

研究用

TAKARA

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

説明書

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に必ず、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

AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) は、タカラバイオが独自に開発したリアルタイム PCR を用いてアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの力価を定量するためのキットです (特許出願中)。本製品には、AAVベクター産生細胞から AAVベクターを抽出し、リアルタイム PCRによりベクターゲノムを定量するために必要な試薬が含まれています。従来法である DNA ブロット法や ELISA 法と比較して高精度かつ短時間 (2.5 時間以内) で結果を得ることができます。AAV ベクターゲノムの検出には両末端に存在する ITR (Inverted Terminal Repeat) をターゲットとしているので、幅広い AAVベクターの力価測定が可能です。Ver.2 では Positive Control の安定性が向上しました。

AAVベクターについて

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、物理化学的にも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 1 本鎖 DNA で、両末端に ITR と呼ばれる T 字型のヘアピン構造が存在します。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。AAVpro Helper Free System (AAV2) (製品コード 6230) や AAVpro Helper Free System (AAV1) (製品コード 6673)、AAVpro Helper Free System (AAV5) (製品コード 6650)、AAVpro Helper Free System (AAV6) (製品コード 6651) を用いるとヘルパーウイルスを使用せずに、必要なコンポーネントを含むプラスミドを HEK293 細胞などにトランスフェクションすることで、それぞれ AAV2 ベクター、AAV1 ベクター、AAV5 ベクター、AAV6 ベクターの調製を行うことが可能です。

本製品により測定可能な AAV ベクターについて

AAV ベクターの血清型は、ベクター調製時に使用される pRC ベクタープラスミドにコードされている Cap 遺伝子の種類によって決定されます。一方、AAV 粒子内に封入されるベクターゲノムは、一般的には血清型に関わらず、共通して AAV2 の ITR が使用されています。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。ご使用の AAV ベクターの ITR 領域が AAV2 由来であることを確認の上、ご使用ください。

AAVゲノム簡易抽出法について

(A) AAV Extraction Solution を用いた AAV ベクター抽出法

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おり、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用意する必要がありました。本製品では、独自に開発した AAV Extraction Solution 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 AAV ベクターを抽出することができます。なお、凍結融解法で取得した AAV ベクターも本製品を用いて力価を測定することができます。

(B) AAV ベクター抽出液からの AAV ゲノム抽出法

抽出した AAV を含むウイルス抽出液には産生細胞由来のタンパク質や核酸が含まれます。不要な核酸を酵素処理した後、酵素を失活させ、Lysis Buffer を用いてタンパク質を熱変性させることで、目的のベクターゲノムを簡易抽出することができます。

