



# AAV Affinity Beads 4FF

## 目录

1. 产品介绍.....	1
2. 病毒准备.....	1
3. 纯化流程.....	1
4. 填料清洗.....	3
5. 订购信息及相关产品.....	3

## 1. 产品介绍

腺相关病毒（Adeno-associated virus, 简称 AAV）属于细小病毒科低致病性病毒属，无包膜，是由直径约为 22 nm 的二十面体蛋白质衣壳（Cap 蛋白）和线性单链 DNA 基因组组成。

腺相关病毒载体是以 AAV 基因组为骨架改造而来的基因递送工具，可将治疗性基因递送入指定细胞，利用染色体同源重组原理，从而置换人体内功能失常的基因来治疗相关。腺相关病毒以安全性好、宿主细胞范围广、免疫源性低等特点，被视为最有前途的基因转移载体之一。

**AAV Affinity Beads 4FF** 是一种用于纯化腺相关病毒（AAV）的亲亲和层析介质，采用高度交联的 4% 琼脂糖介质为基质，使用不含动物源组分的配体，对腺相关病毒的 2、5、8 等多个血清亚型有较高的亲和力，适合从研究到工业规模纯化。具体性能见表 1。

表 1. AAV Affinity Beads 4FF 产品性能

性能	指标
基质	高度交联的 4% 琼脂糖微球
配体	AAV 亲和配体
载量	$> 1 \times 10^{13}$ genome copies/mL 介质
粒径	45-165 $\mu\text{m}$
最大压力	0.3 MPa, 3 bar
储存缓冲液	含 20% 乙醇的 1XPBS
储存温度	2-8 $^{\circ}\text{C}$

## 2. 病毒准备

AAV 病毒的生产是从质粒的构建、表达和纯化，以及哺乳动物或昆虫细胞的复苏、扩增开始的，待原材料全部准备完毕之后，就可以进行转染，在转染的细胞不断培养过程中，病毒载体的生产也在细胞内逐渐开始。不同规模的生产适用的细胞培养方式不同，其中贴壁细胞适用于工艺开发阶段或者比较容易放大的情况，生产方式可以使用平皿或者细胞工厂。而大规模的生产大部分选择悬浮生长的细胞，因为悬浮细胞培养密度更大，更容易扩展培养体积，可以使用动物细胞发酵罐或者波浪式反应器等，配合一次性培养耗材，可以进行稳定、安全、快速和高质量的培养。以上培养方式获得的重组病毒产品均可以使用 **AAV Affinity Beads 4FF**，进行不同规模的层析。

## 3. 纯化流程

### 3.1 缓冲液的准备

所用水和缓冲液在使用之前建议用 0.22  $\mu\text{m}$  或 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。

平衡/洗杂缓冲液：20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.0

洗脱缓冲液：0.1 M 柠檬酸-柠檬酸钠, 0.5 M NaCl, pH 2.5

中和液：1 M Tris-HCl, pH 9.0

注：为提高洗脱纯度，尤其是杂蛋白与目的蛋白间有相互作用时，可增加二次洗杂操作，洗杂缓冲液可做以下调整：

- 提高氯化钠浓度至 1 M；
- 选择不同 pH 洗杂缓冲液；
- 加入终浓度 0.05% 的 Tween-20；
- 加入  $\leq 0.2$  M  $\text{MgCl}_2$ （避免使用含有磷酸盐的缓冲液，防止产生沉淀堵塞柱子）；
- 加入  $\leq 20\%$  的乙醇，对大多数血清型的衣壳结构没有损害。



### 3.2 样品准备

收集的细胞培养上清或者是细胞裂解产物，在上样前需要离心去除细胞碎片或者裂解杂质，建议加入超级核酸酶降解宿主核酸，最后上样前使用 0.22 μm 或 0.45 μm 滤膜过滤，减少杂质，提高蛋白纯化效率和防止堵塞柱子。

添加超级核酸酶，可以减少核酸杂质，降低样品溶液的粘度，减小纯化时对层析柱压力，减少纯化样品的宿主核酸残留，提高最终样品纯度。

### 3.3 AAV Affinity Beads 4FF 装填

#### 3.3.1 重力柱的装填

- 1) 取合适规格的重力层析柱，装入下垫片，加入适量纯水润洗柱管和垫片，关闭下出口。
- 2) 将 **AAV Affinity Beads 4FF** 混合均匀，用枪头吸取适量浆液加入至重力柱中（介质实际体积占悬液的一半），打开下出口流干保护液。
- 3) 加入适量纯水冲洗介质，待柱管中液体重力流干后，关闭下出口。
- 4) 装入润洗后的上垫片，确保垫片与填料之前没有空隙，且保持水平。
- 5) 装填好的重力柱可以直接加入平衡液进行平衡，暂不使用时则加入保护液，2-8℃保存。

