製品コード 6245

研究用

TaKaRa

AAVpro® Probe qPCR Titration Kit

説明書

v202611w

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。

目次

本製品の使用について 2

I. 製品概要 4

II. 内容 7

III. 保存 7

IV. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの） 8

V. 操作上の注意 9

VI. 操作 10

VII. 解析 15

VIII. 関連製品 17

IX. 注意 18

I. 製品概要

AAVpro Probe qPCR Titration Kit 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（Adeno-Associated Virus：AAV）ベクターのゲノム力価を定量するための製品です。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。AAV ベクターゲノムの検出には、両末端に存在する逆位末端反復配列（Inverted Terminal Repeat : ITR）をターゲットとしているため、幅広い AAV ベクターのゲノム力価測定が可能です。また、本製品は精製 AAV だけでなく、AAV 産生細胞から調製した粗抽出液をサンプルとして用いることができるため、簡便に AAV ベクターゲノムを定量することができます。

【 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 *Parvoviridae* 科 *Dependoparvovirus* 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 の特性を利用した、培養細胞および動物個体への遺伝子導入用ベクターであり、研究用途に加え、遺伝子治療用ベクターとしても広く利用されています。

AAVpro Helper Free System（製品コード 6230/6650/6651/6673/6680/6690）を用いることで、ヘルパーウイルスを使用することなく、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し、それぞれ AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9 ベクターを調製することができます。また、一部製品については、カナマイシン耐性プラスミド（製品コード 6266/6616/6866/6696）もラインアップしています。

さらに、pAAV-ZsGreen1 One-Vector（製品コード 6263/6264/6265/6267/6268/6269）を使用すると、単一のプラスミドをトランスフェクションするだけで、より簡便に高収量の AAV ベクターを調製することができます。

【 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には、血清型に関わらず、AAV2 由来の ITR が広く用いられています。本製品は、この AAV2 由来の ITR を検出ターゲットとしているため、**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、血清型に関わらず幅広い AAV ベクターの定量が可能です**。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。

【 ITR の二次構造について 】

AAV の ITR には、強固な二次構造や反復配列、高 GC 含量領域が存在し、PCR における標的配列の増幅効率や定量精度に影響を及ぼす可能性があります。*Msp* I による制限酵素処理は、ITR 構造に起因する PCR 阻害の影響を低減するための手法として有用であると考えられます。本製品では、PCR 反応液中で *Msp* I による制限酵素処理を行った後、そのままリアルタイム PCR を行います。

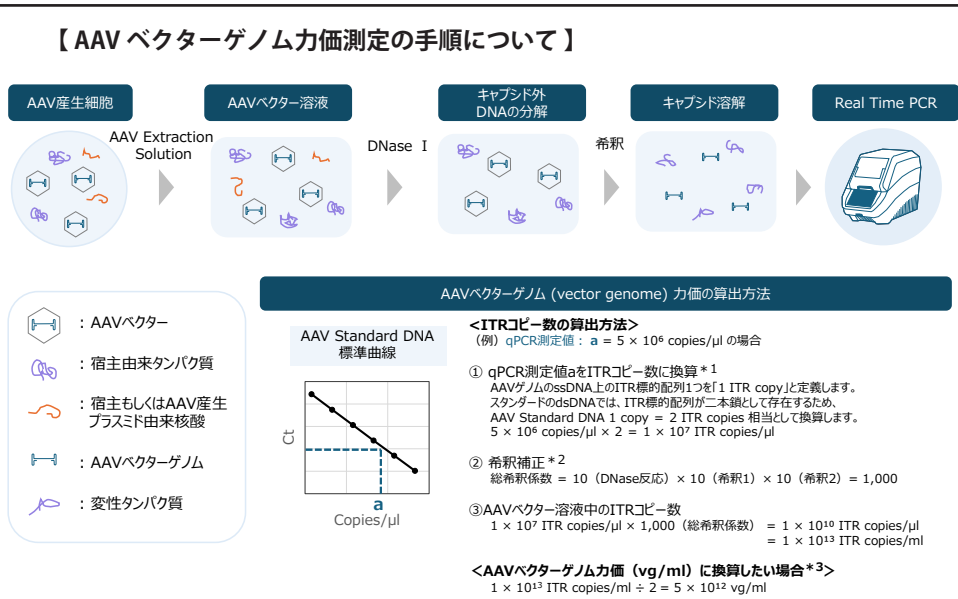


図 1. AAV ベクターゲノム力価測定の手順

＊ 1：標準曲線から算出される a は、AAV Standard DNA の分子数に相当する値であるため、ITR コピー数への換算が必要となります。

＊ 2：本製品では、AAV ベクター溶液は DNase I 反応により 10 倍希釈されます。さらに、その後の希釈操作では 10 倍希釈を 2 回（希釈 1 および希釈 2）行うため、総希釈係数は 1,000 になります。

