

Code No. 6232

研究用

Takara

AAVpro[®] Purification Kit
(AAV2)

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	5
● 参考文献	7
● 关联产品	7

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

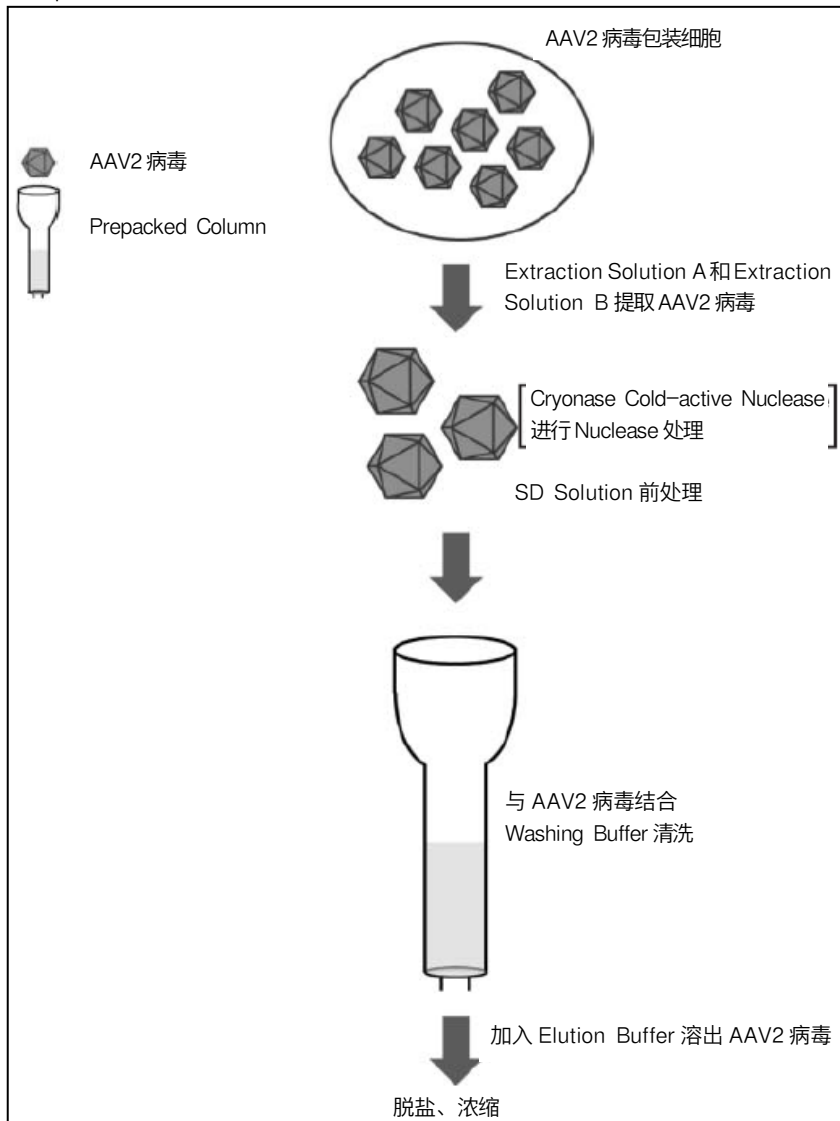
腺相关病毒 (AAV) 是 *Dependovirus* 属 *Parvovirus* 家族的最小病毒之一。AAV 是单链线状 DNA 分子的无包膜病毒。AAV 有 100 多种血清型, 不同血清型病毒间的宿主特异性和特点有所不同。比如, 2 型 (AAV2) 具有广泛的研究应用, 是 AAV 基础研究中较为常用的血清型, 包括基因治疗。

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 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。

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。AAV2 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 (AAV2) 是一种仅需 4 小时就可以从 AAV2 病毒包装细胞中制备 AAV2 病毒的试剂盒。



操作流程简图

本制品特长：

- 高纯度、高回收率。
- 采用特别的 AAV 病毒提取法，不需要冻融及超声波破碎等复杂操作。
- 试剂盒中附带从病毒包装细胞中制备 AAV2 病毒及纯化 AAV2 病毒的所有 Buffer。
- 使用专用 Column，无需进行超离心等繁琐操作。
- 即使不进行 Nuclease 处理，也可以显著降低 AAV2 病毒溶液中残留的 dsDNA。

