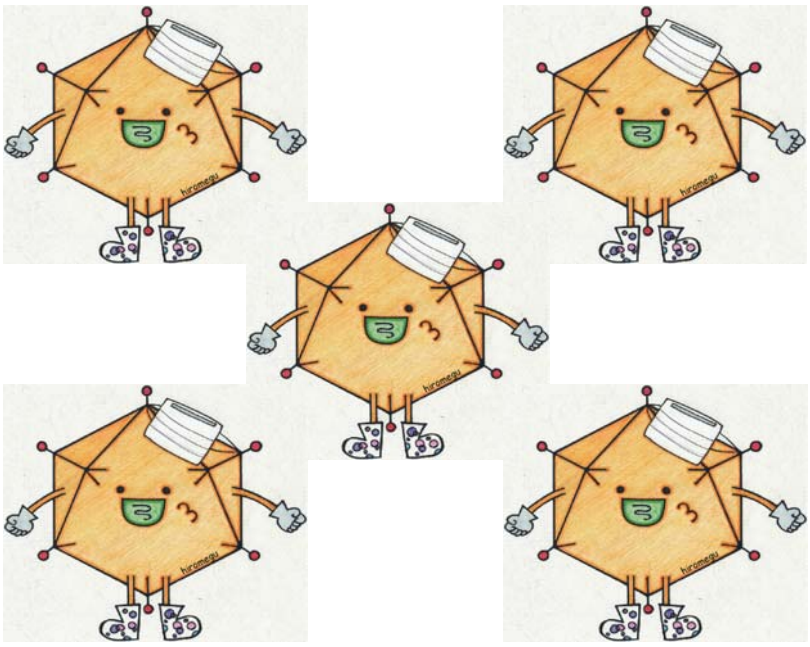
組換えアデノウイルス作製マニュアル
～ 完全長ゲノム導入法 ～

平成23年2月10日版



Aden君

独立行政法人理化学研究所　バイオリソースセンター

遺伝子材料開発室

www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/

目次

アデノウイルスベクター、完全長ゲノム導入法の説明 ・・・ 3

材料 ・・・ 4

取り扱いの注意点 ・・・ 6

組換えアデノウイルス実験概要 ・・・ 8

プロトコール

＜A＞ 1次ウイルスの作製 ・・・ 16

＜B＞ 2次ウイルスの作製と組換えアデノウイルスDNAの構造確認 ・・・ 21
（切断パターンテスト）

＜C＞ 目的ウイルス株の3次ウイルス、4次ウイルス作製 ・・・ 28

＜D＞ 組換えウイルスの超遠心による大量調製 ・・・ 30

＜E＞ ウイルス力価測定 ・・・ 33

＜F＞ ウイルス使用法の実際 ・・・ 38

＜G＞ コスミドベクターのパッケージング ・・・ 39

＜H＞ ウイルス産生用コスミドベクターDNAの調製 ・・・ 40

参考文献 ・・・ 43

作製済み組換えウイルスを入手した場合 **差し込み文書１**

参考資料 ・・・ 46

アデノウイルスベクター、完全長ゲノム導入法の説明

組換えアデノウイルスは、高い遺伝子導入効率と強力な遺伝子発現によって、近年は遺伝子治療の基礎研究だけでなく、培養細胞及び動物個体を用いた遺伝子機能の解明に広く使われている。レトロウイルスとは異なり、導入された遺伝子を染色体に組み込む機構を持たないため遺伝子の発現は一過性であるが、休止期の細胞へも遺伝子導入を行うことが可能で、ヒト、マウス、ラットなどの神経系を含む多くの分化・未分化動物培養細胞で非常に高い発現効率を示す。また、非増殖型アデノウイルスはウイルスゲノムからウイルスの増殖に必須な初期遺伝子であるE1A・E1B遺伝子を欠失させてあるため、E1A・E1Bを恒常的に発現している293細胞内でしか増殖できないよう設計されており、通常の実験に用いる培養細胞や動物個体内ではウイルスの増殖に伴う細胞死は起こらない。すなわち組換えアデノウイルスを動物個体に注入しても細胞を死滅させずにその機能を調べることができるため、*in vivo*法が可能である。

E1A・E1B遺伝子は2873bp、E3遺伝子も1878bp欠失させてあるため、もともとウイルスのもつ約2Kbの余裕を含め、合わせて約7Kbの外来遺伝子をアデノウイルスに組込むことが可能となっている。

東京大学医科学研究所の斎藤ら（COS-TPC法; Miyake *et al.*, 1996）やGrahamらによって開発された方法によって、高効率の組換えアデノウイルス作製が可能になったが、最近では、作製効率がやや低くともより簡便で廉価な方法が望まれ、斎藤らはCOS-TPC (cosmid-terminal protein complex) 法で使用していたコスミドを改変し、「完全長ゲノムDNA導入法」を採用することによってCOS-TPC法よりも簡便で廉価なウイルスの作製を実現した(寺島ら, 2003; Fukuda *et al.*, 2006)。

この「完全長ゲノム導入法」では親ウイルスDNA を必要とせず、目的の遺伝子を挿入したコスミドだけで組換えアデノウイルスを作製することができる。また、平滑末端化したインサートDNA を直接コスミドベクター内のアデノウイルスゲノムに組込むため、シャトルプラスミドにクローン化する必要がない。

完全長ゲノム導入法では、組換えアデノウイルス作製効率がCOS-TPC法よりも一桁落ちるとされているが、通常のウイルス作製には十分な効率を得ることができ、また、この方法で確立しにくいクローンついては、作製したコスミドを利用してそのままCOS-TPC法による作製を行うこともできる。

斎藤らによって開発されたCOS-TPC法ならびに完全長ゲノム導入法のコスミドカセットについてはUgai et al. (2005, J. Gene Med. 7, 1148-1157) の総説で紹介している。

＊adenovirus, adenoviridae アデノウイルス科
正 20 面体構造 2 本鎖 DNA ウイルス。
ウイルス粒子は直径 80～110 nmで、直径 7～9 nm の 240 個のヘキソン（非頂点カプソメア）と 12 個のペントン（頂点カプソメア）からなる。ペントンはベースと末端にノブを持つ長さ 9～30 nm のファイバー突起からなる。カプシドの内側にタンパク質と分子量 20~30×10^6 の直鎖状 2 本鎖 DNA からなるコアがある。
ウイルス粒子にはエンベロープが無く脂質溶媒やトリプシンに耐性である。
浮上密度（CsCl）：1.33~1.35g/mL
ウイルスの成熟は核内でおこり、細胞の崩壊で放出される。

材料

＜試薬＞

- *Csp*45I　　他に*Nsp*V、*Bsp*T104I、*Bst*BIなど、切断部位が TTCGAA の酵素も使用可
- 5%ならびに10% FCS-DMEM
- PBS (-)
- 0.02% EDTA-PBS (-)
- transfection用試薬（Lipofectamine2000など）
- 無血清培地（OPTI-MEM Iなど）

- 1 M HEPES-NaOH, pH7.4　　HEPES: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid

  $C_8H_{18}N_2O_4S$=238.31

HEPES	119.2 g
H_2O	400 mL+ α
Total	500 mL

NaOHでpHを7.4に調製する。200 mlに対し、5N NaOH 10 ml程度。

- 0.2 M $MgCl_2$　　＊ビーカーに水を入れ、スターラーで撹拌しながらMgClを加えて完全に溶かす。250 mLにメスアップしてオートクレーブ滅菌する。

$MgCl \cdot 6H_2O$	10.2 g
(MgCl anhydrous	4.8 g)
H_2O	200 mL+ α
Total	250 mL

- TNE　　オートクレーブ滅菌する。

1 M Tris-HCl [pH 7.5]	20 mL	(final conc. 50 mM)
0.5 M EDTA [pH 7.5]	8 mL	(final conc. 10 mM)
NaCl	2.34 g	(final conc. 100 mM)
H_2O	350 mL	+ α
Total	400 mL	

- Proteinase K （10mg/mL）
- 10% SDS (w/v)
- PCR用試薬 [KOD dash (Toyobo)など]
- 10 mM HEPES, pH 7.4　　オートクレーブ滅菌する。
- 2.2 Mならびに4.0 M CsCl in 10 mM HEPES, pH 7.4　　オートクレーブ滅菌する。

＜機器＞

- 遠心機　TOMY　LX-130; rotor no.TS-39,TLA-11
- 遠心機　TOMY　MX-200; rotor no.ARO15-24
- 超遠心機　HITACHI　CS-120GX; rotor no.S100AT6

- ソニケーター　Cosmo Bio Bioruptor UCD200-TM
- チューブシーラー　HITACHI　tube sealer STF-2
- ボルテックスミキサー
- Water bath
- CO_2インキュベーター

・ コラーゲン（type I）コート細胞培養用シャーレ（6cm, 10cm）	6 cm, Iwaki, cat.# 4010-010 10 cm, Iwaki, cat.# 4020-010
・ コラーゲン（type I）コート細胞培養用平底プレート（96well, 24well）	96 well, Iwaki, cat.# 4860-010 24 well, Iwaki, cat.# 4820-010
・ コラーゲン（type I）コート細胞培養用ボトル（225cm^2）	225 cm^2, スミロンセルタイト MS-0480K

- ピペット（綿栓付き）各種
- ピペットマン用チップ（綿栓付き）各種
- チューブ各種

・ 200 nm　ステリフィリップGVフィルターユニット	Millipore, cat.# SE1M179M6
・ 450 nmステリフィリップHVフィルターユニット(ミリポア社)	Millipore, cat.# SE1M003M00
・ Amicon Ultra-15 遠心式フィルターユニット(MWCO, KDa 100 K , Millipore社)	Millipore, cat.# UFC910096

- ポリメチルペンテン（PMP）製 2L ビーカー（取っ手付き）

＜細胞＞

・293細胞

・HeLa細胞

理研バイオリソースセンター細胞材料開発室（http://www.brc.riken.jp/lab/cell/)など公的バンクから入手する。

取り扱いの注意点

＜細胞の培養について＞

細胞は、理研バイオリソースセンター細胞材料開発室などの公的バンクから入手し、1代目は6 cmディッシュ1枚に、2代目は10 cmディッシュ1枚に、3代目は10 cmディッシュ4~5枚に増やし、細胞保存液に再懸濁した細胞を40~50本に分注してストックしておく。ストックを一度起こしたら、培地に慣れさせるため2度継代してから使い始める。継代は20代以内に抑えること。

293細胞、HeLa細胞とも10% FCS-DMEMで培養する。ただし、ウイルス感染時には5% FCS-DMEMを使用する。

ウイルス作成時は細胞が剥がれるのを防ぐためにコラーゲンコートされたディッシュやプレートを用いるが、通常の継代ではその必要はない。

293細胞は非常に剥がれやすいため、慎重に操作を行うこと。

＜ウイルスの取り扱いについて＞

細胞にトランスフェクションして得られた組換えアデノウイルスは、旧指針では「ベクター」として扱われていたが、現在では「組換え生物」として扱うことになっている（宿主：ヒト5型アデノウイルス、供与核酸の名称：組み込まれた遺伝子名、感染細胞：ヒト293細胞（ウイルス増殖細胞））。よって実験は、平成16年2月19日施行の「遺伝子組換え生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（遺伝子組換え生物等規制法）」、「研究開発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（二種省令）」、および所属機関の安全管理規程に従うこと。また、組換えアデノウイルスは、P2レベルの実験施設で、その施設内に設置されたクラスIIの安全キャビネット内で取り扱うこと。作業中、マイクロピペット、指先など、ウイルス液に触れる可能性があるところは、こまめにアルコール綿でぬぐうこと。ウイルス取扱い作業を終えた安全キャビネットは、30分以上の紫外線照射の後で使用すること。

増殖型、非増殖型に関わらず、組込む遺伝子が二種省令・別表第一（第四条関係）・三ロに該当する場合、これをマウス個体に導入する実験も大臣確認実験になる。（例えばヒト由来ポリオウイルス受容体をマウス個体に導入するなど。）

＊研究開発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・別表第一（第四条関係）、三ロ

「宿主が動物である遺伝子組換え生物等であって、供与核酸が哺乳動物等に対する病原性がある微生物の感染を引き起こす受容体（宿主と同一の分類学上の種に属する生物が有していないものに限る。）を宿主に対し付与する遺伝子を含むもの」

＜廃棄について＞

ウイルスによって汚染されたものは、P2レベルの実験施設内に設置されたオートクレーブによって121℃、20分滅菌した後、所属機関の安全管理規定に従い廃棄すること。（アデノウイ

ルスは熱に弱く、65℃・30分で失活する。）
オートクレーブバックだけでは穴が開くことが多いので、2Lの耐熱性ビーカー（ポリメチルペンテン製など）を買っておき、実験に用いたチップ、ピペット、ウイルス廃液などはそちらに捨てるようにし、ビーカーごとバックに入れてオートクレーブをかけると良い。

＜汚染による感染性について＞
多くの組換えアデノウイルスは293細胞以外では増殖しないので、一般のウイルスのようにヒトで感染増殖してカゼ症状を起こしたり、ヒトからヒトへ伝播していく可能性は低い。しかし、ヒト細胞に感染すれば、高率に核内へ遺伝子を運び、組み込んだ遺伝子を発現することが当然考えられる。
高濃度ウイルス液を誤って手につけた場合、その人がウイルス病になる可能性は低いと考えられるが、手の皮膚の細胞で目的遺伝子の発現が起こることは有り得るため、発現タンパクの生理活性や発現タンパクに対する抗体産生等の生体反応の方が問題となる。したがって、直ちにP2レベルのウイルスとしての消毒が必要になる。

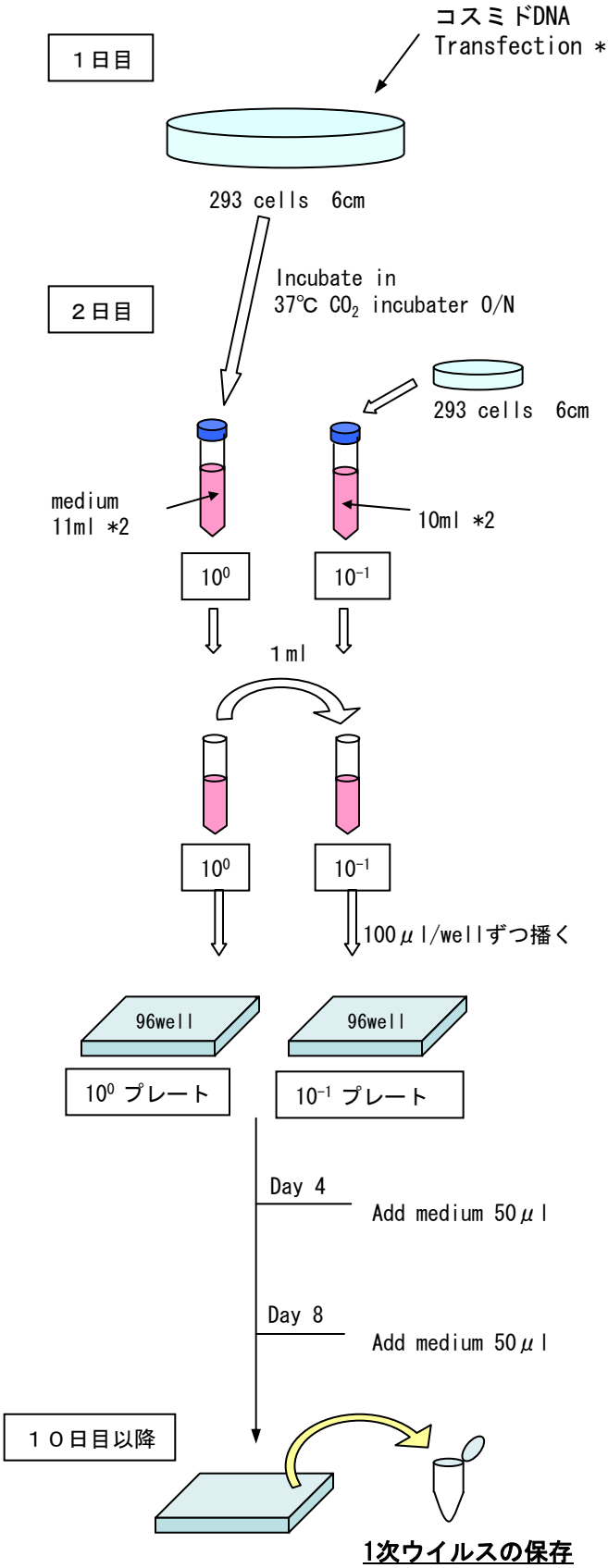
＜汚染時の消毒法について＞
消毒法については、アデノウイルスはエンベロープを持たずタンパクの殻を被っているため、タンパクを変性させれば失活することを覚えておくと良い。
アルコールではタンパク変性する濃度なら失活するが、細胞膜由来のエンベロープをもつウイルス群に比べると、アデノウイルスはアルコールに強いほうである。タンパクを変性させることを考えると石鹸で洗う方が効果が高いと言える。
10% SDSで消毒し、70%エタノールでSDSごと拭き取るのが効果的だが、実験中などはSDSは扱いづらいため70%エタノールだけを用いている。また、ヨード液（イソジン）による消毒も有効である。

