

利用 Leprechaun 确认慢病毒的滴度及 RNA 内容物

简介

在优化细胞治疗的开发和生产时，尽早得到完整的含有 RNA 的慢病毒 (LV) 的滴度是十分有意义的。LV 收获后，了解哪些批次具有最高的结构完整的滴度，哪些批次具有最低的滴度，可以确保您不会把时间浪费在那些一开始质量就很低的 LV 上。此外，FDA 和其他监管机构越来越关注基于 LV 治疗的分析方法开发和产品表征，这使得对于希望避免延误上市而造成损失的人来说，准确了解制备的 LV 比以往任何时候都更重要。

与其他病毒载体相比，可用于 LV 表征的分析技术仍然存在问题。广泛使用的检测方法，如 p24 ELISA 和 qRT-PCR 提供的信息有限——因为需要破坏病毒，仅检测病毒结构的一部分，并且只分析衣壳蛋白或目标基因的总量而不检查其在病毒颗粒内部的含量。另一方面，依赖于非特异性的单颗粒分析技术可以检测和计数单个病毒，但该技术通常对其内容物做出假设，无法获取检测的病毒内部或表面存在什么。

Leprechaun 是一款能在生产过程的每一步中对单个 LV 颗粒提供全面的生物物理表征的平台，无论其假型化如何 (图 1)。



图 1：Leprechaun 是一款能对单个慢病毒颗粒提供全面的生物物理表征的平台

慢病毒 VSVG RNA 的 Luni 芯片预埋有针对 VSVG 的高特异性抗体，可直接从粗制样品中捕获病毒颗粒，无需事先纯化（图 2）。对于非 VSVG 假型化病毒的分析，慢病毒 Flex RNA Luni 允许采用针对您选择的包膜蛋白的定制抗体进行病毒捕获。病毒一旦被捕获，Leprechaun 使用单颗粒干涉反射技术来测量每个病毒颗粒的粒径大小，以此来判断该病毒颗粒是单体、聚集体亦或是破碎的片段。抗体被用来确认病毒包膜蛋白和 p24 衣壳蛋白的存在，而 RNA 荧光染料则用来检测病毒内部核酸。不管您的样品有多脏，Leprechaun 都可以测量滴度低至 1×10^7 颗粒/毫升的含有 RNA 的慢病毒。

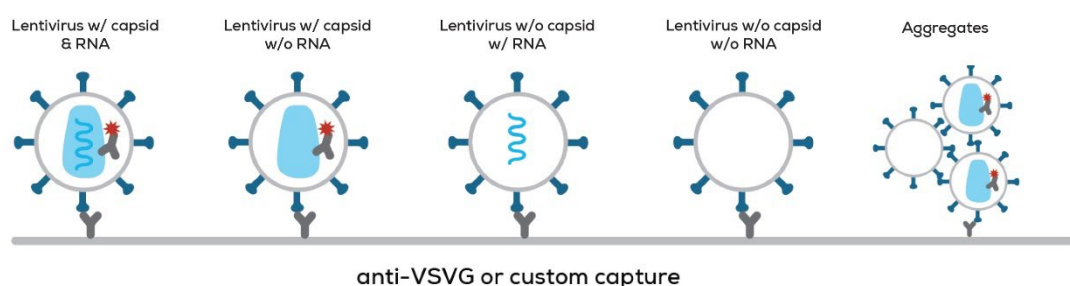


图 2：慢病毒被捕获在 RNA Luni 芯片上，随后其粒径大小被测量，再通过 anti-p24-CF647 荧光抗体及 SYTO14 荧光染料检测慢病毒中的 p24 和 RNA。单个 Luni 芯片上的检测位点设有重复 ($n \geq 3$)

本篇应用说明描述了 Leprechaun 的慢病毒 RNA 应用如何定量分析 LV 粗制样品和纯化样品中的 RNA 和衣壳蛋白，并展示了 LV 结构分析在样品制备纯化过程和分析方法开发中的价值。