● 制品内容 (2 preps)

1. AAV Extraction Solution A	14 ml × 2
2. AAV Extraction Solution B	2.8 ml
3. SD Solution* ¹	2.8 ml
4. Equilibration Buffer	11 ml × 2
5. Washing Buffer	11 ml × 2
6. Elution Buffer	7 ml
7. Suspension Buffer	1.2 ml
8. Prepacked Column* ²	2 支
9. Filter Device	2 支
10. Collection Tube	4 支

*1: SD Solution 可能会出现白色沉淀，这时将溶液在 37°C 水浴中加热，待沉淀完全溶解后使用，不影响性能。

*2: 一支 Prepacked Column 最多可以纯化 10 个 T225 培养瓶制备的 AAV2 病毒，建议纯化 5 个 T225 培养瓶制备的 AAV2 病毒。

● 保 存

4°C

● 试剂盒外所需主要试剂及器具

[器具]

- 细胞培养的相关器具及设备
- 50-ml 无菌离心管
- T225 培养瓶
- 15-ml 无菌离心管

[试剂]

- 0.5 M EDTA (pH8.0) (EDTA Buffer Powder, pH8.0 (Code No. T9191))
(当进行核酸酶处理时，以下试剂也是必要的)
- 1 M MgCl₂
- Cryonase Cold-active Nuclease (Code No. 2670A)

● 操作方法

下面是从 5 个 T225 培养瓶中纯化 AAV2 病毒的操作方法。下面的操作方法不必改变试剂加量也可以从 10 个 T225 培养瓶中纯化 AAV2 病毒。

建议使用 AAVpro Helper Free System (AAV2) (Code No. 6230) 制备 AAV2 病毒。

I. 制备 AAV2 病毒提取液

本试剂盒中的 Extraction Solution A 和 B 用于从病毒包装细胞中提取 AAV2 病毒，不必使用常规的冻融方法或超声破碎方法。这些试剂可简便有效地提取 AAV2 病毒，并且能去除宿主细胞蛋白质和核酸（请参考“实验例”）。

1. 加入培养基体积 1/80 的 0.5 M EDTA (pH8.0) 到含 AAV2 病毒细胞*的培养液中。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，收集到多个 50 ml 无菌离心管中。
3. $1,750 \times g$ 4°C 离心 10 分钟，去除部分上清液，保留约 5 ml 上清液，通过轻弹管壁使得细胞沉淀松散开来，将几管细胞收集到一个 50 ml 无菌离心管中。 $1,750 \times g$ 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 10 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 1 ml AAV Extraction Solution B，混匀。
注意 1：此步骤的混合物可于 -80°C 保存。如果不保存，请立即进行 I-10 或 I-11 步骤。
如果于 -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。
注意 3：如果进行核酸酶处理，进行 10N-1 步骤。
如果不进行核酸酶处理，继续进行 11 步骤。
10. 进行核酸酶处理（请参考“实验例”中的附加信息）
10N-1. 加入 1/100 体积的 1 M $MgCl_2$ 溶液到 I-9 的上清液中。
10N-2. 加入 Cryonase Cold-active Nuclease 达到终浓度为 2 U/ μl ；37°C 反应 30 分钟。
10N-3. $2,000 \sim 14,000 \times g$ 4°C 离心 10 分钟，收集上清液到新的 50-ml 无菌离心管中。
11. 加入 1 ml SD Solution，混匀，37°C 反应 30 分钟。 $2,000 \sim 14,000 \times g$ 4°C 离心 10 分钟，回收上清液作为精制前的 AAV2 病毒粗提液。
注意：SD Solution 可能会出现白色沉淀，这时将溶液在 37°C 水浴中加热，同时轻摇溶液，待沉淀完全溶解后即使用，不影响性能。

II. 吸附、清洗和洗脱 AAV2 病毒

Prepacked Column 是重力流柱。在使用前，在生物安全柜中安装好回收装置及废液回收瓶。确保柱子直立放置并且树脂表面是水平的。在纯化过程中，溶液液面不可以低于树脂表面。

