

Code No. 6235

研究用

Takara

AAVpro[®] Extraction Solution

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	2
● 制品内容	2
● 保 存	2
● 试剂盒外所需主要试剂及器具	2
● 操作方法	2
● 参考数据	3
● 关联产品	5

Safety & Handling of Adeno-associated Virus Vectors

The protocols in this User Manual require the handling of adeno-associated virus vectors. It is imperative to fully understand the potential hazards of and necessary precautions for laboratory use of these vectors.

Viruses produced with AAV-based vectors could, depending on your gene insert, be potentially hazardous. Similar vectors have been approved for human gene therapy trials, attesting to their potential ability to express genes in vivo. For these reasons, due caution must be exercised in the production and handling of any recombinant viruses.

Follow all applicable guidelines for research involving recombinant DNA. Take appropriate safety measures when producing or handling recombinant adeno-associated viruses, including working in a biological safety cabinet and wearing protective laboratory coats, face protection, and gloves.

Available AAVpro Products

AAVpro [®] Helper Free System (AAV2)	Code No. 6230
AAVpro [®] Purification Kit (AAV2)	Code No. 6232
AAVpro [®] Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2	Code No. 6233
AAVpro [®] Packaging Plasmid (AAV2)	Code No. 6234
AAVpro [®] Extraction Solution	Code No. 6235
pAAV-ZsGreen1 Vector	Code No. 6231
AAVpro [®] Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase)	Code No. 6652
AAVpro [®] Helper Free System (AAV2-LacZ)	Code No. 6655
AAVpro [®] Tet-One™ Inducible Expression System (AAV2)	Code No. 634310

● 制品说明

腺相关病毒 (AAV) 是 *Dependovirus* 属 *Parvovirus* 家族的最小病毒之一。AAV 是单链线状 DNA 分子的无包膜病毒。AAV 有 100 多种血清型, 不同血清型病毒间的宿主特异性和特点有所不同。

腺相关病毒载体 (AAV 载体) 能够转基因进入细胞和生物体, 可用作研究工具和用于基因治疗的载体。

另外, AAV 载体较腺病毒载体和逆转录病毒载体更安全。

AAV 载体能用于转基因进入增殖和非增殖细胞, 以及在未分裂细胞内的长期表达, AAV 几乎没有致病性, 非常适用于转基因进入动物体内 (作为体内转导工具)。当使用 AAV 载体转基因进入动物体内时, 使用不含有细胞或培养基中杂质的高纯度病毒很重要。另外, 转染细胞时, 使用纯化后的 AAV 载体可以降低上述杂质的影响。

以往从产生 AAV 病毒的包装细胞中制备 AAV 病毒时, 通常使用冻融法或超声波破碎法, 但这些方法耗时且需要特殊设备。本制品是从产生 AAV 病毒的包装细胞中提取 AAV 病毒的试剂。AAVpro Extraction Solution 可高效、简便地分离 AAV 病毒颗粒, 本试剂加入到产生病毒的细胞中, 通过离心回收病毒。提取获得的病毒溶液含有非常低量的宿主细胞蛋白质和核酸污染。提取的病毒适用于细胞感染或进一步纯化等操作。

注意: 当使用 AAV2 载体转基因进入动物体内时, 使用不含有细胞或培养基中杂质的高纯度病毒很重要, 建议使用 AAVpro Purification Kit (AAV2) (Code No. 6232) 进行纯化。

● 制品内容

本制品是用于从产生 AAV 病毒细胞中提取病毒的试剂。

1. AAV Extraction Solution A	25 ml
2. AAV Extraction Solution B	2.5 ml

● 保存

室温。

● 试剂盒外所需主要试剂及器具

- 细胞培养的相关器具及设备
- 无菌离心管
- 无菌微型离心管
- 0.5 M EDTA (pH8.0) (EDTA Buffer Powder, pH8.0 (Code No. T9191))

● 操作方法

下面是从一个 10-cm 培养皿培养的产生 AAV 细胞中提取 AAV 病毒的操作方法。不同类型培养器皿所需的溶液体积请参考表 1。

1. 加入培养液体积 1/80 的 0.5 M EDTA (pH8.0) 到含 AAV 病毒细胞*的 10-cm 培养皿中。轻摇使液体混匀, 室温放置 10 分钟。
*: 按照标准方法培养细胞。
2. 剥离细胞, 收集到 15 ml 无菌离心管中。
3. $1,750 \times g$ 4°C 离心 10 分钟, 完全去除上清液后收集细胞沉淀。
注意: 尽量完全去除上清, 避免病毒分离受残留上清的影响。
4. 通过拍打管壁或振荡使得细胞沉淀松散开来。
注意: 如果细胞沉淀没有完全松散, 提取效率可能会降低。在进行下一步前, 要确认没有细胞结块。
5. 加入 0.5 ml AAV Extraction Solution A。
6. Vortex 振荡 15 秒使细胞沉淀充分悬浮。
7. 室温静置 5 分钟。Vortex 振荡 15 秒。
8. $2,000 \sim 14,000 \times g$ 4°C 离心 10 分钟。

