

製品コード 6230、6650 ~ 6657、
6668、6669、6673

研究用

Takara

**AAVpro[®] Helper Free
System**

説明書

本製品の使用について

本製品をご利用の際は、以下の点にご注意ください。

- 本製品の使用には文部科学省の定める省令（「研究開発等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」平成16年文部科学省・環境省令第1号）にあるP1レベル以上の施設が必要です。
- 本製品ご利用の際は省令および組織内の組換えDNA実験安全委員会の指示に従い、安全には十分ご注意ください。
- 本アデノ随伴ウイルスベクターの系によって生産されるウイルスは挿入断片によっては危険なウイルスを含む恐れがあるため、組換えアデノ随伴ウイルスベクターの生産と取扱いには、適切な処置をとる必要があります。吸入や付着を防ぐため、必ず、安全キャビネットを使用してください。
- 本製品の使用には遺伝子工学と細胞培養に関する基本的な技術が必要です。

I. はじめに

I-1. アデノ随伴ウイルスベクター

アデノ随伴ウイルス (Adeno Associated Virus: AAV) は、アデノウイルスやヘルペスウイルスなどのヘルパーウイルスの存在下で増殖するパルボウイルス科ディペンドウイルス属に属する非エンベロープウイルスです。AAV はヒトへの病原性が知られておらず、物理化学的に極めて安定であることが知られています。AAV のゲノムは約 4.7 kb の 1 本鎖 DNA で、両末端に ITR (Inverted Terminal Repeat) と呼ばれる T 字型のヘアピン構造が存在します (図 1)。この ITR が複製の開始点となり、プライマーとして機能するほかウイルス粒子へのパッケージングにも寄与します。AAV のゲノムには 3 つの ORF がコードされており、1 つ目は複製、転写に関連している Rep、2 つ目はウイルス粒子の外殻タンパク質をコードする Cap、3 つ目は非構造タンパク質であり、ウイルス粒子形成に必須の因子である AAP です。Rep 領域には 4 種類の異なるタンパク質 (Rep78、Rep68、Rep52、Rep40) がコードされており、また Cap 領域には 3 種類の異なるタンパク質 (VP1、VP2、VP3) がコードされています。

AAV には 100 を超える血清型が存在しており、血清型の違いによって宿主域やウイルスの持つ特徴が異なることが知られています。タカラバイオでは血清型 1、2、5、6 のアデノ随伴ウイルスベクター調製システムを発売しています。血清型 2 (AAV2) は古くから広く研究されてきた血清型の 1 つであり、宿主域が大変広いことが知られています。血清型 1 (AAV1)、血清型 5 (AAV5)、血清型 6 (AAV6) は、より高い組織指向性を持った血清型です。AAV1 は筋肉、肝臓、気道、中枢神経系等、AAV5 は中枢神経系、肝臓、網膜等、AAV6 は心臓、筋肉、肝臓等への遺伝子導入効率が高いと言われています。詳細に関しては、XII. 参考文献やタカラバイオウェブサイトの「アデノ随伴ウイルス AAV による遺伝子導入」のページをご参照ください。

アデノ随伴ウイルスベクター (AAV ベクター) は、上記のような AAV の特長を利用した、培養細胞や動物個体への遺伝子導入用ベクターであり、研究用ツールのみならず遺伝子治療用ベクターとしても使用実績のあるウイルスベクターです。また、AAV ベクターは文部科学省の定める省令 (「研究開発等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」平成 16 年文部科学省・環境省令第 1 号) にある P1 レベルの施設で取扱いが可能であり、アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターと比較して、安全で取扱いの容易なウイルスベクターとして知られています。AAV ベクターは、増殖/非増殖のいずれの細胞にも遺伝子導入が可能であり、特に非分裂細胞においては長期間の発現が可能です。また、免疫原性が低く、動物個体への遺伝子導入 (*in vivo* transduction ツール) にも適しています。

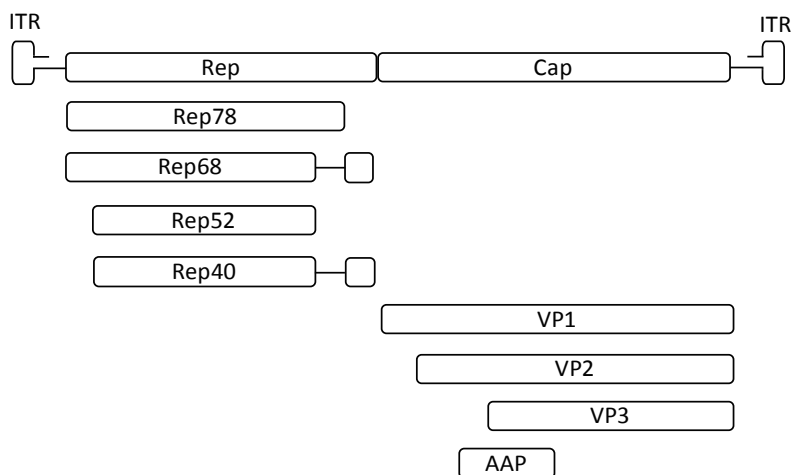


図 1. 野生型 AAV ゲノム構造とコードするタンパク質

I-2. 製品説明、原理

AAVpro Helper Free System は、血清型 1、2、5 または 6 の AAV ベクターをヘルパーウイルスを使用せずに安全に作製するためのキットです (AAV Helper Free System)。本製品を使用して作製した AAV ベクターを用いることにより、標的細胞や標的動物個体において目的遺伝子を一過性に発現させることができます。動物個体への遺伝子導入に使用する場合は、精製した AAV ベクターの使用を推奨します。^{*1}

* 1 : AAV ベクターの精製には AAVpro Purification Kit Maxi (All Serotypes) (製品コード 6666) をお勧めします。このキットでは、簡便かつ短時間で高純度の AAV ベクターが得られます。

血清型 2 においては、アフィニティー精製を利用した AAVpro Purification Kit (AAV2) (製品コード 6232) においても高純度の AAV ベクターを得られます。

製品の特長

A. AAV Helper Free System による AAV ベクターの作製

AAV Helper Free System はヘルパーウイルスを使用せずに高タイターな AAV ベクターを作製する独自のシステムです (図 2)。本製品では、AAV ベクターの作製に必要な複数のプラスミドを HEK293 細胞、もしくは HEK293T 細胞にトランスフェクションすることで、簡便に AAV ベクターを作製することができます。ここで必要なコンポーネントは、以下の 3 種類のプラスミドです。

- pAAV Vector : 目的遺伝子の発現カセットと 2 つの ITR を含むベクタープラスミド

pAAV-CMV Vector (製品コード 6673、6230、6650、6651)