注意：确定树脂柱中没有气泡。如果有气泡，那么需要吸打重悬树脂以去除气泡，待树脂沉降后再使用。

12. 安置好 Prepacked Column，去掉顶盖和底盖，使内部溶液自然流出。加入 10 ml Equilibration Buffer 进行柱平衡。
13. 将 I-11 的 AAV2 病毒粗提液上样到柱子中，废液流出。
14. 使用 10 ml washing buffer 清洗柱子，废液流出。
15. 用 3 ml Elution Buffer 洗脱 AAV2 病毒，收集病毒液到一个新的 15 ml 无菌离心管中。

III. 脱盐和浓缩 AAV2 病毒

16. 将 Filter Device 插入到 Collection Tube 中。
17. 加入 500 μl 的 II-15 的 AAV2 病毒溶液到 Filter Device 中， $2,000 \times g$ 4°C 离心 5 分钟，弃滤液。
18. 继续加入 AAV2 病毒溶液到 Filter Device 中离心，以 17 步骤同样的方式离心，直到所有 AAV2 病毒溶液都添加到 Filter Device 中离心，最后 Filter Device 中剩余溶液量约 100 μl ，不需

要额外处理。

19. 加入 400 μl Equilibration Buffer 到 Filter Device 中, $2,000 \times g$ 4°C 离心 5 分钟, 弃滤液。
注意: 确认 Filter Device 装置中剩余溶液量应低于 100 μl , 如果高于 100 μl , 再重复离心。
20. 加入 400 μl 的 Suspension Buffer 到 Filter Device 中, 移液枪吸打至少 100 次以清洗 Filter Device 内侧膜。
21. 将 Filter Device 倒扣着插入到新的 Collection Tube 中, 注意不要弄洒病毒液。 $1,000 \times g$ 4°C 离心 1 分钟, 回收溶液即纯化后的 AAV2 病毒。

● 实验例

1. 本制品与其它公司产品的性能比较

使用本制品和其它两家公司的 AAV2 纯化试剂盒, 从 5 个 T225 培养瓶的 AAV2 病毒包装细胞中纯化含荧光蛋白 ZsGreen1 基因的 AAV2 病毒。

AAV2 病毒产量

每种试剂盒中纯化的 AAV2 病毒量使用 AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (Code No. 6233) 确定 (图 2)。使用本制品获得的病毒产量是其它公司试剂盒的 3 倍多。

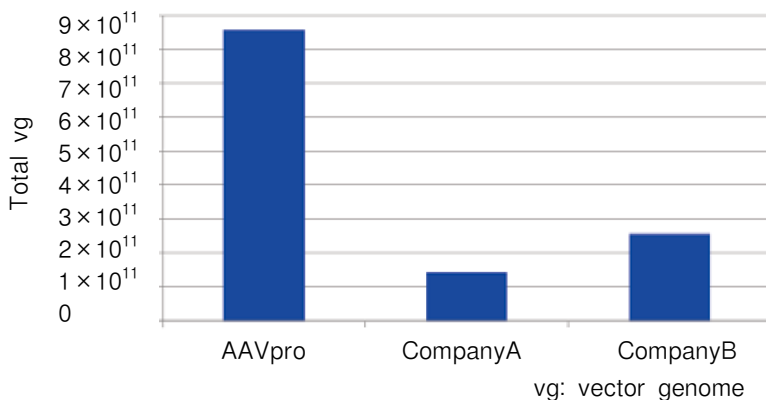
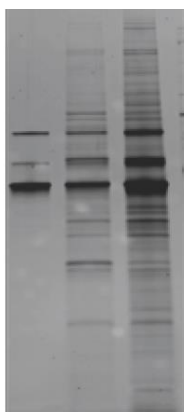


图 2. 使用各种试剂盒纯化 AAV2 病毒的产量

纯度

纯化后的 AAV2 病毒纯度通过 SDS-PAGE 评估, 每个泳道添加 1×10^9 vector genomes (vg) (图 3)。使用本制品纯化的 AAV2 病毒纯度最高, 只有 AAV2 蛋白质条带。

