

Code No. 6230, 6650–6657,
6668, 6669, 6673

研究用

TAKARA

AAVpro[®] Helper Free
System

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	2
● 制品内容	4
● 保 存	9
● 试剂盒外所需主要试剂及器具	9
● AAV 病毒制备的概述	9
● 操作方法	10
● 病毒滴度测定	11
● 参考数据	12
● 参考文献	15
● 关联产品	15

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

pAAV-ZsGreen1 Vector	Code No. 6231
AAVpro [®] Purification Kit Maxi (All Serotypes)	Code No. 6666
AAVpro [®] Purification Kit (AAV2)	Code No. 6232
AAVpro [®] Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2	Code No. 6233
AAVpro [®] Extraction Solution	Code No. 6235
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
AAVpro [®] 293T Cell Line	Code No. 632273

● 制品说明

1. 腺相关病毒 (Adeno-Associated Virus)

腺相关病毒 (AAV) 是 *Dependovirus* 属 *Parvovirus* 家族的无包膜病毒。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，在每个末端都有发夹结构的反向末端重复序列 (ITRs)，ITRs 的功能在于基因组复制起始位点及包装病毒粒子。AAV 基因组包含了 3 个开放阅读框 (图 1)：Rep 编码参与复制和转录的蛋白质；Cap 编码病毒衣壳蛋白质；AAP 编码用于病毒粒子形成的非结构蛋白质。Rep 区域编码 4 种不同的蛋白质 (Rep78, Rep68, Rep52 和 Rep40)，Cap 区域编码 3 种不同的蛋白质 (VP1, VP2 和 VP3)。

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。Takara Bio Inc. 提供 AAV 1 型 (AAV1)、2 型 (AAV2)、5 型 (AAV5)、6 型 (AAV6) 的制备试剂盒。2 型 (AAV2) 具有广泛的研究应用，包括基因治疗，也具备泛嗜性特点。而 AAV1、AAV5 和 AAV6 却受限于组织宿主。AAV1 对于肌肉、肝脏、呼吸道和中枢神经系统有高转导效率；AAV5 对于中枢神经系统、肝脏和视网膜有高转导效率；AAV6 对于心肌细胞、肌肉和肝脏有高转导效率。

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)。

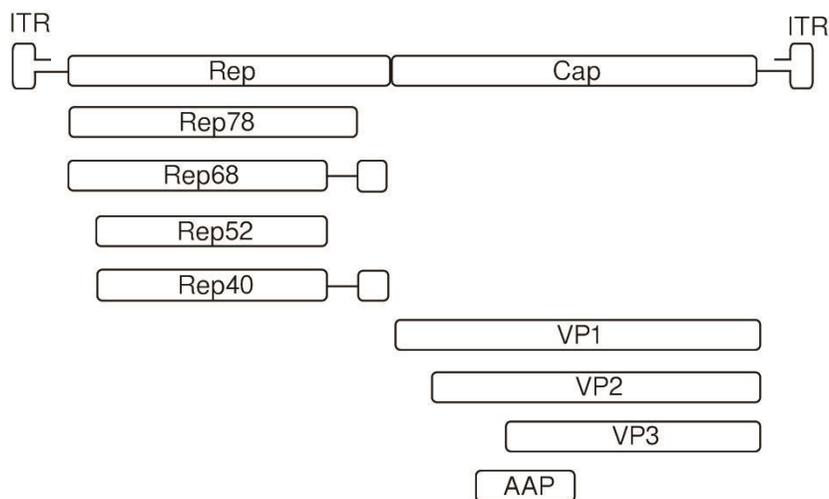


图 1. AAV 基因组结构和开放阅读框

2. 原理

每一种 AAVpro Helper Free System 都是无需使用辅助病毒的可安全制备血清型 1、2、5、6 型 AAV 的试剂盒。使用试剂盒制备的 AAV 病毒，可以在哺乳动物细胞和动物体中瞬时表达目的基因。对于体内应用，可使用 AAVpro Purification Kit Maxi (All Serotypes) (Code No. 6666)。对于 AAV2 提取，也可以使用 AAVpro Purification Kit (AAV2) (Code No. 6232)。

3. 特点

A. 使用 AAV Helper Free System 制备 AAV 病毒

AAV Helper Free System 是一种特别的可制备高滴度 AAV 的无辅助病毒系统 (图 2)。每个试剂盒包含 3 种质粒，只需将制备 AAV 病毒所需的这 3 种载体质粒转染于 HEK293 细胞中，即可制备 AAV 病毒。

- pAAV Vector: 包含目的基因表达启动子和 2 个 ITR 的载体质粒。
 pAAV-CMV Vector (Code No. 6673, 6230, 6650, 6651)
 质粒包含目的基因 (GOI) 克隆位点, GOI 由 CMV 启动子表达。由于 AAV 病毒中能够包装的插入 DNA 大小有限, 使用试剂盒中 pAAV-CMV Vector 时, 插入的 DNA 片段大小应在 2.5 kb 以下。
 pAAV-CRE Recombinase Vector (Code No. 6668, 6652, 6653, 6654)
 本载体制备的 AAV 病毒可传递 Cre 基因编码的 loxP 依赖型重组酶。Cre 重组酶已经广泛用于制备转基因小鼠和各种筛选检测。
 pAAV-LacZ Vector (Code No. 6669, 6655, 6656, 6657)
 本载体用于制备传递 LacZ 表达盒的 AAV 病毒。AAV-LacZ 病毒可作为体外和体内基因转移的对照。
- pRC Vector: 包含 AAV2 的 Rep 基因和每个血清型各自的 Cap 基因。
 pRC1 Vector: Serotype 1 (Code No. 6673, 6668, 6669)
 pRC2-mi342 Vector*: Serotype 2 (Code No. 6230, 6652, 6655)
 pRC5 Vector: Serotype 5 (Code No. 6650, 6653, 6656)
 pRC6 Vector: Serotype 6 (Code No. 6651, 6654, 6657)
- pHelper Vector: 包含腺病毒的 E2A、E4 和 VA 基因的载体质粒。
- *: pRC2-mi342 可表达 hsa-miR-342, hsa-miR-342 是一种病毒制备系统中可提高 AAV2 病毒滴度的人源 miRNA。与一般只表达 Rep 基因和 Cap 基因的 pRC2 Vector 相比, 病毒滴度可提高 2 倍 (参见“参考数据”)。

