



生物实验室

腺相关病毒载体工程毒株精细化纯化

高强* 宁毅 熊涛 胡珏 聂娟 李玲 肖荣

湖南中医药大学 湖南 长沙 410208

摘要: 【背景】大量制备高纯度的重组腺相关病毒(Recombinant Adeno-Associated Virus, rAAV), 是以腺相关病毒(AAV)为投递载体的基因靶向治疗或基因工程药物研发过程中需要解决的重要问题。【目的】利用层析柱法大量纯化质粒和 rAAV 细胞培养液, 以获得高纯度的 rAAV 颗粒。

【方法】对组装 rAAV 的 3 种质粒用 HiPrepTM10 Sepharose 6FF 和 HiTrap PlasmidSelect Xtra 凝胶层析柱纯化, 目的是得到组装 AAV 的超螺旋质粒 DNA, 然后对组装 rAAV 过程中的 AAV-293 细胞培养方法进行优化, 组装成功病毒后, 再对收集到的细胞提取液用 HiLoadTM10Q 和 HiLoadTM10SP 阴阳离子交换层析柱纯化, 最后用纯化浓缩后的 rAAV 感染 HT1080 细胞, 通过流式细胞仪检测荧光表达细胞数, 计算浓缩后活病毒感染滴度。【结果】HiPrep 和 HiTrap 层析柱纯化后得到大量高纯度的超螺旋质粒 DNA, 组装病毒后, 用 HiLoad 柱纯化获得大量高纯度的 rAAV 颗粒, 通过测定, rAAV 基因组滴度达到 $(2.46 \pm 0.37) \times 10^{12}$ TCID₅₀/mL ($MOI = 1.0 \times 10^4$)。【结论】通过一系列精细化组装纯化制备出高纯度、高滴度 rAAV 病毒颗粒。

关键词: 腺相关病毒, AAV-293 细胞, 层析柱, 纯化

Refined purification of adeno-associated virus vector-engineered strain

GAO Qiang* NING Yi XIONG Tao HU Jue NIE Juan LI Ling XIAO Rong

Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

Abstract: [Background] In gene targeted therapy and gene engineering drug development with adeno-associated virus (AAV) as the delivery vector, the challenges of the large-scale preparation of highly purified recombinant AAV (rAAV) should be solved. [Objective] The goal of this study was to obtain highly purified rAAV particles by purification of plasmids and rAAV cell culture medium. [Methods]

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81803964); Project of Hunan University of Traditional Chinese Medicine (2019XJJJ026, 99821001011); Project of Hunan Provincial Department of Education (20C1431); Project of Hunan Health and Family Planning Commission (C2017027); Hunan Provincial “Domestic First-Class Cultivation Discipline” Basic Open Foundation of Chinese and Western Medicine Combination (2020ZXYJH03); Key Discipline “Preclinical Medicine” Foundation of Hunan University of Traditional Chinese Medicine

*Corresponding author: Tel: 86-731-88458207; E-mail: gaoqiang021@126.com

Received: 22-02-2021; Accepted: 28-04-2021; Published online: 14-07-2021

基金项目: 国家自然科学基金(81803964); 湖南中医药大学项目(2019XJJJ026, 99821001011); 湖南省教育厅项目(20C1431); 湖南省卫生计生委项目(C2017027); 湖南省“国内一流培育学科”中西医结合基础开放基金(2020ZXYJH03); 湖南中医药大学校级重点学科“基础医学”资助项目

*通信作者: Tel: 0731-88458207; E-mail: gaoqiang021@126.com

收稿日期: 2021-02-22; 接受日期: 2021-04-28; 网络首发日期: 2021-07-14

HiPrep™10 Sepharose 6FF and HiTrap PlasmidSelect Xtra gel chromatography columns were used to purify three rAAV plasmids. The study sought to obtain super helical DNA plasmids and optimize the culture of AAV-293 cells in the assembly process. After successful assembly, the virus extract was purified using HiLoad™10Q and HiLoad™10SP cation exchange columns. HT1080 cells were infected with purified and concentrated rAAV. Flow cytometry was used to enumerate the fluorescent cells to detect the number of live virus and calculate the titer of live virus after concentration. **[Results]** After HiPrep and HiTrap chromatography columns purification, many copies of highly purified super helical plasmid DNA were obtained. After virus assembly, many highly purified rAAV particles were obtained by cation exchange chromatography. The genome titer of rAAV ($TCID_{50}/mL$) reached $(2.46 \pm 0.37) \times 10^{12}$ (multiplicity of infection of 1.0×10^4). **[Conclusion]** A high titer of pure rAAV was prepared by a series of assembly refinements and purification.

