

製品コード 6679

研究用

TAKARA

**AAVpro[®] Freeze-Thaw Extraction Buffer
(All Serotypes)**

説明書

v202103Da

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

本製品は、AAV ベクター産生細胞 (生細胞および凍結細胞) から凍結融解法を用いて AAV ベクターを抽出するための細胞懸濁液です (特許出願中)。

本製品を用いて AAV ベクター産生細胞を懸濁することで、1 回の凍結融解操作のみで、さまざまな血清型の AAV ベクターを効率よく抽出することができます。

AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (製品コード 6678) と組み合わせて使用することで、超遠心分離などの煩雑な工程を行うことなく、約 4 時間で AAV ベクター産生細胞からの AAV ベクターの精製と濃縮が可能です。

III. 内容

AAVpro Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes) 20 ml × 2

IV. 保存

− 20℃

V. キット以外に必要な試薬・器具 (主なもの)

【試薬】

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

【器具】

- ・ 細胞培養に必要な一般的設備
- ・ 滅菌済み遠心チューブ

VI. 実験操作

下記に T225 フラスコ 5 本で調製した AAV ベクターを抽出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、6668 ~ 6671、6673) の使用を推奨します。

【 AAV ベクター抽出液の調製 】

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、滅菌済み遠心チューブに回収する。
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 分間遠心後、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から次の工程に進んでください。
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 AAVpro Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes) を添加する。
7. ボルテックスで 15 秒間懸濁する。
注：細胞ペレットを十分にほぐしてください。
8. - 80°C フリーザーに 10 ~ 20 分程度、または、ドライアイス - エタノールに 5 ~ 10 分程度置き、細胞懸濁液を完全に凍結させる。
9. 37°C のウォーターバス、または、インキュベーターに 5 ~ 10 分程度置き、細胞懸濁液を完全に融解させる。
10. ボルテックスで 15 秒間懸濁する。
11. 9,000 × *g*、4°C で 10 分間遠心する。
12. AAV ベクターを含む上清 (AAV ベクター抽出液) 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する。
注 1：AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (製品コード 6678) を用いることにより、得られた抽出液から AAV ベクターを精製可能です。プロトコールの詳細については、「VII. AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) による抽出液からの AAV ベクターの精製」をご参照ください。
注 2：この時点で - 80°C で保存することができます。- 80°C で保存する場合は、凍結に耐性があり、その後の遠心操作に耐えうるチューブをご使用ください。使用する際は、37°C の恒温槽で速やかに融解してください。
注 3：抽出した AAV ベクターのタイター測定には、AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (製品コード 6233) が使用可能です。

VII. 抽出液からの AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) による AAV ベクターの精製

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

*を付した試薬は、AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (製品コード 6678) のコンポーネントです。

1. VI-12. 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. VII-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。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 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. VII-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、9,000 × g、4°C で 5 分間遠心後、上清を回収する。

注 1: 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。

注 2: AAVpro Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes) (製品コード 6676) の遠心操作とは異なります。
4. 上清を Millex-HV 0.45 μm* を用いてろ過する。
5. VII-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 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。
6. 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。

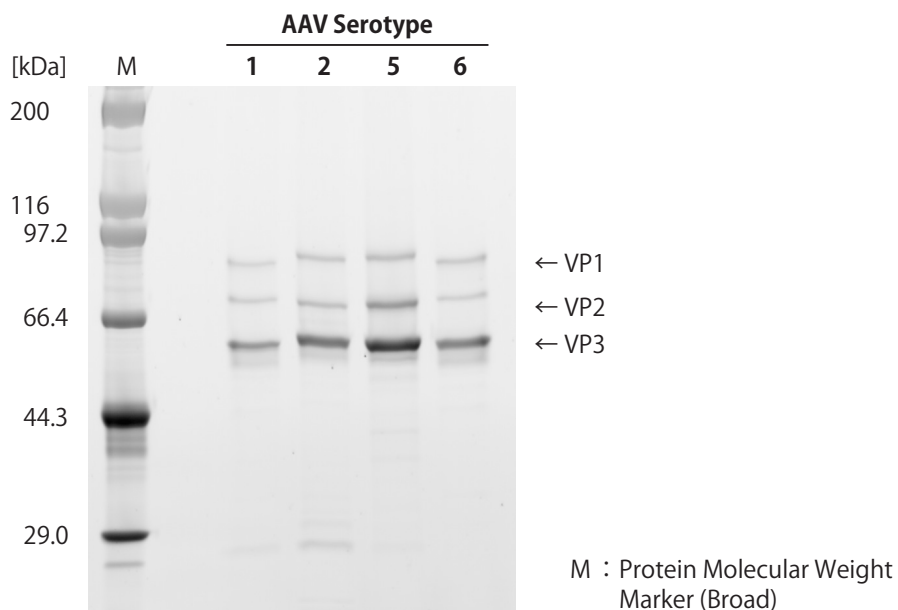
注: AAV ベクター溶液が 1.5 ml 程度になっていない場合は、遠心操作を繰り返し実施してください。
7. VII-6. の操作を 4 回 (全 5 回) 繰り返し、最終的に任意の量まで濃縮する。