方 法

Leprechaun 分析方法

LV 样品从 5 家供应商处获得，使用 Leprechaun 的慢病毒 VSVG RNA 试剂盒 (Unchained Labs) 进行分析。LV 用添加了终浓度为 1% 的胎牛血清的孵育液以 1:12–1:2000 的体积比进行稀释。将提供的 SYTO14 荧光染料用孵育液释至 10 μM ，加入至上述稀释后的 LV 样品中，体积比为 1:10。最后，将该染料-样品混合物在 37°C 下孵育 16 小时。染色完成后，将 50 μL SYTO14 标记的样品滴加至慢病毒 VSVG RNA Luni 芯片上，室温下孵育 1 小时。通过溶液 C 和溶液 D 进行样品固定和透膜后，将提供的 anti-p24-CF647 (1:250) 加至 Luni 芯片上，

室温下孵育 1 小时。Luni 芯片经过洗涤、干燥，最后使用慢病毒 RNA 应用程序在 Leprechaun 上运行。

核酸酶处理

用核酸酶孵育缓冲液 (20 mM Tris-HCl, 4 mM 氯化镁, 20 mM 氯化钠), 将 25 U/ μ L 核酸酶原液 (Sigma-Aldrich) 以 1:8 的体积比进行稀释, 上述溶液每 2 μ L 加入 1 μ L LV 样品, 混合, 在 37°C 下孵育 1 小时。对于 Leprechaun 分析, 将 SYTO14 (或等体积的 PBS) 加入核酸酶处理后的样品中, 并按照之前的方法进行 Luni 芯片的准备。

通过将 1 mg/mL 小牛肝脏 RNA (Sigma-Aldrich) 加入到 25 U/ μ L 核酸酶 (分散在核酸酶孵育缓冲液中) 以及 10 μ M SYTO14 中来验证核酸酶的功能。对于非核酸酶处理的阴性对照, 用等体积的缓冲液 (20 mM Tris-HCl, 2 mM 氯化镁, 20 mM 氯化钠和 50%甘油) 取代核酸酶。样品在 37°C 下孵育 1 小时, 使用 Uncle (Unchained Labs) 的等温应用程序, 收集在 500–630 nm 之间的荧光发射信号。

qRT-PCR 分析方法

该分析结果由 SydLabs 使用 Lenti-X qRT-PCR 滴定试剂盒 (Takara Bio), 根据试剂盒提供的方法得到。每个样本进行 3 次稀释, 每次稀释重复测试 2 次, 取结果的平均值以获得基因滴度。

结 果

如何获得全面的结果

病毒颗粒通过其包膜蛋白被免疫捕获在 RNA Luni 芯片的表面, 然后结合干涉反射和荧光显微镜技术分析其结构。单颗粒干涉反射技术利用 Luni 芯片表面的二氧化硅涂层起到的信号增强的作用, 最大限度地对从 Luni 芯片表面反射的信号以及被捕获的病毒产生的散射光进行干涉成像。该技术可以获得高分辨率的单颗粒尺寸, 低至 35 nm。通过测量病毒粒径大小, Leprechaun 可以区分单个病毒、病毒片段以及团聚体。

仅凭粒径大小并不足以将一个颗粒识别为一个完整的 LV。病毒内部 p24 衣壳蛋白和 RNA 的荧光共定位起着确认病毒关键结构成分的作用 (表 1)。样品与膜透性 RNA 染料 SYTO14 一起孵育, 从而标记病毒 RNA, 然后滴加在 Luni 芯片上。病毒一旦被结合, 并经过温和的固定和透膜后, CF647 荧光素标记的 anti-p24 抗体可以被用来检测病毒包裹的衣壳 (图 3)。

Particle type	Capture antibody	Particle definition	
		Size (nm)	Component detected
LV w/ capsid & RNA	anti-VSVG/custom	35 - 130	VSVG+ p24+ RNA+
LV w/ capsid w/o RNA	anti-VSVG/custom	35 - 130	VSVG+ p24+ RNA-
LV w/o capsid w/ RNA	anti-VSVG/custom	35 - 130	VSVG+ p24- RNA+
LV w/o capsid w/o RNA	anti-VSVG/custom	35 - 130	VSVG+ p24- RNA-
Aggregates	anti-VSVG/custom	>130 - 200	VSVG+ p24± RNA±
Viral p24	anti-VSVG/custom	N/A	VSVG+ p24+ RNA±
Soluble p24	anti-p24	N/A	p24+ VSVG-

表 1: 在 VSVG 以及 Flex RNA Luni 芯片上, 慢病毒检测类型的定义。默认的粒径范围可以在分析时手动更改。Luni 芯片表面除了病毒的捕获位点, 也具备捕获游离的 p24 蛋白的位点, 因此既能得到病毒的滴度信息也能得到游离 p24 蛋白的浓度信息

