

QuaCell® AAV Production Kit

无血清，无动物源成分

腺相关病毒 (AAV) 最强生产力

目 录

CONTENT

产品简介.....	01
产品组成.....	01
操作指南.....	02
细胞培养.....	02-03
AAV病毒包装.....	03
病毒收获及样品处理.....	04
病毒样品定量.....	04-06

产品简介

QuaCell® AAV Production Kit生产系统是一种基于293细胞系的高产量腺相关病毒(AAV)表达生产系统。QuaCell® AAV Production Kit系统包括WayneLVPro™ HEK 293细胞、Wayne293® V MAX Medium 培养基、转染试剂、转染缓冲液、细胞裂解缓冲液和病毒裂解液及工作液,以生产高滴度的腺相关病毒(AAV)载体。

产品组成

名称	货号	规格	储存条件
QuaCell® AAV Production Kit	A24501	Set	2-8°C, 液氮 (-196°C)
WayneLVPro™ HEK293 Cell line	A23109	1.5×10 ⁷ cells/mL	液氮 (-196°C)
Wayne293® V MAX Medium	A21502	1000mL	2-8°C, 避光
QuaCell® AAV Transfection Kit	B34501	Set	2-8°C
QuaCell® V MAX Transfection Reagents	B31501	5mL	2-8°C, 避光
QuaCell® Transfection Buffer	B31502	10mL	2-8°C
QuaCell® Cell lysis Buffer	B31503	100mL	2-8°C
QuaCell® Virus lysis Buffer Part A	B31504A	0.5mL	2-8°C
QuaCell® Virus lysis Buffer Part B	B31504B	5mL	2-8°C

表1. 产品组成

1.WayneLVPro™ HEK293 Cell line

WayneLVPro™ HEK293 Cell line是HEK293细胞系的克隆衍生物,经康晟生物研发团队驯化、单克隆筛选细胞可以直接复苏到Wayne293® V MAX Medium 中。细胞系特征如下:

WayneLVPro™ HEK293 Cell line是一种适合于高密度生长条件的细胞株,细胞倍增时间为 23小时左右。在摇瓶培养中,最高密度≥1×10⁷ cells/mL。

- 细胞复苏后建议传代3次以上再进行病毒包装实验

2.Wayne293® V MAX Medium

Wayne293® V MAX Medium 是一款由康晟生物研发团队开发的无血清,无蛋白,无动物来源成分,化学成分限定的培养基,用于WayneLVPro™ HEK293 Cell line的培养及转染。

3.QuaCell® V MAX Transfection Reagents

该试剂盒所使用的转染试剂为高电荷阳离子聚合物 (PEI) 类型,非常容易结合带负电荷的核酸分子,形成复合物,并使该复合物进入细胞中。其细胞毒性低,转染效率高;可高效共转染多个质粒DNA到高密度WayneLVPro™ HEK293 Cell line中。

4.QuaCell® Transfection Buffer

性质稳定、无细胞毒性、对细胞状态及转染无影响的缓冲液,用于稀释质粒DNA及PEI形成转染混合液。

5.QuaCell® Cell lysis Buffer

该试剂盒所使用的细胞裂解缓冲液主要成分为非离子型表面活性剂,可高效裂解细胞膜,释放胞内病毒载体,以获得胞内表达的AAV载体。

6. QuaCell® Virus lysis Buffer

该试剂盒所使用的QuaCell® Virus lysis Buffer Part A为一定浓度的蛋白溶解酶溶液，56℃条件下能使病毒蛋白外壳裂解，QuaCell® Virus lysis Buffer Part B可以帮助增强病毒裂解液A的活性使病毒蛋白外壳裂解更充分完全，便于后续样品定量(qPCR检测)。

操作指南

1. 细胞培养

细胞储存：

- ① 冷冻细胞在收到后避免将细胞长期储存在-80℃，应立即储存在液氮中，可长期保存；
- ② 让细胞在液氮中保存3-4天，再进行复苏解冻；
- ③ 避免让细胞经受短期、极端的温度变化。