Keywords: adeno-associated virus, AAV-293 cell, chromatographic column, purification

腺相关病毒(Adeno-Associated Virus, AAV)属微小病毒科,是基因组为约 4.8 kb 的单链 DNA。作为候选的基因转移载体之一,其具有安全性好、宿主范围广、免疫原性低、可同时感染分裂期与非分裂期细胞、携带的基因可在宿主细胞内长期表达等优点,近年来成为基因治疗研究的热点载体之一^[1],并且部分以 AAV 为载体的基因治疗研究已进入临床试验阶段和临床治疗阶段^[2-3]。

本研究使用第 4 代 AAV (即 AAV2)病毒,病毒的组成元件被拆分,构建成 3 种不同的质粒 pHelper、pRC 和 pMCS,复制基因 E1 另外构建在包装细胞 AAV-293 中,因此病毒具有高安全性。然而 AAV 作为基因工程药物投递载体时,在构建好重组质粒后,要解决的首要问题就是包装出大量、高纯度、高滴度的 rAAV 病毒颗粒,但目前国内所用的质粒纯化和病毒纯化方法主要是有机溶剂萃取与离心沉淀法^[4-5],其结果纯度不高、得率较低,因此亟需探索出高质量、高纯度的质粒和病毒纯化新方法,以便组装出有效病毒。本实验采用不同的层析柱分别精细纯化质粒和组装后的病毒颗粒,同时优化了 AAV 病毒颗粒包装过程,最终得到了相对高纯度、高滴度的病毒颗粒。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

含 pAAV-Helper、pAAV-RC 和 pAAV-MCS 这 3 种质粒的 AAV Helper-free 系统,Stratagene 公司;

大肠杆菌 GT116 菌株和 HT1080 细胞,Stratagene 公司;293 细胞(含 E1 基因),中科院上海典型培养物保存中心;pAAV-EGFP 质粒(由 pAAV-MCS 构建,携带 EGFP-myc-6×His 融合基因),由本实验室构建并验证正确;其他各种酶类,TaKaRa 公司;培养细胞的 DMEM 培养基等,Gibco 公司。

HiPrep™10 Sepharose 6FF 和 HiTrap™ PlasmidSelect Xtra 质粒纯化凝胶层析柱、HiLoad™10Q 和 HiLoad™10SP 病毒纯化阴阳离子交换层析柱、层析系统,GE 公司;流式细胞仪,Beckman Coulter 公司;倒置荧光显微镜,Olympus 公司;透射电子显微镜,JEOL 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒大量提取与纯化

采用碱裂解法从培养的 GT116 菌株中大量提取质粒 pAAV-EGFP、pAAV-RC 和 pAAV-Helper DNA。将提取液进行超滤浓缩后换液,换液后经 ÄKTAexplorer100 型层析系统通过 HiPrep™10 Sepharose 6FF 凝胶层析柱进行第 1 步分离纯化,除去样品中的 RNA 等杂质,上样量为 30%柱体积(柱体积 53 mL),进行 260 nm 紫外光检测,设定流速 4 mL/min 的流动相线性梯度,收集阈值 0.02 AU 吸收峰,主要除去 RNA 和粗蛋白;第 2 步,纯化收集样采用 HiTrap™ PlasmidSelect Xtra 亲和层析柱捕获完整的超螺旋质粒,筛除非超螺旋质粒等杂质,每 3 次柱纯化后收集样合并在一起进

行第2步纯化, 设定流速 4 mL/min 的流动相线性梯度, 收集阈值 0.05 AU, 除去非超螺旋 DNA; 第3步, 含目的质粒的洗脱收集液再次经由 HiPrep™10 Sepharose 6FF 凝胶层析柱进行脱盐处理, 改用 ddH₂O 洗脱, 收集 260 nm 峰流出物, -50 °C、0.05 Pa 条件下冷冻干燥, 每次上样量最终浓缩成干粉, 加入 1 mL 2×TE, -20 °C 保存备用。质粒纯化前和纯化后分别进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度。

1.2.2 质粒转染 AAV-293 细胞组装 rAAV 病毒

质粒转染采用磷酸钙共沉淀法^[6]。转染前 24 h 于 10 cm 培养皿中接种 2×10^6 个 AAV-293 细胞, 待生长汇合率约 60%–70% 时开始转染。转染时将 pAAV-RC、pAAV-Helper 和 pAAV-EGFP 这 3 种质粒各 10 µg 一起轻柔混合在 1 mL 0.3 mol/L CaCl₂ 溶液中, 再将混合物滴加到 1 mL 2×HBS (280 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L Na₂HPO₄, 50 mmol/L HELPS) 中混合均匀, 最后将质粒-CaCl₂-HBS 形成的聚合物加入培养皿中并摇匀, 6 h 后更换新鲜培养基。同样的转染方法同时平行组装多个培养皿, 37 °C、5% 二氧化碳和饱和湿度条件下培养 66–72 h, 期间每隔 24 h 更换新鲜培养基, 收集换下的培养基(含有包装出的 rAAV 病毒颗粒)备用。

1.2.3 AAV 病毒液收集与纯化

转染 66–72 h 后收集病毒颗粒。用无菌玻璃刮铲刮下培养皿中的 AAV-293 细胞, 收集细胞与培养液, 依次置于 37 °C 水浴锅、干冰加酒精组成的 -70 °C 低温中反复冻融 4 次, 裂解细胞。4 °C、10 000×g 离心 10 min, 收集上清液。采用 Millipore 公司 15 mL 标准分子量 100 kD 超滤离心管 Centrplus100 于 4 000×g 离心 5 min, 收集 rAAV 病毒液, 每 10 cm 培养皿大约收集 10 mL 细胞裂解液。

浓缩后的细胞裂解液和培养过程中换下的培养基一起用 ÄKTAexplorer100 型层析系统通过两步阴离子交换层析法进行精细纯化^[7-9]。第1步采用 HiLoad™10SP 阳离子交换柱进行病毒的捕获, 上样体积为 50 mL 病毒培养上清液(用 2 倍上

