



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: raocm@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

7 500 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 \times Taqman universal Master Mix II, 3.5 μL 超纯水。根据以下反应程序进行 Q-PCR: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 30 s, 40 个循环; 37 $^{\circ}\text{C}$ 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 C_t 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 C_t 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。

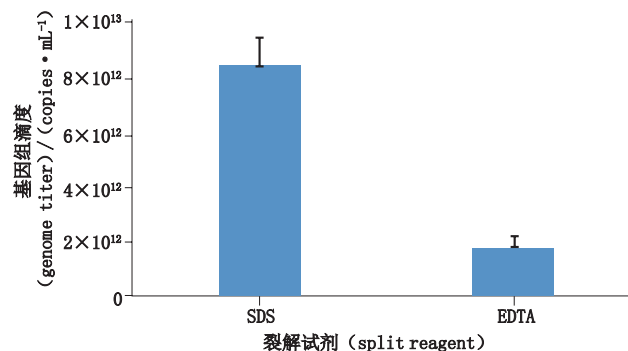


图 1 SDS 和 EDTA 对 rAAV-9 裂解效果的比较

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

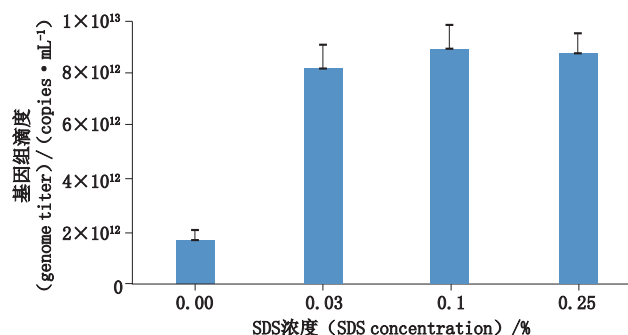


图 2 不同浓度 SDS 对 rAAV-9 裂解效果的比较

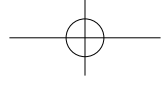
Fig. 2 Comparison of dissociation effect on rAAV-9 with SDS at different concentrations

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)		
平行线法 (method of parallel lines)	质粒对照品 (plasmid control)	1.07 × 10 ¹³	1.13 × 10 ¹³	1.96 × 10 ¹³	1.39 × 10 ¹³	4.97 × 10 ¹²	35.9
	病毒对照品 (virus control)	1.37 × 10 ¹³	1.40 × 10 ¹³	1.74 × 10 ¹³	1.50 × 10 ¹³	2.07 × 10 ¹²	13.7
单点法 (single-point method)	病毒对照品 (virus control)	1.42 × 10 ¹³	1.45 × 10 ¹³	2.10 × 10 ¹³	1.65 × 10 ¹³	3.83 × 10 ¹²	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 \cdot 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)