细胞培养体积及培养参数（如下表）：

培养容器类型	培养瓶体积大小	推荐细胞培养体积	推荐参数
TPP	50 mL (TPP)	12 mL (10~20mL)	200±5 rpm (50mm振幅)
培养摇瓶	125 mL	30~35mL	125±5 rpm (19 mm 振幅) 120±5 rpm (25 mm 振幅) 95±5 rpm (50 mm 振幅)
	250mL	60~70mL	
	500 mL	120~140 mL	
	1000 mL	240~280mL	
	2000mL	480~560mL	
	3000mL	720~840mL	85±5 rpm

表2. 推荐细胞培养体积及培养参数

1.1 细胞复苏

- ① 在 37℃ 水中快速摇晃解冻 (< 2 分钟) 冻存管中的细胞液；
- ② 将细胞液转移至 15 mL 离心管中，加入 5mL 预热的Wayne293® V MAX Medium培养基，以1000rpm 离心 5 分钟 丢弃上清液，使用 5ml Wayne293® V MAX Medium重悬，进行细胞计数；
- ③ 将上述离心管的全部细胞液转移到装有 25 mL 预热的Wayne293® V MAX Medium的 125ml 摇瓶中，或稀释至所需细胞密度；
- ④ 在含有 5% CO₂，37℃，加湿的 CO₂ 震荡培养箱中进行培养。
- ⑤ 细胞复苏后培养 2~3 天，细胞密度达到 $(1.5\sim2.5) \times 10^6$ cells/mL进行传代。在进行其它实验之前，复苏的细胞至少应进行三次传代以保证细胞状态良好。

1.2 细胞传代培养

- ① 建议在细胞密度达到 $(1.5\sim2.5) \times 10^6$ cells/mL 时进行细胞传代，可使用自动细胞计数仪或其他计数仪器进行细胞计数；
- ② 推荐的接种密度为 5×10^5 cells/mL；
- ③ 继续置于37℃、5% CO₂ 的CO₂ 震荡培养箱中培养，通常2~3天后可进行下一次传代；

1.3 细胞冻存

- ① 以 $(1.0 \sim 1.5) \times 10^7$ cells/mL 的最终密度冷冻；
WayneLVPTM HEK293 悬浮细胞，将 90% Wayne293[®] V MAX Medium 和 10% DMSO 混合至总体积为 1mL；
- ② 建议细胞在冻存前的密度保持在 $(1.5 \sim 2.5) \times 10^6$ cells/mL，细胞存活率 > 95%；
- ③ 将细胞在 1000 rpm 下离心 5 分钟至沉淀，弃去培养上清，换入预冷的含 10% DMSO 的 Wayne293[®] V MAX Medium，用移液管轻轻吹打重悬细胞；
- ④ 将细胞调整至 $(1.0 \sim 1.5) \times 10^7$ cells/mL 终浓度并分装为每冻存管 1mL；
- ⑤ 按照标准程序，在自动或手动控制速率的冷冻设备中实现冷冻保存。将冷冻细胞转移到液氮或 -130℃ 以下保存。

2. AAV 病毒包装

2.1 细胞准备

取一瓶状态良好的 293 细胞按 0.5×10^6 cells/mL 的密度传代，使用计数仪记下细胞密度，当细胞密度达到 $(2.5 \sim 3.0) \times 10^6$ cells/mL 时 can 开始病毒包装实验。

2.2 测糖补糖

取 1~2uL 细胞液用测糖仪进行测糖，并根据测糖仪读数使用葡萄糖溶液（可自行配制，溶液浓度为 300g/L），将细胞糖浓度补充至 6g/L，同时还需补充 4mM/L 的谷氨酰胺（需自行配制，推荐溶液浓度为 200mM/L）。

2.3 质粒 DNA 准备

常用的 AAV 三质粒系统包括表达载体（Expression vector）（以 GFP 为例）、包装质粒（Rep-Cap plasmid）和辅助质粒（p Helper p lasmid）三种质粒；一般建议将质粒的工作浓度调整为 1ug/uL。

2.4 质粒转染

每 10mL 转染反应体积需要 500uL 质粒混合液及 500uL 转染混合液，质粒浓度 1ug/uL 条件下，以下配比供参考（如需扩大转染反应体积可按比例扩大各组分量）：

质粒混合液 (uL)	包装质粒	辅助质粒	表达载体 (GFP)	QuaCell [®] Transfection Buffer
	5	5	5	485

表 2.1 质粒混合液配制表

转染混合液 (uL)	QuaCell [®] V MAX Transfection Reagents	QuaCell [®] Transfection Buffer
	45	455

