

製品コード 6676～6678

研究用

Takara

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)

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 Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes) は、AAV ベクター産生細胞とその培養上清中に産生された AAV ベクターを簡便に約 7 時間で精製できるキットです。

本製品の特長

- AAV 産生細胞と培養上清の両方から同時に高精製度、高回収率な AAV ベクターの精製が可能
- ささまざまなセロタイプに適用可能
- 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
- 超遠心分離などの煩雑な工程は不要
- AAV ベクターを精製するのに必要なすべてのバッファーが付属

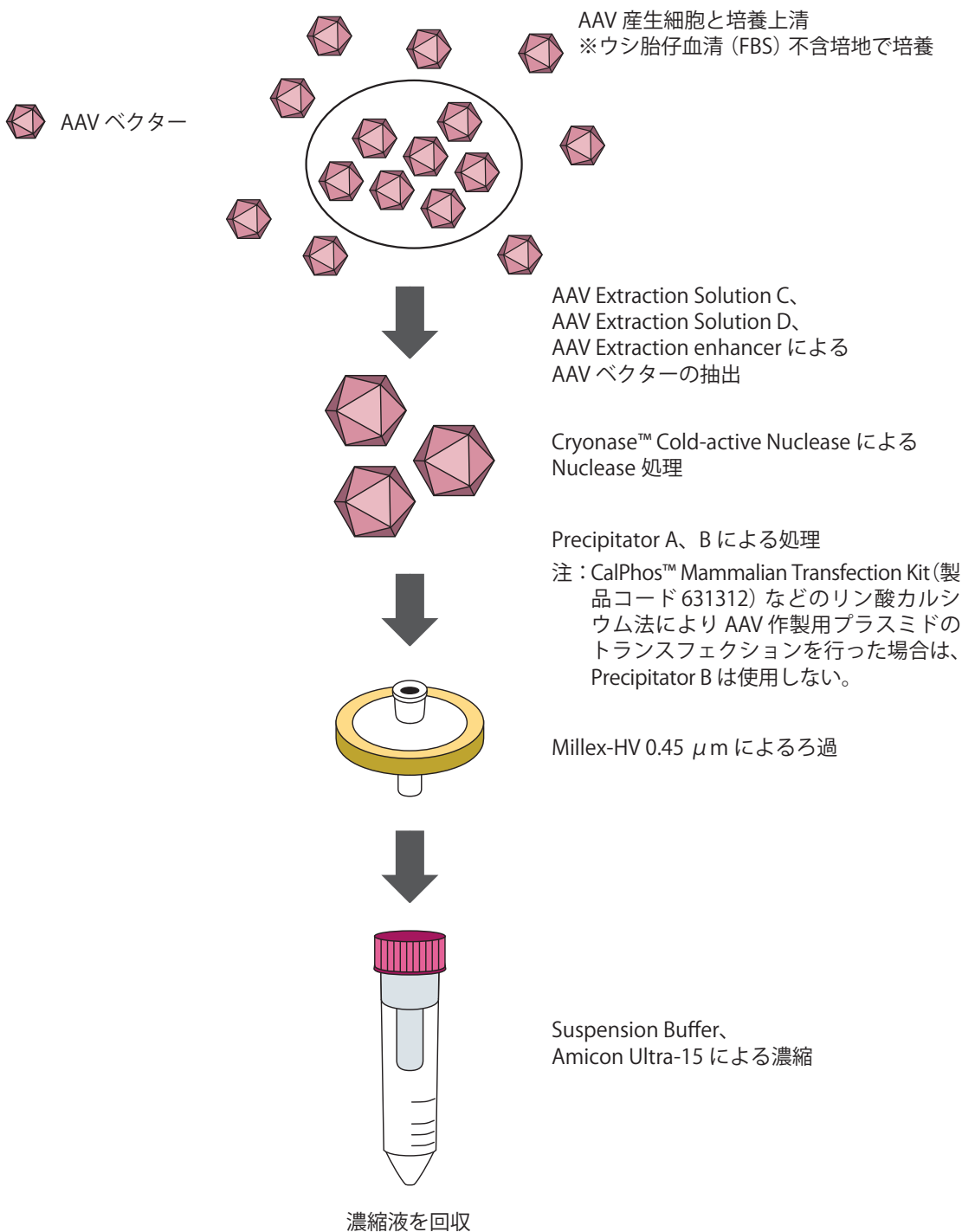


図 1. AAVpro Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes) を使用した AAV ベクター精製工程の概略

