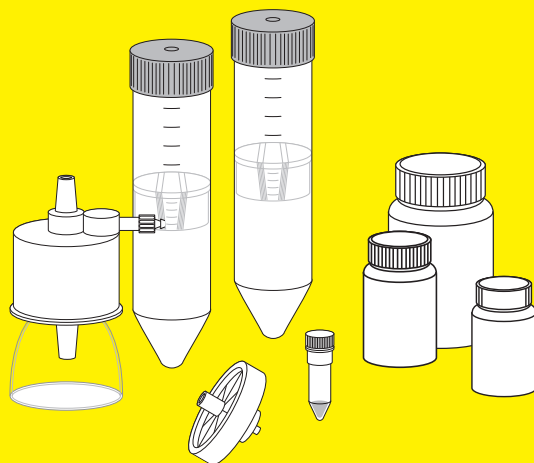


Инструкция по применению

Vivapure[®] Adenopack[™] 500

Набор для концентрирования и очистки аденовируса (Ad5) клеточных культур объемом до 500 мл (например, планшет 5 - 25 × 15 см) | Только для использования in vitro



85037-549-89



SARTORIUS

Vivapure Adenopack 500 – Введение

Условия хранения | срок годности

Внимание: при получении набора нуклеазы Benzonase® сразу же следует вынуть и хранить при температуре –20°C. Оставшееся содержимое набора Adenopack следует хранить при комнатной температуре. Комплект необходимо использовать в течение 12 месяцев.

Введение

В данном протоколе описан процесс очистки аденовируса (штамм Ad5) с помощью шприцевых фильтров для ультрафильтрации Adenopack, 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 1–2 часов.

Для сравнения, традиционное градиентное центрифугирование CsCl является методом, который требует затрат времени, как правило, 1–2 дня. Кроме того, токсичность сред накладывает ограничения на последующее применение. Готовые к использованию фильтрующие устройства, спин-колонки 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»,
Хайделберг.



Vivapure Adenopack 500

Номер по каталогу	VS-AVPQ501
Устройство Adenopack 100	1
Капсула Sartopore 2 150 для очистки	1
Шприц объемом 10 мл	1
Комплект трубок	2
Загрузочный буфер (10 ×)	60 мл
Промывочный буфер (10 ×)	30 мл
Буфер для элюирования	20 мл
Benzonase®* (12,5 Ед/мкл)	500 мкл
Концентратор Vivaspin 20, порог отсечения 100 кДа	2
Техническое описание	по 1 на набор и на концентраторы Vivaspin

Материалы деталей

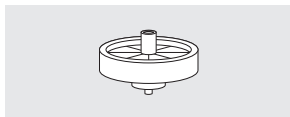
Корпус мембранных адсорберов Adenopack 100	Полисульфон
Корпус фильтров для очистки Sartopore 2 150	Полипропилен
Мембрана Adenopack	Стабилизированная регенерированная целлюлоза
Емкости для буфера	ПЭНП
Буферы для очистки	Запатентованный состав

Технические характеристики набора

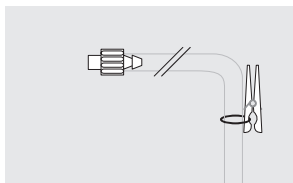
Объем пробы	до 500 мл супернатанта с аденовирусом
Количество вирусных частиц (ВЧ) на мл	Как правило, до 1–3 × 10 ¹³
ВЧ/ИЕ	20–50
Продолжительность обработки	Как правило, 2 часа

* Нуклеаза Benzonase® производится компанией Merck KGaA, Дармштадт, Германия. На нуклеазу Benzonase® распространяется действие патента US 5,173,418 q и патента EP 0,299,866. Компания Nuscomed Pharam A/S (Дания) открыто заявляет о патентных правах на нуклеазу Benzonase®, лицензия на которую принадлежит исключительно компании Merck KGaA, Дармштадт, Германия. Benzonase® – это зарегистрированная торговая марка компании Merck KGaA, Дармштадт, Германия.

