

製品コード 6232

研究用

Takara

AAVpro[®] Purification Kit (AAV2)

説明書

v201509Da

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。

- 本製品はアデノ随伴ウイルスベクターを含むものではなく、また本製品の使用によりアデノ随伴ウイルスベクターが産生されるものではありません。しかしながら、本製品の使用対象であるアデノ随伴ウイルスベクター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。
- 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

アデノ随伴ウイルス (Adeno-Associated Virus : AAV) は、パルボウイルス科ディペンドウイルス属に属する最も小さなウイルスの 1 種であり、1 本鎖 DNA をゲノムとする非エンベロープウイルスです。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。中でも血清型 2 (AAV2) は古くから広く研究されてきた血清型の 1 つです。

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 の特徴を利用した、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。AAV ベクターを用いて動物個体へ遺伝子導入を行う際は、ウイルス産生細胞や培地由来の不純物を除去し、高純度に精製したウイルスベクターを使用する必要があります。また、培養細胞へ遺伝子導入を行う際にも、精製した AAV ベクターを使用することで、前記不純物の影響をなくすることができます。

II. 製品説明

動物個体や培養細胞に安定して効果的な遺伝子導入を実現させるには、使用する AAV ベクターの純度、力価が大切な要素になります。AAV2 ベクターの精製は、CsCl 濃度勾配超遠心法や iodixanol 超遠心法などが一般的ですが、これらの方法には熟練した技術が必要であり、精製工程にかかる時間、回収率などに課題があります。

AAVpro Purification Kit (AAV2) は、約 4 時間で AAV2 ベクター産生細胞から AAV2 ベクターを簡便に精製できるキットです。

本製品の特長

- ・高精製度、高回収率
- ・独自の AAV ベクター抽出法により凍結融解法や超音波破碎法のような面倒な操作は一切不要 (特許出願中)
- ・ベクター産生細胞から AAV2 ベクターを精製するのに必要なすべてのバッファーを付属
- ・カラム精製タイプなので超遠心分離などの煩雑な工程は不要
- ・Nuclease 処理無しでも、2 本鎖 DNA の混入を著しく低減