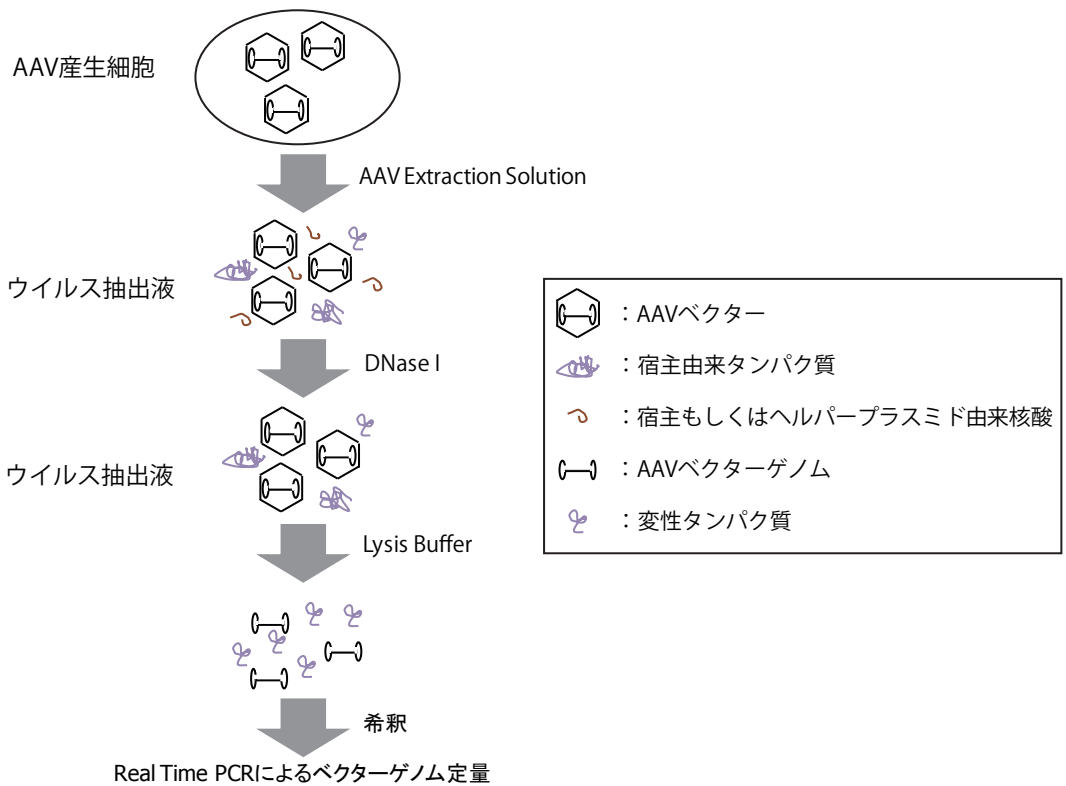


図 1. AAV ベクターおよびベクターゲノム抽出工程の概略

リアルタイム PCR 法について

リアルタイム PCR は、PCR 増幅の過程を蛍光物質によりリアルタイムでモニタリングする迅速性と定量性に優れた遺伝子検出法です。本製品に含まれる TB Green® Premix Ex Taq™ II は、インターカレーター法によるリアルタイム PCR 試薬です。

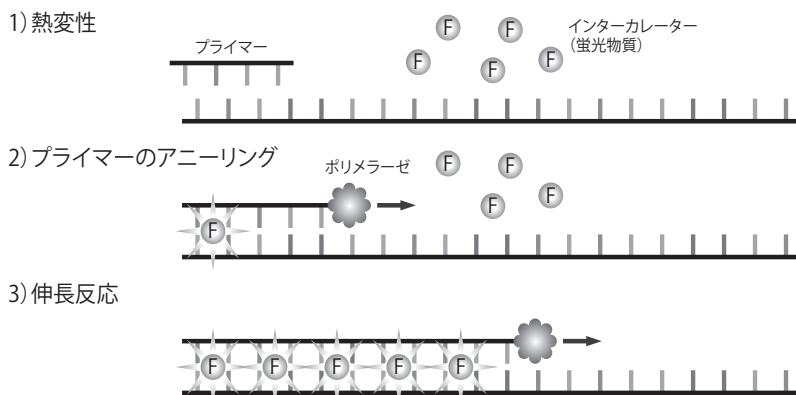


図 2. インターカレーター法の原理

二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレーター）を反応液に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法です。PCR 反応によって合成された二本鎖 DNA にインターカレーターが結合すると、蛍光を発します。

II. 内容

II-1. AAV ベクターの抽出	
AAV Extraction Solution A	1.5 ml × 2
AAV Extraction Solution B	300 μl
II-2. AAV ゲノム簡易抽出 (100 サンプル分)	
DNase I	100 μl
10 × DNase I Buffer	200 μl
Lysis Buffer	1 ml × 2
II-3. Real Time PCR (100 回分 ; 25 μl 反応系)	
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (Tli RNaseH Plus)	625 μl × 2
AAV Forward Titer Primer	20 μl
AAV Reverse Titer Primer	20 μl
dH ₂ O* ¹	1 ml × 3
ROX Reference Dye* ²	50 μl
ROX Reference Dye II* ²	50 μl
Positive Control	50 μl
EASY Dilution (for Real Time PCR)	1 ml × 5

* 1 : dH₂O は DNase I 反応に使用する分も含まれます。

* 2 : Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。

◆ ROX Reference Dye を添加する機種

• StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

◆ ROX Reference Dye II を添加する機種

• Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)

◆ 添加の必要がない機種

• Thermal Cycler Dice® Real Time System シリーズ
(製品コード TP900/TP960 : 終売など)

III. 保存

- TB Green *Premix Ex Taq* II は必ず遮光して 4℃ で保存してください。保存中は、コンタミネーションに十分注意してください。長期保存する場合は、-20℃ で保存してください。一度融解したものは 4℃ で保存し、6 ヶ月を目処にご使用ください。
- AAV Extraction Solution A、B および Lysis Buffer は融解後、室温保存してください。
- その他のコンポーネントは -20℃ 保存してください。TB Green *Premix Ex Taq* II 以外のコンポーネントは 2 年を目途にご使用ください。

