

## 细胞治疗及基因治疗中病毒载体的纯化

### - 使用 himac (原日立) 超速及高速离心机

细胞治疗/基因治疗作为一种“活的”生物药物，给肿瘤治疗带来了新的曙光，并在癌症、血液病、心血管病、糖尿病、老年痴呆等方面显示出越来越高的应用价值。其中常用的一个关键步骤是使用病毒载体（主要是腺病毒，腺相关病毒，慢病毒）进行基因改造。

慢病毒载体是来源于人类免疫缺陷病毒-1 (HIV-1)的一种病毒载体，对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。其有别于腺病毒，可以将自身携带的外源基因片段插入宿主的基因进行改造，从而在细胞治疗领域获得了广泛应用。慢病毒的化学特性不够独特，用层析法不能完全与外泌体或有缺陷的病毒分离，以下将介绍离心纯化慢病毒的方法和步骤：

1. 低速差分离心：除去细胞碎片等杂质，如  $500-5000 \times g$ ，10-30 min。

- 主机可使用 himac 高速冷冻离心机 CR22N 或 CR30NX：



**himac CR22N**

最高转速及RCF: 22000rpm/55200xg  
最大容量：6L



**himac CR30NX**

最高转速及RCF: 30000rpm/118000xg  
最大容量：6L

- 转头：针对不同的样品量，可以选择使用不同容量的转头，或大容量连续流转头(处理几百升样品)：

#### 中等容量



**R16A3**  
6x250ml  
16000rpm  
40100 xg



**R10A3**  
6x500ml  
10000rpm  
18800 xg



**R9A**  
4x1000ml  
9000rpm  
15300 xg

#### 大容量



**R9A2 转头及离心瓶**  
6L (4x1.5L)  
8500rpm  
15100 xg  
每个离心瓶可以做到从0 到1.5L的离心  
该离心瓶容量大/不易漏液/非常耐用  
也可直接把转头拿到安全柜内后再处理样品

#### 生产型容量



**大容量连续流转头**  
R18C: 1L (18000rpm)  
R13C: 2.2L (13000rpm)  
R10C: 3.2L (10000rpm)  
(处理几百升样品)  
(R13C及R10C为himac独有)



由于CR22N/CR30NX主机具有转头自锁功能，更加方便了在使用较大容量转头时转头装卸的便利

2. 蔗糖垫层沉淀病毒：100000xg 下离心，收集病毒沉淀
3. 等密度梯度离心：将沉淀后的上述样品加入密度梯度液（如蔗糖，CsCl），慢病毒最后沉淀在 1.15g/cm<sup>3</sup> 蔗糖处。但该收集的样品可能混有 exosome（外泌体）
4. 使用速率-区带离心：进一步区分慢病毒 和外泌体，条件如下：
  - 慢病毒病毒尺寸大约 100 to 125 nm, 而 exosome 大约 30 to 100 nm, 尺寸不同，密度相似
  - 使用 iodixanol 进行速率-区带离心，6 to 18% 或 10 to 30%，从而可以区分 FIV 与 exosome.

- 浓缩及密度梯度纯化使用的离心机及转头建议：



**himac 超速离心机**  
**CP-NX系列 / CP70NE**  
全球最大转速及离心力  
具有转头寿命自动管理、  
目视平衡等高端技术  
具有实际时间控制功能

或



**himac CR30NX**  
结合了超速离心机及高速  
冷冻离心机大容量的特性，  
既可达100000xg也可  
进行6L容量离心的机型

+



可达100000xg 角  
转头或水平转头

**如 P32ST水平转头**

himac特色水平转头，从上面加装  
吊桶，所以装卸转头更轻松，且避  
免了外挂式产生挂不好及挂钩损坏  
导致的转头爆炸等问题，从而障了  
离心机、样品、人员的安全

- 慢病毒载体纯化示意图总结：