B. 使用 AAVpro Extraction Solution 提取 AAV 病毒

从产生 AAV 病毒的宿主细胞中制备 AAV 病毒时, 通常使用冻融法或超声波破碎法。使用上述 2 种方法时要先准备液氮和超声波仪。本试剂盒中包含 AAVpro Extraction Solution, 可高效、简便地分离 AAV 病毒颗粒, 且将蛋白质和核酸污染降至很低。

包含 AAV Extraction Solution A 和 B 组分的 AAVpro Extraction Solution (Code No. 6235) 可以单独购买。

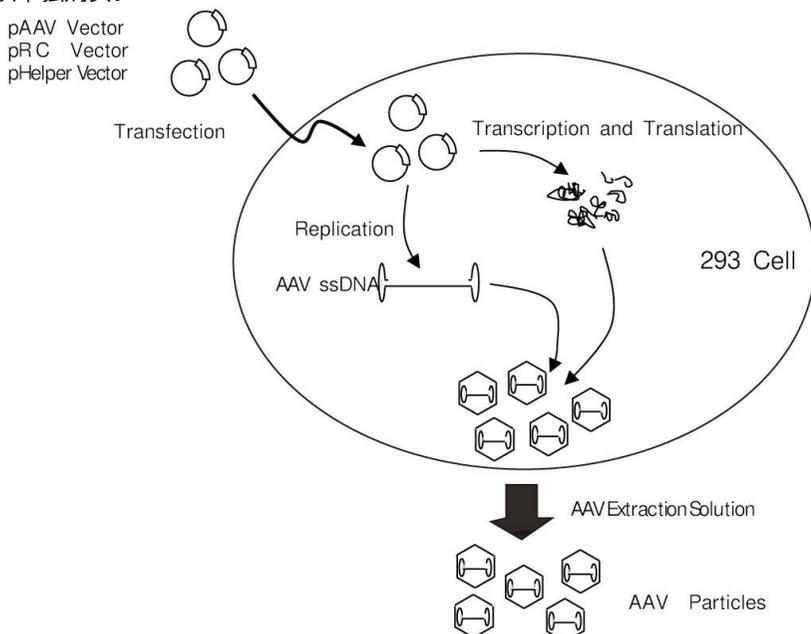


图 2. 使用 AAVpro Helper Free System 制备 AAV 病毒

● 制品内容

每种试剂盒包含 3 种载体质粒，编码制备重组 AAV 病毒的必要元件；还包含从细胞中提取 AAV 病毒的试剂。

[1 型]

AAVpro Helper Free System (AAV1) (Code No. 6673)

- | | |
|---|------------------------------|
| 1. pAAV-CMV Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 2. pRC1 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μl \times 3 |

AAVpro Helper Free System (AAV1-CRE Recombinase) (Code No. 6668)

- | | |
|---|------------------------------|
| 1. pAAV-CRE Recombinase Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 2. pRC1 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μl \times 3 |

AAVpro Helper Free System (AAV1-LacZ) (Code No. 6669)

- | | |
|--|------------------------------|
| 1. pAAV-LacZ Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 2. pRC1 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μl \times 3 |

[2 型]

AAVpro Helper Free System (AAV2) (Code No. 6230)

- | | |
|---|------------------------------|
| 1. pAAV-CMV Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 2. pRC2-mi342 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μl \times 3 |

AAVpro Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase) (Code No. 6652)

- | | |
|---|------------------------------|
| 1. pAAV-CRE Recombinase Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 2. pRC2-mi342 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μl \times 3 |

AAVpro Helper Free System (AAV2-LacZ) (Code No. 6655)

- | | |
|---|------------------------------|
| 1. pAAV-LacZ Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 2. pRC2-mi342 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 μl \times 3 |

[5 型]

AAVpro Helper Free System (AAV5) (Code No. 6650)

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. pAAV-CMV Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 2. pRC5 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 $\mu\text{l}\times$ 3 |

AAVpro Helper Free System (AAV5-CRE Recombinase) (Code No. 6653)

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. pAAV-CRE Recombinase Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 2. pRC5 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 $\mu\text{l}\times$ 3 |

AAVpro Helper Free System (AAV5-LacZ) (Code No. 6656)

- | | |
|--|---------------------------|
| 1. pAAV-LacZ Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 2. pRC5 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 $\mu\text{l}\times$ 3 |

[6 型]

AAVpro Helper Free System (AAV6) (Code No. 6651)

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. pAAV-CMV Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 2. pRC6 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 $\mu\text{l}\times$ 3 |

AAVpro Helper Free System (AAV6-CRE Recombinase) (Code No. 6654)

- | | |
|---|---------------------------|
| 1. pAAV-CRE Recombinase Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 2. pRC6 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 $\mu\text{l}\times$ 3 |

AAVpro Helper Free System (AAV6-LacZ) (Code No. 6657)

- | | |
|--|---------------------------|
| 1. pAAV-LacZ Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 2. pRC6 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 3. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 20 μl |
| 4. AAV Extraction Solution A | 1.5 ml \times 3 |
| 5. AAV Extraction Solution B | 150 $\mu\text{l}\times$ 3 |

