

一种测定重组腺相关病毒滴度的定量PCR方法

申请号：[201310046098.X](#)

申请日：2013-02-04

申请(专利权)人 [许瑞安](#)

地址 362021 福建泉州市华侨大学分子药物研究院

发明(设计)人 [许瑞安](#) [王峰](#) [崔秀灵](#)

主分类号 [C12Q1/70\(2006.01\)I](#)

分类号 [C12Q1/70\(2006.01\)I](#) [C12Q1/68\(2006.01\)I](#)

公开(公告)号 103114152A

公开(公告)日 2013-05-22

专利代理机构 [北京华科联合专利事务所 11130](#)

代理人 [杨厚](#) [王为](#)



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103114152 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201310046098. X

(22) 申请日 2013. 02. 04

(73) 专利权人 许瑞安

地址 362021 福建泉州市华侨大学分子药物
研究院

(72) 发明人 许瑞安 王峰 崔秀灵

(74) 专利代理机构 北京华科联合专利事务所
(普通合伙) 11130

代理人 杨厚 王为

(51) Int. Cl.

C12Q 1/70 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

(56) 对比文件

刁勇 等.《重组腺相关病毒基因药物的病毒
滴度定量测定》.《中国新药与临床杂志》. 2010,
第 29 卷 (第 10 期), 全文.

王峰 等.《表达 Kallistatin 的 9 型重组腺
相关病毒的制备及其体外表达效率》.《华侨大学
学报》. 2013, 第 34 卷 (第 1 期), 第 69 页第 1.5
节.

曹佐武 等.《ITR 缺陷对 AAV 病毒包装与感
染力的影响》.《生物化学和生物物理进展》. 2008,
第 35 卷 (第 2 期), 第 224 页左栏, 第 1.1 节—
1.3 节.

审查员 罗德明

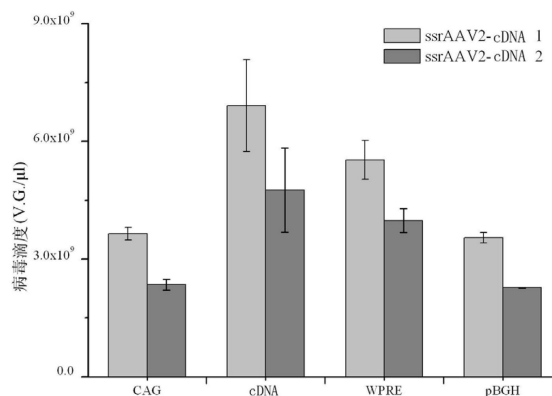
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

一种测定重组腺相关病毒滴度的定量 PCR 方
法

(57) 摘要

本发明涉及一种实时荧光定量 PCR 检测重组
腺相关病毒(rAAV)滴度的方法,通过分析 AAV 的
空间构象,确定可能影响其检测的空间构象位置
及消除方法,本发明比传统的方法能够显著提高
重组腺相关病毒滴度检测的准确度,具有广泛的
应用前景。



1. 一种检测重组腺相关病毒滴度的定量 PCR 方法,其特征是,所述方法系利用腺相关病毒基因组共有的空间构象末端重复序列 ITR 中的 SmaI 限制性酶切位点,通过 SmaI 酶切,消除影响定量 PCR 检测重组腺相关病毒滴度的干扰,再以酶切后的重组腺相关病毒 DNA 为模板进行实时定量 PCR 检测,具体实施步骤包括:

- 1) 将重组腺相关病毒感染细胞,扩增制备重组腺相关病毒;
- 2) 提取纯化重组腺相关病毒 DNA;
- 3) 用 SmaI 酶切处理腺相关病毒 DNA,破坏 ITR 的构象;

4) 以酶切后的重组腺相关病毒 DNA 为模板,用不同元件设计引物进行实时定量 PCR 检测重组腺相关病毒的滴度。

一种测定重组腺相关病毒滴度的定量 PCR 方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及定量实时荧光 PCR 检测重组腺相关病毒滴度的方法。