＊ 3：AAV ゲノム 1 分子あたりに ITR が 2 つ存在する場合、2 ITR copies が 1 vector genome に相当します。本製品では ITR コピー数（ITR copies/ml）に基づいて AAV ベクターゲノム力価（vg/ml）を算出します。

（A）AAV 産生細胞から簡易的な AAV ベクター抽出
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砕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砕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ゲノム力価を測定することができます。

（B）AAV ベクター溶液からの AAV ゲノム抽出
抽出した AAV ベクター溶液には産生細胞由来のタンパク質や核酸、AAV 産生用プラスミド DNA が含まれます。DNase I 反応により不要な核酸を除去した後、希釈し、熱処理によって AAV キャプシドからベクターゲノムを放出させます。

（C）リアルタイム PCR による ITR コピー数の定量
Probe qPCR Mix, with UNG（製品コード RR392S/A）は、抗体を利用したホットスタート PCR 酵素とリアルタイム PCR 用バッファーをそれぞれ改良することにより、PCR 阻害物質に対する高い抵抗性、特異性の高い増幅、高い検出感度を実現しています。また、UNG の働きにより、キャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防止します。さらに、高速 PCR にも適しており、幅広いダイナミックレンジで正確なターゲットの定量、検出を再現性よく行うことができるため、信頼性の高いリアルタイム PCR 解析が可能です。

(D) AAV ベクターゲノム力価 (vg/ml) の算出
本製品では、リアルタイム PCR 法により算出した ITR コピー数に基づいて AAV ベクターゲノム力価 (vg/ml) を算出します。

【 リアルタイム PCR 法 (プローブ法) の原理について 】

本製品では、プローブ検出法 (5′- ヌクレアーゼ法) によりターゲットを検出します。キットには 5′ 側に蛍光物質 (FAM)、3′ 側にクエンチャー物質 (BHQ-1) を修飾したプローブを含みます。PCR 増幅中、プローブはそれぞれの標的遺伝子特異的にハイブリダイズしますが、蛍光はクエンチャーによって抑制されています。伸長反応時、耐熱性 DNA ポリメラーゼの持つ 5′ → 3′ エキソヌクレアーゼ活性により、テンプレートにハイブリダイズしたプローブが分解され、クエンチャーによる抑制が解除されることで発する蛍光を検出する方法です。