遺伝子導入したい目的遺伝子を MCS に挿入することができるベクタープラスミドです。ただし、AAV 粒子に封入される DNA サイズには制限があるため、挿入する目的遺伝子のサイズは 2.5 kb 以内にしてください。

pAAV-CRE Recombinase Vector (製品コード 6668、6652、6653、6654)

loxP 依存的な recombinase である Cre 遺伝子を発現する AAV ベクター調製用のベクタープラスミドです。Cre recombinase は、トランスジェニックマウスの作製や様々なスクリーニング系で広く使用されています。

pAAV-LacZ Vector (製品コード 6669、6655、6656、6657)

LacZ 遺伝子を発現する AAV ベクター調製用のベクタープラスミドです。調製された AAV-LacZ ベクターは、*in vitro*、*in vivo* において遺伝子導入のコントロールベクターとして使用できます。

- pRC Vector : AAV2 の Rep 遺伝子および各血清型の Cap 遺伝子を含むプラスミド

pRC1 Vector : 血清型 1 (製品コード 6673、6668、6669)

pRC2-mi342 Vector^{*2} : 血清型 2 (製品コード 6230、6652、6655)

pRC5 Vector : 血清型 5 (製品コード 6650、6653、6656)

pRC6 Vector : 血清型 6 (製品コード 6651、6654、6657)

- pHelper Vector : アデノウイルス由来の E2A、E4、VA を含むプラスミド

* 2 : AAV2 用の pRC Vector (pRC2-mi342 Vector) には、miRNA の一種である hsa-miR-342 発現カセットが含まれます。この hsa-miR342 は、AAV2 ベクター作製系でタイター向上効果のある miRNA として、miRNA ライブラリーからスクリーニングされた因子です。一般的な Rep および Cap のみを発現する pRC2 Vector 使用時と比較して約 2 倍のタイター向上効果があります (参考データ 1 参照)。

B. AAV Extraction Solution を用いた AAV ベクター抽出法

従来、AAV ベクター産生細胞からのベクター調製は、凍結融解法や超音波破碎法が用いられていました。これらの方法を実施するには、液体窒素や超音波破碎機をあらかじめ用意する必要がありました。本製品には、当社が独自に開発した AAV Extraction Solution が添付されています。この溶液を使用することで、宿主由来のタンパク質や核酸の混入を抑え、簡便に AAV ベクターを抽出することができます (特許出願中)。

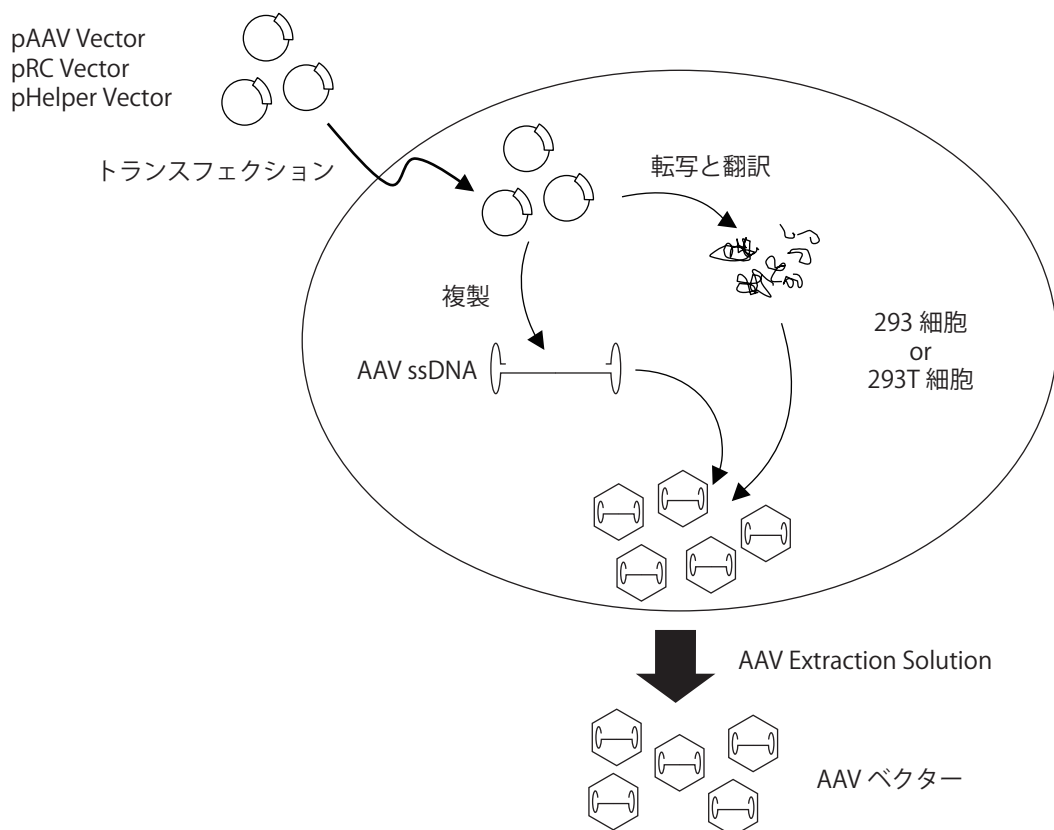


図 2. AAVpro Helper Free System による AAV ベクターの作製

II. キットの内容とプラスミドマップ

II-1. キットの内容

各製品には3種類のプラスミドとAAVベクター産生細胞からのベクター抽出に必要な2種類の試薬が含まれています。

[血清型1]

AAVpro Helper Free System (AAV1) (製品コード 6673)

- | | |
|---|------------------------|
| 1. pAAV-CMV Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 2. pRC1 Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 3. pHelper Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μ l \times 3 |

AAVpro Helper Free System (AAV1-CRE Recombinase) (製品コード 6668)

- | | |
|---|------------------------|
| 1. pAAV-CRE Recombinase Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 2. pRC1 Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 3. pHelper Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μ l \times 3 |

AAVpro Helper Free System (AAV1-LacZ) (製品コード 6669)

- | | |
|--|------------------------|
| 1. pAAV-LacZ Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 2. pRC1 Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 3. pHelper Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μ l \times 3 |

[血清型2]

AAVpro Helper Free System (AAV2) (製品コード 6230)

- | | |
|---|------------------------|
| 1. pAAV-CMV Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 2. pRC2-mi342 Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 3. pHelper Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μ l \times 3 |

AAVpro Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase) (製品コード 6652)

- | | |
|---|------------------------|
| 1. pAAV-CRE Recombinase Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 2. pRC2-mi342 Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 3. pHelper Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μ l \times 3 |

AAVpro Helper Free System (AAV2-LacZ) (製品コード 6655)

- | | |
|---|------------------------|
| 1. pAAV-LacZ Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 2. pRC2-mi342 Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 3. pHelper Vector (1 μ g/ μ l) | 20 μ l |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μ l \times 3 |