背景技术：

[0002] 腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体是含有单链的 DNA, 无包膜, 属于依赖辅助病毒的细小病毒 B19 家族。这种病毒是 1965 年 Atchison 等人在猿猴腺病毒 15 (SV-15) 中发现并定义为腺相关病毒(AAV)。AAV 在宿主中的复制需要宿主细胞或其他病毒的协助才能完成, 如腺病毒和疱疹病毒, 也因此被称为腺相关病毒。AAV 病毒颗粒直径大约 20nm, 呈二十面体, 分子量约为 $5.5-6.2 \times 10^6$ 道尔顿, 在 CsCl 梯度中的密度为 1.39-1.42g/cm。相较于其它病毒, 腺相关病毒更加稳定, 可以承受 60 度的温度及离子去污剂的作用。AAV 基因组为线性单链的正链或负链 DNA, 长度约为 4700 个核苷酸。腺相关病毒的基因组中含有两个开放的阅读框, rep 和 cap, 两端分别有末端重复序列(ITR)。

[0003] 重组腺相关病毒(rAAV)载体因其在体内外表达效率高、表达周期长、免疫性低、无致病和致瘤性、遗传毒性低并可规模化生产等诸多优点, 使其成为目前基因治疗领域非常有前途的生物载体, 现已被广泛应用于临床试验且取得很好的疗效。

[0004] 然而, 迄今世界上还没有形成统一的标准化的 AAV 滴度测定和临床剂量使用标准, 给不同实验室临床试验结果间的比较造成了困难。目前国际基因治疗中应用较多的另一种腺病毒, 已由腺病毒标准样品工作小组(Adenovirus Reference Material Working Group, ARMWG)根据 5 型腺病毒制定出标准样品指南。其对腺病毒的滴度测定和基因治疗中使用的剂量进行了统一规定。参照这一经验, 美国食品药品监督管理局(FDA)、美国国家健康研究所重组 DNA 顾问委员会(NIH-RAC)、美国国家基因载体实验室和来自其他 9 个国家的科学家共同成立了 AAV 标准样品工作小组(AAV Reference Standard Working Group, AAVRSWG), 试图建立起 AAV 的标准化指南。rAAV2 是基因治疗领域应用最早和最广泛的亚型, 也是目前物理、化学和生物性质研究得最清楚的 AAV 亚型。所以标准化指南首先建立在 rAAV2 的基础上。该组织对 rAAV2 标准样品统一测定时, 要求被测定的 rAAV2 标准样品, 必须要达到在不同实验室能进行不同测定所需的量, 并具有一定时间内的稳定性。同时, 规定了生产和纯化 rAAV2 的标准指南。该组织确定, 选择四个方面进行测定实施对 rAAV2 的质量控制: (1) 使用 A20 酶联免疫吸附法测定 rAAV2 外壳滴度; (2) 定量聚合酶链反应 qPCR 测定 rAAV2 的基因组滴度; (3) qPCR 和增强绿色荧光蛋白(EGFP)表达测定感染滴度; (4) SDS-PAGE 测定病毒纯化和外壳蛋白。

[0005] 如所周知, rAAV 的滴度是影响基因治疗效果的重要因素。研究发现, 临床试验对病毒生产的要求为 10^3 和 10^5 DRP/cell (DNA 酶 - 抗性颗粒 / 细胞, DNase-Resistant Particles/cell)。而临床试验中的剂量一般为 2×10^{11} DRP/kg, 需要的单批产量约为 10^{15} DRP。而且不同组织对 rAAV 的使用滴度要求有所不同。在眼科临床试验中, 大约只需要 2×10^8 DRP, 而对肌肉或者肝脏疾病进行治疗时却需要 1×10^{14} DRP。目前涉及 rAAV 应用于临床试验的研究有 81 项。多数临床研究处于临床 I 期和 II 期, 但是有 8 项临床研究已经

进入 III 期。临床结果表明,基因表达量与 rAAV 的滴度成正比关系,而且大多数基因药物的疗效与表达量有很大关系,表达量太低达不到其起作用的药物需求量。某些基因药物高表达可能会导致正常功能的紊乱,从而对人体产生伤害。研究发现, rAAV 对于某些病人会产生针对其外壳蛋白的免疫反应,包括抗原特异性记忆性 CD8+T 细胞、抗体和干扰素等。所以, rAAV 的滴度测定对临床试验至关重要。而整个基因治疗领域制定标准化的滴度测定方法,将使不同实验室间临床结果比较和药物研发成为可能。目前测定 rAAV 滴度的方法主要检测以下几个方面:病毒颗粒滴度(Viral Particles, V.P.),基因组滴度(viral genome, V.G.),感染滴度(Infectious Particles, I.P.),转导滴度(Transduction Units, T.U.)或增强的转导滴度(Enhanced Transduction Units, E.T.U.)。

