

Ad5 纯化试剂盒说明书

【产品名称】

通用名称：Ad5 纯化试剂盒

【产品规格】

货 号：FBP2401-5

规 格：5Test/盒

【产品介绍】

Ad5 纯化试剂盒适用于快速高效地纯化和浓缩重组腺病毒，Ad5 纯化试剂盒利用离子交换原理，操作简单，且安全有效。可纯化 15~18×10cm 培养皿（约 1.0E+12VP）的病毒颗粒，操作时间仅需 60min~90min。

【包装清单】

产品名称	规格
Buffer A（Loading buffer）	125mL*2
Buffer B（Wash buffer）	80mL
Buffer C（Elution buffer）	100mL
Ad5 纯化柱	5 个
storing buffer	100mL
100KD 超滤浓缩管	5 个

【存储条件及有效期】

4℃~8℃ 保存，有效期 1 年。

【安全信息】

腺病毒转染的细胞培养液和纯化后的病毒是潜在的生物危险品，对人类和动物具有传染性，因此，所有的操作步骤至少在生物安全级别二级条件下进行。

【操作流程】

一、收获腺病毒

- 1、当约 50%的细胞出现 CPE 时（观察到 50%细胞呈圆形聚集漂浮在培养基中，其余细胞粘附且完整）收集细胞和上清至 50mL 离心管中。

注：腺病毒快速滴度检测试剂盒可用于在细胞病变效应(CPE)形成之前进行监测。

- 2、4℃，3000×g 离心 5min 收集细胞，丢弃上清，留细胞沉淀。
- 3、每 10×10cm 培养皿细胞量使用 1mL storing buffer 重悬。
- 4、细胞重悬液在液氮/-80℃冰箱和 37℃水浴中重复冻融三次（或使用细胞研磨仪）。
- 5、最后一次解冻后，细胞重悬液离心（离心条件：4℃，10000g，5min）去除细胞碎片，收集上清液。
- 6、使用 0.45um 滤膜过滤上清，过滤后的病毒液可以进行纯化或-80℃保存。

注：可以选择加入 Benzonase Nuclease，37℃ 孵育 1h，降低了溶液的粘度，有利于通过纯化柱。

二、平衡纯化柱

- 7、将 Ad5 纯化柱放置在 50ml 离心管中，离心（离心条件：4℃、50×g、1min）去除气泡。
- 8、拧开 Ad5 纯化柱的底部封盖，让保存液依靠重力流下或离心（离心条件：4℃、50×g、1min）。
- 9、用 15mL buffer A 平衡 Ad5 纯化柱两次，依靠重力流下或离心（离心条件：4℃、50×g、1min），至纯化柱中无液体即可。

三、Ad5 纯化柱上样病毒上清液

- 10、使用 buffer A 将病毒液按照比例（1×10cm 培养皿细胞补充体积至终体积 1mL）进行稀释。

11、将稀释后的病毒液装入 Ad5 纯化柱，依靠重力流下或离心（离心条件：4℃、20×g、1min），让病毒液逐渐通过 Ad5 纯化柱，继续加载直到所有病毒液通过 Ad5 纯化柱。（可将流穿液重新加载上柱一次，以获得最大的病毒颗粒结合量。）