[血清型 5]

AAVpro Helper Free System (AAV5) (製品コード 6650)

1. pAAV-CMV Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
2. pRC5 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
4. AAV Extraction Solution A 1.5 ml \times 3
5. AAV Extraction Solution B 150 μl \times 3

AAVpro Helper Free System (AAV5-CRE Recombinase) (製品コード 6653)

1. pAAV-CRE Recombinase Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
2. pRC5 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
4. AAV Extraction Solution A 1.5 ml \times 3
5. AAV Extraction Solution B 150 μl \times 3

AAVpro Helper Free System (AAV5-LacZ) (製品コード 6656)

1. pAAV-LacZ Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
2. pRC5 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
4. AAV Extraction Solution A 1.5 ml \times 3
5. AAV Extraction Solution B 150 μl \times 3

[血清型 6]

AAVpro Helper Free System (AAV6) (製品コード 6651)

1. pAAV-CMV Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
2. pRC6 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
4. AAV Extraction Solution A 1.5 ml \times 3
5. AAV Extraction Solution B 150 μl \times 3

AAVpro Helper Free System (AAV6-CRE Recombinase) (製品コード 6654)

1. pAAV-CRE Recombinase Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
2. pRC6 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
4. AAV Extraction Solution A 1.5 ml \times 3
5. AAV Extraction Solution B 150 μl \times 3

AAVpro Helper Free System (AAV6-LacZ) (製品コード 6657)

1. pAAV-LacZ Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
2. pRC6 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 20 μl
4. AAV Extraction Solution A 1.5 ml \times 3
5. AAV Extraction Solution B 150 μl \times 3

Ready-to-use で使用できる高容量のトランスフェクション用プラスミド（コンポーネント 2 と 3 をセット）を別売り製品として用意しています。

AAVpro Packaging Plasmid (AAV1) (製品コード 6672)

【内容】

- pRC1 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 ml \times 2
- pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 ml \times 2

AAVpro Packaging Plasmid (AAV2) (製品コード 6234)

【内容】

- pRC2-mi342 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 ml \times 2
- pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 ml \times 2

AAVpro Packaging Plasmid (AAV5) (製品コード 6664)

【内容】

- pRC5 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 ml \times 2
- pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 ml \times 2

AAVpro Packaging Plasmid (AAV6) (製品コード 6665)

【内容】

- pRC6 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 ml \times 2
- pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 ml \times 2

