

Code No. 6679

研究用

Takara

AAVpro[®] Freeze-Thaw Extraction Buffer
(All Serotypes)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 简 介	2
● 制品说明	2
● 制品内容	2
● 保 存	2
● 试剂盒外所需主要试剂及器具	2
● 操作方法	2
● 使用 AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) 纯化提取物中的 AAV	3
● 实 验 例	3
● 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 biological safety cabinet and wearing protective laboratory coats, face protection,

● 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

AAVpro Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes) 是一种细胞悬浮液, 用于通过冻融法从 AAV 包装细胞 (活细胞和冷冻细胞) 中提取 AAV。

使用本制品悬浮包装细胞, 只需要一次冻融操作就能高效提取各种血清型 AAV。与 AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6678) 配合使用, 可以在大约 4 个小时内纯化并浓缩 AAV 包装细胞中的 AAV, 以获得高纯度 AAV, 而无需超速离心等繁琐操作。

● 制品内容

AAVpro Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes) 20 ml x 2

● 保存

-20°C

● 试剂盒外所需主要试剂及器具

[试剂]

- AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6678)
- 0.5 M EDTA (pH 8.0) (e.g. EDTA Buffer Powder, pH8.0 (Code No. T9191))

[器具]

- 细胞培养所需设备
- 无菌离心管

● 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。推荐使用 AAVpro Helper Free System (Code No. 6230, 6650 - 6663, 6668 - 6671, 6673) 制备 AAV 包装细胞。

1. 加入培养液体积 1/80 的 0.5 M EDTA (pH8.0) 到含 AAV 包装细胞的培养基中, 混匀。
2. 室温放置 10 分钟, 剥离细胞, 收集到无菌离心管中。
3. 1,700-2,000g 4°C 离心 10 分钟, 去除上清液。
4. 1,700-2,000g 4°C 再次离心 10 分钟, 完全去除残留上清液。

注意: 在进行下一步前, 确认上清液已完全去除, 避免残留的上清液影响后续实验步骤。

5. 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。
6. 加入 10 ml AAVpro Freeze-Thaw Extraction Buffer (All Serotypes)。
7. Vortex 振荡 15 秒使细胞沉淀充分悬浮。
注意: 要充分松散细胞沉淀。
8. 将细胞悬液置于 -80°C 冰箱中 10~20 分钟或置于干冰乙醇中 5~10 分钟, 以完全冻结。
9. 将细胞悬液置于 37°C 的水浴或培养箱中 5~10 分钟, 使其完全解冻。
10. Vortex 振荡 15 秒以重悬融解后的细胞。

11. 9,000g 4°C离心 10 分钟。
12. 收集上清液到新的无菌离心管中，确保上清液中没有杂质。
注意 1：可使用 AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6678)纯化提取物中的 AAV。操作细节请参考：使用 AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes)纯化提取物中的 AAV。
注意 2：混合物于-80°C保存。使用前于 37°C水浴快速融解。
注意 3：测定 AAV 病毒粒子的滴度时，可使用 AAVpro Titration Kit (for Real-Time PCR) Ver. 2 (Code No. 6233)。

● 使用 AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes)纯化提取物中的 AAV

在步骤 5、6、7 中离心操作时，请使用 swinging bucket rotors。标注星号 (*) 的试剂为 AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6678)的组分。

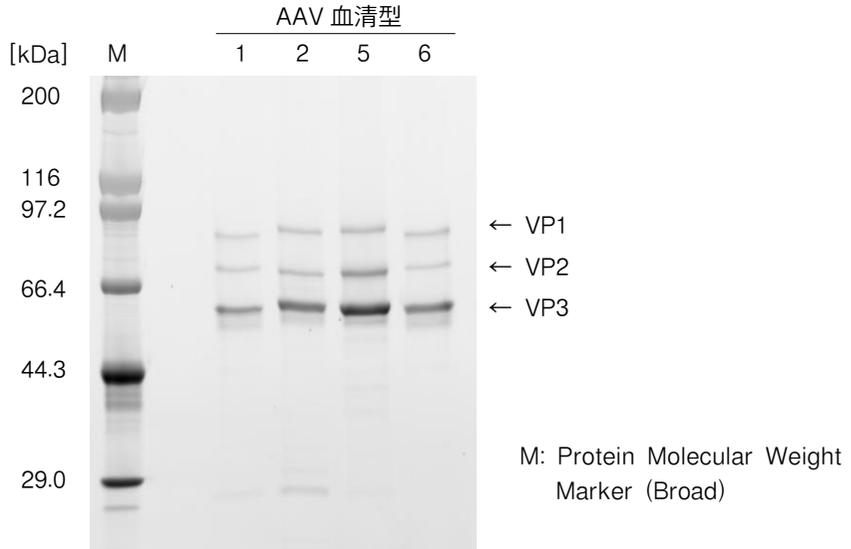
1. 向操作方法-12.的上清液中加入 1/100 体积 (终浓度 200 U/ml) 的 Cryonase Cold-active Nuclease*，37°C反应 1 小时。
2. 加入 1/10 体积的 Precipitator A*，振荡混合 10 秒后，37°C反应 30 分钟，再振荡混合 10 秒。
注 1：Precipitator A 低温保存时可能会产生白色沉淀，不影响制品的品质及性能。此时，只需将试剂在 37°C下充分溶解即可使用。
注 2：反应过程中产生沉淀对实验本身没有影响，可直接进入下一步操作。
3. 加入 1/20 体积的 Precipitator B*，迅速振荡混合 10 秒钟，9,000g 4°C离心 5 分钟，回收上清液。
注 1：如果回收上清液中有沉淀，要再次离心尽可能去除沉淀。
注 2：离心条件与使用 AAVpro Cell & Sup. Purification Kit Maxi (All Serotypes) (Code No. 6676)有所不同。
4. 使用 Millex-HV 0.45 μm*滤膜过滤上清。
5. 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，确认 AAV 溶液的体积后调整离心时间。
注 2：AAV 溶液体积大于 1.5 ml 时，继续离心。
6. 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，再次离心。
7. 上述 6.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 溶液浓缩过度，AAV 可能不易溶解。当进行离心浓缩时，适时停止离心，并试着吸打混匀 AAV 溶液以确定 AAV 的可溶性。
8. 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，建议分成小份后-80°C保存。

