

## 「挿入遺伝子と RCA の確認」

### 1. アデノウイルスの増幅

組換えアデノウイルスは、通常の方法により増幅して下さい。

「別冊実験医学 ザ・プロトコールシリーズ 遺伝子導入 & 発現解析実験法  
羊土社」参照

### 1. RCA 検査のための感染実験

作業手順「RCA 検査のための感染細胞の調製」参照

### 2. DNA 抽出

作業手順書「アデノウイルス感染細胞からの全 DNA 抽出」参照

### 3. DNA の確認と PCR

4-1. 「染色体 DNA を含むアデノウイルスゲノム DNA の制限酵素切断」参照

4-2. 「PCR 法による挿入遺伝子の確認」参照

4-3. 「PCR 法による RCA の確認」参照

## 注釈

1. PCR プライマーは、脱保護グレードのもので十分である。

2. プライマーセットの選択について、

pAxCAwt (RDB No. 1678) によって作製された組換えアデノウイルスは、プライマーセット (PAXCAF1, PAXCAR1) により検出する。また、pAXCALNLw によって作製された組換えアデノウイルスは、プライマーセット (PAXCALNLF1, PAXCAR1) により検出する。

3. PCR 反応は、30 サイクル以上は行わないで下さい。プライマーダイマーが形成される可能性があるため。

4. E1 遺伝子検出のためのポジティブコントロールとしては、293 細胞を用いて下さい。

## 「RCA 検査のための感染細胞の調製」

- 1 . -80 で保存されているウイルス液を取り出す。  
(当バンクでは継代により力価を上げたウイルス液を使用している。)
- 2 . 37 water bath で溶かす。  
Virus が凝集しているので、十分にボルテックスを行う。
- 3 . 5% FCS-DMEM 500  $\mu$ l にウイルス液 10  $\mu$ l を加えたものを準備する。
- 4 . あらかじめ HeLa 細胞を 24 穴プレートで 500  $\mu$ l の 10% FCS-DMEM 液中で培養し、ほぼ 80% confluent になっていることを確認する。
- 5 . 培養上清を取り除く。
- 6 . 細胞に操作 3 の液をすべて(約 510  $\mu$ l/well)加える。
- 7 . CO<sub>2</sub> incubator で 3-5 日まで培養する。  
この間、1 日毎に顕微鏡で細胞を観察する。RCA の混在する組換えアデノウイルスにおいては、細胞の形態に変化が現れる。
- 8 . 培養上清を取り除く。このとき細胞ははがれやすくなっているので静かに操作すること。
- 9 . 細胞をはがさないように PBS(-) 500  $\mu$ l/well で細胞を wash する。
- 10 . 0.02% EDTA-PBS(-) 200  $\mu$ l/well を加える。  
37 で 10 分間ほど置く(細胞が丸くなるのを顕微鏡下で確認する)。
- 11 . さらに PBS(-) 500  $\mu$ l/well を加えてピペティングして細胞をはがし、1.5 ml マイクロチューブに回収する。
- 12 . 14,000 rpm, 4 , 1 min で遠心する。
- 13 . 上清を取り除く。
- 14 . 回収した感染細胞(cell pack)から DNA を抽出する。  
(「アデノウイルス感染細胞からの全 DNA の抽出」の項目を参照)

## アデノウイルス感染細胞からの全 DNA 抽出

1. 1ml の死細胞を、1.5 ml のチューブに 500  $\mu$ l ずつ分注する。
2. 14,000 rpm, 1 min, 4°C で遠心する。
3. 上清を取り除く。
4. それぞれのチューブに、以下の混合溶液を加える。

TNE*	500 $\mu$ l
10 mg/ml proteinase K	5 $\mu$ l
10% SDS	5 $\mu$ l

\*TNE:50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA (pH 7.5)

5. よく混ぜる。
6. 50°C、1 時間反応させる (37°C、一晩でもよい)。
7. フェノール抽出を、1 回行う。  
(このとき、十分にボルテックスを行うこと)。
8. クロロフォルム抽出を、1 回行う  
(このとき、十分にボルテックスを行うこと)。
9. (オプション) 1/10 量の 3M NaOAc (pH 5.2) を加える。
10. 等量の 99.5 % EtOH を加える。
11. 15,000 rpm, 10 min, 4°C で遠心する。
12. 上清を除去し、沈殿を 99.5% EtOH で、リンスする。
13. 乾燥する (乾燥しすぎると DNA が溶けなくなるので、キムワイプでこよりを作成し、余  
分な EtOH を吸い取る)。
14. 100  $\mu$ l の TE+10  $\mu$ g/ml RNase を加える。

