

测定重组腺相关病毒基因组滴度的 qPCR 新方法

蒙青林¹, 张彬彬², 张春¹

1 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所 苏州市分子诊断与治疗技术重点实验室, 江苏 苏州 215163

2 苏州大学生命科学学院, 江苏 苏州 215006

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. 生物工程学报, 2013, 29(2): 235–242.

Meng QL, Zhang BB, Zhang C. Novel qPCR strategy for quantification of recombinant adeno-associated virus serotype 2 vector genome-titer. Chin J Biotech, 2013, 29(2): 235–242.

摘要: 腺相关病毒 (Adeno-associated virus, AAV) 在基因治疗应用中具有很多优势, 但是其生物学滴度的测定仍很繁琐, 不同实验室使用各自的方法和参照, 这些都影响了重组腺相关病毒 (rAAV) 载体在临床前和临床上的应用。反向末端重复序列 (Inverted terminal repeats, ITR) 是重组腺相关病毒载体中不可或缺的顺式作用元件, 针对 ITR2 以及 ITR2-CMV 设计的 qPCR 检测方法可以快速、准确地得到 rAAV2 的基因组滴度, 由于该方法可以广泛适用, 因此对推动 AAV 滴度检测的标准化有重要意义。

关键词: 腺相关病毒, 基因治疗, 反向末端重复序列, 荧光定量 PCR

Novel qPCR strategy for quantification of recombinant adeno-associated virus serotype 2 vector genome-titer

Qinglin Meng¹, Binbin Zhang², and Chun Zhang¹

1 Suzhou Municipal Key Laboratory of Molecular Diagnostics and Therapeutics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, Jiangsu, China

2 College of Life Science, Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China

Abstract: Adeno-associated virus (AAV) has many advantages for gene therapy over other vector systems. However, after the production of recombinant AAV (Raav) vectors, the biological titration of rAAV stocks is still cumbersome. Different investigators used laboratory-specific methods or internal reference standards that may limit preclinical and clinical applications. The inverted terminal repeats (ITR) sequences are the only *cis*-regulated viral elements required for

Received: July 26, 2012; **Accepted:** December 5, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30970880), Suzhou Science and Technology Committee (No. ZXY2012005).

Corresponding author: Chun Zhang. Tel/Fax: +86-512-6958-8327; E-mail: chunzhang@sibet.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 30970880), 苏州市科技局项目 (No. ZXY2012005) 资助。

rAAV packaging and remain within viral vector genomes. ITR is the excellent target sequences for qPCR quantification of rAAV titer. In this study, we developed a novel qPCR strategy to quantify rAAVs' vector genome titer via targeting the ITR2 or ITR2-CMV element. In conclusion, the method is fast and accurate for the titration of rAAV2-derived vector genomes. It will promote the standardization of rAAV titration in the future.

Keywords: adeno-associated virus, gene therapy, inverted terminal repeats, real-time PCR

腺相关病毒 (AAV) 是目前很受欢迎的用于人类基因治疗的载体之一, 过去几年, 重组腺相关病毒 (rAAV) 载体作为转基因工具已经在先天遗传性疾病^[1]、神经退行性疾病^[2-3]、癌症^[4]以及干细胞^[5]的研究中取得令人惊喜的成就, 具有非常好的应用前景^[6-7]。尽管如此, rAAV 载体真正用于基因治疗仍面临不少阻碍, 例如其制备、检定的标准化工作滞后, rAAV 滴度的测定有不同的方法和内参, 不同研究者所使用的 rAAV 剂量由于缺少参比标准无法归一化处理^[8]。在此, 我们提出一个普遍适用的定量检测 rAAV 基因组滴度 (Vector genome titer) 的 qPCR 方法。

1 材料与方法

1.1 质粒

采用 pTR-UF11^[9] (MBA-331; ATCC) 作为标准质粒, 其 ITR 序列来自 AAV2 基因组; pTR-UF11 和 pDG^[10]共转染 AAV-293 细胞, 可制备表达 GFP 的 rAAV 载体^[11]。