IV. キット以外に必要な器具、試薬類

- 細胞培養に必要な一般的設備
- トランスフェクション試薬
- 0.5 M EDTA (pH8.0) (EDTA Buffer Powder, pH8.0 (製品コード T9191))
- ヒートブロック (37℃、70℃、95℃)
※ AAV ゲノムの抽出工程には Thermal Cycler を使用すると便利です。
- リアルタイム PCR 装置および専用チューブ
Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900/TP960 : 終売)
Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760 : 終売)
Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社)
StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific 社) など

V. 操作上の注意

本キットを使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 本キットには AAV ベクター産生細胞からの AAV ベクターの抽出、AAV ベクターからのゲノムの抽出およびリアルタイム PCR の反応試薬が添付されています。
2. 添付の Primer は混合・希釈をせずに -20°C 以下で保存し、反応直前に Primer mix を調製してください。
3. 反応液は、まとめて Master Mix (dH₂O、バッファー、酵素等の混液) を調製すると便利です。Master Mix を調製することで、ピペティングによるロスや、試薬の分注、攪拌回数が少なくなり、正確な試薬の分注を行うことができます。その結果、実験間のデータのばらつきも防げます。
4. TB Green Premix Ex Taq II は、使用前に軽く遠心して、試薬をチューブの底に落としてください。粘度が高いため、注意深くゆっくりとピペティングを行ってください。
5. 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。
6. 反応液の調製、検体の調製および検体の反応液への添加は、できるだけ実験エリアをわけ、増幅産物の入ったチューブの開閉は避けてください。本キットでは増幅反応と検出を同時にリアルタイムで行うため、反応終了後の増幅産物を電気泳動などに使用する必要はありません。

VI. 実験操作

注意：以下の操作手順は、AAV ベクター産生細胞からの AAV 抽出工程も含まれています。すでに取得された AAV ベクターの力価を測定する場合は、以下 VI-2. 以降をご参照ください。

VI-1. AAV ベクターの抽出

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抽出を行うプロトコールを示します。培養基材を変更した場合の溶液量は表 1 を参考にしてください。

1. 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 容量で添加する。
2. 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。
3. $1,750 \times g$ 、 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 1：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んでください。

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 2：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. 0.5 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. $2,000 \sim 14,000 \times g$ 、 4°C で 10 分間遠心する。

注 3：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。

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 50 μl 添加する。

注 4：この時点で -80°C で保存することができます。 -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 5：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換することがありますが、性能には問題ありません。

表 1. 各培養基材を用いた際の必要溶体量

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

VI-2. AAV ベクターゲノムの抽出

1. 調製した AAV ベクター液を、DNase I を用いて以下のとおり混合し、37°C で 15 分以上反応させ、遊離のゲノムやプラスミド DNA を除去する。

AAV ベクター抽出液	2 μ l
10 × DNase I Buffer	2 μ l
DNase I	1 μ l
dH ₂ O	15 μ l
Total	20 μ l

2. 95°C で 10 分間熱処理を行い、DNase I を失活させる。
3. 2. で得られたサンプル 20 μ l に Lysis Buffer を等量添加する。
4. 70°C で 10 分間熱処理を行う。
5. 得られた AAV ベクターゲノム抽出液の一部を EASY Dilution (for Real Time PCR) で 50 倍以上に希釈し、これを鋳型にしてリアルタイム PCR によるゲノム DNA の定量を行う。

VI-3. リアルタイム PCR

VI-2. で調製した DNA 溶液の内、5 μ l を鋳型としてリアルタイム PCR を行う。同時に検量線作成用スタンダードの反応を実施する。

1. 検量線作成用スタンダードの調製

Positive Control を EASY Dilution で段階希釈し、検量線作成用スタンダードとする。(リアルタイム PCR には、1 反応当りそれぞれ 5 μ l を使用する。)

- (1) 2×10^7 copies/ μ l (Positive Control 原液)
- (2) 2×10^6 copies/ μ l (Positive Control 原液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
- (3) 2×10^5 copies/ μ l ((2) の 2×10^6 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
- (4) 2×10^4 copies/ μ l ((3) の 2×10^5 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
- (5) 2×10^3 copies/ μ l ((4) の 2×10^4 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)
- (6) 2×10^2 copies/ μ l ((5) の 2×10^3 copies/ μ l 溶液 5 μ l + EASY Dilution 45 μ l)

