

製品コード 6230、6650～6663、
6668～6671、6673、
6680、6682～6685、
6690～6695

研究用

TAKARA

**AAVpro[®] Helper Free
System**

説明書

目次

本製品の使用について	3
I. はじめに	4
I-1. アデノ随伴ウイルスベクター	4
I-2. 製品説明、原理	5
I-3. 特長	6
II. 内容	8
II-1. 対象製品	8
II-2. 本製品の内容	9
III. プラスミドマップ	12
IV. 保存	16
V. 本製品以外に必要な器具、装置、試薬類 (主なもの)	16
V-1. 器具・装置	16
V-2. 試薬類	16
VI. 操作	17
VI-1. AAV ベクター作製のアウトライン	17
VI-2. 操作法	17
VII. 参考	22
VII-1. ウイルス力価の測定	22
VII-2. ライゲーションによる合成オリゴ DNA のクローニング	23
VIII. 参考文献	24
IX. 関連製品	24
X. 注意	24

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 の一本鎖 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、8 または 9 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)、血清型 8 (AAV8)、血清型 9 (AAV9) 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、AAV8 は肝臓、筋肉、中枢神経系等、AAV9 は中枢神経系、心臓、肝臓、筋肉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、「VIII. 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 (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。

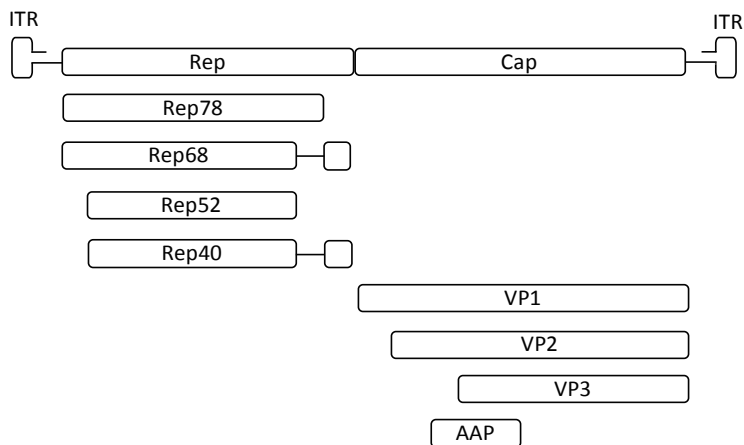


図 1. 野生型 AAV ゲノム構造とコードするタンパク質

I-2. 製品説明、原理

【 AAVpro Helper Free System シリーズ 】

AAVpro Helper Free System シリーズは、血清型 1、2、5、6、8 または 9 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製品です (図 2)。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

【 AAVpro Helper Free System (AAV-U6-ZsGreen1)/(AAV-2xU6) シリーズ 】

遺伝子発現を抑制するひとつの手法として RNA 干渉作用 (RNA interference ; RNAi) があります。RNAi は二本鎖 RNA を導入することにより、標的遺伝子の mRNA を分解し、発現を抑制する手法で、哺乳類細胞では 21 ~ 23 塩基の短い二本鎖 RNA (short interfering RNA ; siRNA) によって RNAi 効果が得られることが明らかとなっています。RNAi 実験の主な手法としては、合成 siRNA を導入する方法と、発現ベクターを用いて細胞内で siRNA を形成させる方法が挙げられます。合成 siRNA ではその RNAi 効果は一過性ですが、発現ベクターを用いることで RNAi 効果の持続が期待できます。AAVpro Helper Free System (AAV-U6-ZsGreen1)/(AAV-2xU6) シリーズは、RNA polymerase III (pol III) 系のプロモーターを搭載した血清型 1、2、5、6、8 または 9 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製品です (図 2)。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ヘアピン型 RNA (shRNA) を一過性に発現させることができます。なお、動物個体において使用する場合は、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) または AAVpro Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes) (製品コード 6676) をお勧めします。これらの製品では、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。

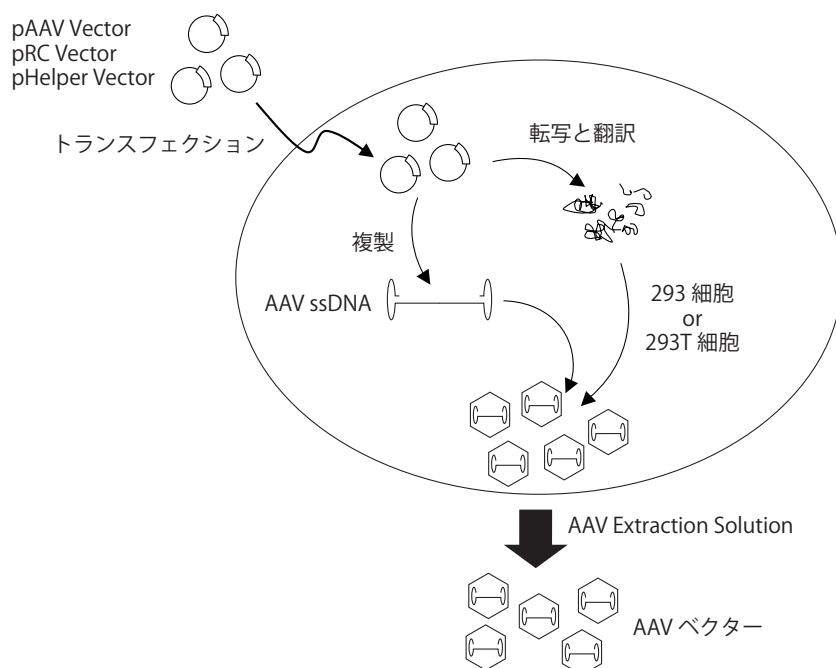


図 2. 本システムによる AAV ベクターの作製

I-3. 特長

1. ヘルパーウイルス不要、効率的に AAV ベクターを作製

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。

【 AAVpro Helper Free System シリーズ 】

AAVpro Helper Free System シリーズに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。

