



重组 9 型腺相关病毒基因组滴度测定方法的改进和初步验证 *

郑红梅, 李永红, 胡金盼, 史新昌, 于雷, 饶春明 **

(中国食品药品检定研究院 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 100050)

摘要 目的: 对重组 9 型腺相关病毒 (rAAV-9) 基因组滴度测定方法进行优化和初步验证, 提高测定结果的精密度。**方法:** 通过比较 SDS 和 EDTA 及不同浓度 SDS 的裂解效果, 对病毒裂解方法进行优化; 通过比较质粒和病毒分别做对照品时的测定结果, 选择合适的对照品; 通过比较平行线法和传统单点法的分析结果, 选择合适的统计方法。**结果:** SDS 裂解效果显著高于 EDTA, 终浓度为 0.1% 的 SDS 裂解效果最佳; 以病毒为对照品, 采用平行线法进行统计分析的结果变异度最小 (RSD 为 13.7%), 优于质粒做对照品的检测结果 (RSD 为 35.9%) 及单点法的分析结果 (RSD 为 23.1%)。**结论:** 本方法优于传统的重组腺相关病毒基因组滴度测定方法, 可应用于以 rAAV-9 为载体的基因治疗药物的质量控制。

关键词: 重组 9 型腺相关病毒; 基因治疗载体; 实时荧光定量 PCR 技术; 基因组滴度; 平行线法; 同质对照品; 精密度

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2020)01-0058-04

doi: 10.16155/j.0254-1793.2020.01.09

Improvement and preliminary validation of a method for genomic titer determination of recombinant adeno-associated virus type 9 *

ZHENG Hong-mei, LI Yong-hong, HU Jin-pan, SHI Xin-chang, YU Lei, RAO Chun-ning **

(National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To optimize and preliminarily validate a method for genome titer determination of recombinant adeno-associated virus type 9 (rAAV-9) with the aim of improving the precision of test results. **Methods:** The method of virus dissociation was optimized by comparing the effect of SDS and EDTA, as well as SDS at different concentrations; an appropriate reference standard was selected by comparing the test results using plasmid or virus as the reference standard; an appropriate statistical method was selected by comparing the results of parallel line method and traditional single point method. **Results:** The results showed that the dissociation effect of SDS was significantly better than that of EDTA, and the effect of SDS was the best when its final concentration

* 国家科技重大专项课题资助项目 (2018ZX09733002-005)"

** 通信作者 Tel:(010)67095380; E-mail: raoem@nifdc.org.cn

第一作者 郑红梅 Tel:(010)67095359; E-mail: 1521768517@qq.com

李永红 Tel:(010)67095684; E-mail: liyh@nifdc.org.cn



was 0.1%. The results of assay using virus as reference standard and parallel line method as statistical method showed the lowest variability (RSD of 13.7%), which was better than the assay using plasmid as reference standard (RSD of 35.9%) and single point method as statistical method (RSD of 23.1%). **Conclusion:** The optimized method is superior to the traditional method for genome titer determination of recombinant AAV and can be applied to the quality control of recombinant AAV-9 gene therapy products.

Keywords: recombinant adeno-associated virus type 9; gene therapy vector; Q-PCR technology; genome titer; parallel line method; homogeneous reference; precision

腺相关病毒 (AAV) 是一种小的无被膜单链 DNA 病毒, 基因组长度约为 4.7 kb, 基因组的两端为反向末端重复序列 (ITR), ITR 是病毒包装和传代所必须的最少自身序列, 也是各种重组腺相关病毒 (rAAV) 载体所共有的 AAV 源序列^[1]。基因组的中间为 2 个开放阅读框 Rep 和 Cap^[2], 基因治疗的 rAAV 载体将 Rep 和 Cap 基因替换为外源基因及其调控元件^[3]。rAAV 基因治疗载体近年来得到了迅速的发展^[4], 其对人类无致病性, 具有高转导效率, 低炎症反应和广泛的宿主靶向性等优点, 是基因治疗领域最具前景的载体之一。截止 2018 年 11 月 13 日, 145 例 rAAV 相关的临床试验已经在 clinical trials.gov 注册^[4]。

