

Code No. 6676–6678

研究用

---

# TAKARA

AAVpro® Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes)  
(Code No. 6676)

AAVpro® Cell & Sup. Extraction/Concentration Pack Maxi  
(All Serotypes) (Code No. 6677)

AAVpro® Purification Pack Maxi (All Serotypes)  
(Code No. 6678)

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 简介	2
● 制品说明	2
● 制品内容	4
● 保存	4
● 试剂盒外所需主要器具	4
● 操作方法	5
● 实验例	6
● 关联产品	8
● 注意事项	9

### **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。AAV 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。

使用 AAVpro Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes) 在大约 7 小时就可以从 AAV 包装细胞和培养上清液中简便快速纯化 AAV。

### 本制品特点

- 同时从 AAV 包装细胞和培养上清液中获得高纯度、高回收率的 AAV
- 适用于各种 AAV 血清型
- 特别的 AAV 提取方法, 节省时间, 无需反复冻融或超声等耗时步骤
- 无需进行超速离心等繁琐操作
- 附带纯化 AAV 所需的所有 Buffer

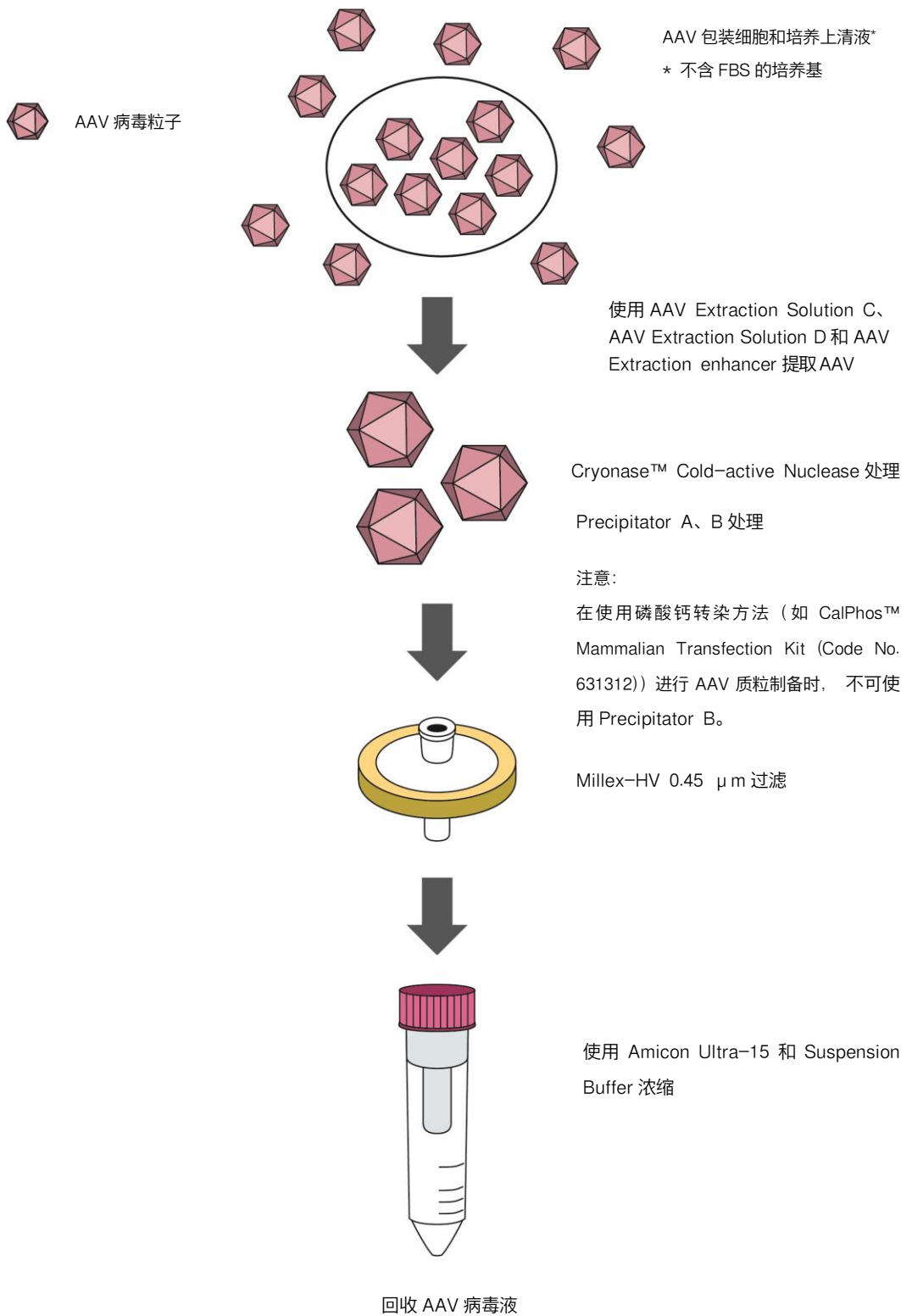


图 1. 使用 AAVpro Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes) 纯化 AAV

## ● 制品内容

- AAVpro Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes) (Code No. 6676)包含 AAVpro Cell & Sup. Extraction/Concentration Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6677)和 AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6678)。

本制品所含的缓冲液及浓缩柱足够从 5 个 T225 培养瓶的包装细胞和培养上清液中纯化 AAV 的 4 次用量。

- 6677 和 6678 可以单独购买。

### AAVpro Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes) (Code No. 6676)

AAVpro Cell & Sup. Extraction/Concentration Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6677)

AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6678)