II-2. プラスミドマップ

各プラスミドの配列情報は、タカラバイオウェブカタログからダウンロードできます。

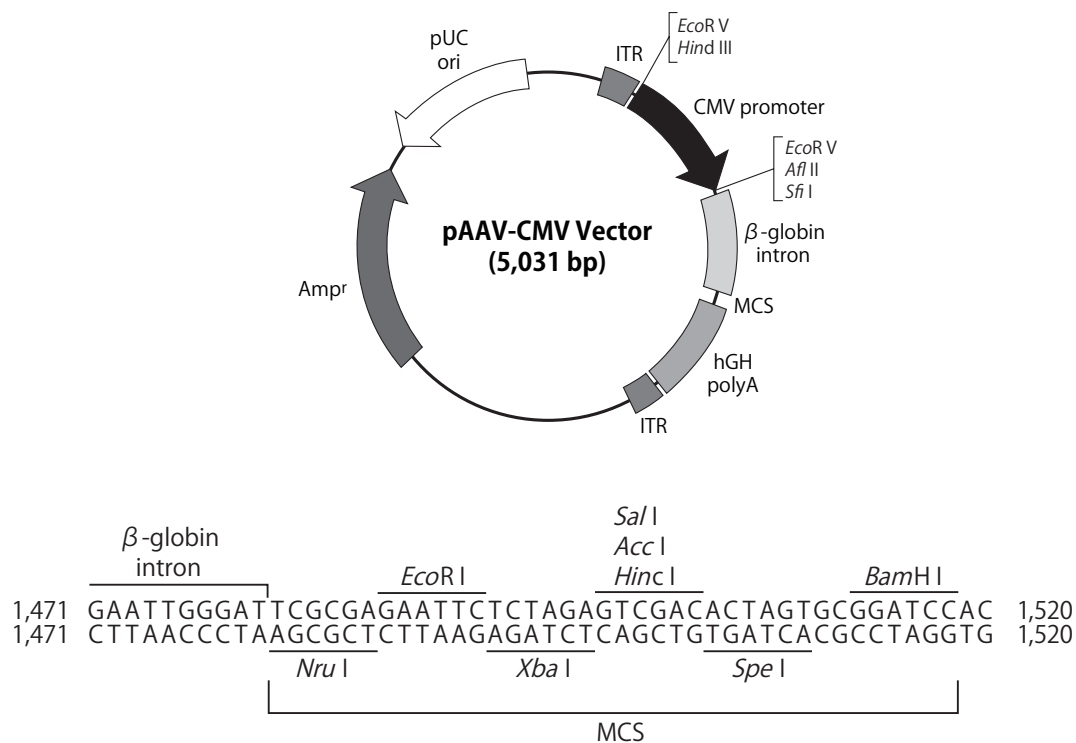


図 3. pAAV-CMV Vector プラスミドマップとマルチクローニングサイト

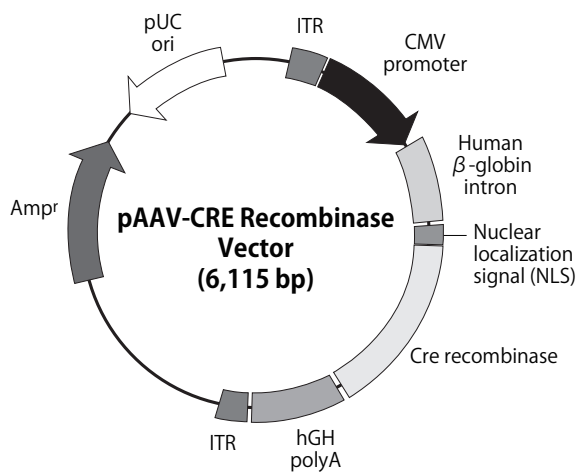


図 4. pAAV-CRE Recombinase Vector プラスミドマップ

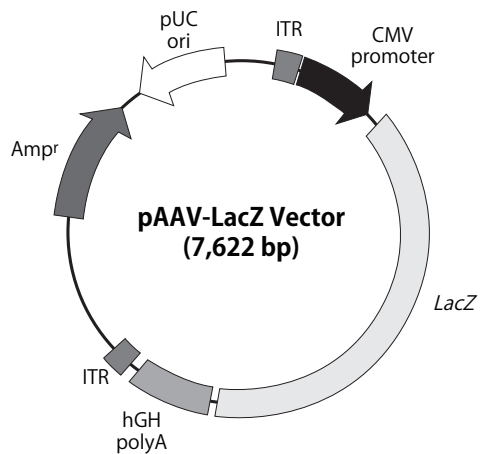


図 5. pAAV-LacZ Vector プラスミドマップ

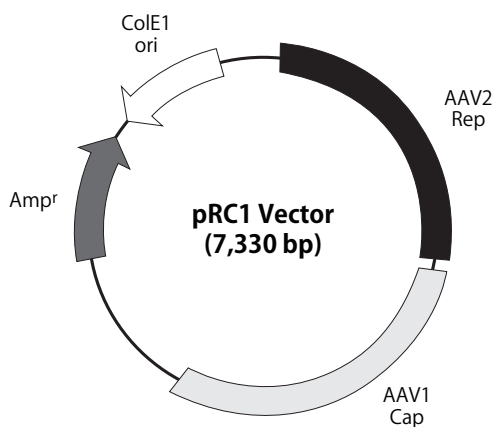


図 6. pRC1 Vector プラスミドマップ

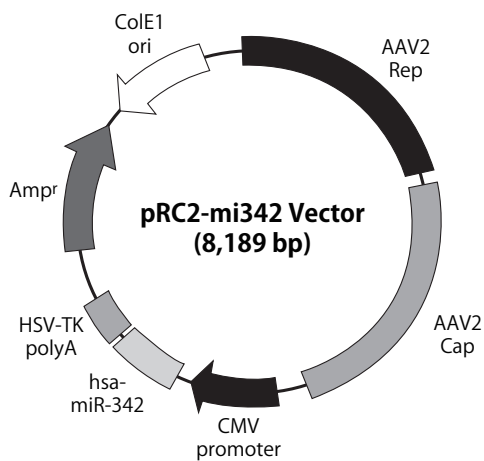


図 7. pRC2-mi342 Vector プラスミドマップ

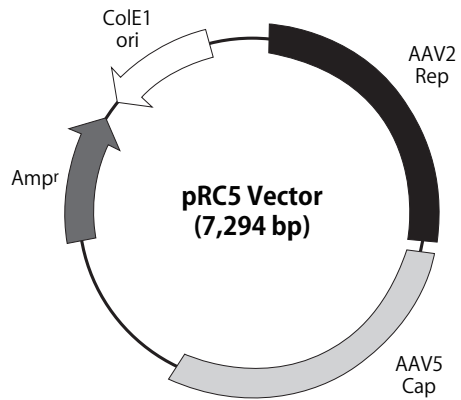


図 8. pRC5 Vector プラスミドマップ

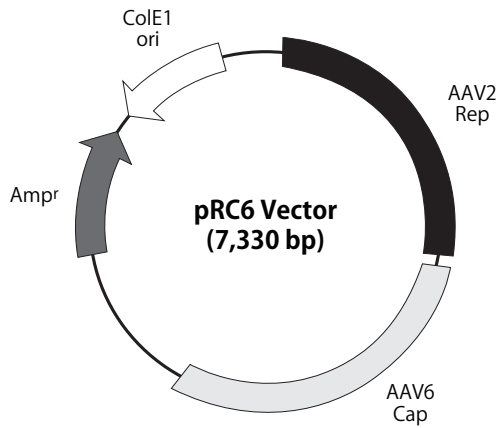


図 9. pRC6 Vector プラスミドマップ

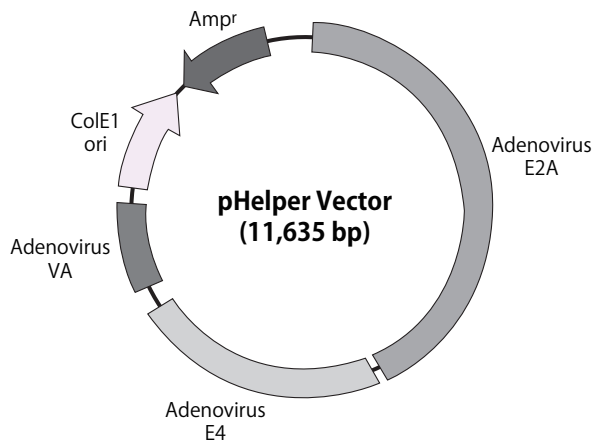


図 10. pHelper Vector プラスミドマップ

III. 保存

−20℃

ただし、AAV Extraction Solution A および AAV Extraction Solution B は融解後、室温保存。
(適切に保存し、受取り後 2 年を目途にご使用ください。)

IV. キット以外に必要な器具、試薬類 (主なもの)

IV-1. 器具・装置

- 100 mm φ細胞培養用表面処理ディッシュ
- 細胞培養に必要な一般的設備

IV-2. 試薬類

- 下記のうちいずれかのトランスフェクション試薬
 - a. CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (製品コード 631312)
 - b. TransIT-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2704)
 - c. Xfect™ Transfection Reagent (製品コード 631317)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 4.5 g/L Glucose with L-Glutamine (584 mg/L)
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- Trypsin EDTA
- HEK293 もしくは HEK293T 細胞*1
- 0.5 M EDTA (pH8.0) (EDTA Buffer Powder, pH8.0 (製品コード T9191))
- pAAV-ZsGreen1 Vector*2 (製品コード 6231 : ポジティブコントロール用)

* 1 : HEK293 もしくは HEK293T 細胞にはいくつかの系統が知られています。細胞株によっては AAV ベクターの産生量が少ない場合がありますのでご注意ください。
タカラバイオでは、AAV ベクター産生に最適化した AAVpro 293T Cell Line (製品コード 632273) を販売しています。AAV ベクター産生にはこの細胞の使用をお勧めします。
なお、作製した AAV ベクターは力価を確認後にご使用ください。

* 2 : pAAV-ZsGreen1 Vector は緑色蛍光タンパク質である ZsGreen1 を発現する AAV ベクタープラスミドであり、トランスフェクション効率の確認や、調製した AAV の生物学的力価を確認するためのポジティブコントロールとして使用するのに便利です。

V. AAV ベクター作製のアウトライン

AAVpro Helper Free System (AAV1/AAV2/AAV5/AAV6) (製品コード 6673/6230/6650/6651) は、目的遺伝子をクローニングするため、下記アウトラインの 1. と 2. の工程を行う。その他の製品 (製品コード 6668、6652、6653、6654、6669、6655、6656、6657) は、3.以降の工程のみでよい。