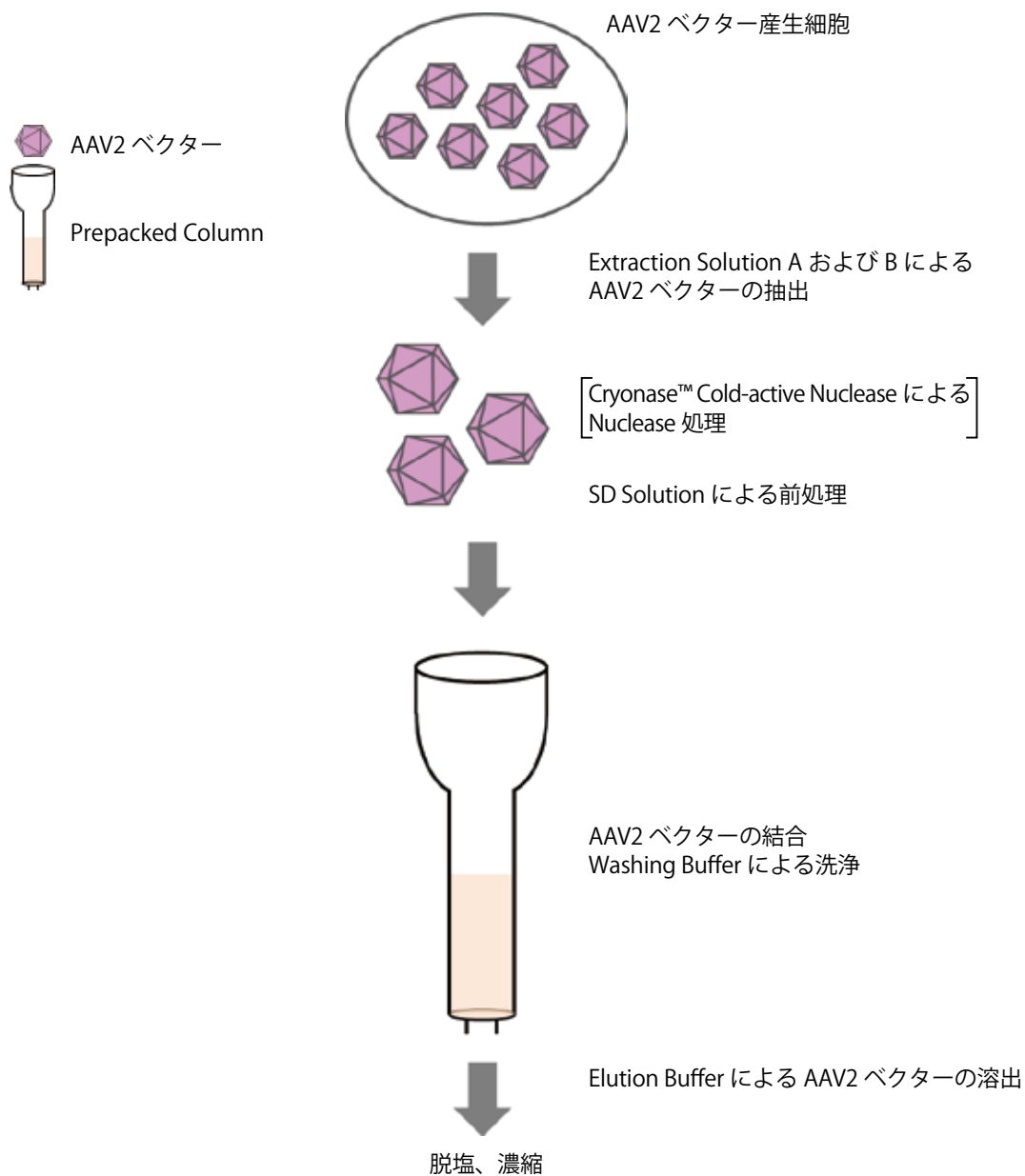


図 1. AAVpro Purification Kit (AAV2) を使用した AAV2 ベクターの精製工程の概略

III. キットの内容

本製品には、AAV2 ベクターの精製に必要なバッファー、カラムが含まれています。

1.	AAV Extraction Solution A	14 ml × 2 本
2.	AAV Extraction Solution B	2.8 ml
3.	SD Solution*1	2.8 ml
4.	Equilibration Buffer	11 ml × 2 本
5.	Washing Buffer	11 ml × 2 本
6.	Elution Buffer	7 ml
7.	Suspension Buffer	1.2 ml
8.	Prepacked Column*2	2 本
9.	Filter Device	2 本
10.	Collection Tube	4 本

* 1 : SD Solution は 4℃ 保存により白色沈殿物が生じることがありますが、品質、性能には問題ありません。この場合は、37℃ で温めて完全に溶解させてから使用してください。

* 2 : Prepacked Column 1 本につき T225 フラスコ 10 枚までの AAV2 ベクターの精製が可能です。(T225 フラスコ 5 枚分の精製を推奨します。)

IV. 保存 4℃

V. キット以外の器具・試薬 (主なもの)

【器具】

- ・細胞培養に必要な一般的設備
- ・50 ml 滅菌済み遠心チューブ
- ・T225 フラスコ
- ・15 ml 滅菌済み遠心チューブ

【試薬】

- ・0.5 M EDTA (pH8.0) (EDTA Buffer Powder, pH8.0 (製品コード T9191))

(Nuclease 処理を行う場合は以下の試薬も必要です)

- ・1 M MgCl₂ 溶液
- ・Cryonase Cold-active Nuclease (製品コード 2670A/B)

VI. 実験操作

下記に T225 フラスコ 5 枚で調製した AAV2 ベクターを精製するプロトコルを示します。なお、調製された AAV2 ベクターが T225 フラスコ 10 枚分までであれば、下記プロトコルに使用するバッファ量は変更せずに実施することができます。

なお、AAV2 ベクター産生細胞の調製には、AAVpro Helper Free System (AAV2) (製品コード 6230) の使用を推奨します。

VI-1. AAV2 ベクター抽出液の調製

本キットでは、AAV2 ベクター産生細胞からのベクター抽出に一般的に行われている凍結融解法や超音波破碎法は行わず、独自に開発した AAV Extraction Solution A および AAV Extraction Solution B を使用します。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、効率的かつ簡便に AAV2 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. AAV2 ベクター産生細胞を含む培養液に、0.5 M EDTA (pH8.0) を 1/80 容量添加し、よく混合する。
2. 室温で 10 分間反応後、細胞を剥離させ、複数本の 50 ml 滅菌済み遠心チューブに回収する。
3. 1,750 × g、4°C で 10 分間遠心後、上清を約 5 ml 残して除き、タッピングにより細胞ペレットをほぐしたのち、1 本の 50 ml 滅菌済み遠心チューブにまとめる。その後、さらに 1,750 × g、4°C で 10 分間遠心後、上清を完全に除去し、細胞ペレットを回収する。

