

腺相关病毒大量纯化试剂盒（血清型 DJ 型）

简明说明书（BW-V1269）

产品简介

腺相关病毒是一种单链 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 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 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	4	10
AAV Maxi Columns	1	2	5
Press-On cap	1	2	5
Centrifugal Filters*	2	4	10
50 mL Centrifugal Tubes	1	2	5
AAV Binding Buffer	100 mL	200 mL	500 mL
AAV Elution Buffer	15 mL	30 mL	75 mL
Regeneration Buffer	40 mL	80 mL	200 mL

100 × Nuclease Reaction Buffer	250 μL	500 μL	1250 μL
Nuclease (25 U/μL)	32 μL	65 μL	160 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 Maxi 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
- 0.45 μm 和 0.22 μm 过滤器
- 柱子支架

操作步骤

I. 收集 AAV 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 **50 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 **10 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 **100 μL 100 × Nuclease Reaction Buffer** 和 **15 μL Nuclease**, 用枪头吹打混匀, 37°C 缓慢摇动 30-60 min。

5. 4°C, 3,000 rpm 离心 15 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 Maxi Column** 置于 **50 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 4 mL ddH₂O 和 **8 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 50 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 Maxi 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。

注: 上清上柱或者再次上柱时, 如果重力流动的速度明显变慢, 将柱子置于 50 mL 离心管中, 4°C, 1,000 x g 离心 2 min。重复两次以确保柱子

最大量吸附病毒颗粒。

注：在运输过程或缓冲液、裂解液上柱时在树脂层形成的可见或不可见气泡会导致液体流速变慢。

IV. 漂洗与洗脱

8. 加入 **10 mL AAV Binding Buffer** 漂洗 AAV Mini Column 并重复一次。此步骤可通过重力或 $1,000 \times g$ 离心 2 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。固定角式转子需要 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：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 **8 mL Regeneration Buffer** 至柱子, 溶液随重力流通过柱子。加入 **10 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. 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. 将柱子静置 5 min 至树脂凝固。
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 高度; 2. 放底部盖好盖子的柱子到 50 mL 离心管中, $1,000 \times g$ 离心 10 min。
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. 在细胞感染前将纯化后的病毒透析到 PBS 或需要的缓冲液中; 2. 使用脱盐柱并进行缓冲液交换。

杭州倍沃医学科技有限公司

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

market@beiwobiomedical.com