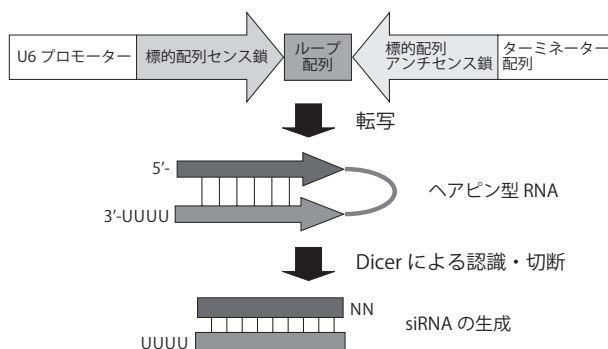
- pAAV Vector：目的遺伝子の発現カセットと 2 つの ITR を含むベクタープラスミド
 - pAAV-CMV Vector (製品コード 6673/6230/6650/6651/6680/6690)
導入したい目的遺伝子を MCS に挿入することができるベクタープラスミドです。ただし、AAV 粒子に封入される DNA サイズには制限があるため、挿入する目的遺伝子のサイズは 2.5 kb 以内にしてください。
 - pAAV-CRE Recombinase Vector (製品コード 6668/6652/6653/6654/6682/6693)
loxP 依存的な recombinase 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 6669/6655/6656/6657/6683/6692)
LacZ 遺伝子を発現する AAV ベクター調製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)
 - pRC8 Vector : 血清型 8 (製品コード 6680/6682/6683)
 - pRC9 Vector : 血清型 9 (製品コード 6690/6693/6692)

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

【 AAVpro Helper Free System (AAV-U6-ZsGreen1)/(AAV-2xU6) シリーズ 】

AAVpro Helper Free System (AAV-U6-ZsGreen1)/(AAV-2xU6) シリーズに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 shRNA 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-U6-ZsGreen1 Vector (製品コード 6670/6658/6659/6660/6685/6695)
1種類の shRNA 発現用ベクターです。mU6 プロモーターより shRNA を発現させ、CMV プロモーターより緑色蛍光タンパク質 ZsGreen1 を発現させます。ZsGreen1 の発現により導入の確認や導入細胞だけでの評価が可能です。
 - pAAV-2xU6 Vector (製品コード 6671/6661/6662/6663/6684/6694)
2種類の shRNA 発現用ベクターです。2種類の shRNA をそれぞれ hU6 プロモーターと mU6 プロモーターから発現させます。2つの遺伝子の同時ノックダウンや1つの遺伝子に対して2種類の shRNA を作用させることによるノックダウン効果の増強に利用できます。



- 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 6670/6671)
 - pRC2-mi342 Vector*3：血清型 2 (製品コード 6658/6661)
 - pRC5 Vector：血清型 5 (製品コード 6659/6662)
 - pRC6 Vector：血清型 6 (製品コード 6660/6663)
 - pRC8 Vector：血清型 8 (製品コード 6685/6684)
 - pRC9 Vector：血清型 9 (製品コード 6695/6694)

* 3：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。

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

2. 効率的かつ簡便操作の AAV ベクター抽出法

タカラバイオが独自に開発した AAV Extraction Solution を用いることで、従来の凍結融解や超音波破碎などの操作が不要になります。加えて、宿主由来のタンパク質や核酸の混入を抑え、簡便に AAV ベクターの抽出が可能です。

II. 内容

II-1. 対象製品

【 AAVpro Helper Free System シリーズ 】

- AAVpro Helper Free System (AAV1/AAV2/AAV5/AAV6/AAV8/AAV9)
(製品コード 6673/6230/6650/6651/6680/6690)
- AAVpro Helper Free System (AAV-CRE Recombinase) (AAV1/AAV2/AAV5/AAV6/AAV8/AAV9)
(製品コード 6668/6652/6653/6654/6682/6693)
- AAVpro Helper Free System (AAV-LacZ) (AAV1/AAV2/AAV5/AAV6/AAV8/AAV9)
(製品コード 6669/6655/6656/6657/6683/6692)

【 AAVpro Helper Free System (AAV-U6-ZsGreen1)/(AAV-2xU6) シリーズ 】

- AAVpro Helper Free System (AAV-U6-ZsGreen1) (AAV1/AAV2/AAV5/AAV6/AAV8/AAV9)
(製品コード 6670/6658/6659/6660/6685/6695)
- AAVpro Helper Free System (AAV-2xU6) (AAV1/AAV2/AAV5/AAV6/AAV8/AAV9)
(製品コード 6671/6661/6662/6663/6684/6694)

