの溶媒で懸濁します。すべてのペレットを溶解させる必要がある場合はピペッティングまたは撹拌を数分行います。
10. 分注し、所定の温度で保存します。長期間保存する場合は、超低温で保存することを推奨します。

ショ糖溶液クッションを用いたレンチウイルスの濃縮

1. トランスフェクトした細胞を培養して得たウイルス含有培養上清を回収し、0.45 μm フィルターに通して浮遊細胞やデブリスを除去します。
2. 滅菌した超遠心用チューブに、20% ショ糖溶液 3 ～ 5 mL を注意深く底に加えます。これがショ糖溶液クッションとなります（製品番号 326823 PA チューブ 38.5 mL, 製品番号 358126 コニカル PA チューブ 31.5 mL などの オートクレーブ可能チューブをご使用ください。詳細は裏面のチューブ欄をご参照ください）。
3. クッションを崩さないように、濾過したウイルス含有培養上清を重層します。
4. チューブをバケットに入れ、バランスをとります。
5. JS-24.38 を用いて 103,900 xg（24,000 rpm）で 4℃ 105 分間遠心します（Avanti JXN-30 を使用）。
6. ペレットを崩さないように、デカンテーションまたはピペットを用いて上清を除きます。
7. PBS などの溶媒で懸濁します。すべてのペレットを溶解させる必要がある場合はピペッティングまたは撹拌を数分行います。
8. 分注し、所定の温度で保存します。長期間保存する場合は、超低温で保存することを推奨します。

BECKMAN COULTER

参考文献

1. Lentiviral vector production—DS-12662A.
2. Miest T, Saenz D, Meehan A, Llano M, Poeschla E; Intensive RNAi with lentiviral vectors in mammalian cells—*Methods*. 2009 April;47(4): 298–303.
3. Houzet L, Morichaud Z, Didierlaurent L, Muriaux D, Darlix JL, Mougel M; Nucleocapsid mutations turn HIV-1 into a DNA-containing virus—*Nucleic Acids Res*. 2008 April; 36: 2311–2319.

ウイルス研究を行っている論文例

1. Thomas H. Hutson, Edmund Foster, John M. Dawes, Robert Hindges, Rafael J. Yáñez-Muñoz, and Lawrence D.F. Moon; Lentiviral vectors encoding shRNAs efficiently transduce and knockdown LINGO-1 but induce an interferon response and cytotoxicity in CNS neurons—*J Gene Med*. 2012 May; 14(5): 299-315.
2. Hind J. Fadel , Dyana T. Saenz, and Eric M. Poeschla; Construction and Testing of orfA +/- FIV Reporter Viruses—*Viruses*. 2012; 4(1): 184-198.
3. Izquierdo-Useros N, Lorizate M, Contreras F-X, Rodriguez-Plata MT, and Glass B; Sialyllactose in Viral Membrane Gangliosides Is a Novel Molecular Recognition Pattern for Mature Dendritic Cell Capture of HIV-1—*PLoS Biol*. 10(4): e1001315.
4. Andrea Cerutti, Patrick Maillard, Rosalba Minisini, Pierre-Olivier Vidalain, Farzin Roohvand, Eve-Isabelle Pecheur, Mario Pirisi, and Agata Budkowska; Identification of a Functional, CRM-1-Dependent Nuclear Export Signal in Hepatitis C Virus Core Protein—*PLoS One*. 2011;6(10): e25854.
5. Alessia Zamborlini, Audrey Coiffic, Guillaume Beauclair, Olivier Delelis, Joris Paris, Yashuiro Koh, Fabian Magne, Marie-Lou Giron, Joelle Tobaly-Tapiero, Eric Deprez, Stephane Emiliani, Alan Engelman, Hugues de Thé, and Ali Saïb; Impairment of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Integrase SUMOylation Correlates with an Early Replication Defect—*J Biol Chem*. 2011 June 10; 286(23): 21013–21022.
6. Cho E-G, Zaremba JD, McKercher SR, and Talantova M, Tu S; MEF2C Enhances Dopaminergic Neuron Differentiation of Human Embryonic Stem Cells in a Parkinsonian Rat Model—*PLoS One*. 2011; 6(8): e24027.
7. Tanner Miest, Dyana Saenz, Anne Meehan, Manuel Llano, and Eric M. Poeschla; Intensive RNAi with lentiviral vectors in mammalian cells—*Methods*. 2009 April; 47(4): 298–303.
8. Maria Elena Avale, Philippe Faure, Stéphanie Pons, Patricia Robledo, Thierry Deltheil, Denis J. David, Alain M. Gardier, Rafael Maldonado, Sylvie Granon, Jean-Pierre Changeux, and Uwe Maskos; Interplay of β2* nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion—*PNAS*. October 14, 2008; vol. 105 no. 41: 15991-15996.
9. Benjamin Hendrickson, Dinithi Senadheera, Suparna Mishra, Kim Chi T. Bui, XingChao Wang, Belinda Chan, Denise Petersen, Karen Pepper and Carolyn Lutzko; Development of Lentiviral Vectors with Regulated Respiratory Epithelial Expression In Vivo—*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. October 2007; vol. 37 no. 4: 414-423.
10. Amy S. Rawls, Alyssa D. Gregory, Jill R. Woloszynek, Fulu Liu, and Daniel C. Link; Lentiviral-mediated RNAi inhibition of Sbds in murine hematopoietic progenitors impairs their hematopoietic potential—*Blood*. October 1, 2007; vol. 110 no. 7: 2414-2422.
11. Xiao-Dong Han, Chin Lin, Judy Chang, Michel Sadelain , and Y. W. Kan; Fetal gene therapy of α-thalassemia in a mouse model—*PNAS*. May 22, 2007; vol. 104 no. 21: 9007-9011.
12. Kouki Morizono, Gene-Errol Ringpis, Nonia Pariente, Yiming Xie, and Irvin S.Y. Chen; Transient low pH treatment enhances infection of lentiviral vector pseudotypes with a targeting Sindbis envelope—*Virology*. 355 (2006): 71–81.
13. Stephan Kissler, Patrick Stern, Kazue Takahashi, Kara Hunter, Laurence B. Peterson and Linda S. Wicker; In vivo RNA interference demonstrates a role for Nrampl in modifying susceptibility to type 1 diabetes—*Nature Genetics*. Volume 38: no. 4(2006).

