

# アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いる遺伝子導入

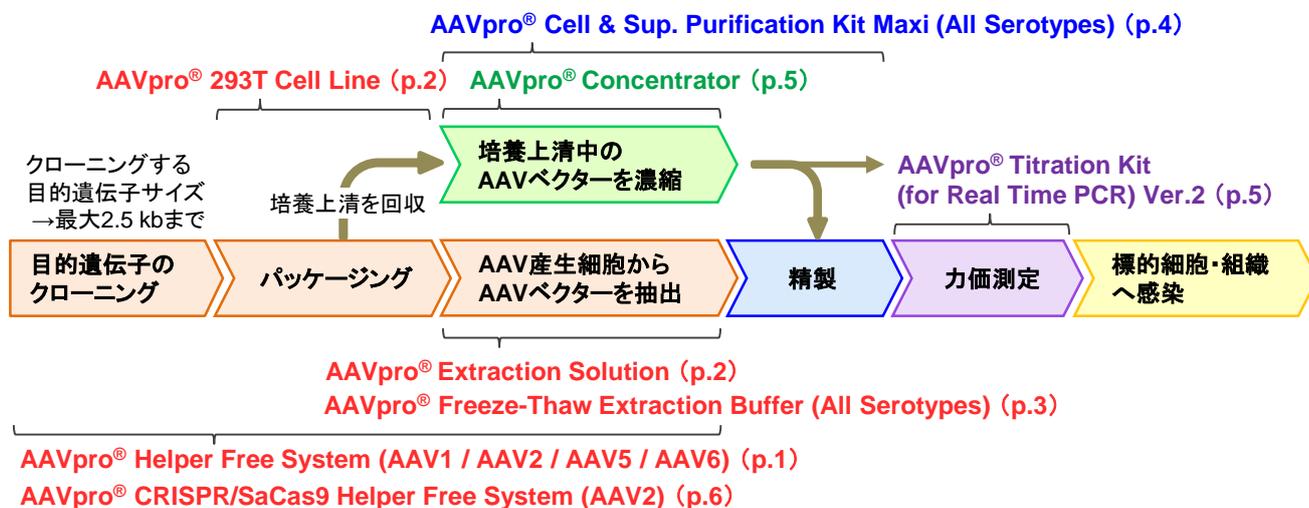
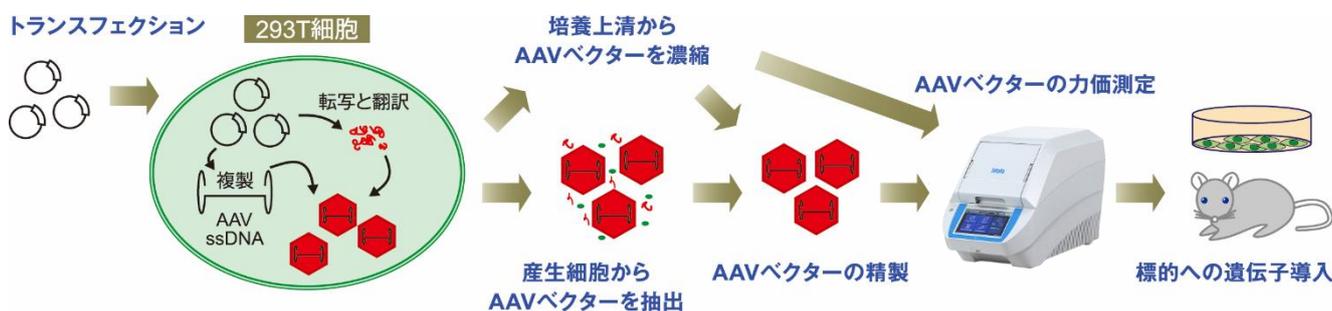
=製品ガイド 2022年9月改訂版=

## アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの特長



- ◆ P1レベルの施設で取扱いが可能
- ◆ 増殖／非増殖のいずれの細胞にも遺伝子導入が可能
- ◆ 長期間の発現が可能（非分裂細胞の場合）
- ◆ 免疫原性が低く、動物個体への遺伝子導入にも最適
- ◆ 血清型の組織指向性を利用して標的組織に効率よく遺伝子導入
- ◆ ゲノム編集実験にも使用可能

## アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター作製の実験フローと対応製品



# アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの特長と各種製品の概要



Adeno-Associated Virus

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存在下で増殖する非エンベロップウイルスです。AAVベクターは**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べて安全で取扱いが容易です。**分裂細胞／非分裂細胞を問わず遺伝子導入ができ**、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**にも適しています。非常に安定なウイルスであり、精製操作も簡便に行うことができます。

AAVは**血清型(セロタイプ)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。標的の細胞・組織に合わせて血清型を選択してください。

※遺伝子導入の程度は実験条件によって異なる場合がありますので、文献を参照してください。

## 血清型と標的組織(血清型1、2、5、6の場合)

血清型	主な標的組織
AAV1	筋肉、肝臓、気道、中枢神経系
AAV2	広範囲の細胞・組織
AAV5	中枢神経系、肝臓、網膜
AAV6	心臓、筋肉、肝臓

## 【参考文献】

Miyake K, Miyake N, Yamazaki Y, Shimada T, Hirai Y. Serotype-independent method of recombinant adeno-associated virus (AAV) vector production and purification. *J Nippon Med Sch.* 2012;**79**(6):394-402.

