

製品コード 6235

研究用

---

**Takara**

**AAVpro<sup>®</sup> Extraction Solution**

---

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。

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、P2 レベルの施設が必要な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 ツールとしても適しています。

## II. 製品説明

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きましたが、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す。本製品は、当社が独自に開発した AAV ベクター産生細胞からのベクター抽出用溶液であり (特許出願中)、ウイルス産生細胞に添加して遠心回収するだけで、効率的かつ簡便に AAV ベクターを抽出することができる試薬です。また、本製品を用いて抽出した AAV ベクターには宿主由来のタンパク質や核酸の混入が少なく、精製や細胞への感染実験に使用する AAV ベクター調製に特に適しています。本製品はさまざまな血清型の AAV ベクターに使用することができます。

## III. キット内容

本製品は、AAV ベクター産生細胞からのベクター抽出に使用する溶液セットです。

- |                              |        |
|------------------------------|--------|
| 1. AAV Extraction Solution A | 25 ml  |
| 2. AAV Extraction Solution B | 2.5 ml |

## IV. 保存

室温

## V. キット以外に必要な器具・試薬 (主なもの)

- ・細胞培養に必要な一般的設備
- ・滅菌済み遠心チューブ
- ・滅菌済み遠心マイクロチューブ
- ・0.5 M EDTA (pH8.0) (EDTA Buffer Powder, pH8.0 (製品コード T9191))

## VI. 実験操作

下記に 10 cm ディッシュ 1 枚で調製した AAV ベクター産生細胞から AAV ベクターを抽出するプロトコルを示します。培養基材を変更した場合の使用溶液量は表 1 を参考にしてください。

### AAV ベクター抽出液の調製

- 10 cm ディッシュ 1 枚で調製した AAV ベクター産生細胞を含む培養液へ 0.5 M EDTA (pH8.0) を 1/80 容量で添加し、よく混合する。
- 10 分間室温で反応後、細胞を剥離させ、15 ml 滅菌済み遠心チューブに回収する。
- 1,750 × g、4℃で 10 分間遠心後、上清を完全に除去する。  
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から次の工程に進めてください。
- 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めてください。
- 500 μl の AAV Extraction Solution A を添加する。
- ボルテックスで 15 秒間懸濁する。
- 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。
- 2,000 ~ 14,000 × g、4℃で 10 分間遠心する。  
注：回収した AAV 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。
- 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 50 μl 添加する。  
注 1：この時点で -80℃で保存することができます。-80℃で保存した場合は、37℃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。

なお、抽出した AAV ベクターのタイター測定には、AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (製品コード 6233) を使用することで迅速なタイター測定を行うことができます。

表 1. 各培養基材を用いた際の必要溶液量

	培養液量	0.5 M EDTA (pH8.0)	AAV Extraction Solution A	AAV Extraction Solution B
6 cm dish	4 ml	50 μl	200 μl	20 μl
10 cm dish	10 ml	125 μl	500 μl	50 μl
15 cm dish	26 ml	325 μl	1,300 μl	130 μl
T25 flask	4 ml	50 μl	250 μl	25 μl
T75 flask	13 ml	162.5 μl	650 μl	65 μl
T225 flask	40 ml	500 μl	2,000 μl	200 μl

## VII. 参考データ 1：凍結融解法との比較実験 1

ZsGreen1 を搭載した AAV2 ベクターを産生する HEK293 細胞から本製品を用いて AAV2 ベクターを抽出した。なお、AAV2 ベクターの調製には AAVpro Helper Free System (AAV2) (製品コード 6230) および pAAV-ZsGreen1 Vector (製品コード 6231) を用いた。比較対照として、凍結融解法により得られた AAV2 ベクターを使用した。得られたウイルス液はそれぞれリアルタイム 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 1 A、B)。その結果、得られた AAV2 ベクターの力価は明らかに本製品使用時の方が高いことが示された。