表 2.2 转染混合液配制表

- ① 将质粒混合液及转染混合液按上述表格配制好后轻柔混匀，静置 5 分钟；
- ② 将转染混合液小心加至质粒混合液中，轻柔颠倒混匀，静置 15 分钟；
- ③ 将静置后的转染混合液边轻轻摇晃边逐滴滴加至准备好的细胞液中 (10mL)，滴加完成后放回摇床继续培养 72h。

3. 病毒收获及样品处理

3.1 细胞裂解，释放病毒

- ① 摇匀细胞并立即取2ml细胞于离心管中；
- ② 将细胞常温800 rpm离心5min收集细胞，小心弃去培养基；
- ③ 将细胞沉淀重悬于 QuaCell® Cell lysis Buffer 中，放入摇床培养箱中37°C孵育1h(细胞裂解完成释放胞内表达的AAV载体) ；
- ④ 长期保存至-80°C，一个星期内使用可放于-20°C，当天内使用可暂放于4°C。

注意：

- 1.避免反复冻融AAV，长期储存温度为-80°C，低温静置解冻（0~4°C）。
- 2.如果病毒用于感染实验，则需要额外加入蛋白酶抑制剂（如PMSF，cocktail等）以保证病毒衣壳完整性。
- 3.如果病毒用于qPCR检测物理滴度，则不可加入蛋白酶抑制剂（如PMSF，cocktail等），否则影响QuaCell® Virus lysis Buffer Part A活性，即影响病毒DNA的释放。
- 4.细胞裂解过程中不可以加入核酸酶，因为在没有蛋白酶抑制剂存在的体系中，溶酶体会降解病毒衣壳，暴露病毒核酸，加入核酸酶会导致结果假阴性。

3.2 病毒DNA的释放

- ① 病毒蛋白外壳消化:取细胞裂解完成的收获的AAV载体样品50uL于1.5mL离心管中,加入5uL QuaCell® Virus lysis Buffer Part A及50uL QuaCell® Virus lysis Buffer Part B,并充分涡旋混匀10s,将离心管置于水浴锅中56°C孵育25min;
- ② 病毒裂解液活性终止:将孵育结束的样品取50uL至PCR管中,采用PCR仪设定程序95°C, 15min以达到将病毒裂解液活性终止的目的(若跳过病毒裂解液活性终止步骤,或活性终止不完全,会对后续qPCR检测AAV滴度产生较大影响)。

4. 病毒样品定量

此AAV定量方法可用于确定AAV中含有目的基因的拷贝数量。qPCR检测AAV滴度的方法需要根据目的基因设计引物。对于本方案，以GFP为目的基因的细胞裂解后回收的AAV载体（纯化前）作为模板。另外，qPCR设备参数设置需要根据实际需求进行设计和优化。

4.1 试剂准备

试剂	浓度	备注
SYBR Green Mix	2×	
PCR Forward Primer	5μM	根据目的基因片段设计
PCR Reverse Primer	5μM	
ROX	----	根据仪器需要选择添加
无菌水	----	----

表4.1 qPCR试剂混合液配比参考表

4.2 目的基因拷贝数标准溶液的制备

- ① 拷贝数计算:拷贝数=(阿伏伽德罗常量 6.02×10^{23}) * (质粒浓度 $\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^9$) / (DNA length \times 660) copies/ μL 。例:GFP大小为6007bp, 浓度1000ng/ μL , 则代入公式计算得出拷贝数为 1.52×10^{11} 。
- ② 配制拷贝数为 1×10^{10} copies/ μL 的 ST1 溶液500 μL :33 μL GFP质粒 + 467 μL 无菌水。取一支拷贝数为 1×10^{10} copies/ μL 的

GFP质粒标准品，标记为ST1，用无菌水依次按10倍将ST1梯度稀释到 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 copies/ μ L，依次标记为ST2、ST3、ST4、ST5、ST6；再将ST6以5倍梯度稀释4次，依次标记为ST7、ST8、ST9、ST10；将ST10以2倍梯度稀释3次，依次标记为ST11、ST12、ST13。取ST6~ST13作为标准曲线的八个点。