小澤敬也  
AAVベクターの開発と遺伝子治療への応用：蛋白質 核酸 酵素 Vol.52 No.10 (2007) 1288-1293.

Ellis BL, Hirsch ML, Barker JC, Connelly JP, Steininger RJ 3rd, Porteus MH. A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. *Virology.* 2013 Mar 6;**10**:74

## ■ アデノ随伴ウイルスベクター作製システム

### AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System シリーズ

弊社ウェブサイト  
操作動画公開中！

- ヘルパーウイルスを使用せず、安全に血清型1、2、5、6のAAVベクターを作製
- 独自のAAVベクター抽出法で効率的かつ簡便な操作
- AAV2ベクターは、hsa-miR-342搭載ベクターの使用により、高力価ベクターを作製可能

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
AAVpro <sup>®</sup> Helper Free System (AAV2) ※	1 Kit	6230	¥183,000

※AAV1、AAV5、AAV6に対応した製品もあります。詳しくはウェブサイトの各製品ページをご覧ください。

本製品は、AAV2ベクターの作製に必要な3種類のベクタープラスミドと、AAV2ベクター産生細胞からベクターを抽出するための2種類の試薬を含みます。

#### <キットの内容>

- ① pAAV-CMV Vector
- ② pRC2-mi342 Vector
- ③ pHelper Vector
- ④ AAV Extraction Solution A
- ⑤ AAV Extraction Solution B

【注】①に挿入できる目的遺伝子のサイズは**2.5 kb**までです。

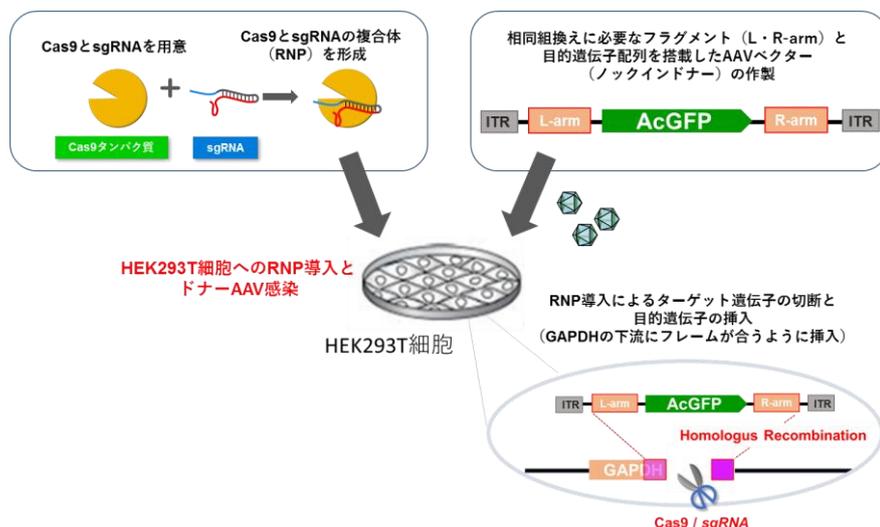
#### <独自のAAVベクター抽出法>

本製品では、従来の凍結融解法や超音波破碎法ではなく、タカラバイオが独自に開発したAAV Extraction Solutionを用いてAAVベクター産生細胞からベクターを調製します。これにより、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AAVベクターを抽出することができます。抽出試薬は、AAVpro Extraction Solution(製品コード 6235、2ページ)として単品販売しています。

