

Code No. 6674

研究用

Takara

AAVpro[®] Concentrator

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	2
● 制品内容	3
● 保 存	3
● 试剂盒外所需主要试剂及器具	3
● 操作方法	3
● 实 验 例	4
● 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

● 制品说明

腺相关病毒 (AAV) 是 *Dependovirus* 属 *Parvovirus* 家族的最小病毒之一，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不同。

腺相关病毒载体 (AAV 载体) 利用 AAV 的特性将基因转导到细胞和生物体中。AAV 载体被用作研究工具和基因治疗的载体。另外，AAV 载体通常被认为比腺病毒载体和逆转录病毒载体更安全。

AAV 载体可用于转导基因进入增殖和非增殖细胞，并能在非分裂细胞内长期表达。此外，AAV 的免疫原性低，适用于基因转导进入动物体内 (作为体内转导工具)。但是，由于 AAV 载体的导入量与所使用的导入方法、目标动物 (如常用的小鼠，由于个体很小，所以转入量受限) 有关，因此在使用 AAV 载体进行转导实验时需要使用高度浓缩的 AAV 载体。

在 AAV 载体制备和纯化的过程中，可能需要浓缩病毒颗粒或者置换缓冲液。AAVpro Concentrator 是一种可以轻松高效地浓缩 AAV 载体的试剂，可用于多种目的，例如浓缩 AAV 载体培养上清液 (有无血清均可) 或者置换 AAV 载体溶液的缓冲液。

制品特长：

- 适用于各种 AAV 血清型
- 高回收率
- 无需复杂操作过程
- 包含浓缩 AAV 载体所需要的全部缓冲液
- 浓缩效果不受有无血清的影响

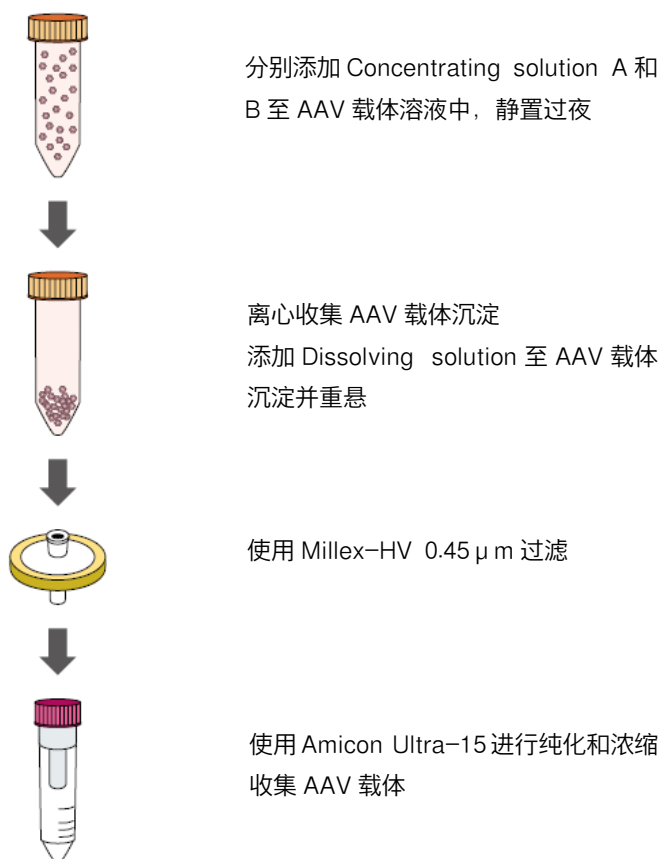


图 1. 使用 AAVpro Concentrator 进行 AAV 载体浓缩的操作概览

● 制品内容 (2 rxns)

本产品含有 2 次用于 150 ml 溶液起始进行 AAV 载体浓缩所需的 buffer 和浓缩 Column。

1. Concentrating solution A	16 ml
2. Concentrating solution B	80 ml
3. Dissolving solution	16 ml
4. Washing solution	30 ml × 2
5. Millex-HV 0.45 μm	4
6. Amicon Ultra-15, 100 kDa	2

