

## ViraTrap™ 腺相关病毒 (AAV) 小量纯化试剂盒 (所有血清型) 简明说明书 (BW-V1369)

### 产品简介

ViraTrap™ 腺相关病毒小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 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	10	20
AAV Mini Columns	1	5	10
Press-On Cap	2	10	20
Centrifugal Filters*	2	10	20
15 mL Centrifugal Tubes	1	5	10
Nuclease (25 U/μL)	11 μL	55 μL	110 μL
100× Nuclease Reaction Buffer	100 μL	500 μL	1000 μL
Buffer VB	8 mL	40 mL	80 mL
Buffer VP	3 mL	15 mL	60 mL
Buffer VS	20 mL	100 mL	200 mL
Buffer ES	10 mL	50 mL	100 mL

Regeneration Buffer	12 mL	60 mL	120 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 Mini 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

- PBS
- 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 1-2 个 T75 培养瓶或等体积的培养液)

1. 对于腺相关病毒转染的细胞，用移液器移去培养基，加入 3-5 mL PBS 收集细胞，4°C，3,000 rpm 离心 10 min，弃上清。加入 **3 mL Buffer VB** 重悬细胞。确保重悬后没有细胞团块。
2. 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，1,000 ×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 孵育过夜。病毒可在 **Buffer VP** 中稳定储存。

3. 4°C，3,000 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 Mini Column** 使得树脂重悬。将 **AAV Mini Column** 置于 **15 mL Centrifugal Tube**，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 10 min，转移上清液至一个干净的管内。

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 **300 μL** 样品。转移样品至一个新的管内。加入 **100 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 Mini Column** 并依靠重力通过柱

子。一旦样品进入树脂，进行下一步。

**注：**慢慢滴加样品至树脂，一旦整个样品进入树脂，进行下一步，不要让柱子干透。

#### IV. 洗脱

8. 加入 **4 mL Buffer ES**，洗脱病毒，收集 4 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，直到 **Centrifugal Filter** 中剩余约 500  $\mu$ L 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  $\mu$ L；

离心 20 min：浓缩体积 76  $\mu$ L；

离心 25 min：浓缩体积 58  $\mu$ 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  $\mu$ L；

离心 15 min：浓缩体积 54  $\mu$ L；

离心 20 min：浓缩体积 35  $\mu$ L。

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  $\mu$ m 过滤器过滤。

#### VI. 纯化柱的再生

11. 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 PBS 洗涤柱子，使得 PBS 通过重力流下。一旦液体停止下落，加入 2 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，1,000 $\times$ 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 15 mL 离心管内，4°C，1,000 $\times$ g 离心 10 min。
上清很粘	将上清用 0.45 $\mu$ m 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。