



Ver:1912

腺相关病毒小量纯化试剂盒（血清型 DJ 型）

简明说明书（BW-V1169）

产品简介

腺相关病毒（AAV）是一种单链 DNA 小病毒，属于复制缺陷型细小病毒家族。AAVs 是重要的基因传递工具，已广泛应用于基因治疗和 RNAi。

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。

本病毒纯化试剂盒适用于 AAV-DJ 型腺相关病毒，可从 1-2 个 T75 瓶培养的细胞培养液中纯化病毒颗粒，病毒回收率为 40%-60%。

试剂盒中柱子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	1	5	10
Centrifugal Filters*	2	10	20
15 mL Centrifugal Tubes	2	10	20
AAV Binding Buffer	45 mL	225 mL	450 mL
AAV Elution Buffer	12 mL	60 mL	120 mL
Regeneration Buffer	12 mL	60 mL	120 mL

100 × Nuclease Reaction Buffer	100 μL	500 μL	1000 μL
Nuclease (25 U/μL)	12 μL	55 μL	110 μL
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 Mini Columns 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

- ddH₂O
- 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. 对于转染的贴壁细胞，用移液器移去培养基，然后加入 3-5 mL PBS，用细胞刮片收集细胞，转移至 15 mL Centrifugal Tube。

2. 4°C，3,000 rpm，离心 10 min，弃上清，将细胞沉淀储存在-80°C 备用或直接进行下一步。

3. 用 3 mL AAV Binding Buffer 重悬细胞，并确保没有细胞团存在。细胞充分重悬对病毒颗粒的释放至关重要。

4. 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 60 min。

5. 4°C，1,000 × g 离心 10 min，收集上清液并用 0.45 μm 滤器进行过滤。

II.平衡柱子

6. 将 AAV Mini Column 置于 15 mL Centrifugal Tube，4°C，500 x g 离心 2 min。掰断柱子底部的尖头，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，依次加入 2 mL ddH₂O 和 5 mL AAV Binding Buffer，使其依靠重力从柱子中流下。

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 15 mL 离心管中，500 x g 离心 2 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，请确保清除了所有可见气泡。

III. 上柱

7. 将样品转移至 AAV Mini Column 并依靠重力通过柱子，继续加样品至纯化柱直至所有样品通过，收集流下来的液体重新上柱，使柱子能够吸附大量的病毒颗粒。丢弃二次上柱后的滤液。

注：如果流速明显变慢，将柱子放在 15 mL 离心管中，4°C，1,000 x g，离心 2 min。

IV. 漂洗与洗脱

8. 加入 **5 mL AAV Binding Buffer** 漂洗 **AAV Mini Column** 并重复一次。此步骤可通过重力或 1,000 × g 离心 5 min 完成。
9. 加入 **4 mL AAV Elution Buffer**, 洗脱病毒, 收集 4 mL 洗脱液。

V. 脱盐和缓冲液交换

10. 转移步骤 **9** 中收集的 4 mL 样品到 **Centrifugal Filter** 中, 4°C, 3,000 rpm, 离心 5 min, 直到 **Centrifugal Filter** 中剩余约 500 µL 溶液。弃滤液, 加入 3.5 mL PBS 或需要的缓冲液, 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。

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。
- 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。
11. 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

12. 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 **5 mL AAV Binding 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
树脂中有气泡导致流速慢	1. 向柱子中加满除气水, 并在柱顶部封上一层膜确保液体顶部和膜之间没有空气; 2. 手指置于封住的柱子上, 将柱子倒置直至气泡出现在出口端; 3. 手指加压至膜上直至气泡从顶端排出。
看不见的气泡导致流速慢	1. 帽子盖住柱子底部, 加除气水到树脂中 1-2 cm 高度; 2. 搅拌树脂至树脂全部分散悬浮; 3. 柱子静置 5 min 至树脂凝固。
上清很粘	将上清用 0.45 µm 滤器进行过滤。
细胞感染纯化后的病毒后未存活	1. 加入 Nuclease 或 Nuclease Reaction Buffer; 2. 裂解产物需进行三次冻融循环 (干冰/乙醇和 37°C 水浴) 以降低黏性和释放病毒颗粒。