样缓冲液稀释样品), 设定柱流速 3.0 mL/min, 通过 4 倍柱体积洗脱液进行线性梯度洗脱, 除去蛋白杂质; 第2步, 将第1步纯化收集液采用 HiLoad™10Q 阴离子交换柱进行病毒捕获, 上样体积为 50 mL (用 2 倍上样缓冲液稀释样品), 设定柱流速 2.5 mL/min, 通过 5 倍柱体积洗脱液进行线性梯度洗脱; 第3步, 将收集到的目的病毒液采用 HiPrep™10 Sepharose 6FF 凝胶层析柱进行脱盐处理, 改用 ddH₂O 洗脱, 收集 280 nm 峰流出物, 收集的病毒液再由超滤管 Centrplus100 重新冷冻真空干燥浓缩成干粉, 加入 1 mL 2×TE, 取 10 µL 电镜观察病毒颗粒形态及纯度, -70 °C 保存病毒液, 以备进一步实验使用。

1.2.4 rAAV 病毒颗粒纯度、活性、滴度检测及电镜观察

纯化后的 rAAV 病毒经过 HiPrep™10 Sepharose 6FF 分子筛柱检测, 并根据 280 nm 峰是否是单一峰初步鉴定病毒纯度, 并用紫外分光光度计测定 $OD_{260/280}$ 值和纯化后的样品含量。纯化后的 rAAV 感染 HT1080 细胞, 根据 rAAV 携带的绿色荧光表达情况确定纯化后的 rAAV 是否有感染活性。纯化后的病毒液冷冻真空干燥浓缩, 大约每 100 mL 病毒纯化液最终浓缩成 1 mL 病毒液, 用 1×TE 复溶冻干后的病毒, -70 °C 保存备用, 最终大约 $(1-3) \times 10^9$ 个 AAV-293 细胞包装的病毒量, 浓缩成 1 mL 病毒液(1×TE)保存。

纯化后的 rAAV 病毒颗粒感染 HT1080 细胞并常规培养, 大约 72 h 后用胰酶消化, PBS 缓冲液悬浮细胞, 上流式细胞仪, 计数绿色荧光细胞数, 利用 50% 组织细胞感染量 ($TCID_{50}$) 计算病毒滴度。最后利用透射电子显微镜 (Transmission Electron Microscope, TEM) 检查纯化后的 rAAV 病毒形态和颗粒完整性。

2 结果与分析

2.1 质粒准备与纯化

pAAV-Helper 质粒 DNA 通过 HiPrep™10 Sepharose 6FF 和 HiTrap™ PlasmidSelect Xtra 柱纯

化过程见图 1 (pAAV-RC 和 pAAV-EGFP 纯化结果图与 pAAV-Helper 类似, 此处未展示)。过柱 1 时收集第 1 个峰, 第 2 个峰为 RNA 峰(图 1A); 过柱 2 时收集最高峰, 即第 3 峰, 此峰为超螺旋 DNA, 前两峰收集物为非超螺旋 DNA (图 1B)。纯化前后

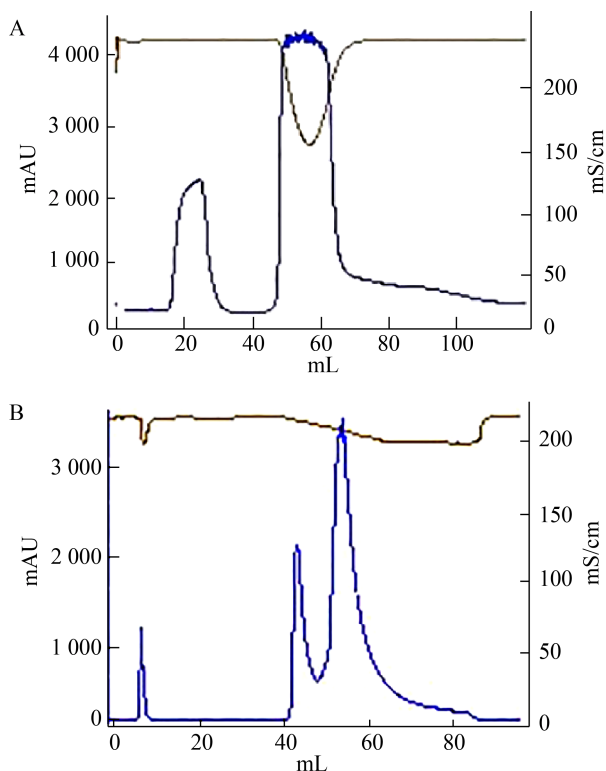


图 1 pAAV-Helper 质粒通过 HiPrep™10 Sepharose 6FF 柱的洗脱曲线(A)和 pAAV-Helper 质粒通过 HiTrap™ PlasmidSelect Xtra 柱的洗脱曲线(B)

Figure 1 The elution curve of pAAV-Helpe plasmid on HiPrep™10 Sepharose 6FF column (A) and the elution curve of pAAV-Helper plasmid on HiTrap™ PlasmidSelect Xtra column (B)

注: A: 紫外线: 260 nm; 流速: 4 mL/min; 缓冲液: 2.0 mol/L (NH₄)₂SO₄+10 mmol/L EDTA+100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5。