1. pAAV-CMV Vector への目的遺伝子のクローニング
↓
2. 1. でクローニングしたベクタープラスミド (pAAV Vector) の調製
↓
3. HEK293 細胞または HEK293T 細胞の播種
↓
4. pAAV Vector、pRC Vector および pHelper Vector の HEK293 細胞または HEK293T 細胞へのトランスフェクション
↓
5. 培地交換
↓
6. AAV ベクター産生細胞の回収 (トランスフェクションから 2 ~ 3 日後)
↓
7. AAV ベクター産生細胞からのベクター抽出

VI. 実験操作

AAVpro Helper Free System (AAV1/AAV2/AAV5/AAV6) (製品コード 6673/6230/6650/6651) は、目的遺伝子をクローニングするため、VI-1. と VI-2. の工程を行う。その他の製品 (製品コード 6668、6652、6653、6654、6669、6655、6656、6657) は、VI-3. 以降の工程のみでよい。

VI-1. pAAV-CMV Vector への目的配列のクローニング

標準的なクローニング方法を用いて、目的の遺伝子コード配列 (Gene of Interest: GOI) を pAAV-CMV Vector のマルチクローニングサイト (MCS) に挿入する。クローニングには In-Fusion® HD Cloning Kit (製品コード 639648 など) も使用できる。このキットを用いると、PCR 産物をどのような直鎖状ベクターにも容易にクローニングできる。この際に使用するコンピテントセルには相同性組換えの起こりにくい *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) の使用を推奨する。また、本プラスミドの *EcoRV* サイト等を利用して、CMV プロモーター領域を他のプロモーターに入れ替えることもできる (図 3 参照)。配列情報は、タカラバイオウェブカタログからダウンロードできる。

VI-2. VI-1. でクローニングしたベクタープラスミドの調製

VI-1. でクローニングした目的遺伝子を含むプラスミドを、細胞へのトランスフェクションに適したグレードで調製する。DNA 濃度は $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整する。

(参考) NucleoBond Xtra Midi/Maxi (製品コード 740410.10/740414.10 など) の使用を推奨します。

その場合、調製した DNA 溶液に含まれる不溶性の不純物を最小限にするため、取得したプラスミド DNA を $13,500 \times g$ で 5 分間遠心し、その上清をプラスミド DNA 溶液として使用してください。

VI-3. HEK293 細胞または HEK293T 細胞の播種

HEK293 細胞または HEK293T 細胞を ϕ 100 mm 細胞培養用表面処理ディッシュに $2.5 \sim 4.0 \times 10^6$ cells/dish で播種し、培養する。培地には 10% FBS 含有 DMEM 培地を使用する。なお、以下 VI-4. で CalPhos Mammalian Transfection Kit もしくは Xfect Transfection Reagent を使用する場合は、培地量を 10 ml とし、TransIT-293 Transfection Reagent を使用する場合は培地量を 15 ml としてください。

VI-4. pAAV Vector、pRC Vector および pHelper Vector の HEK293 細胞または HEK293T 細胞へのトランスフェクション

細胞播種翌日、VI-2. で精製した pAAV Vector、本キット添付の pRC Vector および pHelper Vector を用いて、VI-3. で播種した細胞へのトランスフェクションを行う。

トランスフェクション試薬は以下の 3 種類を推奨します。

- CalPhos Mammalian Transfection Kit (製品コード 631312)
- TransIT-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2704)
- Xfect Transfection Reagent (製品コード 631317)

a は比較的安価にトランスフェクションを行うことができ、b は安定して高力価の AAV ベクターを取得するのに適しています。

以下、それぞれの試薬を使用した場合のトランスフェクションプロトコルを紹介します。

a. CalPhos Mammalian Transfection Kit を使用する場合

より高力価な AAV ベクターを取得するため、以下のプロトコルは CalPhos Mammalian Transfection Kit に添付のプロトコルを、本キットへの使用に合わせて一部改良しています。

- $2 \times$ HEPES-Buffered Saline を室温に戻しておく。
- 2 M Calcium Solution を添付の Sterile H₂O 注射用水で 6 倍希釈し、333 mM Calcium Solution を調製し、室温へ戻す。
- 以下の混合比でプラスミド DNA とカルシウム溶液を混合する。

pAAV Vector	1 μ g/ μ l	6 μ l
pRC Vector	1 μ g/ μ l	6 μ l
pHelper Vector	1 μ g/ μ l	6 μ l
Calcium Solution	333 mM	1,000 μ l
Total		1,018 μ l

- $2 \times$ HEPES-Buffered Saline が室温に戻っていることを確認し、3. に 3. の総量と等量の $2 \times$ HEPES-Buffered Saline を添加し、チューブにフタをして上下に 15 回激しく振って混和する。
- 3 分間静置する。

注：静置時間は 3 分間を厳守し、3 分経過後は速やかに次の工程に進んでください。静置時間が長くなるとリン酸カルシウム-DNA の結晶が大きくなりすぎて、トランスフェクション効率が低下することがあります。

- 前日に播種した HEK293 または HEK293T 細胞に 5. の混合液を滴下し、さらに培養する。

b. *TransIT-293* Transfection Reagent を使用する場合

1. *TransIT-293* Transfection Reagent を室温に戻し、使用前にボルテックスで混合する。
2. 以下の混合比で無血清の DMEM とプラスミド DNA を混合し、穏やかにピペティングして完全に混合する。

pAAV Vector	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	5 μl
pRC Vector	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	5 μl
pHelper Vector	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	5 μl
無血清 DMEM もしくは Opti-MEM		1,500 μl
Total		1,515 μl

3. 2. に 45 μl の *TransIT-293* Transfection Reagent を添加し、穏やかにピペティングして混合し、15 ~ 30 分間、室温で静置する。
4. 前日に播種した HEK293 または HEK293T 細胞に 3. の混合液を滴下し、さらに培養する。

c. Xfect Transfection Reagent を使用する場合

1. Xfect Polymer をボルテックスして混合する。
2. 以下の混合比で Xfect Reaction Buffer とプラスミド DNA を混合し、ボルテックスで 5 秒間激しく混合する。

pAAV Vector	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	13 μl
pRC Vector	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	13 μl
pHelper Vector	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	13 μl
Xfect Reaction Buffer		561 μl
Total		600 μl

3. 2. に 11.7 μl の Xfect Polymer を添加し、ボルテックスで 10 秒間激しく混合する。
4. 室温で 10 分間静置する。
5. 1 秒間溶液をスピンドウンし、前日に播種した HEK293 または HEK293T 細胞に滴下し、さらに培養する。

VI-5. 培地交換

トランスフェクションから 6 時間後～翌日に、新しい 2% FBS 含有 DMEM で培地を全量交換する。

注：CalPhos Mammalian Transfection Kit を使用してトランスフェクションを実施した場合は、顕微鏡観察により、リン酸カルシウムの結晶を確認することができます。

