

製品コード 6674

研究用

TAKARA

AAVpro[®] Concentrator

説明書

v202001Da

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に分類される恐れがあるため、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 (セロタイプ) が存在しており、血清型の違いによって組織/細胞への感染指向性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、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遺伝子発現が可能です。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。ただし、動物個体への AAV ベクター投与量は対象となる動物や投与方法に依存し、一般的に利用されているマウスなどでは個体自体が小さく投与量が制限されることから高濃度の AAV ベクターを調製する必要があります。

II. 製品説明

AAV ベクターの調製や精製の工程において、下流工程の作業性を考え、濃縮やバッファー交換が必要となる場合があります。

AAVpro Concentrator は簡便に効率よく AAV ベクターを濃縮できる試薬であり、AAV ベクターを含む培養上清 (血清の有無にかかわらず) の濃縮や、AAV ベクターを含む溶液のバッファー交換などの様々な用途に使用することができます。

本製品の特長

- さまざまな血清型に適用
- 高回収率
- 煩雑な工程は不要
- AAV ベクターを濃縮するために必要なすべてのバッファーを付属
- 血清の有無に影響されずに濃縮可能

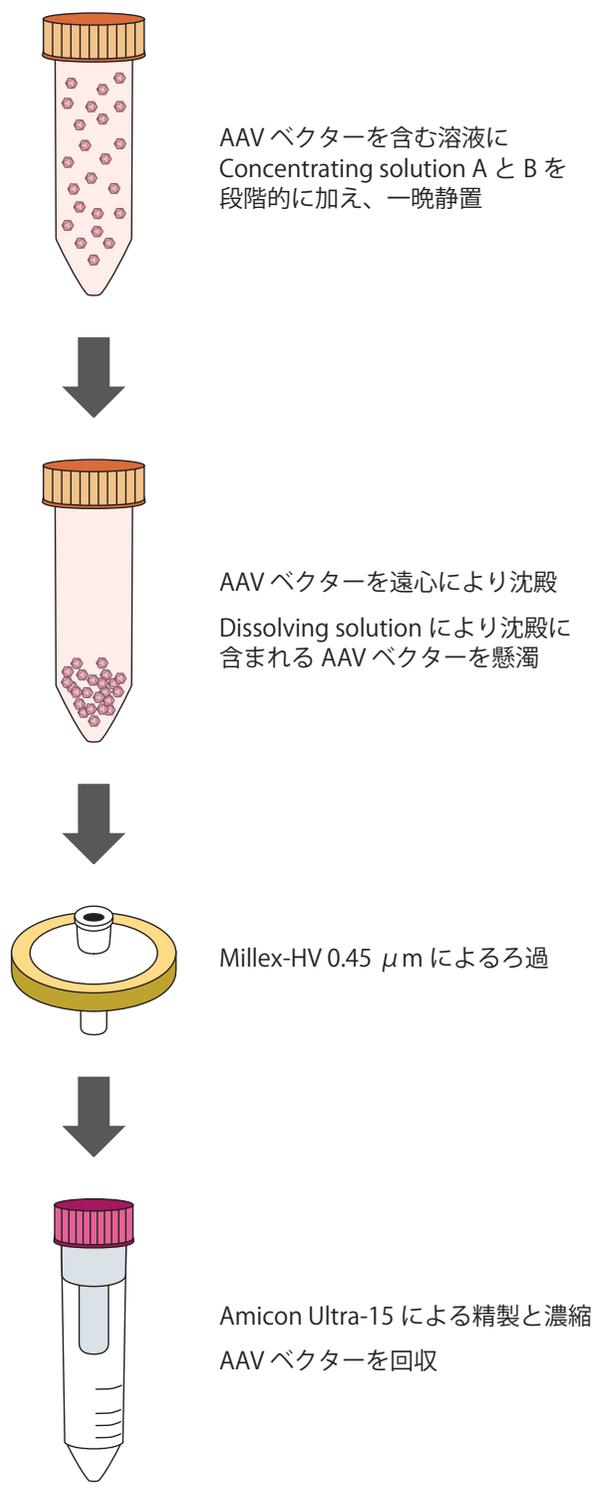


図 1. AAVpro Concentrator を使用した AAV ベクター濃縮工程の概略

III. 本製品の内容

本製品には、150 ml の溶液から AAV ベクターを濃縮するために必要なバッファー類と濃縮カラムが 2 回含まれています。

1.	Concentrating solution A	16 ml
2.	Concentrating solution B	80 ml
3.	Dissolving solution	16 ml
4.	Washing solution	30 ml × 2
5.	Millex-HV 0.45 μ m	4 個
6.	Amicon Ultra-15, 100 kDa	2 本