B: 紫外线: 260 nm; 流速: 4 mL/min; 上样平衡液: 2.0 mol/L (NH₄)₂SO₄+10 mmol/L EDTA+100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 洗脱液: 0.3 mol/L NaCl+1.7 mol/L (NH₄)₂SO₄+10 mmol/L EDTA+100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5

Note: A: UV: 260 nm; Flow rate: 4 mL/min; Buffers: 2.0 mol/L (NH₄)₂SO₄+10 mmol/L EDTA+100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5. B: UV: 260 nm; Flow rate: 4 mL/min; Loading equilibrium solution: 2.0 mol/L (NH₄)₂SO₄+10 mmol/L EDTA+100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; Eluent: 0.3 mol/L NaCl+1.7 mol/L (NH₄)₂SO₄+10 mmol/L EDTA+100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5

的 3 种质粒经 1%琼脂糖凝胶电泳比较,结果见图 2, 测定 $OD_{260/280}$ 为 1.79 ± 0.06 (标准范围 1.6–1.8), 可见纯化后得到了较高纯度的超螺旋 DNA, 纯化效果很好。

2.2 rAAV 病毒组装

从图 3A 可以看出, 未组装病毒组 AAV-293 细胞形态结构完整, 细胞贴壁生长, 排列有规则, 细胞未发生变圆和脱落。随着病毒组装的进行, AAV-293 细胞形态发生明显变化(CPE 效应, 图 3B), 细胞变圆并呈现大量空泡, 并有少量细胞成片从培养皿上脱落下来, 漂浮在培养基中, 空泡的形成是由于有大量 rAAV 病毒粒子组装后从细胞中释放出来导致细胞坏死。因此, 从组装 rAAV 病毒前后 AAV-293 细胞形态的变化可以初步预测病毒组装成功。

2.3 rAAV 病毒纯化

浓缩后的 rAAV 细胞裂解液纯化过程如图 4 所示。图 4A 是组装 rAAV 后的 AAV-293 细胞裂解液和培养液经由 HiLoad™10SP 阳离子柱纯化后收集 rAAV 的曲线峰图, 经检验, 纯化出的病毒液对应的曲线是第 1 个峰, 也即水平粗黑线标定的区域, 第 1 步纯化出的病毒再经 HiLoad™10Q 阴离子柱

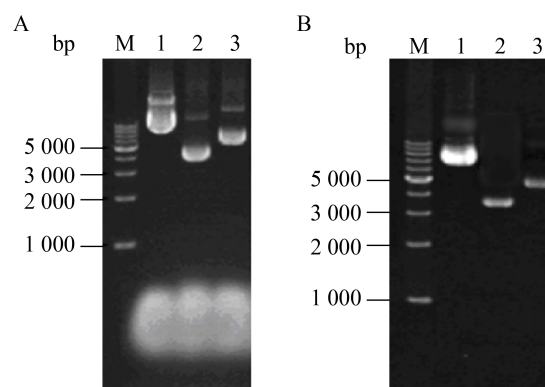


图 2 质粒纯化前的电泳图(A)和纯化后的电泳图(B)

Figure 2 Electrophoretic map of plasmid before purification (A) and electrophoretic map of plasmid after purification (B)

Note: M: 1 kb DNA Ladder Marker; 1: pAAV-Helper; 2: pAAV-RC; 3: pAAV-EGFP

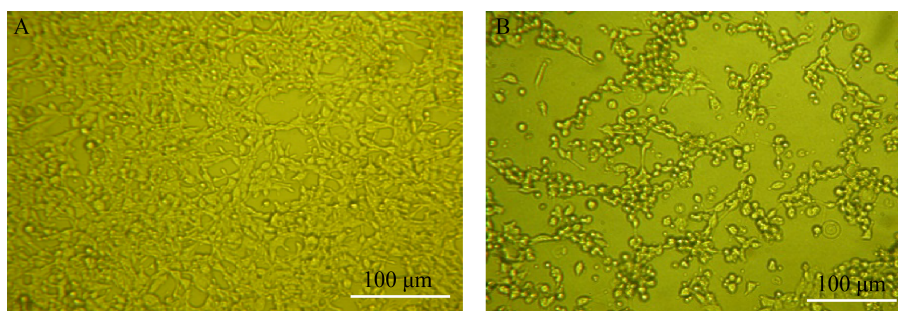


图3 未组装(A)和组装(B) rAAV 72 h 时的 293 细胞(10×)

Figure 3 293 cells with no packaged rAAV (A) and packaged rAAV (B) at 72 h (10×)