1.2 引物和探针

扩增 AAV2 3'-ITR 序列的引物 (qITR2-F: 5'-CGGCCTCAGTGAGCGA-3', qITR2-R: 5'-AGGAACCCCTAGTGATG-3', PCR 产物大小 63 bp), 探针 (ITR2 probe: 5'-FAM-CACTCCCTCTCTGC GCGC-BHQ1-3') (如图 1A 所示)。扩增 5'-ITR 及外源 CMV 启动子区域的引物 (qITR2-CMV-Lp:

5'-GAGTGGCCAACTCCATCACT-3', qITR2-CMV-Rp: 5'-TTGGCGTTACTATGGGAACAT-3', PCR 产物大小 207 bp), 探针 (ITR2-CMV probe: 5'-FAM-CCATATATGGAGTTCGCGT-BHQ1-3') (如图 1B 所示)。引物和探针由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 定性 PCR 分析

在 Mastercycler 梯度 PCR 仪中进行, 索莱宝 Taq 酶系统 (含 Buffer, dNTPs): 20 μ L 体系含 5~10 ng 模板 (pTR-UF11), 200 nmol/L 引物。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 裂解 30 s, 50 $^{\circ}$ C~65 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个反应循环。

1.4 定量 PCR 分析

在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行, 使用天根 RealMaster Mix (probe, BRYT Green) 试剂盒: 25 μ L 体系, 1 μ L 模板, 200 nmol/L qITR2-F, 100 nmol/L qITR2-R, 100 nmol/L ITR2 probe。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 40 s, 40 个反应循环。

1.5 rAAV2 酶联免疫吸附检测 (ELISA)

使用 AAV2 Titration ELISA (ARP No: PRATV, American Research Products Inc.) 试剂盒, 标准品减半稀释到 10^7 ~ 10^9 , 病毒原液适量稀释至该范围, 按照说明书操作, 酶标仪读取 OD_{450} , 通过标准曲线定量 rAAV2 病毒粒子滴度 (Particles/mL)。

