



Maghabour AAV Purification Kit

目录

1. 产品介绍.....	1
2. 使用方法.....	2
3. 注意事项.....	2
4. 参考信息.....	2
5. 常见问题与解答.....	4
6. 试剂盒的组成.....	5
7. 订购信息及相关产品.....	5

1. 产品介绍

1.1 腺相关病毒 (Adreno-Associated Virus, AAV)

腺相关病毒 (AAV) 是一种小型、无包膜的单链 DNA 病毒，于 20 世纪 60 年代作为腺病毒制剂的污染物被发现。病毒颗粒的直径在 20~26 nm 之间，线状单链 DNA 基因组大小在 4.7~6 kb 之间。AAV 的免疫原性低，体内注射后引起的免疫反应弱；生物安全性高，目前未发现 AAV 与任何已知疾病相关。研究发现：将 AAV 作为一种外源基因载体，携带的外源基因可以被高效的运送到动物组织和器官，因此 AAV 作为一种基因转移工具，被广泛应用于基础研究与临床基因治疗领域。

1.2 AAV 的纯化

AAV 生产流程的关键步骤是从工艺相关的杂质中纯化病毒颗粒，常用 AAV 纯化方法有 CsCl 或者碘克沙醇密度梯度离心法以及亲和纯化法等，密度梯度离心法是一种常用的大规模纯化 AAV 的方法，通过超速离心形成密度梯度，能够提取高纯度的 AAV 颗粒，但这种方法工艺复杂，化学试剂含有毒性，后期残留较难去除，所以越来越多的项目选择亲和纯化。亲和纯化 AAV 的方式操作简单，对操作者的要求低，并且 AAV 的活性能得到很好的保持，所以逐渐成为主流，Maghabour AAV Purification Kit 是就一款基于亲和原理而开发的磁珠法纯化 AAV 的试剂盒，适用于科研客户和项目研发阶段制备高纯度的 AAV。

1.3 试剂盒组成

Maghabour AAV Purification Kit 是一款针对不同血清型 AAV 而开发的磁珠法亲和纯化试剂盒，能够纯化 1-9 型以及特定改造后血清型的腺相关病毒，试剂盒中含有不同的组分（见表 1）。

表 1. 试剂盒组份

试剂盒成份	名称	特征
亲和纯化磁珠	Maghabour AAV Purification Microparticles	偶联了抗体的高聚物磁珠
洗脱液	Maghabour Elution Buffer	酸性洗脱液，含有 AAV 保护剂
中和液	Maghabour Neutralizing Buffer	能够快速将酸性溶液调整至中性

1.4 AAV 纯化磁珠

Maghabour AAV Purification Kit 的核心成分为 Maghabour AAV Purification Microparticles，这是一种超顺磁高聚物磁珠，通过化学键合的方式将 AAV 亲和抗体偶联至磁珠上从而达到纯化目的，Maghabour™ AAV Purification Microparticles 的相关参数见表 2。

表 2. Microparticles 基础信息

类别	性能
微球基质	磁性高聚物微球
配体	AAV 亲和抗体
粒径	1 μm
磁珠浓度	10 mg/ml
AAV 结合载量	≥1 X 10 ¹³ 病毒颗粒/ml (qPCR 法)
储存缓冲液	1×Tris (pH=8.0)，抑菌剂

1.5 保存与运输

运输：冰袋运输，不可冻结。

保存：2-8℃冷藏保存，不可冻结。



2. 使用方法

2.1 计算磁珠使用量

使用荧光定量 PCR 方法对磁珠的载量进行定量，结果显示每毫升 Maghbour AAV Purification Microparticles 的结合载量大于 1×10^{13} 个病毒颗粒，通常在 1×10^{13} - 1×10^{14} 个病毒颗粒之间。对于不同的 AAV 病毒亚型，磁珠结合载量会有差异，可以根据这个结合载量预估磁珠的使用量，再用预实验确认。预实验阶段推荐取用 100 μ l 磁珠进行 5-10 ml 样本的纯化，根据孵育前的样品、孵育后的流穿、洗杂上清、洗脱样品的 AAV 基因组拷贝数，判断后续实验磁珠最终使用量。

2.2 清洗磁珠

重复摇匀分散磁珠，取出所需体积，转移到合适的容器中，将磁珠置于磁力架上静置，待磁珠完全吸附在离心管壁后吸去上清，加入 3-5 倍磁珠含量的 PBS（100 μ l 磁珠含量加入 300-500 μ l PBS）轻轻颠倒混匀 5-10 次，再将悬液置于磁力架上，同样待磁珠完全吸附在离心管壁后吸弃上清，重复 3 次。

