

研究用

TAKARA

**AAVpro[®] Purification Kit Maxi
(All Serotypes)**

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 を超える血清型が存在しており、血清型の違いによって種々の組織／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。AAV ベクターを用いて動物個体へ遺伝子導入を行う際は、ウイルス産生細胞や培地由来の不純物を除去し、高純度に精製したウイルスベクターを使用する必要があります。また、培養細胞へ遺伝子導入を行う際にも、精製した AAV ベクターを使用することで、前記不純物の影響をなくすることができます。

II. 製品説明

動物個体や培養細胞に安定して効果的な遺伝子導入を実現させるには、使用する AAV ベクターの純度、力価が大切な要素になります。AAV ベクターの精製は、CsCl 濃度勾配超遠心法や iodixanol 超遠心法などが一般的ですが、これらの方法には熟練した技術が必要であり、精製工程にかかる時間、回収率などに課題があります。

AAVpro Purification Kit Maxi (All Serotypes) は、約 4 時間で AAV ベクター産生細胞から AAV ベクターを簡便に精製できるキットです。

本製品の特長

- ・さまざまなセロタイプに適用
- ・高精製度、高回収率
- ・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 (特許出願中)
- ・独自の AAV ベクター精製法により単純操作で夾雑物を効率よく除去 (特許出願中)
- ・超遠心分離などの煩雑な工程は不要
- ・ベクター産生細胞から AAV ベクターを精製するのに必要なすべてのバッファーを付属