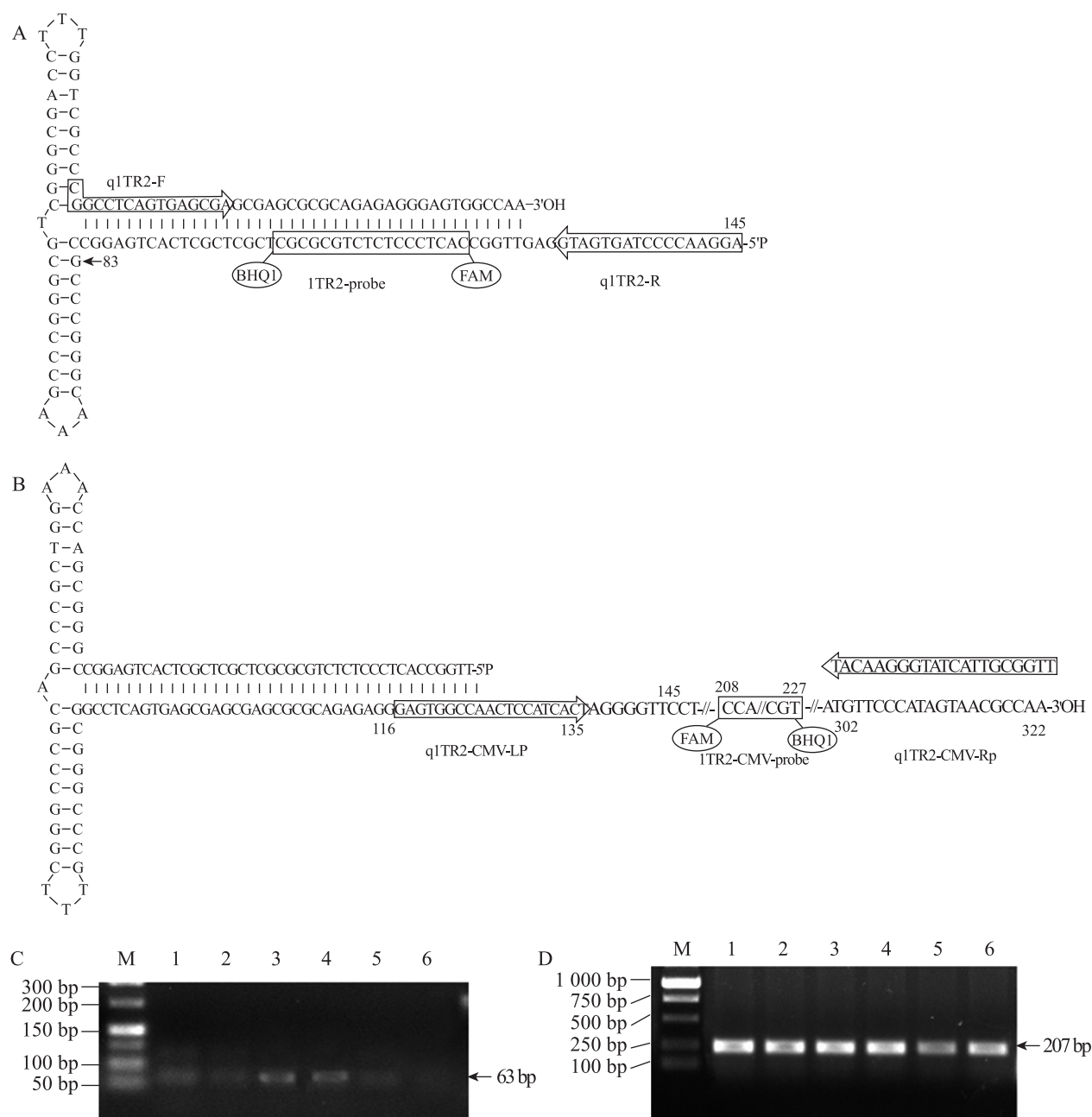


图 1 ITR2、ITR2-CMV 引物和探针设计及 PCR 扩增结果 (A: ITR2 引物和探针的设计, B: ITR2-CMV 引物和探针的设计, C: ITR2 的 PCR 扩增结果, D: ITR2-CMV 的 PCR 扩增结果)

Fig. 1 Diagram of ITR2, ITR2-CMV primers and PCR results. (A) Design of ITR2 primers and probe. (B) Design of ITR2-CMV primers and probe. (C) PCR amplification results of ITR2. (D) PCR amplification results of ITR2-CMV. M: DNA marker; 1: 50 °C; 2: 54.4 °C; 3: 56.5 °C; 4: 60.2 °C; 5: 62.1 °C; 6: 65.5 °C.

1.6 rAAV2 转染检测 (Transduction assay)

参照 Grieger 等的报道并做些改动^[12]: 在 96 孔板中接种 1×10^4 cell/孔 HEK 293 细胞, 37°C 、5% CO_2 培养 24 h; 取 10 μL 病毒原液按 10^N ($N=1,2,3,\dots,7,8$) 梯度稀释, 然后分别取 10 μL 加入各自细胞孔中; 3 h 后更换新鲜培养液并加入丁酸钠至 50 mmol/L; 24 h 后荧光显微镜检查, 在最高稀释梯度 N 的孔中计数绿色荧光细胞数目 m ($m < 10$), rAAV2 的转染滴度: $m \times 10^{N+2}$ TU/mL。

2 结果

2.1 PCR 特异扩增 ITR2 与 ITR2-CMV

图 1C 是 ITR2 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳的结果, 退火温度在 56°C ~ 60°C 之间扩增特异性较好, 但有非特异性扩增存在。图 1D 是 ITR2-CMV 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳的结果, 显示这对引物有很好的特异性和适应性。