II-2. 本製品の内容

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 >

1. pAAV Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *1	20 μl
2. pRC1 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *2	20 μl
3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *2	20 μl
4. AAV Extraction Solution A	1.5 ml \times 3
5. AAV Extraction Solution B	150 μl \times 3

* 1 : 各製品のコンポーネントは以下です。

pAAV-CMV Vector	: 製品コード 6673
pAAV-CRE Recombinase Vector	: 製品コード 6668
pAAV-LacZ Vector	: 製品コード 6669
pAAV-U6-ZsGreen1 Vector	: 製品コード 6670
pAAV-2xU6 Vector	: 製品コード 6671

* 2 : 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 のセット) 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)	
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

< 血清型 2 >

1. pAAV Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *3	20 μl
2. pRC2-mi342 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *4	20 μl
3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *4	20 μl
4. AAV Extraction Solution A	1.5 ml \times 3
5. AAV Extraction Solution B	150 μl \times 3

* 3 : 各製品のコンポーネントは以下です。

pAAV-CMV Vector	: 製品コード 6230
pAAV-CRE Recombinase Vector	: 製品コード 6652
pAAV-LacZ Vector	: 製品コード 6655
pAAV-U6-ZsGreen1 Vector	: 製品コード 6658
pAAV-2xU6 Vector	: 製品コード 6661

* 4 : 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 のセット) を別売り製品として用意しています。

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

※ 臨床での使用を想定したプラスミドを別売り製品として用意しています。詳細は製品のデータシートをご参照ください。

AAVpro Packaging Plasmid (AAV2) (KmR) (製品コード 6266)

[注意] AAVpro Packaging Plasmid (AAV2) (KmR) (製品コード 6266) の pRC2-Km vector には、AAV2 ベクター作製系でタイター向上効果のある hsa-miR-342 (miRNA) 発現カセットは含まれません。

< 血清型 5 >

- | | |
|---|------------------------------|
| 1. pAAV Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *5 | 20 μl |
| 2. pRC5 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *6 | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *6 | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μl \times 3 |

* 5 : 各製品のコンポーネントは以下です。

pAAV-CMV Vector	: 製品コード 6650
pAAV-CRE Recombinase Vector	: 製品コード 6653
pAAV-LacZ Vector	: 製品コード 6656
pAAV-U6-ZsGreen1 Vector	: 製品コード 6659
pAAV-2xU6 Vector	: 製品コード 6662

* 6 : 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 のセット) を別売り製品として用意しています。

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

< 血清型 6 >

- | | |
|---|------------------------------|
| 1. pAAV Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *7 | 20 μl |
| 2. pRC6 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *8 | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *8 | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μl \times 3 |

* 7 : 各製品のコンポーネントは以下です。

pAAV-CMV Vector	: 製品コード 6651
pAAV-CRE Recombinase Vector	: 製品コード 6654
pAAV-LacZ Vector	: 製品コード 6657
pAAV-U6-ZsGreen1 Vector	: 製品コード 6660
pAAV-2xU6 Vector	: 製品コード 6663

* 8 : 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 のセット) を別売り製品として用意しています。

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

※ 臨床での使用を想定したプラスミドを別売り製品として用意しています。詳細は製品のデータシートをご参照ください。

AAVpro Packaging Plasmid (AAV6) (KmR) (製品コード 6616)

< 血清型 8 >

- | | |
|--|------------------------------|
| 1. pAAV Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *9 | 20 μl |
| 2. pRC8 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *10 | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *10 | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μl \times 3 |

* 9 : 各製品のコンポーネントは以下です。

pAAV-CMV Vector	: 製品コード 6680
pAAV-CRE Recombinase Vector	: 製品コード 6682
pAAV-LacZ Vector	: 製品コード 6683
pAAV-U6-ZsGreen1 Vector	: 製品コード 6685
pAAV-2xU6 Vector	: 製品コード 6684

* 10 : 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 のセット) を別売り製品として用意しています。

AAVpro Packaging Plasmid (AAV8) (製品コード 6681)	
pRC8 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

※ 臨床での使用を想定したプラスミドを別売り製品として用意しています。詳細は製品のデータシートをご参照ください。

AAVpro Packaging Plasmid (AAV8) (KmR) (製品コード 6866)

< 血清型 9 >

- | | |
|--|------------------------------|
| 1. pAAV Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *11 | 20 μl |
| 2. pRC9 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *12 | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *12 | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μl \times 3 |

* 11 : 各製品のコンポーネントは以下です。

pAAV-CMV Vector	: 製品コード 6690
pAAV-CRE Recombinase Vector	: 製品コード 6693
pAAV-LacZ Vector	: 製品コード 6692
pAAV-U6-ZsGreen1 Vector	: 製品コード 6695
pAAV-2xU6 Vector	: 製品コード 6694

* 12 : 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 のセット) を別売り製品として用意しています。

AAVpro Packaging Plasmid (AAV9) (製品コード 6691)	
pRC9 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

※ 臨床での使用を想定したプラスミドを別売り製品として用意しています。詳細は製品のデータシートをご参照ください。

AAVpro Packaging Plasmid (AAV9) (KmR) (製品コード 6696)