III. 内容

- AAVpro Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes) (製品コード 6676) は、AAVpro Cell & Sup. Extraction/Concentration Pack Maxi (All Serotypes) (製品コード 6677) と AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (製品コード 6678) で構成されています。
本キットには、T225 フラスコ 5 本相当の AAV 産生細胞と培養上清から AAV ベクターの精製に必要なバッファー、濃縮カラムが 4 回含まれています。
- 製品コード 6677 および 6678 は単品でも販売しています。

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 Cell & Sup. Extraction/Concentration Pack Maxi (All Serotypes) (製品コード 6677)

AAV Extraction Solution C	8 ml
AAV Extraction Solution D	32 ml
AAV Extraction enhancer	80 ml
Concentrating solution* ¹	115 ml × 2
Dissolving solution	50 ml

AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (製品コード 6678)

Precipitator A* ²	5 ml
Precipitator B	2.5 ml
Millex-HV 0.45 μm	4 個
Amicon Ultra-15, 100 kDa	4 本
Suspension Buffer	60 ml × 2
Cryonase Cold-active Nuclease	500 μl

* 1 : Concentrating solution は低温保存により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、40℃で温めて完全に溶解させてから使用してください。

* 2 : 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

AAVpro Cell & Sup. Extraction/Concentration Pack Maxi (All Serotypes) (製品コード 6677)

Concentrating solution	4℃
その他のコンポーネント	室温

AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (製品コード 6678)

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

V. キット以外に必要な器具 (主なもの)

- 細胞培養に必要な一般的設備
- シリンジ

VI. 使用上の注意

AAV Extraction Solution C の原料の一部が、化学物質把握管理促進法 (PRTR 法) 第 1 種指定化学物質 (法第 2 条第 2 項、令第 1 条別表第 1) に指定されています。添付の安全データシート (SDS) をご参照のうえ、取扱いには十分にご注意ください。

※ 実験後の廃液は該当物質の終濃度が化学物質把握管理促進法 (PRTR 法) に指定されている基準値以下になるため、そのまま廃棄していただいて問題ありません。

※ 原液を処分される際は、最低でも 20 倍以上の水で希釈して廃棄ください。

VII. 実験操作

下記に T225 フラスコ 5 本 (フラスコあたり培養液量 40 ml) 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。

VII-1. 操作上の注意点

- AAV ベクター作製用プラスミドの細胞へのトランスフェクションには、*TransIT-VirusGEN* Transfection Reagent (製品コード MIR6700、MIR6703～MIR6706)、*TransIT-293* Transfection Reagent (製品コード MIR2700、MIR2704～MIR2706)、*CalPhos Mammalian Transfection Kit* (製品コード 631312) などの使用をお勧めします。

それ以外のトランスフェクション試薬 (PEI など) を使用する場合は、予備検討にて使用の可否をご確認ください。

なお、*CalPhos Mammalian Transfection Kit* (製品コード 631312) などのリン酸カルシウム法により AAV 作製用プラスミドのトランスフェクションを行った場合、「VII-3. AAV の精製、濃縮」の実験操作は、必ず *Precipitator B* による処理のステップ (VII-3-3. および VII-3-4.) をスキップして実施してください。

- AAV ベクターの抽出、精製に用いる AAV 産生細胞およびその培養上清は、AAV ベクター作製用プラスミドベクターをトランスフェクション後、ウシ胎仔血清 (FBS) を含まない培地 (DMEM など) で 3～5 日間培養したものをご使用ください (血清含有培地を用いるとウイルスの精製効率が低下するため避けてください)。
- AAV ベクターの作製には、*AAVpro Helper Free System* (製品コード 6230、6650～6663、6668～6671、6673) の使用をお勧めします。ただし、トランスフェクション後は、FBS 不含の DMEM を用いて 3～5 日培養してください。
- AAV ベクターの濃縮工程 (VII-3-7. 以降) で AAV ベクターを過度に濃縮すると不溶化する場合があります。遠心により濃縮しすぎないように注意しながら操作を行ってください。
- 精製前のウイルス産生量を調べたい場合は、AAV ベクター抽出液 (VII-2-4. の上清) の一部を保存することをお勧めします。*AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2* (製品コード 6233) を用いて、AAV ベクターの力価を測定することができます。

VII-2. AAV ベクター抽出液の調製

本キットを用いた AAV ベクター産生細胞からの AAV ベクター抽出液の調製は、一般的に行われている凍結融解法や超音波破碎法による細胞の破碎は行わず、AAV 産生細胞と培養液を含む培養容器に、AAV Extraction Solution C、AAV Extraction Solution D および AAV Extraction enhancer を直接添加して行います。そのため、Concentrating solution を用いた AAV ベクター抽出液の濃縮では、AAV 産生細胞から抽出された AAV ベクターに加え、AAV 産生細胞から培養液中に放出された AAV ベクターも同時に回収されます。