包含转染质粒 (组分 2 和 3) 的大包装制品可以单独购买。

AAVpro Packaging Plasmid (AAV1) (Code No. 6672):

- | | |
|--|-------------------|
| 1. pRC1 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 0.5 ml \times 2 |
| 2. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 0.5 ml \times 2 |

AAVpro Packaging Plasmid (AAV2) (Code No. 6234):

1. pRC2-mi342 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 ml \times 2
2. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 ml \times 2

AAVpro Packaging Plasmid (AAV5) (Code No. 6664):

1. pRC5 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 ml \times 2
2. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 ml \times 2

AAVpro Packaging Plasmid (AAV6) (Code No. 6665):

1. pRC6 Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 ml \times 2
2. pHelper Vector (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 ml \times 2

[载体图谱]

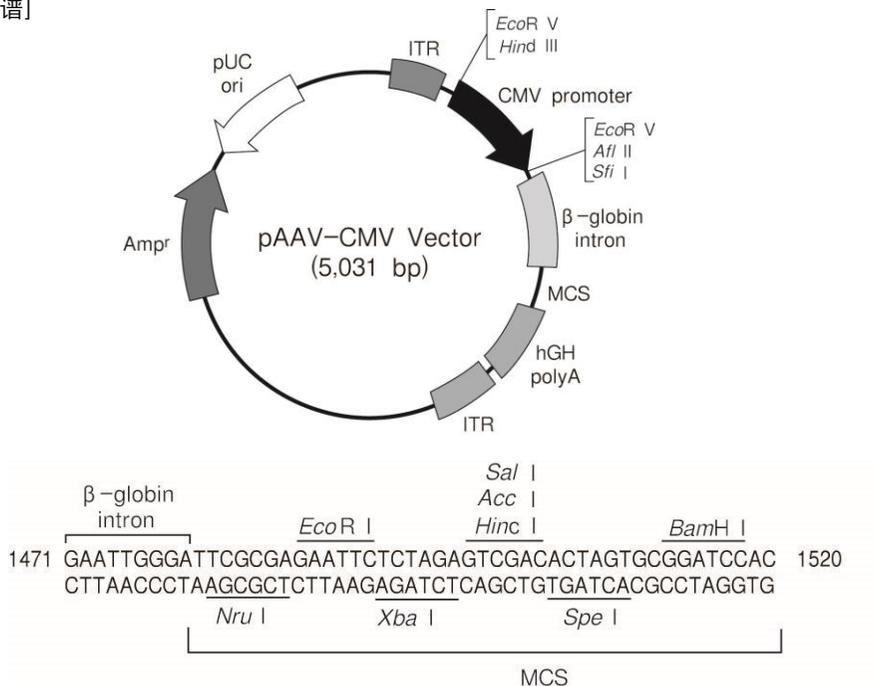


图 3. pAAV-CMV 载体图谱和多克隆位点 (MCS)