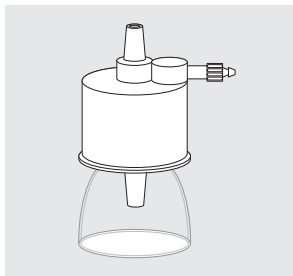
Состав комплекта



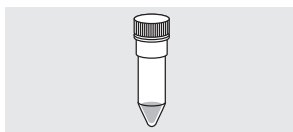
Устройство Adenopack 500 с защитными колпачками



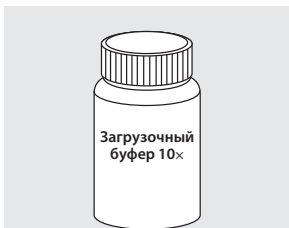
2 комплекта трубок для насоса (с коннекторами Луер Лок, подходят как устройству Adenopack, так и к капсулам Sartopore)



1 капсула для очистки Sartopore 2 150



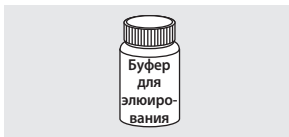
1 пробирка с нуклеазой Benzonase® (12,5 Ед/мл)
Хранить при -20°C



60 мл, загрузочный буфер (10×)



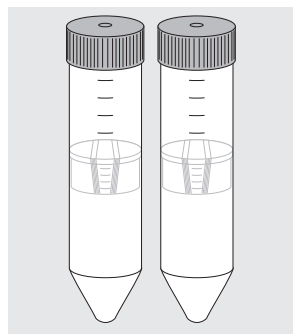
30 мл, промывочный буфер (10×)