2.2 qPCR 定量 ITR2 拷贝数

提取 pTR-UF11 作为质粒标准品, NanoDrop 2000 微量检测浓度, 质粒的拷贝数计算: 拷贝数 (Copies/ μL) = 浓度 (ng/ μL) $\times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}$ (阿伏伽德罗常数) / 分子量 (碱基对数 bp $\times 648$), 倍比稀释到 10^6 、 10^5 、 10^4 和 10^3 , 以此为模板, 3 个重复孔, qPCR 结果显示有很好的扩增曲线 (图 2A), 线性相关系数 $R^2=0.998$, 扩增效率 $\text{Eff}\%=99.9\%$ (图 2B)。以 10^8 、 10^7 、 10^6 和 10^5 浓度的质粒作标准曲线计算 rAAV 的基因组滴度 (原液和原液稀释 10^3 倍作模板, 2 个重复), 结果如图 2C~D 所示, rAAV 原液的滴度是 7×10^6 GC/ μL , 稀释 1 000

倍后, 滴度分别是 3.5×10^3 GC/ μL 与 5×10^3 GC/ μL 。

2.3 qPCR 定量 ITR2-CMV 的拷贝数

探针法检测 ITR2-CMV 与检测 ITR2 结果差异小, 引物特异性较强, 故考察 SYBR Green 方法检测 ITR2-CMV 的效果。质粒标准品倍比稀释 10^9 、 10^8 、 10^7 和 10^6 , 扩增曲线见图 3A, 标准曲线见图 3B, $R^2=0.997$, $\text{Eff}\%=103\%$, 溶解曲线显示产物特异如图 3C 所示。相同的实验检测 rAAV 原液的滴度为 3×10^6 GC/ μL , 与用探针检测 ITR2 的结果类似 (图 3D~F), 说明用 SYBR Green 法检测 ITR2-CMV 也有很好的效果。

2.4 三种 rAAV2 定量方法的比较

ELISA 和转染实验两种方法检测 rAAV2 的滴度, 并和 qPCR 定量 ITR2 的结果进行比较。如表 1 所示, ELISA 检测的除了完整病毒颗粒外, 还包括病毒空壳及不完整衣壳, 其数值大于基因组拷贝数, 两者比值 P/GC 为 59.6, 它体现病毒包装制备过程是否优化; 基因组拷贝数与转染滴度的比值 GC/TU 是 91.2, 它反映病毒对细胞的亲嗜性、转染能力和表达能力等。

表 1 qPCR、ELISA、Transduction assay 三种方法定量 rAAV2 滴度

Table 1 rAAV2 viral stock titer estimates via qPCR, ELISA, Transduction assay

Titer units (method)	$\bar{x} \pm s$
GC/mL (qPCR)	$5.2 \pm 1.8 \times 10^9$
P/mL (ELISA)	$3.1 \pm 2.4 \times 10^{11}$
TU/mL (Transduction assay)	$5.7 \pm 3.2 \times 10^7$

GC: genome copies; P: particles; TU: transducing units.

