

Code No. 6675

研究用

TAKARA

AAVpro[®] Purification Kit Midi
(All Serotypes)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 简介	2
● 制品说明	2
● 制品内容	3
● 保存	4
● 试剂盒外所需主要试剂及器具	4
● 操作方法	4
● 实验例	5
● 关联产品	6

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.

● 简介

腺相关病毒 (AAV) 是 *Dependovirus* 属 *Parvovirus* 家族的无包膜病毒。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。AAV 对人无致病性, 只有在辅助病毒如腺病毒或疱疹病毒存在下才能复制。AAV 基因组是约 4.7 kb 的单链线状 DNA 分子。

腺相关病毒载体 (AAV 载体) 能够转导基因进入细胞和生物体, 可用作研究工具和基因治疗的载体。另外, AAV 载体较腺病毒载体和逆转录病毒载体更安全。AAV 载体能用于转导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 很少有免疫原性, 非常适用于转导基因进入动物体内 (作为体内转导工具)。

● 制品说明

在使用 AAV 病毒体感染动物和培养细胞进行外源性基因稳定表达研究时, 需要使用高纯度、高滴度的 AAV 病毒。AAV 病毒的制备及纯化通常采用 CsCl 密度梯度离心法和碘克沙醇梯度离心法。但这两种方法不仅需要操作技术熟练、同时还存在耗时和回收率低等问题。

AAVpro Purification Kit Midi (All Serotypes) 是一种仅需 4 小时就可以从 AAV 病毒包装细胞中简便纯化 AAV 病毒的试剂盒。

注意: 本试剂盒用于从 1 个 T225 培养瓶的包装细胞中纯化 AAV 病毒。而 AAVpro Purification Kit Maxi (All Serotypes) (Code No. 6666) 用于从 5 个 T225 培养瓶的包装细胞中纯化 AAV 病毒。两个试剂盒 (6675 & 6666) 所包含组分均为 4 次纯化用量。

