

终极 flex：利用 Leprechaun 测定特异性假型化 LV 滴度

简介

VSVG 是假型化慢病毒 (LV) 最常用的包膜蛋白，因为它具有广泛的细胞靶向性和高转染效率。虽然非常适用于选定细胞的离体修饰，但这些特性使得 VSVG 假型化 LV 非常容易导致脱靶效应，而不适合在体治疗。通过用一种更加特异性细胞靶向的包膜蛋白替代 VSVG 来对 LV 进行假型化修饰，可以提高 LV 的递送效率，减少脱靶效应^①。因此，针对疾病特异性细胞，人们对制造非 VSVG 假型化 LV 的兴趣越来越大。

研发人员进行 LV 假型化改造时面临着较多的挑战，其中之一便是无法轻松地检查正确的包膜蛋白在整个 LV 生产中以及不同批次中是否能始终表达。

传统评估 LV 质量的方法，例如衣壳蛋白 ELISA 法或 qRT-PCR，不关注病毒的包膜蛋白，而替代方法，例如蛋白印迹 (western blot)，十分耗时，而且只是半定量。因此，病毒假型化的确认通常是通过细胞实验测量病毒转染靶细胞的效率来间接证实的。

Leprechaun 很容易获得在生产过程中任何阶段的特定假型化 LV 的滴度 (图 1)。



图 1：Leprechaun 是一款可以同时检测您的 LV 是否含有正确的包膜蛋白，衣壳，RNA 以及具有正确粒径大小的平台

Leprechaun 的慢病毒 Flex RNA 试剂盒利用了 Abcam 的闪电链接™

(Lightning-Link™) 技术, 允许用户在自己舒适的实验室中定制化修饰用于捕获 LV 的抗体。您所需要做的就是先获得一种识别您选择的包膜蛋白的抗体, 将它与试剂盒中提供的连接子孵育 (图 2A), 加入猝灭试剂, 然后将连接子-抗体偶联物孵育在 Flex Luni 芯片上。该连接子被 Luni 芯片表面的 Flex 抗体特异性结合 (图 2B)。一旦 Luni 芯片被所需的抗体修饰, 就加入病毒样品, 并进行免疫染色, 以检查病毒衣壳蛋白和 RNA 的存在 (图 2C)。

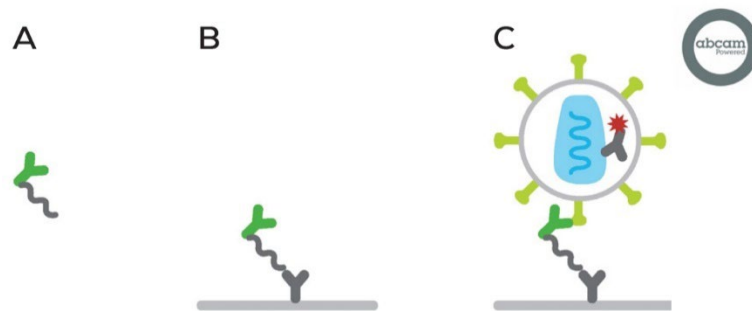


图 2: 一步步修饰慢病毒 Flex Luni 芯片。(A) 针对包膜蛋白的特异性抗体 (绿色) 与 Flex 连接子 (灰色) 孵育, 形成抗体-连接子偶联物。(B) 抗体-连接子偶联物孵育在 Flex Luni 芯片上, 该连接子特异性地与相应的 Flex 捕获抗体相结合, 该捕获抗体已预埋在 Luni 芯片表面上。(C) LV 被修饰上的自定义的抗体通过靶向其包膜蛋白捕获将有/没有衣壳以及有/没有 RNA 的病毒颗粒数量与单颗粒粒径大小数据相结合, 生成每个结构群体的 LV 滴度 (5 组): 既有衣壳又有 RNA 的 LV, 只有衣壳没有 RNA 的 LV, 没有衣壳但是有 RNA 的 LV, 既没有衣壳也没有 RNA 的 LV 以及团聚体。作为 Flex RNA 试剂盒的替代品 (图 3A), 可将 EV 定义为污染物而进行检测的一款试剂盒, 除了能检测 LV 病毒的滴度, 其中还包括额外的检测位点, 用于捕获和定量测试非病毒囊泡的滴度 (图 3B)。每个试剂盒都包含一对连接试剂, 每个连接试剂都能识别 Luni 芯片表面上不同的 Flex 位点。这种设计允许偶联一种抗体来捕获病毒包膜蛋白, 偶联另一种抗体作为第一种抗体的同型对照 (阴性对照)。



图 3: 慢病毒 Flex Luni 芯片设计。(A) 所有的 Flex Luni 芯片具有 6 个 Flex 1 号位点, 用来捕获 LV, 3 个 Flex 2 号位点用来修饰同型对照蛋白 (阴性对照), 以及 3 个用于游离 p24 蛋白测量的 anti-p24 位点。(B) 慢病毒 Flex EV Luni 芯片还有另外 3 个 anti-tetraspanin 位点, 用于分析非病毒囊泡 (视作污染物)