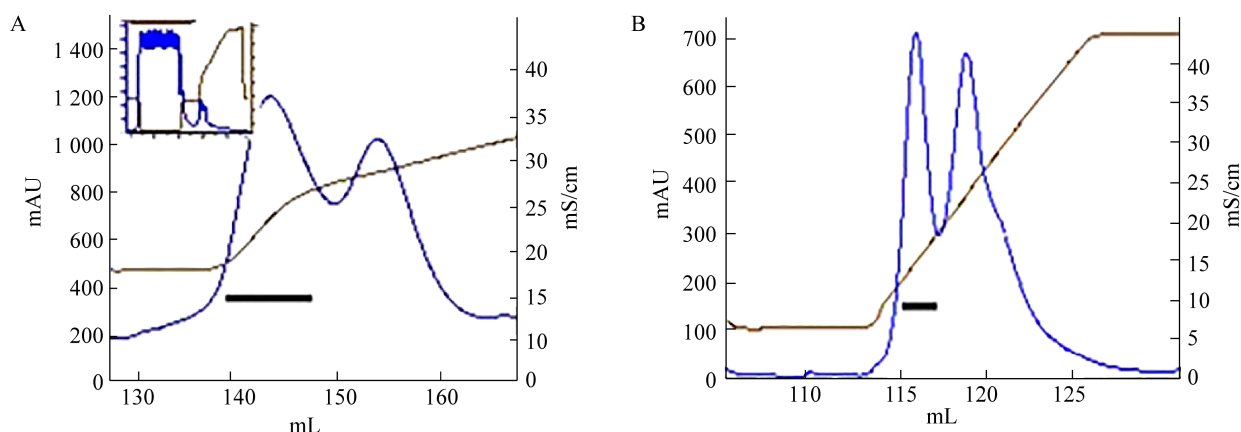


图4 rAAV 病毒液通过 HiLoad™10SP 柱(A)和 HiLoad™10Q 柱(B)的纯化图

Figure 4 Purified graph of rAAV virus by Hiload™10SP column (A) and Hiload™10Q column (B)

注: A: 紫外: 280 nm; 流速: 3 mL/min; 上样平衡液 A: 25 mmol/L Na_2HPO_4 +2 mmol/L MgCl_2 +150 mmol/L NaCl, pH 6.5; 洗脱液 B: 25 mmol/L Na_2HPO_4 +2 mmol/L MgCl_2 +500 mmol/L NaCl, pH 6.5; 线性梯度洗脱液 0–100% B Solution in 3 CV (Column Volume)。B: 紫外: 280 nm; 流速: 3 mL/min; 上样平衡液 A: 20 mmol/L Tris+2 mmol/L MgCl_2 +1 mmol/L CaCl_2 +50 mmol/L NaCl, pH 8.2; 洗脱液 B: 20 mmol/L Tris+2 mmol/L MgCl_2 +1 mmol/L CaCl_2 +500 mmol/L NaCl, pH 8.2; 线性梯度洗脱液 0–100% B Solution, 10 min

Note: A: UV: 280 nm; Flow rate: 3 mL/min; Loading equilibrium solution A: 25 mmol/L Na_2HPO_4 +2 mmol/L MgCl_2 +150 mmol/L NaCl, pH 6.5; Eluent B: 25 mm Na_2HPO_4 +2 mmol/L MgCl_2 +500 mmol/L NaCl, pH 6.5; Linear gradient elution 0–100% B solution in 3 CV (column volumes). B: UV: 280 nm; Flow rate: 3 mL/min; Loading equilibrium solution A: 20 mmol/L Tris+2 mmol/L MgCl_2 +1 mmol/L CaCl_2 +50 mmol/L NaCl, pH 8.2; Eluent B: 20 mmol/L Tris+2 mmol/L MgCl_2 +1 mmol/L CaCl_2 +500 mmol/L NaCl, pH 8.2; Linear gradient elution 0–100% B solution, 10 min

进行第2步纯化,经检验,纯化出的病毒液对应的曲线是第1个峰,即图4B水平粗黑线标定的区域。通过阴离子交换柱两步纯化,得到了纯度高的病毒液。

2.4 rAAV 纯度检测

纯化后的 rAAV 病毒液通过 HiPrep™10

Sephacrose 6FF 凝胶层析柱检测,从图5可以看出只有单一峰,证明纯化出的 rAAV 病毒纯度很高。用微量紫外分光光度计测得纯化后的样品含量超过 100 $\mu\text{g/mL}$, $OD_{260/280}$ 值为 0.59 ± 0.08 (标准范围 0.5–0.7),从含量和纯度指标来看,满足下一步实验的要求。

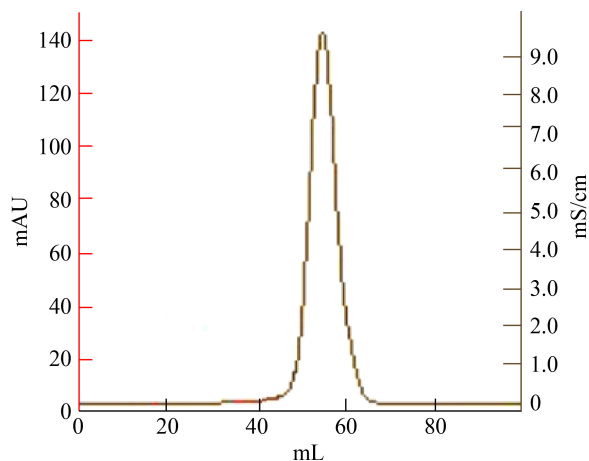


图5 rAAV 病毒检测峰
Figure 5 Detected peak of rAAV virus

2.5 rAAV 病毒颗粒活性检测

浓缩纯化后的 rAAV 感染 HT1080 细胞, 设定每个 HT1080 细胞感染 1.0×10^3 v.g. 病毒粒子, 72 h 后通过荧光显微镜观察, 结果见图 6 (图 6A 为普通光学显微镜观察图, 图 6B 为荧光显微镜观察图)。从荧光显示结果图可以看出组装的 rAAV 能大量表达绿色荧光蛋白, 说明 rAAV 被成功组装并具有感染活性, 能够表达外源基因 EGFP。