III. 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。

【 AAVpro Helper Free System シリーズ 】

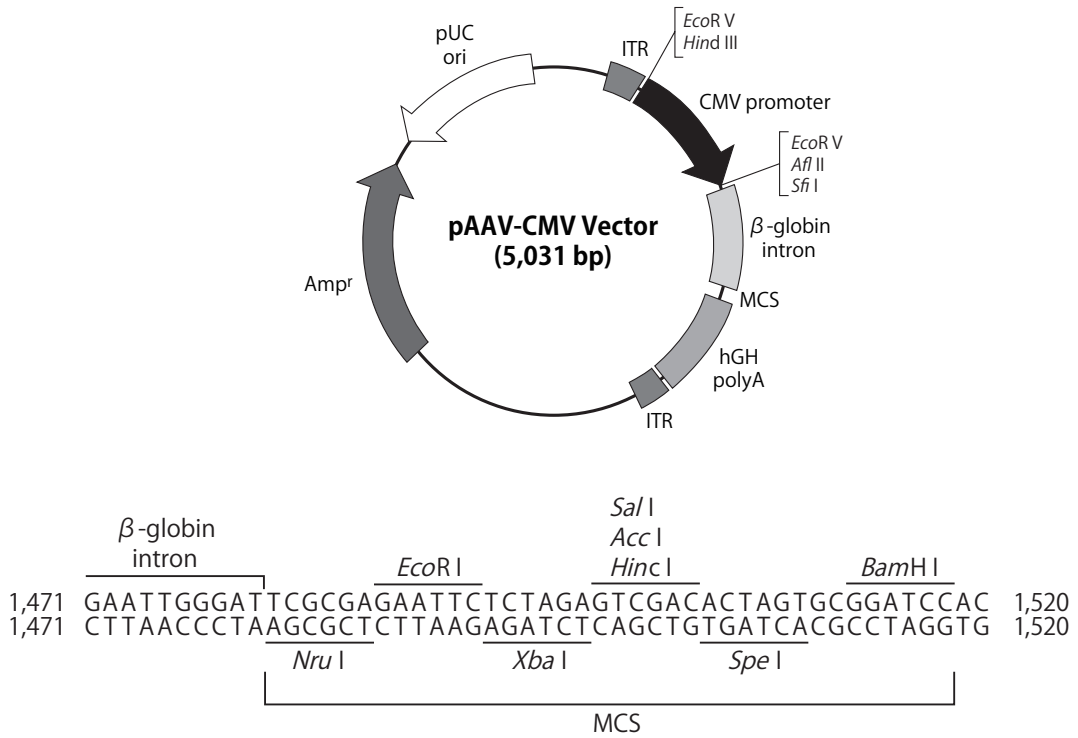


図 3. pAAV-CMV Vector プラスミドマップとマルチクロニングサイト (MCS)