## ■ AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV6)を用いた高効率ノックインゲノム編集

### 【実験概要】

HEK293T細胞を用いて、RNP導入による目的遺伝子の切断と、AcGFPを発現するドナーAAVの感染によるノックインゲノム編集実験を行った。

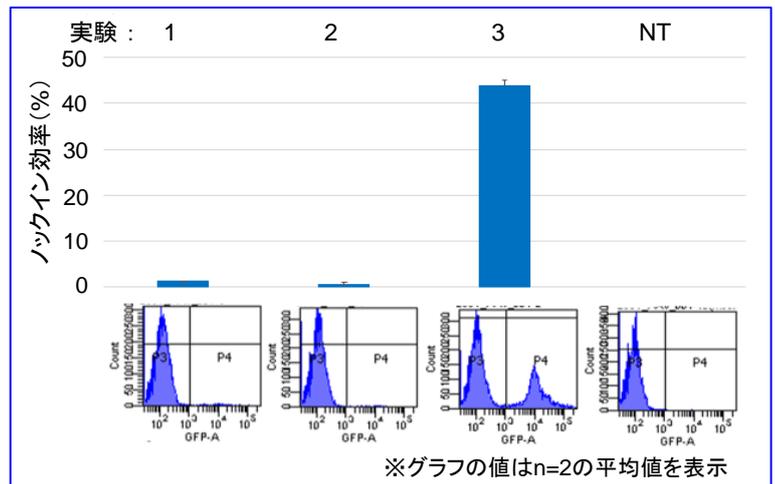


**【結果】**

- 実験1. Cas9 PlasmidとsgRNA Plasmidとドナー Plasmidを使用
- 実験2. RNPとドナーPlasmidを使用
- 実験3. RNPとドナーAAVベクターを使用
- NT. 無処理の細胞

7日目にHEK293T細胞のAcGFP発現細胞の割合をFlow cytometryを用いて解析し、ノックイン効率を測定した。  
 実験3のRNPとドナーAAVベクターを用いた条件で高いノックイン効率を得られた。  
 NTは無処理の細胞を示す。

★ 実験の詳細は、弊社ウェブカタログのApplicationをご覧ください。



■ 組換えアデノ随伴ウイルス産生に最適化した293T細胞

**AAVpro® 293T Cell Line**

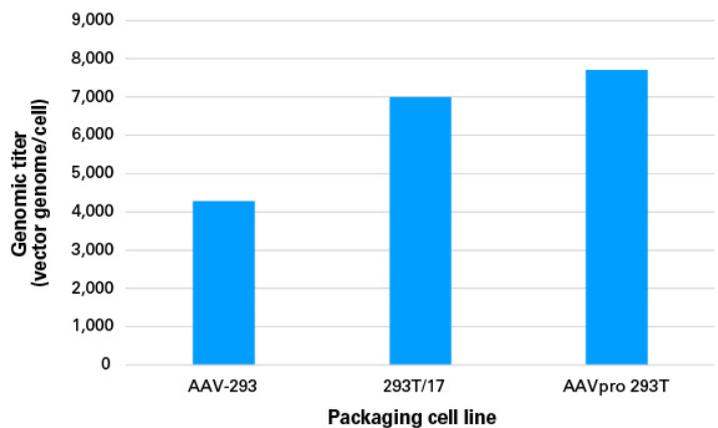
弊社ウェブサイトで  
操作動画公開中！

- 高力価のAAVベクター産生を実現する293T細胞

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
AAVpro® 293T Cell Line	1 ml	632273	¥81,000

■ AAVpro® 293T Cell Lineと他の293細胞株との  
タイター比較

AAVpro® Helper Free System (AAV2) (製品コード 6230)を使用して、パッケージング用細胞株3種類にそれぞれAAV2を産生させた。  
 AAVpro® 293T Cell Line使用の場合のウイルスタイターは、一般的によく用いられるHEK293T/17細胞株と同等以上であり、HEK293細胞のサブクローン株(AAV-293)と比較して高い結果となった。



■ 組換えアデノ随伴ウイルス抽出試薬①

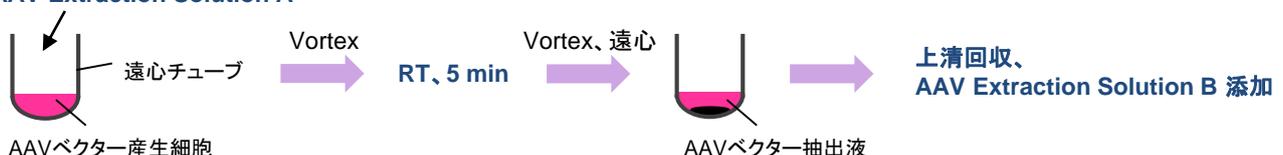
**AAVpro® Extraction Solution**

弊社ウェブサイトで  
操作動画公開中！

- AAVベクターを効率的に抽出
- ウイルス産生細胞に添加して遠心回収するだけの簡便操作
- 宿主由来のタンパク質や核酸の混入が少ないAAVベクターを抽出可能  
 … 精製や細胞への感染実験に使用するAAVベクター調製に最適！
- さまざまな血清型(セロタイプ)のAAVベクターに使用可能

**【AAVベクター抽出工程の概略】**

AAV Extraction Solution A



製品名	容量	製品コード	価格(税別)
AAVpro® Extraction Solution	1 Set	6235	¥37,000

# 各種製品の概要

## ■ 組換えアデノ随伴ウイルス抽出試薬②

### AAVpro® Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes)

- さまざまな血清型のAAVベクターに適用可能
- 1回の凍結融解操作のみで、さまざまな血清型のAAVベクターを効率よく抽出
- 超遠心分離などの煩雑な工程は不要