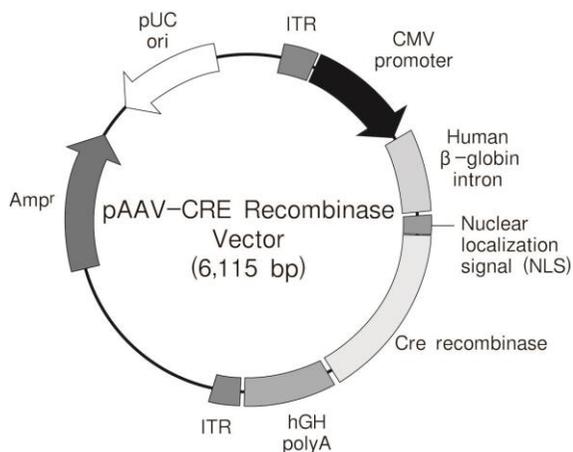


图 4. pAAV-CRE Recombinase 载体图谱

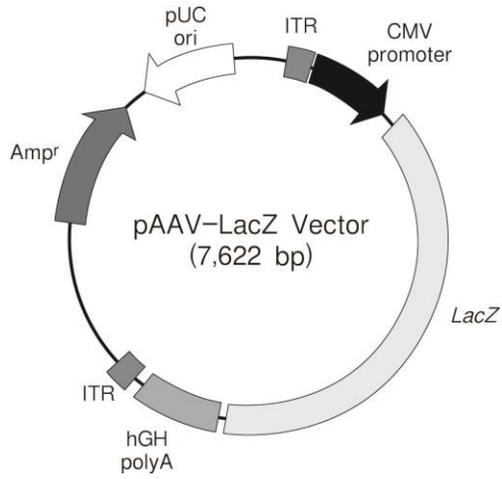


图 5. pAAV-LacZ 载体图谱

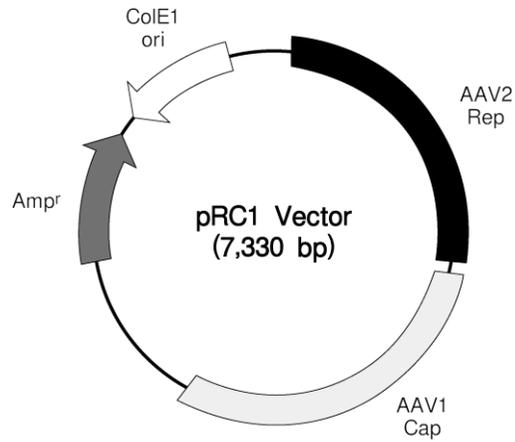


图 6. pRC1 载体图谱

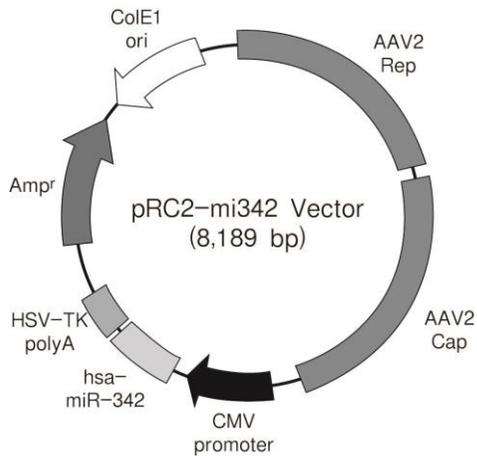


图 7. pRC2-mi342 载体图谱

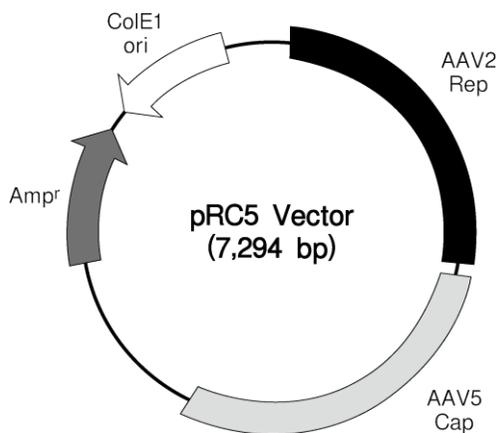


图 8. pRC5 载体图谱

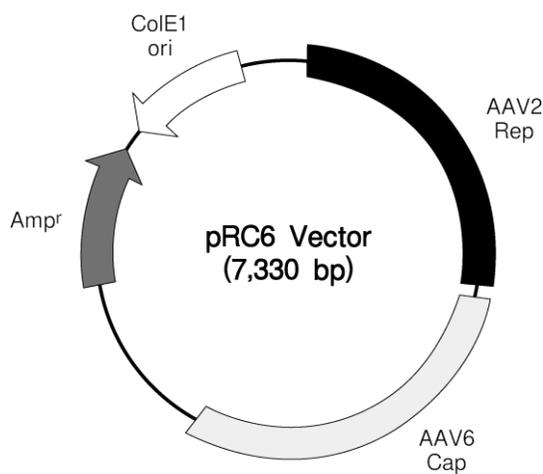


图 9. pRC6 载体图谱

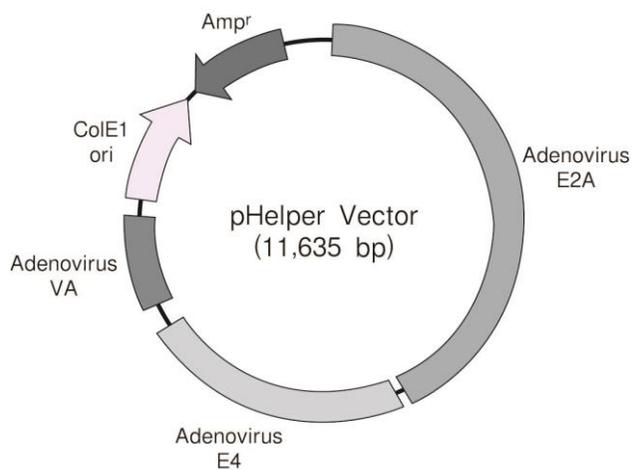


图 10. pHelper 载体图谱

● 保 存

-20°C

AAV Extraction Solution A 和 AAV Extraction Solution B 融解后，请于室温保存。
自收到之日起，适当条件下保存，两年内有效。

● 试剂盒外所需主要试剂及器具

1. 器具·装置

- ϕ 100-mm 细胞培养皿
- 细胞培养的相关器具及设备

2. 试剂

- 转染试剂
 - CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Code No. 631312)
 - Xfect™ Transfection Reagent (Code No. 631317)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 4.5 g/L Glucose with L-Glutamine
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- Trypsin-EDTA
- AAVpro 293T Cell Line (Code No. 632273)*¹
- 0.5 M EDTA (pH8.0) (EDTA Buffer Powder, pH8.0 (Code No. T9191))
- pAAV-ZsGreen1 Vector (Code No. 6231)*²

* 1 : HEK293 和 HEK293T 细胞系可以购买获得。病毒的产生高度依赖于细胞系特性。制备高滴度 AAV 病毒时，建议使用 AAVpro 293T Cell Line (Code No. 632273)和 HEK293T/17 cells (ATCC, CRL-11268)。

* 2 : pAAV-ZsGreen1 Vector 是表达绿色荧光蛋白质 ZsGreen 的 AAV 载体质粒。可作为细胞转染效率和 AAV 病毒滴度确认的阳性对照。

● AAV 病毒制备的概述

使用 AAVpro Helper Free System (AAV1/AAV2/AAV5/AAV6) (Code No. 6673, 6230, 6650, 6651) 克隆目的基因 (GOI) 时，请从操作方法 1.开始完成所有步骤；使用其他系统 (Code No. 6668, 6652, 6653, 6654, 6669, 6655, 6656, 6657) 时，按照操作方法 3.到 7.进行操作。

1. 插入目的基因 (GOI) 到 pAAV-CMV Vector 中
↓
2. 制备重组质粒 (pAAV-GOI vector)
↓
3. 培养 AAVpro 293T 细胞
↓
4. 将 pAAV-GOI、pRC 和 pHelper 共转染到 AAVpro 293T 细胞中
↓
5. 更换培养基
↓
6. 收集产生 AAV 病毒的细胞 (转染后 2~3 天)
↓
7. 从含 AAV 病毒的细胞中提取病毒

● 操作方法

使用 AAVpro Helper Free System (AAV1/AAV2/AAV5/AAV6) (Code No. 6673, 6230, 6650, 6651) 时, 请从操作方法 1.开始完成所有步骤; 使用其他系统 (Code No. 6668, 6652, 6653, 6654, 6669, 6655, 6656, 6657) 时, 从操作方法 3.开始进行操作。