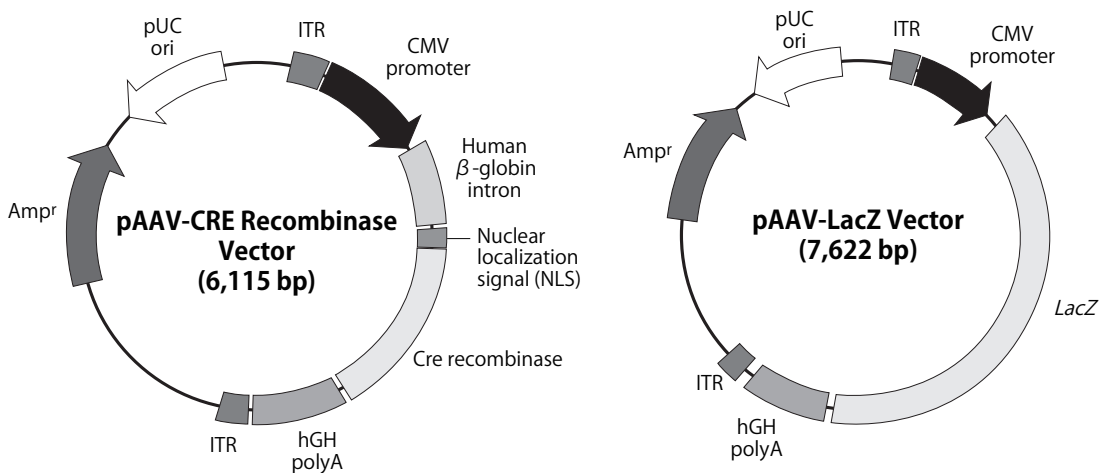


図 4. pAAV-CRE Recombinase Vector プラスミドマップ

図 5. pAAV-LacZ Vector プラスミドマップ

【 AAVpro Helper Free System (AAV-U6-ZsGreen1)/(AAV-2xU6) シリーズ 】

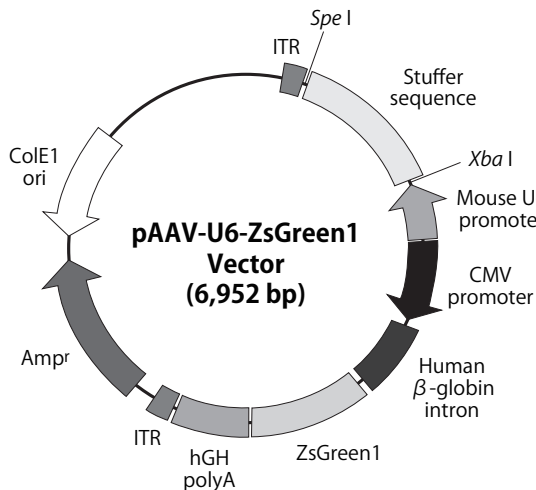


図 6. pAAV-U6-ZsGreen1 Vector プラスミドマップ

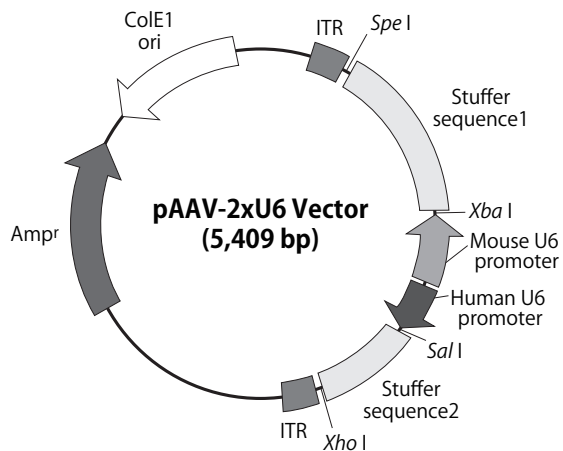


図 7. pAAV-2xU6 Vector プラスミドマップ

【両シリーズ共通】

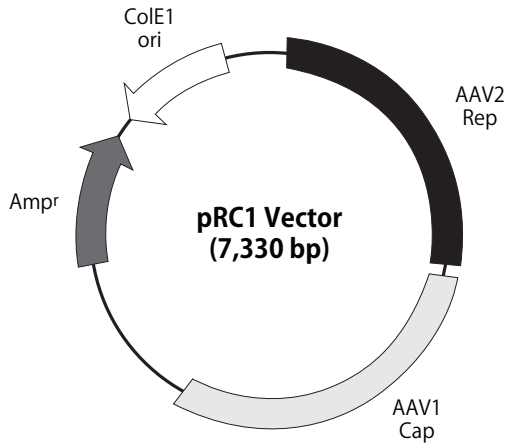


図 8. pRC1 Vector プラスミドマップ

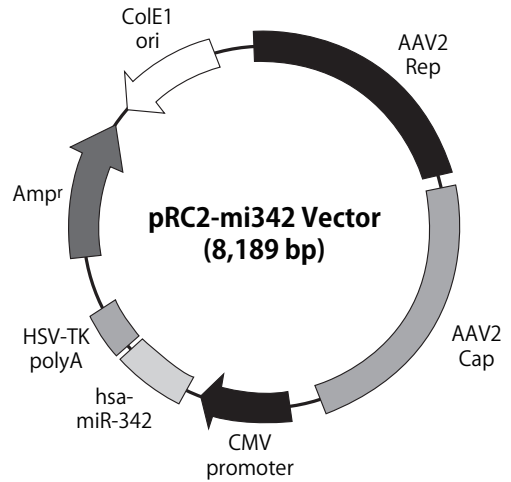


図 9. pRC2-mi342 Vector プラスミドマップ

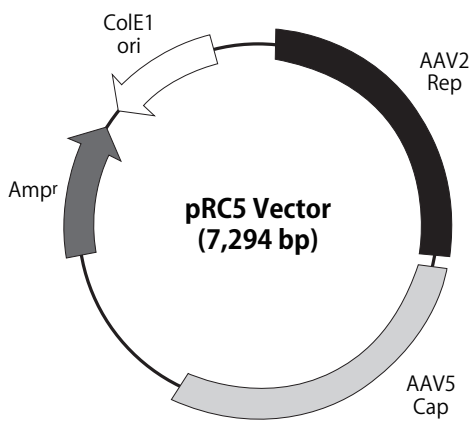


図 10. pRC5 Vector プラスミドマップ

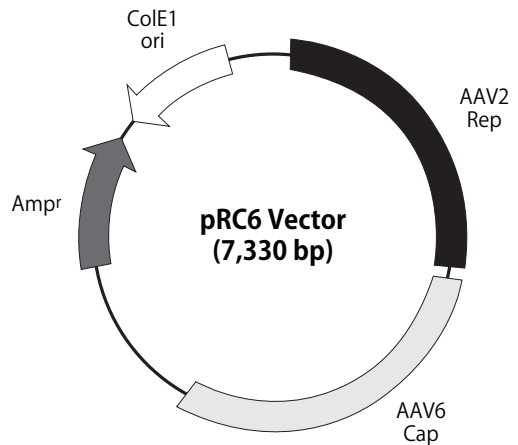


図 11. pRC6 Vector プラスミドマップ

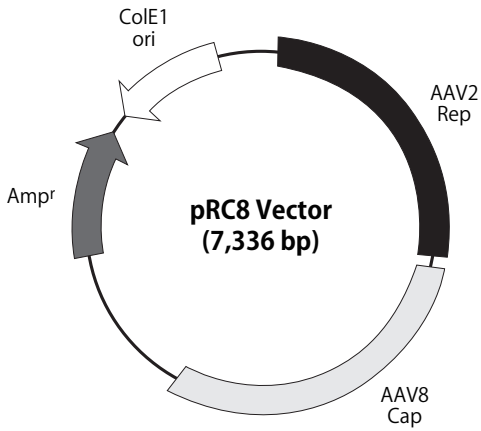


図 12. pRC8 Vector プラスミドマップ

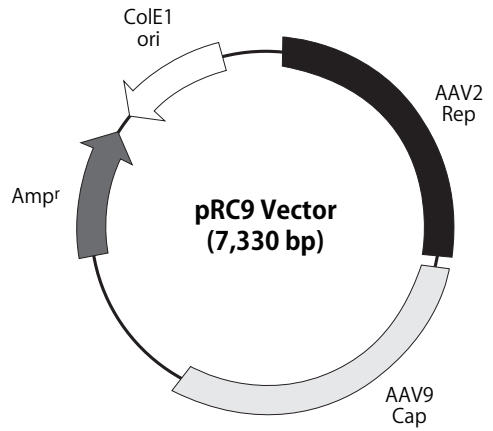


図 13. pRC9 Vector プラスミドマップ

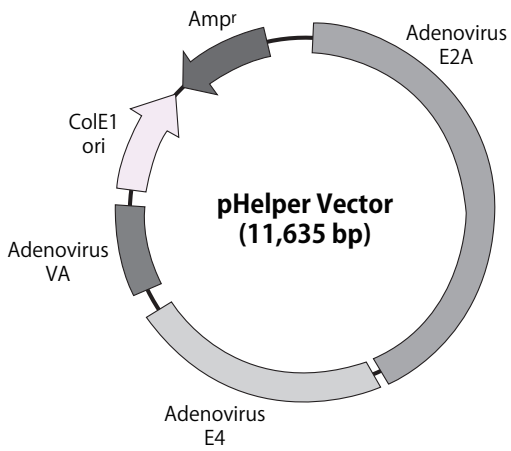


図 14. pHelper Vector プラスミドマップ

IV. 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。)

V. 本製品以外に必要な器具、装置、試薬類 (主なもの)

V-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

V-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))
- 下記のうちいずれかのポジティブコントロール用ベクター
 - a. pAAV-ZsGreen1 Vector (製品コード 6231)*2
 - b. pAAV-ZsGreen1 Vector (KmR) (製品コード 6610)*2
- In-Fusion® Snap Assembly Master Mix (製品コード 638947 など)*3
- 二本鎖オリゴ DNA 調製用バッファー (10 mM Tris-HCl (pH8.0)、50 mM NaCl)*3,4

* 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。

* 3 : AAVpro Helper Free System (AAV-U6-ZsGreen1)/(AAV-2xU6) シリーズのみ必要です。