2.6 流式细胞仪测定 rAAV 病毒滴度

感染 HT1080 细胞表达荧光后的 rAAV 病毒, 胰酶消化处理, 通过流式细胞仪计数荧光表达数, 利用 50% 组织细胞感染量测定病毒滴度 ($TCID_{50}$),

也可用病毒感染蚀斑计数法 (PFU) 计数病毒感染滴度。浓缩后, 荧光表达细胞占细胞总数 10.18%, 见图 7 (图 7A 为 HT1080 细胞阴性对照组, 图 7B 为阳性组)。根据病毒滴度 $TCID_{50}$ 计算, 得出组装后浓缩纯化后的病毒滴度为 $(2.46 \pm 0.37) \times 10^{12} TCID_{50}/mL$ ($MOI = 1.0 \times 10^4$)。

2.7 rAAV 病毒颗粒的电镜观察

纯化后的 rAAV 病毒通过 TEM 电镜观察, 如图 8 所示, 发现病毒颗粒形态完整, 大小均一, 结构基本未破坏, 可以观察到核蛋白结构, 并且以实心颗粒为主, 很少见空心颗粒, 说明通过 HiLoadTM10Q 柱和 HiLoadTM10SP 柱纯化后 rAAV 病毒颗粒纯度较高, 并且纯化方法对 rAAV 病毒的结构基本无破坏, 纯化达到预期效果, 可以满足下一步实验的要求。

3 讨论与结论

目前基因表达载体和基因工程药物载体主要有非病毒载体和病毒载体两大类^[10], 非病毒载体包括脂质体载体、阳离子高聚物、裸露 DNA、壳聚糖载体、电脉冲导入系统等, 它们主要依赖细胞机制将 DNA 导入细胞, 进而转移至细胞核, 虽然非病毒载体具有操作简便、低毒性、低免疫原性的优点, 但转染效率低和基因的表达时间短限制了它们的应用。病毒载体主要有逆转录病毒载体、腺病

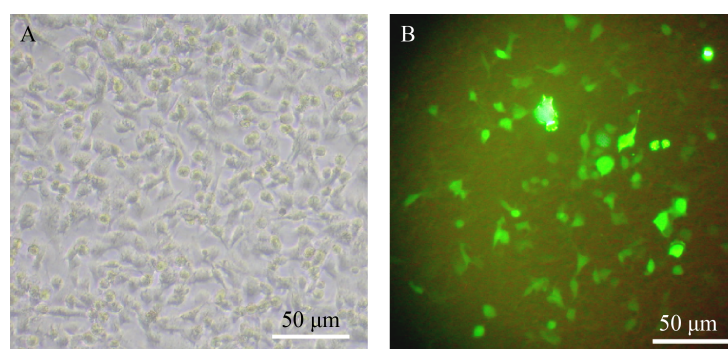


图6 组装 rAAV 后的 HT1080 细胞(A)和 rAAV 感染 HT1080 细胞后的 EGFP 荧光表达图(B)
Figure 6 HT1080 cells after rAAV packaged (A) and fluorescence expression of EGFP in HT1080 cells infected with rAAV (B)

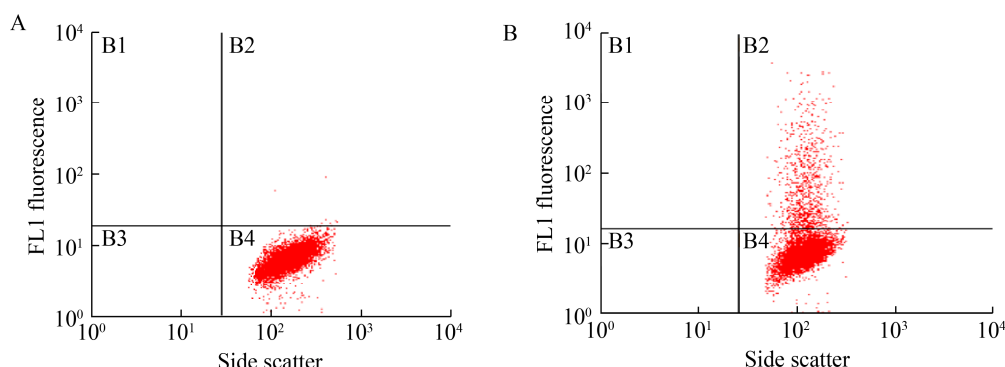


图 7 AAV 感染 HT1080 细胞后的流式图(A)和 rAAV 感染 HT1080 细胞后的荧光表达流式图(B)

Figure 7 Flow cytometry analysis of HT1080 cells infected with AAV (A) and the fluorescence expression of rAAV infected HT1080 cells was analyzed by flow cytometry (B)

注: 区域 B1 代表表达绿色荧光的死细胞; 区域 B2 代表表达绿色荧光的活细胞; 区域 B3 代表不表达绿色荧光的死细胞; 区域 B4 代表不表达绿色荧光的活细胞

Note: Region B1 represents dead cells of green fluorocyte. Region B2 represents living cells of green fluorocyte. Region B3 represents dead cells without green fluorocyte. Region B4 represents living cells without green fluorocyte