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。
8. 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。

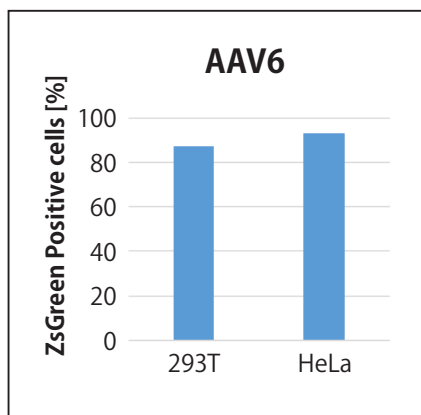
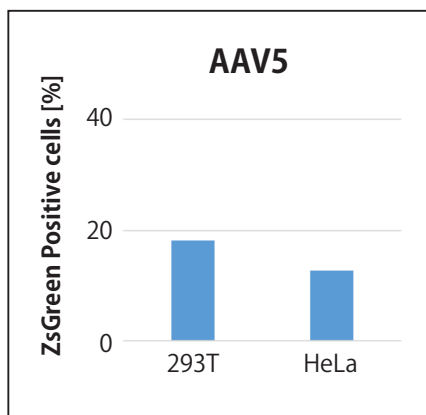
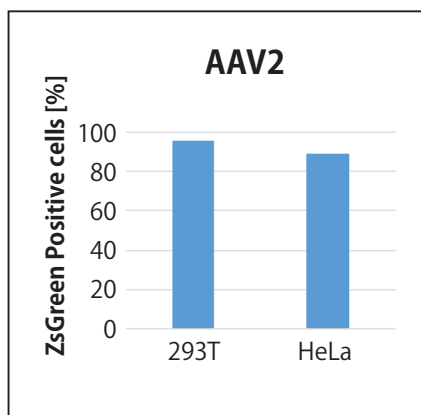
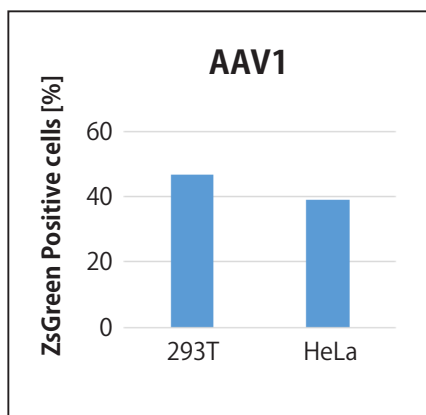
VIII. 参考データ 1：精製後の AAV ベクター（各血清型）の純度測定
(AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (製品コード 6678) と組み合わせて使用した場合)

本製品を用いて、蛍光タンパク質 ZsGreen1 を搭載する各血清型 (AAV1、AAV2、AAV5、AAV6) の AAV ベクター産生細胞から AAV ベクターを抽出し、抽出した AAV ベクターを AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (製品コード 6678) を用いて精製した。精製後の AAV ベクターは、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。



**IX. 参考データ 2：精製後の AAV ベクター（各血清型）の感染能評価
（AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes)（製品コード 6678）と組み合わせて使用した場合）**

「VIII. 参考データ 1」で取得した各血清型の AAV ベクターを用いて、293T 細胞と HeLa 細胞への感染力価を評価した。精製した AAV ベクターは 10,000 vg/cell (AAV1、AAV2)、もしくは 100,000 vg/cell (AAV5、AAV6) 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。本製品で抽出し、AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes)（製品コード 6678）を用いて精製した 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 ベクターの作製キット]

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)

[蛍光タンパク質搭載 AAV ベクタープラスミド]

pAAV-ZsGreen1 Vector (製品コード 6231)

[AAV ベクターのパッケージング用 DNA プラスミド]

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 ベクター作製用細胞へのプラスミド DNA トランスフェクション]

TransIT-VirusGEN Transfection Reagent (製品コード 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[®] 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)

[AAV ベクターの培養上清・溶液からの濃縮]

AAVpro[®] Concentrator (製品コード 6674)

[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