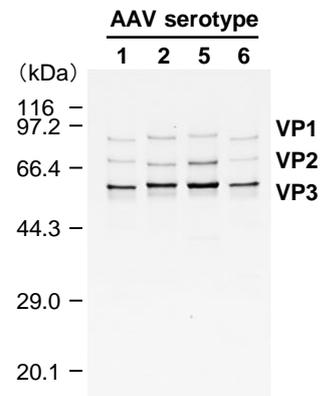
… AAVpro® Purification Pack Maxi (All Serotypes) (製品コード 6678)と組み合わせて使用することで、約4時間で AAVベクター産生細胞からのウイルスベクターの精製と濃縮が可能



製品名	容量	製品コード	価格(税別)
AAVpro® Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes)	20 ml × 2	6679	¥34,000

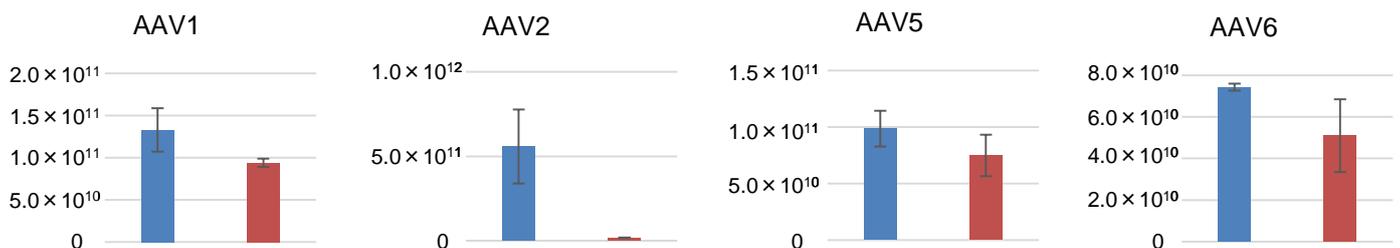
## ■ 各血清型AAVの精製効率と純度測定

AAVpro® Freeze-Thaw Extraction Bufferで各血清型のAAVをT225フラスコ1本分から抽出した場合、PBSより効率的に抽出できることが確認できた。さらに、抽出したAAVをAAVpro® Purification Pack Maxi (All Serotypes) (製品コード 6678)で精製した場合、AAVpro® Freeze-Thaw Extraction Bufferで抽出したAAVは精製できているが、PBSで抽出したAAVは精製できていないことがわかる(下図)。また、この方法で抽出、精製したAAVの純度をSDS-PAGEで確認した結果、すべてのセロタイプで高純度に精製できていることを確認している(右図)。