## 染色体 DNA を含むアデノウイルスゲノム DNA の制限酵素切断

1. アデノウイルスゲノム DNA を切断する酵素の中で認識配列に CG を含む酵素（例えば XhoI, ClaI, SnaBI）で切断し、アガロースゲル電気泳動を行う。

DNA	8 $\mu$ l
10 × buffer	1 $\mu$ l
Enzyme	1 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

2. 少なくとも 2 時間、37 °C で反応する。
3. 10 × Loading buffer を 1  $\mu$ l 加える。
4. 全量を使用し、アガロースゲル電気泳動を行う。

注釈 1：切断パターンは、塩基配列をもとにあらかじめ調べておく。細胞の染色体 DNA には、CG があまり含まれないので細胞の染色体 DNA は、ほとんど切れない。

注釈 2：uncut DNA も電気泳動を行う。

## PCR 法による挿入遺伝子の確認

作業日 : \_\_\_\_\_

クローン名 : \_\_\_\_\_

担当者 : \_\_\_\_\_

1. 鋳型 DNA を滅菌水を使用し、50 倍希釈する。
2. 以下の反応液を調製する。

50 × Template	1.0 μl
10 × Buffer (KOD Plus)	2.0 μl
10 μM forward primer	0.2 μl
10 μM reverse primer	0.2 μl
H <sub>2</sub> O	13.6 μl
25 mM MgSO <sub>4</sub>	0.8 μl
2 mM dNTP	2.0 μl
KOD Plus	0.2 μl
Total	20.0 μl

Primer sets 1:PAXCAF1, PAXCAR1

Primer sets 2:PAXCALNLF1, PAXCAR1

3. 以下の条件で反応を行う。

PCR 反応	
96	5 min
	<u>1 cycle</u>
96	30"
60	15"
68	___ min/kb
	<u>30 cycles</u>
file	_____
link file	<u>10</u>

4. PCR 産物 10 μl をアガロースゲル電気泳動し、増幅産物と挿入遺伝子の大きさと比較する。

## PCR 法による RCA の確認

作業日 : \_\_\_\_\_

クローン名 : \_\_\_\_\_

担当者 : \_\_\_\_\_

1. 鋳型 DNA を滅菌水を使用し、50 倍希釈する。
2. 以下の反応液を調製する。

50 × Template	1.0 μl
10 × Buffer (KOD Plus)	2.0 μl
10 μM forward primer	0.2 μl
10 μM reverse primer	0.2 μl
H <sub>2</sub> O	13.6 μl
25 mM MgSO <sub>4</sub>	0.8 μl
2 mM dNTP	2.0 μl
KOD Plus	0.2 μl
Total	20.0 μl

Primer set 1:E1AF1, E1AR2

Primer set 2:E1BF2, E1BR2

3. 以下の条件で反応を行う。

PCR 反応	
96	5 min
	<u>1 cycle</u>
96	30"
60	15"
68	2 min/kb
	<u>30 cycles</u>
file	_____
link file	<u>10</u>