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、完全に上清を除去できたことを確認してください。

4. 細胞ペレットをタッピングもしくはボルテックスで十分にほぐす。
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。
5. 10 ml の AAV Extraction Solution A を添加する。
6. ボルテックスで 15 秒間懸濁する。
7. 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。
8. 2,000 ~ 14,000 × g、4°C で 10 分間遠心する。
注：回収した AAV2 ベクターの力価が低い場合は、上記 6. ~ 8. の工程を繰り返すことで効率が向上することがあります。
9. 上清を新しい滅菌済み遠心チューブに回収し、AAV Extraction Solution B を 1 ml 添加する。

注 1：この時点で -80°C で保存することができます。保存しない場合は速やかに VI-1-10. または VI-1-11. へ進んでください。-80°C で保存した場合は、37°C の恒温槽で速やかに溶解してから使用してください。

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わることがありますが、性能には問題ありません。

10. Nuclease 処理を実施する (参考データ 2 参照)。
Nuclease 処理を実施する場合は、以下の 10N-1、10N-2、10N-3 を行ってから VI-1-11. に進んでください。
10N-1. VI-1-9. で得られた AAV2 ベクター液に 1 M MgCl₂ を 1/100 量添加する。
10N-2. Cryonase Cold-active Nuclease を終濃度 2 U/μl で添加し、37°C、30 分間反応させる。
10N-3. 2,000 ~ 14,000 × g、4°C で 10 分間遠心後、上清を新しい 50 ml 滅菌済み遠心チューブに回収する。

-
- SD Solution を 1 ml 添加し、30 分間、37°C で反応させ、 $2,000 \sim 14,000 \times g$ 、4°C で 10 分間遠心後、上清を精製前の AAV2 ベクター溶液とする。

注：SD Solution は 4°C 保存により白色沈殿物が生じることがありますが、品質、性能には問題ありません。この場合は、37°C で温めて完全に溶解させてから使用してください。

VI-2. AAV2 ベクターの樹脂への吸着、洗浄、溶出

カラムは自然落下タイプです。カラム使用前に安全キャビネット内にカラムスタンドと溶液回収ボトルもしくはチューブを設置する必要があります。カラムは使用前に縦型に設置し、樹脂表面が水平となったことを確認してからご使用ください。以下の操作は樹脂が乾燥しないように注意して実施してください。

注：カラムの樹脂部分に空気が含まれると、流速が遅くなることがあります。使用前にご確認いただき、空気が含まれている場合はピペティングで空気を除去後、樹脂を沈めてご使用ください。

- Prepacked Column をセットして、カラム上下のキャップを外して内部の溶液を除いた後、10 ml の Equilibration Buffer をアプライし、カラムの平衡化を行う。
- VI-1-11. で得られた AAV2 ベクター溶液をカラムに添加する。
- 10 ml の Washing Buffer でカラムの洗浄を行う。
- 回収用の 15 ml 滅菌済み遠心チューブをセットし、3 ml の Elution Buffer で AAV2 ベクターを溶出する。

VI-3. AAV2 ベクター液の脱塩、濃縮

- Collection Tube に付属の Filter Device をセットする。
- セットした Filter Device に VI-2-15. で溶出した AAV2 ベクター溶液を 500 μ l 添加し、 $2,000 \times g$ 、4°C で 5 分間遠心後、フロースルーを廃棄する。
- さらに AAV2 ベクター溶液を Filter Device に添加し、上記 17. と同様に遠心、フロースルーの廃棄を Filter Device 内の液量が 100 μ l 以下になるまで繰り返す。
- 400 μ l の Equilibration Buffer を Filter Device に添加し、 $2,000 \times g$ 、4°C で 5 分間遠心後、フロースルーを廃棄する。

注：Filter Device 内の液量が 100 μ l 以下であることを確認する。100 μ l 以上ある場合は VI-2-19. の遠心操作を繰り返す。
- Filter Device に 400 μ l の Suspension Buffer を添加し、Filter Device 内側面の膜を洗うように 100 回以上ピペティングを行う。
- 新しい Collection Tube に上記 20. の Filter Device を逆さにセットし、 $1,000 \times g$ 、4°C で 1 分間遠心後、回収した溶液を精製 AAV2 ベクターとする。