＜輸送について＞
アデノウイルスは熱に弱いため、高温にさらされない輸送手段をとらなければならない。一方、ウイルスは37℃インキュベーター内での増殖は全く問題ない。我々の研究（Ugai *et al.*, Jpn J Cancer Res., 93: 598-603, 2002）では、ウイルス感染細胞を培養液ごと回収した粗ウイルス液であれば、著しい感染力価の低下無しに常温での輸送が可能であることがわかっている。従って、通常はドライアイスによる冷凍下での輸送が望ましいが、海外への輸送など、ドライアイスを用いた輸送が難しい場合は、常温での輸送でも、問題ないと思われる。
輸送には、スクリューキャップチューブなどの１次容器にアデノウイルス液を入れ、それをペーパータオル等の吸収材とともにハイブリバックに入れ熱シールをする。ハイブリバッグに入れることにより、仮にウイルス液が容器から漏れ出しても、ウイルス液の拡散を防止できる。また、ドライアイスによる凍結下の輸送では、高濃度のCO_2によりウイルス液のpHが下がり、感染力価を下げる原因になるため、ハイブリバッグへの封入は有効である。
輸送に際しては、組換えアデノウイルスが遺伝子組換え生物であることから、「遺伝子組換え生物等規制法」、海外への輸送に際しては「カルタヘナ条約」、ならびに関係法令、所属機関の定める規則に則った手続きをすること。

組換えアデノウイルス実験概要

I	コスミドベクター作製	コスミドカセット調製 インサート調製 Ligation Packaging DNA check
II	Csp45I cut 精製	
III	1次ウイルス作製	Transfection (6cm dish) 播き換え（96well plate） 培地添加×2 1次ウイルス回収
IV	2次ウイルス作製（24well plate）	293細胞、2次ウイルス回収 HeLa細胞、RCA check ・CPE ・PCR
V	3次ウイルス作製（6cm dish）	感染 回収
VI	4次ウイルス作製（10cm dish）	感染 回収
VII	精製	
VIII	力価測定	
IX	RCA check	
X	実験 *in vitro* *in vivo*	

１次ウイルス作製



● 安全キャビネットの中に入れる物は、アルコールをかけて入れる。チップ捨て用プラスチックビーカーには薄めたイソジン液、キャビネット内にはエタノールとイソジン液（50 ml tube）を準備。

*1　遺伝子導入は、１個の細胞に１個のコスミドが入るくらいの効率で良い。

● コスミド導入後の廃液は、ウイルスが居るものとして、ピペットで集めてイソジン入りのプラスチックビーカーに入れる。アスピレーターでは扱わないこと。

*2　培地は、コンタミしないように小分けにして温めておく。

● はじめにトランスフェクションしていない方のHEK293細胞をディッシュからはがす。細胞がくっつくのを防ぐために、氷上に置いておく。

● 以下の操作では泡立てないこと。泡がはじけると、遊離しているウイルスが飛び散り、コンタミの原因になる。

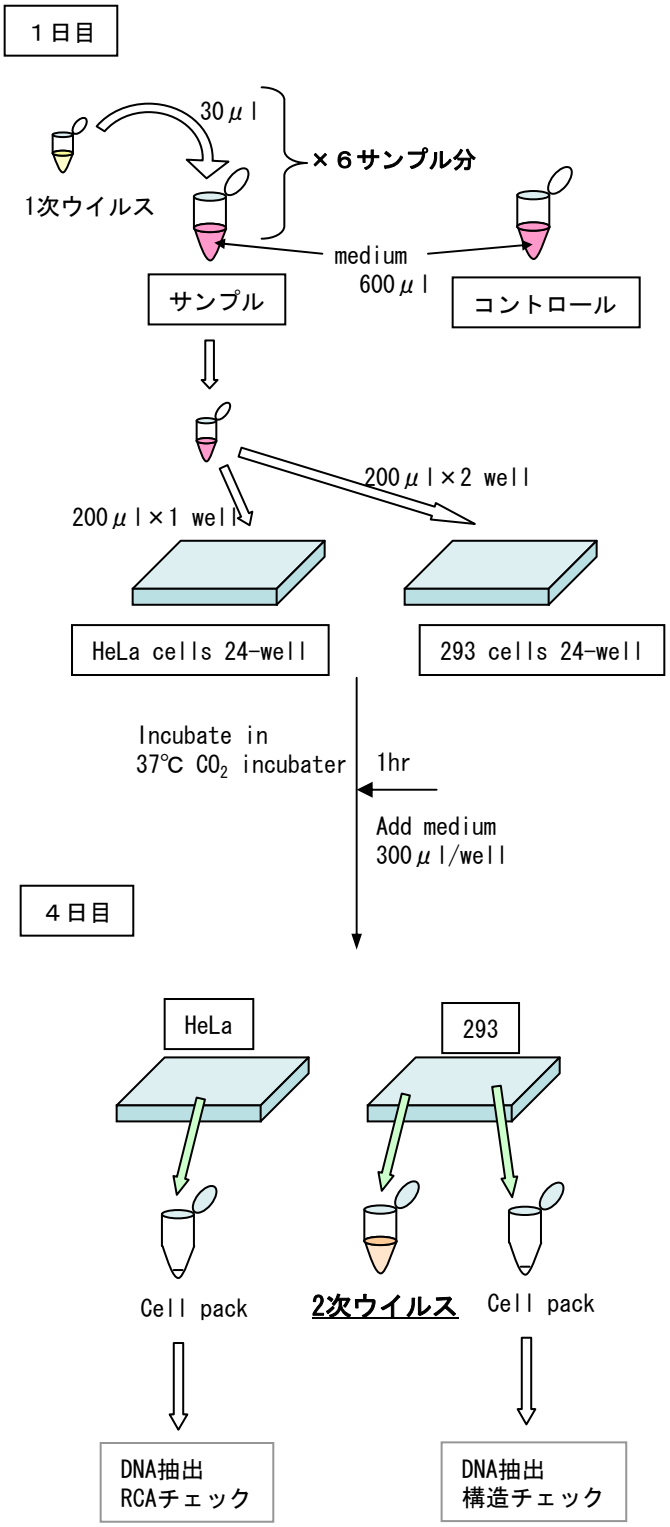
● 10 mlピペットで数回液を出し入れして、細胞を懸濁し、リザーバーに細胞懸濁液を移す。８連ピペッターでプレートに分注する。ウイルスの少ない10^{-1} の方をはじめに播く。播き終わって液が残っているが、リザーバーはそのまま10^0 用に使用する。

● ダメージが見られる前に、ウイルスの少ない方のプレートから培地を加えていく。チップは、１列分ごとに１回ずつ交換すること。１プレートにつき１箱を使うことになる。

● チップを交換するたびにピペッターの先端をアルコール綿でぬぐうこと。

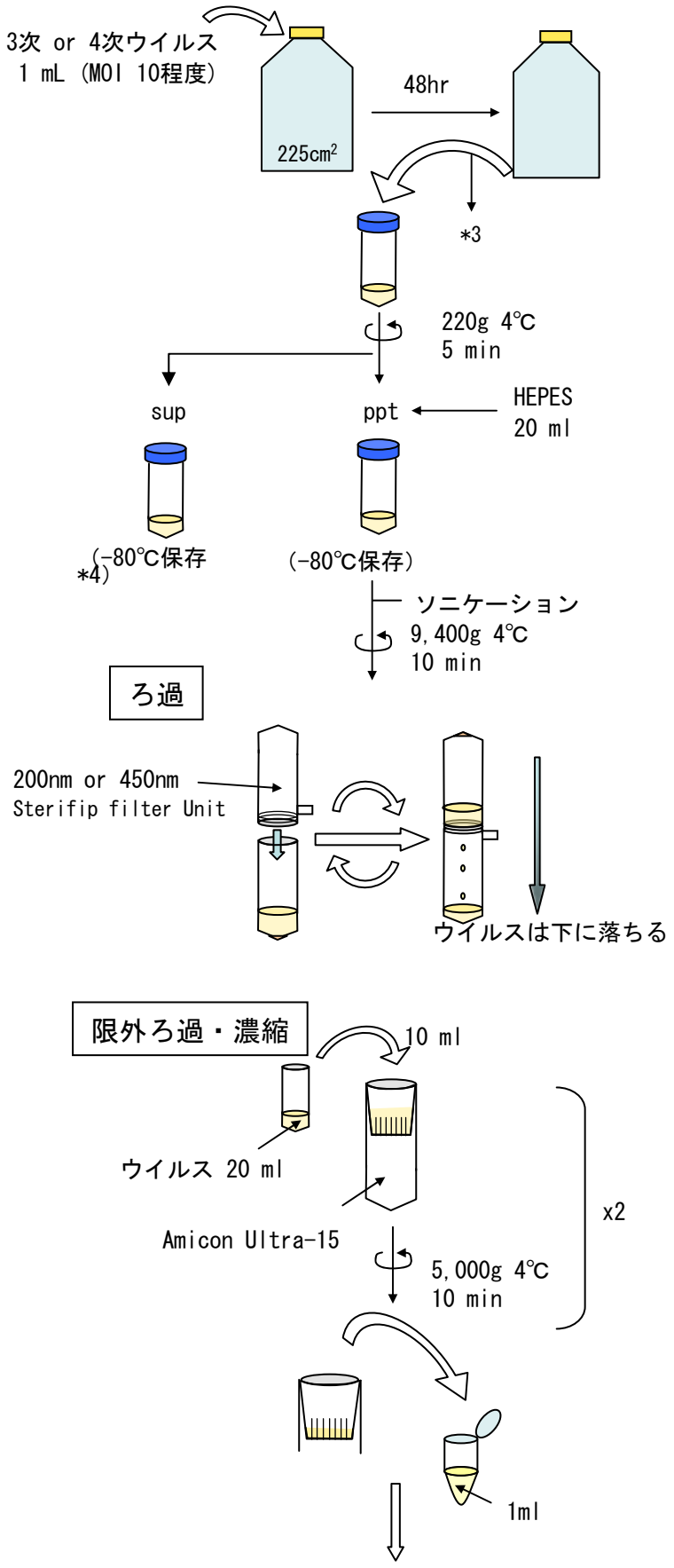
● 10日目以降、死細胞を毎日回収していく。

２次ウイルス作製



- 安全キャビネット内にアルミ箔を敷いておくと、こぼれたときも処理しやすい。
- 以下の操作では泡立てないこと。泡がはじけると、遊離しているウイルスが飛び散り、コンタミの原因になる。
- ここでの回収は、HeLa 細胞に変化が観察されない（RCA のない）ウェルについてのみ行う。
- DNA抽出用の細胞は、遠心の後、上清を捨て、ペレット状にして -80℃で保存する。
- 2次ウイルス液をすぐに使わない場合は、粗ウイルス液としてそのまま （培地ごと）-80℃で保存する。

ウイルス精製



- 48 hr後に培養液ごと細胞を回収。
  遠心し、培養液を10 mM HEPES (pH 7.4)
  20 ml に置き換える。 (-80℃保存)

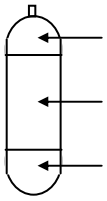
*3　一部 (500μl くらい) をウイルスの構造チェックに使用する。遠心分離の後、上清を除き、cell packを-80℃保存しておく。

*4　保険として上清を-80℃保存する。

- 遠心後、ろ液を新しい50 mlチューブに取分け、次の限外ろ過に用いる。
- Sterifip filter Unit (200nm or 450nm)
  を用いて限外ろ過を行う

- ウイルス液を10 ml×2回に分けて限外ろ過を行い、1 mlまで濃縮する
- フィルターユニットをはずし、ろ液を別の50 ml チューブに取り分けておく。
- 濃縮ウイルス液を1.5mlチューブに回収する

密度勾配遠心



①ウイルス液　1 ml

②2.2 M CsCl　3 ml

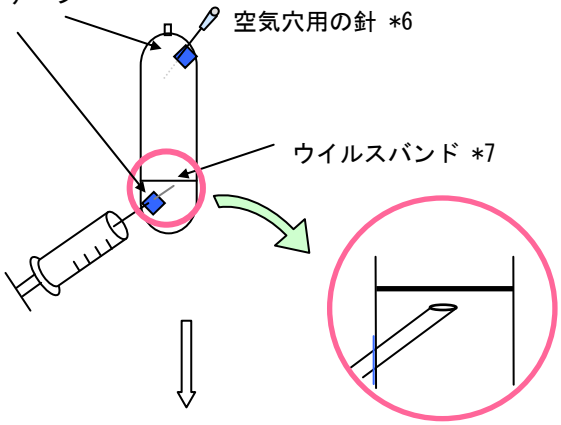
③4.0 M CsCl　1 ml

604,000g 4℃ 15 min∽

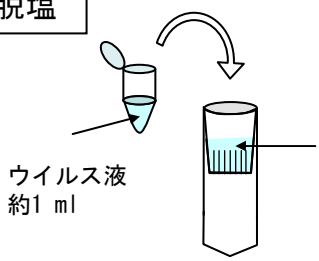
ビニールテープ

空気穴用の針 *6

ウイルスバンド *7



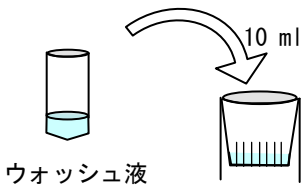
脱塩



ウイルス液
約1 ml

ウォッシュ液
10 ml

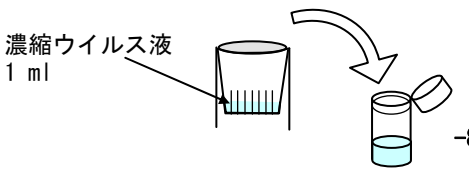
2,500g 4℃ 5 min *8



10 ml

ウォッシュ液

2,500g 4℃ 5 min



濃縮ウイルス液
1 ml

-80℃保存

力価測定

- 安全キャビネット内にアルミ箔を必ず敷いておくこと。こぼれたとき、処理が容易。

- 液の重層
  ① ウイルス液
  ② 2.2M CsCl
  ③ 4.0M CsCl
  の順に、それぞれの液の下層に重層する*5

*5　界面を乱さないようにゆっくり注入する。

- シリンジでウイルスバンドを回収する

*6　針を刺すところにビニールテープを貼っておく。液漏れ防止。

*7　約1 ml 回収するので、バンドより下に針を刺す。

- 針の先をウイルスのバンドと平行にして回収する。

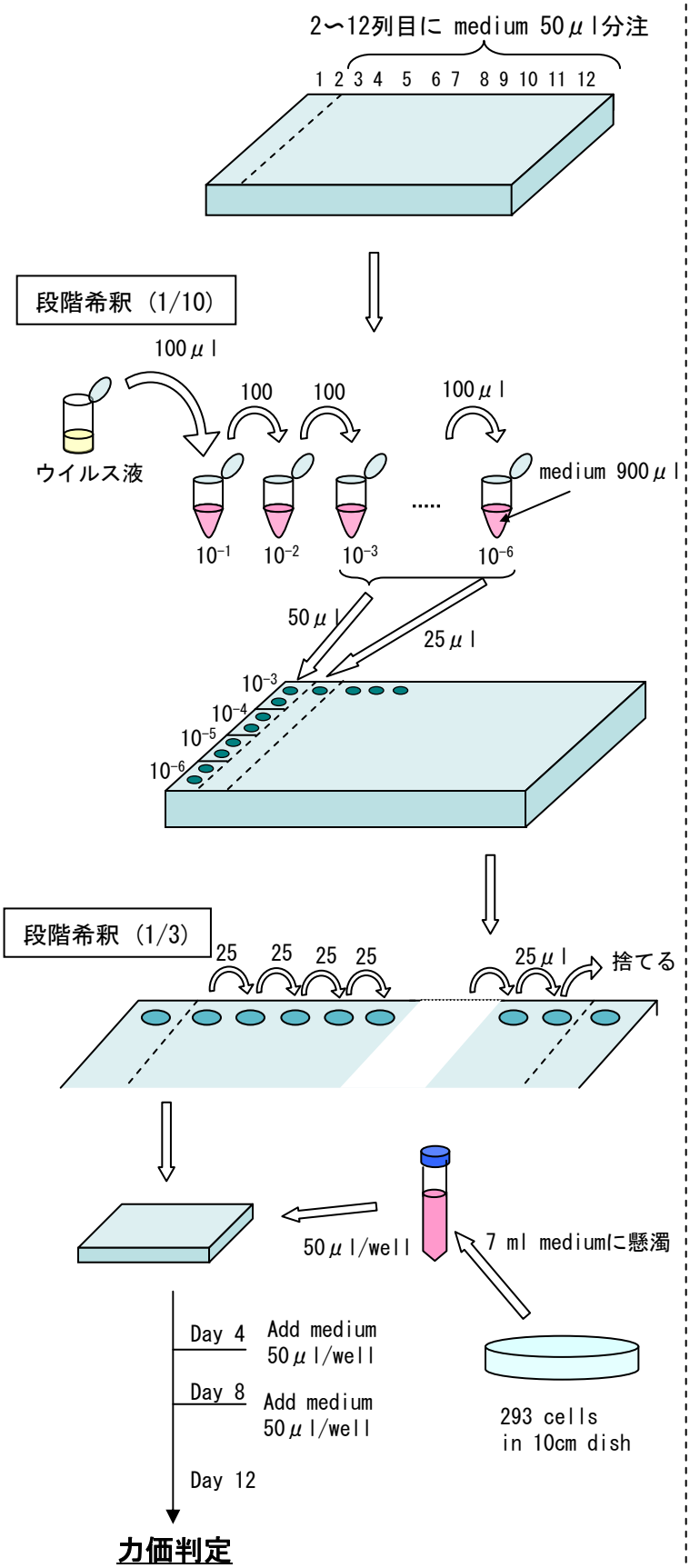
- Amicon にウォッシュ液10mlを入れておき、回収したウイルス液1mlを加える