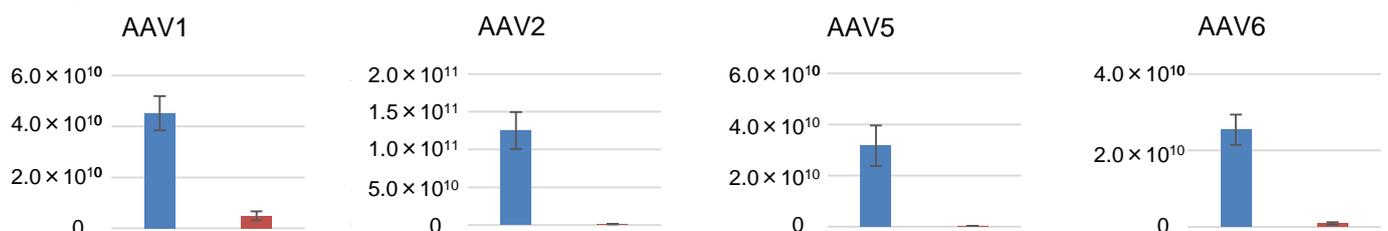


1.0 × 10<sup>9</sup> vector genome (vg) per lane

### <抽出>



### <精製>



■ AAVpro® Freeze-Thaw Extraction Buffer

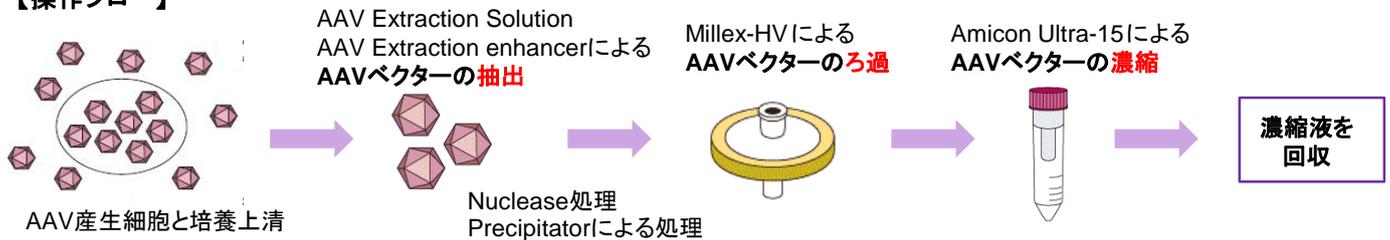
■ PBS

■ アデノ随伴ウイルスベクターの精製

# AAVpro® Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes)

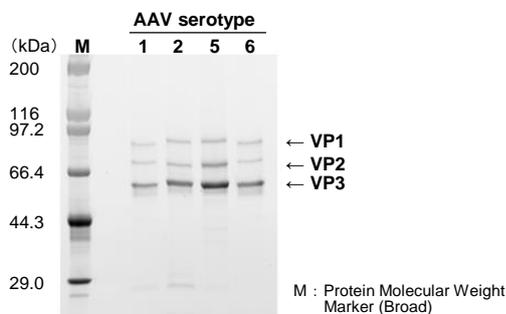
- AAV産生細胞と培養上清の両方から同時にAAVベクターの精製が可能
- さまざまな血清型のAAVベクターに適用可能
- 独自のAAVベクター抽出法により、凍結融解法や超音波破碎法のような面倒な操作は一切不要

【操作フロー】



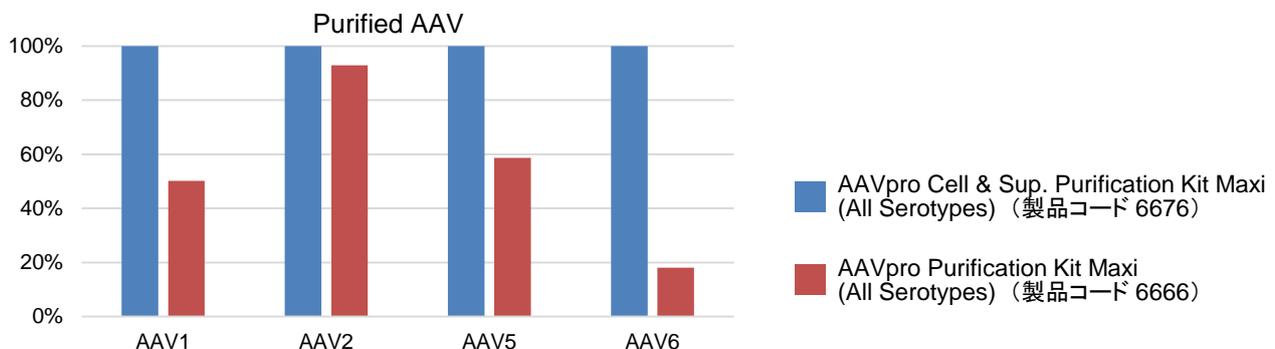
製品名	内容	容量	製品コード	価格(税別)
<b>AAVpro® Cell &amp; Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes)</b>	6677+6678	4回	6676	¥184,000
<b>AAVpro® Cell &amp; Sup. Extraction/Concentration Pack Maxi (All Serotypes)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・AAV Extraction Solution C / D</li> <li>・AAV Extraction enhancer</li> <li>・Concentrating solution</li> <li>・Dissolving solution</li> </ul>	1 Kit	6677	¥111,000
<b>AAVpro® Purification Pack Maxi (All Serotypes)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・Precipitator A / B</li> <li>・Millex-HV 0.45 μm</li> <li>・Amicon Ultra-15, 100 kDa</li> <li>・Suspension Buffer</li> <li>・Cryonase Cold-active Nuclease</li> </ul>	4回	6678	¥99,000

■ 精製後のAAVベクター(各血清型)の純度測定



本製品を用いて、蛍光タンパク質 ZsGreen1を搭載する各血清型 (AAV1、AAV2、AAV5、AAV6) のAAVベクター産生細胞からAAVベクターを抽出し、抽出したAAVベクターをAAVpro® Purification Pack Maxi (All Serotypes) (製品コード 6678) を用いて精製した。精製後のAAVベクターは、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、 $1 \times 10^9$  vector genome (vg) /lane で SDS-PAGE に供した。その結果、AAVキャプシドタンパク質 (VP1、VP2、VP3) が主要バンドとして確認できた。