1. AAV ベクター産生細胞と培養液 (40 ml) を含む T225 フラスコに、直接 AAV Extraction Solution C を 1/100 容量 (0.4 ml)、AAV Extraction Solution D を 1/25 容量 (1.6 ml) 添加し、軽く混合した後、室温で 10 分間静置する。
2. さらに AAV Extraction enhancer を 1/10 量 (4 ml) 添加し、軽く混合する。
3. 室温で 30 分間静置した後、細胞塊を含む全量を遠心チューブに移す。
4. $2,000 \times g$ 、 4°C で 10 分間遠心し、上清を回収する。
注 1：容量の大きな遠心機がない場合は、VII-2-5. に進む前に遠心可能な容量の遠心管に分けてください。
注 2：ウイルス産生量を調べたい場合は、上清の一部を保存することをお勧めします。AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (製品コード 6233) を用いて AAV ベクターの力価測定が可能です。
5. VII-2-4. で得られた上清の 1/4 容量の Concentrating solution を添加して、十分懸濁した後、 4°C で 2 ~ 3 時間静置する。
注：静置時間は 2 ~ 3 時間をお勧めしますが、一晩静置することも可能です。
6. $2,000 \times g$ 、 4°C で 10 分間遠心し、上清を除去する。
7. 再度遠心し、完全に上清を除去する。
8. VII-2-4. で得られた上清の 1/20 容量の Dissolving solution を添加し、ピペットを用いて沈殿を懸濁する。
注：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。細胞塊が残っている場合は、細胞塊がなくなるまで十分に懸濁してください。
9. 室温で 15 分間静置後、さらに 15 秒間ボルテックスして懸濁する。
10. $2,000 \times g$ 、 4°C で 10 分間遠心する。
11. ピペットなどを用いて上清を新しい滅菌済み遠心チューブに回収する。
注：なるべく不純物の混入がないように注意しながら回収してください。