VI-6. AAV ベクター産生細胞の回収（トランスフェクションから 2 ~ 3 日後）

1. 0.5 M EDTA (pH8.0) を培養液の 1/80 容量で添加し、よく混合した後、10 分間室温で静置して、細胞をディッシュ表面から剥離させる。
2. 剥離させた細胞を遠心管に回収し、1,750 $\times g$ で 10 分間遠心後、上清を取り除く。

注：上清が残っていると以降の工程に影響が出ることがあるため、可能な限り上清を除去できたことを確認してください。

VI-7. AAV ベクター産生細胞からのベクター抽出

AAV ベクター産生細胞からのベクター抽出には、キット添付の AAV Extraction Solution の使用を強く推奨します。本方法は添付のバッファーを使用するだけで簡便に AAV ベクターを抽出することができ、従来行われていた凍結融解法や超音波破碎法のように液体窒素や超音波破碎機を準備する必要がありません。また、本方法は従来の方法と比較して、高純度かつ簡便に AAV ベクターを抽出することができます (参考データ 2 参照)。

1. VI-6. で調製した細胞ペレットをボルテックスもしくはタッピングにより十分にほぐす。
注：細胞ペレットが十分にほぐれていない場合、抽出効率が低下する恐れがあります。細胞の塊がないことを確認してから次の工程に進んでください。
2. 0.5 ml の AAV Extraction Solution A を添加する。
3. ボルテックスで 15 秒間懸濁する。
4. 室温で 5 分間静置後、さらに 15 秒間ボルテックスして懸濁する。
5. 2,000 ~ 14,000×g、4℃で 10 分間遠心する。
6. 上清を新しいチューブに回収する。
7. 50 μl の AAV Extraction Solution B を添加してピペティングにより混合する。

注 1：回収した AAV ベクターの力価が低い場合は、上記 3. ~ 5. の工程を繰り返すことで抽出効率が向上することがあります。
作製した AAV ベクターは-80℃で保存することができます。

注 2：サンプルによっては AAV Extraction Solution B を添加した際にピンク色に変換することがありますが、性能には問題ありません。

VII. 参考：ウイルス力価の測定

ウイルス力価の測定法は、AAV ベクターゲノムをリアルタイム PCR で定量することによるベクターゲノム定量法と、力価測定用細胞への感染試験を行う生物学的力価測定法があります。前者は迅速で定量性のある力価測定法であり、後者は実際の細胞への感染試験を行うことから、より正確で実質的な力価測定法です。なお、その他の AAV ベクターの力価測定法として、ウイルス外殻タンパクを定量する方法もありますが、この方法では中空粒子を偽陽性として検出してしまう恐れがあります。

ベクターゲノム定量法による AAV ベクターの力価測定法

ベクターゲノム定量法によるウイルス力価の測定には AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (製品コード 6233) を用いることができます。AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 はリアルタイム PCR により、ITR 領域をターゲットとしてベクターゲノムを定量することができるキットです。

蛍光タンパク質 ZsGreen1 遺伝子を搭載した AAV ベクターの生物学的力価測定法

生物学的力価の測定では導入した遺伝子発現を検出して、その力価を測定します。以下に蛍光タンパク質である ZsGreen1 遺伝子を搭載した AAV ベクター (pAAV-ZsGreen1 Vector (製品コード 6231) と AAVpro Helper Free System を用いて調製) の生物学的力価測定法を紹介します。

1. 10% FBS を含有する DMEM を用いて、任意の細胞を 2 ~ 4×10⁴ cells/ml に調製する。
2. 細胞培養用表面処理 24 well plate に 0.5 ml/well で播種し培養する。
3. 培養翌日に、調製した AAV ベクターを 10% FBS を含む DMEM で段階希釈する。希釈倍率はウイルス力価にもよるが、1,000 ~ 100,000 倍での段階希釈が望ましい。
4. 感染から 2 ~ 3 日後、細胞を Trypsin/EDTA で剥がして回収し、フローサイトメーターに供して ZsGreen1 陽性率を評価する。

VIII. 参考データ 1 : pRC2-mi342 Vector 使用による AAV2 ベクタータイター向上効果

血清型 2 の AAVpro Helper Free System に含まれる pRC2-mi342 Vector を使用することで、より高力価な AAV2 ベクターを作製することができます。

以下に参考データとして、pRC2-mi342 Vector を使用することによる AAV2 ベクターの力価向上効果を示します。

実験方法

HEK293 細胞に下記プラスミドをトランスフェクションして AAV2 ベクターを取得した。AAV2 ベクター作製条件は下記のとおりである。

トランスフェクション法：リン酸カルシウム法

トランスフェクションに使用したプラスミド：

- pAAV-CMV-AcGFP1 Vector
- pRC2-mi342 Vector または pRC2 Vector*
- pHelper Vector

培養容器：T25 フラスコ

* : pRC2 Vector : pRC-mi342 Vector から hsa-miR-342 発現カセットを除いた Vector

得られた AAV2 ベクターの力価をリアルタイム PCR により評価した。

その結果を図 11 に示す。hsa-miR-342 を発現する pRC2-mi342 Vector を使用することにより、pRC2 Vector と比較して約 2 倍高い力価の AAV2 ベクターが得られた。

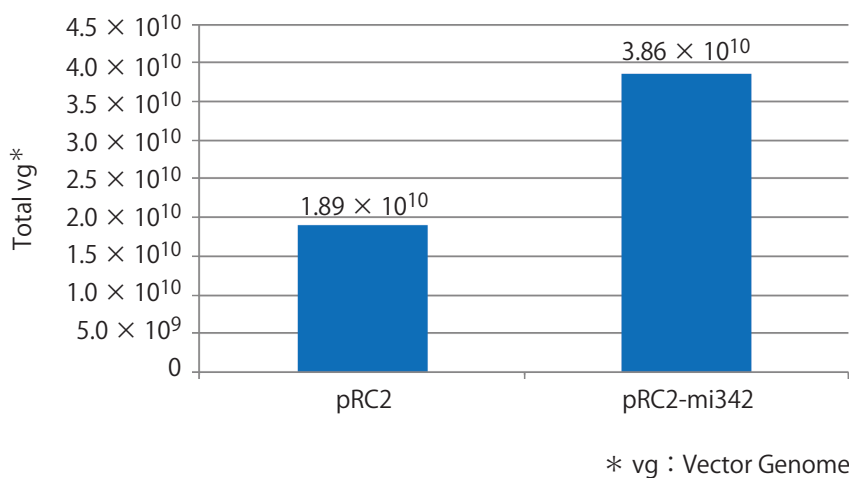


図 11. AAV2 ベクター作製における pRC2-mi342 の効果

IX. 参考データ 2 : AAV Extraction Solution による AAV ベクター抽出効果

本製品に含まれる AAV Extraction Solution A および B を使用することで、簡便に効率よく AAV ベクターを抽出することができます。なお、これらの溶液セットは AAVpro Extraction Solution (製品コード 6235) としてご購入いただけます。以下に参考データを示します。