rAAV 基因治疗药物的质量控制是产品研发和生产的一个重要环节^[5], 其中准确的滴度测定是一项关键性指标。AAV 基因治疗药物的临床剂量通常基于 rAAV 载体的基因组滴度, 准确地定量载体是药物获得最大疗效和最小毒性的前提条件^[6], 也是不同工艺和不同厂家产品横向比较的依据^[7]。rAAV 基因组滴度目前常用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, Q-PCR) 方法测定, 采用已知拷贝数的质粒 DNA 作对照品, 将系列稀释的质粒 DNA 与病毒 DNA 一起进行 Q-PCR, 根据标准曲线计算待测样品的拷贝数^[8]。但是实验结果表明传统方法测定结果的重复性差, 相同样品在同一人不同次实验, 以及不同实验室之间测定结果均存在显著的差异。

基于以上研究背景, 本文对测定 rAAV-9 基因组滴度的传统 Q-PCR 法进行改进, 用病毒对照品代替质粒对照品, 统计方法由平行线法代替传统单点法, 以提高测定结果的重复性。

1 实验材料

1.1 实验仪器

7500 Fast 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI); M-CENTRIFUGE 离心机 (AndyBio); DU 800 核酸蛋白分析

仪 (BECMAN); 96 孔 PCR 板 (ABI, 货号 4346906)。

1.2 样品及试剂

2 × Taqman universal Master Mix II, with UNG (ABI, 货号 4440038); SDS (国药集团化学试剂有限公司, 30166428); EDTA (Thermo Fisher, AM9912); Dnase I (TAKARA, 2270A); 引物和探针 (fwd-ITR-primer: GGAACCCCTAGTGATGGAGTT; rev-ITR-primer: CGGCCTCAGTGAGCGA; AAV2-ITR-probe: CACTCCCTCTCTGCGCGCTCG)^[8], 由 Thermo Fisher 合成; 本实验所用的 rAAV-9 病毒样品 (批号 2019022801)、rAAV-9 病毒对照品 (批号 2014102611, 基因组滴度 2.2×10^{13} copies · mL⁻¹) 及质粒对照品 (pAAV2neo-egfp, 基因组滴度 1.1×10^{11} copies · mL⁻¹) 均为中国食品药品检定研究院重组药物室留样。

2 方法与结果

2.1 检测方法

2.1.1 对照品和样品的预稀释 将质粒对照品用超纯水预稀释 30 倍, 然后 2 倍系列稀释 7 个稀释度, 各稀释度下质粒对照品溶液分别用于“2.1.4”项下 Q-PCR 的试验。病毒对照品、病毒样品分别用超纯水预稀释 200 倍, 然后 2 倍系列稀释 7 个稀释度, 各稀释度下病毒对照品溶液和病毒样品溶液分别用于“2.1.2”“2.1.3”“2.1.4”项下的试验。

2.1.2 外源 DNA 的去除 分别取各稀释度的病毒对照品溶液、病毒样品溶液 5 μL, 按照如下体系配制反应混合液: 5 μL rAAV-9 病毒样品溶液或病毒对照品溶液, 5 μL 10 × Dnase I 缓冲液, 2 μL Dnase I, 38 μL 超纯水。37 °C 孵育 30 min, 去除外源 DNA, 80 °C 孵育 10 min, 灭活 Dnase I, 即得消化液。

2.1.3 病毒的裂解 分别采用 SDS 或 EDTA 裂解病毒。在 SDS 裂解法中, 将上述消化液加入 0.2% SDS 50 μL, 95 °C 30 min 裂解病毒, 即得裂解液。EDTA 裂解法中, 将上述消化液加入 20 mmol · L⁻¹ EDTA