■ 各種セロタイプにおける弊社既存キットとの精製効率の比較



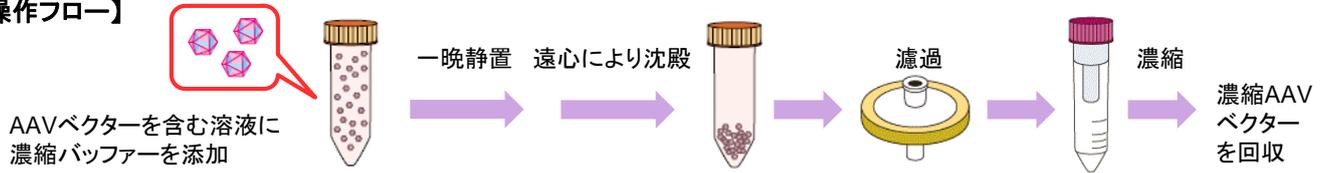
AAVpro® Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes) (製品コード 6676) は、AAVベクター産生細胞中とその培養上清中に産生されるAAVベクターを簡単に精製でき、様々な血清型(セロタイプ)に適用可能なキットである。本キットおよびAAVベクター産生細胞中のみのAAVベクターを精製可能なAAVpro® Purification Kit Maxi (All Serotypes) (製品コード 6666) を用いて、各種AAVセロタイプの精製を行った。上図は、AAVpro® Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes) を用いて精製した各種AAVセロタイプの力価を100%としたときの、AAVpro® Purification Kit Maxi (All Serotypes) の力価を示している。本キットを用いることで、細胞中のAAVベクターのみを精製するキット(製品コード 6666) に比べ、AAV1、AAV5およびAAV6を高収量に精製することができた。

■ アデノ随伴ウイルスベクターの濃縮

AAVpro® Concentrator

- さまざまな血清型に適用可能
- 培養上清など溶液中の血清の有無に影響されずに濃縮可能
- 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

【操作フロー】



製品名	容量	製品コード	価格(税別)
AAVpro® Concentrator	1 Kit	6674	¥74,000

❗ セロタイプによっては、培養上清中に多く分泌されているのをご存知ですか？ 血清型にあった回収、精製方法を確認しましょう。

【参考文献】

Luk H. Vandenberghe, Ru Xiao, Martin Lock, Jianping Lin, Michael Korn, and James M. Efficient Serotype-Dependent Release of Functional Vector into the Culture Medium During Adeno-Associated Virus Manufacturing *PMC* 2010 Oct; **21**(10): 1251-1257.

Martin Lock, Mauricio Alvira, Luk H. Vandenberghe, Arabinda Samanta, Jaan Toelen, Zeger Debysers, and James M. Wilson Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale *PMC* 2010 Oct; **21**(10): 1259-1271.

■ アデノ随伴ウイルスベクターの力価測定

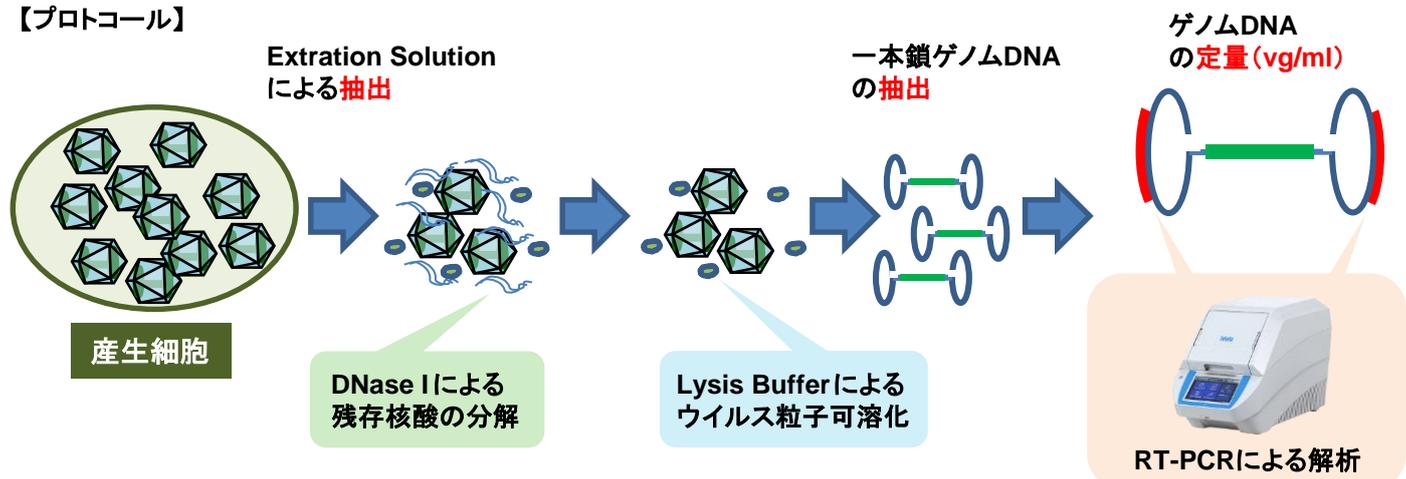
AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2