* 4 : 二本鎖オリゴ DNA 調製用バッファーには、一般的な 1× PCR バッファー等も使用可能です (TaKaRa Ex Taq® (製品コード RR001A) 添付の 10× Ex Taq Buffer (20 mM Mg²⁺ plus) など)。

VI. 操作

VI-1. AAV ベクター作製のアウトライン

1. pAAV-CMV Vector への目的遺伝子クローニング
または
pAAV-U6-ZsGreen1 Vector、pAAV-2xU6 Vector への合成オリゴ DNA 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-2. 操作法

1. クローニング

【AAVpro Helper Free System シリーズの場合】

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 Snap Assembly Master Mix (製品コード 638947 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。

【 AAVpro Helper Free System (AAV-U6-ZsGreen1)/(AAV-2xU6) シリーズの場合 】

＜ヘアピン型 RNA を発現させるための DNA 合成＞

AAVpro Helper Free System (AAV-U6-ZsGreen1)/(AAV-2xU6) シリーズではヘアピン型 RNA を発現させるための合成オリゴ DNA のクローニングに、In-Fusion Snap Assembly Master Mix (製品コード 638947 など) の使用を推奨する。

ヘアピン型 RNA を発現させるためには、[連結用の配列 (15 塩基) - 標的配列 (センス) - ループ配列 - 標的配列 (アンチセンス) - ターミネーター配列 - 連結用の配列 (15 塩基)] の順でデザインした合成 DNA を用意し、In-Fusion 反応でプロモーターの下流に挿入する。

挿入のために、以下に示すような合成オリゴ DNA を作製する (Top strand と Bottom strand の 2 本; N 部分が標的配列)。pol III 系プロモーターの転写開始点はプリン塩基 (G または A) が好ましいため、標的配列が G または A で始まらない場合は標的配列の前に G または A を挿入する。

Xba I-*Spe* I サイトには shRNA oligo DNA-1 を、*Sal* I-*Xho* I サイトには shRNA oligo DNA-2 を挿入する。

ここではループ配列の例として CTGTGAAGCCACAGATGGG (Boden *et al.*⁷⁾) を挙げているが、GTGTGCTGTCC (Miyagishi *et al.*⁸⁾) も有用であることが確認されている。これ以外のヘアピンループとして、Lee *et al.*⁹⁾、Paddison *et al.*¹⁰⁾、Paul *et al.*¹¹⁾、Sui *et al.*¹²⁾ らによってそれぞれ異なった配列が報告されている。1 つのベクターに 2 つの shRNA 発現ユニットを搭載する場合には、ベクター内での組換えのリスクを軽減する目的で 2 つの shRNA に別々のループを使用することを推奨する。