APK A B



APK: AAVpro Purification Kit (AAV2)
A: AAV2 purification kit, Company A
B: AAV2 purification kit, Company B

图 3. 每种试剂盒纯化后 AAV2 病毒的 SDS-PAGE 结果

感染 HT1080 细胞

评价纯化后 AAV2 病毒的感染滴度 (图 4)。使用纯化后的含 ZsGreen1 基因的 AAV2 病毒按照 2,500 vg/cell 感染 HT1080 细胞。感染后 3 天使用流式细胞仪评估感染效率。

结果显示, 使用本制品纯化的 AAV2 病毒与其它公司试剂盒相比, 具有最高的感染效率。

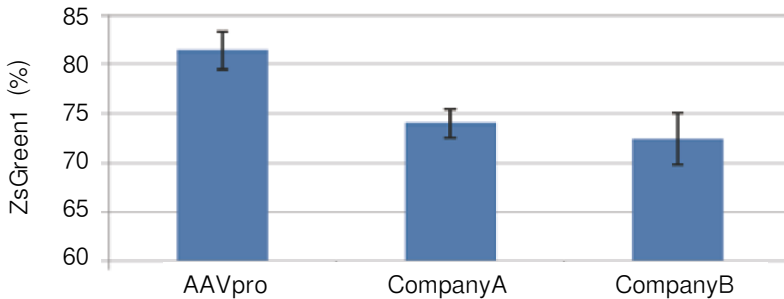


图 4. 使用不同试剂盒纯化的 AAV2 病毒的感染滴度

2. 使用本制品纯化的 AAV2 病毒中残留 dsDNA

使用本制品获得的 AAV2 病毒溶液很少有残留的 dsDNA, 也可以使用核酸酶处理进一步降低 dsDNA 残留量。

使用本制品从 5 个 T225 培养瓶的 AAV2 病毒包装细胞中纯化 AAV2 病毒, 分别用核酸酶处理和不用核酸酶处理。作为比较, 使用冻融方法制备细胞提取物, 然后使用本制品纯化 AAV2 病毒。纯化的 AAV2 病毒中的 dsDNA 采用 intercalation method (图 5) 进行评估。相比较冻融方法, 即便没有进行核酸酶处理, 使用本制品纯化的 AAV2 病毒中的 dsDNA 残留明显降低。另外, 进行核酸酶处理后, dsDNA 残留进一步降低。