四、清洗杂蛋白及洗脱病毒颗粒

12、用 15mL buffer B 清洗 Ad5 纯化柱，离心（离心条件：4℃、20×g、1min），至纯化柱中无液体即可。

13、用 15mL buffer C 洗脱病毒，依靠重力流下或离心（离心条件：4℃、20×g、1min）至纯化柱中无液体，收集 15ml 洗脱液。

注：可重复一次上述步骤，进行 2 次洗脱，确定滴度和纯度后可合并浓缩。

五、脱盐和缓冲液交换

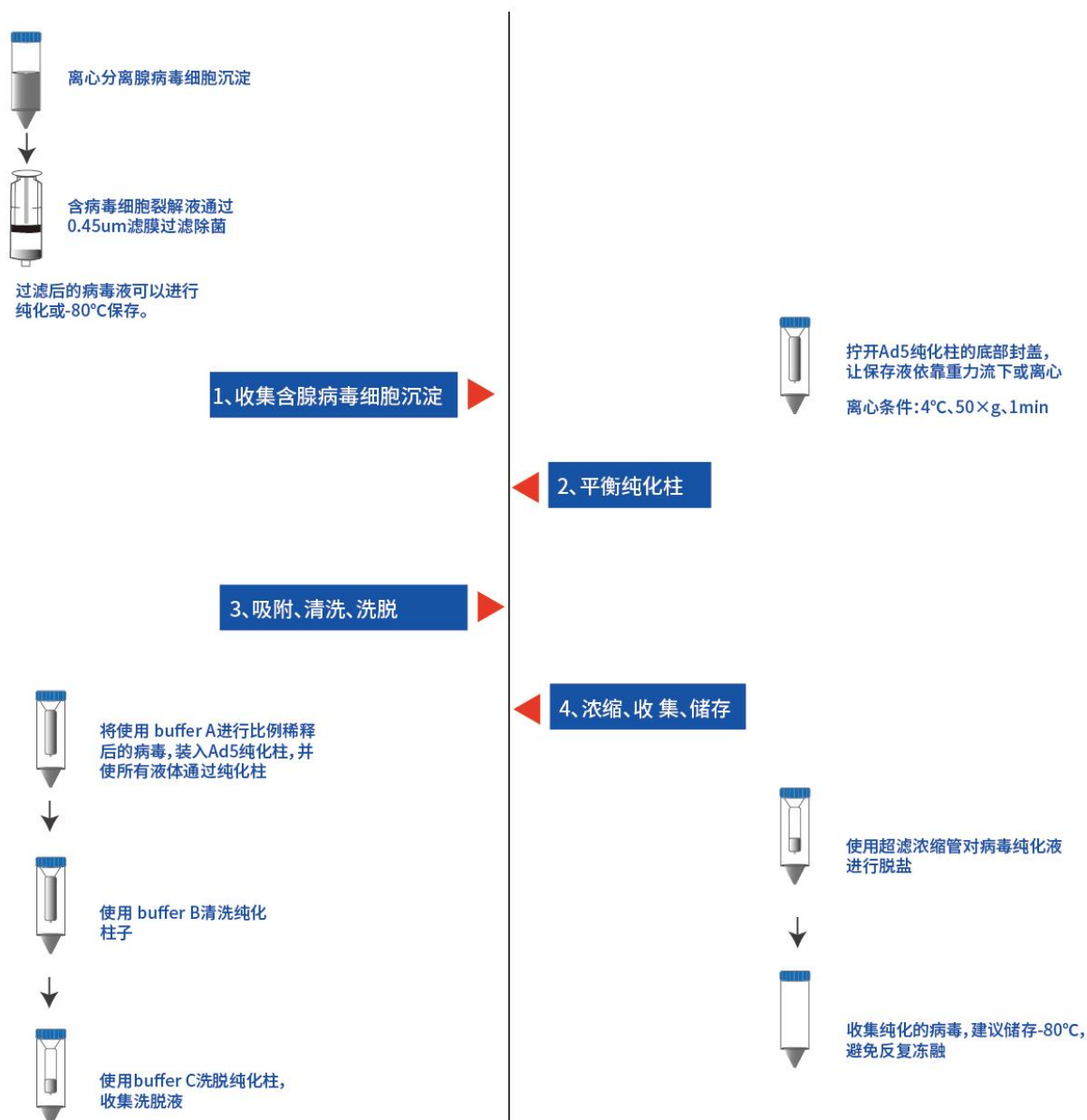
14、洗脱液使用 100KD 超滤浓缩管置换 storing buffer，-80℃ 储存。

（1）转移步骤 13 中 15ml 样品至超滤浓缩管中，4℃ 离心，5000rpm，至超滤浓缩管中剩余液体约 1ml，弃滤液，补加 9ml storing buffer 到超滤浓缩管中。

（2）重复上述步骤 1 次，至超滤浓缩管中约 1mL 左右，用移液枪在超滤浓缩管滤膜上反复吹打数次，收集纯化的病毒。

注：纯化后的病毒建议分装储藏在-80℃，避免反复冻融。

Ad5纯化试流程



【注意事项】

- 1、纯化和保存过程中，应始终保持纯化介质湿润。
- 2、首次使用前，应先离心 $50\times g$ ，1min，去除运输过程中产生的气泡。
- 3、离心条件仅为参考条件，使用时可视剩余液体体积选择延长或缩短离心时间。
- 4、上柱纯化前，样品溶液使用 0.45um 的滤膜过滤。

【参考文献】

1. Huyghe BG, Liu X, Sutjipto S, Sugarman BJ, Horn MT, Shepard HM, Scandella CJ, Shabram P. Purification of a type 5 recombinant adenovirus encoding human p53 by column chromatography. Hum Gene Ther. 1995 Nov;6(11):1403-16.
2. Graham, F . L. & Prevec, L. (1991) Manipulation of adenovirus vectors. In Methods in Molecular Biology, Vol. 7: Gene Transfer and Expression Protocols. Ed. Murray, E. J. (Human Press Inc., Clifton, NJ), pp. 109–128.