本制品特点

- 适用于各种 AAV 血清型
- 高纯度、高回收率
- 无需进行超离心等繁琐操作。
- 附带从病毒包装细胞中纯化 AAV 病毒所需的所有 Buffer。

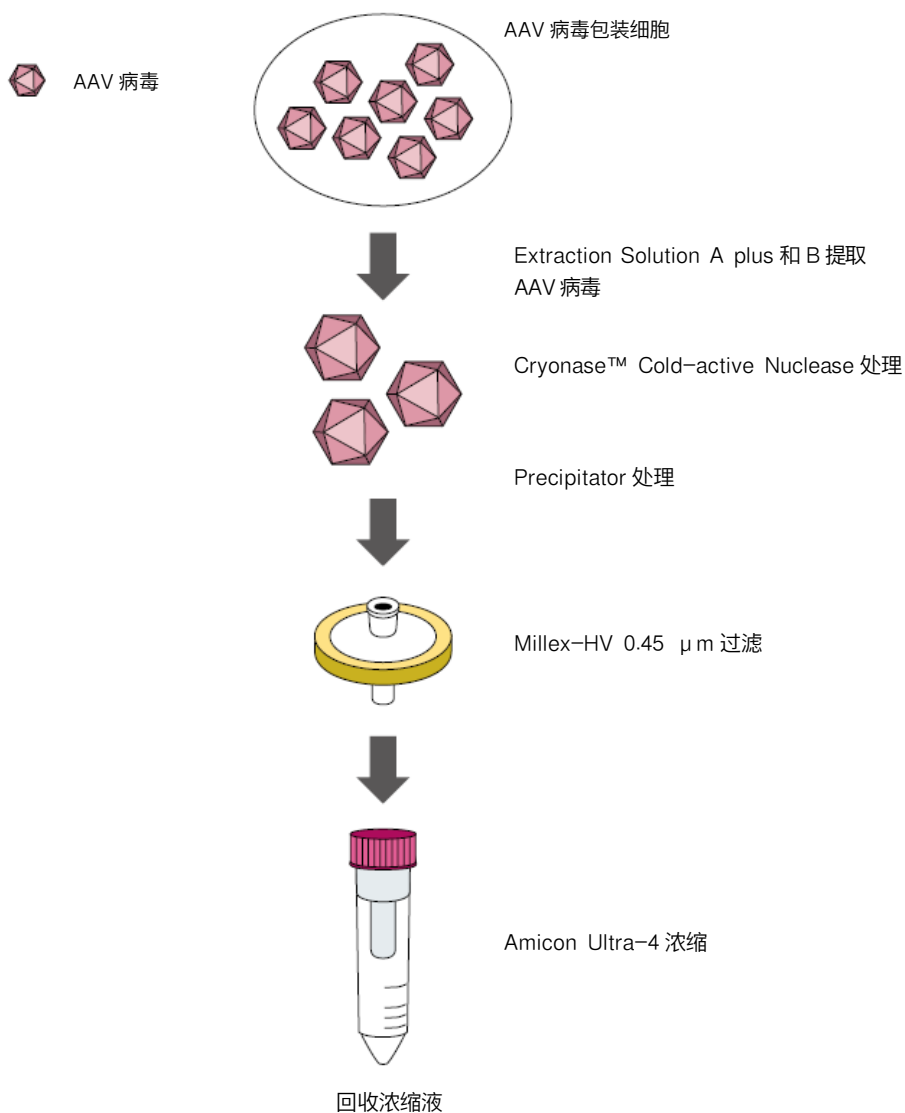


图 1. 使用 AAVpro Purification Kit Midi (All Serotypes) 纯化 AAV 病毒

● 制品内容

本制品所含的缓冲液及浓缩柱足够从 1 个 T225 培养瓶的包装细胞中纯化 AAV 病毒的 4 次用量。

1. AAV Extraction Solution A plus	4.4 ml \times 2
2. AAV Extraction Solution B	0.9 ml
3. Cryonase Cold-active Nuclease	100 μl
4. Precipitator A*	1 ml
5. Precipitator B	0.5 ml
6. Millex-HV 0.45 μm	4
7. Amicon Ultra-4, 100 kDa	4
8. Suspension Buffer	12 ml \times 2

*: Precipitator A 低温保存时可能会产生白色沉淀，不影响制品的品质和性能。产生沉淀时，37°C 水中加热使其完全溶解后再使用。

● 保存

Cryonase Cold-active Nuclease: -20°C

其他组份: 室温

● 试剂盒外所需主要试剂及器具

- 细胞培养所需设备
- 注射器
- 0.5 M EDTA (pH8.0) [e.g., EDTA Buffer Powder, pH8.0 (Code No. T9191)]

● 操作方法

以下是从 1 个 T225 培养瓶的包装细胞中纯化 AAV 病毒的操作流程。建议使用 AAVpro Helper Free System (Code No. 6230, 6650~6663, 6668~6671, 6673) 制备 AAV 病毒。

I. AAV 提取液的制备

本制品通过使用特别开发的 AAV Extraction Solution A Plus 及 AAV Extraction Solution B 从 AAV 载体包装细胞中提取病毒, 不需使用常规的冻融法、超声破碎法。通过使用以上溶液可以抑制宿主来源的蛋白质及核酸的混入, 从而简便地提取 AAV。