*8　濃縮しすぎるとウイルスがアグリゲーションを起こし、力価が下がるので、1 ml 以下にはしないこと。

- 念のため、ろ液を別の50 ml チューブに取り分けておく。

- ウォッシュ液10 mlを加え、再度 遠心する。

力価測定・ウイルス感染



- リザーバーに培地 7 ml（使用量 + 2 ml）を入れておく。 *9

*9　同じチップでよい。

*10　ここに示したのは高力価ウイルスの力価測定である。

- Vortex でよく混和し、遠心によりフタについた液を落とす。

- 1列目：10^{-3}〜10^{-6}を50μlずつ分注
  2列目：10^{-6}を25μlずつ分注
  12列目：ウイルス液は入れない（ネガコン）

- 2〜11列で段階希釈 *11
  25μlずつ隣のwellに移す(Total 50μl) *12
  12列目はコントロールなので、11列目は捨てる

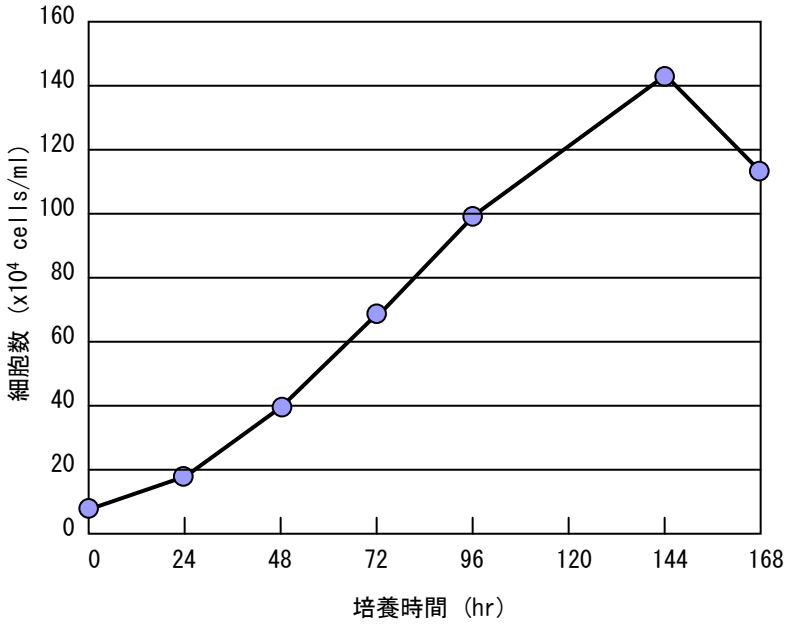
*11　正確な値を得るために、チップは列ごとに換える。

*12　液を加えるときは、ピペッティングしない。次のウェルに移す液を取るときは、回数を揃えてピペッティングする。

- 293細胞を培養液に懸濁する前に5 mlのPBS(-)で洗う。はがれやすいので注意すること。
- 細胞懸濁液をリザーバーに入れ、8連ピペッターで分注する。

293細胞の培養時間と細胞数
10 cm dishを使用し10 mlのDMEM+10% FCSで293細胞を培養したときの細胞数を計数した。

時間 (hr)	細胞数 (x10^4 cells/ml)
0	7.48
24	18.00
48	39.69
72	67.65
96	97.50
144	143.25
168	114.63



HEK293細胞の細胞数と各容器のサイズ
Falcon TC non-coat 10 cm dishを使用し293細胞を培養したときの値を基準に、容器面積から細胞数を換算した。

容器サイズ	面積 (cm^2)	培養液量(ml)	細胞数 (cells)
Falcon TC non-coat dish			
10 cm dish	59.0	10.0	$1.0x10^7$
Iwaki TC col I dish			
10 cm dish	55.0	10.0	$9.3x10^6$
6 cm dish	21.0	3.0	$3.6x10^6$
96 well plate	0.32	0.2	$5.4x10^4$
24 well plate	2.0	1.0	$3.4x10^5$
Greiner TC non-coat dish			
10 cm dish	58.0	10.0	$9.8x10^6$
6 cm dish	21.0	3.0	$3.6x10^6$
96 well plate	0.34	0.2	$5.8x10^4$
24 well plate	1.9	1.0	$3.2x10^5$
12 well plate	3.9	2.0	$6.6x10^5$
6 well plate	9.6	3.0	$1.6x10^6$
Sumilon Celltight flask			
225 cm^2 bottle	225.0	25.0	$3.8x10^7$

フローチャート

	Ⅲ 1次ウイルス作製(96well)
Day0	Transfection
Day1	播き換え 96well
Day2	Check
Day3	
Day4	培地添加 Check
Day5	
Day6	
Day7	
Day8	培地添加 Check!
Day9	
Day10	Check!
Day11	
Day12	Check!
Day13	Day10位から完全に細胞が死んだWellより回収
Day14	
Day15	
Day16	
Day17	
Day18	
Day19	
Day20	
Day21	
Day22	
Day23	
Day24	
Day25	
Day26	
Day27	
Day28	
Day29	
Day30	
Day31	
Day32	
Day33	
Day34	
Day35	
Day36	
Day37	
Day38	
Day39	
Day40	
Day41	
Day42	

ウイルス作製

	作製スケール	ウイルス回収までの日数	回収量	感染時ウイルス液使用量
1次	96 well	約10～14日	200 ul	10 ul
2次	24 well	約3日	500 ul	100 ul
3次	10 cm	約3日	10 ml	1 ml
4次～	225 cm^2	48時間	20 ml	（精製、力価判定）

	Ⅳ 2次ウイルス作製(24well)
Day0	感染
Day1	
Day2	Check
Day3	293が死滅したら2次ウイルス回収 RCA Check (CPE)
	DNA抽出、制限酵素による構造確認
	RCA check (PCR)

	Ⅴ 3次、4次ウイルス作製(6 cm、10 cm)
Day0	感染
Day1	
Day2	
Day4	回収(細胞が死滅したら)

	Ⅵ 4次、5次ウイルス作製(225cm^2)
Day0	感染
Day1	
Day2	回収(48h後)

Ⅶ ウイルス精製
精製

	Ⅷ 力価測定
Day0	感染
Day1	
Day2	
Day3	
Day4	培地添加
Day5	
Day6	
Day7	
Day8	培地添加
Day9	
Day10	
Day11	
Day12	力価判定

プロトコール

＜A＞ 1次ウイルスの作製

1種類のコスミドにつき、6 cmディッシュ2枚の293細胞を使用日に90～100%コンフルエントとなるようにあらかじめ用意しておく。1枚はトランスフェクション用、もう1枚は希釈プレート作成用となる。

(1) 目的のcDNAが挿入されたコスミドベクター30 µgを*Csp*45 I (注A-1)、100 U で切断し、フェノール抽出2回、クロロホルム抽出2回を行った後エタノール沈殿する。このとき沈殿を乾燥させないこと。沈殿は、50 µLの1/5 TEまたは滅菌水に溶解する。(0.5 µg/µL位に調製)

(2) *Csp*45 Iで切断したコスミド10 µgを6 cmディッシュの293細胞のうち1枚にトランスフェクションし (Protocol A-1)、37℃、5% CO_2のインキュベーターで一晩培養する。

(3) トランスフェクションした293細胞を剥がして原液（10^0)、10倍希釈（10^{-1}）の細胞液を96ウェルプレートに播きかえる (Protocol A-2)。細胞数がプレートごとに大きく変わらないよう6 cmウェルディッシュ1枚分のトランスフェクションしていない293細胞を用いて希釈プレートを作製する (注A-2)。

(4) 4~5日後と8~10日後に、各ウェルに50 µLの5% FCS-DMEM培地を加える (注A-3)。

(5) ウイルスが増殖し、ウェルの細胞が完全に死滅するごとに、コンタミに注意しながら綿栓つき滅菌チップで死細胞ごと培養液 (約200 µL)を滅菌済み1.5 mLチューブに移し、−80℃に保存する。(注A-4,5,6)

(6) それらの中から10倍希釈の96ウェルプレートを優先して2～4クローンを選び、2次ウイルスの調製に用いる。すぐに使わない場合は粗1次ウイルス液としてそのまま−80℃で保存する。2次ウイルスの調製に使用する1次ウイルスは、1回の操作で6サンプル分が限度だが、可能であれば多めに1次ウイルスを取っておき、後で戻ることができるようにする。

（Protocol A-1） トランスフェクション　プロトコール

1： 希釈　　①コスミド10 µg + OPTI-MEM I　500 µL
　　②Lipofectamine2000 20 µL + OPTI-MEM I　500 µL

2： 直ちに①、②を混和し、室温で20分間静置する。この間に6 cmディッシュの培地を取り除き、1 mLのOPTI-MEM Iに置き換えておく。

3： ①+②液を6 cmディッシュに加える（計2 mLとなる）。

4： 37℃で1時間インキュベートする。

5： 5% FCS-DMEMを4 mL加える（計6 mLとなる）。

6： 一晩培養

トランスフェクションは上記あるいはその同等試薬を用いる方法の他、リン酸カルシウム法でも可能であるが、実施条件はそれぞれ検討する必要がある。

（Protocol A-2） 播き換え　プロトコール

1： 15 mLチューブ2本に5% FCS-DMEMを11 mL（10^0用）と、10 mL（10^{-1}用）を分注する。

2： トランスフェクションしていない方の6 cmディッシュの293細胞を剥がし[培地を取り除き、PBS(-)で一度細胞を洗い、ディッシュの側面を強く叩くと剥がれてくる]、10^{-1}用に分注しておいた5% FCS－DMEM 10 mLに懸濁して回収する。よくピペッティングして細胞を一つ一つバラバラに離したら細胞同士がくっつくのを防ぐため、時間が短くても使うまでは4℃に入れておく。

3： 同様にトランスフェクションした方の6 cmディッシュの293細胞を、10^0用に分注しておいた5% FCS-DMEM 11 mLに懸濁して回収する。

4： 10^0の細胞液1 mLを10^{-1}の細胞液に移す。

5： 10^{-1}、10^0の順で100 µLずつ96ウェルプレートに播く。

（注A-1） *Csp*45Iの他に、*Nsp*V、*Pac*I、*Bsp*T104I、*Bst*BIなど、切断部位が TTCGAA の酵素も使用可能。挿入断片中にこれらの制限酵素サイトがある場合は、切断しないで操作を行うか、COS-TPC法でウイルスを産生させる。酵素切断無しにウイルス産生操作を行うと、効率は約1/100である。

（注A-2） COS-TPC 法とは異なり、親ウイルスは生成してこないが、低頻度でインサートの一部が欠失したウイルスが生じることがある。これが微量でも混じってくると、実験に使う時やそれ以降に欠失ウイルスが突如優性になる（いわゆる「化ける」）ことがある。6 cmディッシュのまま増やして用いると、限界希釈の手順を踏まないままウイルスを増殖させることになり、純化されていない危険性がある。調べるクローン数は少なくて良いが、必ず96 穴プレートから拾い、限界希釈による純化の手順を踏むこと。

（注A-3）　細胞にダメージが見られる場合は早めに培地を加える。
培地を加える際にはコンタミしないよう注意が必要。チップはウェルごとに替え、8連ピペッターの目盛りは55 µLに設定して液を出し切らない様に（チップの先に液を残す）分注時の泡が出来ないように端からゆっくりと加えていく。チップを交換するたびにピペットの先端をアルコール綿で毎回拭くこと。

（注A-4）　P-200のピペットマンの目盛りを150 µLくらいに設定しておき、5~6回、泡が出来ないようにゆっくりとピペッティングして死細胞と培地を回収する。

（注A-5）　感染細胞の培地の大半を捨ててからウイルス液を調製すると、ウイルスと共に細胞毒性も濃縮されてしまうため、測定上のウイルス力価が上がっても、細胞毒性が強すぎて次に感染した細胞からウイルスが増殖できなかったり、発現が阻止されることが起きやすくなる。いったん毒性の高いウイルスになると、限界希釈により96ウェルプレートから分離し直す必要がある。

（注A-6）・コスミドのトランスフェクション後、早い日（4日目以前）に細胞が死んだウェルは、複数のコスミドの導入によりウイルスが産生した可能性が高くクローナリティー（clonality）が保証されない。
・死細胞の出たウェルが二つ以上隣り合っている場合は、ウイルスのウェル間のコンタミネーションが懸念されるため使わない方が良い。
・死細胞の出現が遅すぎるウェルは、別のウェルで産生されたウイルスがコンタミネーションした可能性があるため使わない方が良い。

作業表 Construction of recombinant adenovirus (it vector用)

Name of clone: _____ 担当者: _____

Number of clone: _____

Preparation of 1st seed

1. Cosmid vector/Csp45I (10 μg 相当) μL (μg/μL)
   OPTI-MEMI 500 μL
2. Lipofectamine 2000 20 μL
   OPTI-MEMI 500 μL

Recombination (Date): _____

Addition of medium (1st): _____

Addition of medium (2nd):_____

Collection of 1st seed:_____

Preservation: _____

Preparation of 2nd seed

Infection: _____

Collection of 2nd seed: _____

Preservation: _____

Clone No.: _____

DNA check: _____

Preparation of 3rd seed

Clone No.: _____

Infection: _____

Collection of 3rd seed: _____

Preservation: _____

Preparation of 4th seed

Infection: _____

Collection of 4th seed:_____

Preservation: _____

作業表　1次ウイルス生成観察

Virus name: _____

_____

担当者: _____

Transfection (0):

まきかえ (1):

2:

3:

4:

5:

6:

7:

8:

9:

10:

11:

12:

13:

14:

15:

16:

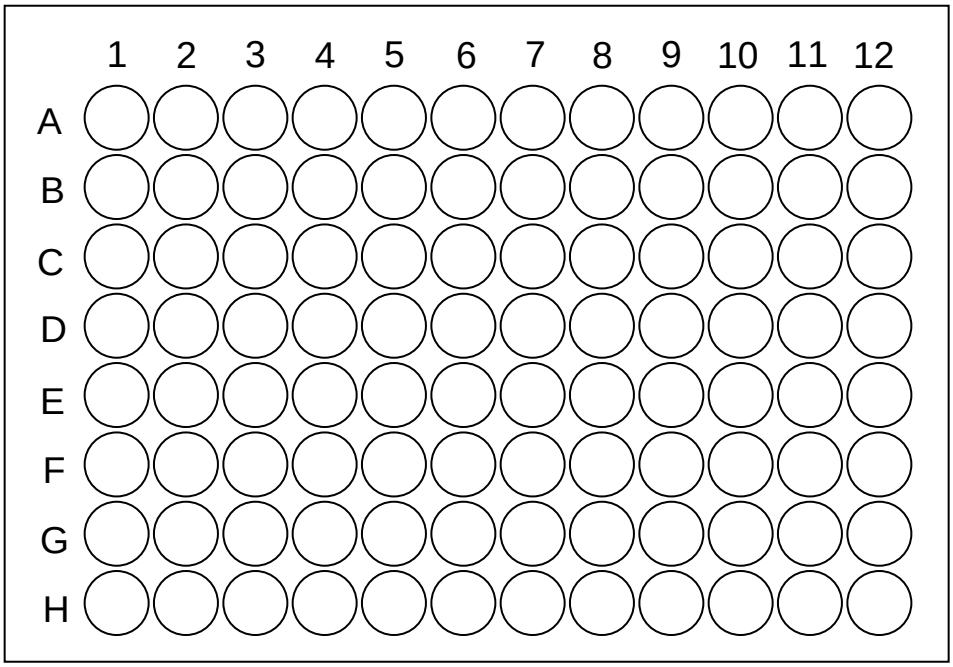
17:

18:

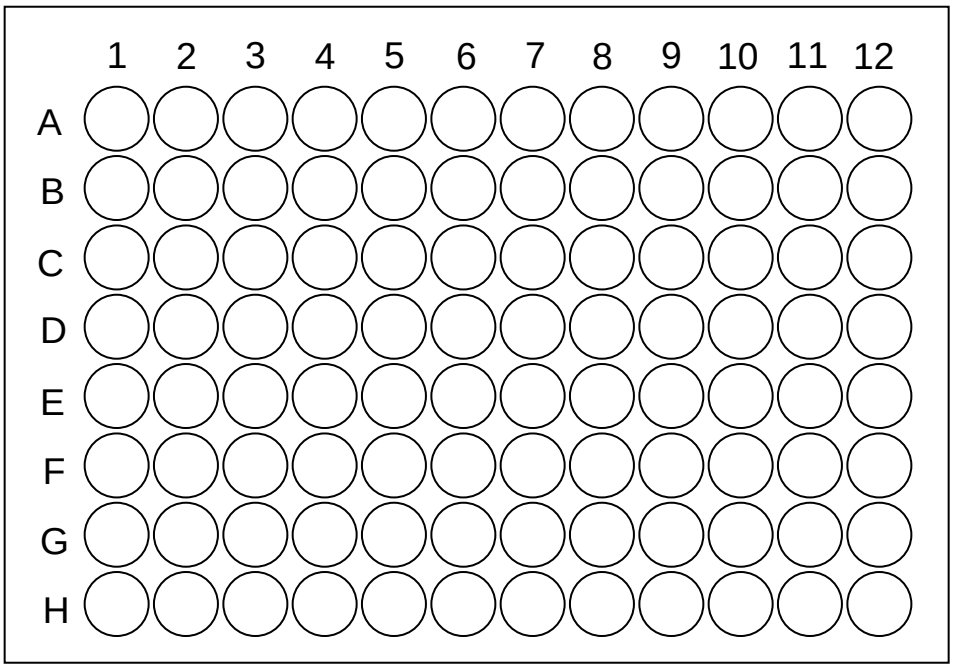
19:

20:

1×10^{0}



1×10^{-1}



＜B＞ 2次ウイルスの作製と組換えアデノウイルスDNAの構造確認（切断パターンテスト）

（1） 感染の２～３日前に、293細胞（TC用コラゲンtype Iコート）とHeLa細胞（TC用コート無し）をそれぞれ24ウェルプレートに播く。当日、80～100 %コンフルエントになるように播き込む。感染させるウイルス数が少ない場合でも、すべてのウェルに細胞を植えておくこと。感染させないネガティブコントロールになる他、乾燥を防ぐことにもなる。

（2） 使う直前に＜A＞で作製した1次ウイルス液の調製を行う。（Protocol B-1）

（3） 1次ウイルス液を感染させる。（Protocol B-2）

（4） 感染3日後に、HeLa細胞では細胞の変化が観察されず、293細胞では完全に死滅したクローンを選び、ウェルの全量を回収する。Cell controlとしたウェルの細胞も回収する。（Protocol B-3）・（注B-1）

（5） 293 cell packから全DNAを抽出し（Protocol B-4）、組換えアデノウイルスDNAの構造を確認する。（注B-2）

（6） HeLa cell packから全DNAを抽出し（Protocol B-4）、PCRによるRCAチェックを行う。（Protocol B-5）（注B-1）

（Protocol B-1）　ウイルス液調製プロトコール

1： 次の①または②により細胞を破砕する。

① 密閉超音波破砕（ON 30秒＋OFF 30秒)×5回

ソニケーターはCosmo Bio Bioruptor UCD200-TM、最大出力で行う。

45℃以上でウイルスが死ぬので、氷がとけ切らないように注意する。

② 液体窒素と37℃水槽による凍結融解6回

2： 3,300 g 、4℃ 、5分の遠心により細胞の残骸を落とし、上清のみ新しいチューブに回収する。

（Protocol B-2） 感染プロトコール

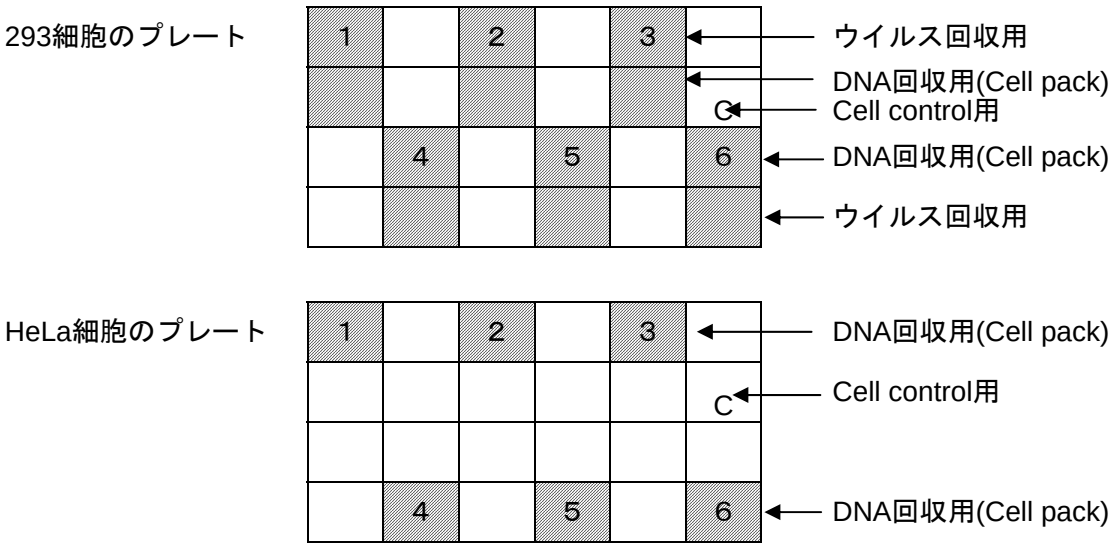
1： 15 or 50 mLチューブに5% FCS-DMEMを感染させる1次ウイルス数×1.3 mL（後で加える用）＋1 mL (Cell control用)を分注し、37℃の水槽で保温しておく。

2： 1.5 mLチューブを感染させる1次ウイルス数＋1 (Cell control用)本用意し、5% FCS-DMEMを600 µLずつ分注する（3ウェル分)。

3： 1次ウイルス液を37℃の水槽で解凍し、使う前に必ずよくボルテックスをかける。その1次ウイルス液30 µL(3ウェル分)を上記の1.5 mLチューブの培地に加えてvortexで混和する。

4： 24ウェルプレートの培地を取り除き、調製した希釈1次ウイルス液 （Cell controlには培地）を200 µLずつ、HeLa細胞 x 1ウェル、チップを替えて293細胞 x 2ウェルに加える (図B-1)。細胞が乾かないように、手際よく操作すること。

(図B-1)



5： 37℃で1時間インキュベートし、ウイルスを感染させる。15分に１回プレートを前後左右にゆっくり傾け、細胞に満遍なくウイルス液をかける。

6： 37℃で温めておいた300 µLの培地を加え培養する。

＊2、3 のように操作せず、培地を100 µL程残して取り除き、そこへ1次ウイルス液を 10 µL加えて感染させても良い。

（Protocol B-3） 2次ウイルス回収プロトコール

以下の操作はHeLa細胞に変化の見られなかったウイルスについてのみ行う。

1： 1.5 mL チューブを回収するウイルス数×3本、Cell control用2本用意する。

2： P-1000のピペットマンの目盛りを400 µLくらいにし、293細胞の2ウェルのうち、1ウェルから死細胞ごと培養液を回収する。このとき、泡立てないようにピペッティングで細胞をはがす。すぐに使わない場合は粗2次ウイルス液としてそのまま－80℃で保存する。

3： 293細胞のもう一つのウェルからも同様に死細胞を培養液ごと回収する。3,300 g、4℃、5分遠心により死滅した細胞をペレット状にして上清を捨て−80℃に保存する（Cell pack）。

4： 同時に293細胞 Cell controlのCell packも回収する。

5： Cell pack用のHeLa細胞は、培養液を取り除き、300 µLのPBS(-)でwashした後 300 µL の0.02 % EDTA-PBS(-)を 37℃で 3分程効かせたのち取り除き、300 µLのPBS(-)で剥がして回収する。3,300 g、4℃、5分遠心により死滅した細胞をペレット状にして上清を捨て、−80℃に保存する（Cell pack）。

（Protocol B-4） Cell packからの全DNA抽出プロトコール

＊ SDSを加えるまでは、安全キャビネット内で作業すること。

1： 反応液を調製する

TNE	400 µL
Proteinase K （10 mg/mL）	4 µL
Total	404 µL

2： 反応液を感染細胞ならびにCell control（非感染293細胞）のCell packのチューブに加え、10~15分激しく振り混ぜ、確実に細胞をほぐす。ボルテックスをかけても良い。白い糸くずのようなタンパクが見えるのを確認する。

3： 4 µLの10% SDSを加え、泡立たないようゆっくり転倒混和する。

4： 50℃で1.5~2時間反応させる（2時間以上置かない）。タンパクが見えなくなっているのを確認する。

5： 等量のフェノール/クロロホルム処理で除タンパクを2回行う。

6： 等量のクロロホルム処理で除フェノールを2回行う。

7： 等量の100 %エタノールと、1/10量の 3 M NaOAc (pH 5.2)を加え、エタノール沈殿を行う。

8： 50 µL TE-RNase(+) (20 µg/mL RNase)に溶かす。

（Protocol B-5） RCAチェックのプロトコール

1： 制限酵素によるDNA構造チェック（注B-2）にパスしたウイルスのHeLa cell pack、HeLa cell control (negative controlとする)、293 cell control (293 makerとする。positive controlにもなる)、以前RCAと判定されたウイルスDNA (positive controlとする) から抽出したDNAの50倍希釈液を調製する。

2： 以下のようにPCR反応液を調製する。

Template (50倍希釈液)	1.0 μL
10×Buffer (KOD dash)	2.0 μL
2 mM dNTP	2.0 μL
KOD dash	0.4 μL
10 μM forward primer (E1A)	0.4 μL
10 μM reverse primer (E1A)	0.4 μL
10 μM forward primer (E1B)	0.4 μL
10 μM reverse primer (E1B)	0.4 μL
D.W.	13.0 μL
Total	20.0 μL

3： 以下のようにPCR反応をかける。

94℃ 5 min (1 cycle)

94℃ 30 sec
62℃ 2 sec 〉 (30 cycles)
74℃ 30 sec

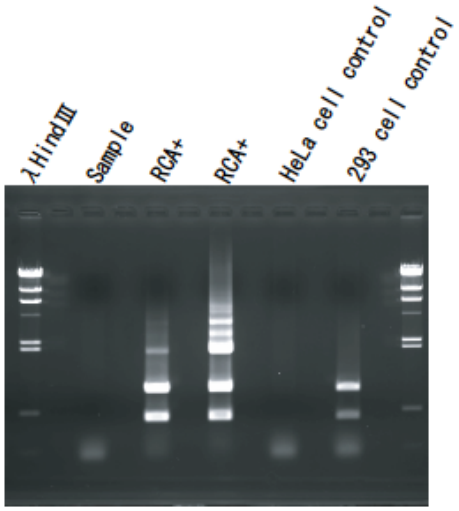
4℃ ∞

4： PCR product 9 μL + dyeを1%アガロース-TAEゲル電気泳動し、
E1A fragment 920 bp
E1B fragment 480 bp のバンドが見られなければ良い。

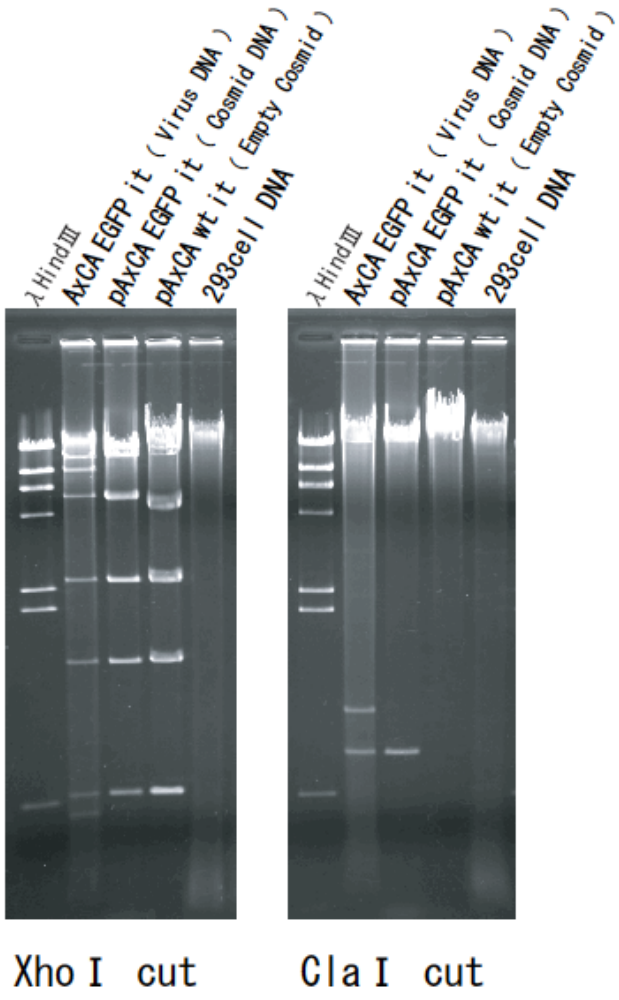
・forward primer (E1A)・・・E1A F2 626-661
5'-CTG ATC GAA GAG GTA CTG GCT GAT AAT CTT CCA CC-3'
・reverse primer (E1A)・・・E1A R2 1545-1511
5'-TTA TGG CCT GGG GCG TTT ACA GCT CAA GTC CAA AG-3'
・forward primer (E1B)・・・E1B F1 2002-2035
5'-AGT TTT ATA AAG GAT AAA TGG AGC GAA GAA ACC C-3'
・reverse primer (E1B)・・・E1B R1 2495-2462
5'-AGT GGT CAG CTG CTC TAT GGA ATA CTT CTG CGC G-3'
数字はGenBank AccessionNo.AC_000008のAd5塩基配列の位置に相当する。
その他のプライマーについては、次のサイトを見て下さい。
http://www.brc.riken.jp/lab/dna/en/adenovirus.html#primer

（注B-1） 非増殖型アデノウイルスのゲノムはE1（およびE3）遺伝子を欠失しているので、アデノウイルスのE1遺伝子を持つ293細胞以外では増殖できない。この性質を利用して、HeLa細胞にウイルスを感染させ、細胞変性（cytopathic effect）を見ることで、自立増殖可能アデノウイルス（replication competent adenovirus, RCA）出現の有無を判定することが出来る。HeLa細胞に変化が見られる場合、293細胞以外の細胞でも増殖できるようになった可能性があるので、そのウイルスは使用しないこと。

（注B-2） 抽出したDNA 14~16 µLを制限酵素で切断する。
Cell packから精製したDNAにはアデノウイルスDNAと共に293細胞由来のゲノムDNAも含まれているので、ゲノムDNAがほとんど切断しない、認識配列に CG を含む制限酵素（*Xho*I、*Cla*Iなど）で切断する。1%アガロース-TAEゲル電気泳動で切断パターンをチェックし、インサートの欠失が起こっていないものを選ぶ。
コントロール（マーカー）として元のコスミドベクターも同時に切断し電気泳動する。



RCA チェック例



構造チェック例

作業表　2次ウイルス生成観察とRCA check (CPE)

Virus name: _____

_____

担当者: _____

感染日 (0) :

1:

2:

3:

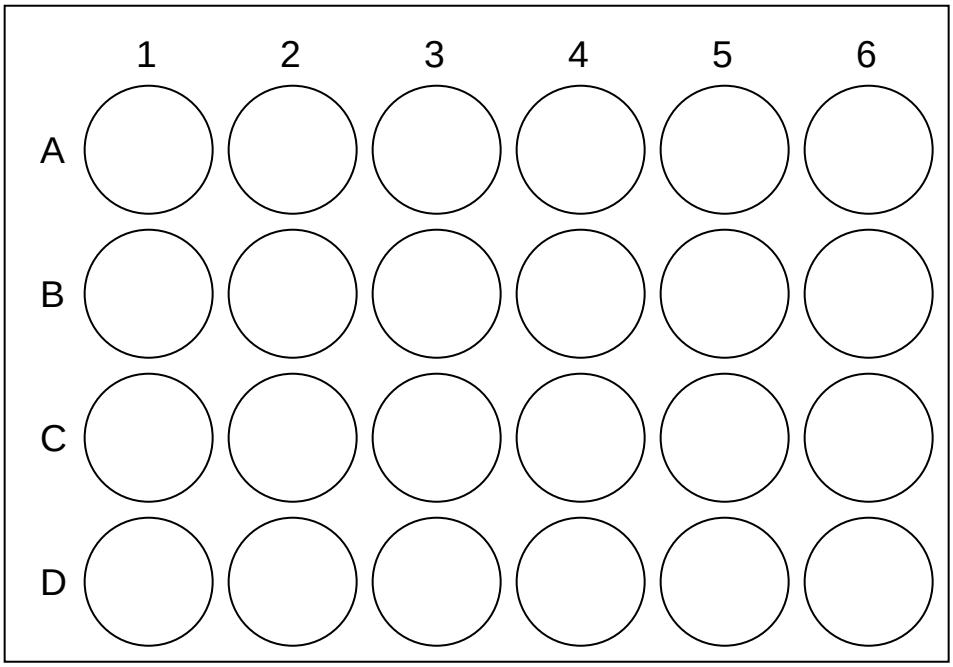
4:

5:

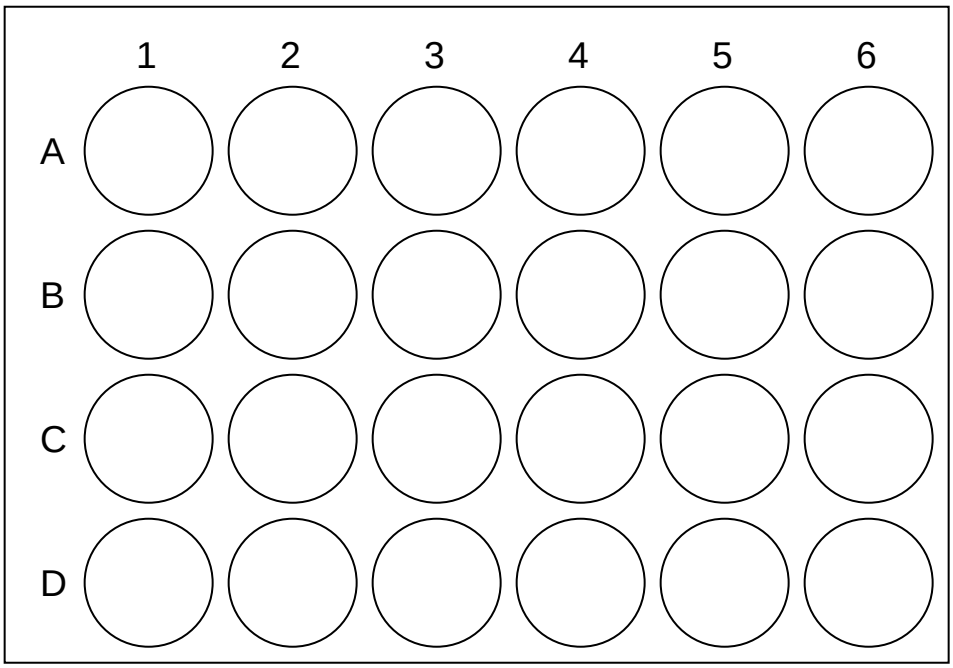
6:

7:

293



HeLa



作業表　PCRによるRCAチェック

Virus name：

担当者：

実施日：

Reaction mixture		Primer sets
Template (1/　)	1.0 μL	E1A…E1A F2, E1A R2→E1A
10 x Buffer (KOD dash)	2.0 μL	fragment: 920 bp
2 mM dNTP	2.0 μL	E1B…E1B F1, E1B R1→E1B
KOD dash	0.4 μL	fragment: 480 bp
10 μM forward primer (E1A)	0.4 μL	
10 μM reverse primer (E1A)	0.4 μL	PCR reaction
10 μM forward primer (E1B)	0.4 μL	94℃ 5 min (1 cycle)
10 μM reverse primer (E1B)	0.4 μL	94℃ 30 sec 62℃ 2 sec 74℃ 30 sec (30 cycles)
D.W.	13.0 μL	
		4℃ ∞
Total	20.0 μL	

＜C＞ 目的ウイルス株の3次ウイルス、4次ウイルス作製

（1） 10 cmコラーゲンコートディッシュまたは75 cm^2フラスコに293細胞を80～100%コンフルエントになるように培養する。タイターが低い場合には6 cmディッシュを用いる（Protocol C-1）。

（2） RCAが陰性で、DNA構造上欠失が起こっていないことを確認した2次ウイルスを感染させる（Protocol C-1）。

（3） 約3～4日後に細胞が死滅したら、培養液（死滅細胞ごと）を50 mLチューブに移し、すぐに使わない場合は粗3次ウイルス液としてそのまま－80℃に保存する。

（4） 密閉超音波破砕または凍結融解し、ウイルスを遊離させる。

（5） 9,400 g、10分、4℃で遠心して上清を回収し、蓋がネジ式のチューブ(2 mL)に1 mLずつ分注して−80℃に保存する。（3次ウイルス液）

（6） 4次ウイルス液は、3次ウイルス液100 μLを用いて（1）～（5）を繰り返して得る。

（Protocol C-1） 3, 4次ウイルス感染プロトコール

1： 15 mLチューブに5% FCS-DMEMを10 mL分注し37℃の水槽で温めておく。

2： 1.5 mLチューブに5% FCS-DMEMを1 mL分注する。

3： 選定した2次ウイルスを37℃の水槽で解凍し、使う前に必ずよくボルテックスをかけ、100 µLを上記1.5 mLチューブの培地に加えて混和する。

4： ディッシュの培地を取り除き、調製した希釈2次ウイルス液を、壁を伝わせてゆっくりと加える。

5： 37℃のインキュベーターで1時間培養し、ウイルスを感染させる。15分に1回ディッシュを前後左右にゆっくり傾け、細胞に満遍なくウイルス液がかかるようにする。

6： 37℃で温めておいた10 mLの培地を加え培養する。

＊タイターが低い場合には6 cmディッシュを用いる。この場合、下記の量の培地とウイルスを用いる。

15 mLチューブに5% FCS-DMEMを 2.5 mL

1.5 mLチューブに5% FCS-DMEMを 400 µL

2次ウイルス 100 µL

＜D＞ 組換えウイルスの超遠心による大量調製

（1） 225 cm^2コラーゲンコートフラスコに293細胞を80～100%コンフルエントになるように培養する。

（2） 3次または4次ウイルスを感染させる（Protocol D-1）。

（3） 約2～3日後に細胞が死滅し始めたら、培養液ごと死滅細胞を50 mLチューブに移す。そこから500 µLを1.5 mLチューブに分注し、遠心（5,000 rpm, 4℃, 1 min）してCell packを作製、DNAの構造checkを行う。

・ すぐに精製を行わない場合、回収した液はこのまま－80℃で保存できる。

・ また感染後48時間でウイルス感染細胞を回収した場合は、培地を20 mLのPBS(-)やHEPES (10 mM, pH 7.4)に置き換えることが出来る。置き換える場合は220 g, 4℃, 5 minの遠心を行う。（注D-1）

（4） 密閉超音波破砕［ON, 30 sec + OFF, 30 sec) x 5回］または凍結融解し、ウイルスを遊離させる。（注D-2）

（5） 9,400 g、10分、4℃で遠心して上清を回収する。

（6） 200 nm Polyethersulfone (PES) filterを用いて限外ろ過する。（注D-3）

（7） Amicon Ultra-15 遠心式フィルターユニット（MWCO, KDa 100 K , Millipore社）にて限外ろ過を行い（注D-4）、ウイルス液を1 mLまで濃縮する。1 mLより少なくなってしまった場合は、HEPES (10 mM, pH 7.4)で1 mLにする。

（8） よくピペッティングしてウイルス液を回収する。ろ過により下に落ちた液は念のため回収しておく。

（9） 604,000 g、4℃、15分以上で塩化セシウム密度勾配遠心を行う。（Protocol D-2）

（10） 注射器でウイルスバンドを回収する。（Protocol D-3）

（11） Amicon Ultra-15を用いて脱塩を2回行う。（Protocol D-4）

（12） ウイルス液を1 mLに濃縮し、100 µLずつ分注して－80℃で保存する。

（13） ウイルス力価測定を行う。

（Protocol D-1） 大量調製感染プロトコール

1： 15 mLチューブ2本に5% FCS-DMEMを10 mLずつ分注し、1本は37℃の水槽で温めておく。

2： 大量調製する3次または4次ウイルス 1 mLを37℃で解凍し、使う前に必ずよくボルテックスをかけ、15mLチューブに分注した培地に加えて混和する。

3： 225 cm^2フラスコの培地を取り除き、調製した希釈ウイルス液をゆっくりと加える。

4： 37℃で1時間インキュベートし、ウイルスを感染させる。15分に１回フラスコを前後左右にゆっくり傾け、細胞に満遍なくウイルス液をかける。

5： 37℃で温めておいた10 mLの培地を加え培養する。

（Protocol D-2） 密度勾配遠心プロトコール

1： 5PAシールチューブを滅菌しておく。
てんびん、2.2 M CsCl in 10 mM HEPES (pH 8.0), 4.0 M CsCl in 10 mM HEPES (pH 8.0)、10 mM HEPES、各種シリンジ、針（あまり細い針を用いるとウイルス粒子が破壊されるので20Gから23Gくらいの太さのもの)、チューブなどを用意する。2.2 M CsClは3 mL、4.0 M CsClは1 mLを分注しておく。シーラーの電源を入れておく。超遠心機の電源を入れ、4℃に設定しておく。

2： 2.5 mLのシリンジに20G x 70 mmの針を用いて回収したウイルス液1 mLをチューブの底へ入れる。このとき、チューブの底を針で傷つけないように十分注意すること。

3： 同様に2.2M CsCl 3 mLをウイルス液の下層に重層する。

4： 同様に4.0M CsCl 1 mLを2.2M CsClの下層に重層する。2本の液量が合わない時や液量が少ない時は、2.2 M CsClで補正すると密度勾配の距離が長くなるので良い。

5： シーラーでチューブの口を閉じる。

6： 604,000 g、4℃、15分以上遠心する。15分で分離可能だが、時間があればもう少し回した方が良い。ウイルスの密度は1.34 g/mLで、この場合チューブの下から1 cm程の所にウイルスバンドが確認出来る。

7： 使用したシリンジ、針は回収出来るように他のものと分けてオートクレーブし、所定の回収箱などに捨てる。

（Protocol D-3） ウイルス回収プロトコール

1： チューブの上部に空気穴を開ける。針（23G・短針）は刺したままにしておく。

2： バンドの下から針(23G・短針+1 mLシリンジ)を刺し込み、ウイルスバンドを1 mL回収する。

3： ウイルスに汚染された液が漏れてきてしまうので、針はチューブを捨てるときに抜く。

4： 1.5 mLチューブにウイルス液を回収する。

5： 使用したシリンジと針は後で分別廃棄するので、回収出来るように他のものと分けてオートクレーブし、所定の回収箱などに捨てる。

（Protocol D-4） 脱塩プロトコール

1： 事前にウォッシュ液を調製しておく。（pH 7.4~8.0）

1 M HEPES-NaOH, pH7.4	10	mL	(final conc. 10mM)	オートクレーブ滅菌する。
0.2 M $MgCl_2$	10	mL	(final conc. 2mM)	
Glycerol	100	mL	(final conc. 10%)	
Sucrose	40	g	(final conc. 4%)	
H_2O	800	mL	+α	
Total	1000	mL		

2： Amicon Ultra-15にウォッシュ液を10 mL入れておき、そこへウイルス液を加え、ピペッティングで混和する。

3： 2,500 g、4℃、5分遠心する。

4： フィルターの上に残ったウイルス液にウォッシュ液を10 mL加えてピペッティングし、もう一度遠心して、ウイルス液を1 mLまで濃縮する。下に落ちた液は2回分とも回収し、－80℃で一時保存する。

5: ピペッティングでフィルターに付いているウイルスを洗い込みながら液を回収する。100 µLずつもしくは1回の使用量ずつ蓋がネジ式のチューブに分注して - 80℃で保存する。

（注D-1） 感染後48時間でウイルス感染細胞を回収した場合、細胞から培養液中に放出されるウイルス量が少ないため、遠心して培地を取り除き、PBS(-)やHEPESに置き換えることができる。これにより培地からの余計なタンパク質（BSAなど）の持ち込みが少なくなり、より*in vivo*の実験に使いやすいウイルスとなる。

（注D-2） －80℃保存していた場合はよくボルテックスをかけてから破砕すること。

（注D-3） 50 mLチューブへのろ過用吸引式デバイスとなっているSteriflip filter unit (Milipore社)を利用すると便利。ウイルス粒子は直径80～110 nm であるので集合体になっていなければ膜を通って下に落ちる。

（注D-4） 本製品では、ウイルス粒子は約150 KDaなので膜の上に残る。

10 mLずつ2回に分けて5000 g、10分、4℃で遠心する。1回目の遠心中、残りは氷の上においておく。

2回目にウイルス液を加える際、フィルターに付いたウイルスを剥がすようにピペッティングをして加える。

＜E＞ ウイルス力価測定

アデノウイルスの力価（タイター）表示には下記の２種類があり、おおよそ

物理化学的タイター／生物学的タイター＝10～50

となる。米国 ATCC からヒトアデノウイルス５型の standard が提供されているので、これをコントロールに使用することが可能である。

１．物理化学的タイター

OD_{260} に基づく方法で、ウイルスゲノム DNA 量からコピー数を算出する方法である。Particle titer (PT)や virus particle (VP)と表示されることが多い。測定結果は安定しているが、パッケージングが不完全なウイルスや調製過程で壊れたウイルスも測定されるため、生物学的タイターと比べて高い値になる。測定に要する時間は短い。

２．生物学的タイター

細胞にウイルスを感染させ、プラーク形成法や 50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID50) 法により測定する。Plaque forming unit (PFU)と表示されることが多い。これらは細胞変性の目視による測定であり、測定者により値が異なる。また、測定者の経験が浅い場合は、同一測定者であっても値がばらつくことがある。また、感染操作が必要なため、測定終了まで時間がかかる。この他に、ヘキソン抗体を用いた免疫染色法に基づく力価測定キットによる方法もある。

【物理化学的タイター測定法】

0.1% SDS を含む TE でウイルス液を懸濁。

５分間、ボルテックス。

Max speed で５分間遠心。

上清の OD_{260} を測定。

OD_{260} 0.1 = 1.1 x 10e11 particle titer/ml

参考文献

Virology 36, 115, 1968

J. Virol. 70, 7498, 1996

【50% Tissue Culture Infectious Dose（$TCID_{50}$）法】

（1） 力価測定を行うウイルス1種類あたり10 cmディッシュ（コートなしTC）1枚の293細胞を用意する。

以下は1×10^{-4}に希釈したウイルス液を用いる低力価ウイルス用のプロトコールである。精製後の高力価ウイルスでは振り切れてしまうことがあるので、1×10^{-6}まで希釈して同様に測定を行う。36-2ページに高力価ウイルスの測定例を示した。

（2） 当日の準備・・・

5% FCS-DMEM、PBS(-)、96 ウェルコラーゲンコートプレート×1、リザーバー×2、15 mL チューブ×1、1.5 mL チューブ×4、綿栓付き滅菌チップ 200 P× 2 箱＋α、8 連ピペットを用意する。

5% FCS-DMEM 7 mL を 15 mL チューブへ、7 mL をリザーバーへ分注する。

（3） 96ウェルプレートの第2~12列目のウェルに5% FCS-DMEMを50 µLずつ分注する。

（4） 組換えウイルスを5% FCS-DMEMで1×10^{-4}まで段階希釈する。（Protocol E-1）・（注E-1）

（5） 1列目には調製した1×10^{-1}~1×10^{-4}希釈の組換えウイルスを2ウェルずつ50 µLずつ加える。

2列目の8ウェルには調製した1×10^{-4}希釈の組換えウイルスを25 µLずつ加える。

（4） 8連ピペットを用いて、2列目のウェルの25 µLをピペッティングして取り、3列目のウェルに移す。チップを替えて3列目を4列目に移し、以下同じ操作を11列目まで繰り返し、最後の25 µLは捨てる。結果として3^nの段階希釈系列を$3^{-10}\times10^{-4}$希釈まで作製することになる。12列目は非感染細胞のコントロールとして残しておく。（注E-2）

（5） 10 cm ディッシュの 293 細胞を PBS(-)で洗浄ののち剥がし、7 mL の 5% FCS-DMEM に再懸濁して濃度の低い方から 50 µL ずつすべてのウェルに播く。（注 E-3）

（6） 4~5日後と8~10日後に、各ウェルに5% FCS-DMEMを50 µLずつそっと加える。

（7） 12日後に細胞変性の終末点を顕微鏡下で判定する。

（8） ケルバーの式を用いて統計学的に50%細胞変性終末点（$TCID_{50}$）を計算する。（注E-4）

36-1ページに低力価ウイルスの測定例を示した。

＊操作に慣れるまでは、より正確に力価を出すためTriplicateで行うことをお勧めする。

（Protocol E-1） 組み換えウイルス液の段階希釈

1： 1.5 mL チューブ 4 本に 5% FCS-DMEM を 900 µL 分注する。

2： ウイルス液を 37℃の水槽で溶かし、よく（2～3 分間）ボルテックスをかけ、遠心でフタについたウイルス液を落とした後、10^{-1} 希釈のチューブに 100 µL 加えて混和する。

3: チップを変え 1×10^{-1} のチューブから 1×10^{-2} のチューブへウイルス液を 100 µL 移して vortex により混和し、遠心でフタについたウイルス液を落とす。

・

・

・

繰り返して 1×10^{-4} 希釈のウイルス液を調製する。

（注E-1） ウイルスの希釈の目安として、ウイルス原液が未精製の場合は1×10^{-4}に、精製済の場合は1×10^{-6}希釈すると50%細胞変性終末点が段階希釈列から外れることが少ない。

（注E-2） 希釈に用いるチップは1列ごとに替える。従って、プレート1枚の希釈にチップ1箱を使うが、そうしないと結果は全く信用できない。

(注E-3) 細胞液を12列目から加えるときは液面に付けないよう注意しながら同じチップを用いても良いが、実験誤差が生じやすいので1列ずつチップは替えた方が無難。

（注E-4） 293細胞を用いて本法で$TCID_{50}$ を算定した結果と、プラーク形成法でPFUを求めた結果は一致し、$TCID_{50}$/mL＝PFU/mL と考えて良いことがわかっている。

＜ケルバーの式＞

求める$TCID_{50}$を10^Xとすると

X=log a−｛各希釈段階における（変性ウェル数/検体数）の総和−0.5｝×log（希釈率）

ただし、a : 2列目の希釈度（このプロトコールでは$3^{-1}\times10^{-4}$）、希釈率は3。また、log3 = 0.4771。

使用したウイルス液は50 µLなので、10^X倍希釈したウイルス液50 µLが1 PFUと考えると、ウイルス原液の力価は1 mL÷10^X÷0.05 mLで求められる。

測定例　1）低力価ウイルスの場合

TCID50法

Virus name / Clone no.:

担当者:

感染日 (0):

1:

2:

3:

4:

5:

6:

7:

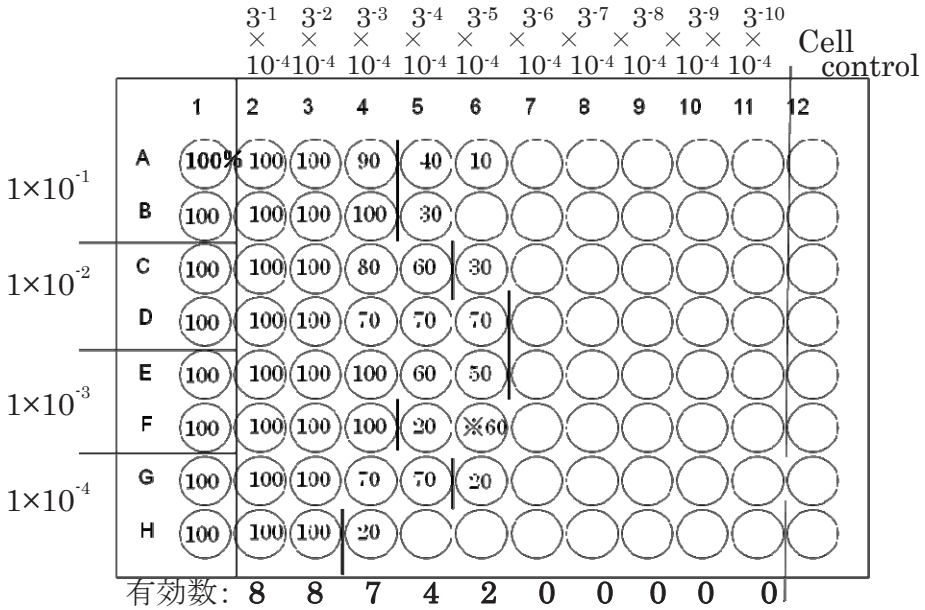
8:

9:

10:

11:

12:



a (2列目の希釈率): $3^{-1} \times 10^{-4}$

希釈率: 3

※ジャンプして変性が出たところは有効と採らない

TCID50=10^x、 aは 2列目の希釈率として

X = log a - [(各希釈段階における (変性ウエル数(有効数) /検体数)の総和 } - 0.5] × log (希釈率)

= log ($3^{-1}\times10^{-4}$) - {(8/8+8/8+7/8+4/8+2/8+0/8+0/8+0/8+0/8) - 0.5} × log 3

= log ($3^{-1}\times10^{-4}$) - 3.125 log 3

= log ($3^{-1}\times10^{-4}\times3^{-3.125}$)

= - 4 - 4.125 log 3

= - 5.968125…

1ウエルに使用したウイルス液は 50 µLなので $10^{-5.968}$倍希釈したウイルス液 50 µLが 1 PFU と考えると、ウイルス原液の力価は 1 mL ÷ $10^{-5.968}$ ÷ 0.05 mL = 20 × $10^{5.968}$ = 1.86 × 10^7(PFU/mL)

測定例　2）高力価ウイルスの場合

TCID50法

Virus name / Clone no.:

担当者:

感染日 (0):

1:

2:

3:

4:

5:

6:

7:

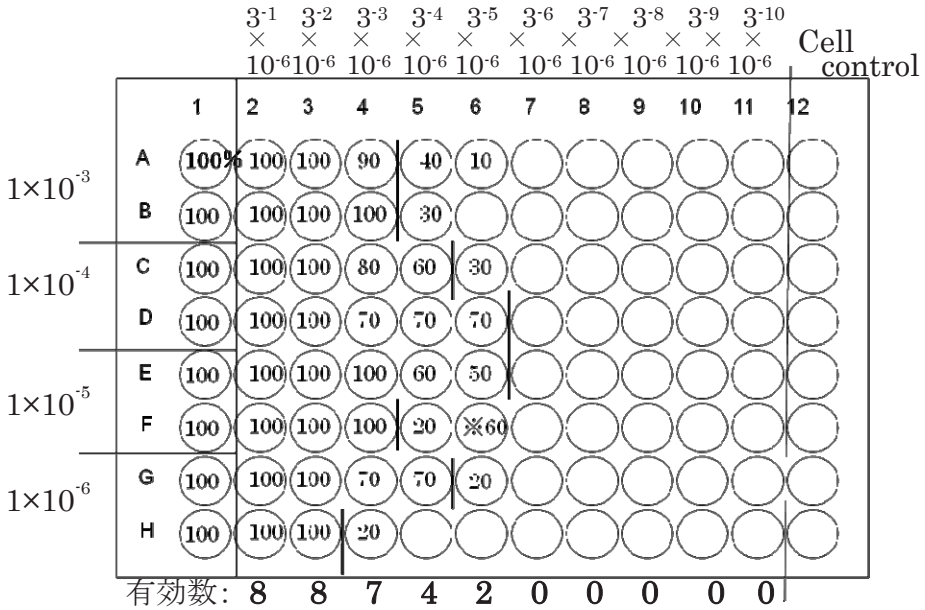
8:

9:

10:

11:

12:



a (2列目の希釈率): $3^{-1} \times 10^{-6}$

希釈率: 3

※ジャンプして変性が出たところは有効と採らない

TCID50=10^x、 aは 2列目の希釈率として

X = log a - [(各希釈段階における (変性ウエル数(有効数) /検体数)の総和 } - 0.5] × log (希釈率)

= log ($3^{-1}\times10^{-6}$) - {(8/8+8/8+7/8+4/8+2/8+0/8+0/8+0/8+0/8+0/8) - 0.5} × log 3

= log ($3^{-1}\times10^{-6}$) - 3.125 log 3

= log ($3^{-1}\times10^{-6}\times3^{-3.125}$)

= - 6 - 4.125 log 3

= - 7.968125…

1ウエルに使用したウイルス液は 50 µLなので $10^{-7.968}$倍希釈したウイルス液 50 µLが 1 PFU と考えると、ウイルス原液の力価は 1 mL ÷ $10^{-7.968}$ ÷ 0.05 mL = 20 × $10^{7.968}$ = 1.86 × 10^9 (PFU/mL)

TCID50 法

Virus name / Clone no. :

担当者 :

感染日 (0) :

1:

2:

3:

4: 1×10^{-}

5:

6: 1×10^{-}

7:

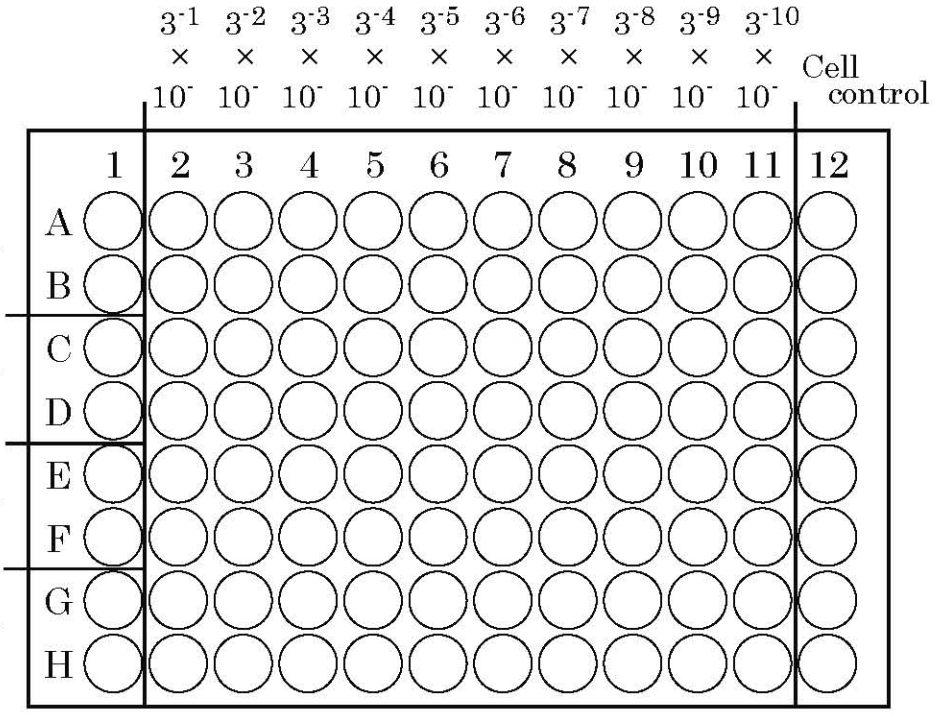
8: 1×10^{-}

9:

10:

11: 1×10^{-}

12:



有効数 :

a (2 列目の希釈率) : 3^{-1} × 10^{-}

希釈率 : 3

＊ジャンプして変性が出たところは有効と採らない

TCID50=10^{X}、 a は 2 列目の希釈率として

X = log a - [{ 各希釈段階における (変性ウエル数 / 検体数) の総和 } - 0.5] × log (希釈率)

= log (3^{-1}×10$^{-(\ )}$) - {(/8+ /8+ /8+ /8+ /8+ /8+ /8+ /8+ /8+ /8) - 0.5} × log 3

= log (3^{-1}×10$^{-(\ )}$) - ( ) ×log 3

= log (10^{-} × 3^{-1} × 3$^{-(\ )}$)

= - - ×log 3

=

1 ウエルに使用したウイルス液は 50 µL なので 10^{X} 倍希釈したウイルス液

50 µL が 1 PFU と考えると、 ウイルス原液の力価は

1 mL ÷ 10$^{-(\ )}$ ÷ 0.05 mL = 20 × 10$^{(\ )}$ = (PFU/mL)

＜F＞ ウイルス使用法の実際

(1)　1種類のウイルスあたり4ウェル以上の培養細胞を80～100%コンフルエントになるように培養する。

(2)　培地中の血清がFCSでない場合（例えばCS）は、無血清培地で2回細胞を洗う。

(3)　無血清またはFCS入り培地で4次ウイルス原液を3倍、10倍、20倍、40倍に希釈したものをウェルに加える（注F-1）。

(4)　37℃で1時間インキュベートし、ウイルスを感染させる。15分に１回フラスコを前後左右にゆっくり傾け、細胞に満遍なくウイルス液がかかるようにする。

(5)　感染1時間後に培地を適当量加えて培養する。

(6)　0、1、2、3 日後に蛍光抗体法やウエスタン法など、適切な方法で目的とするタンパク質の発現を検出する。

(注F-1)　この時、ウイルス液は細胞表面が乾燥しない程度の最小量で加えて感染させる。目安としては、96ウェルプレートで30～40 μL、24ウェルプレートで75～100 μL、10 cmディッシュで150～200 μL程度を使用して感染させると良い。

＜G＞ コスミドベクターのパッケージング

コスミドベクターで形質転換した大腸菌を長時間培養すると、コスミドの脱落が起こりやすいので注意を要する。菌の収量が低くても、概ね 12 時間程度の培養に止める。コロニーからの培養の場合は、いったん 3 ml の培地で 6-8 時間培養した後、50 ml 培養に上げ、12 時間程度で回収すると良い。グリセロールストックから培養を開始すると、形質転換した大腸菌を長期培養することになるので、お勧めできない。面倒でも、パッケージングしなおした方が良い。

＜試薬＞

・ 大腸菌は DH5α をもちいること
・ LB 液体培地ならびにアンピシリン(100 μg/ml)入り LB 液体培地
・ アンピシリン(100 μg/ml)入り LB 寒天培地
・ GIGAPACK III plus (Stratagene)

宿主大腸菌の準備

(A- 1)　2 ml の O/N culture を準備する。
(A- 2)　20 μl の O/N culture を 2 ml の LB 培地に植える。
(A- 3)　37℃で 4 時間、培養する（対数増殖期)。

コスミドのパッケージング

(B- 1)　宿主大腸菌の培養中に以下の溶液を混ぜ合わせる。

ligation mixture	10 μl	10 μl
GIGAPAC III plus	2 μl	25 μl　＊通常は 2 μl で行う。

(B- 2)　室温で 90 - 120 分間放置する（2 時間を越えないこと)。

宿主大腸菌への感染操作

(C- 1)　上記それぞれの溶液を混合する。

DH5α（対数増殖期）	200 μl	200 μl
packaging mixture	12 μl	35 μl　＊通常は 12 μl で行う。

(C- 2)　37℃で 30 分間放置する。
(option) 1 ml の LB 液体培地を加え、37℃、30 - 60 分間振とう培養する。
(C- 3)　1 枚の LB 寒天培地（アンピシリン入り）に原液を播く。培養したときは集菌し、滅菌水に再けん濁したものを播く。
(C- 4)　瞬時遠心より沈殿を落として上清を除くか、またはプラスチック製白金耳により沈殿を分離する。
(C- 5)　37℃で一晩培養する。
(C- 6)　コロニーから培養し、DNA の構造チェックを行う。

＜H＞ ウイルス産生用コスミドベクターDNA の調製

コスミドベクターで形質転換した大腸菌を長時間培養すると、コスミドの脱落が起こりやすいので注意を要する。菌の収量が低くても、概ね 12 時間程度の培養に止める。コロニーからの培養の場合は、いったん 3 ml の培地で 6-8 時間培養した後、50 ml 培養に上げ、12 時間程度で回収すると良い。グリセロールストックから培養を開始すると、形質転換した大腸菌を長期培養することになるので、お勧めできない。面倒でも、パッケージングしなおした方が良い。

50 ml チューブを利用した場合、遠心機が高速回転に対応していない場合は、最初の DNA 調製をＢのプロトコールで行う。

＜試薬＞

・ Solution I (autoclave)

	final	stock	1000 ml	500 ml
glucose	50 mM		9.01 g	4.504 g
EDTA (pH 8)	10 mM	250 mM	40 ml	20 ml
Tris-Cl (pH 8.0)	25 mM	1 M	25 ml	12.5 ml

・ Solution II (not autoclave)

	final	50 ml
NaOH	0.2 N	0.4 g
SDS	1 %	0.5 g

・ Solution III (3 M K) (not autoclave)

	100 ml
KoAc	29.4 g
90% formic acid	5 ml
dH2O	to 100 ml

・ RNase (10mg/mL)

・ Proteinase K (10mg/mL)

・ コスミド用 PEG

20% PEG 6000

2.5 M NaCl

オートクレーブし、冷蔵保存する。

Ａ．50 ml チューブで調製する場合

(A- 1)　DH5α を目的の配列が挿入されたコスミドベクターで形質転換し、LB アガープレートに播く。コロニー1 個をピペットチップの先でかき取り、50 ml の培地で培養する。

(A- 2)　コニカルチューブに培地を移し、遠心により集菌する。

(A- 3)　集菌した菌を 3 ml の Solution Ⅰによく懸濁する。

(A- 4)　6 ml の Solution II を加え、溶菌させる。

(A- 5)　4.5 ml の Solution III を混ぜながら少しずつ加える。

(A- 6)　遠心により上清を分離する。

(A- 7)　上清を Whatman 541 ろ紙でろ過する。

(A- 8)　ろ液に 30 ml エタノールを加える。

(A- 9)　遠心により沈殿を回収する。

(A-10)　冷 75%エタノールで沈殿を洗う。

(A-11)　遠心により沈殿を回収する。

(A-12)　上清をパスツールペピットなどで除き、壁に残った上清をキムワイプでぬぐう。

(A-13)　沈殿を乾燥させないうちに 600 ul の TE を加え、溶解する。

Ｂ．1.5 ml チューブで調製する場合

(B- 1)　DH5α を目的の配列が挿入されたコスミドベクターで形質転換し、LB アガープレートに播く。コロニー1 個をピペットチップの先でかき取り、3 ml の培地で培養する。これを 12 本準備する。

(B- 2)　遠心により集菌する。2 回の集菌により 3 ml 分を 1.5 ml チューブに集める。

(B- 3)　集菌した菌を 100 μl の Solution Ⅰによく懸濁する。

(B- 4)　200 μl の Solution II を加え、溶菌させる。

(B- 5)　150 μl の Solution III を加え、穏やかに混ぜる。

(B- 6)　15,000 rpm, 4 ℃, 10 min の遠心をかけ、分離した上清を新しい 50 ml チューブに集める。

(B- 7)　上清に 11 ml エタノールを加え、混和する。

(B- 8)　室温で 5 分間静置する。

(B- 9)　5,000 rpm, 10 min の遠心により沈殿を回収する。

(B-10)　冷 75%エタノールで沈殿を洗う。

(B-11)　遠心により沈殿を回収する。

(B-12)　上清をパスツールペピットなどで除き、壁に残った上清をキムワイプでぬぐう。

(B-13)　沈殿を乾燥させないうちに 600 ul の TE を加え、溶解する。

Ｃ．後処理

(C- 1)　溶液を丸底のマイクロチューブ (2 ml)に移す。

(C- 2)　RNase 処理ならびに ProteinaseK 処理を行う。

(C- 3)　同量のコスミド用 PEG 溶液を加える。沈殿物が見えるはずである。

(C- 4)　瞬時遠心より沈殿を落として上清を除くか、またはプラスチック製白金耳により沈殿を分離する。

(C- 5)　600 ul の TE に再懸濁する。
(C- 6)　フェノール、フェノールークロロホルム、クロロホルム抽出を行う。
(C- 7)　1/10 容の 5M NaOAc を加え、2 容の冷エタノールを加える。
(C- 8)　遠心により沈殿を回収する。
(C- 9)　冷 75%エタノールで沈殿を洗う。
(C-10)　遠心により沈殿を回収する。
(C-11)　上清をパスツールペピットなどで除き、壁に残った上清をキムワイプでぬぐう。
(C-12)　沈殿を乾燥させないうちに 100-200 ul の dH_2O を加え、溶解する。

参考文献

- バイオマニュアル UP シリーズ 遺伝子治療の基礎技術（島田隆，斎藤泉，小澤敬也 編）羊土社（1996).
- 佐藤友美，鐘ヶ江裕美，斎藤泉：別冊実験医学　遺伝子導入＆発現解析実験法（斎藤泉，菅野純夫 編) pp27-42,羊土社（1997).
- 寺島美保，近藤小貴，鐘ヶ江裕美，斎藤泉：実験医学 21,931-936 (2003).
- 鵜飼英世、寺島美保、村田武英、横山和尚：実験医学 24, 981-985 (2006).
- Fukuda et al., Cancer Res., 63, 4434-4440 (2003).
- Fukuda et al., Microbiol. Immunol., 50, 643-654 (2006).
- Miyake et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93,1320-1324 (1996).
- Seo et al., Cancer Res., 65, 546-552 (2005).
- Suzuki et al., Oncology Reports 11, 173-178 (2004).
- Ugai et al., Jpn. J. Cancer Res., 93, 598-603 (2003).
- Ugai et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 331, 1053-1060 (2005).
- Ugai et al., J.Gene Med., 7, 1148-1157 (2005).
- Yokoyama et al., Science, 307, 1722 (2005).
- この他「組換えウイルスの情報」を http://www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/adenoja.html ならびに http://www.brc.riken.jp/lab/dna/en/adenovirus.html にも掲載しているので参考にして下さい。

