

超速区带转头的二次病毒纯化

设备：日立 CP-70MX 或 CP-70ME 超速离心机

P35ZT 区带转头，RPZ-S 密封加样器，Master-flex 软管泵（流量 100—1000ml/分）

样品：用鸡胚培养后收集的尿囊液，予冷至 4℃左右（流感病毒，仙台病毒或其他）

预处理：

1. 已培养好的鸡胚（蛋）用 75%酒精消毒；
2. 人工或机械（自动）收集鸡胚尿囊液，按鸡蛋大小收集量略有不同（每只 6-8ml）；
3. 初滤：10μm 滤芯过滤；
4. 连续流离心或超滤系统过滤；
 - A. 连续流离心：日立 R13C 连续流转头，12,000rpm，流速 600 - 800ml/分，上清液用于透析浓缩
 - B. Millipore 超滤系统：0.45μm 滤膜
5. 透析浓缩：用 Millipore 超滤器，1000KD 膜包。

浓缩后通常为尿囊液的 1/30 - 1/40

浓缩后液体用于超速离心分离纯化。

区带转头离心分离：

第一组分离：

天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL:010-64010651
FAX:010-64060202
E-MAIL:techcomp@techcomp.cn

- I. 转头低速旋转：2000rpm—3000rpm，4℃，予冷（转头也可以在冰箱中予冷过夜）
- II. 从转头外壁依次注入：65ml PBS(磷酸缓冲液)，1000ml 予处理后的尿囊液(予冷 4℃)，130ml 30% (w/w) 蔗糖液，然后用 55% (w/w) 蔗糖液充满转头（约 450ml—500ml）(蔗糖液配置后放在 4℃冰箱中予冷待用)
- III. 拆除加样头，装上密封盖
- IV. 关闭离心盖板，抽真空，转头加速到 32,000rpm (100,000xg)，4℃，150 分钟
- V. 超速离心完成后转速下降至（2000—3000）rpm，中心孔管道接到分光光度计的标准流动池。流动池出口接分部收集器。
- VI. 用 60% (w/w) 的蔗糖从转头外侧泵入区带转头，从中心孔依次排出第一次离心后的各个组份
- VII. 排出的液体直接输入到分光计或蛋白核酸分析仪的标准流动池并连续测定 O.D.值，测定后收集。
- VII. 病毒沉降在 30%与 55%蔗糖梯度之间的某个界面附近，分光计用 280nm 波长检测 O.D.值，在分光光度计的显示屏上或打印机上绘出转头的容量—O.D.值曲线。在高、低密度蔗糖梯度液之间有一个病毒峰。30%--55%蔗糖在离心后由于浓度扩散在原界面附近已形成了一个连续的密度梯度。

【可以在分部收集后（约 50 管）用阿贝折射仪（4℃恒温）测定每管的光折射率并对照查出 4℃时的蔗糖密度，绘出蔗糖密度曲线】，而 O.D.曲线峰顶的位置对应着某个蔗糖的密度。
- VIII. 根据峰的位置认定病毒所在离心管
- IX. 留取约 150ml 病毒液 4—5℃储存待用
- X. 重复（I—VIII）的过程再做二次病毒的分离和收集，三次离心共收集粗制病毒液 500--550ml，4℃-- 5℃保存待用

第二组离心：

- I. 将第一组三次离心后收集的粗制病毒液配置成 20%（或 25%）低密度蔗糖液（w/w）

天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL:010-64010651
FAX:010-64060202
E-MAIL:techcomp@techcomp.cn

-
- II. 第一组离心后的区带转头停转后倒出浓 (60%w/w) 蔗糖 (可以重复使用), 清洁后, 再安装到离心机上低速旋转 (4°C) 予冷
- III. 从转头外侧依次泵入: 130ml PBS, 550ml 在 (20%或 25%) 蔗糖中的病毒粗制液, 600ml 30% 蔗糖液, 约 410—420ml 55% (w/w) 蔗糖液 (以上液体均予冷到 4°C 左右再泵入)
- IV. 加样完毕后卸下加样器, 装上密封盖, 关门, 抽真空, 转头加速到 32,000rpm (约 100,000 \times g), 240 分钟, 4°C
- V. 重复第一组 (IV—VI) 步骤, 分步收集成 50 管, 经 250nm, O.D. 值连续测定, 可以看出在比第一组峰顶相对应的蔗糖梯度略高的位置形成很尖锐的病毒峰。可以收取约 120ml 高纯度的病毒液
- VI. 最终的蔗糖密度梯度分布呈现连续的有近似台阶形状的密度分布。O.D. 峰位于离心前 30% 与 55% (w/w) 界面稍靠外位置

讨论:

- I. 也可以用 PBS 来配置不同密度蔗糖液
- II. 用阿贝折射仪测蔗糖密度时样品温度应保持在 4°C
- III. 使用 P35ZT 区带转头 (35,000rpm, 122,000 \times g) 后, 要特别注意主机和加样系统的水平调整和离心后转动部件的清洗与润滑, 这些操作对防止漏液、延长转动摩擦密封的寿命 (熟练的操作者可以使一个密封器工作 150 次或更多, 不熟练的随意操作可能使昂贵的摩擦密封只能工作 15—20 次) 非常重要
- IV. 以上介绍的离心方法也适用于超速连续流转头分离 (Hitachi P32CT 系统), 稍有区别的是在加速到分离转速后 (一般为 28,000rpm—32,000rpm) 先排出近转头中心的 PBS 液再以每小时 0.8—1.5 升的速度连续泵入尿囊液或组织培养液。每次离心可处理 (4—6) 升样品。根据第一组分

天美（中国）科学仪器有限公司
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层
TEL:010-64010651
FAX:010-64060202
E-MAIL:techcomp@techcomp.cn

离的结果（病毒的纯度和含量）决定是否进行第二组分离。

V. 如果需要处理的样品量达到 20 升/24 小时或更多时，可考虑使用日立大容量超速连续流系统 CC-40（40,000rpm，118,000xg，最大流量 50 升/小时，病毒纯化常用流量 8 升/小时—12 升/小时）或 CC-40S，应用的蔗糖梯度、缓冲液及分离程序与一般超速连续流相似。从操作者的角度比较，以上三种设备：CC—40 自动化程度最高，操作简易；区带次之；一般超速连续流系统对操作者要求较高

VI. 较低密度蔗糖液的用量和每次处理的样品量及样品的病毒浓度有关。处理样品量大，病毒浓度低，则 30%（w/w）蔗糖量较少，反之则应增加用量

VII. 制备区带梯度和加样的进液速度约为 50ml—200ml/分，出样速度为 100ml/分左右，某些机型的进出样速度可能要降低到 20—50ml/分。

如欲了解更多详细信息，请联系天美（中国）科学仪器有限公司 市场部，或访问天美官方网站：

www.techcomp.cn