ターミネーター配列には TTTTTT 配列を用いる (T が 4 つ続くと pol III 系プロモーターによる転写が止まる)。siRNA 配列と用いるヘアピンループ配列の組み合わせによっては T が 4 つ以上続く可能性があるため、合成 DNA をデザインした後には必ず、Top strand に T が 4 つ以上続いていないことを確認することが必要である。

◆ In-Fusion 反応用 合成 DNA 配列

shRNA oligo DNA-1 (*Xba* I-*Spe* I サイト)
 <連結用配列 - 標的配列 (センス) - ループ配列 - 標的配列 (アンチセンス) - ターミネーター配列 - 連結用配列>

転写開始点*

	連結用配列	target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator	連結用配列
Top strand	5'-GAGAAAGCCCTCTAG(G/A)	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	CTGTGAAGCCACAGATGGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	(CT)TTTTTT	CTAGTGATATCGATA-3'
Bottom strand	3'-CTCTTTTCGGAGATC(C/T)	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	GACACTTCGGTGTCTACCC	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	(G/A)AAAAA	GATCACTATAGCTAT-5'

shRNA oligo DNA-2 (*Sal* I-*Xho* I サイト)
 <連結用配列 - 標的配列 (センス) - ループ配列 - 標的配列 (アンチセンス) - ターミネーター配列 - 連結用配列>

転写開始点*

	連結用配列	target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator	連結用配列
Top strand	5'-GAAAGGACGAGTCGA(G/A)	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	CTGTGAAGCCACAGATGGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	(CT)TTTTTT	TCGAGAGATCTAGGA-3'
Bottom strand	3'-CTTTCCTGCTCAGCT(C/T)	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	GACACTTCGGTGTCTACCC	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	(G/A)AAAAA	AGCTCTCTAGATCCT-5'

* : ターゲット配列の最初の塩基が G または A でない場合はターゲット配列の前に G または A を挿入してください。

＜シーケンス用プライマー＞

shRNA oligo DNA-1 配列確認用プライマー 5'-AAGCTTGAATTCGATCCGACG-3'

shRNA oligo DNA-2 配列確認用プライマー 5'-GAATTC AAGCTT AAGGTCGGG-3'

※ ベクター上の Stuffer sequence を挟む制限酵素サイトを利用して、ライゲーションにより合成オリゴ DNA をクローニングすることも可能です。その場合の合成オリゴ DNA のデザイン等は、「VII-2. ライゲーションによる合成オリゴ DNA のクローニング」をご参照ください。

< pAAV-U6-ZsGreen1 Vector のクローニングを行う場合 >

- 1) 二本鎖オリゴ DNA を調製する。
 - (1) 合成した相補オリゴ DNA (Top strand および Bottom strand) を終濃度 20 pmol/ μ l になるように二本鎖オリゴ DNA 調製用バッファーで希釈する。
 - (2) サーマルサイクラーなどを用いて 95°C 5 分間加熱処理をし、30 分以上かけて 25°C まで徐冷する。
- 2) ベクターを制限酵素で切断する。

pAAV-U6-ZsGreen1 Vector を *Xba*I および *Spe*I で切断し、アガロースゲル電気泳動で Stuffer sequence (約 900 bp) が切り出された断片 (約 6 kb) を回収し、精製する。
- 3) In-Fusion Snap Assembly Master Mix を用い、下記の反応液を調製し、In-Fusion 反応を行う。

試薬	使用量
5 × In-Fusion Snap Assembly Master Mix	2 μ l
精製 DNA ベクター	50 ~ 100 ng
二本鎖オリゴ DNA	3 pmol
dH ₂ O	x μ l
Total	10 μ l

50°C 15 分間反応後、氷上に移す。

注：詳細は In-Fusion Snap Assembly Master Mix の取扱説明書をご確認ください。

- 4) 反応液を用いて、トランスフォーメーションを行う。この際に用いるコンピテントセルには、相同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。

< pAAV-2xU6 Vector のクローニングを行う場合 >

pAAV-2xU6 Vector は、クローニングサイトが 2 か所あるので、まず片方のサイトに pAAV-U6-ZsGreen1 Vector の場合と同様に二本鎖オリゴ DNA をクローニングした後、プラスミドを精製し、そのプラスミドを用いてもう片方のサイトに別の二本鎖オリゴ DNA をクローニングする。
なお、pAAV-2xU6 Vector を *Xba*I と *Spe*I で切り出した断片は約 4.5 kb、*Sal*I と *Xho*I で切り出した断片は、約 4.9 kb になる。

2. クローニングしたベクタープラスミドの調製

1. でクローニングした目的遺伝子 (目的配列) 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 μ g/ μ 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 × *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。

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。

注：以下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。

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、2. で精製した pAAV Vector、AAVpro Helper Free System シリーズ添付の pRC Vector および pHelper Vector を用いて、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、AAVpro Helper Free System シリーズ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。

試薬	使用量	
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。

試薬	使用量	
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。

試薬	使用量	
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。

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。

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。

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、本製品に添付の AAV Extraction Solution の使用を推奨します。添付の AAV Extraction Solution を用いることで、従来の凍結融解や超音波破碎等の操作を必要とせず、簡便に AAV ベクターの抽出が可能です。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。