[0006] 重组单链腺相关病毒 ssAAV2 基因组由两个末端反向重复序列(ITR)包含 CAG 启动子、目的基因 cDNA、土拨鼠肝炎病毒后调控元件(woodchuck hepatitisB virus post-regulatory element, WPRE)、牛生长激素 polyA 元件(bovine growth hormone polyadenylation signal, poly A BGH)构成。双链互补腺相关病毒 scrAAV2 基因组因为含有两条互补的链,其中一半基因组的序列由末端 ITR、牛生长激素 polyA 元件、目的基因 cDNA 和 CB 启动子组成,另一半是上述基因组的反向互补序列,中间由缺失了末端断裂位点(TRS)的 ITR 连接。重组 ssAAV2 和 scAAV2-cDNA 结构如图 1 所示。

[0007] 分别将 ssrAAV2 和 scrAAV2 的全基因组序列通过在线 DNA 构象分析网站进行生物信息学分析(<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>),显示野生型的 AAV2 基因组主要有两种可能的构象。其中一种主要构象中,两段 ITR 形成反向互补的发卡结构,而其他部分形成松散的 DNA 构象展开。另一种主要构象为两段 ITR 相互之间形成反向互补的构象,从而使 ITR 之间的序列结合在一起,形成一种松散的互补性结构。从野生型的两种主要构象中可以看到, ITR 对 AAV2 基因组构象的影响非常大, ITR 特殊的构象会导致整个 AAV2 基因组的构象发生变化。

[0008] 重组 ssAAV2-cDNA 基因组的构象分析表明,虽然只有 ITR 与野生型 AAV2 基因组相同,中间的序列都不相同,但是基因组的构象与野生型基因组极为相似。表明在重组 ssAAV2 中,其他序列对基因组构象形成所起的作用有限,两段 ITR 所具有的反向重复序列,在单链 AAV2 的基因组构象形成中起到至关重要的作用。重组 scAAV2-cDNA 的基因组构象分析表明,在其基因组主要受到中间突变 ITR 的影响,其他自身互补性序列形成非常紧密的互补结构。虽然末端的两个 ITR 会形成不同的构象,但是对整体的构象影响不大。

[0009] 通过对重组腺病毒载体构象分析发现,可能因其基因组上 ITR 的特殊构象导致 qPCR 的检测结果偏低。而 ITR 存在于所有腺相关病毒 AAV 中,为消除 AAV 结构 ITR 特殊构象对 qPCR 检测滴度的影响,以增加其测定准确性方法的研究,迄今尚未见有相关报道。本发明目的在于提供一种能准确反映所测定重组腺相关病毒滴度的定量 PCR 方法。

发明内容:

[0010] 本发明首先以 AAV2 为例,研究证明 AAV2 空间构象对定量 PCR (qPCR) 检测的影响。为此,使用靶向不同元件 CAG、cDNA、WPRE、pBGH 的引物对重组 ssAAV2 基因组,或者 CB、EGFP、pBGH 等元件引物对重组 scAAV2 基因组进行 qPCR 滴度测定(图 2 和图 3),表明不同引物 qPCR 测定的滴度是不同的。在测定重组 ssAAV2 时,由于 ITR 主要存在于两端,接近 ITR

序列进行 qPCR 时受到特殊构象的影响较大,所以测得的滴度较低。而重组 scAAV2 因其 ITR 序列引起的双链互补构象在 qPCR 的过程中不易变性,而靠近两端 ITR 的序列较易打开,所以测定的滴度较高。上述实验结果与生物信息学分析完全一致。

[0011] 本发明所提供的一种检测重组腺相关病毒滴度的定量 PCR 方法,是利用腺相关病毒基因组共有的空间构象末端重复序列 ITR 中的 SmaI 限制性酶切位点,通过 SmaI 酶切,消除影响定量 PCR 检测重组腺相关病毒滴度的干扰,再以酶切后的重组腺相关病毒 DNA 为模板进行实时定量 PCR 检测。

[0012] 本发明的关键在于通过分析 AAV2 基因组的空间构象,确定可能干扰影响 qPCR 检测的空间构象 ITR。然后选择合适的限制性酶,通过酶切将形成特殊空间构象的部分除去,从而消除影响 qPCR 主要空间构象。