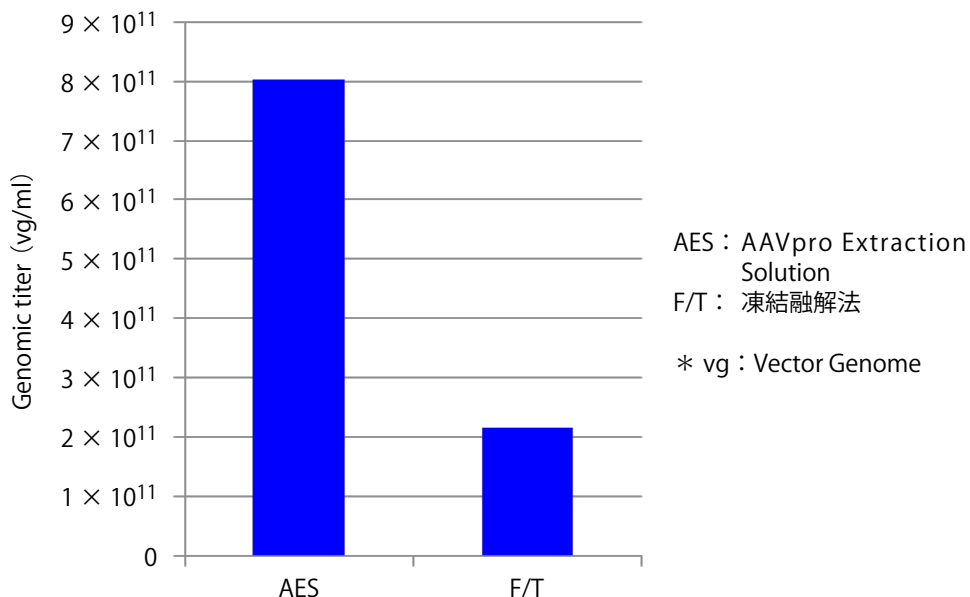


図 1 A. AAVpro Extraction Solution を用いた AAV2 抽出効率 - ベクターゲノム定量 -

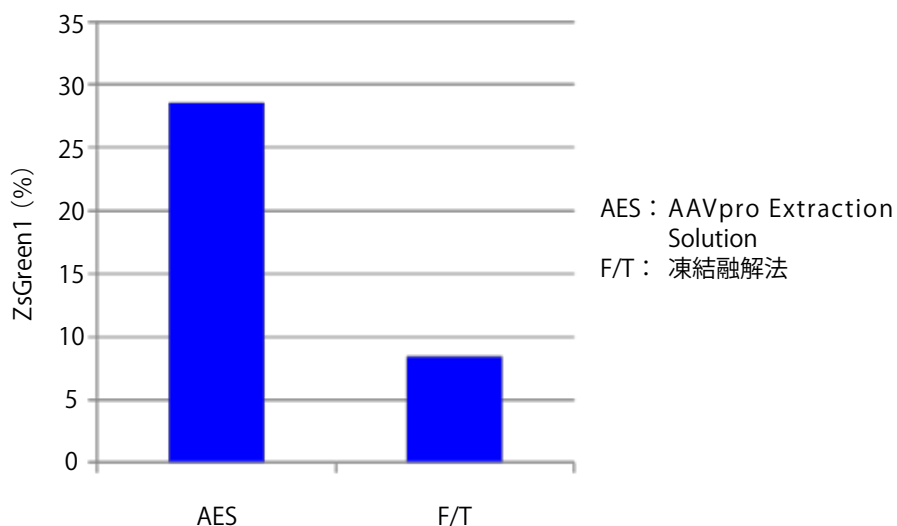


図 1 B. AAVpro Extraction Solution を用いた AAV2 抽出効率 - HT1080 への感染力価 -

## VIII. 参考データ 2：凍結融解法との比較実験 2

目的遺伝子を含まない AAV2 ベクターを産生する HEK293 細胞から本製品を用いて AAV2 ベクターを抽出した。なお、AAV2 ベクターの調製には AAVpro Helper Free System (AAV2) (製品コード 6230) を用いた。比較対照として、凍結融解法により AAV2 ベクターを抽出した。得られたウイルス液はそれぞれリアルタイム PCR によるベクターゲノム定量を行った後、 $1 \times 10^9$  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 2 A)。さらにウイルス液中の 2 本鎖 DNA 量をインターカラー法により定量し、混入している 2 本鎖 DNA の定量を行った (図 2 B)。その結果、AAVpro 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。