- 1) 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 1：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℃ 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 2：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 3：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。

VII. 参考

VII-1. 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 シリーズを用いて調製) 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。

VII-2. ライゲーションによる合成オリゴ DNA のクローニング

※ 本項目は AAVpro Helper Free System (AAV-U6-ZsGreen1)/(AAV-2xU6) シリーズのみ対象です。

ライゲーションによりヘアピン型 RNA を発現させるための合成オリゴ DNA をクローニングする場合は、[Ligation 用の制限酵素サイトー標的配列 (センス)ーループ配列ー標的配列 (アンチセンス)ーターミネーター配列ー Ligation 用の制限酵素サイト] の順で合成 DNA をデザインします。pAAV-U6-ZsGreen1 ベクターのクローニングサイトは、上流側が *Xba*I、下流側が *Spe*I です。pAAV-2xU6 Vector ベクターのクローニングサイトは 2 か所あり、1 つは上流側が *Xba*I、下流側が *Spe*I、もう 1 つは上流側が *Sal*I、下流側が *Xho*I です。挿入のために、下図に示すような合成オリゴ DNA を作製してください (Top strand と Bottom strand の 2 本; N 部分が標的配列)。pol III 系プロモーターの転写開始点はプリン塩基 (G または A) が好ましいため、標的配列が G または A で始まらない場合は標的配列の前に G または A を挿入してください。

ここではループ配列の例として CTGTGAAGCCACAGATGGG (Boden., *et al.*⁷⁾) を挙げていますが、GTGTGCTGTCC (Miyagishi., *et al.*⁸⁾) も有用であることが確認されています。これ以外のヘアピンループとして、Lee., *et al.*⁹⁾、Paddison., *et al.*¹⁰⁾、Paul., *et al.*¹¹⁾、Sui., *et al.*¹²⁾ によってそれぞれ異なった配列が報告されています。1 つのベクターに 2 つの shRNA 発現ユニットを搭載する場合には、ベクター内での組換えのリスクを軽減する目的で 2 つの shRNA に別々のループを使用することを推奨します。

ターミネーター配列には TTTTTT 配列を用います (T が 4 つ続くと pol III 系プロモーターによる転写が止まります)。siRNA 配列と用いるヘアピンループ配列の組み合わせによっては T が 4 つ以上続く可能性があるため、合成 DNA をデザインした後は必ず、Top strand に T が 4 つ以上続いていないことを確認することが必要です。

< *Xba*I- 標的配列 (センス)ーループ配列ー標的配列 (アンチセンス)ーターミネーター配列 -*Spe*I >

	転写開始点*					
	<i>Xba</i> I	↓ target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator	<i>Spe</i> I
Top	5'-pCTAGA(G/A)	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	CTGTGAAGCCACAGATGGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	(C/T)TTTTTT	A-3'
Bottom	3'-T(C/T)	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	GACACTTCGGTGTCTACCC	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	(G/A)AAAAA	TGATCp-5'

< *Sal*I- 標的配列 (センス)ーループ配列ー標的配列 (アンチセンス)ーターミネーター配列 -*Xho*I >

	転写開始点*					
	<i>Sal</i> I	↓ target sequence (sense)	Hairpin loop	target sequence (antisense)	Terminator	<i>Xho</i> I
Top	5'-pTCGAC(G/A)	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	CTGTGAAGCCACAGATGGG	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	(C/T)TTTTTT	C-3'
Bottom	3'-G(C/T)	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	GACACTTCGGTGTCTACCC	NNNNNNNNNNNNNNNNNN	(G/A)AAAAA	GAGCTp-5'

* : ターゲット配列の最初の塩基が G または A でない場合はターゲット配列の前に G または A を挿入してください。

[注意] ライゲーションにより合成オリゴ DNA をクローニングする場合は、合成するオリゴ DNA の 5' 末端をリン酸化修飾してください。

また、制限酵素処理したベクターは脱リン酸化処理を行ってください。

なお、ライゲーションによるクローニングの場合、複数のオリゴ DNA が挿入される場合がありますのでご注意ください。

VIII. 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.
- 7) Boden *et al. Nucleic Acids Res.* (2004) **32**: 1154-1158.
- 8) Miyagishi *et al. J Gene Med.* (2004) **6**: 715-723.
- 9) Lee *et al. Nat Biotech.* (2002) **20**: 500-505.
- 10) Paddison *et al. Genes and Dev.* (2002) **16**: 948-958.
- 11) Paul *et al. Nat Biotech.* (2002) **20**: 505-508.
- 12) Sui *et al. Proc Natl Acad Sci USA.* (2002) **99**: 5515-5520.

IX. 関連製品

pAAV-ZsGreen1 Vector (製品コード 6231)
pAAV-ZsGreen1 Vector (KmR) (製品コード 6610)
AAVpro® Purification Kit Maxi (All Serotypes) (製品コード 6666)
AAVpro® Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes) (製品コード 6676)
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® Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes) (製品コード 6679)
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)
In-Fusion® Snap Assembly Master Mix (製品コード 638947 など)

X. 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、TaKaRa Ex Taq 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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社