20 мл, буфер для элюирования



Шприц на 10 мл



2 концентратора Vivaspin 20 с мембраной 100 кДа из ПЭС

Дополнительные требуемые материалы, не входящие в объем поставки

Центрифуга с ротором для пробирок типа Фалькон объемом 50 мл

Перистальтический насос, принимающий трубки размером 16 Masterflex L/S

Штатив для реторт с зажимом

Мерный цилиндр на 100 мл

Таймер или секундомер

300 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) с pH 7,4

Этаноловая баня / баня на сухом льду или морозильная камера с температурой -80°C

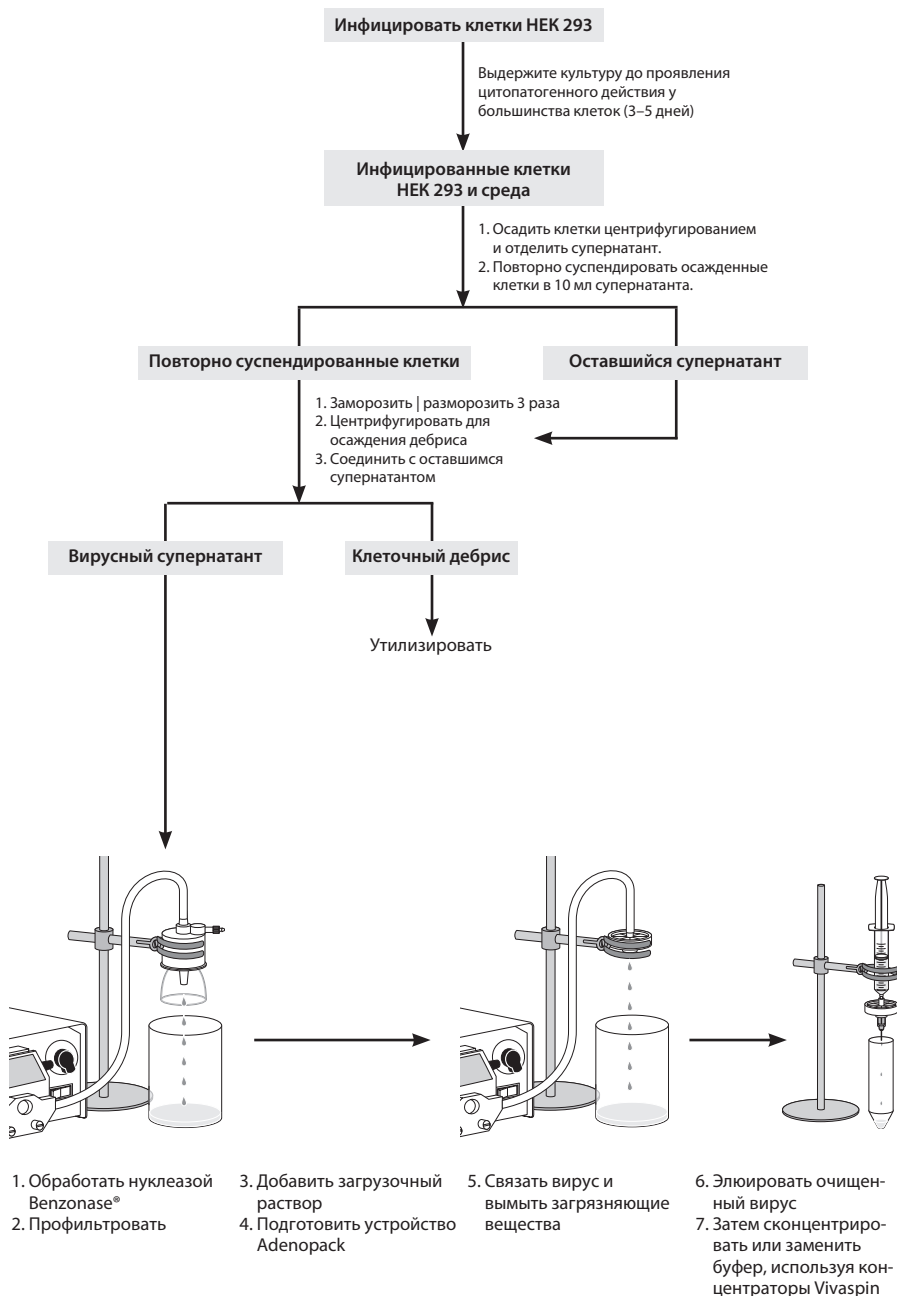
Водяная баня, 25°C

Стерильный пластиковый контейнер для работы с пробой

Стерильная пробирка на 15 мл для сбора очищенного вируса

Дополнительно – Буфер для хранения: 20 мМ Трис/НСI, 25 мМ NaCl, 2,5% раствор глицерина (масса к объему), pH 8,0 при температуре 22°C

Протокол очистки – Общая схема



Протокол очистки – Общая схема

Общий протокол работы

В протоколе использованы следующие этапы концентрирования и очистки штамма аденовируса тип 5.

Примечание: Данный набор содержит расходные материалы в достаточном количестве для концентрирования и очистки вируса из 500 мл культуральной среды. Подробные протоколы написаны для одного приготовления объёмом 500 мл, поэтому объёмы реагентов необходимо пересчитывать соответственно меньшим объёмам проб.

Вирусная культура

Инфицировать клетки НЕК 293 аденовирусом из набора и культивировать до проявления у большинства клеток цитопатогенного действия. Клетки отделяют и забирают.

Приготовление пробы

Отделить клетки центрифугированием. Повторно суспендировать осадок в 25 мл среды. Сохранить оставшуюся среду, поскольку она имеет значительный уровень содержания вирусов.

Лизируйте клетки тройным циклом заморозки | разморозки. Центрифугируйте для удаления нежелательного клеточного дебриса, а затем повторно соедините с оставшейся средой.

Проведите гидролиз нежелательных нуклеиновых кислот добавлением к супернатанту нуклеазы Benzonase® после инкубации.

Профильтруйте супернатант, очищенный нуклеазой Benzonase®, и добавьте загрузочный буфер 10 x: 9 объёмов супернатанта к 1 объёму загрузочного буфера 10 x.

Подготовка устройства Adenopack

Уравновесить мембранные адсорберы и удалить пузырьки воздуха из устройств Adenopack перед введением вируса. Если не извлечь все пузырьки воздуха, они снизят связывание вирусных частиц в мембранном адсорбере.

