

## 腺病毒大量纯化试剂盒简明说明书（BW-V1260）

### 产品简介

ViraTrap™ 腺病毒大量纯化试剂盒能从腺病毒感染的细胞培养液中快速、高效地分离纯化重组腺病毒。可从 5-6 个 T75 瓶培养的细胞培养液中纯化病毒颗粒，病毒回收率为 90%以上。

传统的腺病毒纯化是利用 CsCl 超速离心法将重组病毒从细胞蛋白和介质成分中进行分离纯化，但这种方法耗时较长且限制裂解细胞数，并且有细胞残片、膜碎片和多余的蛋白质残留。

试剂盒中柱子可再生用于同种腺病毒的纯化，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
AV Maxi Columns	1	2	5
Press-On cap	1	2	5
Centrifugal Filters*	2	4	10
50 mL Centrifugal Tubes	1	2	5
10x AV Wash Buffer	10 mL	20 mL	50 mL
2x AV Elution Buffer	10 mL	20 mL	50 mL
Regeneration Buffer	15 mL	30 mL	75 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。AV Maxi Columns 保存

于 4°C，其他试剂及用品可保存于室温（15-25°C）。

### 安全信息

- 腺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

- ddH<sub>2</sub>O
- PBS
- 0.45μm 和 0.22 μm 过滤器
- 柱子支架

### 操作步骤

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

- 从一个 T75 培养瓶中，转移 8 mL 培养液上清至一个新的 **50 mL Centrifugal Tube**，剩余 3 mL 上清。用刮刀收集培养瓶中的细胞，并将细胞和上清液转移到另一个新的 **50 mL Centrifugal Tube**。
- 置于干冰/乙醇混合物中冰冻，再至 37°C解冻，反复 3 次。
- 4°C，3,000 rpm，离心 10 min，收集上清，用 0.45 μm 过滤器过滤。

**注：**过滤后的上清可用于纯化或储存于-80°C备用。

#### II.平衡柱子

用 ddH<sub>2</sub>O 将 **10 x AV Wash Buffer** 稀释成 **1 x AV Wash Buffer**；

用 ddH<sub>2</sub>O 将 **2 x AV Elution Buffer** 稀释成 **1 x AV Elution Buffer**。

- 将 **AV Maxi Column** 置于 **50 mL Centrifugal Tube**，4°C，500 x g 离心 2 min。用夹子或者其他支架固定住 **AV Maxi Column**，掰断底部的尖头，松开盖帽，让液体随着重力从 **AV Maxi Column** 中排出。一旦液体停止滴落，缓缓加入 4 mL ddH<sub>2</sub>O，待溶液从 **AV Maxi Column** 中流出，再加入 **10 mL 1 x AV Wash Buffer**，继续让溶液流走。

**注：**离心可以帮助去除转移过程中产生的气泡。

**注：**离心首选水平转子。

**注：**如果液体流速较慢，可将柱子置于 50 mL 离心管中，500 x g 离心 2-5 min。

**注：**试剂盒提供 **Press-On Cap** 用于阻止液体流下。

**注：**如果液体流速很慢，请确保清除所有可见气泡（详见常见问题分析）。

#### III. 上柱

- 转移 15 mL 上清至 **AV Maxi Column**，重力作用下流过。。

**可选：**将滤液重新过柱，以获得最大的病毒吸附。

**注：**如果流速明显变慢，扣上 **Press-On Cap** 和柱盖，颠倒柱子，将上清和树脂充分混匀。振荡 5 min，取下 **Press-On Cap**，将柱子放在 50 mL 离心管中，4°C，1,000 x g，离心 1 min。如果二次上柱，将过柱后的液体转移到干净的管中，再次上柱，直到所有上清都通过柱子。

#### IV. 漂洗与洗脱

- 加入 **10 mL 1 x AV Wash Buffer** 至 **AV Maxi Column**，重复一次。通过重力流或 4°C，1,000 x g，离心 5 min。
- 加入 **4 mL 1 x AV Elution Buffer**，洗脱病毒，收集 4 mL 洗脱

液。

V. 脱盐和缓冲液交换

8. 转移步骤 7 中收集的 4 mL 样品到 **Centrifugal Filter** 中, 4°C, 3,000 rpm, 离心 10-15 min, 直到 **Centrifugal Filter** 中剩余约 500 µL 溶液。弃滤液, 加入 3.5 mL PBS 至 **Centrifugal Filter** 中, 4°C, 3,000 rpm, 离心 10-15 min, 直到 **Centrifugal Filter** 中剩余约 400-500 µL 溶液。移液枪在 **Centrifugal Filter** 中上下吹打数次, 并转移含病毒的溶液到一个干净的管中。

注: 水平转子是离心首选。

- 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。

- 100K 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。

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 µm 过滤器过滤。

VI. 纯化柱的再生

10. 纯化完成后, 加入 **5 mL Regeneration Buffer** 至柱子, 溶液随重力流通过柱子。加入 **10 mL 1x AV Wash Buffer**, 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
由于柱子与膜之间气泡造成的流速过慢	1. 在柱子内加入除气水, 将膜拉伸至柱子的顶端, 确保没有空气停留在膜和液体之间; 2. 将拇指放于密封柱子顶部, 倒置柱子直至气泡位于出口端; 3. 用拇指轻轻按压由膜产生的“隔膜”, 直至气泡从顶端排出。
树脂中气泡造成的流速过慢	1. 盖住柱子底部, 加除气水使树脂被 1-2 cm 高度的液体覆盖; 2. 用干净的巴斯德吸管搅拌树脂, 直至树脂中的所有部分松散地悬浮在溶液中; 3. 柱子底部盖上, 静置 5 min, 让树脂沉淀下来。
不可见气泡造成的流速过慢	1. 盖住柱子底部, 加除气水, 以便树脂被 1-2 cm 高度的液体覆盖; 2. 将整个柱子置于 50 mL 离心管, 柱子底部盖好, 4°C, 1,000 x g 离心 5 min。
上清液非常粘稠	通过 0.45 µm 过滤器过滤上清液。
在感染病毒后, 细胞没有存活	1. 在感染细胞之前, 将纯化后的病毒用 PBS 或者所需的缓冲液透析; 2. 用脱盐柱交换缓冲液, 替代透析。

杭州倍沃医学科技有限公司

[www.beiwobiomedical.com](http://www.beiwobiomedical.com)

400-115-2855

[market@beiwobiomedical.com](mailto:market@beiwobiomedical.com)