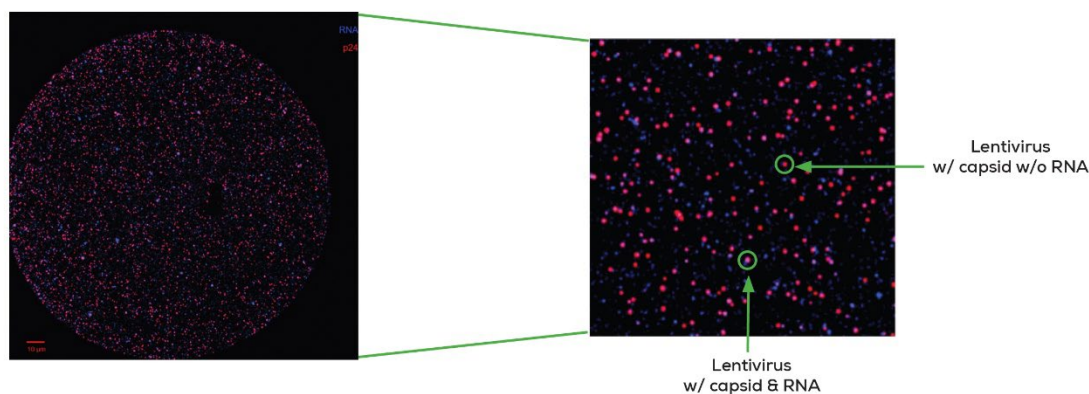


图 3: VSVG RNA Luni 芯片上的 VSVG 捕获位点荧光图。慢病毒样品先用 SYTO14 荧光染料 (蓝色) 结合 RNA, 滴加至 Luni 芯片上, 被 VSVG 位点捕获后, 再对病毒进行固定和透膜, 随后加入检测 p24 的荧光抗体 (红色)。既有 p24 衣壳又有 RNA 的病毒颗粒呈现出紫色, 只有 p24 衣壳而没有 RNA 的病毒颗粒呈现出红色, 只有 RNA 而没有 p24 衣壳的病毒颗粒呈现出蓝色

有效的 RNA 检测

SYTO14 在与 RNA 结合时, 其荧光发射峰在 530 nm 左右, 这可以被 Leprechaun 的蓝色荧光通道检测到。为了确认蓝色通道的荧光是因为 SYTO14 与 LV 颗粒的结合产生的, 我们考察了四种不同孵育条件: 含/不含病毒以及含/不含染料 (图 4)。

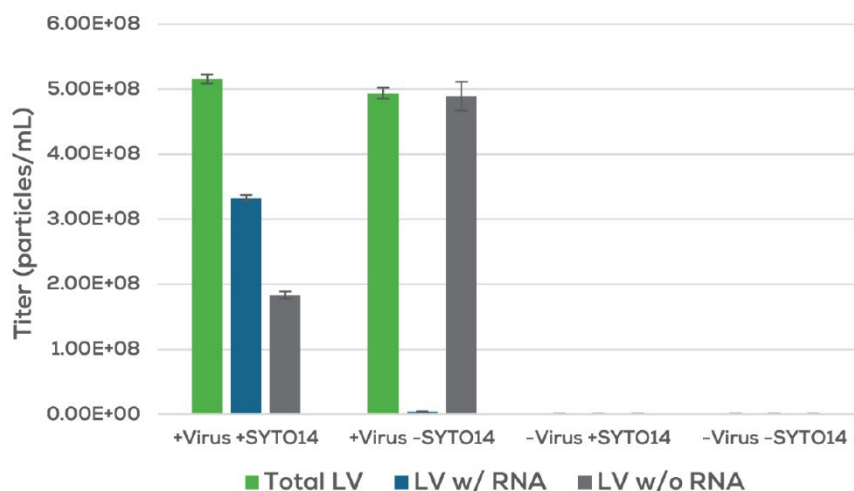


图 4: 通过阴性对照 (不加慢病毒、不加 SYTO14) 来确认 SYTO14 是特异性地和慢病毒的 RNA 结合的, 误差棒表示标准偏差 (n=3)

