

アデノ随伴ウイルスベクターを用いる 遺伝子導入

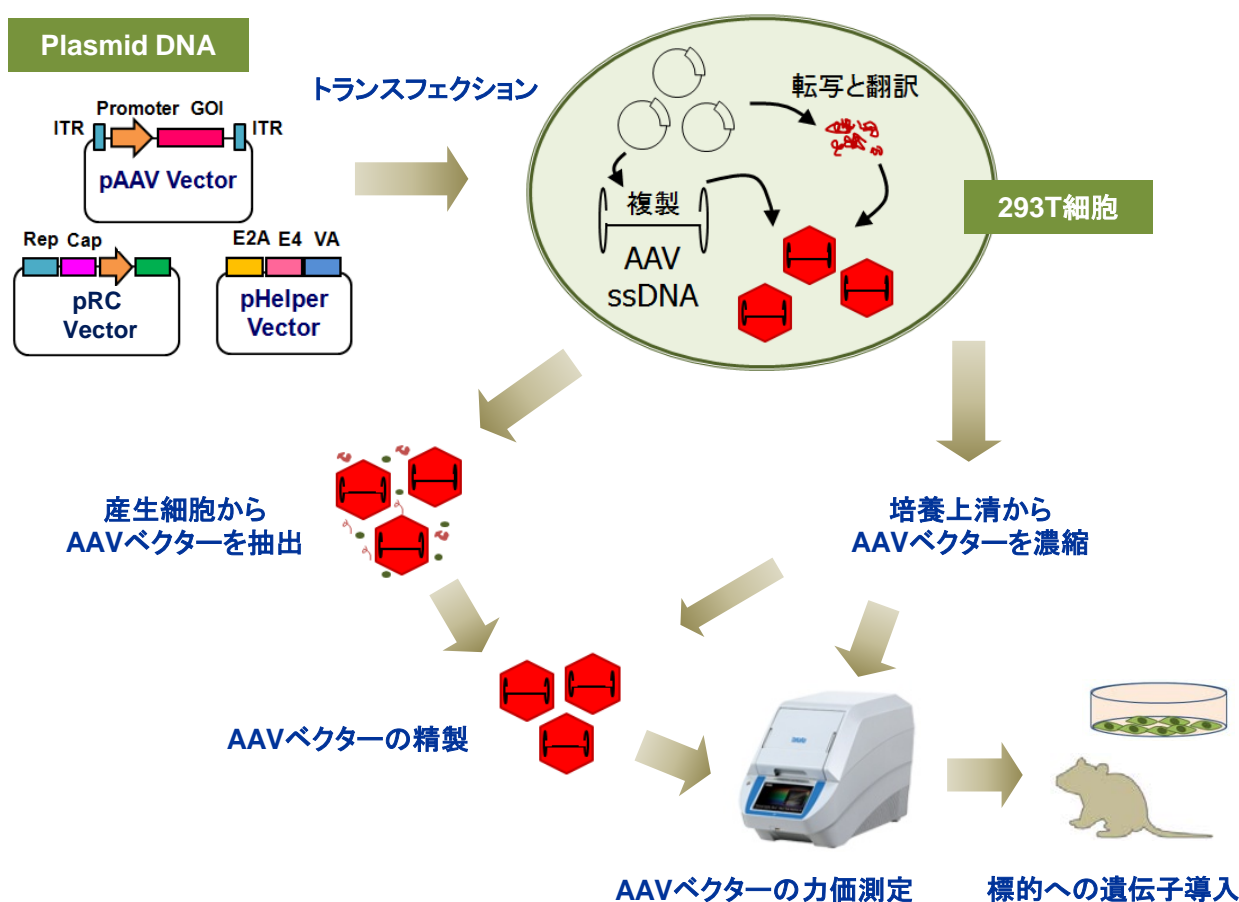
＝製品ガイド 2016年6月改訂版＝

アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの特長

- ★P1レベルの施設で取扱いが可能
- ★増殖／非増殖のいずれの細胞にも遺伝子導入が可能
- ★長期間の発現が可能(非分裂細胞の場合)
- ★免疫原性が低く、動物個体への遺伝子導入にも最適
- ★血清型の組織指向性を利用して標的組織に効率よく遺伝子導入



アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター調製の流れ



アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの特長と各種製品の概要



Adeno-Associated Virus

アデノ随伴ウイルス(Adeno-Associated Virus: 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存在下で増殖する非エンベロープウイルスです。AAVベクターは**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べて安全で取扱いが容易です。**分裂細胞／非分裂細胞を問わず遺伝子導入ができ**、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**にも適しています。非常に安定なウイルスであり、精製操作も簡便に行うことができます。

AAVは**血清型(セロタイプ)の違いによって宿主域やウイルスの持つ特徴が異なる**ことが知られています。標的の細胞・組織に合わせて血清型を選択してください。

※遺伝子導入の程度は実験条件によって異なる場合がありますので、文献を参照してください。

血清型と標的組織(血清型1、2、5、6の場合)

| 血清型 | 主な標的組織 |
|------|----------------|
| AAV1 | 筋肉、肝臓、気道、中枢神経系 |
| AAV2 | 広範囲の細胞・組織 |
| AAV5 | 中枢神経系、肝臓、網膜 |
| AAV6 | 心臓、筋肉、肝臓 |

【参考文献】

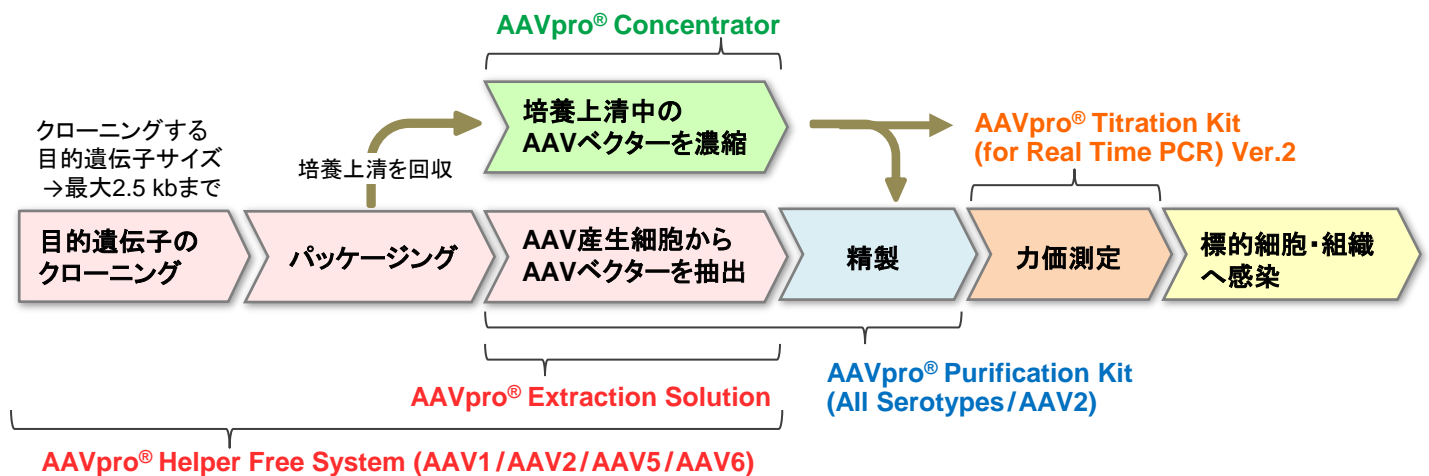
Miyake K, Miyake N, Yamazaki Y, Shimada T, Hirai Y. Serotype-independent method of recombinant adeno-associated virus (AAV) vector production and purification. *J Nippon Med Sch.* 2012;**79**(6):394-402.