作製済み組換えアデノウイルスを入手した場合

組換えアデノウイルスを受取ってから精製するまでの手順の概要です。操作手順は、本冊子の「３次ウイルス、４次ウイルス作製」の項目以降、または当開発室ウェブサイトの「組換えウイルス標準操作手順書集（日本語）」 http://dna.brc.riken.jp/rvd/sopja.htmlを参考にしてください。

1. 組換えアデノウイルスの増幅

理研 DNA Bank が提供する組換えアデノウイルスはウイルス感染細胞ライセートとしてお送り致します。力価は測定していませんが, おおよそ 10^{6-8} pfu/ml の液を 100 μl 提供致しております。お受け取り後は直ちに培養を開始してください。直ちに培養ができない場合は-80℃で保管し、なるべく早く培養して下さい。

操作方法）10 cmコラーゲンコートディッシュに培養した 293 細胞（培養液 10ml,約 9x10^6 cells）を用意する。ウイルス液を 100 μl感染させる（「組換えウイルス標準操作手順書集（日本語）」Protocol C-1 ,3, 4 次ウイルス感染プロトコール参照）。約 3～4 日後に細胞が死滅したら、約 10mlの培養液を細胞ごと（死滅細胞ごと）50 mLチューブに回収する。すぐに使わない場合は粗ウイルス液としてそのまま－80℃に保存する。すぐに使用する場合は、密閉超音波破砕または凍結融解し、ウイルスを遊離させ,9,400ｇ、10 分、4℃で遠心して上清を回収しウイルス液として使用する（ウイルス液約 10mlが得られる）。残りは、蓋がネジ式のチューブに分注して-80℃に保存する。
この後、本冊子の「組換えウイルスの超遠心による大量調製」に従って、ウイルス粒子を精製してください。

組換えアデノウイルスの輸送ならびに保存時の安定性については、以下の http://dna.brc.riken.jp/en/REPORT/index.htmlまたはUgai, H. et al., Jpn. J. Cancer Res.,93, 598-603 (2002)をご覧ください。

2. 配列と構造の検査

組換えアデノウイルスに限らず、組換え DNA クローンは突然変異を起こす可能性があります。PCR、DNA シーケンシングあるいはウエスタンブロッティングにより、インサート遺伝子の有無を実験前にご自身で調べて下さい。組換えウイルス DNA の調製法は、本冊子をご覧ください。

3. 自律増殖ウイルス混入の検査

理研 DNA Bank の組換えアデノウイルスは、そのほとんどが COS-TPC 法により作製されており(Miyake S. et al., 1996)、自律増殖可能なアデノウイルス(Replication Competent Adenovirus, RCA)が混入する恐れがあります。また、組換えアデノウイルス増殖過程でも宿主である 293 細胞の持つ E1 遺伝子を組み換えにより獲得することが報告されています。理研 DNA Bank でも予め RCA のチェックはしておりますが、万全を期するためにご自身でも RCA が存在しないことをご確認下さい。本冊子及び、Suzuki E et al. (2004)にもその方法を掲載しておりますのでご覧下さい。

4. 組換えアデノウイルスの精製

組換えアデノウイルスの簡便な精製法は、操作手順は本冊子をご覧下さい。また、Purification of recombinant adenovirus (Ugai et al., 2005) または鵜飼ら、実験医学、羊土社、24, 981-985 (2006)にも記載されています。

5. 参考文献

Purification of recombinant adenovirus (Ugai et al., 2005)
鵜飼ら、実験医学、羊土社、24, 981-985 (2006)
Suzuki E et al. (2004)
Miyake S. et al., 1996
Ugai, H. et al., Jpn. J. Cancer Res.,93, 598-603 (2002)
「組換えウイルス標準操作手順書集(日本語)」 http://dna.brc.riken.jp/rvd/sopja.html

Shuttle vectors for construction of recombinant adenovirus (pAx, pAxit and Two Cosmid system vectors)

www.brc.riken.jp/lab/dna/rvd/allavector.html

Name of vector	Cloning site	Promoter[a]	Cre-loxP[b]	Production of recombinant adenovirus				RDB no.
				Intact-genome transfection[c]	Two-cosmid[d]	COS-TPC[e]	Fiber-modified COS-TPC	
pAxcw	*Swa*I					Yes		917
pAxCAwt	*Swa*I	CA				Yes		1678
pAxCALNLw	*Swa*I	CA	Yes			Yes		-[f]
pAxcwit	*Swa*I			Yes		Yes		3120
pAxCAwtit	*Swa*I	CA		Yes		Yes		3121
pUAd5L	*Swa*I				Yes	Yes	Yes	3444
pUAd5LCA	*Swa*I	CA			Yes	Yes	Yes	3445
pUAd5LCALNL	*Swa*I	CA	Yes		Yes	Yes	Yes	3446
pAxCEAwt	*Swa*I	CEA				Yes		2565
pAxcwit2	*Swa*I			Yes[g]		Yes		5212
pAxCAwtit2	*Swa*I	CA		Yes[g]		Yes		5213
pAxCALNLwtit2	*Swa*I	CA	Yes	Yes[g]		Yes		5214
pAxEFwtit2	*Swa*I	EF-1 alpha		Yes[g]		Yes		5215

a, CA, a modified promoter of the chicken gene for beta-actin with a cytomegalovirus-immediate early enhancer (CMV-IE); CEA, carcinoembryonic antigen; EF-1 alpha, elongation factor 1 alpha.

b, Target gene harbored in the recombinant adenovirus can be expressed by co-infection with AxCANCre (RDB no. 1748, Kanegae *et al*., Gene 181: 207-212, 1996).

c, Fukuda *et al*. Microbiol. Immunol. 50: 643-654, 2006.

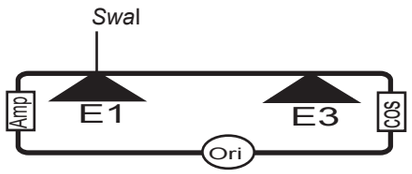
d, Use pAF16Rct (RDB no. 3220) together to generate rAd.

e, Miyake *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1320-1324, 1996.

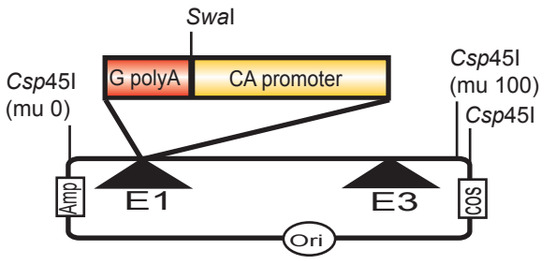
f, Available from Takara Bio Inc. and Nippon gene Co., Ltd.

g, *Pac*I restriction enzyme is also applicable for linearization as well as *Csp*45I restriction enzyme.

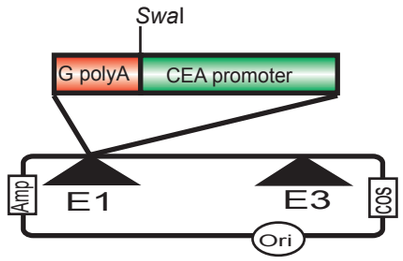
ベクターシリーズ名 入手先	ウイルスゲノムに対する目的遺伝子の向き	目的遺伝子の挿入	Intact-genome transfection	Two-vector	COS-TPC	Fiber-modified COS-TPC
pAxit RIKEN DNA Bank またはタカラバイオ、ニッポンジーン	左	制限酵素	Yes		Yes	
pAx RIKEN DNA Bank またはタカラバイオ、ニッポンジーン	左	制限酵素			Yes	
Two cosmid system RIKEN DNA Bank	左	制限酵素		Yes 相同組換え	Yes	Yes
AdMax Microbix Biosystems Inc., コスモバイオ	右	制限酵素		Yes Cre-loxP		
Adeno-X Clontech, タカラバイオ	右	制限酵素	Yes			
ViraPower インビトロジェン	右	Gateway	Yes			



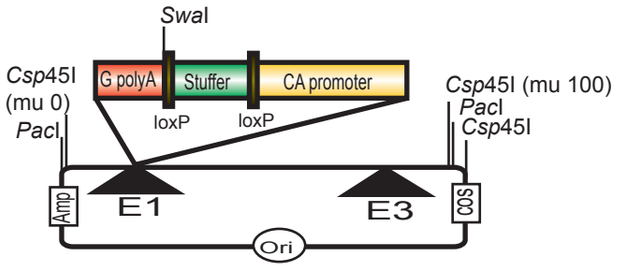
pAxcw
RDB 917



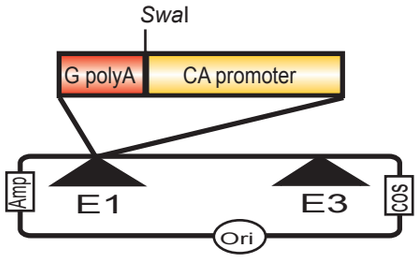
pAxCAwtit
RDB 3121



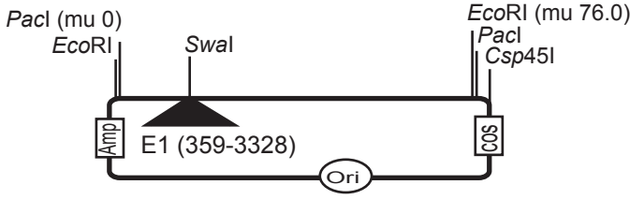
pAxCEAwt
RDB 2565



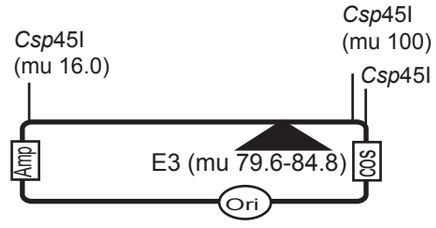
pAxCALNLwtit2
RDB 5214



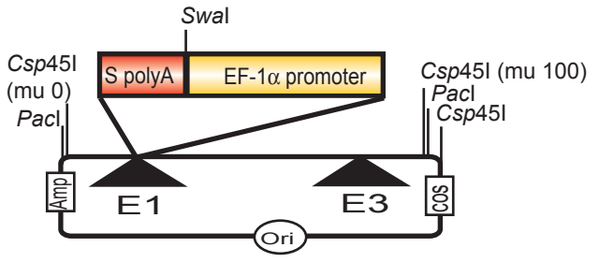
pAxCAwt
RDB 1678



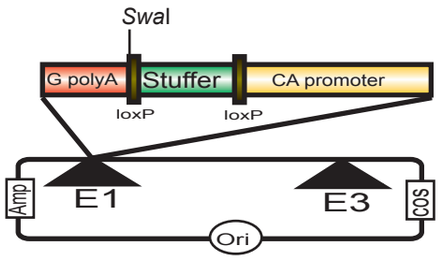
pUAd5L
RDB 3444



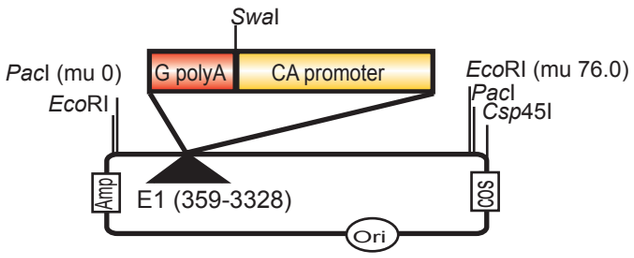
pAF16Rct
RDB 3220



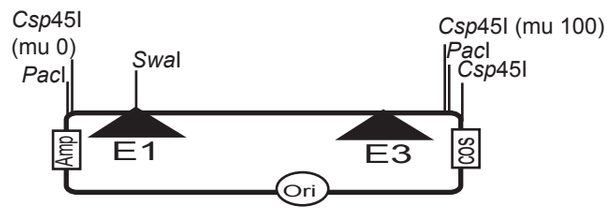
pAxEFwtit2
RDB 5215



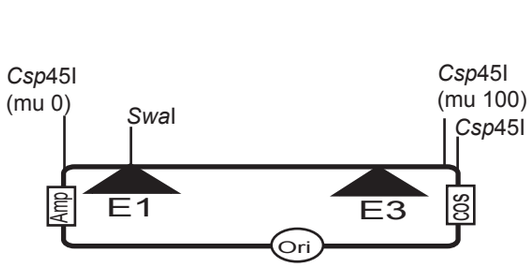
pAxCALNLw



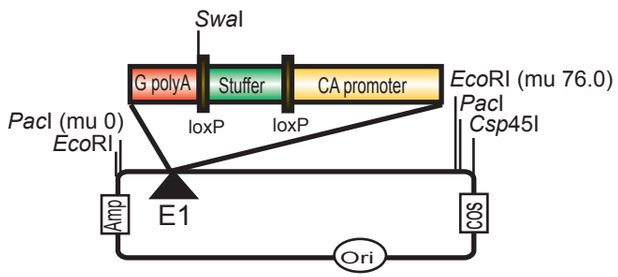
pUAd5LCA
RDB 3445



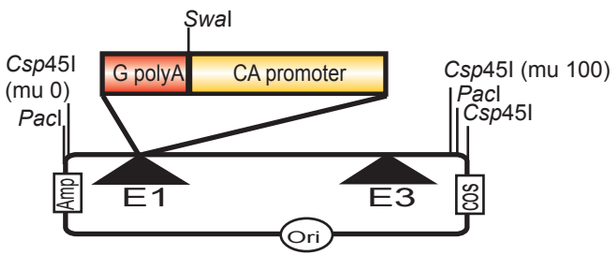
pAxcwit2
RDB 5212



pAxcwit
RDB 3120



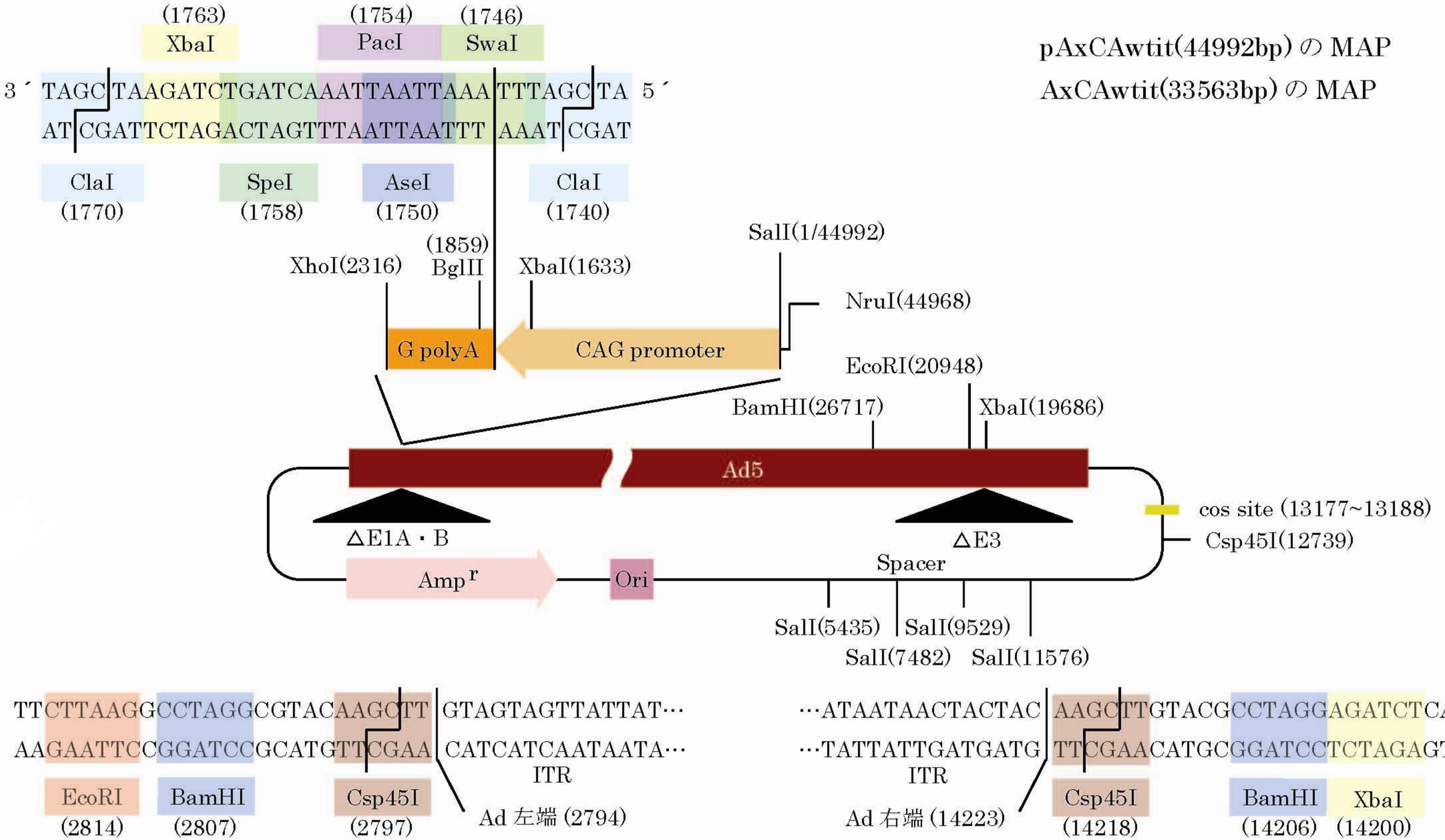
pUAd5LCALNL
RDB 3446



pAxCAwtit2
RDB 5213

pAxCAwtit(44992bp) の MAP

AxCAwtit(33563bp) の MAP



cosmid を XhoI で切断した時見られるバンド…21167,14502,4817,2466,1445,595

recombinant adenovirus を 〃 …14502,9260(右端),4817,2466,1445,595,478(左端)

cosmid を SmaI で切断した時見られるバンド…15450,6480,4456,3685,3540,3386,2468,2263,1455,1398,231,180