IV. 保存

Concentrating solution B	4°C
その他のコンポーネント	室温

V. 本製品以外の器具 (主なもの)

- ・細胞培養に必要な一般的設備
- ・ロック付シリンジ

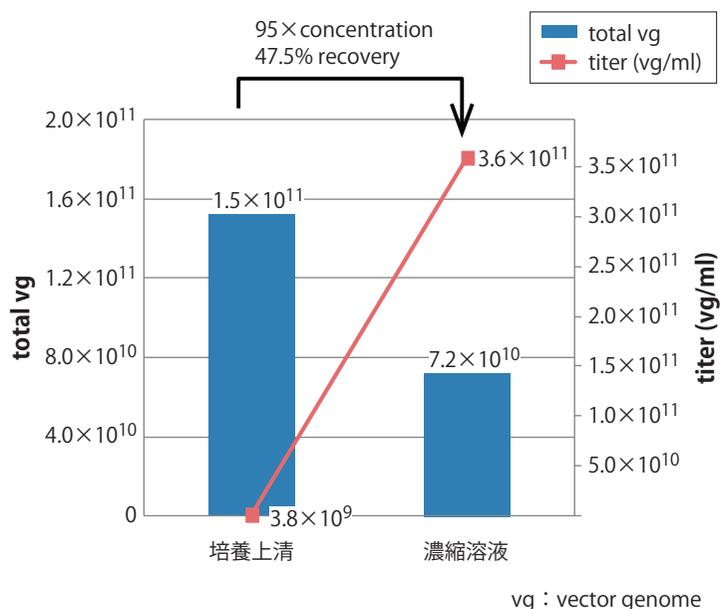
VI. 実験操作：150 ml の AAV ベクター溶液からの濃縮

AAV ベクター溶液が 150 ml 未満の場合は、AAV ベクター溶液の液量に応じてステップ 1、2 の試薬添加量を変更してください。（例：AAV ベクター溶液が 75 ml の場合、Concentrating solution A および B の添加量を 1/2 量に変更してください。）

- 150 ml の AAV ベクター溶液に Concentrating solution A を 8 ml 添加し（約 20 倍希釈）、ボルテックスで十分に懸濁する。
【注】容量の大きな遠心機がない場合は、2. に進む前に遠心可能な容量の遠心管に分けてから 2. の操作を行ってください。
- 40 ml の Concentrating solution B を添加し、ボルテックスで十分に混合後、遠心管に移し、4℃で一晩静置する。
2. の遠心管の底部に白い沈殿があることを確認する。
【注】サンプルに EDTA が含まれている場合には白い沈殿が見られない場合もありますが、そのまま 4. に進んでください。
- 2,000 × g、4℃で 50 分間遠心した後、慎重に上清を除去する。
- 沈殿に 8 ml の Dissolving solution を添加し、ピペティングで均一になるように懸濁する。懸濁後、新しい遠心管に移す。
- 15 秒間ボルテックス後、室温で 15 分間静置する。その後、さらに 15 秒間ボルテックスする。
- 懸濁液を 2,000 × g、4℃で 15 分間遠心後、上清を新しい遠心管に移し、さらに 2,000 × g、4℃で 15 分間遠心する。その後、慎重に上清を回収し、Millex-HV 0.45 μm で濾過する。
【注】1 個の Millex-HV 0.45 μm では、目詰まりによりすべての溶液を濾過できない場合があります。その場合は新しい Millex-HV 0.45 μm を使用してください。
7. で得られた AAV ベクター溶液を Amicon Ultra-15, 100 kDa に添加し、2,000 × g、15℃で 10 分間遠心する。AAV ベクター溶液が 1.5 ml 以下になったことを確認する。
【注 1】スイングローターの使用を推奨します。固定アングルローターを用いる場合は、メンブレンパネルが上を向くようバケットに設置してください。
【注 2】AAV ベクター溶液が 1.5 ml 以下になっていない場合は、カップ内に残った AAV ベクター溶液をピペティングで均一にし、さらに遠心操作を実施してください。
- ろ液を除去後、10.5 ml の Washing solution をカップ内に添加する。ピペティングで溶液を均一化し、2,000 × g、15℃で 10 分間遠心する。AAV ベクター溶液が 1.5 ml 以下になったことを確認する。
【注 1】スイングローターの使用を推奨します。固定アングルローターを用いる場合は、メンブレンパネルが上を向くようバケットに設置してください。
【注 2】AAV ベクター溶液が 1.5 ml 以下になっていない場合は、カップ内に残った AAV ベクター溶液をピペティングで均一にし、さらに遠心操作を実施してください。
9. の操作をさらに 2 回繰り返し、最終的に任意の容量まで濃縮する。
- ろ液を除去後、ボルテックスで 30 秒間、もしくはピペティングで十分に懸濁し、Amicon Ultra-15, 100 kDa カップ内の AAV ベクター溶液をチューブに移す。

