

ユーザーインストラクション: アデノ随伴ウイルス (AAV) in vitro用

製品内容

カスタムAAVに関する製品情報を以下の表に示します。AAVウイルスタイター(力価)は品質検査証明書(COA)に記載されています。

スケール	納入品	仕様	推奨用途
パイロット	カスタムウイルス	濃縮ウイルス ($>2 \times 10^{11}$ GC/ml, 10 × 25 ul)	細胞培養
	コントロールウイルス	濃縮ウイルス ($>2 \times 10^{11}$ GC/ml, 1 × 100 ul)	細胞培養
中容量	カスタムウイルス	濃縮ウイルス ($>2 \times 10^{11}$ GC/ml, 10 × 100ul)	細胞培養
	コントロールウイルス	濃縮ウイルス ($>2 \times 10^{11}$ GC/ml, 2 × 100 ul)	細胞培養
大容量	カスタムウイルス	濃縮ウイルス ($>2 \times 10^{12}$ GC/ml, 10 × 100ul)	細胞培養
	コントロールウイルス	濃縮ウイルス ($>2 \times 10^{11}$ GC/ml, 2 × 100 ul)	細胞培養

保存および取り扱い

- このウイルスはin vitroの使用を推奨しています。このAAVはTris組成バッファーに保存されています。
- お受け取り後は、長期保存の場合は -80°C (少なくとも1年間は安定)、短期保存の場合 (例: 2~3 週間) は -20°C で保存してください。
- AAVのバイアルは使用前に氷上で解凍し、実験中も氷上で取り扱ってください。解凍したAAVは生物学的活性を大きく低下させることなく、 4°C で 1-2 週間保存が可能です。
- AAVは解凍後、実験に使用する量に応じて少量ずつ分注し、再凍結できます。ウイルスを希釈する必要がある際はPBSIによって行い、必ず使用直前に希釈するようにして下さい。

注意: 凍結融解を繰り返すことは避けてください。AAVは活性損失を最小限に数回は凍結融解が可能ですが、可能な限り避けることで最良の結果が得られます。



安全上の注意事項

VectorBuilderから提供される全てのAAV製品は、AAV末端逆位配列(ITR)によって挟まれた組換え導入遺伝子配列で構成されています。AAV ITRsは、野生型AAVゲノムのわずか6%から成り、ウイルス粒子にパッケージされた唯一のAAV特異的配列です。ウイルス構造遺伝子の大部分の除去はウイルスの複製能を欠損させ、ウイルス複製はトランスで提供するアデノウイルスヘルパーに依存します。組換えAAVウイルスは、ヘルパーウイルスではなくヘルパープラスミドの存在下で生合成されます。組換えウイルスは3つのプラスミド(cis ITR含有プラスミド、AAVレプリカーゼおよびカプシド遺伝子をコードするtransプラスミド、アデノウイルスヘルパープラスミド)を用いた293T細胞の一過性トランスフェクションによって生合成されます。そして、異なるセロタイプ(血清型)カプシドタンパク質を有するベクターゲノムの偽型(シュードタイプ)化をもたらします。組換えAAVウイルスは、ヒトに病原性のない野生型AAVウイルスをベースにしています。野生型AAVウイルスの複製はアデノウイルスやヘルペスウイルスの存在に依存し、ヘルパーウイルスが存在しない場合は安定して宿主細胞のゲノムに組み込まれますが、組換えAAVウイルスのゲノムは宿主細胞内に主にエピソームとして存在し、組み込み頻度はあるとしても低いとされています。AAVウイルスはバイオセーフティレベル2(BSL-2)基準に従って取り扱うことを推奨します。バイオハザード物の取り扱い、保管および廃棄はすべて公的基準および所属機関の基準に従ってください。

標的細胞への形質導入(トランスダクション)

AAVの形質導入は細胞種に依存します。細胞種によっては導入効率が低いものもあれば、非常に導入しやすいものもあります。AAV形質導入実験を計画する際には、eGFP発現AAVなどのレポーターベクターを異なる血清型(セロタイプ)(VectorBuilderのAAV Senotype Testing Panel 参照)にて使用し、目的の組織や培養細胞の形質導入に最適な血清型を決定することをお勧めします。細胞が容易に形質導入可能である場合は、細胞あたり $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ ゲノムコピー(GC)の多重感染度(MOI)で細胞への形質導入を開始します。細胞株によっては、より高いMOIが必要な場合があります。細胞死を最小限に抑え、高効率の導入条件を検討してください。一部の細胞株では、高い導入レベルが達成できない場合があります。