只有当 LV 样品和 SYTO14 染料同时存在时, 才在蓝色荧光通道中检测到信号。不加入荧光染料, 分析病毒样品时, 并没有检测到与 VSVG 阳性颗粒共定位的蓝色信号。这将使所有病毒颗粒被归类为“无 RNA”, 并证实了信号是 SYTO14 与 RNA 结合产生的特异性信号, 而不是样本的自发荧光或来自于其他荧光通道。此外, 当单独用荧光染料孵育 Luni 芯片时, 也没有检测到蓝色荧光信号, 这验证了 SYTO14 不会非特异性地粘附在 Luni 芯片表面。

选择 SYTO14 进行 LV RNA 检测, 是因为它具有细胞通透性, 能够在不影响病毒结构的情况下穿过病毒囊膜。为了确认 SYTO14 是与病毒内部的 RNA 结合, 而不是和病毒表面或溶液中游离的核酸相结合, RNA 染色完成的 LV 样品在和 Luni 芯片孵育前用核酸酶处理。首先, 在核酸酶存在和不存在的条件下对小牛肝脏 RNA 和 SYTO14 进行孵育, 接着, 通过在 Uncle 上测量产生的荧光信号 (图 5A) 来检测核酸酶的活性。结果显示, 核酸酶存在的情况下, 荧光信号降低了 95%, 由此验证了核酸酶的功能。与之形成对比的是, RNA 染色完成的 LV 样品

经由核酸酶处理后, Leprechaun 鉴定为含有 RNA 的 LV 颗粒的数量是没有变化的 (图 5B), 证实了 SYTO14 是与病毒颗粒内部的 RNA 结合的。

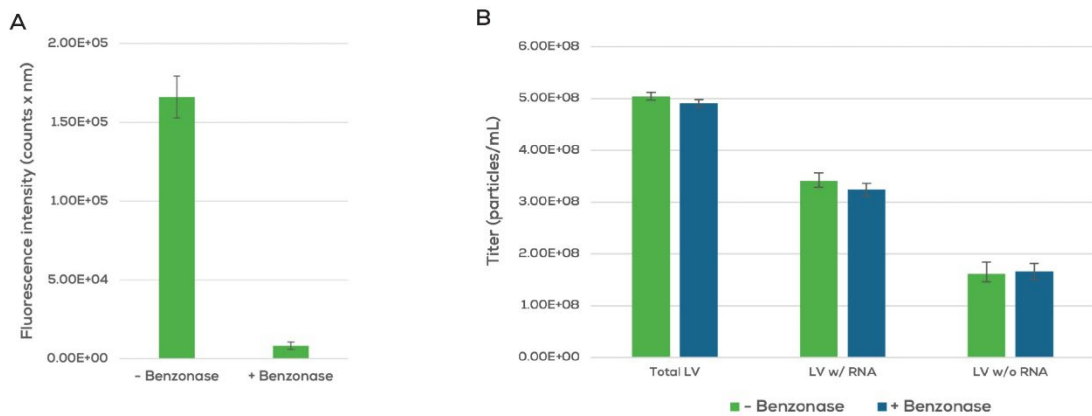


图 5: (A) 核酸酶活性确证。SYTO14 和 RNA 在“有”以及“没有”核酸酶的情况下进行孵育, 其荧光强度数值由 Uncle 测定得到。(B) 具有 RNA 的慢病毒在“有”以及“没有”核酸酶的处理下, 在 Leprechaun 上的相关数据。误差棒表示标准偏差 (n=3)

小分子染料如 SYTO14 穿过病毒蛋白衣壳而被病毒摄取是依赖于时间和温度的^{1,2}。为了确保 RNA 被高效染色, 我们考察了不同时间及不同温度下 SYTO14 与 LV 的孵育情况。在 37°C 孵育时, 发现含有 RNA 的病毒百分比随着时间的延长而增加, 并在 16 个小时之后趋于稳定 (图 6A)。温度降至 25°C 或 4°C 显著降低了 LV 颗粒的 SYTO14 染色 (图 6B)。综合这些数据证实, 高温和过夜孵育有助于病毒有效地摄取 SYTO14, 并和包封的 RNA 相结合。