1. 加入培养液体积 1/80 的 0.5 M EDTA (pH8.0) 至含有 AAV 包装细胞的培养液中, 充分混匀。室温反应 10 分钟。
2. 从培养瓶中回收细胞到离心管中。
3. 1,700~2,000 *g*, 4°C 离心 10 分钟后, 除去上清。
4. 1,700~2,000 *g*, 4°C 离心 1 分钟, 完全除去上清。
注: 尽量完全去除上清, 避免病毒纯化受残留上清的影响。
5. 通过拍打管壁或振荡使得细胞沉淀松散开来。
注: 如果细胞沉淀没有完全松散, 纯化效率可能会降低。在进行下一步前, 要确认没有细胞结块。
6. 加入 2 ml AAV Extraction Solution A plus。
7. Vortex 振荡 15 秒使细胞充分悬浮。
注: 振荡悬浮至没有细胞结块。
8. 室温静置 5 分钟后, vortex 振荡 15 秒。
9. 4,000~9,000 *g*, 4°C 离心 10 分钟。
注: 重复上述 7.-9. 操作, 可能提高效率。
10. 回收上清液到新的灭菌离心管中, 避免污染。加入上清液量 1/10 的 AAV Extraction Solution B。
注 1: 此时可将溶液 -80°C 保存。如果不保存, 请立即进行 II-1 的操作。如果于 -80°C 保存, 使用前于 37°C 水浴快速融解。 -80°C 保存病毒悬液时, 请使用对冻结和离心耐受性好的 tube。
注 2: 在加入 AAV Extraction Solution B 后, 上清液可能会变为粉色, 不影响性能。

II. AAV 病毒的纯化、浓缩

注意: II-5, II-6, II-7 等操作请使用 swinging bucket rotors。

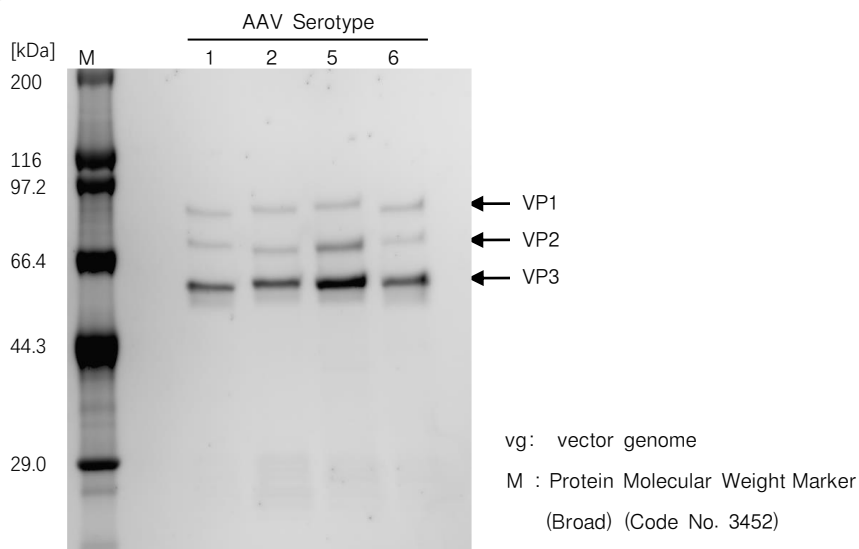
1. 向 I-10. 的溶液中加入 1/100 量 (终浓度 200 U/ml) 的 Cryonase Cold-active Nuclease, 37°C 反应 1 小时。
2. 加入 1/10 量的 Precipitator A, 振荡混合 10 秒后, 37°C 反应 30 分钟, 再振荡混合 10 秒。
注 1: Precipitator A 低温保存时可能会产生白色沉淀, 不影响制品的品质及性能。此时, 只需将试剂在 37°C 下充分溶解即可使用。
注 2: 反应过程中产生沉淀对实验本身没有影响, 可直接进入下一步操作。
3. 加入 1/20 量的 Precipitator B, 迅速振荡混合 10 秒钟, 5,000~9,000 *g* 4°C 离心 5 分钟。
注: 加入 Precipitator B 会产生沉淀, 要进行离心。