● 保 存

Concentrating solution B 4°C
其他组分 室温

● 试剂盒外所需主要器具

- 细胞培养相关的器具及设备
- 自锁式注射器
- 涡旋振荡器

● 操作方法: 150 ml AAV 载体溶液起始的浓缩

AAV 载体溶液不足 150 ml 时, 请根据 AAV 载体溶液的实际起始量按比例调整步骤 1 和步骤 2 中试剂加量。(例如: AAV 载体溶液为 75 ml 时, Concentrating solution A 和 B 的加量调整为 1/2 量。)

1. 添加 8 ml Concentrating solution A (约稀释 20 倍) 到 150 ml 的 AAV 载体溶液中, vortex 振荡使其充分混匀。

【注】没有大容量的离心机时, 在进行步骤 2 前将样品分装到适合离心机的离心管中, 然后再进行步骤 2。

2. 添加 40 ml Concentrating solution B, vortex 振荡充分混匀后, 转移至离心管, 4°C 静置过夜。
3. 确认步骤 2 中的离心管管底有白色沉淀。

【注】样品中含有 EDTA 时可能看不到白色沉淀, 请正常进行步骤 4。

4. 2,000g 4°C 离心 50 分钟后, 小心去除上清。
5. 添加 8 ml Dissolving solution 到沉淀中, 移液器吸打使沉淀重悬。混匀后, 转移至新的离心管中。
6. Vortex 振荡 15 秒后, 室温静置 15 分钟。再 vortex 振荡 15 秒。
7. 悬浊液 2,000g 4°C 离心 15 分钟后, 将上清 (含 AAV) 转移到新的离心管中, 再次 2,000g 4°C 离心 15 分钟。小心回收上清, 使用 Millex-HV 0.45 μm 滤膜过滤。

【注】使用 1 个 Millex-HV 0.45 μm 过滤时可能会出现由于滤膜堵塞, 导致 1 个滤膜不能过滤全部溶液的情况, 此时请再使用一个新的 Millex-HV 0.45 μm 滤膜过滤。

8. 将步骤 7 中得到的 AAV 载体溶液添加到 Amicon Ultra-15, 100 kDa 中, 2,000g 15°C 离心 10 分钟。确认 AAV 载体溶液在 1.5 ml 以下。

【注 1】: 建议使用水平转子。使用固定的角转子时, 请将 Amicon filter unit membrane panel 朝上放置在桶中。

【注 2】: AAV 载体溶液不在 1.5 ml 以下时, 重悬 Amicon filter 中的 AAV 载体溶液再次离心。

9. 去除滤液后, 加入 10.5 ml 的 Washing solution 到 Amicon filter 中, 移液器吸打混匀后, 2,000g 15°C 离心 10 分钟。确认 AAV 载体溶液的体积在 1.5 ml 以下。

【注 1】: 建议使用水平转子。使用固定的角转子时, 请将 Amicon filter unit membrane panel

朝上放置在桶中。

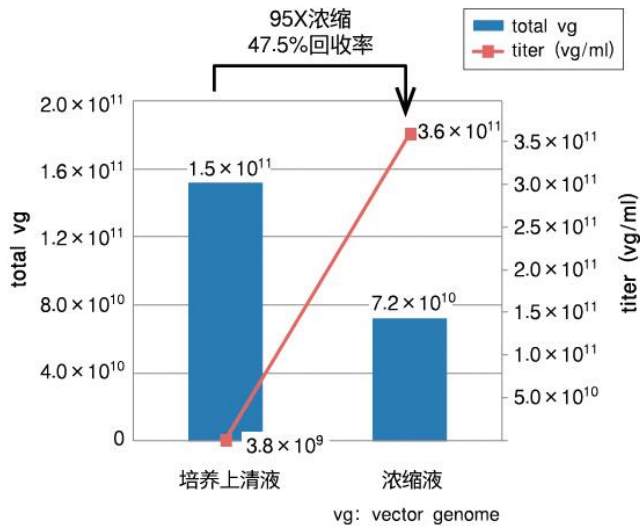
【注2】: AAV 载体溶液不在 1.5 ml 以下时, 重悬 Amicon filter 中的 AAV 载体溶液再次离心。

