

Инструкция по применению

# Vivapure<sup>®</sup> Adenopack<sup>™</sup> 20 RT

Набор для концентрирования и очистки аденовируса (Ad5) клеточных культур объемом до 20 мл (например, планшет 1 × 15 см) | Только для использования in vitro



85037-548-52



SARTORIUS

# Vivapure Adenopack 20 RT – Введение

## Условия хранения/ срок годности

Содержимое набора Adenopack следует хранить при комнатной температуре. Комплект необходимо использовать в течение 24 месяцев.

## Введение

В данном протоколе описан процесс очистки аденовируса (штамм Ad5) с помощью центрифужных колонок для ультрафильтрации Adenopack Maxi, которые содержат ионообменный мембранный адсорбер, связывающий частицы аденовируса. После связывания частицы вируса могут быть очищены путем вымывания неспецифически связанных белков. Далее проводится элюирование в течение одного часа.

Комплект Adenopack 20 RT разработан для параллельной очистки и концентрирования штаммов аденовируса Ad5 из клеточной культуры объемом 20 мл.

Для сравнения, традиционное градиентное центрифугирование CsCl является методом, который, во-первых, требует затрат времени, как правило, 1–2 дня, а во-вторых, эффективен только для объемов клеточных культур более 100 мл. Кроме того, токсичность сред накладывает ограничения на последующее применение.

Готовые к использованию фильтрующие устройства, спин-колонок для ультрафильтрации Adenopack Maxi, центрифужные концентраторы Vivaspin и буферы дают возможность провести дальнейшую процедуру очистки так же легко, как и обычную процедуру фильтрации.

Исследования по вирусной очистке проведены совместно с компанией «Progen Biotechnik GmbH», Хайдельберг.



## Vivapure Adenopack 20 RT

Номер по каталогу	VS-AVPQ022
Возможное количество процессов очистки с Adenopack 20	6 × 20 мл
Центрифужные колонки для ультрафильтрации Adenopack Maxi	6
Vivaclear Maxi 0,45 мкм, ПЭС	6
Пустые пробирки объемом 50 мл	6
Загрузочный буфер (10×)	25 мл
Промывочный буфер (10×)	30 мл
Буфер для элюирования	20 мл
Концентратор Vivaspin 20, порог отсека 100 кДа	6
Инструкции	по 1 на набор и на концентраторы Vivaspin

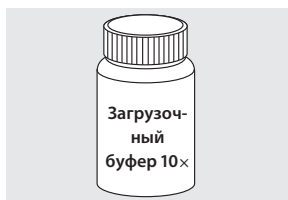
## Материалы деталей

Корпус спин-колонок Adenopack Maxi	Полипропилен
Корпус Vivaclear Maxi	Полипропилен
Мембрана Adenopack	Стабилизированная регенерированная целлюлоза
Емкости для буфера	ПЭНП
Буферы для очистки	Собственный

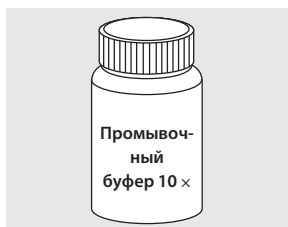
## Технические характеристики набора

Объем пробы	20 мл супернатанта с аденовирусом
Количество вирусных частиц (ВЧ) на мл	Как правило, до $1 \times 10^{11} - 10^{12}$
ВЧ/ИЕ	50 – 100
Продолжительность обработки	Как правило, 1 час
Уровень эндотоксинов	< 0,025 ЕЭ/мл