[0013] 具体实施步骤包括:将重组腺相关病毒感染细胞,扩增制备重组腺相关病毒;采用三质粒磷酸钙共转染 HEK293 细胞,制备含各种元件的重组 ssAAV2 和 scAAV2 基因组;经过超声裂解, CaCl_2 和 PEG8000/NaCl 沉淀后,再进行 CsCl 密度梯度离心和缓冲液透析;使用银染试剂盒鉴定各种 rAAV2 的纯度。

[0014] 振荡离心管混匀。向每管样品中加入 2.5 倍体积的无水乙醇,移液枪轻轻吹打混匀,置于 -20°C 中过夜沉淀病毒 DNA。离心沉淀 DNA。70% 乙醇洗涤病毒 DNA。室温静置挥发,TE 溶解干燥后的 DNA 沉淀,然后置于 4°C 中备用。

[0015] 用 SmaI 酶切处理腺相关病毒 DNA,破坏 ITR 的构象,酶切反应条件为:

[0016]

10×缓冲液	2 μl
基因组 DNA	10 μl
SmaI (10u/ μl)	1 μl
纯净水	补足到 20 μl

[0017] 37°C 温育,3 小时。

[0018] 提取纯化重组腺相关病毒 DNA。rAAV2 经过 DNase I 于 25°C 孵育 1 小时然后,使用 Proteinase K 37°C 孵育 1 小时。等体积向每管样品中加入配制好的酚、氯仿及异戊醇混合液进行纯化分离。从每管样品中轻轻吸取离心后上层水相,加入到新的离心管中,向每管加入适量体积的 3M 醋酸钠 (pH5.2)、糖原。涡旋热变性: 90°C 反应 10min。

[0019] 以酶切后的重组腺相关病毒 DNA 为模板,用不同元件如 CAG、WPRE、cDNA 和 pBGH 等设计引物进行实时定量 PCR 检测重组腺相关病毒的滴度。采用传统和 SmaI 酶切后 DNA 模板进行 qPCR,分别测定其滴度。qPCR 使用 2×SYBR Green 试剂盒,标准样品使用含有全部病毒基因组的线性化质粒。使用 AB 公司的 Stepone plus 仪器进行测定。反应条件如下:

[0020]

95 $^\circ\text{C}$ 10s 1 个循环,
 95 $^\circ\text{C}$ 10s } 40 个循环
 60 $^\circ\text{C}$ 30s }

[0021] 结果见表 1 和图 4、图 5,显示采用本发明 SmaI 酶切后 DNA 模板,定量测定重组腺

相关病毒滴度的 qPCR 方法,能明显提高测定的滴度,克服了传统定量 PCR 方法测定重组腺相关病毒滴度偏低的缺陷,使定量 PCR 检测方法在检测 AAV2 时更加准确,并且具有可重现性。与此同时,通过本发明方法测定重组 scAAV2 的实验结果发现,使用靶向 cDNA 引物测定的滴度增长倍数,明显高于使用靶向 pBGH 的引物测定滴度的增长倍数(图 5);鉴于使用传统定量 PCR 实验中,使用靶向 cDNA 的引物测定的滴度明显低于使用靶向 pBGH 的引物测定的滴度(图 3),所以,本发明方法测定重组 scAAV2 时能够缩小使用不同引物间的差异,为不同实验室之间的实验结果比较提供了方便。

[0022] 表 1 采用传统和本发明 qPCR 测定重组腺病毒滴度比较

[0023]

样品	引物	病毒滴度 (V.G./ μ l)			
		传统方法		本发明方法	
		样品 1	样品 2	样品 1	样品 2
ssAAV2	CAG	$6.40 \times 10^9 \pm 2.57 \times 10^8$	$4.40 \times 10^9 \pm 1.45 \times 10^8$	$7.14 \times 10^9 \pm 4.34 \times 10^8$	$5.28 \times 10^9 \pm 4.53 \times 10^8$
-cDNA	WPRE	$1.36 \times 10^9 \pm 5.86 \times 10^7$	$2.77 \times 10^9 \pm 1.11 \times 10^8$	$2.30 \times 10^9 \pm 6.66 \times 10^7$	$3.82 \times 10^9 \pm 2.42 \times 10^8$
scAAV2	cDNA	$6.40 \times 10^6 \pm 1.17 \times 10^5$	$1.89 \times 10^7 \pm 3.85 \times 10^6$	$1.45 \times 10^7 \pm 7.23 \times 10^5$	$4.94 \times 10^7 \pm 1.30 \times 10^7$
-cDNA	pBGH	$1.67 \times 10^7 \pm 3.29 \times 10^6$	$3.83 \times 10^7 \pm 3.53 \times 10^6$	$2.98 \times 10^7 \pm 3.97 \times 10^6$	$7.02 \times 10^7 \pm 9.22 \times 10^6$