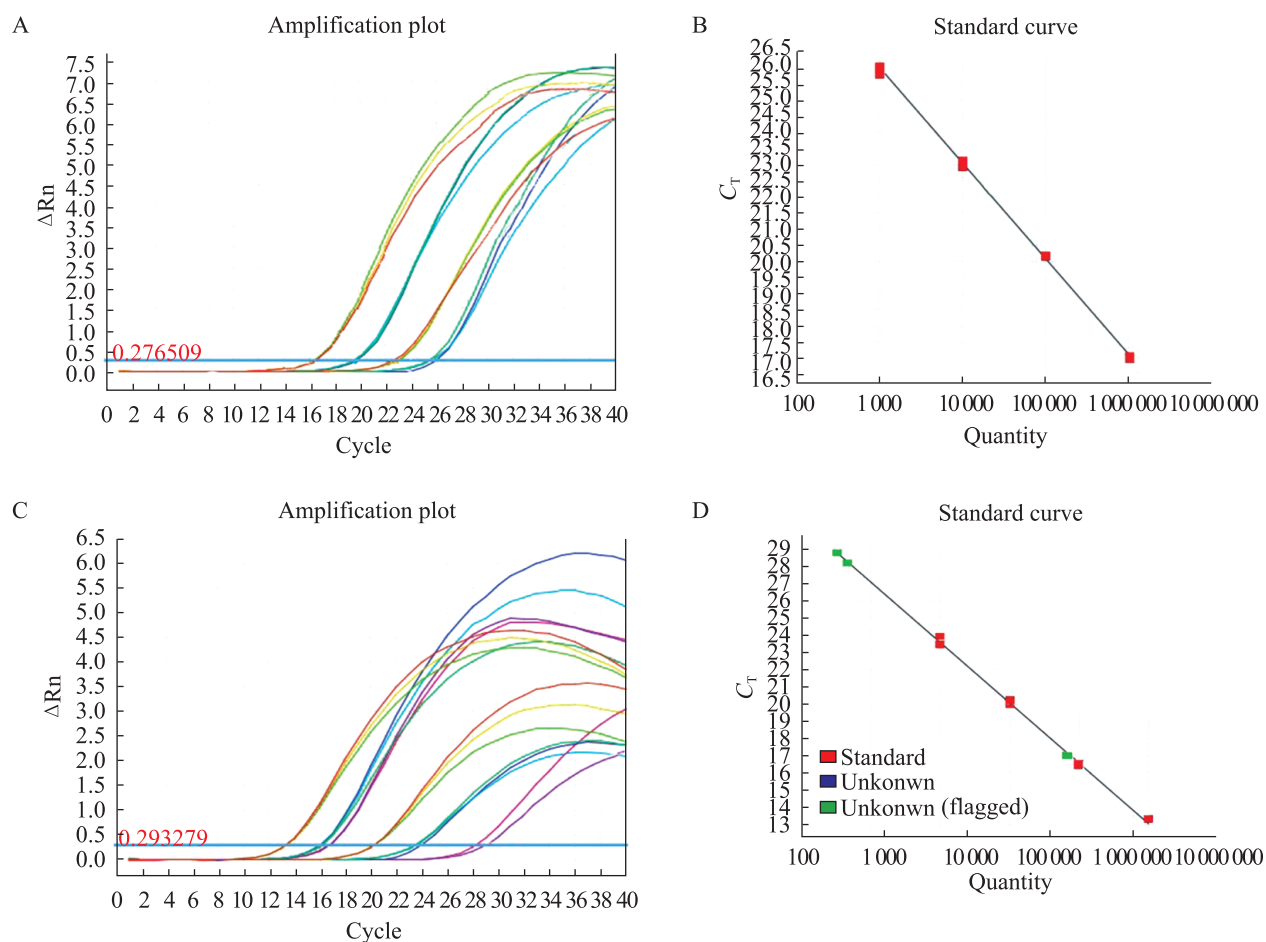


图 2 qPCR 检测 ITR2 的扩增曲线和标准曲线 (A: 质粒 ITR2 的扩增曲线, B: 质粒的标准曲线, C: 质粒与病毒样品 ITR2 的扩增曲线, D: 质粒的标准曲线及病毒样品定量)

Fig. 2 Performance of qPCR in quantification with ITR2 primers and probe. (A) Amplification plot of ITR2 for plasmid standard specimens. (B) Standard curve of plasmid standards. (C) Amplification plot of ITR2 for plasmid standard and viral specimens. (D) Standard curve of plasmid standards and quantification of viral specimens.

3 讨论

腺相关病毒是微小的单链 DNA 依赖性病毒, 基因组结构简单, *Rep* 和 *Cap* 基因在重组中可替换成目的基因及调控元件^[13], 两端 ITR 序列 (145 nt) 则是不可缺少的顺式作用元件^[14-15]。ITR 序列会自动形成紧密的“T 形”二级结构, PCR 难以扩增全序列, 因此很少被考虑作为 qPCR 检