4. PCR 産物 10 μl をアガロースゲル電気泳動し、増幅産物と挿入遺伝子の大きさと比較する。  
相当するバンドが存在すれば、RCA 混入の可能性が高い。

表. アデノウイルス検出用プライマー

Name	Position	Sequence	
E1AF1	560-595	5'-ATGAGACATATTATCTGCCACGGAGGTGTTATTAC-3'	in this study
E1AF2	626-661	5'-CTGATCGAAGAGGTACTGGCTGATAATCTTCCACC-3'	in this study
E1AR2	1545-1511	5'-TTATGGCCTGGGGCGTTTACAGCTCAAGTCCAAAG-3'	in this study
E1BF1	2002-2035	5'-AGTTTTATAAAGGATAAATGGAGCGAAGAAACCC-3'	in this study
E1BF2	2097-2131	5'-ACACAAGAATCGCCTGCTACTGTTGTCTTCCGTCC-3'	in this study
E1BR1	2495-2462	5'-AGTGGTCAGCTGCTCTATGGAATACTTCTGCGCC-3'	in this study
E1BR2	3156-3122	5'-TGCGAGAGTGGCTGGCTACGTGAATGGTCTTCAGC-3'	in this study
E1BR3	3285-3251	5'-TGCTCTCGGGCTCAAGCAATATCTTAGTGTGACTC-3'	in this study
jpz1 (E1A)	880-899	5'-GGGTCCGGTTTCTATGCCAA-3'	Hum. Gene Ther. 10, 113-121. (1999)
jpz2 (E1A)	1099-1077	5'-GCCACAGGTCCTCATATAGCAAA-3'	Hum. Gene Ther. 10, 113-121. (1999)
jpz3 (E1B)	2392-2413	5'-CCAGACACCGTCCTGAGTGTAT-3'	Hum. Gene Ther. 10, 113-121. (1999)
jpz4 (E1B)	2628-2607	5'-CGTTCCAGAAATGTAGCAACA-3'	Hum. Gene Ther. 10, 113-121. (1999)
jpz5 (pIX)	3473-3494	5'-CGCTGAGTTTGGCTCTAGCGAT-3'	Hum. Gene Ther. 10, 113-121. (1999)
jpz6 (pIX)	3698-3679	5'-CATCACATTCTGACGCACCC-3'	Hum. Gene Ther. 10, 113-121. (1999)
Ad5fiberF1	31001-31035	5'-GTTCCGTGCCATCCGCACCCACTATCTTCATGTTG-3'	in this study
Ad5fiberR1	31596-31562	5'-AGTGGCAGTAGTTAGAGGGGGTGAGGCAGTGATAG-3'	in this study
PAXCAF1	1601 - 1619	5'-GGCTTCTGGCGTGTGACCGGC-3'	in this study
PAXCAR1	1865 - 1843	5'-CAGAGGGAAAAAGATCTCAGTGG-3'	in this study

**Table. PCR primer sets for detection of Replication competent adenovirus and recombinant adenovirus**

<b>Name</b>	<b>Sequence</b>	<b>Detection</b>	<b>Size</b>
<b>E1AF1</b>	<b>5'-ATGAGACATATTATCTGCCACGGAGGTGTTATTAC-3'</b>	<b>E1A</b>	<b>985 bp</b>
<b>E1AR2</b>	<b>5'-TTATGGCCTGGGGCGTTTACAGCTCAAGTCCAAAG-3'</b>		
<b>E1BF2</b>	<b>5'-ACACAAGAATCGCCTGCTACTGTTGTCTTCCGTCC-3'</b>	<b>E1B</b>	<b>1,059 bp</b>
<b>E1BR2</b>	<b>5'-TGCGAGAGTGGCTGGCTACGTGAATGGTCTTCAGC-3'</b>		
<b>PAXCAF1</b>	<b>5'-GGCTTCTGGCGTGTGACCGGC-3'</b>	<b>Insert DNA</b>	
<b>PAXCALNLF1</b>	<b>5'-CACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC-3'</b>		
<b>PAXCAR1</b>	<b>5'-CAGAGGGAAAAAGATCTCAGTGG-3'</b>		

## RCA に関する参考文献

1. FALLAUX, F.J., BOUT, A., VAN DER VELDE, I., VAN DEN WOLLENBERG, D.J., HEHIR, K.M., KEEGAN, J., AUGER, C., CRAMER, S.J., VAN ORMONDT, H., VAN DER EB, A.J., VALERIO, D., and HOEBEN, R.C. (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 9, 1909-1917.
2. FALLAUX, F.J., KRANENBURG, O., CRAMER, S.J., HOUWELING, A., VAN ORMONDT, H., HOEBEN, R.C., and VAN DER EB, A.J. (1996). Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 7, 215-222.
3. GAO, G.P., ENGDAHL, R.K., and WILSON, J.M. (2000). A cell line for high-yield production of E1-deleted adenovirus vectors without the emergence of replication-competent virus. *Hum Gene Ther* 11, 213-219.
4. HEHIR, K.M., ARMENTANO, D., CARDOZA, L.M., CHOQUETTE, T.L., BERTHELETTE, P.B., WHITE, G.A., COUTURE, L.A., EVERTON, M.B., KEEGAN, J., MARTIN, J.M., PRATT, D.A., SMITH, M.P., SMITH, A.E., and WADSWORTH, S.C. (1996). Molecular characterization of replication-competent variants of adenovirus vectors and genome modifications to prevent their occurrence. *J Virol* 70, 8459-8467.
5. LOCHMULLER, H., JANI, A., HUARD, J., PRESCOTT, S., SIMONEAU, M., MASSIE, B., KARPATI, G., and ACSADI, G. (1994). Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (delta E1 + delta E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum Gene Ther* 5, 1485-1491.
6. ZHU, J., GRACE, M., CASALE, J., CHANG, A.T., MUSCO, M.L., BORDENS, R., GREENBERG, R., SCHAEFER, E., and INDELICATO, S.R. (1999). Characterization of replication-competent adenovirus isolates from large-scale production of a recombinant adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 10, 113-121.