2. 50 × Primer mix の調製

以下に示す溶液を調製し、50 × Primer mix とする。50 × Primer mix は必要量を即時調製し、保存はしない。

AAV Forward Titer Primer	5 μ l
AAV Reverse Titer Primer	5 μ l
TE or dH ₂ O	15 μ l
Total	25 μ l

3. 反応液の調製

以下に示す反応液を氷上で調製する。

鋳型以外のコンポーネントを必要本数+ α 分調製し、各反応チューブに 20 μ l ずつ分注して軽くキャップをしめる。その内の 1 本に陰性コントロールとして dH₂O 5 μ l を加え、反応チューブのキャップをしっかりと閉める。

【Thermal Cycler Dice Real Time System の場合】

[1 反応]

TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (2 \times conc.)	12.5 μ l
50 \times Primer mix	0.5 μ l
dH ₂ O	7.0 μ l
鋳型	(5.0 μ l)
Total	25.0 μ l

【Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置の場合】

[1 反応]

TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (2 \times conc.)	12.5 μ l
50 \times Primer mix	0.5 μ l
ROX Reference Dye or ROX Reference Dye II *	0.5 μ l
dH ₂ O	6.5 μ l
鋳型	(5.0 μ l)
Total	25.0 μ l

* : StepOnePlus には ROX Reference Dye を、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System には ROX Reference Dye II を使用する。

4. 鋳型 (DNA 溶液) の添加

3. で分注した反応液に、検体 DNA 溶液や検量線作成用スタンダード等の鋳型を 5 μ l 添加し、チューブのキャップをしっかりと閉める。蛍光測定を行うため、チューブに汚れが付かないよう注意し、キャップを閉めるときは手袋を着用する。0.2 ml チューブ用の卓上遠心器で軽く遠心を行い、リアルタイム PCR 装置にセットする。

5. リアルタイム PCR 反応の開始

以下の PCR 条件でリアルタイム PCR を実施する。

※リアルタイム PCR 装置の操作方法は、各機種取扱説明書をご参照ください。

初期変性

95°C 2分

2 Step PCR

35 サイクル

95°C 5秒

60°C 30秒 (蛍光検出: FAM)

融解曲線分析

VII. 定量の原理について

本製品に含まれる Positive Control は ITR の該当領域を搭載したプラスミド DNA であり、OD₂₆₀ 値より換算した値で 2×10^7 copies/ μ l に調整されています。段階希釈物を検量線作成用スタンダードとして使用し、定量解析を行うことができます。AAV ベクターゲノム上の ITR と同等のコピー数を搭載していますので、得られた定量値からベクターゲノム量 (vg/ml および vg/cell) をそのまま換算することができます。

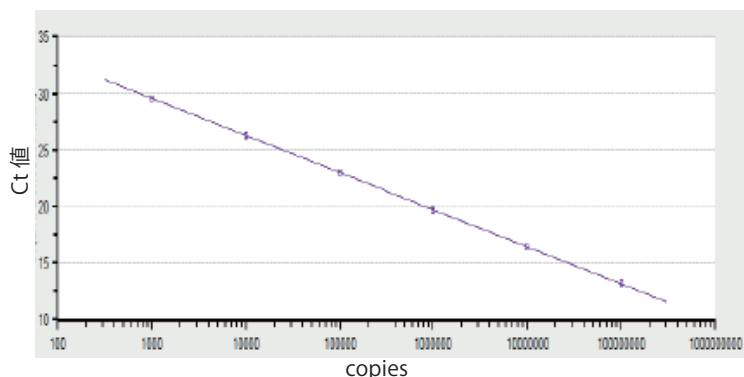


図 3. Positive Control を用いた検量線の例

VIII. 実験例

実験例 1：ITR および他領域をターゲットとした場合のベクターゲノム定量の比較

ITR 領域をターゲットとした場合（本製品）と AAV プラスミド上に存在する他領域をターゲットとした場合のリアルタイム PCR の定量結果を比較解析しました。

【実験方法】

AAV1、2、6 ベクターを産生する HEK293 細胞をそれぞれ作製した。得られた細胞から AAV Extraction Solution を使用して AAV ベクターの抽出を行い、リアルタイム PCR で定量解析を行った。増幅ターゲットを ITR と AAV プラスミド上に存在する CMV promoter に設定し、リアルタイム PCR を行い得られた定量値を比較した。その結果を図 4 に示す。