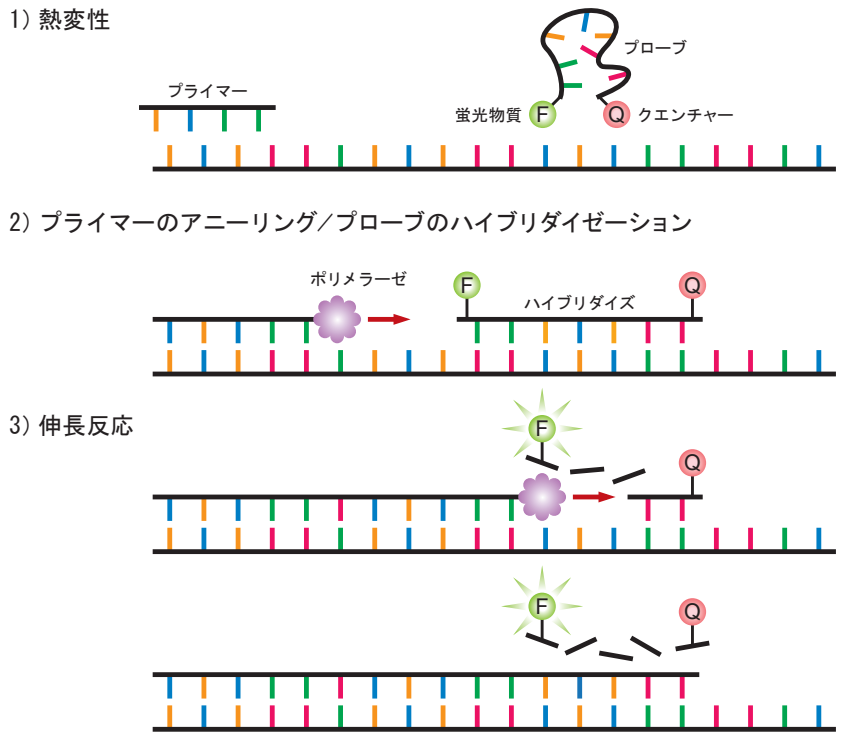


図 2. プローブ法の原理

II. 内容

【 AAV ベクターの抽出 】

AAV Extraction Solution A	1.5 ml × 2
AAV Extraction Solution B	300 µl

【 AAV ゲノム簡易抽出】

Recombinant DNase I (RNase-free)	100 µl
10X DNase I Buffer for AAV Titration	200 µl
Dilution Buffer	1.5 ml × 5

【 Real Time PCR（100 回分、25 µl 反応系 】

Probe qPCR Mix, with UNG	625 µl × 2
ITR Primer/Probe Mix	125 µl
Msp I	50 µl
H_2O*1	1 ml × 3
ROX Reference Dye*2	200 µl
ROX Reference Dye II*2	200 µl
AAV Standard DNA	20 µl

＊1：H_2O 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
- Applied Biosystems 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
- Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System
（ともに Thermo Fisher Scientific 社）

◆ 添加の必要がない機種
- Thermal Cycler Dice® Real Time System IV with PC（製品コード TP1010）
- Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC（製品コード TP970）
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad 社） など

III. 保存

・ AAV Extraction Solution A および B 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。

IV. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）

【試薬】
- 細胞培養に必要な一般的試薬
- 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））

【器具】
- 200 μl、20 μl、10 μl 各マイクロピペット
- マイクロピペット用チップ（疎水性フィルター付）
- 専用反応チューブあるいはプレート

【機器】
- 微量高速遠心機
- ヒートブロック（37℃、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
  - Thermal Cycler Dice Real Time System IV with PC（製品コード TP1010）
  - Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC（製品コード TP970）
  - Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）
  - Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System（Thermo Fisher Scientific 社）
  - Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.2 mL block)（Thermo Fisher Scientific 社）
  - CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad 社） など

V. 操作上の注意

本製品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. 本製品には 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 AAV ゲノム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. Probe qPCR Mix, with UNG は、泡立てないように穏やかに転倒混和し、試薬を均一にしてから使用してください。試薬が完全に混和されていない場合、十分な反応性が得られなくなります。ボルテックスによる混合は行わないでください。なお、保存中に沈殿を生じた場合には、軽く手で温めるか室温にしばらく置いた後、転倒混和することで完全に溶解します。必ず均一に混合してからご使用ください。

3. 融解した試薬はただちに氷上に置いてください。

4. 試薬の調製、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。

5. 万一、サンプルや Primer/Probe Mix が核酸分解酵素（ヌクレアーゼ）の混入により分解されると、正確な検出ができません。実験者の汗や唾液からもヌクレアーゼが混入する可能性がありますので、作業過程ごとにディスポーザブルの手袋およびマスク着用など、操作には細心の注意を払ってください。

6. 本製品に使用している DNA ポリメラーゼはポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95℃（5～）15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。PCR 反応前に鋳型の初期変性を行う場合でも、通常 95℃ 30 秒で十分です。

7. 反応液の調製、検体の調製および検体サンプル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。本製品では反応終了後の増幅産物を電気泳動などで解析する必要はありません。反応後のチューブを開封すると、増幅産物によるコンタミネーションが発生し、後続の試験結果に影響を及ぼす可能性がありますので、取り扱いには十分ご注意ください。

8. リアルタイム PCR 装置の取扱いは、それぞれの装置の取扱説明書に従ってください。解析ソフトウェアの補正機能などが適切でない場合、誤判定の原因になります。必要に応じてリアルタイム PCR 装置の取扱説明書に従い、解析パラメーターの Manual 設定を行ってください。

VI. 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 ベクター抽出工程も含まれています。すでに取得された AAV ベクターのゲノム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 ベクター産生細胞からの 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 AAV ベクターを抽出するプロトコールを示します。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。

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 容量で添加し、よく混合する。
2. 室温で 10 分間静置後、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 × *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：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. 500 µl 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 ～ 14,000 × *g*、4℃で 10 分間遠心する。
   注：回収した AAV ベクターのゲノム力価が低い場合は、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 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、室温、または氷上（2 ～ 8℃）で融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。