50 μL, 95 °C 30 min 裂解病毒, 即得裂解液。

2.1.4 Q-PCR 用超纯水将上述裂解液稀释 100 倍, 以去除裂解试剂对 Q-PCR 的抑制作用, 然后分别以各稀释度病毒对照品、病毒样品的裂解液及各稀释度质粒对照品溶液为模板, 配制如下反应体系: 5 μL DNA 模板, 0.5 μL fwd-ITR-primer, 0.5 μL rev-ITR-primer, 0.5 μL AAV2-ITR-probe, 10 μL 2 × Taqman universal Master Mix II, 3.5 μL 超纯水。根据以下反应程序进行 Q-PCR: 50 °C 2 min; 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 40 个循环; 37 °C 2 s。

2.1.5 结果的计算 平行线法: 采用平行线法分析结果时需要预试验, 寻找平行范围。本研究首先将相近浓度的样品和对照品以较大的稀释倍数(如 4 倍)倍比稀释, 寻找到大概的平行范围, 然后缩小稀释倍数(如 2 倍), 寻找最佳平行范围。选择质粒对照品、病毒对照品、病毒样品任意二者之间平行性均好的 5 个稀释度范围进行计算。以质粒为对照品时, 选取质粒对照品和病毒样品分别对应的 Ct 值, 根据平行线法^[9]进行计算, 同时乘以样品预稀释及处理过程中的稀释倍数, 得出 rAAV-9 基因组滴度; 以病毒为对照品时, 选取病毒对照品和病毒样品分别对应的 Ct 值, 根据平行线法进行计算, 同时乘以样品预稀释及处理过程中的稀释倍数, 得出 rAAV-9 基因组滴度。单点法: 以病毒为对照品, 根据标准曲线用外标法进行计算, 同时乘以样品预稀释及处理过程中的稀释倍数, 得到 rAAV-9 的基因组滴度。

2.2 方法改进结果

2.2.1 病毒裂解方法的选择 根据“2.1.3”项方法, 比较 SDS 和 EDTA 的裂解效果, 结果如图 1 所示, SDS 裂解后测定结果显著高于 EDTA, 表明 SDS 裂解效率高于 EDTA, 所以 SDS 裂解法是较优的方法。对 SDS 裂解浓度进行优化, 比较不同浓度 SDS 裂解效

果, 结果如图 2 所示, 终浓度为 0.1% 的 SDS 裂解后测定结果值最高, 裂解效果最佳, 故选择在此 SDS 终浓度下裂解病毒。

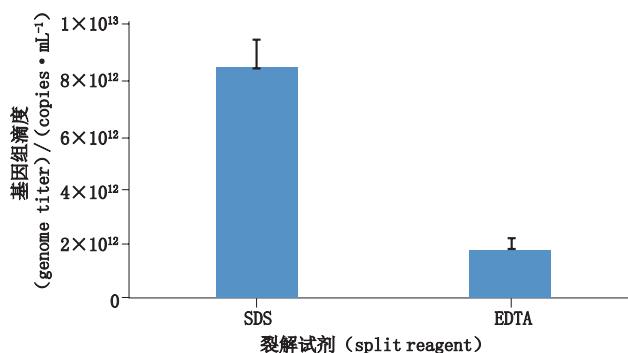


图 1 SDS 和 EDTA 对 rAAV-9 裂解效果的比较

Fig. 1 Comparison of dissociation effects on rAAV-9 between SDS and EDTA

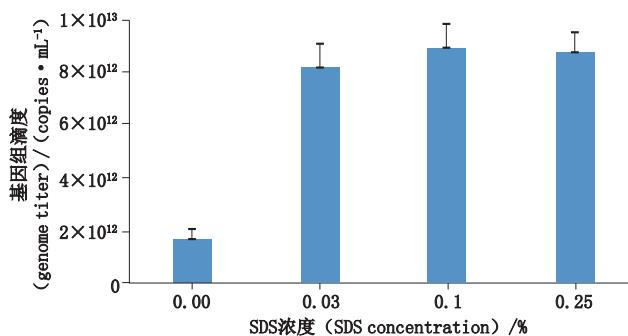


图 2 不同浓度 SDS 对 rAAV-9 裂解效果的比较

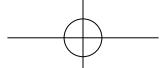
Fig. 2 Comparison of dissociation effect on rAAV-9 with SDS at different concentrations