### AAVpro Cell & Sup. Extraction/Concentration Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6677)

AAV Extraction Solution C	8 ml
AAV Extraction Solution D	32 ml
AAV Extraction enhancer	80 ml
Concentrating solution*1	115 ml x 2
Dissolving solution	50 ml

### AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6678)

Precipitator A*2	5 ml
Precipitator B	2.5 ml
Millex-HV 0.45 μm	4 pcs
Amicon Ultra-15, 100 kDa	4 pcs
Suspension Buffer	60 ml x 2
Cryonase Cold-active Nuclease	500 μl

\*1: Concentrating solution 4°C保存时可能会产生沉淀，不影响制品的品质和性能。产生沉淀时，请于 40°C水浴中加热使其完全溶解后再使用。

\*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，请于 37°C水浴中加热使其完全溶解后再使用。

## ● 保存

AAVpro Cell & Sup. Extraction/Concentration Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6677)

Concentrating solution: 4°C

其他组份: 室温

AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6678)

Cryonase Cold-active Nuclease: -20°C

其他组份: 室温

## ● 试剂盒外所需主要器具

- 细胞培养所需设备
- 注射器

## ● 操作方法

以下是从 5 个 T225 培养瓶的包装细胞中纯化 AAV 的操作流程，每个培养瓶中含 40 ml 培养基。

### I. 操作注意事项

- 转染 AAV 质粒进入细胞时，推荐使用 *TransIT-VirusGEN Transfection Reagent* (Mirus Bio: Code. MIR6700, MIR6703 –MIR6706), *TransIT-293 Transfection Reagent* (Mirus Bio: Code. MIR2700, MIR2704 –MIR2706), 或 *CalPhos Mammalian Transfection Kit* (Code No. 631312)等。

当使用其他转染试剂 (PEI, etc.) 时，请进行预实验以确认其适用于本试剂盒。

**当使用 CalPhos Mammalian Transfection Kit (Code No. 631312)或其他磷酸钙转染试剂进行 AAV 质粒转染时，不可进行 III. AAV 的纯化、浓缩中的 III-3 和 III-4 两个步骤。**