[0024] 本发明实施方案,系以单链 ssAAV2 和双链互补 scAAV2 为例,提供了一种测定重组腺相关病毒滴度的定量 PCR 方法,所述方案适用于所有 AAV 病毒滴度的测定。

[0025] 本发明建立的测定重组腺相关病毒滴度的定量 PCR 方法具有以下优点:

[0026] 1、所述方法在消除了重组腺相关病毒 ITR 构象的影响后,定量 PCR 检测 rAAV2 滴度明显提高且更加准确;

[0027] 2、所述方法能够有效缩小使用靶向不同元件的引物进行定量 PCR 测定 rAAV2 滴度之间的差异,缩小不同实验室在定量 PCR 使用不同引物而引起的差异,有利于不同实验室对临床试验结果进行比对;

[0028] 3、所述方法具有通用性,本发明所提及的 ITR 存在于所有 AAV2 基因组中。目前国际上使用的 rAAV 基本均为 AAV2 的重组基因组。本发明使用的限制性内切酶 SmaI 序列也是唯一存在于两端 ITR 的序列中,且适用于单链和互补双链两种 rAAV2,故该方法有望适用于对所有 AAV 进行定量 PCR 检测;

[0029] 4、所述方法的检测范围广,可检测从 10^6 到 10^{10} 基因组滴度 (V.G./ μ l) 的病毒,为不同生产规模的 rAAV 进行检测提供了方便。

附图说明:

[0030] 图 1: 重组 ssAAV2- 和 scAAV2-cDNA 基因组的元件组成和 SmaI 酶切位点

[0031] 上面为 ssAAV2-cDNA

- [0032] 下面为 scAAV2-cDNA
- [0033] 其中 :ITR5' 或 3' —5' 或 3' 末端重复序列
- [0034] Mutant ITR- 突变末端重复序列
- [0035] CAG—CAG 启动子
- [0036] cDNA—重组腺相关病毒载体中的目的基因
- [0037] WPRE—土拨鼠肝炎病毒后调控元件
- [0038] pBGH—牛生长激素 polyA 元件
- [0039] CB—CB 启动子
- [0040] SmaI—末端重复序列中的限制性酶 SmaI 酶切位点
- [0041] 图 2 :不同引物 qPCR 测定重组 ssAAV2 基因组 1、2 两个样品的滴度
- [0042] 其中 :CAG—CAG 启动子
- [0043] cDNA—重组腺相关病毒载体中的目的基因
- [0044] WPRE- 土拨鼠肝炎病毒后调控元件
- [0045] pBGH—牛生长激素 polyA 元件
- [0046] 纵坐标—病毒滴度单位以基因组拷贝 / 微升 (V. G/ μ l) 表示
- [0047] 图 3 :不同引物 qPCR 测定重组 scAAV2 基因组 1、2 两个样品的滴度
- [0048] 其中 :CB-CB 启动子
- [0049] cDNA- 重组腺相关病毒载体中的目的基因
- [0050] pBGH- 牛生长激素 polyA 元件
- [0051] 图 4 :本发明和传统方法对 ssAAV2 基因组测定的滴度比较
- [0052] 其中 :1、2 两个样品使用靶向 CAG 的引物
- [0053] 3、4 两个样品使用靶向 WPRE 的引物
- [0054] 图 5 :本发明和传统方法对 scAAV2 组测定的滴度比较
- [0055] 其中 :1、2 两个样品使用靶向 cDNA 的引物
- [0056] 3、4 两个样品使用靶向 pBGH 的引物。