- 使用Millex-HV 0.45 μm滤膜过滤上清。
- 将过滤后的AAV溶液加入到Amicon Ultra-4, 100 kDa滤器中, 2,000 g 15°C离心5分钟, 确认滤杯中 AAV溶液少于0.4 ml。
注: AAV溶液体积大于0.4 ml时, 继续离心。
- 去除滤液后, 在Amicon Ultra-4滤杯中加入1 ml的Suspension Buffer, 吸打使溶液混匀, 2,000 g 15°C离心5分钟。确认滤杯中AAV溶液少于1.5 ml。
注: AAV溶液大于1.5 ml时, 继续离心。
- II-6.操作重复4次(总计5次), 最终离心浓缩到合适的体积。
- 去除滤液, 吸打或振荡30秒使其充分悬浮, 然后将Amicon Ultra-4, 100 kDa滤杯中的AAV溶液转移到新tube中。

● 实验例

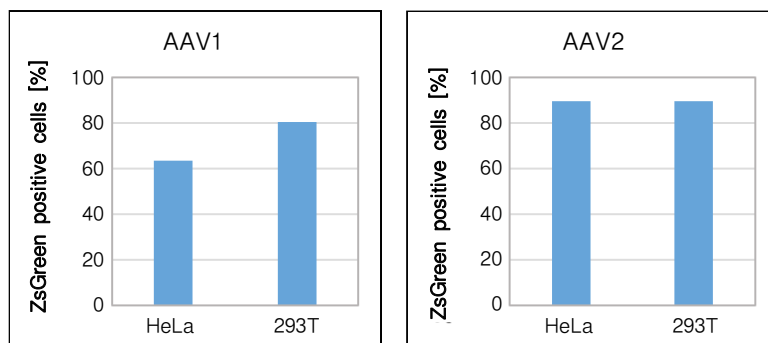
1. 纯化后的各血清型 AAV 纯度测定

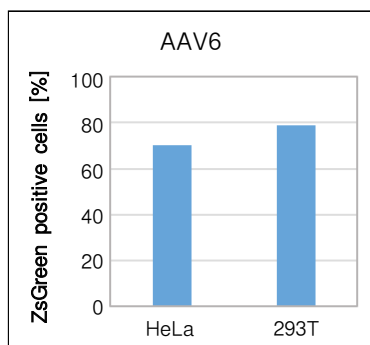
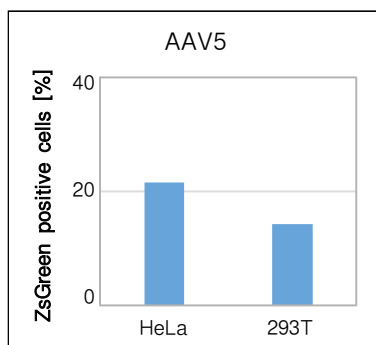
使用本试剂盒, 从1瓶 T225 培养瓶的含荧光蛋白 ZsGreen1 的各血清型 AAV 包装细胞中纯化 AAV 病毒。然后, 使用 AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (Code No. 6233) 测定病毒滴度, 以 1×10^9 vg/lane 上样量进行 SDS-PAGE 电泳。结果显示, 能够确认到以 AAV 衣壳蛋白 (VP1、VP2、VP3) 为主的电泳条带。



2. 纯化后 AAV 病毒的感染力评价

使用在1.获得的各血清型的AAV, 对各细胞株的感染滴度进行了评价。纯化后的AAV以5,000 vg/cell (血清型1、2、6)、或50,000 vg/cell (血清型5) 感染细胞, 3天后进行了流式细胞仪分析。结果证实, 使用本试剂盒纯化的AAV保持着感染力。





● 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. 6272)
 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[®] Purification Kit Maxi (All Serotypes) (Code No. 6666)
 AAVpro[®] Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (Code No. 6233)
 AAVpro[®] Concentrator (Code No. 6674)
 AAVpro[®] 293T Cell Line (Code No. 632273)
 EDTA Buffer Powder, pH8.0 (Code No. T9191)

AAVpro is a registered trademark of Takara Bio Inc.

Cryonase is a trademark of Takara Bio 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>

v202004Da