VII. 参考データ 1：他社 AAV2 ベクター精製キットとの性能比較

AAVpro Helper Free System (AAV2) を使用して T225 フラスコ 5 枚で調製した、蛍光タンパク質 ZsGreen1 を搭載する AAV2 ベクター産生細胞から、本キットおよび 2 種の市販の AAV2 精製キット (A 社、B 社) を用いて AAV2 ベクターの精製を行い、性能を比較しました。

VII-1. AAV2 ベクター収量評価

各キットにより得られた精製 AAV2 ベクター量を図 2 に示した。AAV2 ベクター量は AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (製品コード 6233) を使用して、リアルタイム PCR により定量した。その結果、AAVpro Purification Kit (AAV2) は、他社精製キットと比較して 3 倍以上の高い収量が得られた。

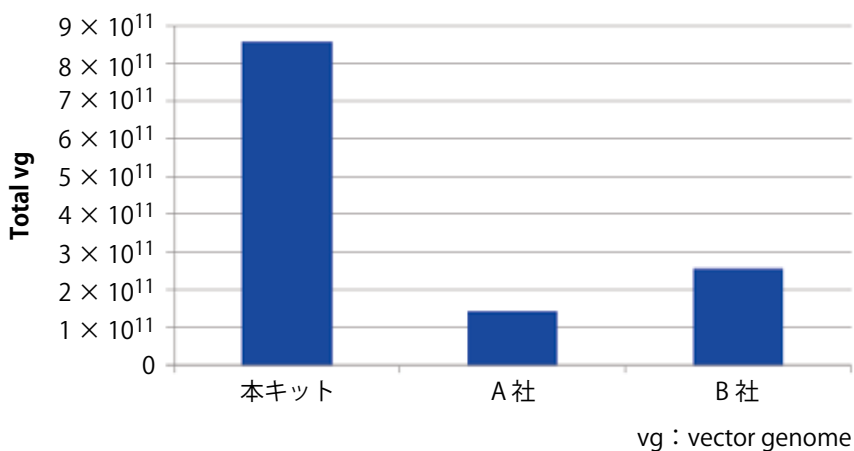


図 2. 各キットを用いて精製した AAV2 ベクター収量

VII-2. 精製度評価

精製した AAV2 ベクターをレーンあたり 1×10^9 vector genome (vg) で SDS-PAGE に供し、精製度を評価した (図 3)。その結果、AAVpro Purification Kit (AAV2) で精製した AAV2 ベクターは、他社キットで精製したものと比較して、AAV2 構成タンパク質以外のバンドは確認されず、最も精製度が高いことが示された。

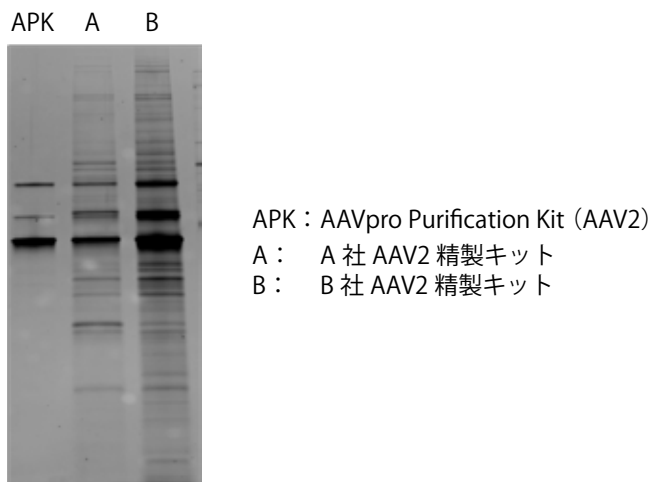


図 3. 各キットを用いて精製した AAV2 ベクターの SDS-PAGE

VII-3. HT1080 細胞への感染能評価

精製した AAV2 ベクターの HT1080 細胞への感染力価を評価した (図 4)。精製した AAV2 ベクターはいずれも 2,500 vg/cell で感染させ、3 日後にフローサイトメトリー解析を行った。その結果、AAVpro Purification Kit (AAV2) で精製した AAV2 ベクターは、他社キットで精製したものと比較して最も高い導入率を示した。