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

VI-2. AAV ベクター溶液からの AAV ゲノム抽出

1. 使用直前に、AAV ベクター溶液を室温、または氷上（2～8℃）で融解する。

2. AAV ベクター溶液中の宿主由来ゲノムやプラスミド DNA を DNase I 反応により除去するため、以下の反応液を調製する。

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
AAV ベクター溶液＊1	2.0 μl
10X DNase I Buffer for AAV Titration	2.0 μl
Recombinant DNase I (RNase-free)	1.0 μl
H_2O	15.0 μl
Total	20.0 μl

＊ 1：AAV ベクター溶液は最後に添加してください。

3. ピペッティングにより混合し、スピンダウンする。
注：ボルテックスは避けてください。

4. 37℃で 30 分間反応させた後、4℃で 5 分間以上冷却する。
注：37℃の反応時間を短縮すると宿主由来ゲノムやプラスミド DNA が残留する可能性があります。

5. 4. のサンプルを 100 倍希釈する。以下に段階希釈の例を示す。
注 1：DNase I 反応後のサンプルは 50 倍以上の希釈が必要です。推奨希釈倍率は 100 倍です。

希釈 1：4. の DNase I 反応後サンプル 5 μl ＋ Dilution Buffer 45 μl
希釈 2：希釈 1 溶液 5 μl ＋ Dilution Buffer 45 μl

注 2：Dilution Buffer に添加する前に、サンプルをボルテックスで十分に混合し、スピンダウンしてください。

6. 5. の希釈 2 溶液を 95℃で 10 分間熱処理を行い、キャプシドを変性させることでベクターゲノムを抽出する。その後 4℃で 5 分間以上冷却する。これを鋳型 DNA 溶液としてリアルタイム PCR による定量作業に移る。

VI-3. リアルタイム PCR 反応液の調製と反応開始

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

1. 標準曲線作成用スタンダードサンプルの調製

氷上にて ● AAV Standard DNA を Dilution Buffer で段階希釈し、スタンダードサンプルとする。

1) 以下に従って、各チューブに Dilution Buffer を 45 μl ずつ分注する。

[1] 2×10^8 copies/μl（● AAV Standard DNA 原液 5 μl＋Dilution Buffer 45 μl）
[2] 2×10^7 copies/μl（[1] の 2×10^8 copies/μl 溶液 5 μl＋Dilution Buffer 45 μl）
[3] 2×10^6 copies/μl（[2] の 2×10^7 copies/μl 溶液 5 μl＋Dilution Buffer 45 μl）
[4] 2×10^5 copies/μl（[3] の 2×10^6 copies/μl 溶液 5 μl＋Dilution Buffer 45 μl）
[5] 2×10^4 copies/μl（[4] の 2×10^5 copies/μl 溶液 5 μl＋Dilution Buffer 45 μl）
[6] 2×10^3 copies/μl（[5] の 2×10^4 copies/μl 溶液 5 μl＋Dilution Buffer 45 μl）

2) ● AAV Standard DNA（2×10^9 copies/μl）を 5 μl 分取し、[1] のチューブに加え、1 秒ずつ 5 回ボルテックスして十分に混和し、スピンダウンする。

3) 以降、2）の操作を順次繰り返し、希釈系列とする。

2. リアルタイム PCR 反応液の調製

必要数＋αの反応液をまとめて氷上で調製し、リアルタイム PCR 用チューブまたはプレートに 20 μl ずつ分注する。

【ROX Reference Dye を使用しない場合＊2】

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
Probe qPCR Mix, with UNG	12.5 μl
ITR Primer/Probe Mix	1.25 μl
Msp I	0.5 μl
H_2O	5.75 μl
Total	20.0 μl

＊2：対応機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System IV with PC（製品コード TP1010）
- Thermal Cycler Dice Real Time System III with PC（製品コード TP970）
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad 社）
  など

【ROX Reference Dye を使用する場合＊3】

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、ROX Reference Dye を使用してください。

[1 反応分の反応液]

試薬	使用量
Probe qPCR Mix, with UNG	12.5 μl
ITR Primer/Probe Mix	1.25 μl
Msp I	0.5 μl
ROX Reference Dye or Dye II	0.5 μl
H_2O	5.25 μl
Total	20.0 μl

＊3：対応機種

◆ ROX Reference Dye を添加する機種
- Applied Biosystems 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
- Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System
（ともに Thermo Fisher Scientific 社）

3. 鋳型（DNA 溶液）の添加

1）2. で分注した PCR 反応液に、VI-2. で調製した DNA 溶液やスタンダードサンプルを 5 μl 添加する。陰性コントロールには ㊮ H_2O を 5 μl 添加する。