Введение пробы

Постепенно, капля за каплей, пропустите подготовленный супернатант через устройство Adenopack. Правильно подобранная скорость потока во время введения пробы является важным условием для максимального связывания вирусных частиц. Скорость фильтрации не должна превышать 10 мл/мин.

Промывка

Промойте устройство от остатков питательной среды, загрязняющих белки и нуклеиновые кислоты. Промывку можно проводить при более высоких скоростях потока.

Элюирование

Элюируйте очищенные вирусные частицы, пропустив с помощью шприца через устройство Adenopack буфер для элюирования. Обработка устройства Adenopack буфером для элюирования и подбор правильной скорости фильтрации является важным условием максимального извлечения вирусных частиц. Проводить элюирование при скорости не более 1 мл/мин.

Заключительное концентрирование | замена буфера

Концентрация вируса может быть увеличена при использовании центрифужных концентраторов Vivaspin 20, входящих в комплект данного набора.

При необходимости концентраторы Vivaspin 20 могут быть также использованы для замены буфера для элюирования на соответствующий физиологический буфер или буфер для хранения (см. Полезные советы).

Протокол очистки – Методика

А). Подготовка пробы вируса

Примечание: Состав загрузочного буфера 10 ×, входящего в набор Vivapure Adenovack 500, разработан специально для использования в особых условиях в культуральной среде. Необходимо тщательно соблюдать данные условия при работе.

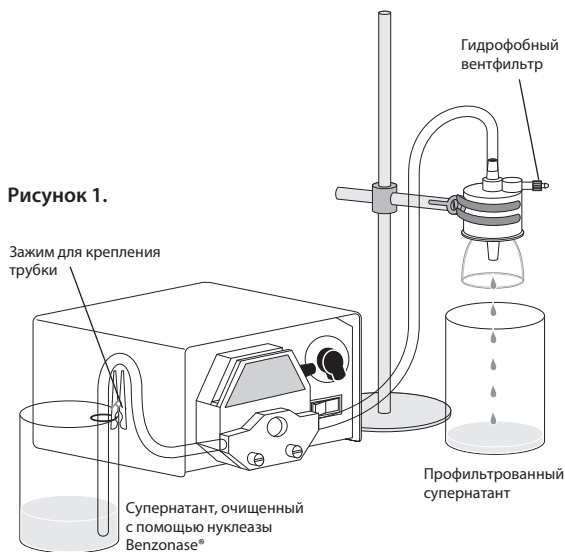
Засейте до 25 планшет размером 15 см клетками HEK 293, находящихся в среде DMEM, содержащей 10% раствор фетальной бычьей сыворотки (FBS), pH 7,0–7,4. Как только монослой клеток достигнет конfluenceности 60–80%, инфицируйте клетки аденовирусом тип Ad5 с множественностью инфицирования не менее 20. Культивировать инфицированные клетки при температуре 37°C в присутствии 5% CO₂ в течение 3–5 дней до проявления большинства клеточек цитопатогенного эффекта. Клетки отделяют и забирают.

Подготовка пробы

1. Объединить инфицированные клетки и среду. Осадить клетки центрифугированием при ускорении 3500 ×g в течение 15 минут.
2. Декантировать супернатант в стерильную ёмкость и поместить на хранение при 4°C.
3. Повторно суспендировать осажённые клетки в 25 мл оставшегося супернатанта.
4. 3 раза полностью заморозить и разморозить клеточную суспензию 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.
5. Осадить клетки центрифугированием при ускорении 3500 ×g в течение 15 мин. Декантировать супернатант и добавить его к супернатанту, полученному после шага 2.