1. 插入目的基因到 pAAV-CMV Vector 中

使用标准克隆方法将目的基因 (GOI) 插入到 pAAV-CMV Vector 的多克隆位点 (MCS) 中。也可以使用 In-Fusion[®] HD Cloning Plus (Code No. 638909) 将 GOI 的 PCR 产物克隆到任意线性载体中。另外, CMV 启动子可以使用 EcoR V 位点替换为其他启动子。

注意 1: 目的基因 DNA 片段中应包含 ATG 起始密码子和终止密码子。

注意 2: 目的基因插入片段应小于 2.5 kb。

2. 制备重组质粒 (pAAV-GOI vector)

在验证目的基因正确插入到载体 (pAAV-GOI) 中后, 使用质粒纯化试剂盒如: NucleoBond Xtra Midi/Maxi (Code No. 740410.10/740414.10, etc.) 提取质粒 DNA, 调整质粒 DNA 浓度为 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

注意: 对于转染效率而言, 质粒纯度尤为重要。

3. 培养 AAVpro 293T 细胞

在含 10% FBS 的 DMEM 培养基的 ϕ 100-mm 细胞培养皿中接种 $2.5\sim 4.0 \times 10^6$ 的 AAVpro 293T 细胞进行培养。对于 CalPhos Mammalian Transfection Kit 或 Xfect Transfection Reagent, 可使用 10 ml 培养基。依据标准的细胞培养操作流程进行过夜培养。

4. 将 pAAV、pRC 和 pHelper 转染到 AAVpro 293T 细胞中

在细胞培养第二天, 同时将 pAAV (操作方法 2.获得的 pAAV-GOI、pAAV-CRE 或 pAAV-LacZ)、pRC 和 pHelper 共转染到 AAVpro 293T 细胞中。

转染试剂推荐使用 CalPhos Mammalian Transfection Kit (Code No. 631312) 或 Xfect Transfection Reagent (Code No. 631317), 以下是每种试剂盒的实验例。

a. CalPhos Mammalian Transfection Kit (Code No. 631312)

下面的操作方法依据 CalPhos Mammalian Transfection Kit 说明书进行了改良。按照如下步骤操作可以获得高滴度的 AAV 病毒。

- 1) 将 2X HEPES-Buffered Saline 置于室温融化并恢复到室温。
- 2) 将 2 M calcium solution 使用灭菌水 (试剂盒中包含) 稀释成 333 mM calcium solution (6 倍稀释), 置于室温放置并恢复到室温。
- 3) 将质粒 DNA 与 Calcium Solution 混合。

pAAV Vector	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	6 μl
pRC Vector	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	6 μl
pHelper Vector	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	6 μl
Calcium Solution	333 mM	1,000 μl
Total		1,018 μl

- 4) 加入等体积 2X HEPES-Buffered Saline, 盖紧管盖, 用手剧烈上下摇晃混匀 15 次。
- 5) 静置 3 分钟。

注意: 要严格遵守 3 分钟的反应时间, 然后迅速进行下一步。过长的反应时间会导致大体积的磷酸钙-DNA 复合物的形成而降低转染效率。

- 6) 将混合物逐滴加入到 AAVpro 293T 细胞 (操作方法 3.) 中, 摇荡分散后继续培养细胞。

注意: 使用 CalPhos Mammalian Transfection Kit 时, 在显微镜下可能观察到磷酸钙复合物。

b. Xfect Transfection Reagent (Code No. 631317)

- 1) 将 Xfect Polymer 进行 Vortex 混匀。
- 2) 将 Xfect Reaction Buffer 和质粒 DNA 剧烈 Vortex 混匀 5 秒钟。

pAAV Vector	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	13 μl
pRC Vector	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	13 μl
pHelper Vector	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	13 μl
Xfect Reaction Buffer		561 μl
<hr/>		
Total		600 μl

- 3) 加入 11.7 μl Xfect Polymer 到质粒混合物中，剧烈 Vortex 混匀 10 秒钟。
- 4) 室温静置 10 分钟。
- 5) 瞬时离心后，将混合物逐滴加入到 AAVpro 293T 细胞（操作方法 3.）中，摇荡分散细胞后继续培养。

5. 更换培养基

转染后 6 小时~25 小时，使用新鲜的含 2% FBS 的 DMEM 更换培养基。

6. 收集含 AAV 病毒的细胞（转染后 2~3 天）

- 1) 加入培养液体积的 1/80 的 0.5 M EDTA (pH8.0)到含 AAV 细胞的培养皿中。室温放置 10 分钟。
- 2) 可轻轻摇动或吹打使细胞悬浮，收集到 15 ml 无菌离心管中。
- 3) 于 4°C 1,750g 离心 10 分钟，完全去除上清液后收集细胞沉淀。

注意：尽量彻底去除上清，避免病毒提取受残留上清的影响。

7. 从含 AAV 病毒的细胞中提取病毒

建议使用本试剂盒中的 AAV Extraction Solution 进行提取。本方法获得的 AAV2 病毒与冻融法或超声法相比较，具有较高的纯度和滴度（参见“参考数据”）。

- 1) 通过拍打管壁或振荡使得细胞沉淀（操作方法 6.）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。