2.3 样品准备

AAV 包装和扩增一定时间后 8000 rpm 离心 10 min 收集含有 AAV 的上清；如果上清中 AAV 滴度不高，可以收集离心后的细胞，加入一定体积的 PBS 缓冲液重悬，在液氮和 37 $^{\circ}$ C 水浴中反复冻融 3-5 次将胞内的 AAV 释放出来，12000 rpm 离心 10-20 min 取上清。

2.4 样品孵育和洗杂

将样本和磁珠的混悬液在常温下摇晃孵育 30-60 分钟，随后将离心管置于磁力架上，直至磁珠完全吸附在离心管壁后，将上清液转移到另外的管子中，留样备检。在管中加入 3-5 倍磁珠含量的 PBS 缓冲液进行清洗，轻轻颠倒混匀 5-10 次后将离心管置于磁力架上，待磁珠完全吸附后弃去上清，如此重复 3-5 次。

2.5 AAV 洗脱

本试剂盒中提供了一种酸性洗脱缓冲液，洗脱时加入和磁珠含量等体积的洗脱液（100 μ l 磁珠含量加入 100 μ l 洗脱液），常温摇晃洗脱，每次洗脱 5-10 min，重复洗脱 5 次，洗脱的 AAV 需要分管收集，每次洗脱后加入中和缓冲液迅速将溶 pH 调整至中性。

2.6 AAV 检测

AAV 纯化后推荐先进行 SDS-PAGE 电泳检测，高滴度的 AAV 在 SDS-PAGE 胶上会检测到三条带，分别代表不同的 VP 蛋白，但由于 SDS-PAGE 电泳检测的分辨率有限，即使 SDS-PAGE 电泳上检测不到三条带也不代表没有纯化到 AAV，可能是 AAV 洗脱滴度低，推荐用荧光定量 PCR 的方法检测 AAV 的拷贝数。

3. 注意事项

- 1) 本产品保存在 2-8 $^{\circ}$ C 冰箱中，不要冻结保存；
- 2) 本产品出现轻微团聚属正常现象，可正常使用；
- 3) 本产品的洗杂液请自备，推荐 PBS 或者 TBS，不要加入 Tween 等去污剂；
- 4) AAV 纯化在常温环境中进行即可，没有必要在低温环境下操作；
- 5) AAV 的包装直接影响最终得到 AAV 的产量和质量，所以请严格优化 AAV 包装、扩增等相关参数和步骤；
- 6) 实时定量 PCR 检测 AAV 拷贝数是 AAV 定量方法之一，还有其它方法，每种定量方法原理不同，测得的拷贝数也不完全相同。

4. 参考信息

4.1 AAV 病毒的包装

- 1) 细胞接种：转染前一天进行 293T 细胞消化，接种至 100 mm 细胞培养皿中，接种密度为 30%-40%，培养体积为 10 ml，次日汇合度达到 60%-80% 时进行细胞转染；
- 2) 转染前细胞处理：转染前吸弃培养皿中 5 ml 完全培养基，加入 3ml 的 Opti-MEM1 或者无血清培养基，最终体积为 8 ml；
- 3) 细胞转染：1 个 100 mm 的细胞培养皿转染 30 μ g 质粒（AAV:RC:pHelper=10 μ g:10 μ g:10 μ g），加入 60 μ g PEI max。转染时准备两个 15ml 无菌离心管，均加入 0.9 ml Opti-MEM1，在一个离心管中加入 30 μ g 质粒混合物，另一个离心管中加入 60 μ g PEI max，室温静置 5 min 后将 PEI max 的混悬液加入至质粒混悬液中，室温静置 10 min，最后缓慢滴加至细胞中，终体积为 10 ml；
- 4) 荧光显微镜观察：如果 AAV 质粒中带有 GFP 荧光蛋白，转染 18-24 小时后可观察荧光强度从而初步判断转染效果；
- 5) AAV 收获：转染 3 天后收集细胞，8000 rpm 离心 10 min 收集上清，再加入 5 ml 1X PBS 重悬细胞，液氮和 37 $^{\circ}$ C 水浴锅快速冻融 3 次后 12000 rpm 离心 10 min 收集上清，最后将细胞冻融后的上清和培养基上清混匀，终体积约为 15 ml。