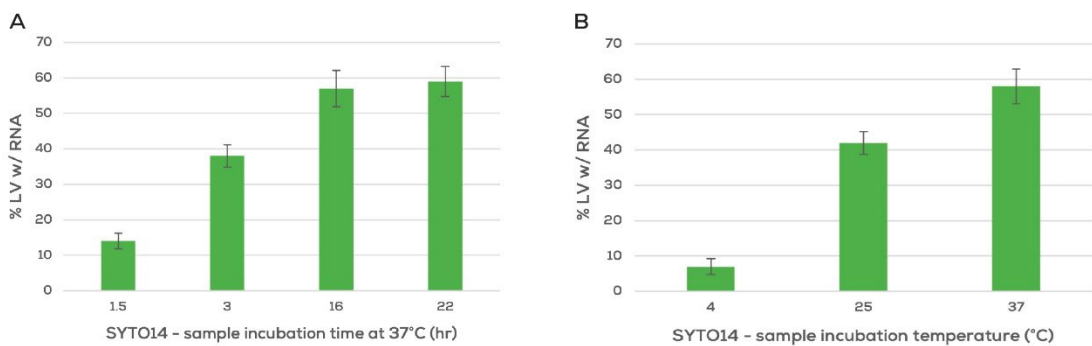


图 6: (A) SYTO14 与慢病毒 RNA 相结合具有时间依赖性。在 37 °C 下, 慢病毒样品和 10 μM 的染料相结合, 时间范围: 1.5 至 22 个小时。(B) SYTO14 与慢病毒 RNA 相结合具有温度依赖性。慢病毒样品和 10 μM 的染料在不同的温度下孵育 16 个小时, 温度分别为: 4 °C, 25 °C 和 37 °C。误差棒表示标准偏差 (n=3)

线性以及精确性

通过 Luni 芯片对 LV 颗粒的囊膜进行特异性捕获可以阻止非病毒颗粒的结合，防止污染物干扰病毒滴度的测量。这种特异性结合意味着 Leprechaun 在测量慢病毒粗制样品和纯化样品时，都可以拥有良好的线性范围，最低测量滴度为 1×10^7 颗粒/毫升 (图 7，表 2)，通常 变异系数在 8 % 以下。

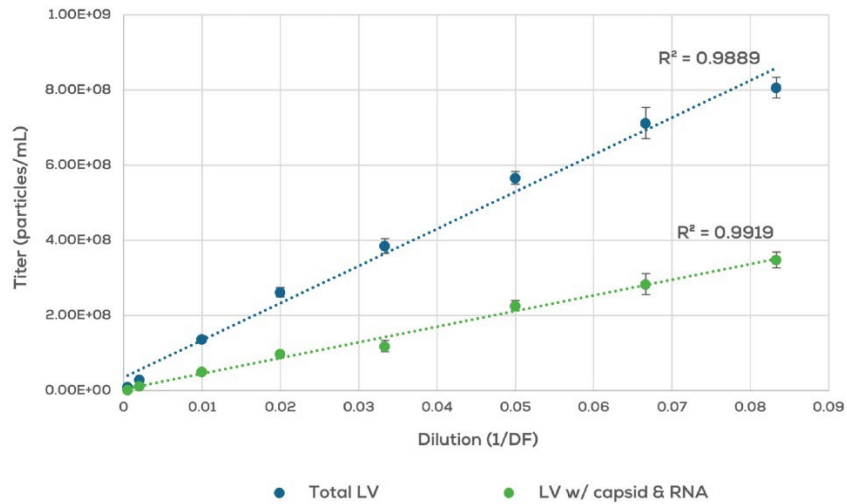


图 7: Leprechaun 测量慢病毒的线性范围。误差棒为标准偏差

Particle type	Dynamic range
LV w/ capsid & RNA	1x10 ⁷ – 5x10 ⁸ particles/mL
LV w/ capsid w/o RNA	
LV w/o capsid w/ RNA	
LV w/o capsid w/o RNA	
Aggregates	
Soluble p24	5 – 10,000 pg/mL
Viral p24	1,000 – 50,000 pg/mL

表 2: Leprechaun 慢病毒 VSVG/Flex RNA 试剂盒动态检测范围

和基因滴度具有相关性

我们对来自不同供应商，并有着不同基因滴度的一系列 LV 样品，其中既包含粗制品也有纯化样品，进行了 Leprechaun 以及 qRT-PCR 的测试。结果显示，对于纯化的样品来说，LV 颗粒的基因滴度与在 Leprechaun 上测定的含有 RNA 的滴度是呈正相关 ($r^2=0.95$) (图 8A)。有趣的是，在粗制样品中并没有观察到同样的相关性 (图 8B)。