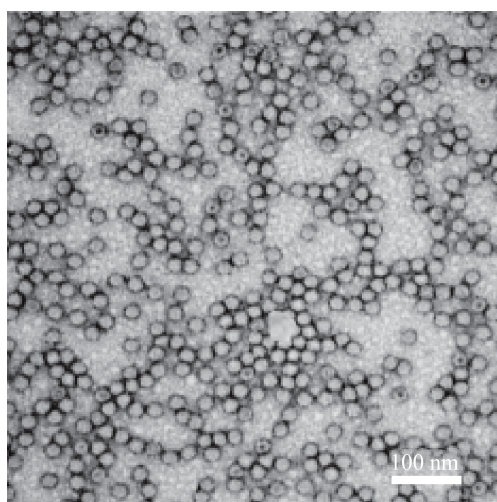


图 8 rAAV 病毒颗粒的 TEM 电镜观察图

Figure 8 TEM observed graph of rAAV virus particles

毒载体、慢病毒载体、腺相关病毒载体(AAV)等。前几种载体有其优点,比如携带基因片段大、转染效率高等,但也存在突出的缺点,比如免疫原性高、安全性低、携带的基因片段不一定能长期表达等,AAV 病毒载体则恰好克服了上述缺点,具有高安全性,目前尚无 AAV 病毒引起的疾病报道,AAV 病毒免疫原性低,不易引起免疫反应。同时由于 AAV 的血清型比较多,可以转染不同类型的细胞,并且

转染的基因一般可长期表达,可能是新一代理想的基因表达载体之一^[11]。

目前鉴定的 AAV 的 13 种血清型中有多种用作与人类相关疾病的基因治疗,特别是在眼部疾病的基因治疗中得到了广泛应用,例如 AAV2、AAV5、AAV8、AAV9 等在青光眼、遗传性视网膜病变、角膜病等疾病的治疗中常作为高效的载体^[12-13], AAV2 常用于 B 型血友病的治疗研究^[14-15]。此外,在听觉障碍基因治疗^[16]、癌症的治疗^[17]、神经退行性疾病如阿尔茨海默病^[18]及脊髓性肌萎缩症^[19]等的治疗中,AAV 载体也得到了广泛的应用。

在 AAV 作为基因表达载体的应用中,获得高纯度、高滴度的 rAAV 病毒是以 AAV 为投递载体的基因工程药物开发中需要解决的首要问题。目前国内纯化质粒主要采用 SDS 碱裂解法及碱裂解结合酚氯仿法等方法^[20],这些方法不但得到的质粒纯度不高,而且质粒样品中还含有大量的非超螺旋质粒,严重影响了 rAAV 病毒的组装质量和效率。本研究针对这些问题,用 HiPrepTM10 Sepharose 6FF 柱及 HiTrapTM PlasmidSelect Xtra 柱对包装 rAAV 的 3 种质粒进行了纯化,纯化后得到高纯度超螺旋质粒 DNA,有效除去了非超螺旋质粒和蛋

白杂质等,为大量组装 rAAV 病毒奠定了质粒材料基础。

组装病毒时,采用经典的磷酸钙转染法以提高转染效率,三质粒共转染 AAV-293 细胞。

通过多次试验摸索,我们采用传代第 3-5 代的 AAV-293 细胞组装病毒,在细胞生长状态最佳并且汇合率达到 60%左右时开始转染质粒,改进了 Stratagene 说明书建议的细胞汇合率达到 80%时开始转染的方法,因为按照后者的方法,中后期细胞会出现生长抑制的现象,不利于病毒组装;并且中途换一次培养液,收集换下的培养液(培养液中可能有释放出的病毒颗粒)也改进了 Stratagene 说明书上的中途不换培养液的方法,中途不换培养液会导致后期细胞营养不足,影响病毒组装效率。最后合并收集培养的所有细胞和所有培养基(包括中途换液换下的培养基),进行下一步的病毒纯化。

包装出病毒粒子后,用 100 kD Milipore 超滤管 Centrplus100 离心浓缩收集的细胞和培养基,再用 HiLoad™10SP 和 HiLoad™10Q 阴阳离子层析柱纯化,在纯化过程中,对反应条件不断地摸索、优化,特别是对纯化过程中不同峰区收集物进行检测,最终探索出最佳反应条件和活性病毒粒子所在的峰区,得到了高纯度的 rAAV 病毒颗粒。这种方法比国内常用的氯仿处理-PEG/NaCl 沉淀-氯仿抽提以及冰乙醇沉淀浓缩法^[18]简单高效,可以得到大量有感染活性的病毒颗粒。我们借助 EGFP 报告基因的表达,类似模拟 50%组织细胞感染量 ($TCID_{50}$),利用流式细胞仪计数有荧光表达的细胞数并计算浓缩液稀释后病毒感染滴度,方法简便、结果可靠。

利用 HiPrep™10 Sepharose 6FF 柱、HiTrap™ PlasmidSelect Xtra 柱纯化质粒和 HiLoad™10SP、HiLoad™10Q 柱纯化病毒的另一最大优点是可以批量流水线操作,这对大量制备 rAAV 载体是非常有利的,但这种方法也存在纯化柱价格相对较高、需定期置换凝胶树脂填料的不足。