2.2.2 对照品的比较 质粒和病毒分别做对照品, 根据平行线法计算 rAAV-9 的拷贝数, 病毒对照品由质粒对照品根据平行线法标化, 计算结果见表 1, 质粒做对照品的测定结果精密度差, RSD 为 35.9%, 病毒做对照品的测定结果精密度较高, RSD 为 13.7%, 所以选择用病毒对照品替代质粒对照品。

表 1 不同统计方法及对照品分析结果的比较

Tab. 1 Comparison of different statistical methods and reference standards

方法 (method)	对照品 (reference substance)	结果 (result) / (copies · mL⁻¹)				SD	RSD/%
		1	2	3	均值 (mean)		
(method of parallel lines)	质粒对照品 (plasmid control)	1.07 × 10¹³	1.13 × 10¹³	1.96 × 10¹³	1.39 × 10¹³	4.97 × 10¹²	35.9
	病毒对照品 (virus control)	1.37 × 10¹³	1.40 × 10¹³	1.74 × 10¹³	1.50 × 10¹³	2.07 × 10¹²	13.7
单点法 (single-point method)	病毒对照品 (virus control)	1.42 × 10¹³	1.45 × 10¹³	2.10 × 10¹³	1.65 × 10¹³	3.83 × 10¹²	23.1



2.2.3 统计方法的选择 用病毒做对照品, 分别根据单点法和平行线法计算病毒样品拷贝数, 结果见表1。单点法测定结果精密度较差, RSD为23.1%; 平行线法计算结果精密度较好, RSD为13.7%。所以选择用平行线法代替传统单点法分析结果。

2.3 方法学的初步验证

2.3.1 准确度 用超纯水将病毒对照品稀释1.5倍后按照改进后方法测稀释后对照品拷贝数, 比较实测值和理论值的关系, 3次实验结果表明, 回收率在90%~120%之间, 准确度较好。

2.3.2 精密度 根据改进后方法测rAAV-9样品拷贝数, 每天做1次试验, 连续做3 d, 结果显示, 3次实验均值为 1.54×10^{13} copies·mL⁻¹, RSD为11.4%, 精密度较好。

3 讨论

在rAAV基因治疗药物的质量控制研究中, 滴度的测定扮演着重要的角色, 由于传统方法的测定结果重复性差, 本研究中对传统方法进行了裂解试剂的选择、对照品的比较和统计方法的选择等方面的改进。

目前测定rAAV基因组滴度报道最多的是Q-PCR方法, 用Q-PCR方法测rAAV基因组滴度主要有2种思路, 一是SDS或EDTA裂解病毒后进行Q-PCR, 二是试剂盒提取DNA后进行Q-PCR^[10]。本研究对裂解方法进行了选择优化, 选出了较优的裂解试剂SDS及裂解浓度0.1%。至于试剂盒提取DNA的方法, 实验过程发现用试剂盒提取后测定结果重复性差, 考虑到不同试剂盒的提取效率不同, 且提取过程中所添加的试剂可能会对Q-PCR产生影响, 本研究中舍弃了试剂盒提取的方法, 选择了裂解法。

传统裂解法中质粒为对照品, 并未参与病毒的前处理过程, 不能对其进行控制, 为非同质对照品。本研究用病毒对照品代替了质粒对照品, 为同质对照品, 提高了测定结果的精密度。此外, 质粒对照品结构与病毒基因组结构差异较大(质粒中的ITR序列处于非游离状态, 而病毒基因组中的ITR序列是游离状态), 这种结构差异会导致二者的扩增效率不一致, 与D' Costa等^[11]的研究结果相一致。

