

ViraTrap™ 腺病毒小量纯化试剂盒简明说明书 (BW-V1160)

产品简介

ViraTrap™ 腺病毒小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 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 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，并且有裂解细胞数量的限制。

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	10	20
AV Mini Columns	1	5	10
Press-On Cap	2	5	10
Centrifugal Filters*	2	10	20
15 mL Centrifugal Tubes	2	10	20
10× AV Wash Buffer	5 mL	25 mL	50 mL
2× AV Elution Buffer	5 mL	25 mL	50 mL
Regeneration Buffer	15 mL	75 mL	150 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 Mini 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

- ddH₂O
- PBS
- 0.45 μm 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 1-2 个 T75 培养瓶或等体积的培养液）

1. 从一个 T75 培养瓶中，转移 8 mL 培养液上清至一个新的 **15 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 **15 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，将裂解液和 8 mL 上清混匀。

2. 4°C，3,000 rpm，离心 10 min，收集上清，用 0.45 μm 过滤器过滤。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 ddH₂O 将 **10× AV Wash Buffer** 稀释成 **1× AV Wash Buffer**;

用 ddH₂O 将 **2× AV Elution Buffer** 稀释成 **1× AV Elution Buffer**。

3. 将 **AV Mini Column** 置于 **15 mL Centrifugal Tube**，4°C，500 ×g 离心 2 min。用夹子或者其他支架固定住 **AV Mini Column**，掰断底部的尖头，松开盖帽，让液体随着重力从 **AV Mini Column** 中排出。一旦液体停止滴落，缓缓加入 2 mL ddH₂O，待溶液从 **AV Mini Column** 中流出，再加入 **5 mL 1× 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 15 mL 离心管中，500 ×g 离心 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，请确保清除了所有可见气泡（详见常见问题分析）。

III. 上柱

4. 转移 5 mL 上清至 **AV Mini Column**，重力作用下流过。继续加上清至 **AV Mini Column**，直至所有上清通过。

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 15 mL 离心管中，4°C，1,000 ×g，离心 2 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

5. 加入 **5 mL 1× AV Wash Buffer** 至 **AV Mini Column**，重复一次。通过重力流或 4°C，1,000 ×g，离心 5 min。

6. 加入 **4 mL 1× AV Elution Buffer**，洗脱病毒，收集 4 mL 洗脱

液。

V. 脱盐和缓冲液交换

7. 转移步骤 6 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 μ L 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 μ L 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: 若果不适用 **Centrifugal Filter**, 也可以通过透析或其他脱盐处理对病毒进行染色。

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 μ L;

离心 20 min: 浓缩体积 76 μ L;

离心 25 min: 浓缩体积 58 μ L。

● 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 μ L;

离心 15 min: 浓缩体积 54 μ L;

离心 20 min: 浓缩体积 35 μ L。

8. 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

9. 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 1 \times 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
树脂中有气泡导致流速慢	1. 底部按上帽子, 加除气水到树脂中 1-2 cm 高; 2. 搅拌树脂至树脂全部分散悬浮; 3. 将柱子静置 5 min 至树脂沉淀。
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; 2. 放底部盖好盖子的柱子到 15 mL 的离心管中, 4°C, 1,000 \times g 离心 10 min。
上清很粘稠	将上清用 0.45 μ m 过滤器过滤。
感染纯化后的病毒后细胞没存活	在转染细胞前将纯化后的病毒透析到 PBS 或需要的缓冲液中。

杭州倍沃医学科技有限公司

www.beiwobiomedical.com

400-115-2855

market@beiwobiomedical.com