● 实验例

1. 纯化后的 AAV 纯度测定

(与 AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6678)组合使用)

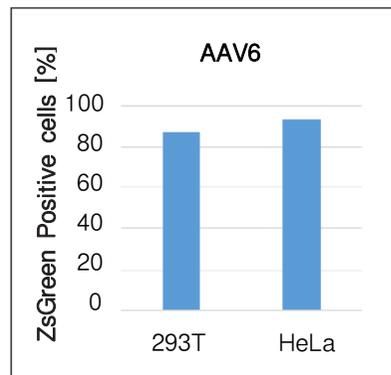
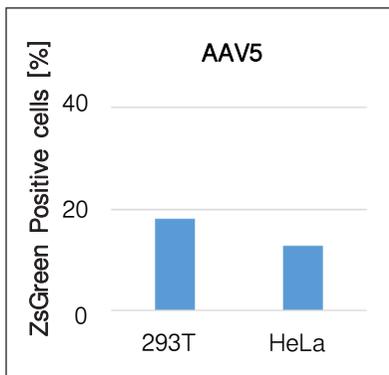
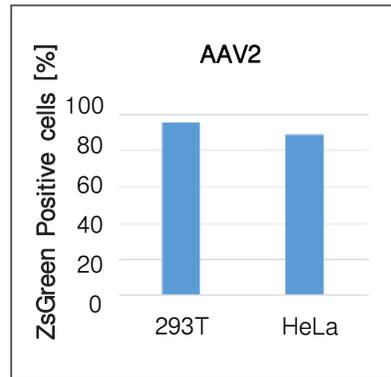
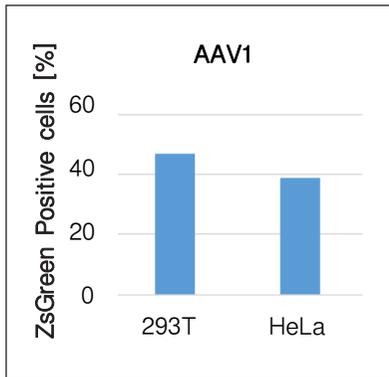
使用本制品提取和 AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6678)纯化携带 ZsGreen 荧光蛋白质的 AAV (血清型 1、2、5、6) 病毒。使用 AAVpro Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (Code No. 6233) 测定纯化后的 AAV 滴度，以 1×10^9 vg/lane 上样量进行 SDS-PAGE 电泳。结果显示，能够确认到以 AAV 衣壳蛋白 (VP1、VP2、VP3) 为主要的电泳条带。



2. 纯化后 AAV 的感染力评价

(与 AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes) (Code No. 6678)组合使用)

使用在 1.获得的各血清型的 AAV, 对各细胞株的感染力进行了评价。纯化后的 AAV 以 10,000 vg/cell (AAV1, AAV2)、或 100,000 vg/cell (AAV5, AAV6) 感染细胞, 3 天后进行了流式细胞仪分析。结果证实, 使用本制品提取和 AAVpro Purification Pack Maxi (All Serotypes)纯化的 AAV 保持着感染能力。



● 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)

- pAAV–ZsGreen1 Vector (Code No. 6231)

- 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)

- Trans* IT–VirusGEN Transfection Reagent (Code No. MIR6703 ~ MIR6706)
- Trans* IT–293 Transfection Reagent (Code No. MIR2700、MIR2704 ~ MIR2706)
- CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Code No. 631312)

- AAVpro[®] 293T Cell Line (Code No. 632273)

- AAVpro[®] Purification Kit Maxi (All Serotypes) (Code No. 6666)
- AAVpro[®] Purification Kit Midi (All Serotypes) (Code No. 6675)
- AAVpro[®] Extraction Solution (Code No. 6235)
- 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[®] Concentrator (Code No. 6674)

- AAVpro[®] Titration Kit (for Real–Time PCR) Ver. 2 (Code No. 6233)

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。

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