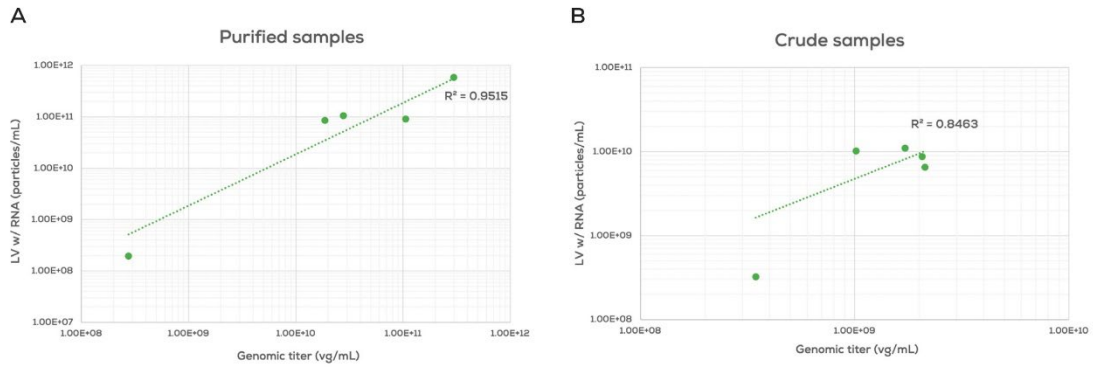


图 8：利用 Leprechaun 测量含有 RNA 的慢病毒的颗粒滴度和利用 qRT-PCR 测量得到的基因滴度之间的相关性 (A) 粗制液 (B) 纯化的样品

这强烈地表明，从生产细胞中释放了大量与 LV 相同大小的颗粒，它们也表达 VSVG，并包含了除病毒基因组之外其它的 RNA。

这些颗粒很可能是与 LV 颗粒一起释放的细胞外囊泡，它们含有细胞质 RNA。Leprechaun 通过既测量 RNA 也测量衣壳蛋白来确保只计算那些经历了正确组装过程的 LV。因此，这一点是至关重要的：任何依赖于 RNA 检测来分析早期 LV 样本的技术，也必须要检测 p24 衣壳的存在。

跟踪纯化过程

Leprechaun 可以让您在整个生产纯化过程中跟踪 LV 批次的质量，揭示您是否正在富集那些至关重要的既有衣壳又有 RNA 的 LV，同时去除那些错误组装的病毒样颗粒。我们利用 Leprechaun 对同一批次，但来自纯化过程的不同阶段——粗提液、PEG 沉淀处理后以及最终产品（经过 PEG 沉淀、UC 和 UF 纯化）的 LV 样品进行了分析（图 9A）。

通过 Leprechaun 对单个病毒颗粒的结构进行检查，发现尽管 LV 的总滴度随着每个纯化步骤在增加，但最终产品中结构完整的病毒颗粒的比例却并不比粗提液的高（图 9A - 蓝线）。这表明，虽然标准的 LV 纯化技术成功地浓缩了具有正确粒径大小和密度的 LV，但它们并不能有效地富集结构完整的 LV。

三个不同阶段样品的总 p24 含量可用 Leprechaun 进行分析并计算得出，其转换关系式为： 1×10^4 个 LV 颗粒等于 1 μg p24，这样就能得到与 p24 ELISA 较吻合的数据。可以看到，p24 ELISA 实验显示 p24 的浓度随着每一步的纯化而增加，这意味着病毒滴度的增加（图 9B）。但是，如果不知道有多少不含有 p24

衣壳的病毒存在（图 9a–灰色柱和黄色柱）——传统 ELISA 不能提供该信息，那么这个由 p24 ELISA 得到的结果是有误导性的。这些不含有衣壳的病毒颗粒表达相同的包膜蛋白，可能含有 RNA，并有可能与完整的 LV 竞争靶细胞的转染。当将不含有 p24 衣壳的病毒颗粒考虑进去时，您会发现最终产品中含衣壳 LV 的比例与粗提液中的比例是相似的。

