

Virus Bank SOP-AAV-003

標準 AAV ベクターを用いた染色体中の AAV ベクター コピー数測定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標準アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて、染色体中の AAV ベクターコピー数の測定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、デンシトグラフ (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。
- 1.6 本試験で用いる標準 AAV ベクター調製法は **Virus Bank SOP-AAV-002** の記載に従う。

2. 原理

- 2.1 標準 AAV ベクターを用いて PCR 法により、標準曲線を作成し、染色体中の AAV ベクターコピー数の測定を行うものである。

3. 試薬類

- 3.1 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、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 ベクター希釈液の調製

- 4.1 TA-cloning 法により調製した標準 AAV ベクターを 10⁷ から 10⁴ コピー/ μ l に段階希釈する。希釈液は用時調製とする。希釈溶液の凍結保存したものを標準液として用いてはならない (DNA のチューブ壁への吸着による感度低下が示唆されたため)。

5. 被検サンプルの調製

- 5.1 染色体 DNA 中の AAV ベクターコピー数の測定には、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段階希釈する。被検サンプルによっては、三段階の 10 倍希釈系列を作成し予備検討を行う。

6. 操作手順

6.1 標準 AAV ベクターならびに被検サンプル希釈液 1 μl を鋳型として用い、各サンプルは二連で PCR を行う。

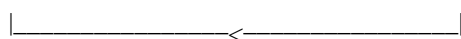
PCR は以下の方法で実施する。即ち、下記の組成の内、Template DNA を除いた 49 μl の PCR 溶液を 200 μl 反応チューブに分注し、1 μl の Template DNA を添加する。下記に示すプログラムを設定したサーマルサイクラーにより PCR を実施する。なお、全ての操作において手袋を着用し、試薬類は氷上に置く。

●PCR 溶液 (1 サンプル当たり)

10×LA PCR buffer	5 μl
Template DNA (希釈液)	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
滅菌蒸留水	39.25 μl
	<hr/>
	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

6.2 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。標準 AAV ベクターと各染色体 DNA の希釈サンプルは、同一ゲル上で泳動する。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 バッファ一中、100 V で 30 分間泳動する。

6.3 終濃度 2 $\mu\text{g/ml}$ 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、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、解析ソフトウェア「ゾーンデンストメトリー」により約 4 Kb の PCR 産物のバンドの蛍光強度を定量する。データは Excel のテキストファイルとして保存する。

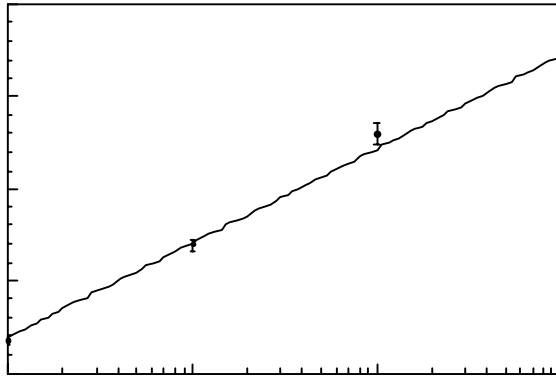
7. 計算

7.1 ゾーンデンストメトリーによる解析データをコンピューターソフトウェア“Microsoft Excel 5.0”を用いて、コピー数が既知の標準 AAV ベクターを鋳型として得られる PCR 産物の蛍光強度から検量線を作成し、その検量線から AAV ベクターのコピー数を算出する。

7.2 プリントアウトし、必要事項を記入し報告用紙とする。

7.3 測定例を以下に示す。

Standard conc.	Density 1	Density 2	AVERAGE	SD			
1.00E+07	17172	16320	16746	602.45			
1.00E+06	12564	13368	12966	568.51			
1.00E+05	6720	7200	6960	339.41			
1.00E+04	1536	1896	1716	254.56			
1.00E+03	372	624	498	178.19			
Genome	Density 1	Density 2	AVERAGE	SD	Copies/uL	AVERAGE	SD
1V5 x 0.05	8436	7308	7872	797.62	2.91E+06	3.01E+06	2.84E+05
x 0.025	6048	6432	6240	271.53	2.79E+06		
x 0.0125	6120	4080	5100	1442.50	3.33E+06		
2V8 x 1	3336	3252	3294	59.40	1.85E+04	2.80E+04	8.34E+03
x 0.5	2640	3252	2946	432.75	3.16E+04		
x 0.25	1380	1764	1572	271.53	3.40E+04		



$$Y = -18506 + 5109.6 \text{Log}(x) \quad R=0.99626$$

1V5 : 3.01×10^6 copies / μl ($\pm 0.28 \times 10^6$)

2V8 : 2.80×10^4 copies / μl ($\pm 0.83 \times 10^4$)