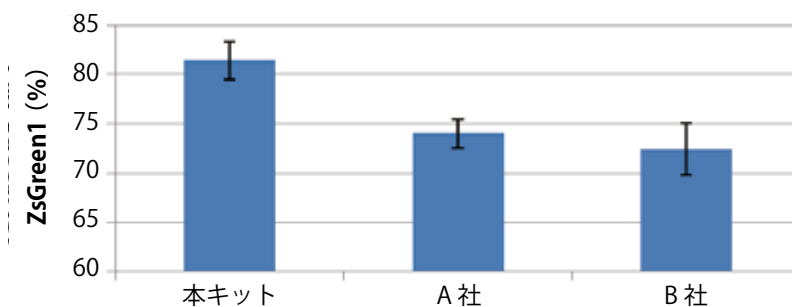


図 4. 各キットを用いて精製した AAV2 ベクターの HT1080 への感染力価

VIII. 参考データ 2：本キットにより精製した AAV2 ベクター中の残存 2 本鎖 DNA への影響

本キットにより精製した AAV2 ベクター溶液中の残存 2 本鎖 DNA は著しく低減されておりますが、前記 VI-1-10. の Nuclease 処理工程を実施することで、2 本鎖 DNA の混入をさらに低減させることができます。以下に、本キット使用における残存 2 本鎖 DNA への影響について示します。

T225 フラスコ 5 枚で調製した AAV2 ベクター産生細胞から、本キットのプロトコールの Nuclease 処理有無の両条件により、AAV2 ベクターを調製した。また、比較対象として、本キット添付の AAV Extraction Solution A および AAV Extraction Solution B の代わりに、凍結融解法により抽出した AAV2 ベクターをサンプルとして、同じ条件で精製を行った。得られた精製 AAV2 ベクター液中の 2 本鎖 DNA をインターカラー法により定量した (図 5)。その結果、本キットを使用して精製した AAV2 ベクター液は、凍結融解法を使用した場合と比較して、Nuclease 処理を行わない場合でも明らかに残存 2 本鎖 DNA 量が低減されていた。また、本キットのプロトコールに従って、Nuclease 処理を行った場合は、さらに残存 2 本鎖 DNA 量が低減されていた。

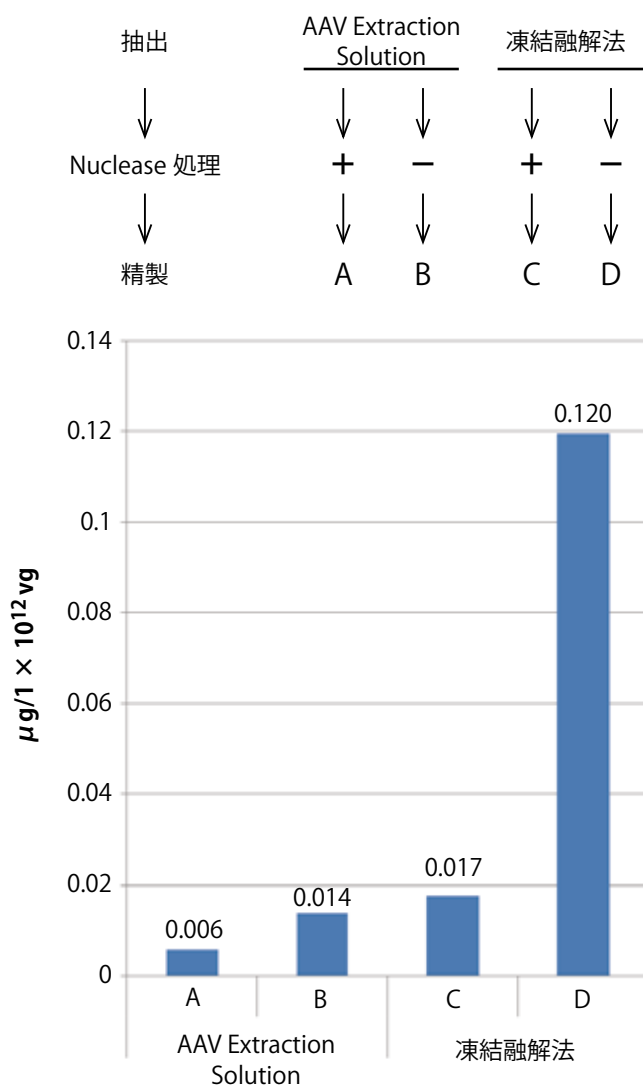


図 5. 各方法で精製した AAV2 ベクター液中の 2 本鎖 DNA 量

IX. 参考データ 3 : AAV Extraction Solution により抽出した AAV2 ベクター中の不純物評価

本キットに含まれる AAV Extraction Solution A および AAV Extraction Solution B を使用することで、不純物の混入を抑えて AAV を抽出することができます。以下に、参考データを示します。