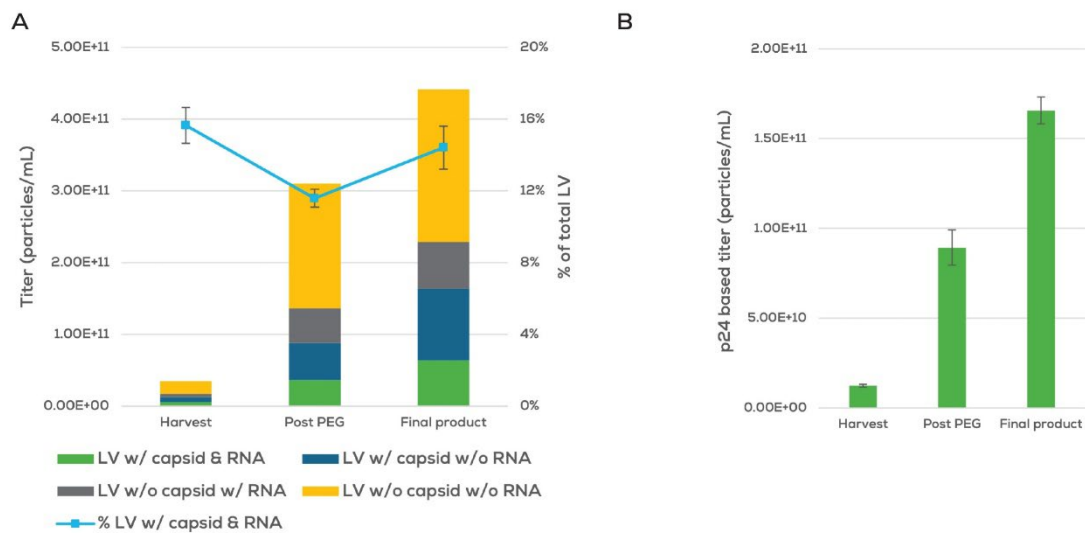


图 9: (A) 在不同纯化阶段利用 Leprechaun 分析慢病毒。(B) 根据 p24 酶联免疫吸附 (ELISA) 得到的慢病毒颗粒滴度。滴度数据是病毒内部 p24 和游离 p24 数据的总和。误差棒为标准偏差 (n=3)

确认好的批次

Leprechaun 还提供了在粗提液阶段时 LV 样品的筛查能力，确保该批次具有较高的结构完整的 LV 滴度，进而值得进行后续的纯化工序，亦或当您检测到具有较低的完整的 LV 滴度时，说明该批次是垃圾，这时您可以考虑停止后续操作并减少您的损失。我们使用 Leprechaun 分析三个批次的 LV 粗制品，并比较其组成（图 10A）。

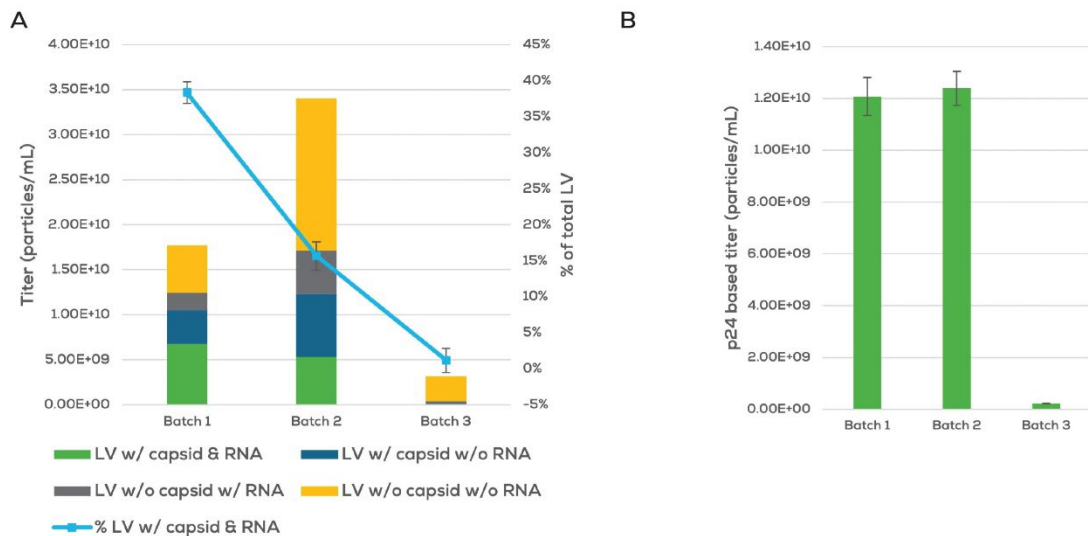


图 10: (A) Leprechaun 测量 3 种粗制慢病毒样品, 得到的结构组成信息。(B) p24 酶联免疫吸附 (Leprechaun) 得到的慢病毒滴度数据。误差棒为标准偏差 (n=3)