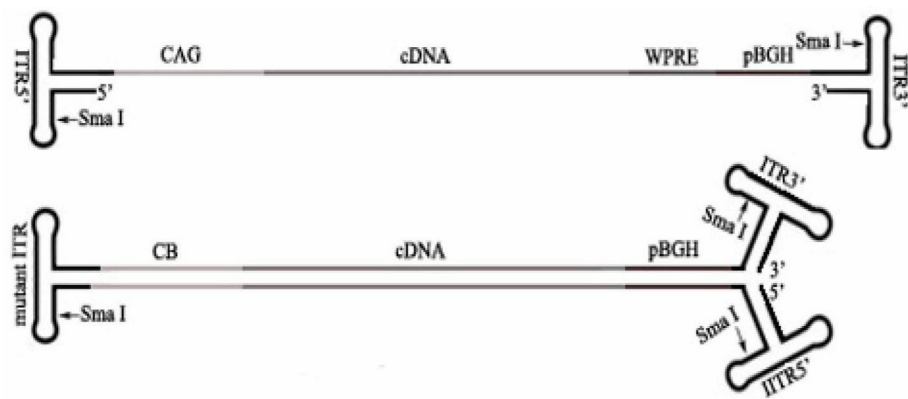


图 1

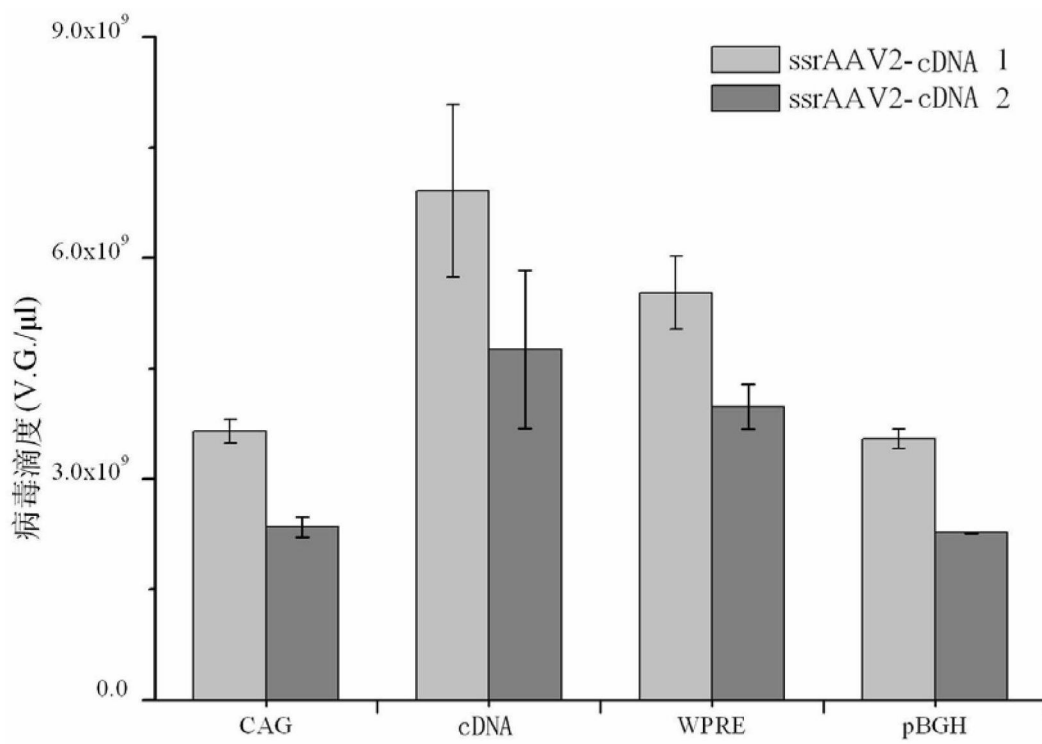


图 2

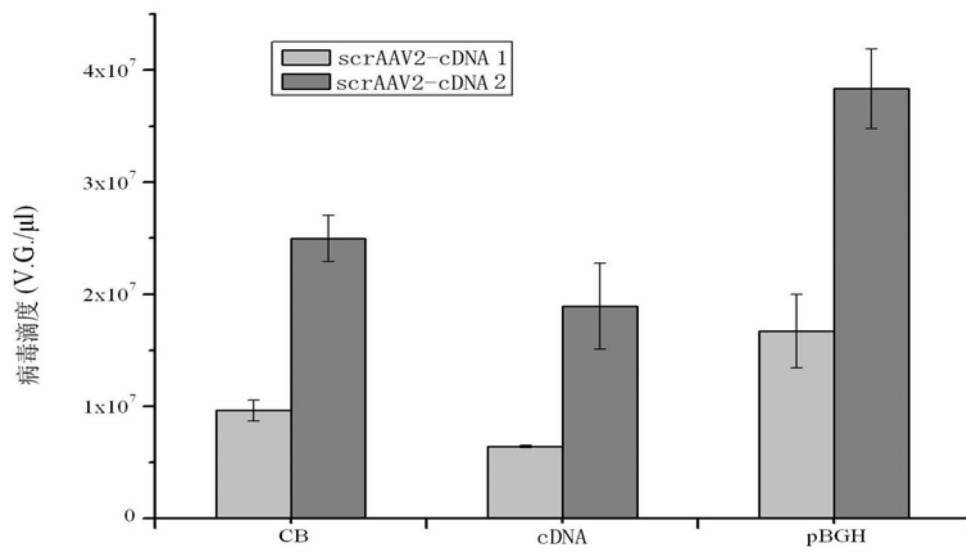