测的靶标。ITR 序列的茎干区域 (A+D region) 只有 61 nt 长度^[16], 其中的 Rep 蛋白结合位点序列 (Rep-binding element, RBE) 是 AAV 的特征序列^[17], 在不同血清型 AAV 中有进化差异, 我们正是取其中一段作为 ITR2 检测探针^[18]。CMV 启动子由于在重组真核表达中常常被用到, 很少单独作为 qPCR 检测靶标, 但是联合 ITR 序列后作为靶标有很强的特异性。

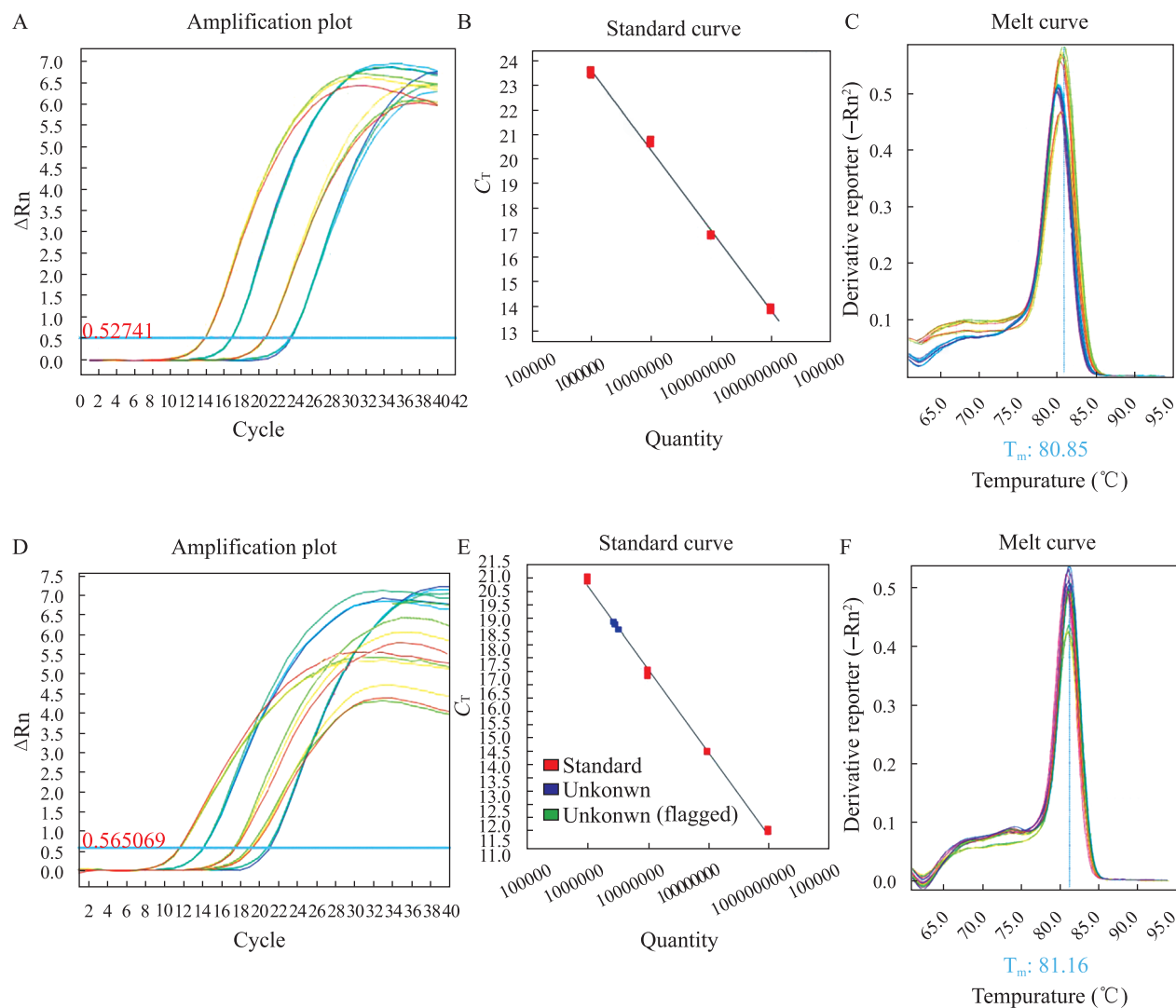


图3 qPCR检测ITR2-CMV的扩增曲线、标准曲线和溶解曲线 (A: 质粒ITR2-CMV的扩增曲线, B: 质粒的标准曲线, C: 质粒ITR2-CMV的溶解曲线, D: 质粒与病毒样品ITR2-CMV的扩增曲线, E: 质粒的标准曲线及病毒样品定量, F: 质粒与病毒样品ITR2-CMV的溶解曲线)