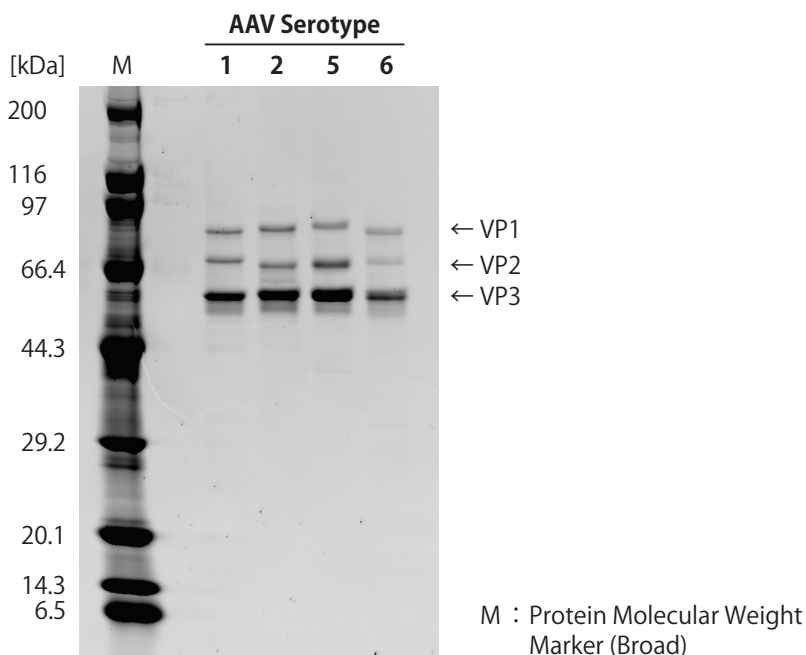
VII-3. AAV ベクターの精製、濃縮

VII-3-7.、VII-3-8.、VII-3-9. ではスイングローターを使用してください。

1. VII-2-11. 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、1 時間反応させる。
2. VII-3-1. の溶液に Precipitator A を 1/10 量添加し、ボルテックスで 10 秒間混和する。
注 1：CalPhos Mammalian Transfection Kit (製品コード 631312) などのリン酸カルシウム法により AAV 作製用プラスミドのトランスフェクションを行った場合は、VII-3-3. および VII-3-4. を行わず、VII-3-5. に進んでください。
注 2：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°C で温めて完全に溶解させてから使用してください。
注 3：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. VII-3-2. の溶液を 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。
4. VII-3-3. 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 秒間混和する。
5. 5,000 ~ 9,000 × g、4°C で 5 分間遠心後、上清を回収する。
注：回収した上清中に沈殿物が含まれる場合は、再度遠心を行い、沈殿物をなるべく除去してください。
6. 上清を Millex-HV 0.45 μm を用いてろ過する。
7. VII-3-6. 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 ベクター溶液の 1.5 ml 程度になったことを確認する。
注 1：AAV ベクター溶液の過度な濃縮を防ぐために、まず、短時間の遠心操作 (1 ~ 2 分程度) を行い、AAV ベクター溶液の濃縮度合を確認した上で、遠心速度や時間を調整してください。
注 2：AAV ベクター溶液が 1.5 ml 程度になっていない場合は、遠心操作を繰り返し実施してください。
8. ろ液を除去後、5 ml の Suspension Buffer をカップ内に添加し、ピペ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 程度になっていない場合は、遠心操作を繰り返し実施してください。
9. VII-3-8. の操作を 4 回 (全 5 回) 繰り返し、最終的に任意の量まで濃縮する。
注：濃縮しすぎると AAV ベクターが不溶化する可能性があります。適宜遠心を止め、不溶化していないかピペティング等で確認しながら濃縮遠心操作を行ってください。
10. ろ液を除去後、ボルテックスで 30 秒間、もしくはピペティングで十分に懸濁し、Amicon Ultra-15, 100 kDa 内の AAV ベクター溶液をチューブに回収する。
注：得られた AAV ベクター溶液は凍結融解の繰り返しを避けるために必要に応じて分注し、- 80°C で保存することをお勧めします。

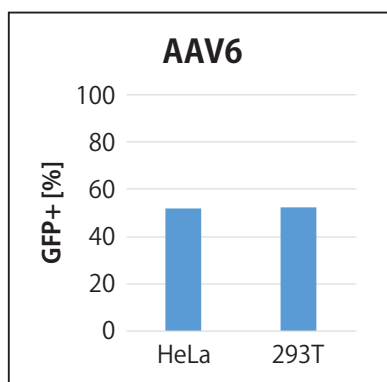
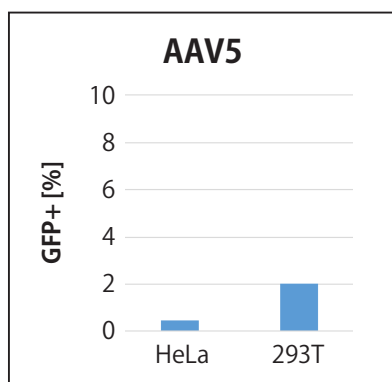
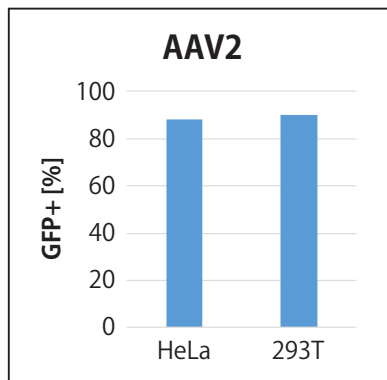
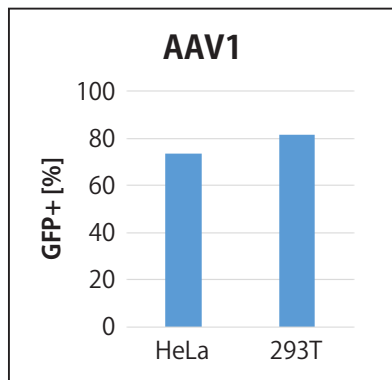
VIII. 参考データ 1：精製後の各セロタイプの純度測定

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 ベクター産生細胞とその培養上清から、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 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。



IX. 参考データ 2：精製 AAV ベクターの感染能評価

「VIII. 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 50,000 vg/cell 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。



X. 関連製品

[AAV ベクターのパッケージング用 DNA プラスミド]

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 (AAV1-CRE Recombinase) (製品コード 6668)
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 (AAV1-LacZ) (製品コード 6669)
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 (AAV1-U6-ZsGreen1) (製品コード 6670)
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 (AAV1-2xU6) (製品コード 6671)
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 (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)

[AAV ベクター作製用プラスミドのトランスフェクション]

TransIT-VirusGEN Transfection Reagent (製品コード MIR6700、MIR6703 ~ MIR6706)
TransIT-293 Transfection Reagent (製品コード MIR2700、MIR2704 ~ MIR2706)
CalPhos[™] Mammalian Transfection Kit (製品コード 631312)

[AAV ベクター作製用細胞]

AAVpro[®] 293T Cell Line (製品コード 632273)

[AAV ベクターの抽出・精製]

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[®] Extraction Solution (製品コード 6235)
AAVpro[®] Concentrator (製品コード 6674)
AAVpro[®] Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes) (製品コード 6679)

[AAV ベクターの力価測定]

AAVpro[®] Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (製品コード 6233)

XI. 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、CalPhos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