注意：如果回收的 AAV2 病毒滴度低，可以通过重复 6~8 步骤以提高提取效率。

9. 收集上清液到新的无菌离心管中，加入 50 μ l AAV Extraction Solution B。

注意 1：混合物于 -80°C 保存。使用前于 37°C 水浴快速融解。

注意 2：在加入 AAV Extraction Solution B 后，上清液可能会变为粉色。

提取获得的 AAV 病毒可使用 AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) (Code No. 6233) 进行滴度测定。

表 1. 各种培养器皿所需的试剂加量

	Volume of Media	0.5 M EDTA (pH8.0)	AAV Extraction Solution A	AAV Extraction Solution B
6-cm dish	4 ml	50 μ l	200 μ l	20 μ l
10-cm dish	10 ml	125 μ l	500 μ l	50 μ l
15-cm dish	26 ml	325 μ l	1,300 μ l	130 μ l
T25 flask	4 ml	50 μ l	250 μ l	25 μ l
T75 flask	13 ml	162.5 μ l	650 μ l	65 μ l
T225 flask	40 ml	500 μ l	2,000 μ l	200 μ l

● 参考数据

1. 本制品与冻融方法比较 (1)

使用 AAVpro Helper Free System (AAV2) (Code No. 6230) 和 pAAV-ZsGreen1 vector (Code No. 6231) 制备产生表达 ZsGreen1 的 AAV2 病毒的 HEK293 细胞，利用 AAV Extraction Solution 方法或冻融方法提取细胞中的 AAV2 病毒。病毒提取溶液的滴度通过病毒基因组检测法 (Real Time PCR) 和生物学滴度测定法 (HT1080 cells) 测定。使用 AAV Extraction Solution 提取病毒获得 AAV2 病毒滴度更高。

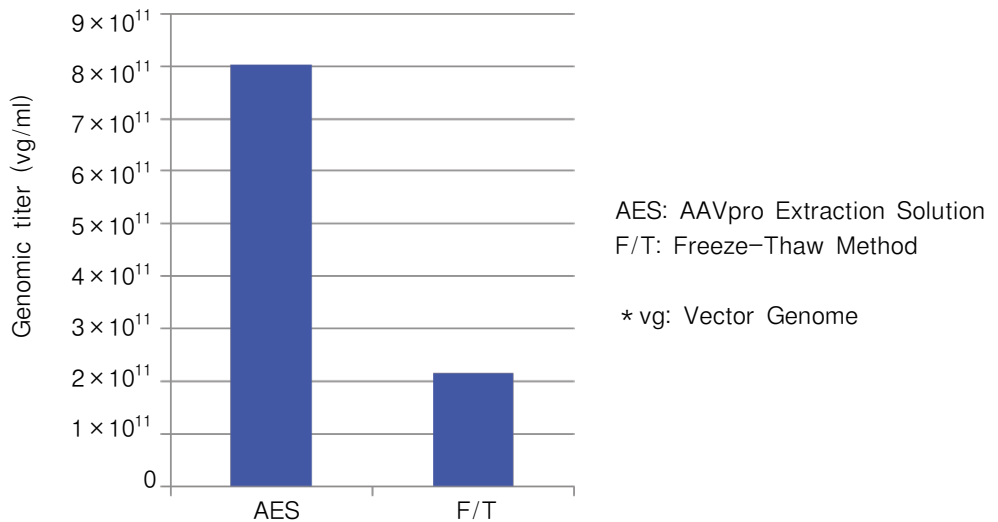


图 1A. 病毒基因组检测

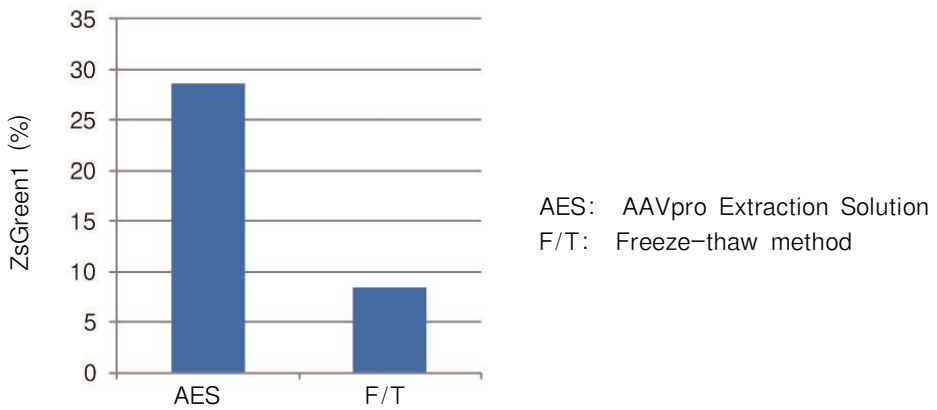


图 1B. 生物学滴度检测

2. 本制品与冻融方法比较 (2)