- 用于提取和纯化 AAV 病毒的 AAV 包装细胞在转染 AAV 质粒载体后，需要使用不含胎牛血清 (FBS) 的培养基 (DMEM 等) 培养 3~5 天。(请避免使用含血清的培养基，因为它会降低病毒纯化的效率。)
- 推荐使用 AAVpro Helper Free System (Code No. 6230, 6650 – 6663, 6668 – 6671, 6673)制备 AAV。使用这些试剂盒时，AAV 包装细胞在转染 AAV 质粒载体后，需要使用不含胎牛血清 (FBS) 的培养基 (DMEM 等) 培养 3~5 天。
- 如果 AAV 在浓缩步骤 (III-7) 被过度浓缩，可能会难以溶解。注意确保 AAV 在离心时不被过度浓缩。
- 如果想在纯化前确定病毒产量，建议使用少量 AAV 病毒提取物 (II-4 上清液) 进行滴度测定，测定 AAV 滴度时可使用 AAVpro Titration Kit (for Real-Time PCR) Ver. 2 (Code No. 6233)

### II. AAV 提取液的制备

使用本试剂盒从 AAV 包装细胞中制备 AAV 提取液，AAV Extraction Solution C, AAV Extraction Solution D, and AAV Extraction enhancer 可以直接添加到含 AAV 包装细胞和培养基的培养瓶中。在从 AAV 包装细胞和培养上清液中回收 AAV 的同时，可以使用 Concentration solution 进行 AAV 的浓缩。

1. 在含有 AAV 包装细胞和培养液 (40 ml) 的 T225 培养瓶中，加入培养液体积 1/100 (0.4 ml) 的 AAV Extraction Solution C 和 1/25 (1.6 ml) 的 AAV Extraction Solution D，轻柔混匀，室温反应 10 分钟。
2. 再加入培养液体积 1/10 (4 ml) 的 AAV Extraction enhancer，轻柔混匀。
3. 室温反应 30 分钟，从培养瓶中回收含细胞结块在内的全部溶液到离心管中。
4. 2,000g, 4°C 离心 10 分钟后，回收上清液。
  - 注1: 如果没有足够大容量的离心机，将上清液分到几个离心管中继续进行步骤 II-5。
  - 注2: 为了确定病毒产量，建议保存部分上清液。AAVpro Titration Kit (for Real-Time PCR) Ver.2 (Code No. 6233) 可用于测定 AAV 的滴度。
5. 加入上清液体积 1/4 的 Concentrating solution 至 II-4 步骤的上清液中，混合均匀，4°C 反应 2-3 小时。
  - 注: 推荐 4°C 反应 2-3 小时，也可以过夜反应。
6. 2,000g, 4°C 离心 10 分钟，除去上清液。
7. 再次离心，彻底去除残留上清液。
8. 加入 Dissolving solution (II-4 上清液体积 1/20) 至 II-7 沉淀中，通过移液枪吸打重悬沉淀。
  - 注: 在进行下一步前，要确认没有结块。
9. 室温反应 15 分钟，振荡混合 15 秒。
10. 2,000g, 4°C 离心 10 分钟。
11. 转移上清液至新的无菌离心管中。
  - 注: 确保没有杂质随同上清液一起转移。

