

標準 AAV ベクター調製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、染色体中のアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターコピー数の測定に用いる、標準 AAV ベクターの調製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。
- 1.5 本試験で用いる PCR 法による AAV ベクターの高感度検出法は **Virus Bank SOP-AAV-001** の記載に従う。

2. 原理

- 2.1 AAV ベクターが組み込まれた組換え 293 細胞である 2V8 由来の約 4 kbp の PCR 産物を、TA-cloning 法により pT7Blue T-Vector (Novagen 社) に導入し、大腸菌 JM109 株を形質転換し、2V8 由来の AAV ベクター断片のクローン化を行い、組換えプラスミドより AAV ベクターを調製し、標準 AAV ベクターとする。

3. 試薬類

- 3.1 pT7Blue T-Vector (NV004, Novagen)、TaKaRa DNA Ligation Kit Ver.2 (#6022)、*E.coli* JM109 Competent Cell (#9052)、TaKaRa Ex Taq (5 U/ μ l)、10 \times Ex PCR Buffer (#RR001A)、TaKaRa LA Taq (5 U/ μ l)、10 \times LA PCR Buffer (Mg²⁺ Free)、25 mM MgCl₂、2.5 mM each dNTP mixture (#RR002A) は宝酒造 (株)、制限酵素 PvuII (#151CS) は NEW ENGLAND BioLabs 社、QIAGEN Plasmid Midi Kit (#12145)、QIAquick PCR Purification Kit (#28104) は QIAGEN 社、GenElute Minus EtBr Spin Column (# 5-6510) は Sigma 社、分子量マーカー 1 kb Ladder (#15615-016)、50 \times TAE Buffer (#24710-030)、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. 標準 AAV ベクターの調製

- 4.1 PCR 法により増幅した 2V8 由来の約 4 kbp の PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit にて精製し、pT7Blue T-Vector へ TaKaRa DNA Ligation Kit Ver.2 を用いて導入した。大腸菌 JM109 株を形質転換し、組換え菌を得る。
- 4.2 インサート DNA の確認は、X-gal を用いた Blue/White スクリーニングにより白色コロニーを選択し、そのクローンを直接 PCR によってインサートの有無を確認する。PCR 反応は以下の方法で実施する。即ち、30 μ l の滅菌蒸

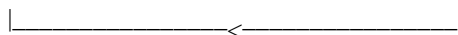
留水を 200 μ l 反応用チューブに分注し、白色コロニーのクローンを懸濁し、下記の組成の PCR 溶液を 20 μ l 添加する。下記に示すプログラムを設定したサーマルサイクラーにより PCR を実施する。なお、全ての操作において手袋を着用し、試薬類は氷上に置く。

●PCR 溶液 (1 サンプル当たり)

10×Ex PCR buffer	5 μ l
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ l
Primer M13-47 (20 μ M)	0.5 μ l
Primer M13RV-M (20 μ M)	0.5 μ l
TaKaRa Ex Taq (5 U/ μ l)	0.25 μ l
滅菌蒸留水	9.75 μ l
	<hr/>
	20 μ l

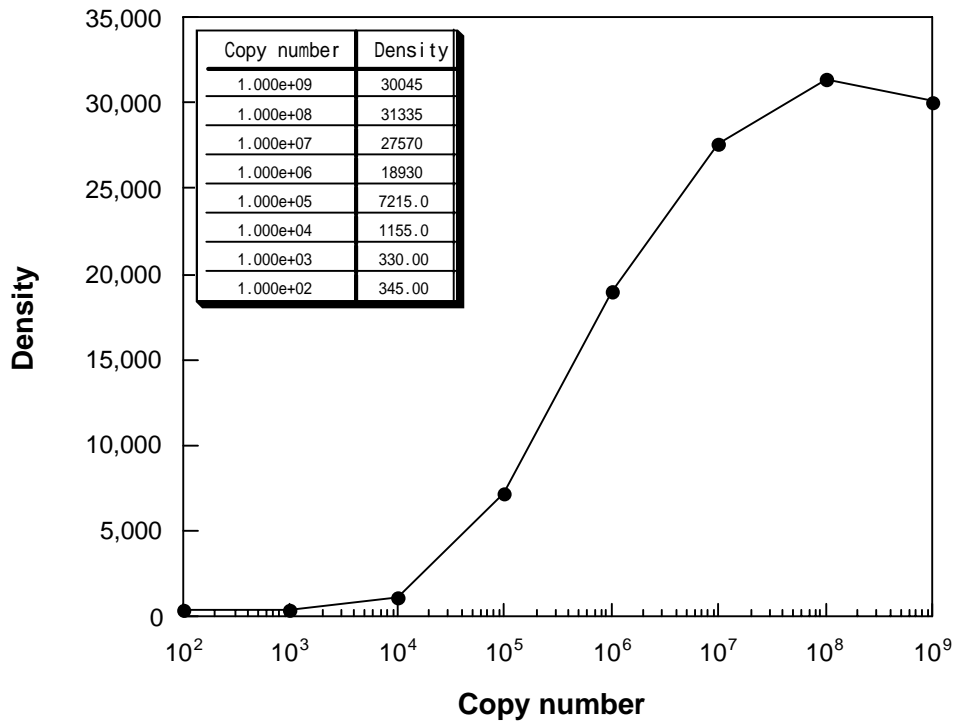
●PCR におけるサーマルサイクラーのプログラム

95°C, 1 分間 → 95°C, 30 秒間 → 55°C, 45 秒間 → 72°C, 3 分間 → 72°C, 7 分間 → 4°C, forever



合計 25 サイクル

- 4.3 PCR 終了後、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。PCR 産物 5 μ l に 6×Gel-loading buffer (0.25% bromophenol blue/0.25% xylene cyanol/30% glycerol) を 1 μ l 添加し、そのうちの 5 μ l をゲルにアプラインして 1×TAE バッファー中、100 V で 30 分間泳動する。
- 4.4 終濃度 2 μ g/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、DNA を検出する。必要であれば、デンストグラフ (アトー、AE-6920M-03 型) に画像を取り込んでおく。
- 4.5 約 4 kbp の AAV ベクター断片が導入されたクローンを培養し、QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) にて AAV ベクターを有するプラスミドを大量調製する。制限酵素 PvuII により消化し 0.7% Agarose Gel にて電気泳動を行い、約 4 kbp のインサート DNA を切り出す。GenElute Minus EtBr Spin Column (シグマ) を用いて標準 AAV ベクターを精製した後、A260 nm を測定し DNA 濃度を求め、AAV ベクター断片の長さ、分子量 (1b=330) からコピー数を算出する。
- 4.6 標準 AAV ベクターを 10^9 から 10^2 コピー/ μ l に段階希釈する。それぞれ調製した希釈液 1 μ l を用いて PCR 反応を行う。染色体 DNA 中の AAV ベクターのコピー数を測定するためには、標準 AAV ベクターの検量線の直線領域内で測定できるように、測定限界濃度と直線領域の濃度範囲を求める。
- 4.7 測定例を以下に示す。



Standard curve of AAV vector copy number by PCR