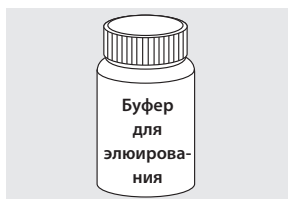
## Состав комплекта



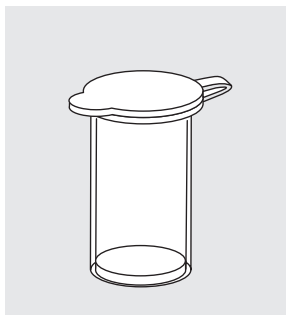
Загрузочный буфер 1 × 25 мл



Промывочный буфер 1 × 30 мл



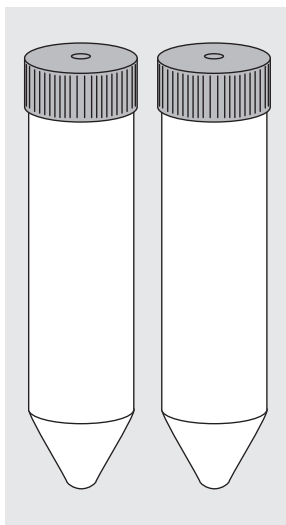
Буфер для элюирования  
1 × 20 мл



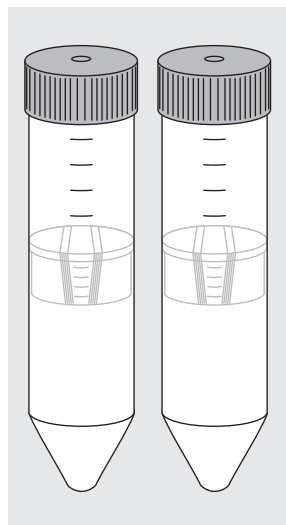
6 центрифужных колонок  
Adenopack Maxi



6 центрифужных колонок  
Vivaclear Maxi



6 пробирок объемом 50 мл  
с навинчивающимися  
крышками



6 концентраторов Vivaspin 20  
с мембраной 100 кДа

### Дополнительные требуемые материалы, не входящие в объем поставки

Центрифуга с бакетными роторами для пробирок типа Фалькон объемом 50 мл

Этаноловая баня | баня на сухом льду или морозильная камера с температурой  $-80^{\circ}\text{C}$