- わずか2.5時間でAAVベクターのタイターを測定
- ITR (Inverted Terminal Repeat)をターゲット配列としているため、ベクターの内部配列や血清型に関わらず使用可能 ※

※ 本製品はAAV2由来のITRをターゲットとしてベクターゲノムを定量するキットであり、ウイルス粒子内に封入されているベクターゲノムのITR領域がAAV2由来であれば、血清型に関わらず本製品を使用することができます。

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2	100回	6233	¥92,000

【プロトコール】



# AAVベクターを用いたゲノム編集

## ■ アデノ随伴ウイルスベクターによるゲノム編集システム

### AAVpro® CRISPR/SaCas9 シリーズ

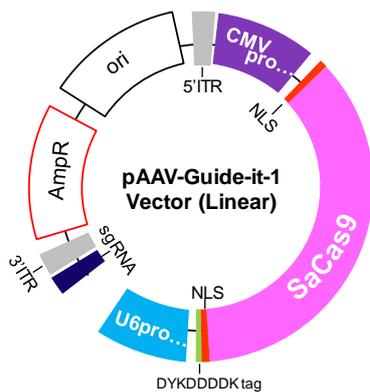
- 単一のアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターでSaCas9遺伝子、sgRNAを導入
- ゲノムへの組み込みによる持続的なCas9発現を排除し、細胞毒性やオフターゲットの影響を軽減
- AAV CRISPR/SaCas9の生成に必要な全てのコンポーネントを含んだAll-in-Oneシステム

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
AAVpro® CRISPR/SaCas9 Helper Free System (AAV2)	1 Kit	632619	¥166,000
AAVpro® CRISPR/SaCas9 Vector System	1 Kit	632618	¥100,000

### 小さなCas9 "SaCas9" を用いたAAVpro® CRISPR/SaCas9 System

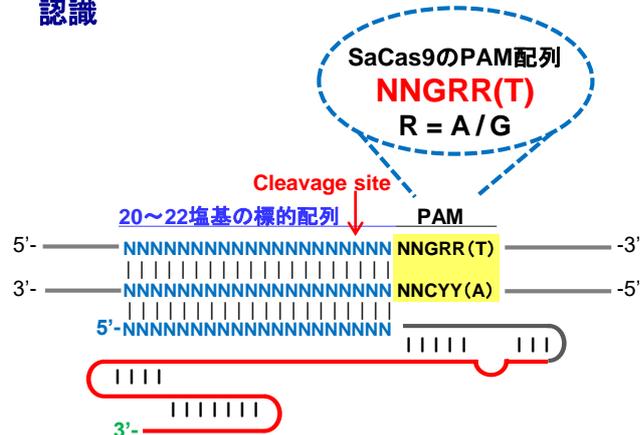
SaCas9は、*Staphylococcus aureus*由来のCas9です。遺伝子サイズが3.3 kbと、現在広く利用されている*S. pyogenes*由来のSpCas9(4.1 kb)より約1 kb小さいCas9です。

☑ 1つのAAVベクターでSaCas9遺伝子とsgRNAの発現が可能に！



1つのAAVベクター内に、SaCas9遺伝子とsgRNAの搭載が可能になりました。*in vitro*および*in vivo*でさまざまな細胞に対するゲノム編集を行うことができます。

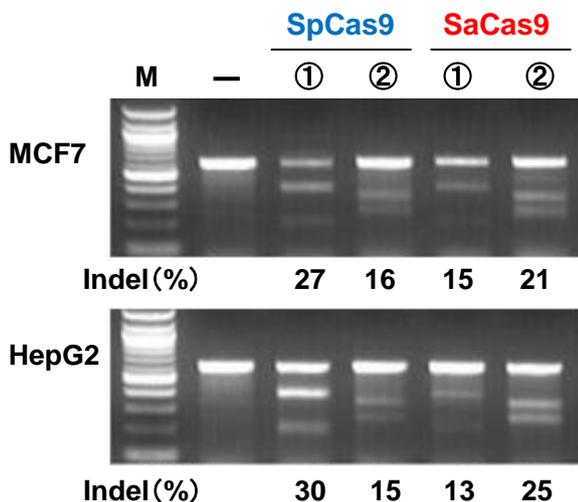
☑ SpCas9とは異なるPAM配列 NNGRR (T) を認識



PAM配列としてNNGRR(T)を認識し、その3塩基上流を切断します。(Nはどの塩基でもよく、RはAまたはG。(T)はできるだけ考慮することを推奨します。)

★sgRNAは、<http://www.benchling.com> で設計可能です。

## ■ AAVベクターを用いたSaCas9とSpCas9のゲノム編集効率の比較



AAVpro® CRISPR/Cas9 System (2ベクタータイプ : SpCas9、製品コード 632608) ならびに AAVpro® CRISPR/SaCas9 System (1ベクタータイプ : SaCas9) を用いて、CYP2遺伝子 Exon1 の2か所の配列 (①、②) を標的としてsgRNAを設計し、それぞれAAVベクターを作製した。