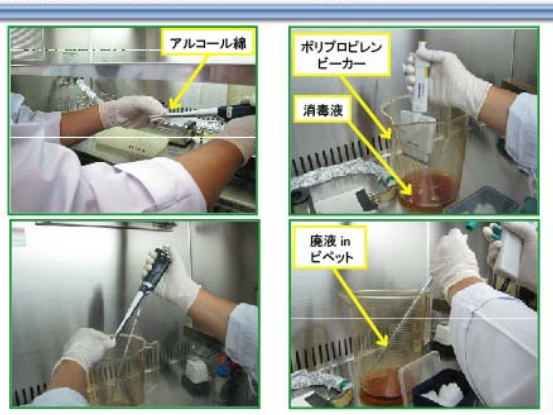
recombinant adenovirus を 〃 …6480,4456,3685,3540,3441(左端),3386,2468,2263,1455,1398,580(右端),231,180

cosmid を ClaI で切断した時見られるバンド…36924,3944,2047,2047,30(+insert)

recombinant adenovirus を 〃 …32509(右端 +CAG promoter),1024(左端 +G polyA),30(+insert)

組換えアデノウイルスを取扱う実験室

拡散防止措置 :エアロゾルを発生させない操作



アデノウイルス非活性化に有効な消毒法

- オートクレーブ：廃液、使用済器具（ゴミ、再利用品）
- 消毒剤：サンプル容器外壁、手、作業台等
  - 10% SDS: 強力、扱いづらい
  - 70%エタノール: 有効、便利
  - ヨード剤（100-200 ppm）：効果良好、色素あり
  - 逆性石けん: 手洗い用
- 紫外線：空間の消毒

実験後の処置

実験従事者へ感染防止

感染回避のための措置

- 防護用具の着用
  （吸入しない、手につかない）
- 実験中、万が一皮膚粘膜に付着した場合、直ちに消毒、洗浄
- 実験後手の消毒、洗浄

他の実験との併行における注意点

隔離措置：

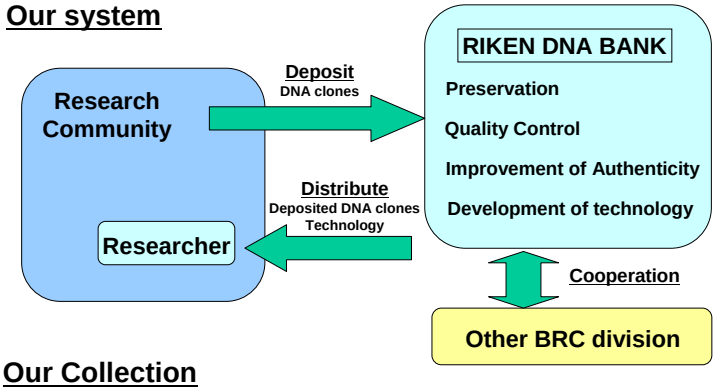
空間的に分ける
時間的にずらす
空間時間ともに分ける

- ❑ ウイルス感染細胞と非感染細胞は別々のインキューベーターで。
- ❑ ウイルス実験と一般的な実験の細胞培養は別々の部屋で行う。
- ❑ ウイルス実験用の器具、培地、試薬などは専用とする。
- ❑ アデノ、レトロ、レンチ等ウイルスベクターは同時に取り扱わない。

Gene Engineering Division

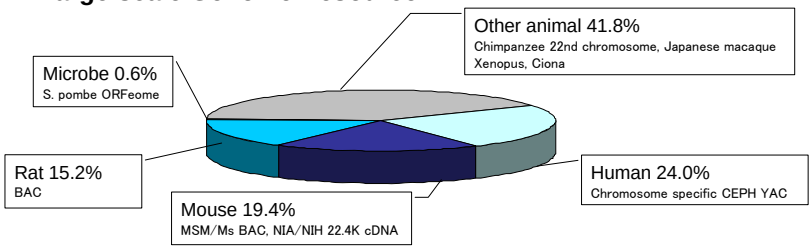
RIKEN DNA Bank supports your research

Our system



Our Collection

A. Large-scale Genome Resource



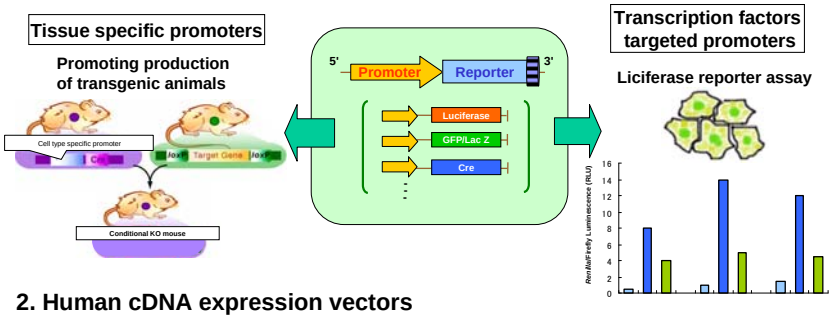
DNA Clone, vector, host, genome DNA	3,502
cDNA library (2.35 x 10^7 clones)	47
Recombinant virus	501
Nakamura & White human RFLP markers	123
Human HLA clones	40
Human SEREX clones	516
Human CEPH MEGA YAC	35,712
Human chromosomes 21 and 22 genome cloned library	444,384
Human full length cDNA cloned library	307,200
NIA/NIH mouse cDNA cloned library	22,407
Mouse early embryo cDNA cloned library	45,216
Mouse BAC cloned library	193,152
Tokushima Univ. mouse cDNA cloned library	374,208
Chimpanzee 22th chromosome genome library	13,824
NBRP Rat BAC cloned library	498,048
NBRP Japanese monkey BAC cloned library	200,064
NBRP *Xenopus* cDNA cloned library	261,888
NBRP *Ciona* EST cloned library	452,352
Tokushima Univ. Cricket cDNA cloned library	60,288
Thermos thermophilus expression and knock-out plasmid sets	2,753
Schizosaccharomyces pombe ORFeome cloned library	14,436

B. Tools for gene transfer

1.Human promoter fused to reporter vectors

Tissue specific promoter

Transcription factors(ATF-2, p53 etc…) targeted promoters

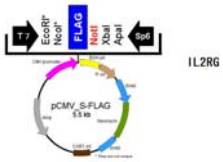


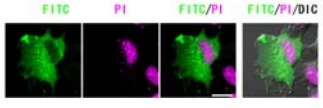
2. Human cDNA expression vectors

Human Full-length CDS (Stem cell related genes, Transcription factors etc…)

HLA antigen (90% alleles observed in the Japanese population)

SEREX cancer antigen





From Dr. Yamaguchi, Chiba university

3. Recombinant adenovirus harboring full-length CDS from human and other animal cDNAs

Locus	125		
Apoptosis	71	Immunology	50
CD/extracellular	8	Insulin	6
Cell activation	32	Kinase/Phosphatase	6
Cell adhesion	10	Neuroscience	11
Cell cycle	43	Nitric oxide	43
Chromatin	3	Obesity	2
Cytoskeltal	2	Oncology	87
Development	30	Posttranscription	9
Disease related	31	Signal transduction	69
Durug metabolism	31	Stress	10
Enzyme	35	Surface receptor	8
Hematopoeisis	24	Transcription factor	61
Control vector	26		

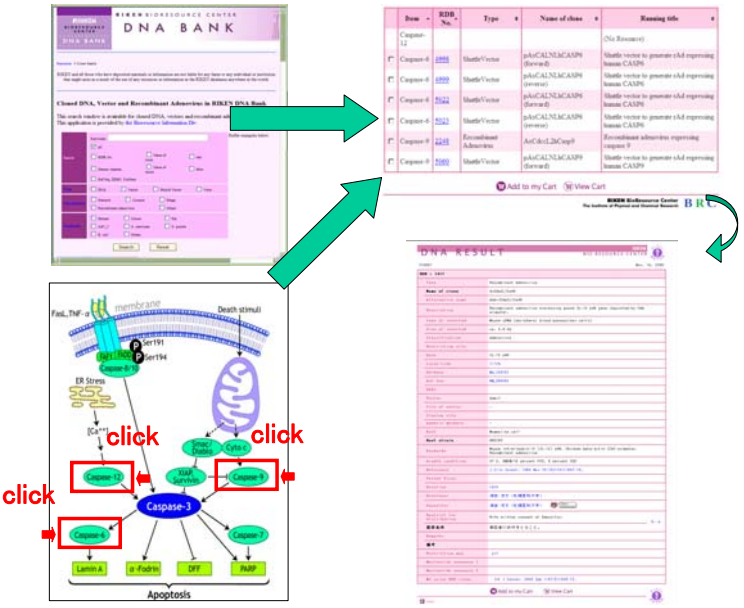
(As of Oct. 20, 2008)

C. Genome Resource

Microorganisms genomic DNAs
form the culture collection of RIKEN BRC-JCM

How to search just your demands ?

DNA Bank Database

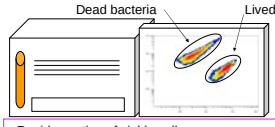


http://www.brc.riken.jp/lab/dna/search/

Development of Technology for Long-term Preservation
(NBRP, National BioResource Project)

Purpose:
Preservation with less space and lower cost

I. Development of automatic counting



- Rapid counting of viable cells
- Reliable estimation of viability of preserved bacteria in solid phase
- Complete counting of *E. coli* within **1 h!**

II. Development of sealing apparatus

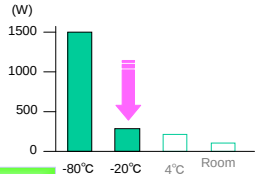
Sealing multi-well culture plate

Forecasting of viability of cells in a long-period

Development of new system

System allowing long-term preservation of *E. coli*

- in freezer
- in refrigerator
- by freeze-drying
- at room temp.



Reduction of cost of electricity

Development of technology for long-term preservation (more than 100 years!)

Foundation for Discoveries and Access to the Future

The Major Activities at the RIKEN BRC

1. Bioresource Infrastructure
(1) Collection, Preservation & Distribution
(2) Quality Control and Improvement
(3) Training and Education
(4) International Cooperation

2. Key Technology Development
Development of technologies for production, preservation, distribution and quality control of bioresources

"Trust"
"Sustainability"
"Leadership"

3. Bioresource Frontier Programs
Molecular imaging, Biological signals, Japan mouse clinic, Human disease models, Novel bioresources, Phenotype database

http://www.brc.riken.jp/

Experimental Animal Division: "Mouse" NBRP

Focus on Novel Strains Developed in Japan

Analysis of Gene Function and Complex Diseases

Genetics, Molecular Biology, Cancer, Allergy & Immunology, Infectious Diseases, Developmental & Regenerative Biology, Neurobiology, Life Style-related Diseases, Drug Discovery

- Live stocks
- Frozen embryos and sperms
- Frozen tissues and organs
- Genomic DNA*1
- ES, EG, iPS cells*2
- MSM BAC library*1

Deposition with MTA

RIKEN BRC
Collection, Preservation
Quality Control
Distribution

Distribution with MTA

- Inbred
- Transgenic
- Knock Out, Knock In
- Conditional KO
- Cre-driver
- ENU mutants
- Wild-derived inbred
- Recombinant inbred
- Congenic, Consomic

Collaboration with
*1 Gene Engineering Division
*2 Cell Engineering Division

Research Needs
The International Scientific Community
Preparation for the deluge of mutant mice!!

Knockout ES Cell Resources
KOMP (NIH, USA)
EUCOMM (EU)
NORCOMM (Canada)
Several groups (Japan & Asia)

Transport as Frozen ES cells
300,000 strains are to be created!!
FIMRe MTA

National & International Biomedical Research Community
Federation of International Mouse Resources (FIMRe)
FIMRe MTA

Tissue-specific Cre-Tgs
Establish efficient technologies & work flow

RIKEN BRC (FIMRe member)
Collection, Preservation, Distribution
Production of KO mice from frozen ES cells
Development of
Novel Technologies (*In vivo* Imaging) and
Novel Resources (Cre Tgs & Disease Models)

KO mouse production facility

Experimental Plant Division NBRP

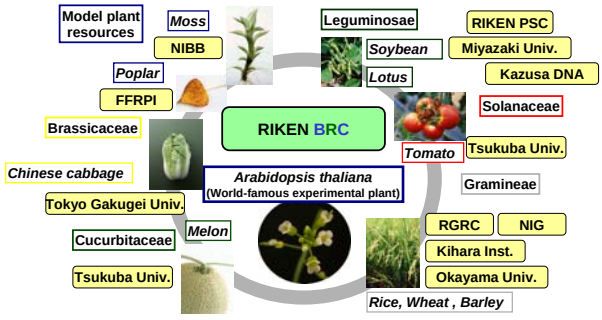
Materials available from Experimental Plant Division
(plant@brc.riken.jp, http://www.brc.riken.jp/lab/epd/Eng)

Seeds of Arabiodpsis
Mutant and natural accessions of model plant, *Arabidopsis thaliana*.

cDNA clones of model plants
cDNA of Arabidopsis, moss, poplar and more. Mostly full-length.

Cultured cell lines of model plant
Cultured cell lines of Arabidopsis, tobacco, rice and more.

RIKEN BRC supports both basic and applied plant research by collaborating with various institutes .



Cell Engineering Division NBRP

Cultured Cell Liens: Basic Research Materials

600 Human cell lines, mainly cancer cell lines
700 Animal cell lines, mainly mouse and rat

Newly Arising Cell Materials

Cells for Genome Research
EB virus transformed human B lymphocytes
Healthy Japanese volunteers
Mongoloid origin：Sonoda-Tajima Collection
Patient origin：Premature aging, Breast cancer

Cells for Regenerative Medicine
Human and mouse ES, iPS cells

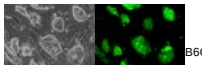
Distribution of iPS cells for the first time in the world
FY2008 distribution of the mouse iPS cells: 295 ampoules

One and only distribution center for Human ES cell in Japan
Human mesenchymal tem cell banking
Human umbilical cord blood banking

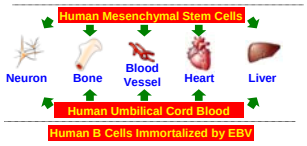
Human iPS cells

Human ES cells

C57BL/6 ES Cell Line

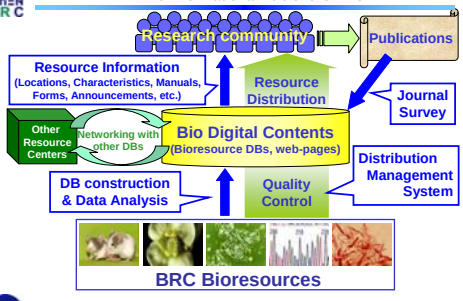

B6G-2

Derived from C57BL/6 Mouse Strain. Expressing GFP Marker.Germline Transmission was Confirmed.



Derived from Japanese.
Derived from Mongoloid in South America.

Bioresource Information Division
- The informational hub of the BRC -



Japan Collection of Microorganisms NBRP

Universities & Research Institutes

NBRP Pathogenic Microbes
Collaboration

RIKEN BRC - JCM
Microbes Research and Development
【Type Strains and Reference Strains of Lactic acid Bacteria, Anaerobes, Aerobes, Actinomyces, Archaea, Extremophiles, Yeasts and Fungi】
- Collection, Identification, Preservation, Quality Control (ISO9001) and Distribution
- Distribution of Genomic DNA of Unexploited Microbes
- Training Courses

Advices & Suggestions
BRC Advisory Council
Steering Committee of BRC-JCM

Micoorganisms and Anaerobic Chamber in BRC-JCM

Rescue Microbes from Endangered Culture Collections [Eg., Tokyo Univ. IAM Culture Collection: 3000 Strains, NIH: Pathogenic Bacteria (BSL2)]

International Cooperation

Asian Microbial Culture Collections: China, Korea, Thailand, Vietnam and etc.

For Official Proposal for New Microbial Species
1) Registration of 16S rRNA gene sequence
2) Deposit of a type strain to at least two public culture collections in different countries using MTA
3) The Microbe Deposit Certificate by JCM
Number of Certificates issued; 250/year, the 2nd in number issued among public culture collections

A: *Actinomycete* isolated from Thailand
B: *Actinomyces* isolated from Malaysia
C: *Actinomyces* from Japan
D: *Bifidobacterium*
E: *Bifidobacterium*
F: *Clostridium*
G: *Treponema*
H: *Bacillus*
I: Anaerobic chamber
K: *Bacillus*
L: *Bacillus*

Contribution for Japanese and International Research Community

For Sustainable Use of Irreplaceable Bioresources

RIKEN
BioResource Center

DNA BANK

【オンラインカタログ】
www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/
【メールニュース】
新規提供可能遺伝子材料のお知らせ、各種セミナーのお知らせ、分子生物学実験手法のヒントなどを配信しております。御希望の方は、下記登録画面からお申し込み下さい。
www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/userappl.html

独立行政法人理化学研究所
バイオリソースセンター　遺伝子材料開発室
〒305-0074　茨城県つくば市高野台3-1-1
Phone: 029-836-3612　Fax: 029-836-9120
E-mail: dnabank@brc.riken.jp