10. 将步骤 9 的操作重复 2 次, 最终浓缩到需要的体积。
11. 去除滤液后, vortex 振荡 30 秒, 或者使用移液器吸打使其充分混匀, 然后将 Amicon Ultra-15, 100 kDa 中的 AAV 载体溶液转移到反应管中。

● 实验例

1. 从无血清培养上清液中浓缩 AAV 载体

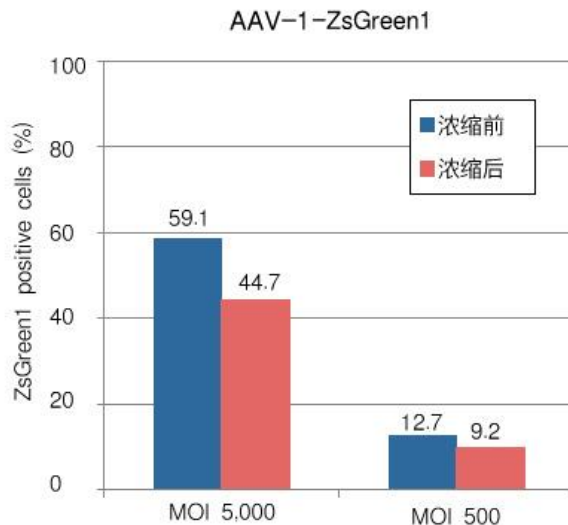
使用本制品将产生携带荧光蛋白质ZsGreen1的AAV1载体细胞培养上清液, 从40 ml (1个T225培养瓶量) 浓缩至200 μ l。然后使用AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (Code No. 6233) 测定滴度, 并确认回收率。



2. 评估浓缩后 AAV 载体的感染性

使用浓缩前后的 AAV1-ZsGreen1 载体感染 HT1080 细胞来评估感染性。

以 5,000 vg/细胞和 500 vg/细胞的 AAV 载体感染 HT1080 细胞, 并在 3 天后通过流式细胞术进行分析。结果证明, 使用 AAVpro Concentrator 浓缩后的 AAV 载体仍然保持其感染性。



● 关联产品

AAVpro[®] Helper Free System (AAV1) (Code No. 6673)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV2) (Code No. 6230)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV5) (Code No. 6650)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV6) (Code No. 6651)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV1-CRE Recombinase) (Code No. 6668)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase) (Code No. 6652)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV5-CRE Recombinase) (Code No. 6653)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV6-CRE Recombinase) (Code No. 6654)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV1-LacZ) (Code No. 6669)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV2-LacZ) (Code No. 6655)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV5-LacZ) (Code No. 6656)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV6-LacZ) (Code No. 6657)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV1-U6-ZsGreen1) (Code No. 6670)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV2-U6-ZsGreen1) (Code No. 6658)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV5-U6-ZsGreen1) (Code No. 6659)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV6-U6-ZsGreen1) (Code No. 6660)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV1-2xU6) (Code No. 6671)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV2-2xU6) (Code No. 6661)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV5-2xU6) (Code No. 6662)
AAVpro[®] Helper Free System (AAV6-2xU6) (Code No. 6663)
AAVpro[®] Packaging Plasmid (AAV1) (Code No. 6672)
AAVpro[®] Packaging Plasmid (AAV2) (Code No. 6234)
AAVpro[®] Packaging Plasmid (AAV5) (Code No. 6664)
AAVpro[®] Packaging Plasmid (AAV6) (Code No. 6665)
pAAV-ZsGreen1 Vector (Code No. 6231)
AAVpro[®] 293T Cell Line (Code No. 632273)
AAVpro[®] Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (Code No. 6233)
AAVpro[®] Purification Kit (All Serotypes) (Code No. 6666)
AAVpro[®] Purification Kit (AAV2) (Code No. 6232)
AAVpro[®] Tet-One™ Inducible Expression System (AAV2) (Code No. 634310)
AAVpro[®] CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2) (Code No. 632608)
AAVpro[®] CRISPR/Cas9 Vector System (Code No. 632609)

AAVpro is a registered trademark of Takara Bio Inc.

Tet-One is a trademark of Takara Bio USA, 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，请联络我们，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: <https://www.takarabiomed.com.cn>