小澤敬也

AAVベクターの開発と遺伝子治療への応用：蛋白質 核酸 酵素 Vol.52 No.10 (2007) 1288-1293

Ellis BL, Hirsch ML, Barker JC, Connelly JP, Steininger RJ 3rd, Porteus MH. A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. *Virology.* 2013 Mar 6;**10**:74

AAVベクター調製の実験フローと対応製品



■ アデノ随伴ウイルスベクター作製システム

AAVpro® Helper Free System シリーズ

- ヘルパーウイルスを使用せず、安全に血清型1、2、5、6のAAVベクターを作製
- 独自のAAVベクター抽出法(特許出願中)で効率的かつ簡便な操作
- AAV2ベクターは、hsa-miR-342搭載ベクターの使用により、高力価ベクターを作製可能(特許出願中)

| 製品名 | 容量 | 製品コード | 価格(税別) |
|-----------------------------------|-------|-------|----------|
| AAVpro® Helper Free System (AAV1) | 1 Kit | 6673 | ¥150,000 |
| AAVpro® Helper Free System (AAV2) | 1 Kit | 6230 | ¥150,000 |
| AAVpro® Helper Free System (AAV5) | 1 Kit | 6650 | ¥150,000 |
| AAVpro® Helper Free System (AAV6) | 1 Kit | 6651 | ¥150,000 |

※各システムには、3種類のプラスミドとAAVベクター産生細胞からのベクター抽出に必要な2種類の試薬が含まれています。

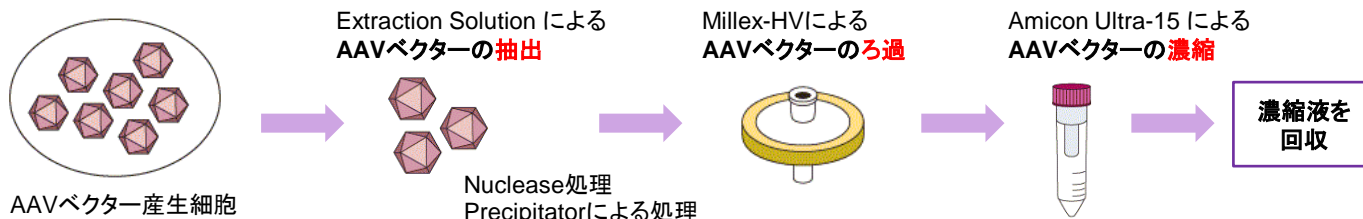
■ アデノ随伴ウイルスベクターの精製

AAVpro® Purification Kit (All Serotypes)

- 様々な血清型に適用可能
- 高い精製度、高い回収率
- 独自のAAVベクター抽出法・精製法(特許出願中)による簡単な操作



【操作フロー】

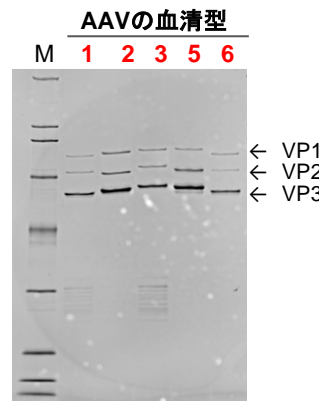


| 製品名 | 内容 | 容量 | 製品コード | 価格(税別) | |
|---|-----------------------------------|------------|-------|--------|----------|
| AAVpro® Purification Kit (All Serotypes) | 1. AAV Extraction Solution A plus | 22 ml × 2本 | 1 Kit | 6666 | ¥120,000 |
| | 2. AAV Extraction Solution B | 4.5 ml | | | |
| | 3. Precipitator 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本 | | | |
| | 8. Cryonase Cold-active Nuclease | 500 μl | | | |