Fig. 3 Performance of qPCR in quantification with ITR2-CMV primers. (A) Amplification plot of ITR2-CMV for plasmid standard specimens. (B) Standard curve of plasmid standards. (C) Melt curve of ITR2-CMV for plasmid standards. (D) Amplification plot of ITR2-CMV for plasmid standard and viral specimens, E: Standard curve of plasmid standards and quantification of viral specimens. (F) Melt curve of ITR2-CMV for plasmid standards and viral specimens.

目前, 定量 AAV 滴度的方法主要有: qPCR 和 Dot-Blot 测基因组滴度^[19-20], ELISA 测病毒粒子滴度^[21], 荧光显微镜或流式细胞仪测转染滴度^[22], ICA (Infectious center assay) 法测感染滴度^[23]。在文献报道中大多数都是 qPCR 定量病毒基因组拷贝数, 其方法简单、快速、结果精确; ELISA 法比较昂贵且结果含较多“空值”, 一般多用在鉴定 rAAV 特征或优化制备方法上; 转染效率的测定则易受到病毒载体、细胞株选择、培养条件等因素的影响; 由于单一的 rAAV 感染细胞不容易形成病变, 感染活性 TCID₅₀ 的测定需要 rAAV 与辅助病毒 (野生型腺病毒) 共同感染含 *Rep* 与 *Cap* 基因的细胞株 (HeLaRC32)^[24], 并通过 qPCR 检测细胞基因组 DNA 中 rAAV 的拷贝数, 过程比较繁琐、费时费力, 尚未广泛应用。

为了推动不同实验室的 AAV 质控体系的统一和标准化, 美国 FDA、NIH 等机构鼓励并支持成立腺相关病毒参比标准事务委员会 (AAV Reference Standard Working Group, AAVRSWG), 该委员会推荐 ELISA、qPCR、TCID₅₀ (qPCR 和流式细胞术读结果) 一起使用作为 rAAV 检定的测量方法^[25]。现在, 该委员会和 ATCC 推出了 AAV2 的标准品 (AAV2 RSM), 部分实验室已经协作开展标定研究, 据其报道 AAV2 RSM 制备的病毒载体 P/GC 值为 28, GC/TU 值是 64.4^[26], 这与我们的结果也是相近的。

由于 AAV 能携带的外源基因容量有限, 在构建 rAAV 载体时一般只会保留两端的 ITR 序列, 因此我们报道的 qPCR 方法在 rAAV 滴度测定的标准化方法中具有广泛应用的价值。

REFERENCES

- [1] Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*, 2011, 365(25): 2357–2365.
- [2] Decressac M, Mattsson B, Lundblad M, et al. Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of α -synuclein in midbrain dopamine neurons. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(3): 939–953.
- [3] Mandel RJ. CERE-110, an adeno-associated virus-based gene delivery vector expressing human nerve growth factor for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Opin Mol Ther*, 2010, 12(2): 240–247.
- [4] Wang YG, He LF, He GQ, et al. Enhanced antitumor effect of combining interferon beta with TRAIL mediated by tumor-targeting adeno-associated virus vector on A549 lung cancer xenograft. *Chin J Biotech*, 2010, 26(6): 780–788 (in Chinese).
王毅刚, 何凌峰, 何国清, 等. 肿瘤靶向腺相关病毒携带干扰素 β 和 TRAIL 对 A549 肺癌移植瘤的增强治疗效应. *生物工程学报*, 2010, 26(6): 780–788.
- [5] Santat L, Paz H, Wong C, et al. Recombinant AAV2 transduction of primitive human hematopoietic stem cells capable of serial engraftment in immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(31): 11053–11058.
- [6] Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(5): 341–355.
- [7] Wang QZ, Lü YH, Xiao WD, et al. The clinical researches of recombinant adeno-associated vector. *China Biotechnol*, 2010, 30(1): 73–79 (in Chinese).
王启钊, 吕颖慧, 肖卫东, 等. 重组腺相关病毒载体临床实验研究. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(1): 73–79.
- [8] Moullier P, Snyder RO. International efforts for