- 2) 加入 0.5 ml AAV Extraction Solution A。

- 3) Vortex 振荡 15 秒充分悬浮细胞沉淀。

- 4) 室温静置 5 分钟。Vortex 振荡 15 秒。

- 5) 于 4°C 2,000~14,000g 离心 10 分钟，去除细胞碎片。

注意：如果回收的 AAV 病毒滴度低，可以通过重复 3) ~5) 步骤以提高提取效率。

- 6) 收集上清液到新的无菌离心管中，加入 50 μl AAV Extraction Solution B，使用移液枪吸打混匀。

注意 1：AAV 病毒液于 -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，上清可能会变成粉色。

● 病毒滴度测定

病毒滴度可通过 Real Time PCR（病毒基因组检测）或感染检测（生物学滴度测定）两种方法测定。Real Time PCR 方法可快速定量检测，但通过细胞感染检测通常会更准确。也有一些检测病毒衣壳蛋白的 AAV 病毒滴度等测定方法，但这些方法可能会检测到无功能（空的）病毒。

病毒基因组检测

AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (Code No. 6233) 以病毒 ITR 序列作为目的基因，通过 Real Time PCR 方法测定病毒滴度。

生物学滴度测定方法

通过测定目的基因的表达量来确定滴度。下面是表达荧光蛋白 ZsGreen (pAAV-ZsGreen1 Vector (Code No. 6231)) 的 AAV2 病毒的定量操作方法。

1. 使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基，将细胞稀释到 $2-4 \times 10^4$ cells/ml。
2. 在 24 孔板中接种几孔 0.5 ml 细胞悬液，过夜培养。

3. 使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基对 AAV2 病毒液进行梯度稀释，稀释比例取决于病毒滴度，但建议连续稀释倍数在 1,000~100,000 范围内。
4. 感染三天后，用 Trypsin/EDTA 消化细胞，使用流式细胞仪分析 ZsGreen 表达情况。

● 参考数据

1. 使用 pRC2-mi342 Vector 提高 AAV2 病毒滴度

试剂盒 (Code No. 6230, 6652, 6655) 中的 pRC2-mi342 Vector 可辅助产生高滴度的重组 AAV2 病毒。

方法

细胞: HEK293

转染: 磷酸钙方法

质粒:
 • pAAV-CMV-AcGFP1 Vector
 • pRC2-mi342 Vector 或 pRC2 Vector*
 • pHelper Vector

培养: T25 培养瓶

*: pRC2 Vector: 缺失 hsa-miR-342 表达框的载体。

提取 AAV2 病毒后，使用 Real Time PCR 方法测定病毒滴度。

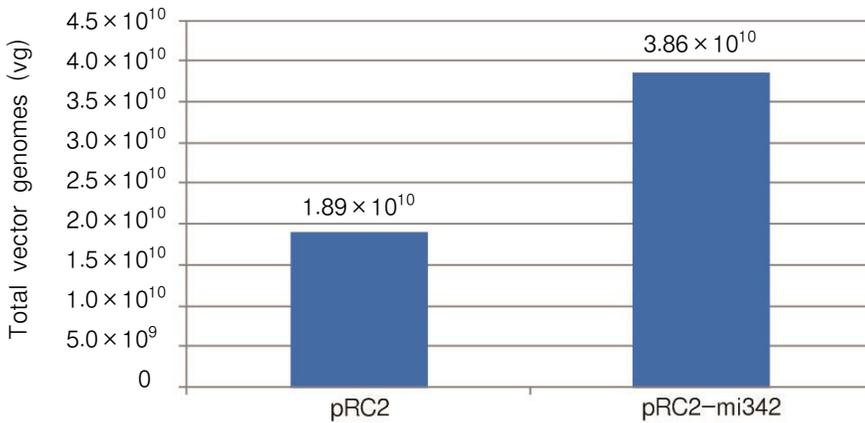


图 11. miRNA-342 对 AAV2 滴度的影响

结果: 表达 hsa-miR-342 的 pRC2-mi342 Vector 与 pRC2 Vector 相比，病毒滴度（病毒基因组）升高到 2 倍。

2. 使用 AAV Extraction Solution 提取 AAV 病毒的效率

本系统中的 AAV Extraction Solution A 和 B 能够简便有效地提取 AAV 病毒。

A. 与冻融方法比较病毒产量

将 pAAV-ZsGreen1 vector (Code No. 6231) 和相应的血清型病毒载体转染到 HEK293 细胞中，得到各种血清型的能表达 ZsGreen1 的 AAV 病毒的 HEK293 细胞，使用 AAVpro Extraction Solution 或反复冻融方法提取细胞中的 AAV 病毒。最后分别通过病毒基因组检测法 (图 12A) 和生物学滴度测定法 (HT1080 cells) (图 12B) 测定病毒提取液的滴度。结果表明，使用 AAVpro Extraction Solution 提取病毒更简便有效。