■ 実験例 -1

< 精製後の各血清型の純度測定 >

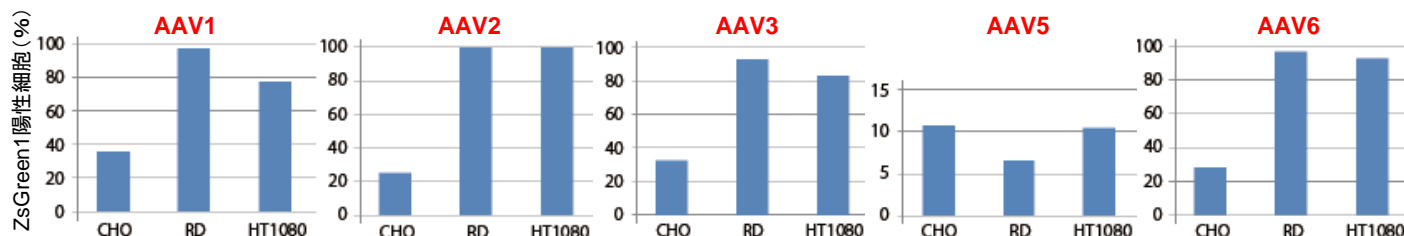
T225フラスコ5本で調製した蛍光タンパク質ZsGreen1を搭載する各血清型(血清型1、2、3、5、6)のAAVベクター産生細胞から、本キットを用いてそれぞれAAVベクターを精製した。その後、AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2(製品コード 6233)を用いてタイターを測定し、 1×10^9 vector genome/laneでSDS-PAGEを行った。その結果、AAVキャプシドタンパク質(VP1、VP2、VP3)が主要バンドとして確認できた(右図)。



M: Protein Molecular Weight Marker (Broad)

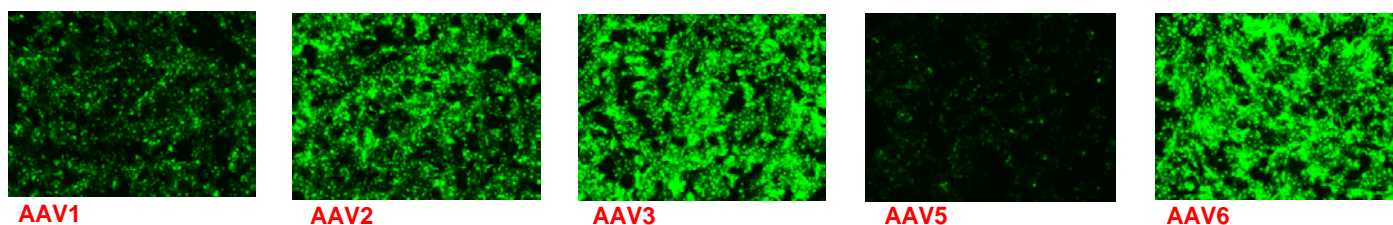
< 精製AAVベクターの感染能力の評価 >

上記の実験で得た精製AAVベクターを5,000 vg/cell(血清型1、2、3、6)、もしくは50,000 vg/cell(血清型5)で3種の細胞に感染させ、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(下図)。



■ 実験例 -2

実験例-1で得た各血清型の精製AAVベクターを、ヒトES細胞由来心筋細胞(製品コード Y10060)に感染させた。48well plateに播種した心筋細胞の拍動確認後に 1×10^{10} vg/wellでAAVベクターを添加した。添加15日後にZsGreen1の発現を蛍光顕微鏡で観察した。同じ撮影条件の蛍光顕微鏡写真を以下に示す。血清型により差はあるものの、効率よく遺伝子導入できていることが確認できた。