4.2 AAV 病毒的纯化

- 1) 磁珠预处理：磁珠分散均匀后取出 100 μ l 至 EP 管中，将磁珠置于磁力架上静置，待磁珠完全吸附在离心管壁后吸去上清，加入 300 μ l PBS 缓冲液进行清洗，再将悬液置于磁力架上，同样待磁珠完全吸附在离心管壁后吸弃上清，重复清洗 3 次；
- 2) 磁珠孵育：取出 10 ml AAV 培养上清，加入 100 μ l 清洗后的 AAV 纯化磁珠，摇晃均匀后常温摇晃孵育 30 min；
- 3) 磁珠洗杂：将离心管置于磁力架上，直至磁珠完全吸附在离心管壁后，将上清液转移到另外的管子中，加入 500 μ l PBS 缓冲液进行磁珠清洗，轻轻颠倒混匀后将离心管置于磁力架上，待磁珠完全吸附后弃去上清，如此重复 5 次。
- 4) AAV 洗脱：加入 100 μ l Maghabour™ Elution Buffer，常温摇晃洗脱 5 min，将离心管置于磁力架上，直至磁珠完全吸附在离心管壁后吸取上清为洗脱 1，再次加入 100 μ l Maghabour™ Elution Buffer 进行第二次洗脱为洗脱 2，重复 5 次洗脱步骤，每次洗脱后的溶液中迅速加入 10 μ l Maghabour™ Neutralizing Buffer 调整 pH；
- 5) AAV 检测：SDS-PAGE 检测、荧光定量 PCR 检测和 AAV 细胞侵染实验。

4.3 SDS-PAGE 电泳检测

取 20 μ l 孵育前的原样、孵育后的流穿和洗脱进行 SDS-PAGE 电泳检测，结果见图 1；

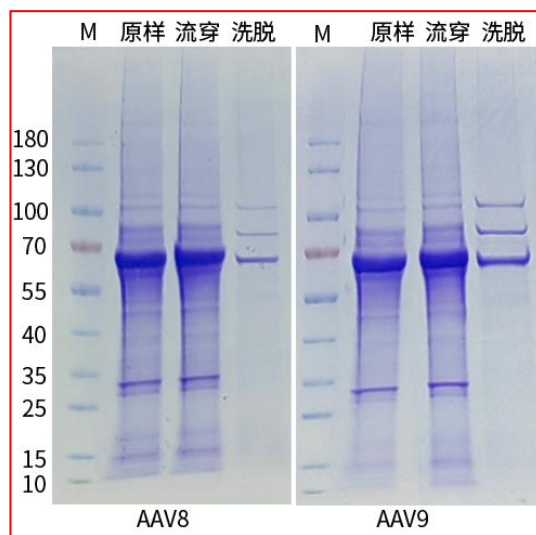


图 1.AAV8 和 AAV9 纯化后的 SDS-PAGE 电泳图

图 1.中可以看出利用 Maghabour AAV Purification Kit 纯化 AAV8 和 AAV9 血清型，洗脱中能够明显看到三条带，这三条带代表不同的 VP 蛋白，VP 蛋白的电泳是 AAV 纯度和滴度比较直观的一个表征。

4.4 实时定量 PCR 检测

将孵育前的原样、孵育后的流穿和洗脱管稀释 10 倍后取 1 μ l 进行实时定量 PCR 检测，检测试剂盒采用 HS Universal qPCR Master Mix (常州伯仪生物科技有限公司，BR0014-01)，标准曲线采用 AAV 质粒做为标准品进行绘制，结果见表 3。

表 3. 实时定量 PCR 检测 8 型和 9 型 AAV 样本中的基因拷贝数

血清型	项目	拷贝数 copies/ml 样本
8 型-AAV	原样	1×10^{11}
	流穿	9.7×10^9
	洗脱-1	5.1×10^{12}
	洗脱-2	1.1×10^{12}
	洗脱-3	2.5×10^{11}
9 型-AAV	原样	2.2×10^{10}
	流穿	2.6×10^9
	洗脱-1	7.4×10^{11}
	洗脱-2	5.3×10^{10}
	洗脱-3	1.2×10^{10}



4.5 AAV 侵染 293T 细胞

细胞提前接种于 96 孔板中，待细胞汇合度 $\geq 50\%$ 进行病毒侵染，利用 Opti-MEM1 无血清培养基将纯化后的 AAV8 分别稀释 1000 倍 (10^{-3})，10000 倍 (10^{-4})，100000 倍 (10^{-5}) 和 100000 倍 (10^{-6})，吸取 10 μ l 稀释后的 AAV8 进行 293T 细胞侵染实验，由于 AAV 质粒中带有 GFP 基因，通过荧光观察侵染效率，结果见图 2。