2）ふたをしっかりと閉めた後、反応チューブをスピンダウンし、室温で 10 分間インキュベーションする。

3）リアルタイム PCR 装置にセットする。

4. リアルタイム PCR 反応の開始

以下の PCR 条件で反応を実施する。

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

※ Thermal Cycler Dice Real Time System III／IV、Applied Biosystems QuantStudio 5 Real-Time PCR System を使用する場合は、Run mode／Ramp speed を Fast に設定してください。

[反応条件]

＜ Hold ＞
95℃　30 秒

＜ PCR：40 サイクル＞
95℃　5 秒
60℃　30 秒（蛍光検出：FAM）

[検出対象と蛍光検出フィルター]

検出対象	蛍光検出フィルター
ITR	FAM

VII. 解析

【 Ct 値（または Cq 値）の算出方法 】

PCR 反応後、使用するリアルタイム PCR 装置の取扱説明書を参照し、Ct 値（または Cq 値）を取得します。Ct 値の算出には大きく 2 通りの方法があり、Crossing Point 法（CP 法）と 2nd Derivative Maximum 法（SDM 法）があります。CP 法とは増幅曲線と閾値（Threshold）の交点から Ct 値を求める方法です。SDM 法は、増幅曲線の二次導関数（2 回微分した曲線）が最大となる位置を Ct 値とする方法です。後者の方法では、閾値の設定により Ct 値が変動することがなく、装置の検出誤差の影響も受けませんので、精度の高い解析が可能です。以上の理由から本製品では SDM 法で Ct 値を算出することを推奨します。ただし、装置によっては Crossing Point 法、2nd Derivative Maximum 法の選択ができないものもありますので、ご留意ください。

【 ITR コピー数（ITR copies/ml）の算出方法 】

ITR の標的配列が 1 つ含まれる AAV Standard DNA は、OD_{260} 値より換算した値で 2×10^9 copies/μl に調製されています。

標準曲線から算出される qPCR 測定値は、AAV Standard DNA の分子数に相当する値であるため、ITR コピー数への換算が必要となります。

以下の手順で ITR コピー数を算出してください。

1. スタンダードサンプルから測定された Ct 値と AAV Standard DNA 濃度（copies/μl）の常用対数（$\log_{10}$）を用いて、標準曲線を作成する。

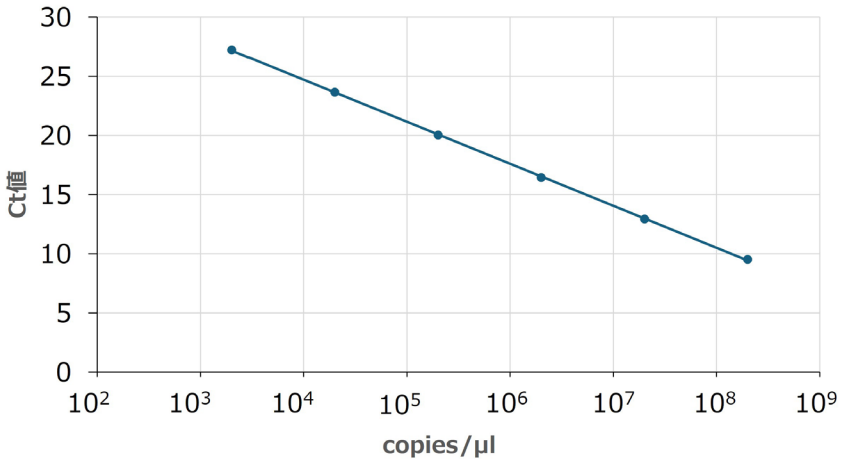


図 3. AAV Standard DNA を用いた標準曲線の例

2. 1. の標準曲線により、各サンプル DNA の Ct 値から AAV Standard DNA の分子数に相当する qPCR 測定値（copies/μl）を求める。

3. 以下の数式により qPCR 測定値を ITR コピー数に換算する。

＜ ITR コピー数（ITR copies/ml）の換算＞
AAV ゲノムと AAV Standard DNA では、PCR 開始時の鋳型状態が異なり、AAV ゲノムは ssDNA、AAV Standard DNA は dsDNA です。本製品では、AAV ゲノムの ssDNA 上の ITR 標的配列 1 つを「1 ITR copy」と定義し、AAV Standard DNA では ITR 標的配列が二本鎖として存在することから、AAV Standard DNA 1 copy ＝ 2 ITR copies 相当として換算します。