6. Добавить нуклеазу Benzonase® в расчёте 1 мкл на 1 мл супернатанта до получения конечной концентрации 12,5 ед/мл.
7. Разбавить промывочный раствор 10 × до рабочей концентрации, добавив 270 мл деионизированной воды, и тщательно перемешать. Оставить рядом до момента использования.
8. Собрать компоненты, как показано на рисунке 1. Ослабить гидрофобный вент-фильтр на корпусе капсулы Sartopore 2. Профильтровать с помощью насоса супернатант, очищенный нуклеазой Benzonase®, со скоростью 10–20 мл/мин. Попавшие в корпус капсулы пузырьки воздуха могут быть удалены через гидрофобный вент-фильтр. Закрыть вент-фильтр и профильтровать оставшуюся в капсуле жидкость.
9. Медленно при помешивании добавить загрузочный буфер 10 × к очищенному нуклеазой Benzonase® супернатанту. 9 объёмов супернатанта к 1 объёму загрузочного буфера. Например, к 500 мл супернатанта добавить 56 мл загрузочного буфера 10 ×.

Рисунок 1.



Протокол очистки – Методика

В). Подготовка устройства Adenopack

Примечание: Воздух, попавший в устройство Adenopack, снизит титр вируса. Весь воздух должен быть удалён из устройств Adenopack, чтобы вирусные частицы могли связываться с мембраной.

10. С помощью нового комплекта трубок собрать компоненты системы, как показано на рисунке 1.
11. Налить 300 мл фосфатно-солевого раствора в стаканчик.
12. Чтобы гарантировать полное смачивание устройства Adenopack 500, профильтровать через него с помощью насоса раствор фосфатно-солевого буфера.
13. Отрегулируйте скорость фильтрации насосом до 10 мл/мин.
14. Профильтруйте с помощью насоса 30–50 мл фосфатно-солевого раствора, а затем остановите фильтрацию, отключив насос; при этом не нужно уменьшать скорость фильтрации. Внимание: Слишком высокая скорость фильтрации сократит улавливание вирусных частиц и может привести к снижению вирусного титра.

Введение пробы | промывка

15. Выньте подающую трубку из стаканчика с фосфатно-солевым раствором и поместите её в емкость с подготовленным вирусным супернатантом. Пропустите с помощью насоса через адсорбер Adenopack 500 при установленной скорости 10 мл/мин. С собранным фильтратом следует обращаться как с биологическими отходами.

16. Когда емкость с супернатантом окажется практически пустой, добавьте в емкость с пробой 300 мл 1× промывочного буфера.

17. Пропустите с помощью насоса промывочный буфер через фильтр при скорости 10–20 мл/мин.

Рисунок 2.

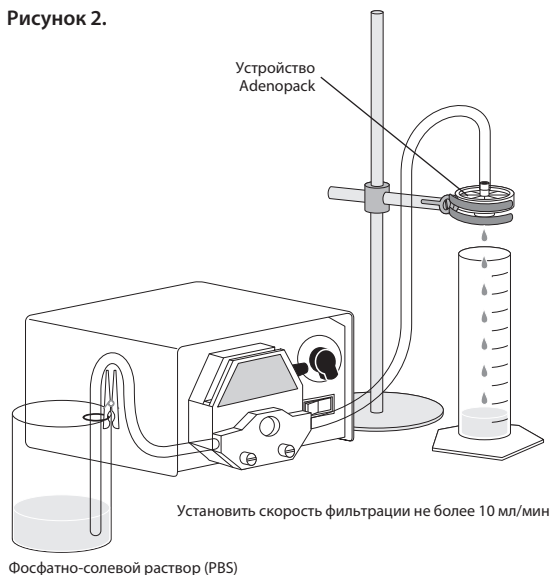
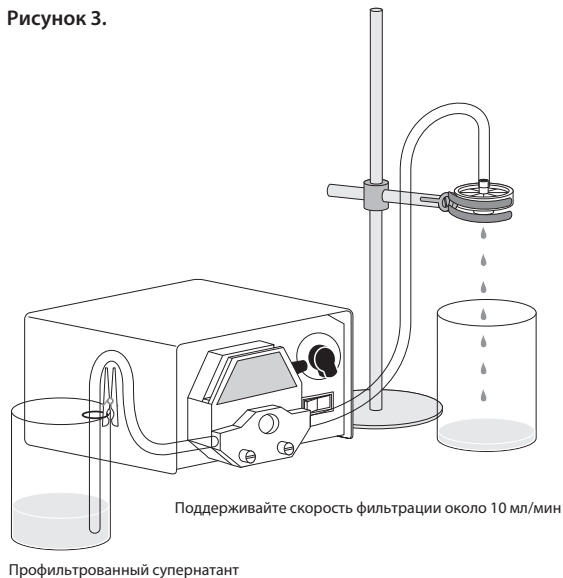