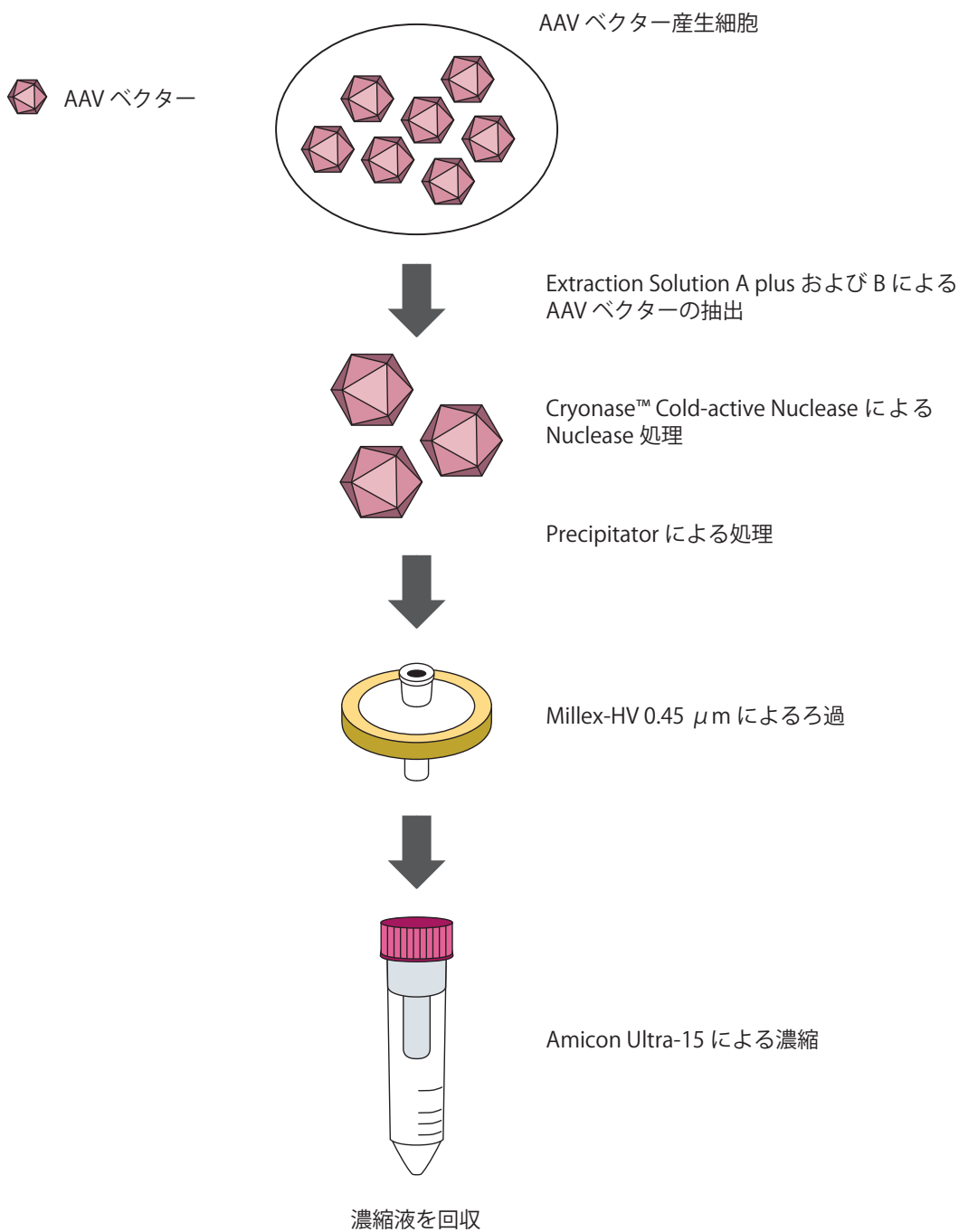


図 1. AAVpro Purification Kit Maxi (All Serotypes) を使用した AAV ベクター精製工程の概略

III. キットの内容

本製品には、T225 フラスコ 5 本相当の産生細胞から AAV ベクターを精製するために必要なバッファー、濃縮カラムが 4 回分が含まれています。

1.	AAV Extraction Solution A plus	22 ml × 2
2.	AAV Extraction Solution B	4.5 ml
3.	Precipitator A*	5 ml
4.	Precipitator B	2.5 ml
5.	Millex-HV 0.45 μm	4 個
6.	Amicon Ultra-15, 100 kDa	4 本
7.	Suspension Buffer	60 ml × 2
8.	Cryonase Cold-active Nuclease	500 μl

* : Precipitator A は低温保存により白色沈殿物が生じることがありますが、品質、性能には問題ありません。沈殿が生じた場合は、37℃で温めて完全に溶解させてから使用してください。

IV. 保存

Cryonase Cold-active Nuclease	− 20℃
その他のコンポーネント	室温

V. キット以外の器具・試薬（主なもの）

【器具】

- ・細胞培養に必要な一般的設備
- ・シリンジ

【試薬】

- ・ 0.5 M EDTA (pH8.0) (EDTA Buffer Powder, pH8.0 (製品コード T9191))

VI. 実験操作

下記に T225 フラスコ 5 本で調製した AAV ベクターを精製するプロトコールを示します。AAV ベクター産生細胞の調製には、AAVpro Helper Free System (製品コード 6230、6650 ~ 6663) の使用を推奨します。

VI-1. AAV ベクター抽出液の調製

本キットでは、AAV ベクター産生細胞からのベクター抽出に一般的に行われている凍結融解法や超音波破碎法は行わず、独自に開発した AAV Extraction Solution A plus および AAV Extraction Solution B を使用します。この溶液を使用することで、宿主由来のタンパク質や核酸の混入を抑え、簡便に AAV ベクターを抽出することができます。

1. AAV ベクター産生細胞を含む培養液に、0.5 M EDTA (pH8.0) を 1/80 容量添加し、よく混合する。
2. 室温で 10 分間反応後、細胞を剥離させ、回収する。
3. 1,700 ~ 2,000 × g、4°C で 10 分間遠心後、上清を除去する。
4. 再度、1,700 ~ 2,000 × g、4°C で 1 分間遠心し、完全に上清を除去する。
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ください。
5. 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。
6. 10 ml の AAV Extraction Solution A plus を添加する。
7. ボルテックスで 15 秒間懸濁する。
注：細胞の塊がないことを確認し、細胞の塊がある場合は、なくなるまで懸濁してください。
8. 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。
9. 4,000 ~ 9,000 × g、4°C で 10 分間遠心する。
注：上記 7. ~ 9. 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。
10. 上清を新しい滅菌済み遠心チューブに、なるべく不純物の混入がないようピペットなどを用いて回収し、AAV Extraction Solution B を上清の 1/10 量添加する。
注 1：この時点で - 80°C で保存することができます。保存しない場合は速やかに VI-2-1. へ進んでください。- 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。
- 80°C で保存する際は、凍結に耐性があり、その後の遠心操作に耐えるチューブをご使用ください。
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。