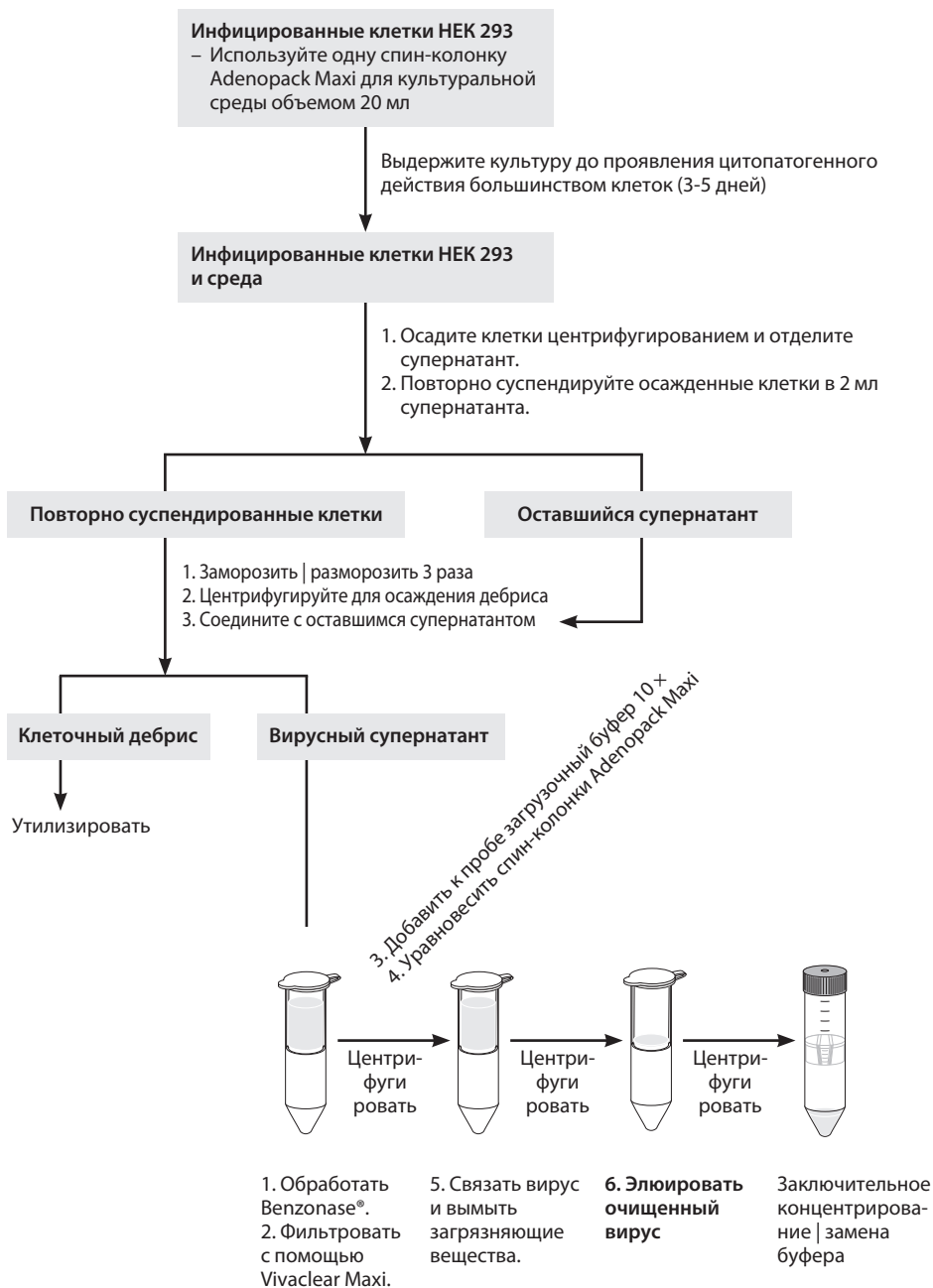
Водяная баня,  $25^{\circ}\text{C}$

Стерильный пластиковый контейнер для работы с пробами

Дополнительно – Буфер для хранения: 20 мМ Трис/HCl, 25 мМ NaCl, 2,5% раствор глицерина (масса/объем), pH 8,0 при температуре  $22^{\circ}\text{C}$

Нуклеаза Venzonase® 1500 ед.

# Протокол очистки – Общая схема



## Протокол очистки – Методика

### А). Приготовление пробы

Примечание:

Каждая центрифужная колонка для ультрафильтрации Adenopack Maxi может применяться для очистки вируса из клеточной культуры объемом до 20 мл. Данный комплект содержит расходные материалы в достаточном количестве для шести таких небольших приготовлений. Для проб меньшего объема необходимо соответственно рассчитать объем реактивов.

1. Амплифицировать аденовирус в клетках НЕК 293, прошедших малое количество пассажей, в общем объеме культуральной среды до 20 мл (например, один планшет размером 15 см x 20 мл культуры), которая была заражена исходным аденовирусом при множественности инфицирования 10–20. Культуры должны быть выращены в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), pH 7,0 – 7,4 при температуре 37°C с 5% CO<sub>2</sub>.

2. Когда большинство клеток проявит цитопатогенное действие (2–5 дней), клетки и среду объединить. Возможно, понадобится отобрать приклепленные клетки с помощью пипетки или скребка для сбора клеток.

3. Центрифугировать при 3500 xg в течение 15 минут для осаждения клеток.

4. Декантировать супернатант в стерильную емкость и оставить рядом.

5. Повторно суспендировать осажденные клетки в 2 мл супернатанта.

6. Полностью заморозить и разморозить клеточную суспензию 3 раза подряд с целью деструкции клеток, поочередно используя водяную баню при 25°C и баню на этаноле | баню на сухом льду или морозильную камеру с температурой –80°C.

7. Центрифугировать при 3500 xg в течение 15 минут для осаждения остатков клеточного дебриса.