スウィングロータ JS-24.38

	最高回転数	最大遠心力	最大容量	製品番号	価格（税別）
JS-24.38	24,000 rpm	103,900 xg	6 × 38.5 mL	360743	￥1,550,000

JS-24.38 用チューブ例　＊下記はすべてオートクレーブ可能なチューブです。

チューブ		製品番号	価格（税別）	アダプタ / スペーサー製品番号	価格（税別）
PA チューブ	38.5mL、50 本入、25 x 89mm	326823	￥29,500		
コニカル PA チューブ	31.5mL、50 本入、25 x 89mm	358126	￥18,000	358156（6 個入）	￥6,700
コニカル PA チューブ	25mL、50 本入、25 x 76mm	358125	￥19,000	358156（6 個入）	￥6,700
肉厚 PA チューブ	30mL、25 本入、25 x 89mm	355642	￥28,000		
QSPA チューブ＊	33mL、50 本入、25 x 83mm	344623	￥26,000	355536（1 個入）	￥5,600
QSPA チューブ＊	27mL、50 本入、25 x 64mm	343665	￥27,000	355536（1 個入）	￥5,600
QSPA チューブ＊	15mL、50 本入、25 x 38mm	343664	￥26,000	355536（1 個入）	￥5,600
コニカル QSPA チューブ＊	22.5mL、50 本入、25 x 76mm	358654	￥15,000	358156（6 個入）/ 355536（1 個入）	￥6,700 / ￥5,600
コニカル QSPA チューブ＊	8.4mL、50 本入、25 x 38mm	358652	￥15,400	358156（6 個入）/ 355536（1 個入）	￥6,700 / ￥5,600

＊QSPA チューブをご使用の際は、製品番号 358312 コードレスチューブトッパシーリングキット ￥72,000（税別）が別途必要です。

ベックマン・コールター株式会社

本　社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 0120-566-730　☎ 03-6745-4704　FAX 03-5530-2460

e-mail bckkcas@beckman.com　URL http://www.beckmancoulter.co.jp

本内容は予告なく変更する場合がありますのでご了承ください。

2015.06（BCKK）