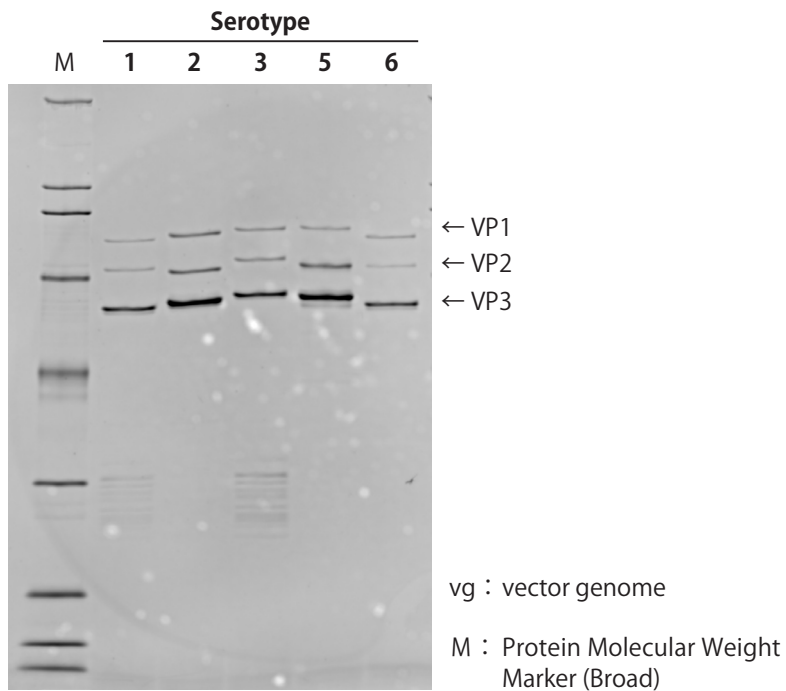
VI-2. AAV ベクターの精製、濃縮

VI-2-5、VI-2-6、VI-2-7. ではスイングローターを使用してください。

1. VI-1-10. で得られた溶液に、Cryonase Cold-active Nuclease を 1/100 量 (終濃度 200 U/ml) 添加し、37°C で 1 時間反応させる。
2. VI-2-1. の溶液に Precipitator A を 1/10 量添加し、ボルテックスで 10 秒間混和後、37°C で 30 分間反応させ、再度ボルテックスで 10 秒間混和する。
注 1：Precipitator A は低温保存により白色沈殿物が生じることがありますが、品質、性能には問題ありません。この場合は、37°C で温めて完全に溶解させてから使用してください。
注 2：反応中に沈殿物が生じることがありますが問題ありません。そのまま次のステップに進んでください。
3. VI-2-2. の溶液に 1/20 量の Precipitator B を添加し、速やかにボルテックスで 10 秒間混和し、5,000 ~ 9,000 × *g*、4°C で 5 分間遠心する。
注：Precipitator B 添加後に沈殿物が生じますが問題ありません。そのまま遠心操作に進んでください。
4. 上清を Millex-HV 0.45 μm を用いてろ過する。
5. VI-2-4. でろ過した AAV ベクター溶液を Amicon Ultra-15, 100 kDa に添加し、2,000 × *g*、15°C で 5 分間遠心し、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：AAV ベクター溶液が 1.5 ml 以下になっていない場合は、VI-2-5. の遠心操作を繰り返し実施する。
6. ろ液を除去後、5 ml の Suspension Buffer をカップ内に添加し、ピペッティングで溶液を均一化し、2,000 × *g*、15°C で 5 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：AAV ベクター溶液が 1.5 ml 以下になっていない場合は、VI-2-6. の遠心操作を繰り返し実施する。
7. VI-2-6. の操作を 4 回 (total 5 回) 繰り返し、最終的に任意の容量まで濃縮する。
8. ろ液を除去後、ボルテックスで 30 秒間、もしくはピペッ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。