具体稀释步骤如下：

稀释管	稀释体积	浓度
ST1	33 μ L GFP质粒 + 467 μ L 无菌水	1×10^{10}
ST2	50 μ L ST1+450 μ L 无菌水	1×10^9
ST3	50 μ L ST2+450 μ L 无菌水	1×10^8
ST4	50 μ L ST3+450 μ L 无菌水	1×10^7
ST5	50 μ L ST4+450 μ L 无菌水	1×10^6
ST6	50 μ L ST5+450 μ L 无菌水	1×10^5
ST7	100 μ L ST6 + 400 μ L 无菌水	2×10^4
ST8	100 μ L ST7 + 400 μ L 无菌水	4×10^3
ST9	100 μ L ST8 + 400 μ L 无菌水	8×10^2
ST10	100 μ L ST9 + 400 μ L 无菌水	1.6×10^2
ST11	250 μ LST10+250 μ L 无菌水	8×10^1
ST12	250 μ LST11 +250 μ L 无菌水	4×10^1
ST13	250 μ LST12 +250 μ L 无菌水	2×10^1

表4.2 标准品稀释步骤

4.3 样品定量

① 预混液配制（冰上进行）：打开生物安全柜，从冰箱中取出SYBR（在冰上融化）、无菌水、Primer、待测样品放于冰上（可用冰盒代替），采用20 μ L的反应体系如下：

试剂组分	体积(μ L)	终浓度
SYBR Green Mix	10	1×
PCR Forward Primer (5 μ M)	1	100nM
PCR Reverse Primer (5 μ M)	1	100nM
ROX	0.4	/
Template DNA (<50ng)	5	/
无菌水	2.6	/
Total	20	/

表4.3 qPCR反应体系各试剂组分占比

每个样品三个平行, 8个标准品, 最少需要配制 $(8 + \text{样品数}) \times 3 \times 15\mu\text{L}$ 的Premix (建议多配几份)。配制完成后将Premix振荡混匀, 瞬时离心备用。注: 为确保数据准确性, 样品可进行梯度稀释, 每个梯度三平行。

② 样品稀释: 将步骤3.2得到的病毒DNA样品取5uL稀释于95uL 无菌水中, 以此类推稀释至100000倍。每个样品取10000倍与100000倍两个稀释倍数作为模板。

③ 点样: 取出八联管/96孔板置于96孔冰盒上, 按所需孔数每孔铺入15uL Premix, 每个模板三个平行孔各点5uL样, 盖好八联管盖子/孔板光学封膜。

④ 检查管底是否有气泡, 若有则用手指轻弹至气泡消失, 以1000rpm离心1min。

⑤ 上机及设定程序: 将样品放进孔板槽后设定反应程序, 点击运行开始反应, 程序设置如下: (注: 程序设置随染料品牌有细微变化, 具体按照SYBR染料说明书设置)

Stage	Temp	Time
恒温段	95 °C	1min
循环段	95 °C	20s
	50~60 °C	20s
	72°C	60s
	Go to 40× Cycles	
溶解段	使用仪器自带溶解段	

表4.4 qPCR反应程序设置

⑥ 数据处理: 以GFP标准品CT值为横坐标, 拷贝数的对数值 (以10为底) 为纵坐标做线性回归, 拟合曲线, $R^2 \geq 0.99$ 则曲线数据可用。

将未知浓度样品得到的CT值代入回归方程计算得到拷贝数底数, 从而得出样品拷贝数浓度。

注: 同一样品三个平行间应舍弃CT值相差 > 1的数据; 应舍弃三个平行间CT值相差 > 1的数据, CT值范围需落在16~34之间。

注意:

1. 绘制标准曲线实验中DNA模板加入体积和病毒定量qPCR实验中的模板量需保持一致, 否则将导致标准曲线不可用。比如, 在本说明书中标曲绘制的qPCR实验中DNA体积为5μL, 那么在AAV的后续qPCR实验中必须保持模板为5μL体积。

2. 根据标准曲线计算出的AAV浓度需乘以2。由于AAV为单链DNA, 标准曲线用质粒 (双链DNA) 来进行绘制, 所以标准曲线中质粒拷贝数应该对应的是两倍的AAV拷贝数。

3. 样品qPCR的CT值范围需落在16~34之间。详细原因请查阅相关资料, 原理超出本说明书讨论范围内。