- recombinant adeno-associated viral vector reference standards. *Mol Ther*, 2008, 16: 1185–1188.
- [9] Burger C, Gorbatyuk OS, Velardo MJ, et al. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system. *Mol Ther*, 2004, 10: 302–317.
- [10] Grimm D, Kern A, Rittner K, et al. Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther*, 1998, 9: 2745–2760.
- [11] Zhang C, Yadava P, Hughes J. Polyethylenimine strategies for plasmid delivery to brain-derived cells. *Methods*, 2004, 33: 144–150.
- [12] Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc*, 2006, 1: 1412–1428.
- [13] Hermonat PL, Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81(20): 6466–6470.
- [14] Lusby E, Fife KH, Berns KI. Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J Virol*, 1980, 34(2): 402–409.
- [15] Xiao X, Xiao W, Li J, et al. A novel 165-base-pair terminal repeat sequence is the sole cis requirement for the adeno-associated virus life cycle. *J Virol*, 1997, 71(2): 941–948.
- [16] Im DS, Muzyczka N. Factors that bind to adeno-associated virus terminal repeats. *J Virol*, 1989, 63(7): 3095–3104.
- [17] Yan Z, Zak R, Zhang Y, et al. Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes. *J Virol*, 2005, 79: 364–379.
- [18] Feng D, Chen J, Yue Y, et al. A 16bp Rep binding element is sufficient for mediating rep-dependent integration into AAVS1. *J Mol Biol*, 2006, 358(1): 38–45.
- [19] Aurnhammer C, Haase M, Muether N, et al. Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. *Hum Gene Ther Methods*, 2012, 23: 18–28.
- [20] Chen Q, Li ZB, Zeng ZJ, et al. The construction of recombinant AAV vector expressing HSVtk gene controlled by Tet-On and the detection of its activity. *Chin J Biotech*, 2005, 21(3): 360–364 (in Chinese).
陈迁, 李子博, 曾赵军, 等. Tet-On 调控 HSVtk 表达的重组腺相关病毒载体的构建和感染活性的检测. *生物工程学报*, 2005, 21(3): 360–364.
- [21] Grimm D, Kern A, Pawlita M, et al. Titration of AAV-2 particles via a novel capsid ELISA: packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2. *Gene Ther*, 1999, 6: 1322–1330.
- [22] Rohr UP, Heyd F, Neukirchen J, et al. Quantitative real-time PCR for titration of infectious recombinant AAV-2 particles. *J Virol Methods*, 2005, 127(1): 40–45.
- [23] Zen Z, Espinoza Y, Bleu T, et al. Infectious titer assay for adeno-associated virus vectors with sensitivity sufficient to detect single infectious events. *Hum Gene Ther*, 2004, 15: 709–715.
- [24] Chadeuf G, Favre D, Tessier J, et al. Efficient recombinant adeno-associated virus production by a stable rep-cap HeLa cell line correlates with adenovirus-induced amplification of the integrated rep-cap genome. *J Gene Med*, 2000, 2: 260–268.
- [25] Snyder RO, Flotte TR. Production of clinical-grade recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13: 418–423.
- [26] Lock M, McGorray S, Auricchio A, et al. Characterization of a recombinant adeno-associated virus type 2 reference standard material. *Hum Gene Ther*, 2010, 21: 1273–1285.

(本文责编 郝丽芳)