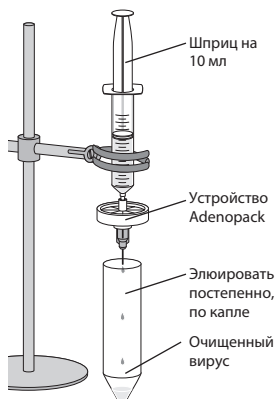
Рисунок 3.



Протокол очистки – Методика

Элюирование

- Заполнить новый 10-мл шприц буфером для элюирования и поместить рядом.
- Отсоединить устройство Adenopack 500 от трубки и подсоединить заполненный шприц к выходному отверстию адсорбера.
- Удерживайте шприц вертикально. Очень медленно (капля за каплей) пропустить 1 мл буфера для элюирования через адсорбер Adenopack и собрать в стерильную пробирку на 15 мл (см. рисунок 4). Внимание: нажимайте на плунжер шприца мягко. Слишком быстрое введение буфера для элюирования снижает улавливание вирусных частиц. Оптимальная скорость потока при элюировании составляет 1 мл/мин; данная скорость обеспечивается, если можно посчитать каждую каплю отдельно на выходе из устройства.
- Отложить шприц (вместе с оставшимися 9 мл буфера для элюирования), соединённый с адсорбером Adenopack и инкубировать в течение 5–10 мин при комнатной температуре.
- Очень медленно пропустить оставшийся буфер для элюирования через устройство Adenopack 500 как описано выше. После того, как вирусные частицы будут полностью элюированы, мембрана станет белой. Если цвет мембраны остаётся розовым, повторите шаги 20–22.
- На последнем этапе с помощью шприца медленно пропустите воздух через адсорбер, чтобы максимально извлечь элюат.



Заключительное концентрирование | Замена буфера

Примечание: Дополнительно сконцентрируйте элюат с вирусом, чтобы увеличить степень инфицирования. Подробные инструкции по работе смотрите в техническом описании концентраторов Vivaspin 20. Важным условием является замена буфера вирусных частиц на физраствор перед использованием в культурах клеток и в количественных исследованиях с применением клеток, или на обычный буфер для длительного хранения при температуре -80°C . Буферы для хранения, содержащие глицерин, требуют значительно больше времени для концентрирования, чем первоначальный раствор вирусного элюата; увеличьте время центрифугирования. Рекомендуется обязательное охлаждение при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

- Переместите элюат в центрифужные концентраторы Vivaspin 20 и уравновесьте ротор с использованием второго концентратора, заполнен-

ного водой или фосфатно-солевым раствором эквивалентного объема. В угловом роторе с фиксированным углом пробирки должны быть размещены так, чтобы шкала градуировки была повернута в противоположную сторону от центра ротора.

- Центрифугировать в течение 15 минут при ускорении до $3000 \times g$ в бакетном роторе или при $6000 \times g$ в угловом роторе с фиксированным углом 25° . Роторы должны принимать пробирки объемом 50 мл с коническим дном.
- Проверьте объем вирусного концентрата, оставшегося в верхней части концентратора, при необходимости повторите центрифугирование. Внимание: Не следует снижать объем менее 1 мл с целью предотвращения агрегации и потери инфицирующих свойств.
- Слить фильтрат, когда объем пробы достигнет 1 мл, а затем добавить к концентрату 4 мл буфера для хранения | физраствор (например, 20 мМ Трис/HCl, 25 мМ NaCl, 2,5% раствор глицерина (масса к объёму), pH 8,0), доведя объем до 5 мл.
- Извлеките концентрированный вирус с помощью дозатора. Повторно суспендировать вирусный концентрат, осторожно набирая и сливая его наконечником дозатора несколько раз перед извлечением.
- Определить титр вируса. Разделить на соответствующие аликвоты и хранить при температуре -80°C .