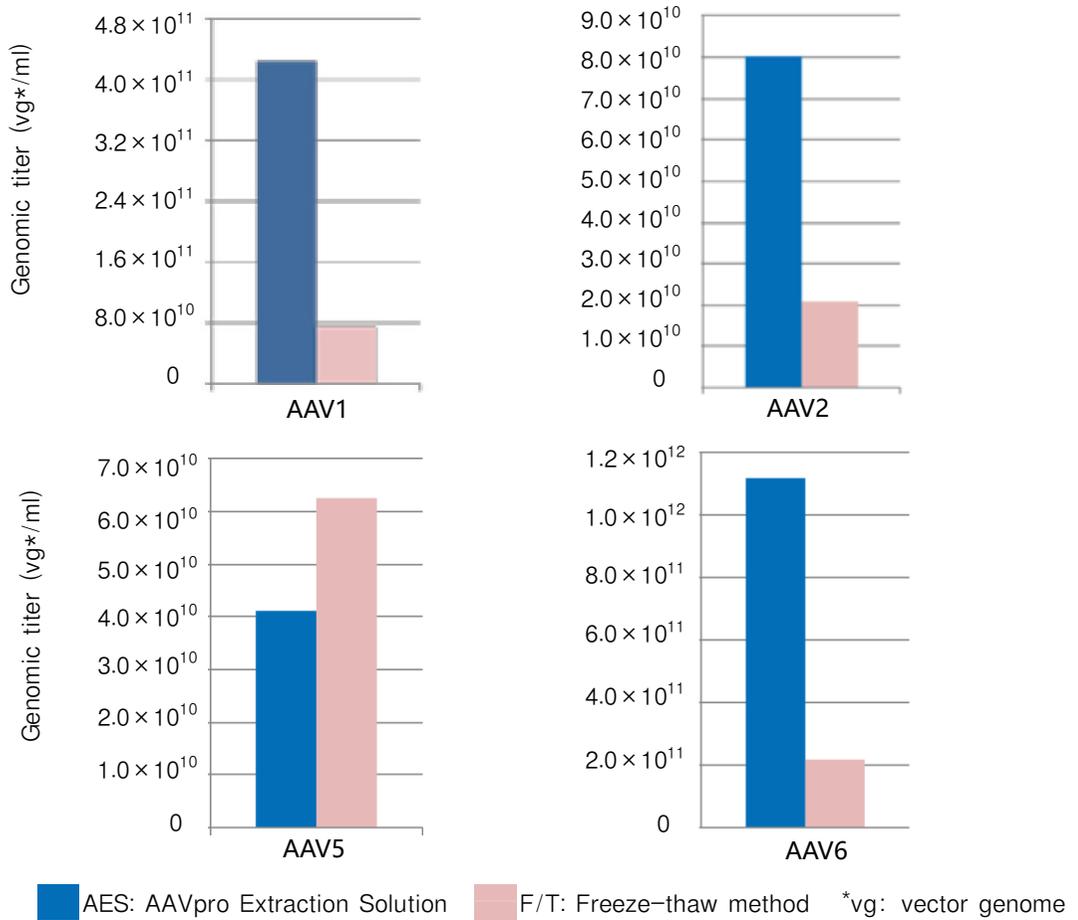


图 12A. 使用 AAVpro Extraction Solution 的 AAV 提取效率 (病毒基因组检测)

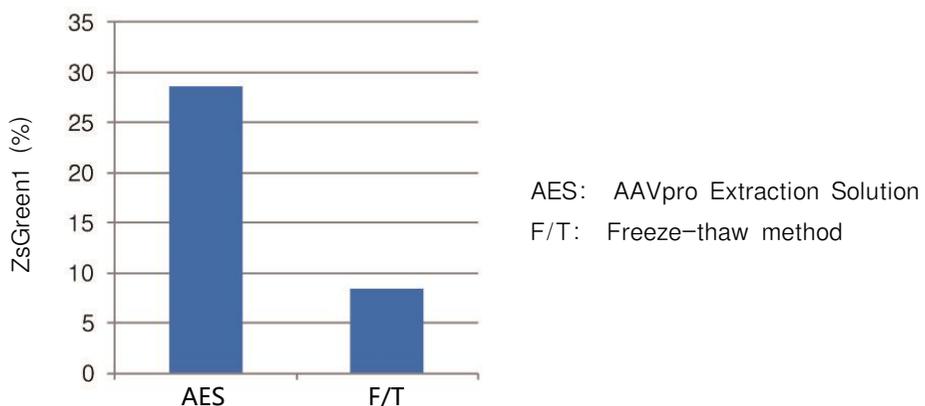
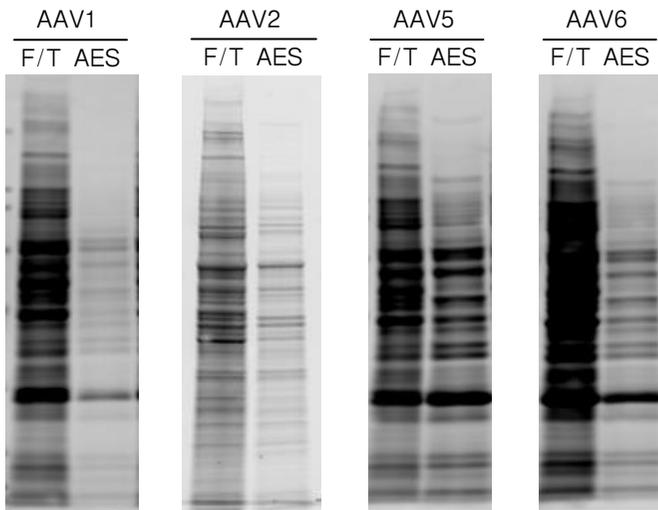


图 12B. 使用 AAVpro Extraction Solution 的 AAV2 提取效率 (生物学滴度检测)

B. 与冻融方法比较病毒纯度

使用 AAVpro Extraction Solution 或冻融方法从 HEK293 细胞中提取 AAV 病毒。使用 Real Time PCR 方法测定 AAV 提取液中的病毒基因组含量。然后, 采用 SDS-PAGE 方法分析相当于 1×10^9 vg 的 AAV 病毒提取液, 来评估蛋白质残留量 (图 13)。另外, 提取的 AAV2 病毒中残留的 dsDNA

浓度采用 intercalation 方法检测 (图 14)。结果表明, 与冻融方法相比, 使用 AAVpro Extraction Solution 明显降低了蛋白质和 dsDNA 的残留量。



AES: AAVpro Extraction Solution F/T:Freeze-and-Thaw Method (1×10^9 vg/lane)

图 13. AAV 提取液的 SDS-PAGE 电泳结果。使用 AAV Extraction Solution(AES)制备的 AAV 纯度远远高于冻融方法(F/T)。