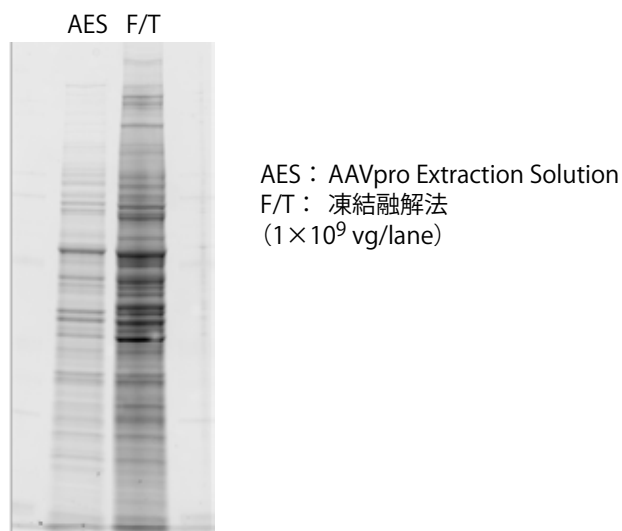


図 2 A. AAVpro Extraction Solution により抽出した AAV2 ベクター溶液の SDS-PAGE

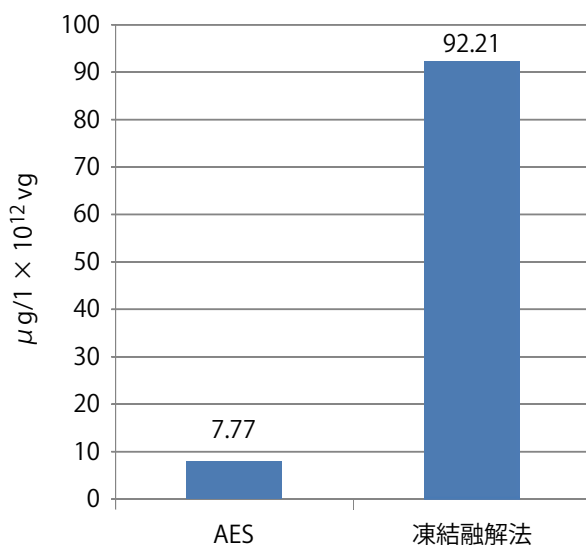


図 2 B. AAVpro Extraction Solution により抽出した AAV2 ベクター溶液中の 2 本鎖 DNA 混入量

## IX. 参考データ 3：本製品を用いた血清型 1、2 および 6 の AAV ベクター抽出

AAV1、2、6 ベクターを産生する HEK293 細胞をそれぞれ作製し、得られた細胞から本製品もしくは凍結融解法により AAV ベクター抽出を行い、リアルタイム PCR 法で定量解析を行った。力価測定には AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (製品コード 6233) を用いた。その結果、血清型 1、2、6 において、本製品を使用することで効率よく細胞から AAV ベクターを抽出できることが示された。

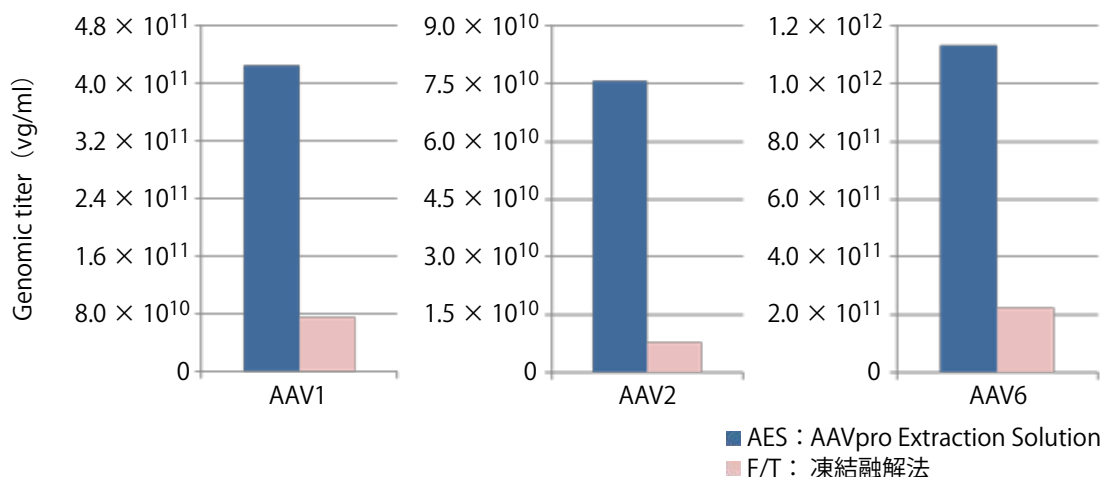


図 3. AAVpro Extraction Solution もしくは凍結融解法で抽出した AAV ベクターの力価

## X. 関連製品

AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2) (製品コード 6230)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV5) (製品コード 6650)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV6) (製品コード 6651)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase) (製品コード 6652)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV5-CRE Recombinase) (製品コード 6653)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV6-CRE Recombinase) (製品コード 6654)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-LacZ) (製品コード 6655)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV5-LacZ) (製品コード 6656)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV6-LacZ) (製品コード 6657)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-U6-ZsGreen1) (製品コード 6658)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV5-U6-ZsGreen1) (製品コード 6659)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV6-U6-ZsGreen1) (製品コード 6660)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-2xU6) (製品コード 6661)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV5-2xU6) (製品コード 6662)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV6-2xU6) (製品コード 6663)  
pAAV-ZsGreen1 Vector (製品コード 6231)  
AAVpro<sup>®</sup> Packaging Plasmid (AAV2) (製品コード 6234)  
AAVpro<sup>®</sup> Purification Kit (AAV2) (製品コード 6232)  
AAVpro<sup>®</sup> Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (製品コード 6233)

## XI. 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。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