8. Слить вирусный супернатант, повторно соединить его с исходным супернатантом и осторожно перемешать.

9. Добавить нуклеазу Benzopase® до получения конечной концентрации 12,5 ед./мл.

10. Перемешать пробу и инкубировать в течение 30 минут при температуре 37°C для гидролиза клеточных нуклеиновых кислот.

11. Внести гидролизованный супернатант в спин-колонку VivaClear Maxi и центрифугировать в течение 5 минут при 500 xg или до полного прохождения объема жидкости через мембрану.

12. Собрать фильтрат. Определить объем и медленно добавить 1/9 объема концентрированного 10x загрузочного буфера при перемешивании, чтобы избежать осмотического шока вирусных частиц. Например: 2 мл буфера на 18 мл фильтрата. Точные измерения объема супернатанта и загрузочного буфера 10x являются важными для создания правильных условий связывания вирусных частиц.

### В). Приготовление Adenopack 20 RT

13. Развести 10x промывочный буфер до рабочей концентрации. Например, на одно приготовление: 5 мл буфера на 45 мл деионизированной воды и тщательно перемешать.

14. Уравновесить спин-колонку Adenopack 20 Maxi с помощью 5 мл разведенного промывочного буфера и центрифугировать в течение 5 минут при 500 xg. Для обеспечения равномерного распределения пробы рекомендуется использовать бакетный ротор.

### С). Очистка аденовируса

15. Поместить пробу (не более 20 мл) в колонку Adenopack Maxi и центрифугировать в течение 5 минут при 500 xg или до полного прохождения объема жидкости через мембрану. Соберите фильтрат и повторите этап с оставшейся пробой при необходимости.

16. Промыть спин-колонку 18 мл промывочного буфера путем центрифугирования в течение 5 минут при 500 xg. Удалить осадок и повторить этап промывки еще раз.

17. Используя чистую пробирку для сбора фильтрата, элюировать аденовирус через мембрану Adenopack с использованием 1 мл буфера для элюации. Пипеткой нанести буфер на мембрану, центрифугировать в течение 30 сек при 500 xg и инкубировать в течение 10 минут. Затем центрифугировать устройство в течение 5 минут при 500 xg и собрать элюат, содержащий аденовирус. Применение второго этапа элюации может увеличить выход элюата, но разбавит при этом титр вируса.

## Протокол очистки – Методика

### D). Дополнительно:

#### **Замена буфера и дальнейшее концентрирование**

##### Примечание:

Важным условием является замена буфера вирусных частиц на физраствор перед использованием в культурах клеток и в количественных исследованиях с использованием клеток, или на обычный буфер для длительного хранения при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Буферы для хранения, содержащие глицерин, требуют значительно больше времени для концентрирования, чем первоначальный раствор вирусного элюата; увеличьте время центрифугирования и при необходимости охладите при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$ .

18. Перенести элюат в центрифужный концентратор Vivaspin 20 и добавить к концентрату буфер для хранения | физраствор, чтобы довести объем до 10 мл. Уравновесить ротор при помощи второго концентратора, заполненного тем же объемом фосфатно-солевого буфера (PBS) или воды. В угловом роторе с фиксированным углом пробирки должны быть размещены так, чтобы шкала градуировки была повернута в противоположную сторону от центра ротора.

19. Центрифугировать в течение 30 минут при 800 xg в бакетном роторе или в угловом роторе с фиксированным углом  $25^{\circ}$ . Роторы должны принимать пробирки объемом 50 мл с коническим дном.

20. Проверить объем вирусного концентрата, оставшегося в верхней части концентратора, при необходимости снова центрифугировать и провести повторную замену буфера.

#### **⚠ Осторожно!**

**Не следует снижать объем менее 200 мкл с целью предотвращения агрегации и потери инфицирующих свойств.**

21. Извлечь концентрированный вирус с помощью дозатора. Суспендировать концентрат вируса, осторожно набирая и сливая его накопчиком дозатора несколько раз перед извлечением.