IX-1. 凍結融解法との比較実験 1

本製品を用いて ZsGreen1 を搭載した各血清型の AAV ベクターを産生する HEK293 細胞を調製した。得られた細胞から AAV Extraction Solution を使用して AAV ベクターの抽出を行った。比較対照として、凍結融解法により AAV ベクターを抽出した。得られた抽出液はリアルタイム PCR によるベクターゲノム定量および HT1080 細胞への感染試験を行い、その力価を評価した (図 12A、B)。その結果、本製品を用いることで簡便に AAV ベクターを得ることができ*、抽出した AAV ベクターは、感染性を有することが示された。

* : 血清型によっては、凍結融解法と比較して抽出効率が低下することもあります。

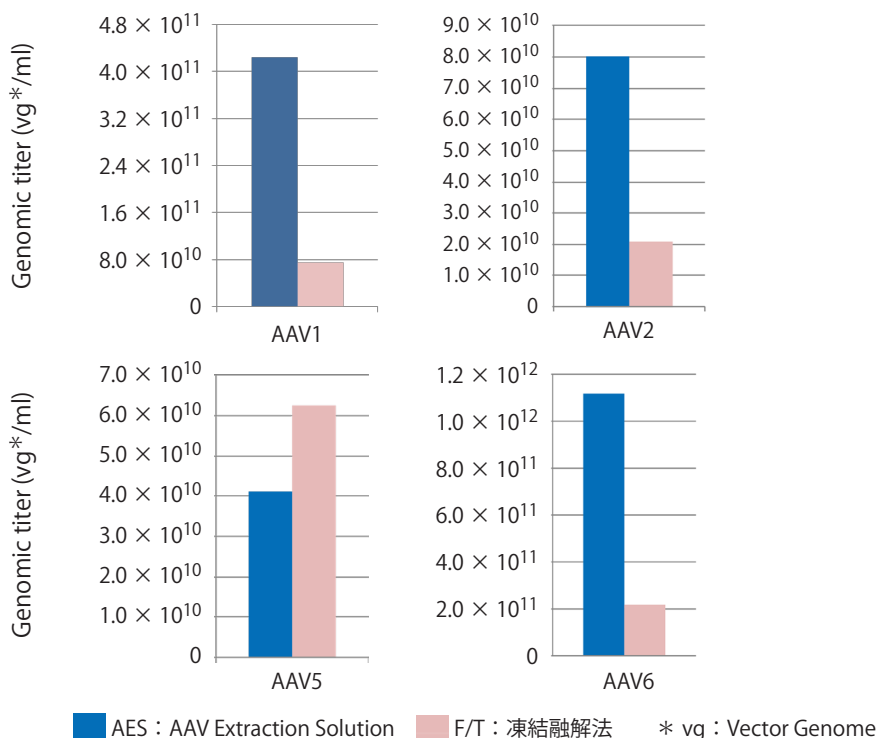


図 12A. AAV Extraction Solution を用いた AAV 抽出効率 - ベクターゲノム定量 -

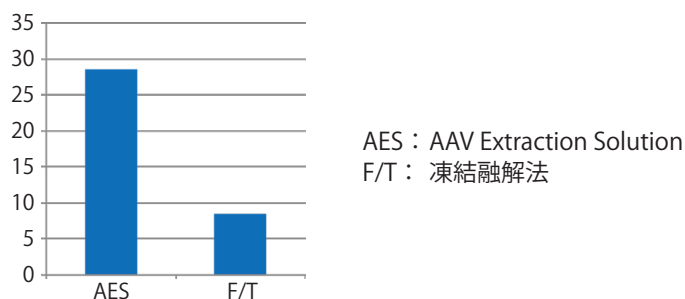
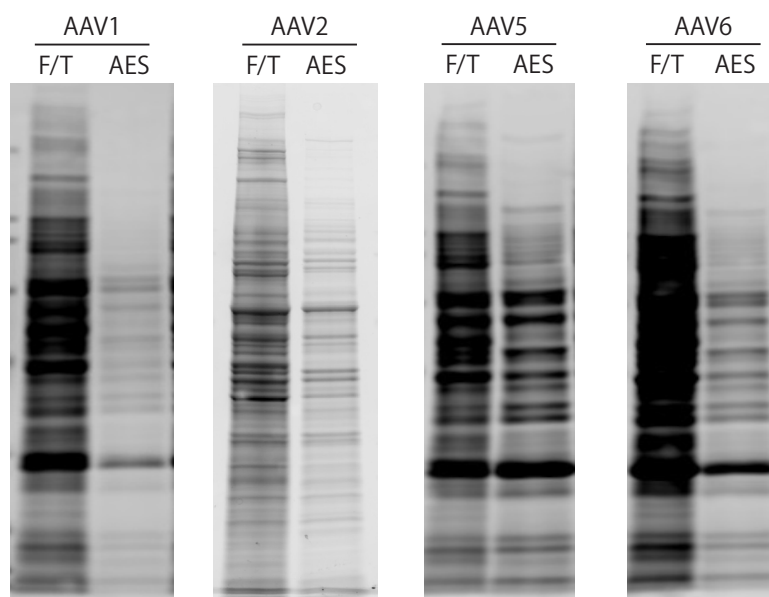


図 12B. AAV Extraction Solution を用いた AAV2 抽出効率 - HT1080 への感染力価 -

IX-2. 凍結融解法との比較実験 2

本製品を用いて各血清型の AAV ベクターを産生する HEK293 細胞を作製した。得られた細胞から AAV Extraction Solution を使用して AAV ベクターの抽出を行った。比較対照として、凍結融解法により AAV ベクターを抽出した。得られたウイルス液はリアルタイム PCR によるベクターゲノム定量を行った後、 1×10^9 vg 分のウイルス液を SDS-PAGE に供して、ウイルス液中に混入している不純タンパク質を評価した (図 13)。さらに AAV2 ウイルス液中の 2 本鎖 DNA 量をインターカレーター法により定量し、混入している 2 本鎖 DNA の定量を行った (図 14)。その結果、AAV Extraction Solution を使用して得られたウイルス液は、凍結融解法と比較して明らかに不純タンパク質と 2 本鎖 DNA の混入が少ないことが示された。



F/T : 凍結融解法 AES : AAV Extraction Solution (1×10^9 vg/lane)