T225 フラスコ 5 枚で調製した AAV2 ベクター産生細胞から、本キットに添付の AAV Extraction Solution A および AAV Extraction Solution B を使用して AAV2 ベクターの抽出を行った。比較対象として凍結融解法により AAV2 ベクターを抽出した。得られた抽出液はリアルタイム PCR によりベクターゲノム定量を行った後、 1×10^9 vg 分の抽出液を SDS-PAGE に供して、抽出液中に混入している不純タンパク質量を評価した (図 6)。さらにインターカレーター法により、混入している 2 本鎖 DNA の定量を行った (図 7)。その結果、本キットに添付の AAV Extraction Solution を使用することで、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。

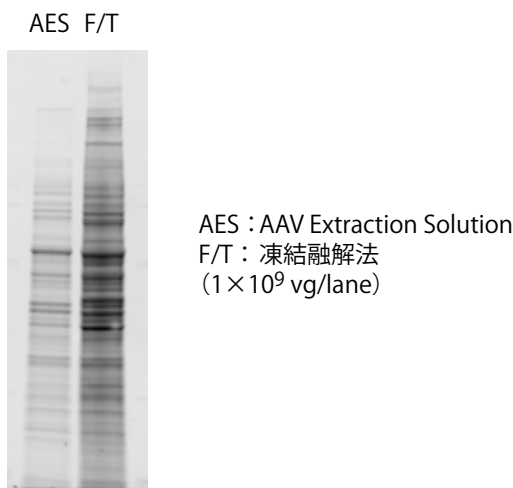


図 6. 各方法で抽出した AAV2 ベクター抽出液の SDS-PAGE

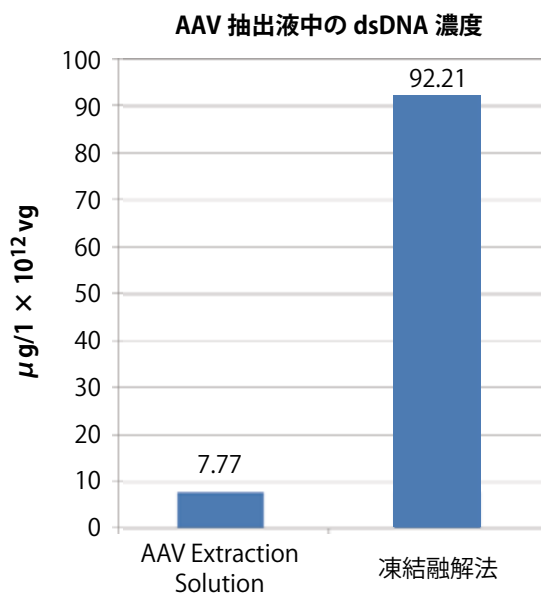


図 7. AAV Extraction Solution により抽出した抽出液の 2 本鎖 DNA 混入量

X. 参考文献

- 1) Summerford C, Samulski RJ. (1999) *Nat Med.* **5**:587-588.
- 2) Auricchio A, Hildinger M, O'Connor E, Gao GP, and Wilson JM. (2001) *Hum Gene Ther.* **12**:71-76.

XI. 関連製品

Cryonase™ Cold-active Nuclease (製品コード 2670A/B)
EDTA Buffer Powder, pH8.0 (製品コード T9191)
AAVpro® Helper Free System (AAV2) (製品コード 6230)
AAVpro® Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase) (製品コード 6652)
AAVpro® Helper Free System (AAV2-LacZ) (製品コード 6655)
AAVpro® Helper Free System (AAV2-U6-ZsGreen1) (製品コード 6658)
AAVpro® Helper Free System (AAV2-2xU6) (製品コード 6661)
pAAV-ZsGreen1 Vector (製品コード 6231)
AAVpro® Packaging Plasmid (AAV2) (製品コード 6234)
AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (製品コード 6233)
AAVpro® Extraction Solution (製品コード 6235)

XII. 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登録商標です。Cryonase はタカラバイオ株式会社の商標です。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

TakaRa テクニカルサポートライン

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

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社