与此同时, 本研究也对统计方法进行了选择, 将传统的单点计算法替换为平行线法, 进一步提高了实验的精密度。传统方法中结果的计算只参考了病毒样品1个点的数据, 数据不充分, 无法对结果的可靠性进行准确判断, 而平行线法结果的计算参考了多个点的数据, 结果的重复性高。而且平行线法在计算结果的同时进行了线性、平行性的判断, 可检验对照品、样品的扩增是否呈线性及对照品和样品扩增是否同步等, 结果更可靠。

总之, 本文完善了rAAV-9基因组滴度测定方法, 提高了对重组腺相关病毒基因治疗药物的质控水平。

参考文献

- [1] 肖桂清, 杨会勇, 刁勇. 重组腺相关病毒质量控制的qPCR技术研究进展[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2014, 35(2): 191
XIAO GQ, YANG HY, DIAO Y. Advances in real-time quantitative PCR technology for quality control of recombinant adeno-associated virus[J]. J Huaqiao Univ(Nat Sci), 2014, 35(2): 191
- [2] 杜梦潭, 刘兴健, 胡小元, 等. 腺相关病毒的生产方式及其在基因治疗中的应用[J]. 生物技术进展, 2019, 9(4): 326
DU MT, LIU XJ, HU XY, et al. The production method of adeno-associated virus and its application in gene therapy[J]. Curr Biotechnol, 2019, 9(4): 326
- [3] 刁勇, 王启钊, 吕颖慧, 等. 重组腺相关病毒基因药物的病毒滴度定量测定[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(10): 728
DIAO Yo, WANG QZ, LÜ YH, et al. Biological assay of recombinant adeno-associated virus gene medicine[J]. Chin J New Drugs Clin Rem, 2010, 29(10): 728
- [4] WANG D, TAI PWL, GAO G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery[J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(5): 358
- [5] 蒙青林, 张彬彬, 张春. 测定重组腺相关病毒基因组滴度的qPCR新方法[J]. 生物工程学报, 2013, 29(2): 235
MENG QL, ZHANG BB, ZHANG C. Novel qPCR strategy for quantification of recombinant adeno-associated virus serotype 2 vector genome-titer[J]. Chin J Biotechnol, 2013, 29(2): 235
- [6] WAGNER A, RÖHRS V, KEDZIERSKI R, et al. A novel method for the quantification of adeno-associated virus vectors for RNA interference applications using quantitative polymerase chain reaction and purified genomic adeno-associated virus DNA as a standard[J]. Hum Gene Ther Methods, 2013, 24(6): 355
- [7] 石亮, 刘云波. 腺相关病毒的特性及应用进展[J]. 医学综述, 2016, 22(11): 2088
SHI L, LIU YB. The characteristics and applications of adeno-associated virus[J]. Med Recapit, 2016, 22(11): 2088
- [8] AURNHAMMER C, HAASE M, MUETHER N, et al. Universal real-timePCR for the detection and quantification of adeno-associated virus sero-type 2-derived inverted terminal repeat sequences[J]. Hum Gene Ther Methods, 2012, 23(1): 18
- [9] BP 8.0[S]. 2013: 609
- [10] 于雷, 李永红, 秦玺, 等. Q-PCR法检测腺病毒基因治疗产品中的复制型腺病毒[J]. 生物技术通讯, 2017, 28(3): 352
YU L, LI YH, QIN X, et al. Detection of replication-competent adenoviruses in adenoviral gene therapy products by Q-PCR[J]. Lett Biotechnol, 2017, 28(3): 352
- [11] D' COSTA S, BLOUIN V, BROUCQUE F, et al. Practical utilization of recombinant AAV vector reference standards: focus on vector genomes titration by free ITR qPCR[J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2016, 5: 16019

(本文于2019年11月22日收到)