

ViraTrap™ 慢病毒小量纯化试剂盒简明说明书 (BW-V1170)

产品简介

传统的慢病毒纯化是利用超速离心法从细胞蛋白和介质成分中纯化分离重组病毒，但这种方法耗时长，限制裂解的细胞数，并且有细胞残片、膜碎片和多余的蛋白质残留。

ViraTrap™ 慢病毒小量纯化试剂盒能从病毒感染的细胞培养液中快速、高效地分离纯化慢病毒。病毒先从病毒培养上清液中沉淀出来，再通过纯化柱和脱盐浓缩装置纯化浓缩病毒。

本慢病毒纯化试剂盒可在 1 小时内，从 1-2 个 T75 瓶培养的细胞培养液中纯化病毒颗粒，病毒回收率可达 50-60%。纯化到的病毒颗粒可直接用于下游实验，如细胞和动物感染。

试剂盒中柱子可再生，用于同种慢病毒的纯化，但考虑病毒的吸附能力，每个柱子可再生一次。

产品构成

Catalog#	-00	-01	-02
Preps	2	10	20
LV Mini Columns	1	5	10
Press-On Cap	2	10	20
Centrifugal Filters*	2	10	20
15 mL Centrifugal Tubes	1	5	10
Buffer P	18 mL	90 mL	180 mL
Buffer S	20 mL	100 mL	200 mL

Buffer MS	10 mL	50 mL	100 mL
Regeneration Buffer	10 mL	50 mL	100 mL
User Manual	1	1	1

*: Centrifugal Filters (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。其中 Buffer S、Buffer MS 和 LV Mini Columns 贮存在 4°C，其他试剂及用品可保存于室温（15-25°C）。

安全信息

慢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
- 0.45 μm 和 0.22 μm 过滤器
- 柱子支架
- PBS

操作步骤

I. 收集慢病毒感染的细胞(每个柱子适用 1-2 个 T75 培养瓶或等体积的培养液)

1. 将慢病毒感染的细胞培养液，4°C，3,000 rpm，离心 10 min。用 0.45 μm 滤器过滤上清。每次可处理从 1-2 个 T75 瓶的细胞培

养液，最大处理量为 30 mL/次。

注：上清可储存在-80°C，备用。

II. 慢病毒沉淀

2. 向病毒上清中加入 **1/3 体积的 Buffer P**（例如：加入 5 mL Buffer P 到 15 mL 病毒上清中）。混匀后 4°C 孵育 4 小时以上或过夜。病毒可稳定储存于 **Buffer P**。

3. 4°C，6,000 rpm，离心 20-30 min（在离心期间可进行步骤 4）。小心吸去上清。瞬时离心并吸去剩余上清。可观察到病毒为非透明状沉淀。将病毒置于冰上并进行步骤 5。

III. 平衡柱子

4. 颠倒并摇晃 **LV Mini Column** 以重悬浮柱子中的树脂。将 **LV Mini Column** 置于 **15 mL Centrifugal Tube** 中，4°C，500 ×g，离心 2 min。掰断柱子底部的尖头，将柱子置于 **15 mL Centrifugal Tube**，松开盖帽，使液体随着重力从柱子中排出。一旦液体停止滴落，均匀加入 **5 mL Buffer S** 到柱子中，使溶液依靠重力从柱子中流出，不要让柱子流干。

注：试剂盒提供了适用于柱子底部的 **Press-On Cap**，用于防止液体在任何时候因重力而流出。

5. 用 **4 mL Buffer S** 重悬步骤 3 得到的病毒颗粒。通过枪头吹打样品使之溶解后，4°C，3,000 rpm，离心 5 min。转移上清至一个干净的管中，4°C，3,000 rpm，离心 5 min 并再次转移上清至干净的管。将病毒置于冰上。将上清液加到 **Centrifugal Filter** 中并在 4°C，3,000 rpm 离心 10-15 min 直到约 300 μL 留在储样池。

IV. 上柱

6. 转移样品至 **LV Mini Column** 中央, 并使其依靠重力通过柱子, 丢弃流到收集管中的液体。

注: 逐滴慢慢添加样品到树脂中。全部上柱后, 进行下一步操作。不要让柱子干透。

V. 洗脱慢病毒

7. 均匀地将 **3 mL Buffer MS** 加到 **LV Mini Column** 中, 并收集 3 mL 流出液。病毒在流出液中。

VI. 浓缩

8. 将步骤 7 中收集到的溶液加入到 **Centrifugal Filter** 的储样池中, 4°C, 3,000 rpm, 离心 15-20 min, 直到池中剩余约 500 μ L 溶液。用移液枪在池中上下吹打数次并转移病毒溶液至干净的管中。纯化好的病毒可以应用于下游实验。

注: 水平转子是首选。固定角式转子需更高转速 **7,000 rpm** 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: 不同的转子对应的离心时间不同。通常离心较短时间检查溶液液面, 然后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 μ L;

离心 20 min: 浓缩体积 76 μ L;

离心 25 min: 浓缩体积 58 μ L。

● 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 μ L;

离心 15 min: 浓缩体积 54 μ L;

离心 20 min: 浓缩体积 35 μ L。

9. 纯化后的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 μ m 过滤器过滤。

VI. 纯化柱的再生

10. 纯化完成后, 加入 **3 mL Regeneration Buffer** 至柱子, 使溶液随着重力流过柱子。用 6 mL PBS 漂洗柱子并随着重力流过柱子。一旦液体停止滴落, 加入 2 mL PBS 至柱子中。将帽子盖住底部, 拧紧帽子, 用封口膜将柱子封住, 用袋子封好, 保存 4°C。

常见问题解答

问题	解决方法
树脂中有气泡导致流速慢	压盖盖住柱子底部, 柱子 4°C, 1,000 \times g, 离心 5 min。
看不见的气泡导致流速慢	1. 底部按上帽子, 加除气水到树脂中 1-2 cm 的高度; 2. 将底部盖好盖子的柱子置于 15 mL 离心管中, 4°C, 1,000 \times g, 离心 10 min。
上清很粘	将上清用 0.45 μ m 滤器进行过滤。
上样后柱子堵塞	重新用 Buffer S 悬浮溶解病毒颗粒, 瞬间离心, 以去除任何不能溶解的碎片。