Общая информация

Характерные результаты

Для вектора с нормальным выходом культуральные планшеты размером 25 × 15 см, очищенные с использованием данного метода, должны давать выход до $1-3 \times 10^{13}$ вирусных частиц (см. таблицу 1).

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°C . После размораживания хранить при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ и не замораживать повторно.

– После очистки по данной методике вирус сохраняет жизнеспособность до 2 лет при температуре -80°C .

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 500 мл	1–2 часа	1 мл	80%	$1-3 \times 10^{13}$
CsCl 500 мл	12–48 часов	1–2 мл	60–70%	1×10^{13}

* после замены буфера

** перед заменой буфера

Устранение проблем

Проблема	Причина	Что делать
Воздух в трубке на входе	Низкий уровень жидкости в емкости с пробой	Не удалять воздух через устройство Adenopack. Снимите на некоторое время устройство Adenopack со шприца и удалите воздух. Повторно заполните шприц и трубку жидкостью и затем повторно подсоедините устройство Adenopack
Воздух в трубке на входе	Конец трубки находится на некотором расстоянии от жидкости	Убедитесь, что держатель трубки надежно закреплен со стороны колбы
	Воздух в устройстве Adenopack	Избегать попадание воздуха в устройство Adenopack
	Слишком высокая скорость потока при введении пробы	Ввести пробу при скорости не более 10 мл/мин
	Слишком высокая скорость потока при элюировании	Тщательно следовать описанному протоколу работы с Adenopack
	Низкий титр вирусных частиц в культуральной жидкости	Оптимизировать культивирование вирусов
	Остался буфер в устройстве Adenopack	После элюирования продуть воздухом шприцевую насадку Minisart plus, чтобы извлечь весь буфер
Низкая степень извлечения вируса	Слишком старая культура может быть причиной снижения титра вируса	Отбирать пробы при проявлении цитопатогенного действия у большинства клеток.
Капсула Sartopore 2 150 забивается во время фильтрации	В корпус капсулы Sartopore попал воздух	Ослабить плотно закрытый гидрофобный вент-фильтр, чтобы пузырьки воздуха могли выйти
Капсула Sartopore 2 150 забивается во время фильтрации	Слишком большое количество клеточного дебриса, задерживающегося на мембране	Центрифугировать при ускорении 3500 × g в течение 15 мин для осаждения клеточного дебриса перед заключительной очисткой с помощью капсулы Sartopore 2 150
Устройство Adenopack забивается во время фильтрации	Неполная очистка пробы	Центрифугировать при ускорении 3500 × g в течение 15 мин для осаждения клеточного дебриса перед заключительной очисткой с помощью капсулы Sartopore 2 150

Информация для размещения заказа

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

Продукты Sartorius Stedim Biotech Biolab в данном наборе

VS2041	Концентратор Vivaspin 20, с порогом отсечения 100 кДа MWCO, ПЭС	12
5441307H0-00	Капсула Sartopore 2 150, ПЭС с размером пор 0,2–0,45 мкм	5

Дополнительное оборудование для набора Adenopack 500

VFP001	Перистальтический насос Masterflex с экономичным двигателем с регулируемой скоростью (240 В)	
VFP002	Перистальтический насос Masterflex с экономичным двигателем с регулируемой скоростью (115 В)	
VFA012	Easy load головка насоса Masterflex – размер 16	

Сопутствующая продукция

VS-AVPA001	Набор трубок к насосу для устройства Adenopack 100	
17829-K	Шприцевые насадки Minisart plus, 0,45 мкм, мембраны АЦ+СВ	50

* Набор не содержит нуклеазу Bionase®.

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.: SLU2015-r210802