22. Определить титр вируса. Разделить на соответствующие аликвоты и хранить при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Буферы для хранения аденовируса указаны на с. 3 и в следующей публикации: Hoganson, D. K. et al., Development of a Stable Adenoviral Vector Formulation (2003), Bioprocessing Journal, pp. 43-48.

## Общая информация

### Характерные результаты

Для вектора с нормальным выходом культуральные планшеты размером 1 × 15 см, очищенные с использованием данного метода, должны давать выход до  $1 \times 10^{12}$  вирусных частиц (см. таблицу 1).

– После очистки по данной методике вирус сохраняет жизнеспособность до 2 лет при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Рекомендации по применению

– Рекомендуется замена буфера вируса на стандартный физиологический буфер перед использованием в культурах клеток и в количественных исследованиях с использованием клеток.

– Разделить на аликвоты и хранить вирус при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . После размораживания хранить при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  и не замораживать повторно.

**Таблица 1:** Результаты очистки при работе с определенными Ad5 и использованием GFP (в зависимости от конкретных условий значения могут отличаться)

Метод очистки	Длительность процесса	Элюат	Коэффициент восстановления**	Вирусные частицы
Культура 20 мл	1 час	1 мл	65–70%	$1 \times 10^{11-12}$
CsCl 500 мл	12–48 часов	1–2* мл	60–70%	$1 \times 10^{11-12}$

\* после диализа

\*\* перед заменой буфера

## Информация для размещения заказа

Информация для размещения заказа		Размер упаковки
VS-AVPQ020	Vivapure Adenopack™ 20, для культуры объемом 20 мл	6
VS-AVPQ022	Vivapure Adenopack™ 20 RT, для культуры объемом 20 мл*	6
VS-AVPQ101	Vivapure Adenopack™ 100, для культуры объемом 200 мл	1
VS-AVPQ102	Vivapure Adenopack™ 100 RT, для культуры объемом 200 мл*	1
VS-AVPQ501	Vivapure Adenopack™ 500, для культуры объемом 500 мл	1
VS-AVPQ502	Vivapure Adenopack™ 500 RT, для культуры объемом 500 мл*	1

### Дополнительно в наборе

VS2041	Концентрат Vivaspin 20, с порогом отсечения 100 кДа MWCO, ПЭС	6
--------	---	---

### Сопутствующая продукция

5441307H0-00	Sartopore 2 150, размер пор 0,45–0,2 мкм, ПЭС	5
17829-K	Minisart Plus, размер пор 0,45 + 1,2 мкм, мембрана АЦ + СВ (ацетат целлюлозы + стекловолокно)	50

\* Набор не содержит Bensonase®.

Sartorius Stedim Lab Ltd.  
Sperry Way, Stonehouse Park  
GL10 3UT Stonehouse, Gloucestershire, UK

Тел.: +44 1453 821972  
www.sartorius.com

Содержащаяся в данном руководстве информация и рисунки соответствуют состоянию, указанному ниже. Компания «Sartorius» оставляет за собой право изменять технические характеристики, комплектацию и дизайн устройств, приведенные в данном руководстве. Из соображений удобочитаемости в данном руководстве могут использоваться языковые формы только мужского или только женского рода. Во всех случаях та или иная языковая форма заменяет языковую форму другого рода.

Примечание об авторских правах:

Настоящее руководство, включая все его части, защищено авторским правом.

Всякое использование настоящего руководства, превышающее пределы авторского права, без нашего согласия не допускается.

Согласие требуется, в частности, для копирования, перевода и обработки настоящего руководства в СМИ всех видов.

Состояние:  
08 | 2021

© 2021 Sartorius Stedim Lab Ltd.  
Sperry Way, Stonehouse Park  
GL10 3UT Stonehouse, Gloucestershire, UK

AM | Publication No.: SLU6118-r210802