図 13. AAV Extraction Solution を用いて抽出した AAV 溶液の SDS-PAGE

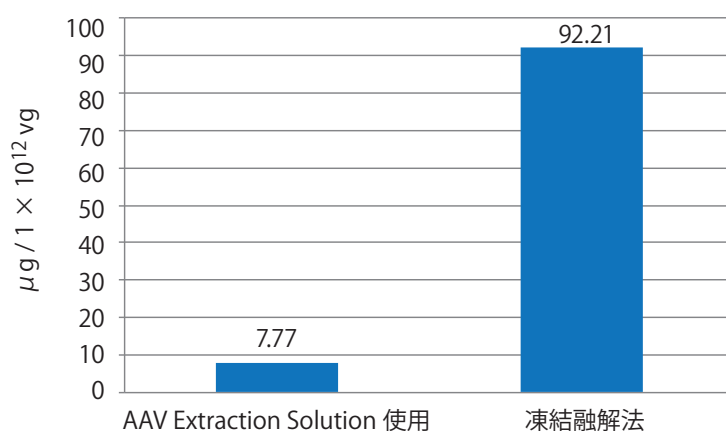


図 14. AAV Extraction Solution を用いて抽出した AAV2 溶液中の 2 本鎖 DNA 混入量

X. 参考データ 3：AAV2-Cre ベクターの感染例

AAVpro Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase) (製品コード 6652) を用いて調製した AAV2-Cre ベクターを AAVpro Purification Kit (AAV2) (製品コード 6232) を用いて精製し、Cre recombinase による組換えが起こると蛍光 (ZsGreen1) を発する HEK293 細胞に感染させた。感染させた AAV2-Cre ベクター量に依存して蛍光を発する細胞集団が増加した。

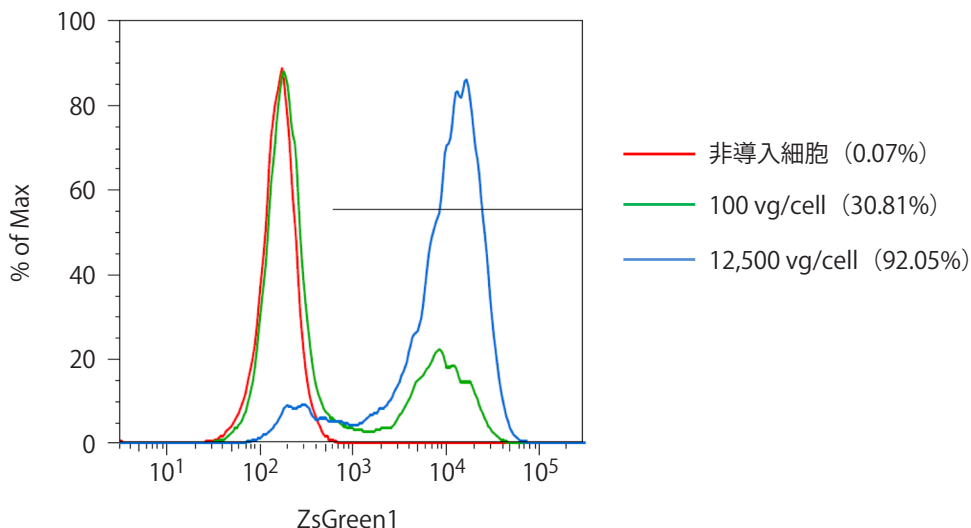


図 15. AAV2-Cre ベクター感染細胞の FACS 結果

XI. 参考データ 4：AAV2-LacZ ベクターの感染例

AAVpro Helper Free System (AAV2-LacZ) (製品コード 6655) を用いて調製した AAV2-LacZ ベクターを AAVpro Purification Kit (AAV2) (製品コード 6232) を用いて精製し、HT1080 細胞に感染させた。Beta-Galactosidase Staining Kit (製品コード 631780) を用いて染色を行い、感染を確認した。

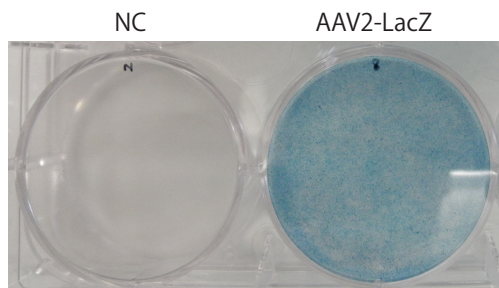


図 16. AAV2-LacZ ベクター感染細胞の X-gal 染色結果

XII. 参考文献

- 1) Miyake K *et al. J Nippon Med Sch.* (2012) **79**(6): 394-402.
- 2) Van Vliet K M *et al. Methods Mol Biol.* (2008) **437**: 51-91.
- 3) Wu Z *et al. Mol Ther.* (2006) **14**(3): 316-327.
- 4) 小澤敬也 他 蛋白質核酸酵素 (2007) **52**(10): 1288-1293.
- 5) Zincarelli C *et al. Mol Ther.* (2008) **16**(6): 1073-1080.
- 6) Ellis B L *et al. Virol J.* (2013) **10**: 74.

XIII. 関連製品

pAAV-ZsGreen1 Vector (製品コード 6231)
AAVpro® Purification Kit Maxi (All Serotypes) (製品コード 6666)
AAVpro® Purification Kit (AAV2) (製品コード 6232)
AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (製品コード 6233)
AAVpro® Extraction Solution (製品コード 6235)
AAVpro® Helper Free System (AAV1-U6-ZsGreen1) (製品コード 6670)
AAVpro® Helper Free System (AAV2-U6-ZsGreen1) (製品コード 6658)
AAVpro® Helper Free System (AAV5-U6-ZsGreen1) (製品コード 6659)
AAVpro® Helper Free System (AAV6-U6-ZsGreen1) (製品コード 6660)
AAVpro® Helper Free System (AAV1-2xU6) (製品コード 6671)
AAVpro® Helper Free System (AAV2-2xU6) (製品コード 6661)
AAVpro® Helper Free System (AAV5-2xU6) (製品コード 6662)
AAVpro® Helper Free System (AAV6-2xU6) (製品コード 6663)
AAVpro® Packaging Plasmid (AAV1) (製品コード 6672)
AAVpro® Packaging Plasmid (AAV2) (製品コード 6234)
AAVpro® Packaging Plasmid (AAV5) (製品コード 6664)
AAVpro® Packaging Plasmid (AAV6) (製品コード 6665)
AAVpro® 293T Cell Line (製品コード 632273)
CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (製品コード 631312)
TransIT-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2704/MIR2700/MIR2705/MIR2706)
Xfect™ Transfection Reagent (製品コード 631317/631318)
Beta-Galactosidase Staining Kit (製品コード 631780)

XIV. 使用上の注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・AAVpro はタカラバイオ株式会社の、In-Fusion は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。CalPhos、Xfect は Takara Bio USA, Inc. の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。
- ・本製品の使用によって生じたいかなる事故、損害についても、弊社では責任を負いかねますので、ご了承の上で使用ください。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社