### III. AAV的纯化、浓缩

注意：III-7, III-8, III-9操作步骤请使用swinging bucket rotors。

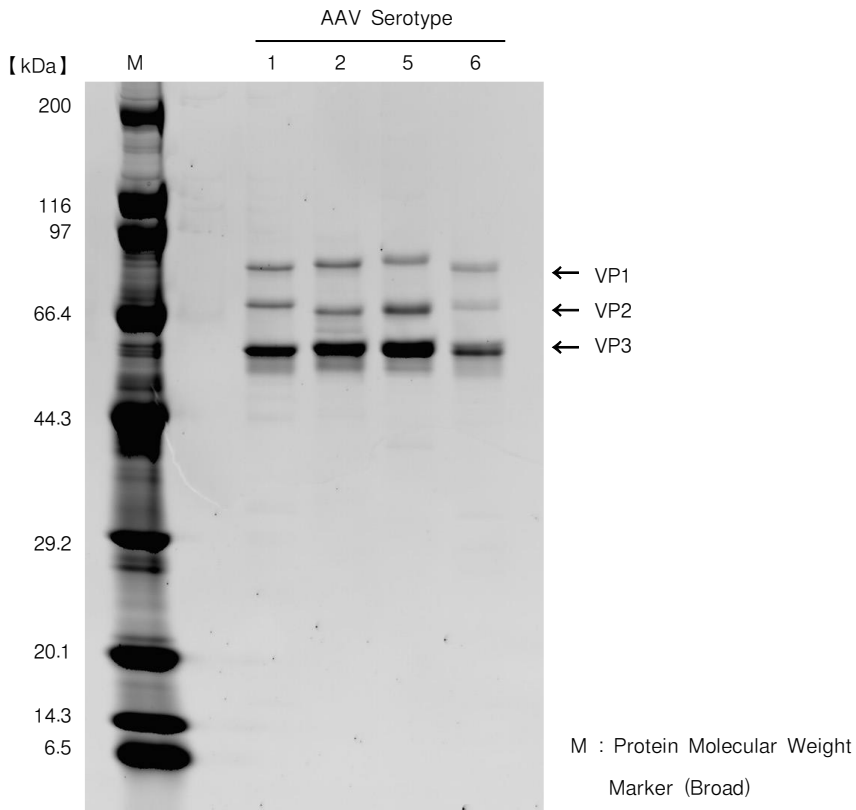
1. 向II-11的溶液中加入1/100体积量的Cryonase Cold-active Nuclease (终浓度200 U/ml), 37°C反应1小时。
2. 加入III-1溶液体积1/10的Precipitator A, 振荡混合10秒。  
注1: 当使用CalPhos Mammalian Transfection Kit (Code No. 631312)或其他磷酸钙转染试剂转染AAV质粒时, 需跳过III-3和III-4步骤, 直接进行III-5步骤。  
注2: Precipitator A低温保存时可能会产生白色沉淀, 不影响制品的品质及性能。此时, 只需将试剂在37°C下充分溶解即可使用。  
注3: 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. 37°C反应30分钟, 再振荡混合10秒。
4. 加入III-3溶液体积1/20的Precipitator B, 迅速振荡混合10秒钟。
5. 5,000~9,000g 4°C离心5分钟, 回收上清液。  
注: 如果回收的上清液中含有沉淀, 再次离心以尽可能去除沉淀。
6. 使用Millex-HV 0.45 μm滤膜过滤上清。
7. 将过滤后的AAV溶液加入到Amicon Ultra-15, 100 kDa滤器中, 2,000g 15°C离心5分钟, 确认滤杯中AAV溶液少于1.5 ml。  
注1: 为避免过度浓缩AAV溶液, 短时(大约1-2分钟)离心, 在确定AAV溶液体积后调整离心次数。  
注2: AAV溶液体积大于1.5 ml时, 继续离心。
8. 去除滤液后, 在Amicon Ultra-15 filter unit 滤杯中加入5 ml的Suspension Buffer, 吸打使溶液混匀, 2,000g 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。
9. III-8.操作重复4次(总计5次), 最终离心浓缩到合适的体积。  
注: 如果AAV溶液浓缩过多, AAV颗粒可能变得难溶解。进行离心浓缩时, 适时停止离心, 试着吸打AAV溶液以确保AAV颗粒没有变得难溶解。
10. 去除滤液, 吸打或振荡Amicon Ultra-15, 100 kDa滤杯中的液体30秒使病毒充分悬浮, 然后将滤杯中的AAV溶液转移到新tube中。  
注: 为避免反复冻融AAV溶液, 建议-80°C分装保存。

