

病毒的大量制备与 CsCl 梯度离心纯化病毒

腺病毒载体的纯化方法按规模分有两种，一种是实验室规模，主要有 CsCl 或蔗糖密度梯度离心和腺病毒纯化试剂盒等；另一种是生产规模，主要是阴离子柱层析。前者适合实验室小量快速制备，主要用于实验前期的初试，缺点是得到的病毒量低，且质量较难得到保证；后者适合于较完整的细胞和动物实验、乃至临床试验的需求，批产量高、品质有保障，缺点是对纯化设备有一定要求，且需要有经验的操作人员。我们目前用的主要是腺病毒纯化试剂盒，但是 CsCl 梯度离心方法仍然很重要，所以需要学习一下，其主要操作方法如下：

将 293 细胞铺于 30-40 个 10cm dish，待细胞长满，向每块板中加入合适滴度的病毒（约 10^7 - 10^8 pfu/ml）10ul，待细胞完全病变后（4-7 天），向每块板中加入约 500ul 10% 的 NP-40 以裂解细胞，冻存于 -80℃。

提前 1 天将病毒从 -80℃ 冰箱中拿出，室温（或 4℃）融解。收集整个细胞裂解物，12000rpm 离心 10min，弃细胞碎片，收集上清。每 100ml 上清加入 50ml PEG8000（20% PEG8000，2.5M NaCl），冰上放置 1 小时沉淀病毒（可适当延长）。12000rpm 离心上述混合物 20min，弃上清，将沉淀物悬浮在 10ml 密度为 1.10g/ml 的 CsCl 溶液中（溶剂为 20mM Tris-HCl, PH8.0），**毒液应呈粉红色。**

CsCl 梯度的制备方法如下：加入 2.0ml 密度为 1.40g/ml 的 CsCl 溶液（溶剂同上），然后缓慢加入 3.0ml 密度为 1.30g/ml 的 CsCl 溶液，再加入 5ml 的病毒悬浮液。**20000rpm，室温离心 2 小时。**

收集密度在 1.30g/ml 和 1.40g/ml 之间的病毒条带至透析袋中（透析袋使用前用 10mM 的 EDTA-Na₂ 煮沸 10min）。在透析缓冲液（50g 蔗糖，10ml 1M Tris-HCl, PH8.0，2ml 1M MgCl₂ 定容至 1L）中，4℃ 搅拌透析过夜，中间换一次透析液。收集病毒，测定病毒滴度。

附：3 种浓度的 CsCl 溶液的配制（WJ 修改）

| 密度 (g/ml) (20℃) | 浓度 (mg/ml) | CsCl 的量 (g) | 终体积 (ml) |
|--------------------|------------|-------------|----------|
| 1.40 | 548.3 | 5.483 | 10 |

| | | | |
|------|-------|-------|----|
| 1.30 | 402.4 | 4.024 | 10 |
| 1.10 | 143.8 | 1.438 | 10 |

附：腺病毒滴度测定

空斑形成单位（PFU）的测定：293 细胞铺于 60mm dish，24h 后细胞接近长满，加入不同稀释度的病毒，37℃感染 2 小时后，铺 8ml 低熔点胶（5%FBS，1.25%Agarose）。9 天左右计数。上述操作中在最低浓度的培养皿中挑取病毒空斑，可以用来纯化病毒。

病毒颗粒（OPU）的测定：将 CsCl 离心纯化得到的病毒以适当倍数稀释（OD 值在 0.1-1.0），测 OD₂₆₀ 的值，估算病毒颗粒数（OPU）： $OPU/ml = OD_{260} \times \text{稀释倍数} \times 1.1 \times 10^{12}$ 。由于此种方法测出的是病毒的物理浓度，而并没有考虑其生物学活性，即没有活力的病毒也计算在内，因此经验上估算 $PFU/ml = OPU/100$ 。