在 5 个 T225 培养瓶中培养 AAV2 病毒包装细胞, 用 Extraction Solution A 和 B 或冻融方法提取 AAV2 病毒。使用 Real Time PCR 方法测定 AAV2 提取液中的病毒基因组。然后, 采用 SDS-PAGE 方法分析相当于 1×10^9 vg 的 AAV2 病毒提取液, 来评估蛋白质纯度 (图 2A)。另外, 残留的 dsDNA 浓度采用 intercalation 方法检测 (图 2B)。结果表明, 使用 AAV Extraction Solution 明显降低了蛋白质杂质的量和 dsDNA 量。

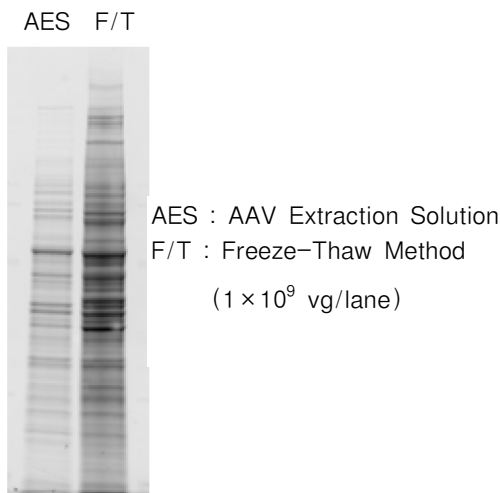


图 2A. AAV2 提取液的 SDS-PAGE 电泳结果

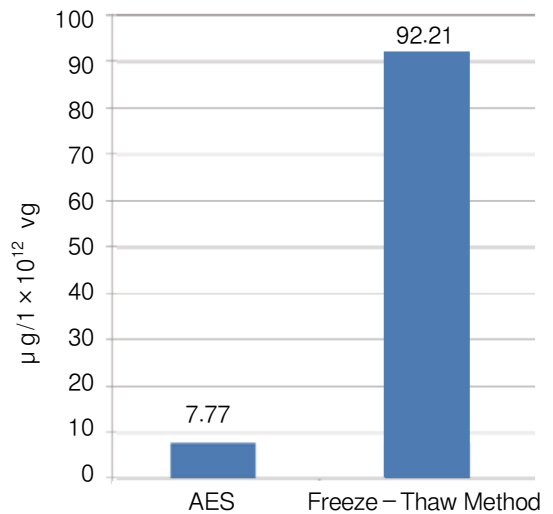


图 2B. AAV2 提取液的 dsDNA 量

3. 提取血清型 1、2 和 6 型 AAV 病毒

制备产生 1、2 和 6 型 AAV 病毒的 HEK293 细胞, 使用 AAVpro Extraction Solution 方法或冻融方法提取细胞中的 AAV 病毒。使用 AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (Code No. 6233) 测定病毒滴度。结果表明, AAVpro Extraction Solution 能有效提取 1、2 和 6 型 AAV 病毒。

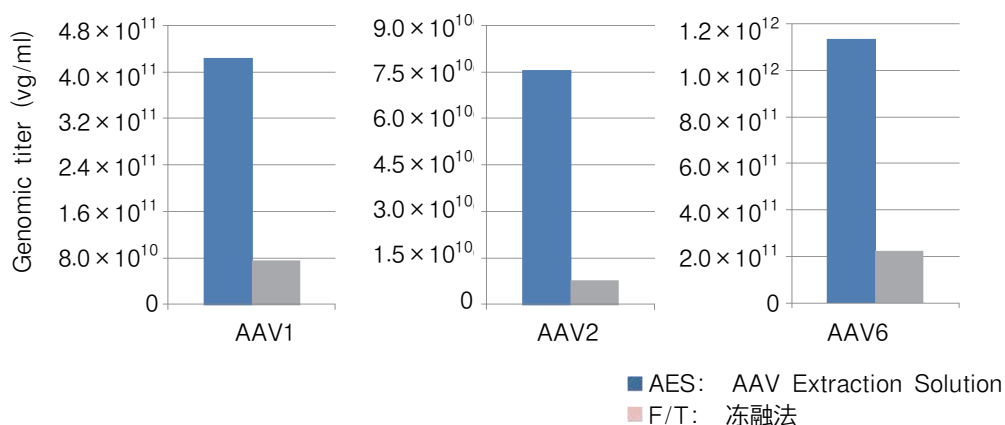


图 3. 使用 AAVpro Extraction Solution 方法或冻融方法提取的 AAV 病毒的滴度

● 关联产品

- AAVpro[®] Helper Free System (AAV2) (Code No. 6230)
- pAAV-ZsGreen1 Vector (Code No. 6231)
- AAVpro[®] Purification Kit (AAV2) (Code No. 6232)
- AAVpro[®] Titration Kit (for Real Time PCR) (Code No. 6233)
- AAVpro[®] Packaging Plasmid (AAV2) (Code No. 6234)
- AAVpro[®] Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase) (Code No. 6652)
- AAVpro[®] Helper Free System (AAV2-LacZ) (Code No. 6655)
- AAVpro[®] Tet-One™ Inducible Expression System (AAV2) (Code No. 634310)

AAVpro is a registered trademark of TAKARA BIO INC.

Tet-One is a trademark of Clontech Laboratories, Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联系我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 TAKARA BIO INC.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takara.com.cn>

v201702Da