图 3

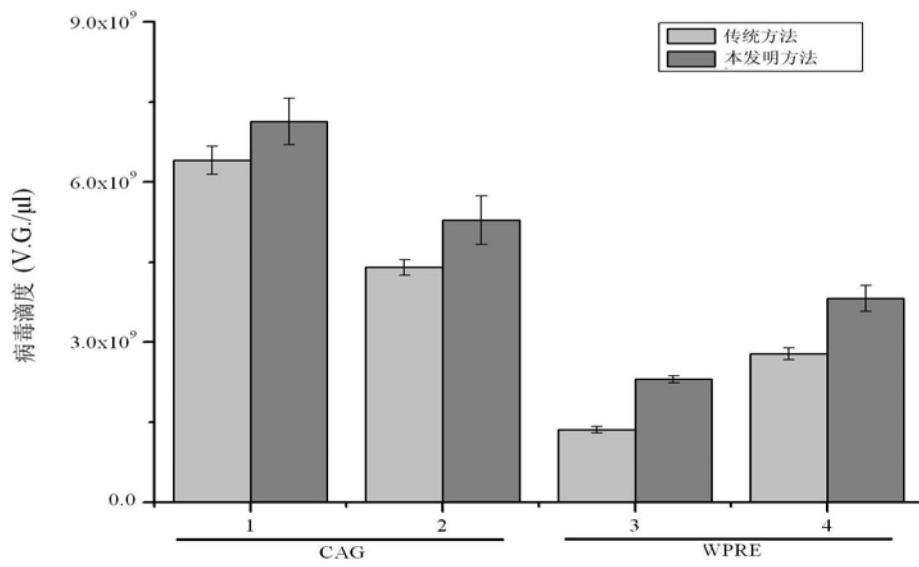


图 4

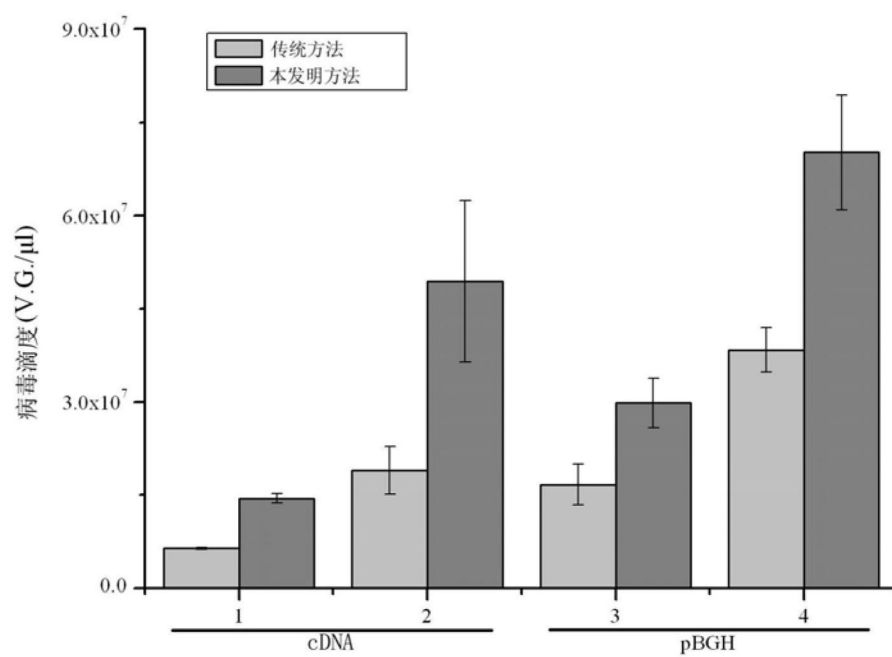


图 5