ITR コピー数（ITR copies/μl） ＝ qPCR 測定値（copies/μl）× 2

次に、サンプル DNA 調製時の希釈を補正します。
AAV ベクター溶液は DNase I 反応時に 10 倍希釈されその後、10 倍希釈をさらに 2 回行うため、総希釈係数は以下のとおりです。

総希釈係数 ＝10（DNase I 反応時の希釈）×10 × 10 ＝ 1,000

したがって、AAV ベクター溶液中の ITR コピー数は以下の式で算出します。

AAV ベクター溶液中の ITR コピー数（ITR copies/ml）
＝ ITR コピー数（ITR copies/μl）× 1,000（総希釈係数）× 1,000（μl/ml）

[計算例]
qPCR 測定に供したサンプル DNA の qPCR 測定値が 5×10^6 copies/μl と算出された場合

AAV ベクター溶液中の ITR コピー数（ITR copies/ml）
5×10^6 copies/μl × 2（ITR コピー変換）× 1,000（総希釈係数）× 1,000（μl/ml）
$= 1 \times 10^{13}$ ITR copies/ml

＜ AAV ベクターゲノム力価（vg/ml）への換算方法＞
AAV ゲノム 1 分子あたりに ITR が 2 つ存在する場合、2 ITR copies が 1 vector genome に相当します。したがって、AAV ベクターゲノム力価（vg/ml）は、以下の式で換算できます。

vg/ml ＝ ITR コピー数（ITR copies/ml）÷ 2

[計算例]
1×10^{13} ITR copies/ml ÷ 2 ＝ 5×10^{12} vg/ml

VIII. 関連製品

AAVpro® Extraction Solution（製品コード 6235）
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 (AAV8)（製品コード 6680）
AAVpro® Helper Free System (AAV9)（製品コード 6690）
pAAV-ZsGreen1 Vector（製品コード 6231）
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）
AAVpro® Packaging Plasmid (AAV8)（製品コード 6681）
AAVpro® Packaging Plasmid (AAV9)（製品コード 6691）
AAVpro® Packaging Plasmid (AAV2) (KmR)（製品コード 6266）
AAVpro® Packaging Plasmid (AAV6) (KmR)（製品コード 6616）
AAVpro® Packaging Plasmid (AAV8) (KmR)（製品コード 6866）
AAVpro® Packaging Plasmid (AAV9) (KmR)（製品コード 6696）
pAAV-ZsGreen1 Vector (KmR)（製品コード 6610）
pAAV1-ZsGreen1 One-Vector（製品コード 6263）
pAAV2-ZsGreen1 One-Vector（製品コード 6264）
pAAV5-ZsGreen1 One-Vector（製品コード 6265）
pAAV6-ZsGreen1 One-Vector（製品コード 6267）
pAAV8-ZsGreen1 One-Vector（製品コード 6268）
pAAV9-ZsGreen1 One-Vector（製品コード 6269）
AAVpro® 293T Cell Line（製品コード 632273）
AAVpro® Purification Kit (AAV2)（製品コード 6232）
AAVpro® Purification Kit Maxi (All Serotypes)（製品コード 6666）
AAVpro® Purification Kit Midi (All Serotypes)（製品コード 6675）
AAVpro® Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes)（製品コード 6676）
AAVpro® Cell & Sup. Extraction/Concentration Pack Maxi (All Serotypes)（製品コード 6677）
AAVpro® Purification Pack Maxi (All Serotypes)（製品コード 6678）
AAVpro® Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes)（製品コード 6679）
AAVpro® Concentrator（製品コード 6674）
AAV-X™ Packaging Single Shots (AAV2)（製品コード 631490）
AAV-X™ Packaging Single Shots (AAV8)（製品コード 631491）
AAV-X™ Packaging Single Shots (AAV9)（製品コード 631492）
AAV2 Rapid Titer ELISA Kit (Single Wash)（製品コード 631485）
AAV8 Rapid Titer ELISA Kit (Single Wash)（製品コード 631486）
AAV9 Rapid Titer ELISA Kit (Single Wash)（製品コード 631487）
AAV-X™ GoStix™ Plus (AAV2)（製品コード 631493）
AAV-X™ GoStix™ Plus (AAV8)（製品コード 631494）
AAV-X™ GoStix™ Plus (AAV9)（製品コード 631495）

IX. 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、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。AAV-X、GoStix 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、ご了承の上ご使用ください。

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

v202611w