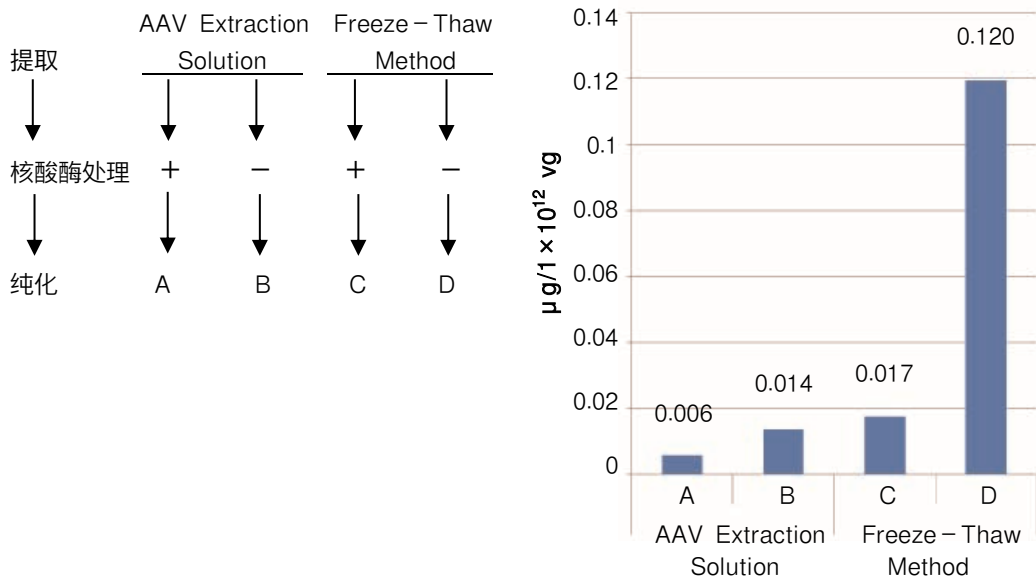


图 5. AAV2 病毒溶液中的 dsDNA 量

3. 使用 AAV Extraction Solution 提取的 AAV2 病毒中的杂质评价情况

使用 AAV Extraction Solution A 和 B 能够去除杂质。使用 AAV Extraction Solution A 和 B 从 5 个 T225 培养瓶的 AAV2 病毒包装细胞中纯化 AAV2 病毒, 以冻融方法作为比较。AAV2 提取液中的病毒基因组由 Real Time PCR 方法测定, 然后用 SDS-PAGE 分析 1×10^9 vg AAV2 提取液来评价蛋

白质杂质质量 (图 6)。另外, 残留的 dsDNA 含量用 intercalation method (图 7) 进行检测。结果表明, 与冻融方法比较, 使用 AAV Extraction Solutions 明显降低了蛋白质和 dsDNA 杂质质量。

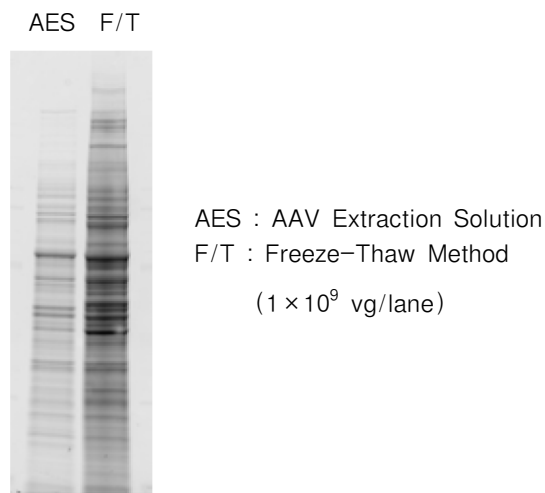


图 6. AAV2 提取液的 SDS-PAGE 电泳结果

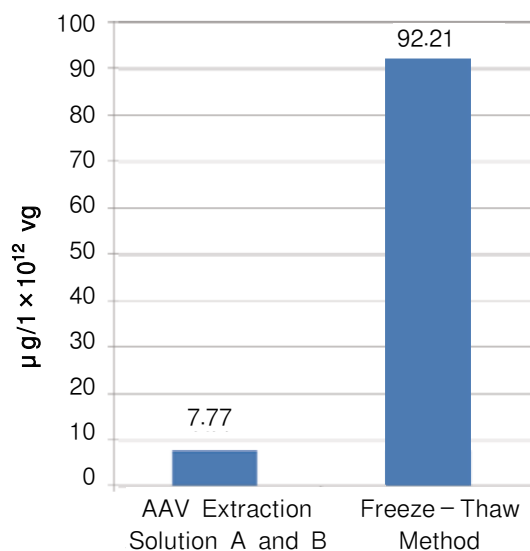


图 7. AAV2 提取液中的 dsDNA

● 参考文献

- 1) Summerford, C. & Samulski, R. J. (1999) *Nat. Med.* **5**:587–588.
- 2) Auricchio A., *et al.* (2001) *Hum Gene Ther.* **12**:71–76.

● 关联产品

- Cryonase™ Cold-active Nuclease (Code No. 2670A)
- EDTA Buffer Powder, pH8.0 (Code No. T9191)
- AAVpro® Helper Free System (Code No. 6230)
- AAVpro® Helper Free System (AAV2-CRE Recombinase) (Code No. 6652)
- AAVpro® Helper Free System (AAV2-LacZ) (Code No. 6655)
- AAVpro® Extraction Solution (Code No. 6235)

AAVpro[®] Packaging Plasmid (AAV2) (Code No. 6234)
AAVpro[®] Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (Code No. 6233)
pAAV-ZsGreen1 Vector (Code No. 6231)
AAVpro[®] Tet-One™ Inducible Expression System (AAV2) (Code No. 634310)

AAVpro is a registered trademark of TAKARA BIO INC.

Cryonase is a 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: <http://www.takara.com.cn>