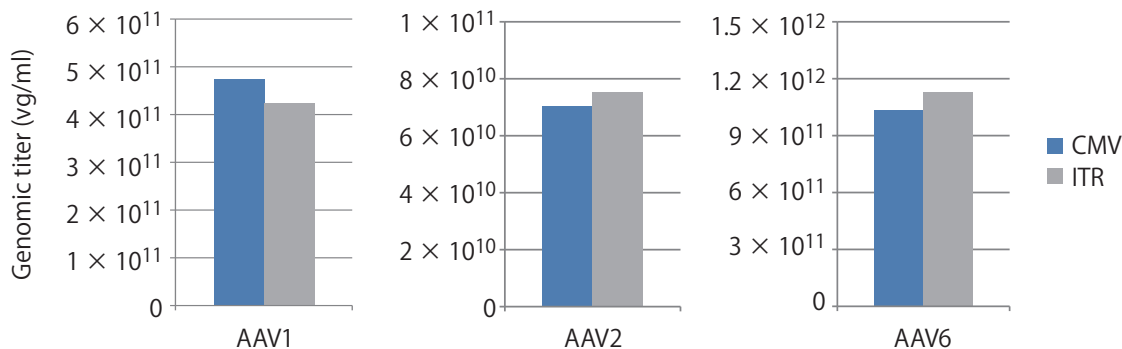


図 4. ITR および CMV promoter をターゲットとして定量した AAV ベクターの力価

【結果】

ITR、CMV promoter のどちらをターゲットとした場合も、双方の力価はほぼ同等であった。

実験例 2：凍結融解法における比較実験

AAV ベクター産生細胞からの AAV ベクターの抽出方法として、添付の AAV Extraction Solution と従来法である凍結融解法を比較しました。

【実験方法】

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 AAV Extraction Solution および凍結融解法により AAV ベクター抽出を行い、Real Time PCR 法で定量解析を行った。その結果を図 5 に示す。

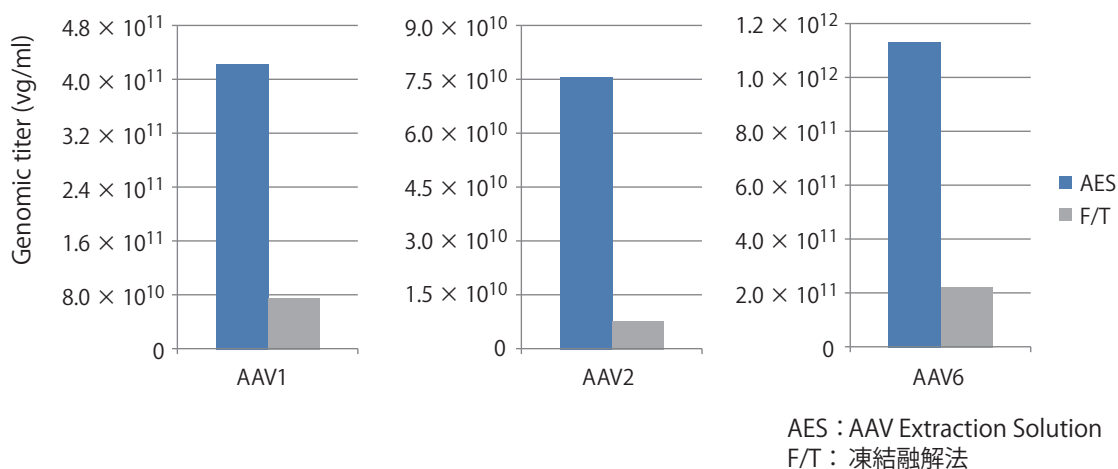


図 5. AAV Extraction Solution もしくは凍結融解法を用いた AAV ベクターの力価

【結果】

従来法である凍結融解法で取得した AAV ベクターも本製品で力価測定が可能であることが示された。また、AAV Extraction Solution を使用する方が AAV の抽出効率が高いことが示された。

IX. 関連製品

AAVpro® Extraction Solution (製品コード 6235)
EASY Dilution (for Real Time PCR) (製品コード 9160)
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)
pAAV-ZsGreen1 Vector (製品コード 6231)
AAVpro® Purification Kit (AAV2) (製品コード 6232)
AAVpro® Purification Kit Maxi (All Serotypes) (製品コード 6666)

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、TB Green、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。*Premix Ex Taq* 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

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