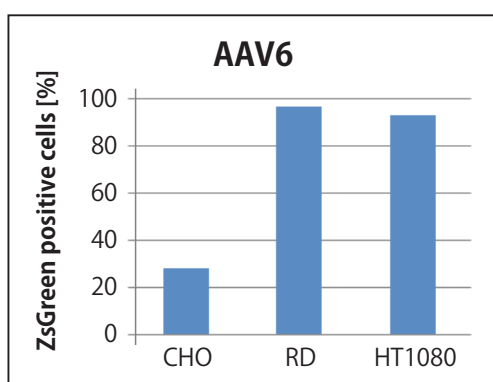
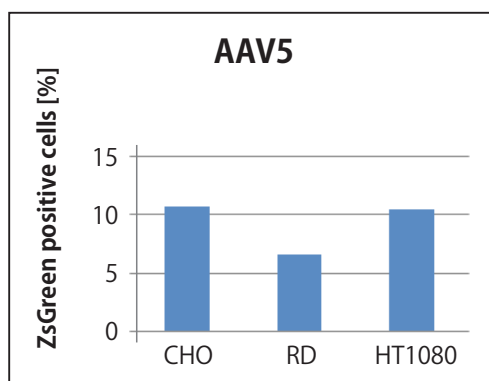
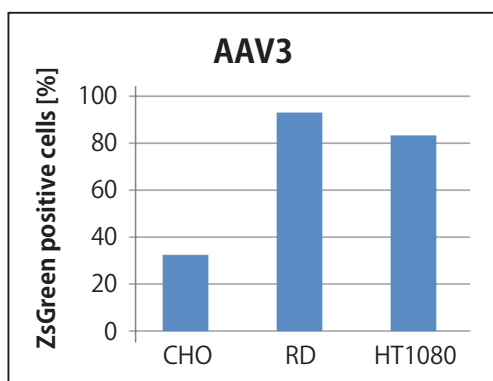
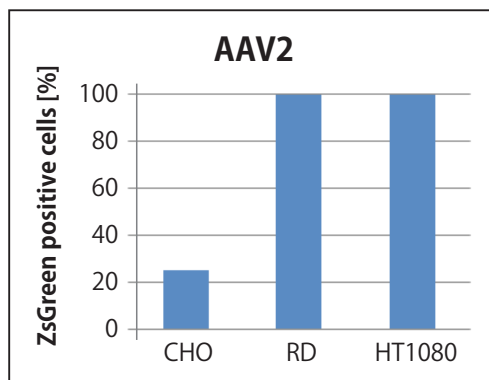
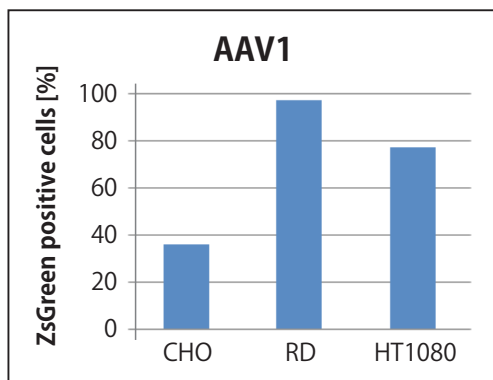
VII. 参考データ 1：精製後の各セロタイプの純度測定

T225 フラスコ 5 本で調製した蛍光タンパク質 ZsGreen1 を搭載する各セロタイプの AAV ベクター産生細胞から、本キットを用いて AAV ベクターを精製した。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、 1×10^9 vg/lane で SDS-PAGE に供じた。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。



VIII. 参考データ 2：精製 AAV ベクターの感染能評価

VII. 参考データ 1 で取得した各セロタイプの AAV ベクターを用いて、各細胞株への感染力価を評価した。精製した AAV ベクターは 5,000 vg/cell (セロタイプ 1、2、3、6)、もしくは 50,000 vg/cell (セロタイプ 5) 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。本キットで精製した AAV ベクターは感染能を保持していることが確認できた。



IX. 関連製品

EDTA Buffer Powder, pH8.0 (製品コード T9191)
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 (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 (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 (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 (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)
pAAV-ZsGreen1 Vector (製品コード 6231)
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® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (製品コード 6233)

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。Cryonase 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 <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社