12ウェルプレートに1×10<sup>5</sup>個の細胞を播種して一晩培養後、SpCas9の2ベクター、またはSaCas9のAAVベクターをそれぞれ1×10<sup>5</sup> MOI (ベクターゲノム定量法) で感染させた。ゲノムDNAへの変異導入効率 (Indel%) は、Guide-it™ Mutation Detection Kit (製品コード 631448) により比較した。

その結果、SpCas9を用いた2ベクタータイプとSaCas9を用いた1ベクタータイプのAAVベクターで実施したゲノム編集では、同程度の変異導入効率を得られた。

■ オンラインツールのご紹介

弊社ウェブサイトでタイトル(下記の青字)で検索、もしくは、以下のQRコードを読み取り、アクセスしてください。

『**AAVベクターによる遺伝子導入 Q&A**』

製品別にQ&Aを掲載しています！  
困ったときはまずここをチェック！！



『**AAVベクターによる遺伝子導入 参考文献**』

総説からセロタイプ別、ゲノム編集の応用など  
テーマ別に掲載しています。



『**動画ライブラリー AAV**』

AAVベクターの抽出から精製、脱塩・濃縮  
までをご覧ください。



『**AAVベクターによる遺伝子導入 使用文献**』

製品別に使用文献を掲載。  
今後も継続的にアップしていきます！



■ その他の関連製品ラインナップ

製品名	概要	容量	製品コード	価格(税別)
<b>TransIT-VirusGEN<sup>®</sup> Transfection Reagent</b>	アデノ随伴ウイルス産生用トランスフェクション試薬	0.3 ml	MIR6703	¥31,000
<b>AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-LacZ) ※</b>	β-ガラクトシダーゼ遺伝子を搭載したAAV2ベクターを作製するキット。遺伝子導入のコントロールに最適	1 Kit	6655	¥183,000
<b>AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase) ※</b>	Creリコンビナーゼ遺伝子を搭載したAAV2ベクターを作製するキット。トランスジェニックマウスの解析や様々なスクリーニング系に広く利用可能	1 Kit	6652	¥183,000
<b>AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-2xU6) ※</b>	RNA polymerase III (pol III) 系プロモーターを搭載したAAV2ベクターを作製するキット。2種類のshRNAを発現	1 Kit	6661	¥183,000
<b>AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-U6-ZsGreen1) ※</b>	RNA polymerase III (pol III) 系プロモーターを搭載したAAV2ベクターを作製するキット。1種類のshRNAとZsGreen1遺伝子を発現	1 Kit	6658	¥183,000
<b>AAVpro<sup>®</sup> Packaging Plasmid (AAV2) ※</b>	動物個体への遺伝子導入など大量のAAVベクター作製に便利なReady to useの高容量トランスフェクション用プラスミド	各 1 mg	6234	¥183,000
<b>AAVpro<sup>®</sup> Purification Kit Maxi (All Serotypes)</b>	さまざまな血清型アデノ随伴ウイルスベクターに適用できる高効率な精製キット	4回	6666	¥146,000
<b>pAAV-ZsGreen1 Vector</b>	緑色蛍光タンパク質ZsGreen1発現AAVベクタープラスミド。トランスフェクション効率や、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に最適	20 µg	6231	¥128,000
<b>AAVpro<sup>®</sup> Tet-One™ Inducible Expression System (AAV2)</b>	調節ベクターと応答発現ベクターが一つになったTet System	1 Kit	634310	¥197,000
<b>Guide-it™ Recombinant Cas9 (10 µg/µl)</b> <span style="color: green;">ラ</span> <span style="color: red;">営</span>	エレクトロポレーションによる導入に最適な高濃度Cas9タンパク質溶液	200 µg	632678	¥55,000
<b>Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription Kit</b>	in vitro transcriptionによるsgRNAの調製およびsgRNAの有効性の確認が可能	50回	632635	¥166,000
<b>Guide-it™ Mutation Detection Kit</b>	ゲノム編集後の変異導入効率確認キットで細胞のゲノムに導入された挿入、欠失をPCRベースの手法で簡単に検出可能	25回	631448	¥34,000

※AAV1、AAV5、AAV6に対応した製品もあります。詳しくはウェブサイトの各製品ページをご覧ください。

ラ ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。 営 営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。

**組換えアデノ随伴ウイルスの作製受託も承っております。**  
詳細は弊社ウェブサイトをご覧ください。

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。  
・本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。  
・本パンフレット記載の価格は2023年12月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2023年12月修正

タカラバイオ株式会社

東日本支店・西日本支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

関西支店・営業第2部 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

テクニカルサポートライン

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <https://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <https://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店