乍一看, 第 2 批次 LV 颗粒的总滴度最高, 但仔细观察这些颗粒的结构组成, 可以看出, 第 2 批次中有很很大一部分是既不含衣壳也不含 RNA 的空病毒颗粒。第 1 批次和第 2 批次其既有衣壳又有 RNA 的 LV 滴度是差不多的, 但第 1 批次含有结构不完整的 LV 要少得多, 这意味着该批次对既有衣壳又有 RNA 的 LV 颗粒富集程度明显更高 (39% vs 14%, 占总 LV 颗粒的百分比)。由于缺失衣壳和/或 RNA 的病毒颗粒在纯化过程中难以去除, 因此选择这些颗粒比例低的起始材料至关重要, 所以在这种情况下, 优选第 1 批次。

与前面测试的样品一样, p24 的含量可由 Leprechaun 测量并转化为与 ELISA 相当的物理滴度 (图 10B)。虽然通过 p24 ELISA 试验成功地将第 3 批次鉴定为最低滴度样品, 但由于缺乏衣壳阴性 LV 以及衣壳阳性并含有 RNA 含量 LV 的信息, 因此该技术不能区分第 1 批次和第 2 批次的质量。

结 论

传统的纯化方法可以有效地浓缩 LV, 但很难去除那些具有正确的颗粒大小和密度, 却缺乏关键的结构成分——p24 衣壳和 RNA, 的 LV 颗粒。这些颗粒与完整的 LV 具有相同的包膜蛋白, 可以竞争和靶细胞的转染, 但不能传递所需的有效载荷, 还可能携带病毒基因组以外的 RNA。为了确保安全有效的细胞治疗, 需要避免将未知的 RNA 序列递送到用于治疗患者的细胞中去。

目前的 LV 分析技术只表征衣壳蛋白或 RNA, 因此无法提供任何关于结构不完整的病毒颗粒信息。甚至基于细胞的功能性测量方法也只关注含有正确病毒基因组的颗粒, 而不测量携带其他 RNA 或蛋白的颗粒可能对细胞转染存在的影响。而在 Leprechaun 的帮助下, 可将您的工艺开发提升至更高水平, 因为这是一款向您展示 LV 样本完整情况的平台, 包括有多少病毒缺失 p24 衣壳、RNA 或两者都缺失。您可以真正了解您的样本中有什么, 并详细了解 LV 生产过程的每个步骤的有效性, 从而对您的工艺开发的决策制定提供帮助。

Leprechaun 通过让您知道哪些上游的起始批次中既含有衣壳又含有 RNA 的 LV 滴度是最高的, 并且结构不完整的 LV 含量较低 (这些结构不完整的 LV 可能会以未知的方式改变您的目标细胞), 从而使您处于一个生产高质量最终产品的最佳位置。尽早确定您的最优样品是至关重要的, 因为即使是最佳的工艺处理也在 LV 的纯化上存在限制性。随着监管部门对 LV 表征需求的不断增长, 相信利用 Leprechaun 将彻底改变您的 LV 分析, 并确保您的 LV 制备始终满足金标准。

参考文献

- 1 Binding of fluorescent dye to genomic RNA inside intact human rhinovirus after viral capsid penetration investigated by capillary electrophoresis. Kremser, L. et al. Anal Chem, 2004. 76: 882–887
- 2 Quantitative evaluation of protein heterogeneity within herpes simplex virus 1 particles. El Bilali, N. et al. J Virol, 2017. 91:e00320–17
- 3 Production of high-titer lentiviral vectors. Zufferey, R. and D. Trono. Curr Protocols in Neuroscience, 2001. 12: 4.21.1–4.21.12.



Unchained Labs
4747 Willow Rd
Pleasanton, CA 94588
Phone: 1.925.587.9800
Toll-free: 1.800.815.6384
Email: info@unchainedlabs.com

© 2023 Unchained Labs. All rights reserved. Leprechaun is a trademark and Unchained Labs is a registered trademark of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.

Rev A