总之,通过本研究对 rAAV 病毒组装纯化过程进行优化,得到了相对高滴度、高纯度的 rAAV 病毒颗粒,为 AAV 大量制备作为基因表达和基因工程药物载体的应用探索了一条新途径。

REFERENCES

- [1] Ayuso E, Mingozzi F, Bosch F. Production, purification and characterization of adeno-associated vectors[J]. *Current Gene Therapy*, 2010, 10(6): 423-436
- [2] Wang D, Tai PWL, Gao GP. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2019, 18(5): 358-378
- [3] Li S, Li G, Chen GL. Introduction of the first gene therapy drug approved by the United States for treatment of spinal muscular atrophy[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2020, 51(11): 1445-1453 (in Chinese)
李帅, 李刚, 陈桂良. 美国批准首个用于治疗脊髓性肌萎缩症的基因治疗药物介绍[J]. *中国医药工业杂志*, 2020, 51(11): 1445-1453
- [4] Qu WH. Research progress on purification technology of adeno-associated virus vector[J]. *China Pharmacy*, 2015, 26(34): 4880-4884 (in Chinese)
曲伟红. 腺相关病毒载体纯化技术的研究进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(34): 4880-4884
- [5] Brooks PJ, Ottinger EA, Portero D, Lomash RM, Alimardanov A, Terse P, Xu X, Chandler RJ, Hauserman JG, Esposito E, et al. The platform vector gene therapies project: Increasing the efficiency of adeno-associated virus gene therapy clinical trial startup[J]. *Human Gene Therapy*, 2020, 31(19/20): 1034-1042
- [6] Sambrook J, Green MR. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. Translated by He FC. Beijing: Science Press, 2017 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 格林 MR. *分子克隆实验指南*[M]. 贺福初, 主译. 北京: 科学出版社, 2017
- [7] Brument N, Morenweiser R, Blouin V, Toubanc E, Raimbaud I, Chérel Y, Folliot S, Gaden F, Boulanger P, Kroner-Lux G, et al. A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and -5[J]. *Molecular Therapy*, 2002, 6(5): 678-686
- [8] Tomono T, Hirai Y, Okada H, Adachi K, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, Okada T. Ultracentrifugation-free chromatography-mediated large-scale purification of recombinant adeno-associated virus serotype 1 (rAAV1)[J]. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 2016, 3: 15058
- [9] Qu WH, Wang MX, Wu YQ, Lv Y, Wang QZ, Xu RA. Calcium-ion-modulated ceramic hydroxyapatite resin for the

- scalable purification of recombinant Adeno-Associated Virus serotype 9[J]. *Journal of Chromatography B*, 2015, 990: 15-22
- [10] Xu YY. Current status and challenges of gene therapy products[J]. *China Biotechnology*, 2020, 40(12): 95-103 (in Chinese)
徐应永. 基因治疗产品的开发现状与挑战[J]. *中国生物工程杂志*, 2020, 40(12): 95-103
- [11] Ong T, Pennesi ME, Birch DG, Lam BL, Tsang SH. Adeno-associated viral gene therapy for inherited retinal disease[J]. *Pharmaceutical Research*, 2019, 36(2): 1-13
- [12] Han ZC, Conley SM, Makkia RS, Cooper MJ, Naash MI. DNA nanoparticle-mediated ABCA4 delivery rescues Stargardt dystrophy in mice[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(9): 3221-3226
- [13] Yu WH, Mookherjee S, Chaitankar V, Hiriyanna S, Kim JW, Brooks M, Ataeijannati Y, Sun X, Dong LJ, Li TS, et al. Nrl knockdown by AAV-delivered CRISPR/Cas9 prevents retinal degeneration in mice[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14716
- [14] Barzel A, Paulk NK, Shi Y, Huang Y, Chu K, Zhang F, Valdmann PN, Spector LP, Porteus MH, Gaensler KM, et al. Promoterless gene targeting without nucleases ameliorates haemophilia B in mice[J]. *Nature*, 2015, 517(7534): 360-364
- [15] George LA, Sullivan SK, Giermasz A, Rasko JEJ, Samelson-Jones BJ, Ducore J, Cuker A, Sullivan LM, Majumdar S, Teitel J, et al. Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2017, 377(23): 2215-2227
- [16] Fakhiri J, Landegger LD, Grimm D. Breaking the sound barrier: Towards next-generation AAV vectors for gene therapy of hearing disorders[J]. *Hearing Research*, 2020: 108092
- [17] Santiago-Ortiz JL, Schaffer DV. Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy[J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 240: 287-301
- [18] Yin H, Song CQ, Dorkin JR, Zhu LJ, Li YX, Wu QQ, Park A, Yang J, Suresh S, Bizhanova A, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components *in vivo*[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(3): 328-333
- [19] FDA. Zolgensma [EB/OL]. [2020-02-25]. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/zolgensma>
- [20] Xie ZH, Shi XJ, Cai GP. The preparation of highly purified plasmid DNA for mammalian cell transfections[J]. *Letters in Biotechnology*, 2007, 18(5): 803-805 (in Chinese)
谢振华, 史小军, 蔡国平. 用于哺乳动物细胞转染的高纯度质粒 DNA 的制备[J]. *生物技术通讯*, 2007, 18(5): 803-805