



AVB Agarose Beads 6FF

产品货号: QS01035

产品规格: 10 mL, 50 mL, 100 mL

产品简介

AVB Agarose Beads 6FF 是一种用于纯化腺相关病毒(adeno associated virus, AAV)的亲层析树脂。腺相关病毒(AAV)作为基因治疗的潜在载体越来越受到关注。为了使 AAV 应用于临床, 需要高效、高质量的生产工艺, 包括下游纯化。纯化过程需要稳健、高产率高、纯度高、配体泄漏低。在目前的纯化方案中, 通常使用密度梯度离心, 然后是几个色谱步骤, 这一过程的产量低, 可扩展性差。

AVB Agarose Beads 4FF 的优点包括:

- 通过亲和层析对几个亚类的腺相关病毒(AAV)进行高效的工业规模纯化
- 减少了临床应用 AAV 生产中的监管问题(由于非哺乳动物衍生产品)
- 高选择性和优秀的可放大性

树脂的特点

AVB Agarose Beads 6FF 是基于高度交联的 6% 琼脂糖基质, 可以快速处理大样本量。配体通过长亲水间隔臂与基基质连接, 使其易于与病毒结合。

AAV 亲和配体是利用 BAC BV 的技术开发的。配体制造, 包括发酵和随后的纯化/调配, 在不含哺乳动物成分的情况下实施。配体本身是利用骆驼科来源的单域抗体片段开发的, 这些抗体片段来自美洲驼对目标 AAV 的免疫应答。所选蛋白的基因被克隆到酵母细胞表达系统中。

表 1 总结了 AVB Agarose Beads 6FF 的主要特点。

基质	高度交联的 6% 琼脂糖
平均粒径	34 μm
配基	毕赤酵母中生产的重组蛋白 (结合子类 1、2、3 和 5 的 AAV)
总结合能力	通常 $>10^{12}$ 个基因组拷贝/mL 色谱树脂
流速	高达 150cm/小时 (压力 <0.3 MPa, 30cm 床高, 在 20°C 下使用与水相同粘度的缓冲液)
操作 PH	3-10
清洗 PH	2-12
工作温度	4°C-30°C
长期保存	2°C-8°C, 储存于 20% 乙醇溶液中。

应用

当使用 AVB Agarose Beads 6FF 时, 可以直接从澄清的 AAV 载体细胞裂解液中纯化 AAV。常规缓冲液(如 PBS、Tris、柠檬酸盐)可用于上样、洗涤和洗脱。病毒在中性 pH 附近与柱结合, 通常通过降低 pH(例如在 pH 2 至 5 的范围内)来洗脱(参见筛选不同的洗脱条件)。由于 AAV 对高酸性条件敏感(1), 因此在洗脱过程中尽量减少暴露于低 pH 是很重要的。因此, 收集的洗脱馏分应立即中和。



不同洗脱条件的筛选

虽然 AAV 在低 pH 下可以有效洗脱，但病毒对高酸性条件非常敏感(1)。因此，我们设计了一项研究，以确定是否可以使用替代缓冲液进行洗脱。制备 7 种洗脱缓冲液(表 2)。利用微孔板筛选各种洗脱条件。采用 AVB Agarose Beads 6FF 进一步评价了三种洗脱条件。低 pH 洗脱提供最高的病毒产量使用柱层析法;随后用精氨酸进行高 pH 洗脱，产量增加很小。虽然与低 pH 缓冲液相比，高 pH 缓冲液和精氨酸柱层析后的病毒产量较低，但病毒纯度相当。

洗脱缓冲液配方

用于洗脱缓冲液配方的指导(表 2)。精氨酸被包括在内，因为它已被证明可以增强从蛋白 A 和抗原偶联琼脂糖柱中洗脱抗体，并增加染料亲和层析中酶的回收率(3)。精氨酸似乎通过减少蛋白质与柱的相互作用来提高蛋白质的回收率和分离。此外，它还能减少蛋白质聚集。据我们所知，精氨酸以前还没有被用来洗脱病毒。选择 MgCl₂ (2.5 M)作为包涵体，因为它已被用于从免疫亲和柱中洗脱 AAV 病毒。