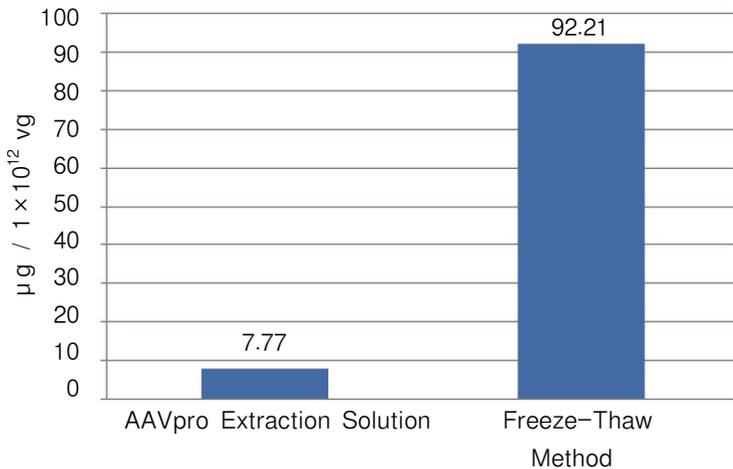


图 14. AAV2 提取液的 dsDNA 混入量。使用 AAVpro Extraction Solution (AES)制备的 AAV 中残留 dsDNA 远远低于冻融方法(F/T)。

3. AAV2-CRE 病毒的感染实验

使用 AAVpro Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase) (Code No. 6652)制备 AAV2-CRE 病毒,使用 AAVpro Purification Kit (AAV2) (Code No. 6232)纯化 AAV2-CRE 病毒。将病毒感染 HEK293 细胞,应用 Cre 重组酶在细胞中进行基因重组,表达荧光蛋白质 (ZsGreen1)。细胞的荧光信号比例随着感染的 AAV2-CRE 病毒数量而升高。

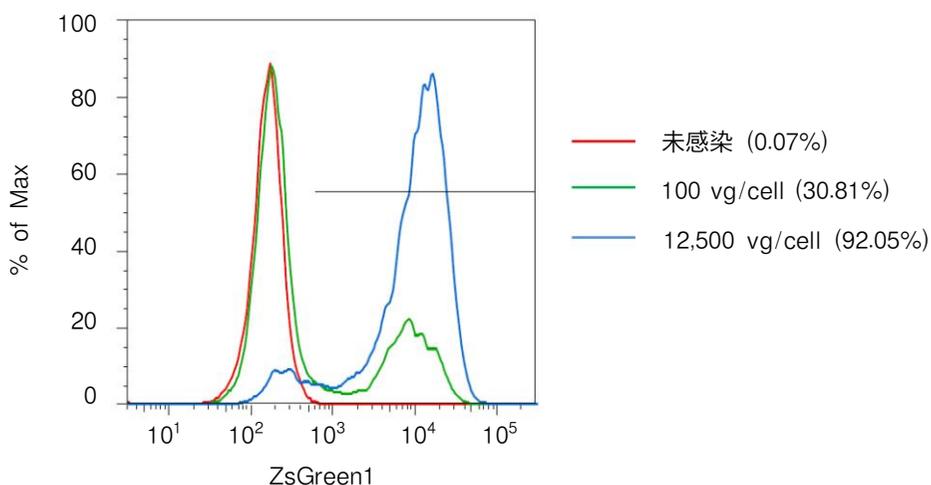


图 15. 感染了 AAV2-CRE 病毒的 HEK293 细胞的 FACS 分析结果

4. AAV2-LacZ 病毒的感染实验

使用 AAVpro Helper Free System (AAV2-LacZ) (Code No. 6655) 制备 AAV2-LacZ 病毒, 使用 AAVpro Purification Kit (AAV2) (Code No. 6232) 纯化 AAV2-LacZ 病毒。将病毒感染 HT1080 细胞。使用 Beta-Galactosidase Staining Kit (Code No. 631780) 进行染色。

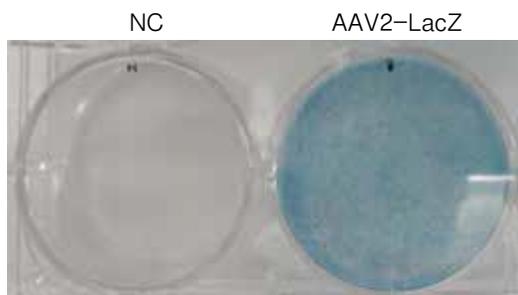


图 16. 感染了 AAV2-LacZ 病毒的 HT1080 细胞的 X-gal 染色结果

● 参考文献

- 1) Miyake *et al.* *J Nippon Med Sch.* (2012) **79**(6):394-402.
- 2) Van Vliet *et al.* *Methods Mol Biol.* (2008) **437**:51-91.
- 3) Wu *et al.* *Mol Ther.* (2006) **14**(3):316-27.
- 4) Zincarelli *et al.* *Mol Ther.* (2008) **16**(6):1073-80.
- 5) Ellis *et al.* *Viral J.* (2013) **10**:74.

● 关联产品

- pAAV-ZsGreen1 Vector (Code No. 6231)
- AAVpro[®] Purification Kit Maxi (All Serotypes) (Code No. 6666)
- AAVpro[®] Purification Kit (AAV2) (Code No. 6232)
- AAVpro[®] Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (Code No. 6233)
- AAVpro[®] Extraction Solution (Code No. 6235)
- 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)
CalPhos[™] Mammalian Transfection Kit (Code No. 631312)
Xfect[™] Transfection Reagent (Code No. 631317/631318)
AAVpro[®] 293T Cell Line (Code No. 632273)
Beta-Galactosidase Staining Kit (Code No. 631780)

AAVpro is a registered trademark of Takara Bio Inc.

In-Fusion is a registered trademark of Takara Bio USA, Inc.

CalPhos and Xfect are trademarks 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。

本文件由宝日生物技术有限公司（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>

v202003Da