### ● 实验例

#### 1. 纯化后的各血清型 AAV 纯度测定

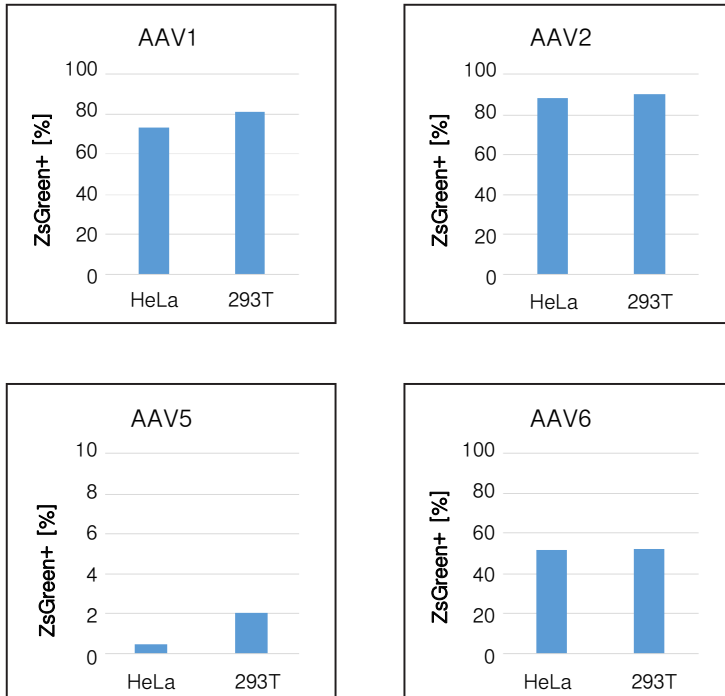
使用本试剂盒, 从含荧光蛋白质 ZsGreen1 的各血清型 AAV (1、2、5、6) 包装细胞中纯化 AAV。然后, 使用 AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (Code No. 6233) 测定病毒滴度, 以  $1 \times 10^9$  vg/lane 上样量进行 SDS-PAGE 电泳。结果显示, 能够确认到以 AAV 衣壳蛋白 (VP1、VP2、VP3) 为主的电泳条带。





## 2. 纯化后 AAV 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50,000 vg/cell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<sup>®</sup> Helper Free System (AAV1) (Code No. 6673)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2) (Code No. 6230)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV5) (Code No. 6650)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV6) (Code No. 6651)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV1-CRE Recombinase) (Code No. 6668)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase) (Code No. 6652)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV5-CRE Recombinase) (Code No. 6653)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV6-CRE Recombinase) (Code No. 6654)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV1-LacZ) (Code No. 6669)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-LacZ) (Code No. 6655)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV5-LacZ) (Code No. 6656)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV6-LacZ) (Code No. 6657)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV1-U6-ZsGreen1) (Code No. 6670)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-U6-ZsGreen1) (Code No. 6658)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV5-U6-ZsGreen1) (Code No. 6659)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV6-U6-ZsGreen1) (Code No. 6660)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV1-2xU6) (Code No. 6671)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV2-2xU6) (Code No. 6661)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV5-2xU6) (Code No. 6662)  
AAVpro<sup>®</sup> Helper Free System (AAV6-2xU6) (Code No. 6663)  
pAAV-ZsGreen1 Vector (Code No. 6231)  
AAVpro<sup>®</sup> Packaging Plasmid (AAV1) (Code No. 6672)  
AAVpro<sup>®</sup> Packaging Plasmid (AAV2) (Code No. 6234)  
AAVpro<sup>®</sup> Packaging Plasmid (AAV5) (Code No. 6664)  
AAVpro<sup>®</sup> Packaging Plasmid (AAV6) (Code No. 6665)

CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Code No. 631312)

AAVpro<sup>®</sup> 293T Cell Line (Code No. 632273)

AAVpro<sup>®</sup> Purification Kit Maxi (All Serotypes) (Code No. 6666)  
AAVpro<sup>®</sup> Purification Kit Midi (All Serotypes) (Code No. 6675)  
AAVpro<sup>®</sup> Extraction Solution (Code No. 6235)  
AAVpro<sup>®</sup> Concentrator (Code No. 6674)  
AAVpro<sup>®</sup> Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes) (Code No. 6679)

AAVpro<sup>®</sup> Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (Code No. 6233)

## ● 注意事项

本制品中包含了Merck Millipore制造的产品，但制品中所有组分包括Merck Millipore制造的那些组分的疑问，请直接联系Takara Bio。

AAVpro is a registered trademark of Takara Bio Inc.

Cryonase is a trademark of Takara Bio Inc.

CalPhos 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.takarabio.com](http://www.takarabio.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>

v202204Da