

ViraTrap™ 腺相关病毒大量纯化试剂盒（所有血型）

简明说明书（BW-V1469）

产品简介

腺相关病毒大量纯化试剂盒是为快速高效地从 AAV 转染细胞培养上清液中纯化重组 AAV 而设计的。该试剂盒可从 5-6 个 T75 瓶培养的细胞培养液中纯化病毒颗粒，病毒回收率在 40-60%。

传统的腺相关病毒纯化是利用 CsCl 超速离心法从细胞蛋白和介质成分中的纯化分离病毒颗粒，但这种方法耗时较长，限制裂解的细胞数，并且有细胞残片、膜碎片和多余蛋白质残留。

试剂盒中病毒纯化柱可再生用于同种腺相关病毒的纯化，但考虑病毒的吸附能力及得率，每个柱子只能再生一次。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	2	4	10
AAV Maxi Columns	1	2	5
Press-On Cap	2	4	10
Centrifugal Filters*	2	4	10
50 mL Centrifugal Tubes	1	2	5
Nuclease (25 U/μL)	60 μL	120 μL	240 μL
100× Nuclease Reaction Buffer	400 μL	800 μL	1800 μL
Buffer VB	40 mL	80 mL	180 mL
Buffer VP	20 mL	70 mL	140 mL
Buffer VS	15 mL	50 mL	100 mL
Buffer ES	15 mL	40 mL	90 mL

Regeneration Buffer	12 mL	24 mL	60 mL
User Manual	1	1	1

*: Centrifugal Filter (Cat# BW-CF01)可从 BEIWO 单独购买。

产品贮存及稳定性

本试剂盒自生产之日起可保存 12 个月。AAV Maxi Columns、Buffer VS 和 Buffer ES 保存于 4°C，Nuclease 和 100× Nuclease Reaction Buffer 于 -20°C 贮存，其他试剂及用品可保存于室温（15-25°C）。

安全信息

腺相关病毒感染的细胞培养液和纯化后的病毒是潜在的生物危险品，对人类和动物具有传染性，因此，所有的操作步骤必须在生物安全级别至少二级条件下进行。

实验前需准备的材料

- 标准台式离心机
- 水平转子
- 0.45μm 和 0.22 μm 过滤器
- 柱子支架

操作步骤

I. 收集腺相关病毒感染的细胞（每个柱子适用 5-6 个 T75 培养瓶或等体积的培养液）

1. 对于贴壁转染的细胞，用移液器移去培养基，每个 T75 培养瓶加入 3-5 mL PBS 收集细胞，4°C，1,000 rpm 离心 10 min，弃上清。每个 T75 加入 **3 mL Buffer VB** 重悬细胞。确保重悬后没

有细胞团块。

2. 对于 3 mL 样品，加入 **30 μL 100× Nuclease Reaction Buffer** 和 **5 μL Nuclease**，用枪头吹打混匀，37°C 缓慢摇动 30 min。4°C，6,00 ×g 离心 15 min，转移上清液至一个新的管，并用 0.45 μm 过滤器进行过滤。加入 **1 倍体积 Buffer VP** 至 **3 倍体积** 的病毒上清液（例如，在 3 mL 病毒裂解液中加入 1 mL Buffer VP）。混合均匀，4°C 孵育至少 4 h 至过夜。病毒可在 **Buffer VP** 中稳定储存。

3. 4°C，6,000 rpm 离心 30 min（离心过程中进行步骤 4），小心弃上清。短暂离心并去除剩余的上清液。此时可见病毒颗粒，呈现出模糊状态。将病毒置于冰上，进行步骤 5。

II. 平衡柱子

4. 颠倒 **AAV Maxi Column** 使得树脂重悬。将 **AAV Maxi Column** 置于 **50 mL Centrifugal Tube**，4°C，600 ×g 离心 2 min。掰断柱子底部的尖头，将柱子置于 **50 mL Centrifugal Tube**，松开顶部压盖，使液体随着重力从柱子中排出。