微孔板实验概述

每孔人工填充 20 μL AVB Agarose Beads 6FF 或基础基质。290 × g 离心 2 分钟，每孔 200 μL 装液 AAV 样品(rAAV1, 7 × 10¹⁰ 个病毒基因组/mL)。所有孔的平衡、样品上样和洗涤均相同。评估了两种洗脱策略。在一种策略中，表 2 中列出的七种缓冲液中的一种用于所有三种洗脱。在另一种策略中，EB1 总是用于第一次洗脱，然后使用表 2 中其他缓冲液中的一种进行两次洗脱。洗脱后的样品在 280 nm 处测定吸光度。

微孔板实验程序

操作步骤如下:

1. 每孔用 200 μL 平衡缓冲液(20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.0)平衡(3 次)。
2. 每孔装 200 μL rAAV1 样品。微孔板在摇床上以 1100 转/分孵育 15 分钟。
3. 每孔用 200 μL 洗涤缓冲液(20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 8.0)洗涤 3 次。
4. 洗脱(3 次)，每孔 200 μL 洗脱缓冲液。使用了两种不同的洗脱策略(见上文)。

表 2 微孔板实验中洗脱缓冲液的评价

EB1	0.1 M 醋酸钠, 0.5 M NaCl, pH 2.5
EB2	0.1 M 醋酸钠, 0.5 M NaCl, 0.5 M 精氨酸, pH 10.0
EB3	20 mM Tris-HCl, 2.5 M MgCl ₂ , pH 8.0
EB4	0.1 mM 醋酸钠, 2.5 M MgCl ₂ , pH 值 2.5
EB5	0.1 M 甘氨酸, 0.5 M NaCl, pH 3.0
EB6	20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.5 M 精氨酸, pH 10.8
EB7	1.5 M NaCl, 0.02% (w/v) Tween™80, 50% (v/v) 乙二醇, 20 mM L-组氨酸, 20 mM CaCl ₂ , pH 6.5

微孔板实验结果



在所有情况下，从 AVB Agarose Beads 6FF 中洗脱的 AAV 明显多于从基质中洗脱的 AAV。基质不表现出结合和洗脱特性。相反，它延缓了 AAV。在微孔板上筛选，根据 A280 的读数，三次 EB8 洗脱的 AAV1 产率最高。在微孔板中，不可能用低 pH 缓冲液(EB1)洗脱所有病毒。用精氨酸(EB2)进行高 pH 洗脱作为第二步，有助于洗脱低 pH 洗脱后留在凝胶上的物质。

在线清洁(CIP)和在线消毒(SIP)

应为每种应用设计清洁或消毒方案，因为该方案的效率与原料和其他相关操作条件密切相关。推荐的方案包括在低 pH 下对树脂进行初始剥离，然后将树脂置于低浓度的 NaOH 中进行清洗。最后用 PAB (120 mM 磷酸，167 mM 乙酸，2.2% v/v 苯醇)对树脂进行最终消毒。PAB 溶液对光敏感，应新鲜配制，以免损坏树脂。PAB 溶液应保存在黑暗的瓶子中，保存时间不超过一周。PAB 溶液的 pH < 2; 在如此低的 pH 值下长时间暴露会限制树脂的稳定性。

- 1、0.1 M citric acid, pH 2.1; 10 min; 13 CV 10 CV PBS, pH 7.4
- 2、10 mM NaOH, pH 12; 15 min; 19 CV 10 CV PBS, pH 7.4
- 3、PAB; 15 min; 19 CV

在下一个纯化循环之前，用平衡缓冲液平衡树脂。

存储

4°C 至 8°C，储存于 20% 乙醇中。