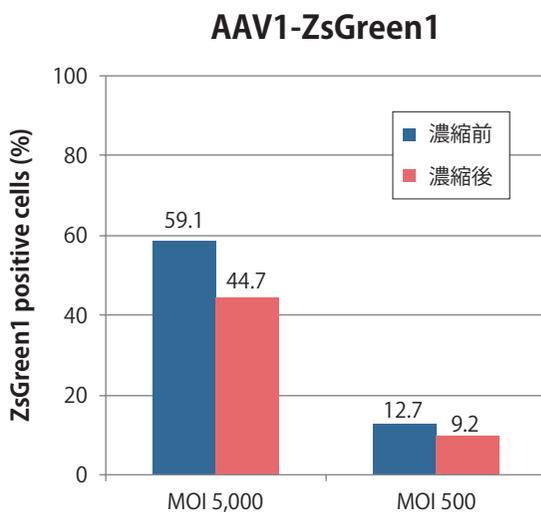
VII. 参考データ 1：無血清培養上清からの AAV ベクターの濃縮

蛍光タンパク質 ZsGreen1 を搭載する AAV1 ベクター産生細胞の培養上清 40 ml (T225 フラスコ 1 本分) を、本製品を用いて 200 μ l に濃縮した。その後、AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (製品コード 6233) を用いてタイターを測定し、回収率を確認した。



VIII. 参考データ 2：濃縮後 AAV ベクターの感染能評価

濃縮前後の AAV1-ZsGreen1 ベクターを用いて、HT1080 細胞への感染力価を評価した。AAV ベクターは 5,000 vg/cell と 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。本製品で濃縮した AAV ベクターは感染能を保持していることを確認した。



IX. 関連製品

AAVpro® Helper Free System (AAV1) (製品コード 6673)
AAVpro® Helper Free System (AAV2) (製品コード 6230)
AAVpro® Helper Free System (AAV5) (製品コード 6650)
AAVpro® Helper Free System (AAV6) (製品コード 6651)
AAVpro® Helper Free System (AAV1-CRE Recombinase) (製品コード 6668)
AAVpro® Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase) (製品コード 6652)
AAVpro® Helper Free System (AAV5-CRE Recombinase) (製品コード 6653)
AAVpro® Helper Free System (AAV6-CRE Recombinase) (製品コード 6654)
AAVpro® Helper Free System (AAV1-LacZ) (製品コード 6669)
AAVpro® Helper Free System (AAV2-LacZ) (製品コード 6655)
AAVpro® Helper Free System (AAV5-LacZ) (製品コード 6656)
AAVpro® Helper Free System (AAV6-LacZ) (製品コード 6657)
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)
pAAV-ZsGreen1 Vector (製品コード 6231)
AAVpro® 293T Cell Line (製品コード 632273)
AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (製品コード 6233)
AAVpro® Purification Kit Maxi (All Serotypes) (製品コード 6666)
AAVpro® Purification Kit (AAV2) (製品コード 6232)
AAVpro® Tet-One™ Inducible Expression System (AAV2) (製品コード 634310)
AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2) (製品コード 632608)
AAVpro® CRISPR/Cas9 Vector System (製品コード 632609)

X. 注意

- ・本製品にはメルクミリポア社製の製品が含まれますが、これらを含むすべてのコンポーネントに関するご質問はタカラバイオにお問い合わせください。
- ・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。Tet-One 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