一旦液体停止滴落，加入 **4 mL Buffer VS**，使其依靠重力从柱子中流下。

注：试剂盒提供 **Press-On Cap** 用于阻止液体流下。

5. 加入 **4 mL Buffer VS** 至步骤 3 溶解病毒颗粒，用枪头吹打并涡旋混匀。4°C，3,000 rpm 离心 5 min，转移上清液至一个干净的管内。4°C，3,000 rpm 再次离心 5 min，转移上清液至一个新的管。

6. 将第 5 步的样品加入至一个 **Centrifugal Filter** 内，4°C，3,000 rpm 离心 15-20 min，直至超滤柱的储样池内只剩余约 **500 μL** 样

品。转移样品至一个新的管内。加入 **50 µL Buffer VS** 至储样池洗涤储样池，并将洗涤后的液体转移至样品管内。

III. 上柱

7. 将第6步的样品转移至 **AAV Maxi Column** 并依靠重力通过柱子。一旦样品进入树脂，进行下一步。

IV. 洗脱

8. 加入 **6 mL Buffer ES**，洗脱病毒，收集 6 mL 洗脱液，病毒存在于流出液内。

V. 浓缩

9. 转移 4 mL 样品到 **Centrifugal Filter** 中，4°C，3,000 rpm，离心 10-20 min，将剩余样品加入至储样池内，4°C，3,000 rpm，离心 15-30 min，直到 **Centrifugal Filter** 中剩余约 1000 µL 溶液。用枪头上下吹吸混匀，转移病毒至一个新的管内。

注：水平转子是离心首选。角度转子需要高于 7,000 rpm 的转速，4°C离心 15-20 min。

注：如果不使用 **Centrifugal Filter**，病毒溶液也可以通过透析或其他脱盐柱进行脱盐。

注：对于不同型号的转子，离心时间有所不同，通常离心较少时间检查溶液液面，并重复离心以得到理想的体积。

● 100 K Centrifugal Filter 装置中，浓缩体积与离心时间相对应（水平转子，4°C，3,000 rpm，起始体积 4 mL）。

离心 15 min：浓缩体积 176 µL；

离心 20 min：浓缩体积 76 µL；

离心 25 min：浓缩体积 58 µL。

● 100 K Centrifugal Filter 装置中，浓缩体积与离心时间的对应（35°角转子，4°C，7,000 rpm，起始体积 4 mL）。

离心 10 min：浓缩体积 97 µL；

离心 15 min：浓缩体积 54 µL；

离心 20 min：浓缩体积 35 µL。

10. 纯化后的病毒已经可以用于下游实验。将病毒分成小份储藏在-80°C。感染目标细胞之前，建议将需要量的纯化后病毒加入到 5-10 mL 含目标细胞的培养基中，并在感染前用 0.22 µm 过滤器过滤。

VI. 纯化柱的再生

11. 纯化完成后，加入 **10 mL Regeneration Buffer** 至柱子，溶液随重力流通过柱子。加入 2× 10 mL PBS 洗涤柱子，使得 PBS 通过重力流下。一旦液体停止下落，加入 10 mL PBS。盖紧底部盖帽，用封口膜将柱子封住，于袋子中封好，保存 4°C备用。

常见问题解答

问题	解决方法
树脂中有气泡导致流速慢	用 Press-on cap 封住柱子底部，4°C，300 ×g 离心 5 min。
看不见的气泡导致流速慢	1. Press-on cap 盖住柱子底部，加除气水到树脂中 1-2 cm 高度； 2. 将柱子置于 50 mL 离心管内，4°C，600 ×g 离心 10 min。
上清很粘	将上清用 0.45 µm 过滤器进行过滤。
加载样品后柱子堵塞	加入 Buffer VS 重悬溶解病毒颗粒。短暂离心以去除不溶性碎片。