#### 3.3.2 中压层析柱的装填

**AAV Affinity Beads 4FF** 被广泛应用于工业纯化，因此，涉及到各种中压色谱层析柱的填装，下面介绍填装层析柱的方法。

装柱前根据层析柱直径计算柱子底面积，根据所需装柱高度计算所需介质体积，公式如下：

$$V = 1.15\pi r^2 h$$

V: 所需介质体积 ml

1.15: 压缩系数

r: 柱管半径 cm

h: 装填高度 cm

注意：所取悬液体积应为介质体积的两倍，因为介质体积只占悬液总体积的一半，另一半为保护液。

- 1) 用去离子水冲洗层析柱底筛板与接头，确保柱底筛板上无气泡，关闭柱底出口，并在柱底部留出 1-2 cm 的去离子水。
- 2) 将介质悬浮起来，小心的将浆液连续地倒入层析柱中。用玻璃棒沿着柱壁倒入浆液可减少气泡的产生。
- 3) 如果使用储液器，应立即在层析柱和储液器中加满水，将进样分配器放置于浆液表面，连接至泵上，避免在分配器或进样管中产生气泡。
- 4) 打开层析柱底部出口，开启泵，使其在设定的流速下进行。最初应让缓冲液缓慢流过层析柱，然后缓慢增加至最终流速，这样可避免液压对所形成柱床的冲击，也可以避免柱床形成的不均匀。如果达不到推荐的压力或流速，可以用你所使用泵的最大流速，这样也可以得到一个很好的装填效果。（注意：在随后的色谱程序中，不要超过最大装柱流速的 75%）当柱床高度稳定后，在最后的装柱流速下至少再上 3 倍柱床体积的去离子水。标上柱床高度。
- 5) 关闭泵，关闭层析柱出口。
- 6) 如果使用储液器，去除储液器，将分配器置于层析柱中。
- 7) 将分配器推向柱子至标记的柱床高度处。允许装柱液进入分配器，锁紧分配器接头。
- 8) 将装填好的层析柱连接至泵或色谱系统中，开始平衡。如果需要可以重新调整分配器。

### 3.4 样品纯化

#### 3.4.1 孵育法纯化

- 1) 根据纯化的样品量，取适量 **AAV Affinity Beads 4FF** 加入离心管中，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清；也可加入重力柱中，流干保护液。
  - 2) 向离心管中加入 5 倍介质体积的平衡液清洗介质，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清；如使用重力柱，则直接在重力柱中清洗，直接重力流干平衡液；重复两次以上。
  - 3) 加入样品，封闭离心管或重力柱管，4℃振荡孵育 2-4 h 或者 37℃孵育 30 min-2 h。
  - 4) 孵育结束后，1000 rpm 离心 1 min，吸弃上清，或过滤收集介质，上清保留作为流穿，用于电泳鉴定。
  - 5) 用 5 倍介质体积的洗杂液清洗介质，1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管过滤，去除上清（注意不要吸到介质），重复 3-5 次，中间建议更换新离心管。
  - 6) 加入 3-5 倍柱体积的洗脱液进行洗脱，室温孵育 5 min，1000 rpm 离心 1 min 或重力柱管收集洗脱液，可重复 2-3 次。
- 注：洗脱组分需要立即调成中性，一般建议使用洗脱组分体积 1/10 的中和液进行中和。

#### 3.4.2 重力柱法纯化

- 1) 将装填好的 **AAV Affinity Beads 4FF** 重力柱用 5 倍柱体积平衡液进行平衡，使填料处于与目的蛋白相同的缓冲液体系下，重复 2-3 次。
- 2) 将样品加到平衡好的重力柱中，样品保留时间至少 2 min，保证样品和介质充分接触，收集流出液，可以反复上样增加结合效率。



- 3) 用 10-15 倍柱体积的洗杂液进行洗杂，去除非特异性吸附的杂蛋白，收集洗杂液。
  - 4) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，分段收集，每一个柱体积收集一管，分别检测，既可以保证所有结合的目的蛋白被洗脱，又可以得到高纯度和高浓度的蛋白。
- 注：洗脱组分需要立即调成中性，一般建议使用洗脱组分体积 1/10 的中和液进行中和。

### 3.4.3 中压层析柱法纯化

**AAV Affinity Beads 4FF** 装填好后，可以用各种常规的中低压色谱系统。

- 1) 将泵管道中注满去离子水。去掉上塞子，将层析柱连接至色谱系统中，打开下出口，将预装柱接到色谱系统中，并旋紧。
- 2) 用 3-5 倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液。
- 3) 使用至少 5 倍柱床体积的平衡液平衡色谱柱。
- 4) 利用泵或样品环上样。注：样品的粘度增加使得即使上样体积很少，也会导致层析柱很大的反压。上样量不要超过柱子的结合能力。大量的样品体积也可能造成很大的反压，使得进样器更难使用。
- 5) 用洗杂液冲洗柱子，直到紫外吸收达到一个稳定的基线（一般至少 10-15 个柱体积）。
- 6) 使用 5-10 倍柱体积的洗脱液洗脱，收集洗脱液，即目的蛋白组分。

注：洗脱组分需要立即调成中性，一般建议使用洗脱组分体积 1/10 的中和液进行中和。

介质洗脱结束后，用平衡液冲洗 5-10 柱体积，然后用纯水冲洗 5-10 个柱体积，再用 20%乙醇冲洗 2 个柱体积，置于 2-8℃保存。

### 3.5 SDS-PAGE 检测

将使用纯化产品得到的样品（包括流出组分、洗杂组分和洗脱组分）以及原始样品使用 SDS-PAGE 检测纯化效果。

## 4. 填料清洗

**AAV Affinity Beads 4FF** 纯化产品每次纯化后都需进行一次在位清洗，推荐的清洗方法是先用低 pH 的缓冲液清洗，然后用变性剂清洗，具体操作步骤如下：

- 5 倍柱体积 0.1 M 磷酸，pH2.0 接触 10 min；
- 5 倍柱体积 1×PBS，pH7.4 清洗；
- 5 倍柱体积 6 M 盐酸胍接触清洗 15 min；
- 15 倍柱体积 1×PBS，pH7.4 清洗平衡；
- 3 倍柱体积含 20% 乙醇的 1XPBS 清洗，保存在 2-8℃。

## 5. 订购信息及相关产品

名称	货号	规格
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