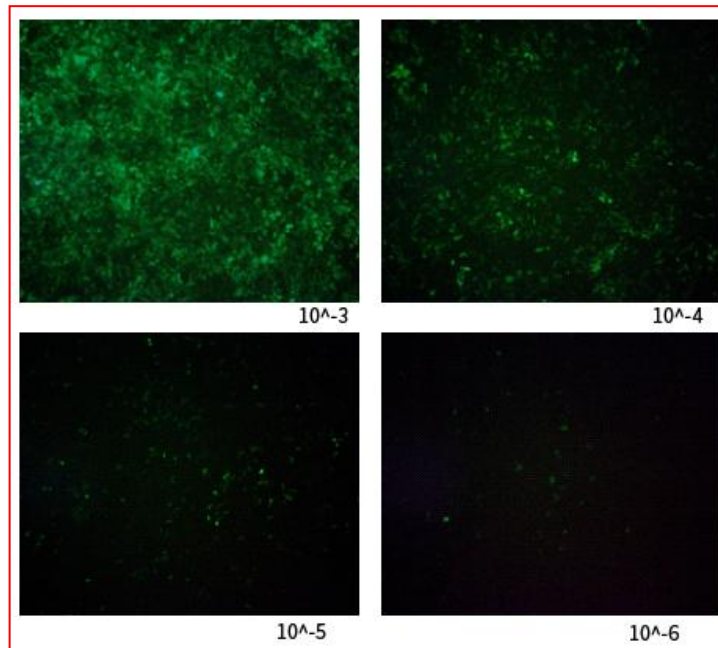


图 2. AAV8 侵染 293T 细胞的荧光图

图 2.中可以看出将纯化后的 AAV8 稀释 1000 倍后有很高的荧光强度，随着稀释倍数的增大 AAV 侵染细胞的数量逐渐减少，但稀释 10^{-6} 倍后仍有少量细胞带有荧光，说明纯化后的 AAV8 活性保持的较好。

5. 常见问题与解答

1) 为何 AAV 纯化后 SDS-PAGE 电泳看不到三条带?

- 可能是因为前期包装 AAV 的过程中出现问题，不同血清型的 AAV 病毒包装的效率不完全一样，可以适当调整三质粒的比值，一般适当增加辅助质粒的用量有助于提高 AAV 的包装效率，其次需要调整 PEI 的使用量，PEI 使用量过高会产生细胞毒性导致细胞死亡，PEI 使用量过低会导致转染效率下降，一般建议质粒和 PEI 的比值在 1:1-1:4 之间进行调整。
- 可能是因为 AAV 的滴度低检测不到三条带，SDS-PAGE 的灵敏度有限（一般需要 $\geq 100 \mu\text{g}$ 的蛋白量），SDS-PAGE 电泳无法直观的看到 AAV 的三条带可以通过实时定量 PCR 的方式进行基因拷贝数的检测。

2) 磁珠法纯化 AAV 和填料法纯化 AAV 使用场景有何不同?

- 从基础球上看磁珠法纯化 AAV 和填料法纯化 AAV 明显不同，磁珠法纯化是使用磁性微球做为介质进行 AAV 亲和抗体的键合交联而填料法使用的基础球一般为 PS 球或者葡聚糖球，这就决定了他们各自的特点，见表 4。

表 4. 磁珠法纯化和填料法纯化 AAV 的特点

纯化方式	特点
Maghabour AAV Purification Kit	载量高：载量 $\geq 1 \times 10^{13}$ /ml，不低于商品化的 AAV 亲和纯化填料； 操作简单：磁珠法纯化 AAV 没有柱效要求，孵育后洗脱即可得到高纯度 AAV； AAV 质量高：洗脱液中含有 AAV 保护剂，得到的 AAV 活性高，纯度高； 纯化效率高：磁珠法只需一个磁力架，无需装柱等复杂步骤。
填料法纯化 AAV	可再生：可进行一定次数的再生，重复使用，有效降低成本； 符合工业要求：有柱效，适合大规模纯化，适用于工业级 AAV 纯化； 载量高：载量 $\geq 1 \times 10^{13}$ /ml。

- 从表 4.可以看出填料法由于其有柱效，可再生的特点非常适用于工业化的生产；而磁珠法的特点在于高效、简单，更适用于早期研究或
- 工业客户，如 AAV 基因治疗或者 AAV 载体疫苗等项目早期的开发，可快速而高效的得到高质量 AAV 产物进行后续实验。



6. 试剂盒的组成

试剂盒成分	规格/10 T	规格/100 T	规格/1000 T
Maghabour AAV Purification Microparticles	1 ml	10 ml	100 ml
Maghabour Elution Buffer	5 ml	50 ml	500 ml
Maghabour Neutralizing Buffer	1 ml	10 ml	100 ml
说明书	1 份		

7. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
Maghabour AAV Purification Kit	SM052K01	10 T
	SM052K02	100 T
	SM052K03	1000 T
Maghabour AAV Purification Microparticles	SM052001	1 ml
	SM052010	10 ml
	SM052100	100 ml
AAV Affinity Beads 4FF	SA096005	5 ml
	SA096025	25 ml
	SA096100	100 ml
	SA09601L	1 L
PreCap AAV Affinity	SA096C11	1X1 ml
	SA096C51	5x1 ml
	SA096C15	1X5 ml
	SA096C55	5X5 ml
	SA096CS	3X1 ml+1X5 ml