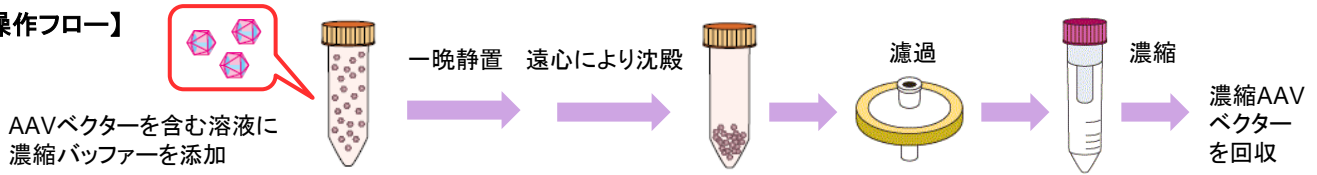


■ アデノ随伴ウイルスベクターの濃縮

AAVpro® Concentrator

- 様々な血清型に適用可能
- 煩雑な工程は不要
- 培養上清など溶液中の血清の有無に影響されずに濃縮可能
- AAVベクターを濃縮するために必要なすべてのバッファーを付属

【操作フロー】



| 製品名 | 容量 | 製品コード | 価格(税別) |
|----------------------|-------|-------|---------|
| AAVpro® Concentrator | 1 Kit | 6674 | ¥60,000 |

■ アデノ随伴ウイルスベクターの力価測定

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

- わずか2.5時間でAAVベクターのタイターを測定
- ITR (Inverted Terminal Repeat) をターゲット配列としているため、ベクターの内部配列や血清型に関わらず使用可能(※)

※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。



| 製品名 | 容量 | 製品コード | 価格(税別) |
|---|------|-------|---------|
| AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 | 100回 | 6233 | ¥75,000 |

【その他の関連製品ラインナップ】

| 製品名 | 概要 | 容量 | 製品コード | 価格(税別) |
|---|--|--------|-------|----------|
| AAVpro® Helper Free System (AAV2-LacZ) ※ | β-ガラクトシダーゼ遺伝子を搭載したAAV2ベクターを作製するキット。遺伝子導入のコントロールに最適 | 1 Kit | 6655 | ¥150,000 |
| AAVpro® Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase) ※ | Creリコンビナーゼ遺伝子を搭載したAAV2ベクターを作製するキット。トランスジェニックマウスの解析や様々なスクリーニング系に広く利用可能 | 1 Kit | 6652 | ¥150,000 |
| AAVpro® Helper Free System (AAV2-2xU6) ※ | RNA polymerase III (pol III) 系プロモーターを搭載したAAV2ベクターを作製するキット。2種類のshRNAを発現 | 1 Kit | 6661 | ¥150,000 |
| AAVpro® Helper Free System (AAV2-U6-ZsGreen1) ※ | RNA polymerase III (pol III) 系プロモーターを搭載したAAV2ベクターを作製するキット。1種類のshRNAとZsGreen1遺伝子を発現 | 1 Kit | 6658 | ¥150,000 |
| AAVpro® Packaging Plasmid (AAV2) ※ | 動物個体への遺伝子導入など大量のAAVベクター作製に便利なReady to useの高容量トランスフェクション用プラスミド | 各 1 mg | 6234 | ¥150,000 |
| AAVpro® Purification Kit (AAV2) | カラムを用いて簡便にAAV2ベクターを精製するキット。AAVpro Purification Kit (All Serotypes) (製品コード 6666) よりも高純度な精製が可能 | 2回 | 6232 | ¥98,000 |
| pAAV-ZsGreen1 Vector | 緑色蛍光タンパク質ZsGreen1発現AAVベクタープラスミド。トランスフェクション効率や、調製したAAVの生物学的力価を確認するためのポジティブコントロールに最適 | 20 µg | 6231 | ¥105,000 |

※AAV1、AAV5、AAV6に対応した製品もあります。詳しくはウェブサイトの各製品ページをご覧ください。

☑ ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。☑ 営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。・本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。・本パンフレット記載の価格は2016年6月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2016年6月作成G

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
 関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995
 TaKaRaテクニカルサポートライン
 TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995
 Website http://www.takara-bio.co.jp

取扱店