哺乳類細胞株の形質導入プロトコール:

1. 導入前日 (0日目)

形質導入時に30~50%のコンフルエントになるように、標的細胞を播種します。加湿した5% CO₂インキュベーター内、37°Cで18~20時間培養します。例として、当社では293T細胞を使用する場合、6 ウェルプレート²の1ウェルあたり3x10⁵細胞を播種します。

2. 形質導入 (1日目)

- ウィルスを氷上で解凍します。目的のMOIを達成するために必要な量のウィルスを取り、適量の培地に加え、穏やかに混合します(ボルテックスはかけない)。形質導入効率を最大にするために、プレートの表面を覆うのに必要な最低限の培地量を使用してください。例えば、6 ウェルプレートで感染を行う場合、ウェルあたり1mlの培地を使用します。
- 標的細胞から古い培地を吸引し、ウィルスを含む培地を細胞に添加します。
- プレートを静かに回転させて混ぜ合わせて細胞を覆うようにし、加湿した5% CO₂インキュベーター²37°Cで一晩培養します。

注意: ウィルス混合液への暴露が細胞に有害作用を及ぼす可能性が懸念される場合は、形質導入を6-8時間に制限してください。

3. 2日目

ウィルスを含む培地を除去し、新鮮な完全培地と交換します。そして、加湿した5% CO₂インキュベーター内、37°Cで一晩培養します。

4. 3日目以降

ウィルス感染後の望ましい時点で遺伝子発現を解析します。一般的に、検出可能なレベルの遺伝子産物は、形質導入後24-48時間後に発現すると考えられます。

注意: 分裂が活発な細胞(例: 倍化時間が約24時間)では、導入された遺伝子は24時間以内に発現が見られ、48~96時間後(2~4日後)に一番多く発現が観測できます。多くの場合、発現レベルは5日目から減少し始めます。より長い倍化時間を要する細胞株や非分裂細胞株では、高レベルの導入遺伝子発現はより長く持続します。目的の哺乳類細胞株に初めて導入する場合は、経時的解析を行い、導入遺伝子の発現に最適な時間を検討することをお勧めします。

結果の一例

形質導入の成功例を図1に示します。

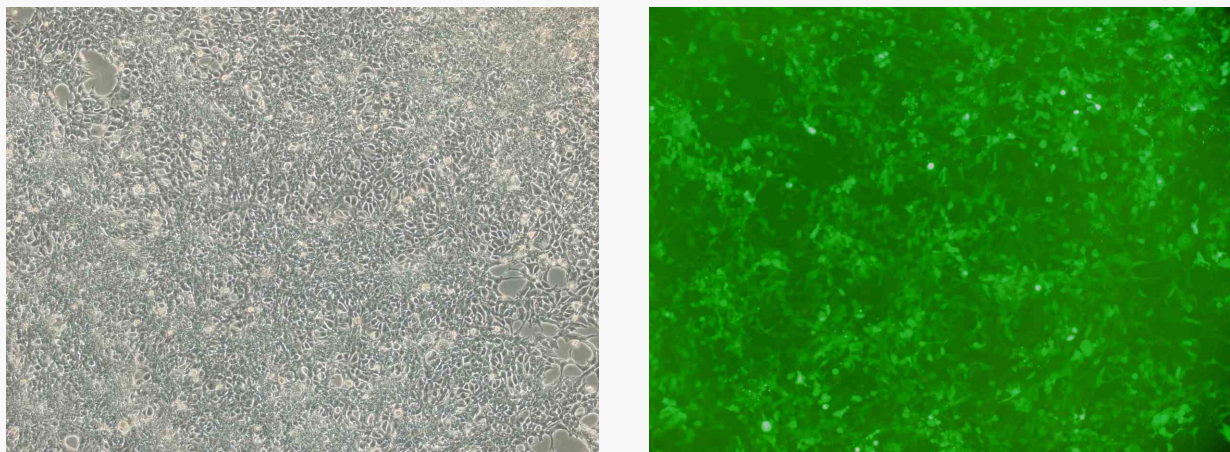


図 1. 本ユーザーインストラクションのプロトコールに従い、EGFP発現AAV2をMOI 10000で293T細胞に形質導入した例。画像は100倍にて撮影。左: 明視野; 右: EGFP。