

# PCR 法によるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの高感度検出法に関する標準操作手順書

## 1. 目的

- 1.1 本標準操作手順書は PCR 法によるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの高感度検出法について述べたものである。
- 1.2 本試験で用いる AAV ベクター感染細胞の調製は\_\_\_\_\_の記載に従う。
- 1.3 本試験で用いる AAV ベクターを含む genomic DNA の調製は\_\_\_\_\_の記載に従う。
- 1.4 本試験で用いるサーマルサイクラー(MJ Research, PTC-200)の詳細な取扱いは\_\_\_\_\_に、デンストグラフ(アトー, AE-6920M-03 型)の詳細な取扱いは\_\_\_\_\_に従う。

## 2. 原理

- 2.1 AAV ベクター感染細胞より genomic DNA を調製し、これを鋳型として ITR (Inverted Terminal Repeat) 領域に設定したプライマーを用いた PCR 法により、外来遺伝子発現ユニットを含む AAV ベクター領域を増幅し、アガロースゲル電気泳動にて AAV ベクターの検出を行うものである。

## 3. 試薬類

- 3.1 TaKaRa LA Taq (5 U/ $\mu$ l)、10 $\times$ LA PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Free)、25 mM MgCl<sub>2</sub>、2.5 mM each dNTP mixture (#RR002A)は宝酒造(株)、分子量マーカー 1 kb Ladder (#15615-016)は GIBCO-BRL 社、50 $\times$ TAE Buffer (#24710-030)は GIBCO BRL 社、10 mg/ml エチジウムブロマイド溶液(#15585-011)は GIBCO BRL 社、アガロース(#A6013)は Sigma 社製を使用する。

## 4. PCR プライマーの調製

- 4.1 AAV genome DNA の ITR 領域に設定した ITR-AD30: 5'-GAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTTCCT-3'を用い、滅菌蒸留水に終濃度 100  $\mu$ M となるように溶解する。

## 5. 操作手順

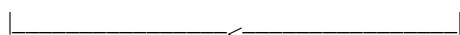
- 5.1 PCR 反応は以下の方法で実施する。即ち下記の組成の内、Template DNA を除いた 49  $\mu$ l の PCR 溶液を 200  $\mu$ l 反应用チューブに分注し、1  $\mu$ l の Template DNA を添加する。下記に示すプログラムを設定したサーマルサイクラーにより PCR を実施する。なお、全ての操作において手袋を着用し、試薬類は氷上に置く。

●PCR 溶液(1 サンプル当たり)

10×LA PCR buffer	5 μl
Template DNA (細胞 genomic DNA)	1 μl
ITR-AD30 (100 μM)	0.5 μl
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μl
TaKaRa LA Taq (5 U/μl)	0.25 μl
滅菌水	39.25 μl
	50 μl

●PCR におけるサーマルサイクラーのプログラム

94°C、1 分間 → 94°C、1 分間 → 64°C、30 秒間 → 72°C、3 分間 → 72°C、7 分間 → 4°C、forever

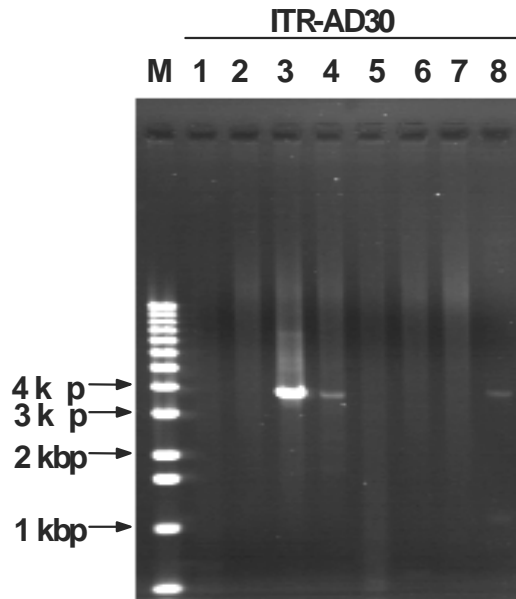


合計 30 サイクル

5.2 PCR 終了後の PCR 産物の検出はアガロースゲル電気泳動により実施する。泳動ゲルは以下の通り調製する。即ち、ミリ Q 水で希釈した 1×TAE Buffer に懸濁したアガロース (1%、w/v) を電子レンジ等により加熱し、完全にアガロースが溶解したのを確認し、室温で固まらない程度まで冷却する。Mupid-2 ゲルメーカーセット (アドバンス、#EM-2) にアガロースを流し込む。大プレート (W 107×L 60 mm) の場合 35 ml、小プレート (W 52×L 60 mm) の場合は 18 ml 使用する。コーム (アドバンス、#COMB25、大プレート 25 ウェル、小プレート 12 ウェル) をセットしアガロースが固まるまで放置する。PCR 産物 5 μl に 6×Gel-loading buffer (0.25% bromophenol blue/0.25% xylene cyanol/30% glycerol) を 1 μl 添加し、そのうちの 5 μl をゲルにアプライして 1×TAE バッファー中、100 V で 30 分間泳動する。

5.3 終濃度 2 μg/ml のエチジウムブロマイドを添加したミリ Q 水に電気泳動後のゲルを浸し、室温で 5 分間放置する。その後、水道水で 5 分間洗浄する。UV (312 nm) 照射により、デンストグラフ (アトー、AE-6920M-03 型) にライブ画像を取り込んだ後、PICT ファイルとして保存する。

5.4 測定例を以下に示す。



**Detection of AAV vector from genomic DNA of recombinant 293 cells by PCR**

M, 1 kb ladder; 1, 293 cells genomic DNA; 2, 1V4 genomic DNA; 3, 1V5 genomic DNA; 4, 2V8 genomic DNA; 5, 2V9 genomic DNA; 6, EV1 genomic DNA; 7, EV5 genomic DNA; 8, standard AAV vector.