本篇应用说明描述了 Leprechaun 的慢病毒 Flex RNA 试剂盒和慢病毒 Flex EV 试剂盒是如何进行特异性假型化 LV 的定量分析以及非病毒污染物(EV)的检测的, 并通过一站式的解决方案来确认您的 LV 的质量, 无论其假型化是什么。

方 法

Leprechaun 分析方法

LV 样本来自 Vectorbuilder, 使用慢病毒 Flex RNA 试剂盒或慢病毒 Flex EV 试剂盒 (Unchained Labs) 进行 Leprechaun 分析测试。根据试剂盒说明, 使用 SARS-CoV-2 刺突蛋白 RBD 抗体 (R&D Systems) 对 Flex Luni 芯片进行表面功能化。利用制造商提供的孵育液, 添加终浓度为 1%胎牛血清后, 将粗制 LV 进行 5 倍稀释, 将纯化 LV 进行 30 倍稀释。RNA 检测试剂盒提供的 SYTO14 染料先用孵育液稀释至 10 μM , 再加入至稀释后的 LV 样品中, 染料与样品的体积比为 1:10。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 Flex RNA Luni 芯片上, 室温孵育 1 小时。对于 EV (污染物) 分析, 稀释后的样品直接在 Luni 芯片上室温下孵育 1 小时。经溶液 C 和溶液 D 固定和渗透后, 所有 Luni 芯片加入 anti-p24-CF647 试剂 (1:250), 并在室温下孵育 1 小时。Luni 芯片经过清洗、干燥后, 在 Leprechaun 上运行慢病毒 RNA 应用程序或慢病毒 EV 应用程序。

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

高度特异性

Flex 系统的特异性通过自定义抗体存在与否时，LV 样品和 Luni 芯片孵育后得到的结果进行证实。自定义抗体不加入，连接子仍然加入到 Flex 芯片位点上，在这种情况下，Luni 芯片并没有修饰上该自定义抗体。信号仅在完全功能化的 Luni 芯片（连接子和自定义抗体都存在）上被检测到，验证了连接子单独存在是不能捕获病毒颗粒的（图 4-左、中）。当没有样品加入时，一个完全功能化的 Luni 芯片也没有信号（图 4-右），证实了只有当样品与 Flex Luni 芯片上的自定义抗体结合时，才能检测到颗粒的信号。上述三种实验也同样用于 EV 污染物的分析，可以获得 EV 的滴度信息。由于 anti-tetraspanin 抗体是直接预埋在 Luni 芯片位点上的，而不是通过 Flex 试剂交联的，因此可以做为阳性对照，确认是加入了样品的，数据是没有问题的。

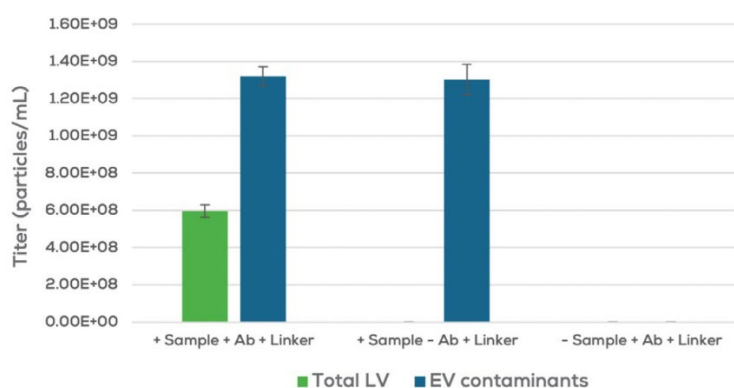


图 4：慢病毒 Flex Luni 芯片信号特异性验证。只有当所有成分（连接子、自定义抗体和样品）都存在的情况下才能检测到 LV 滴度数据 (n=3)，误差棒为标准偏差

线性范围和精确度

利用表达 SARS-CoV-2 刺突蛋白的 LV，来考察 Leprechaun 检测非 VSVG 假型化 LV 时的线性范围和精确度。通过 Flex 偶联系统将针对刺突蛋白的抗体固定在 Flex RNA Luni 芯片上。不管是粗制样品还是纯化样品，在浓度低至 1×10^7 颗粒/毫升时，LV 总滴度和既含有衣壳又含有 RNA 的 LV 滴度都有很好的线性关系（图 5），和 VSVG Luni 芯片的性能是很相符的。结果的精确度会受到用于捕获的自定义抗体的克隆不同而改变，对于该刺突蛋白抗体，变异系数 (% CV) 约为 12%。我们在 Flex EV Luni 芯片上也获得了一致的结果。

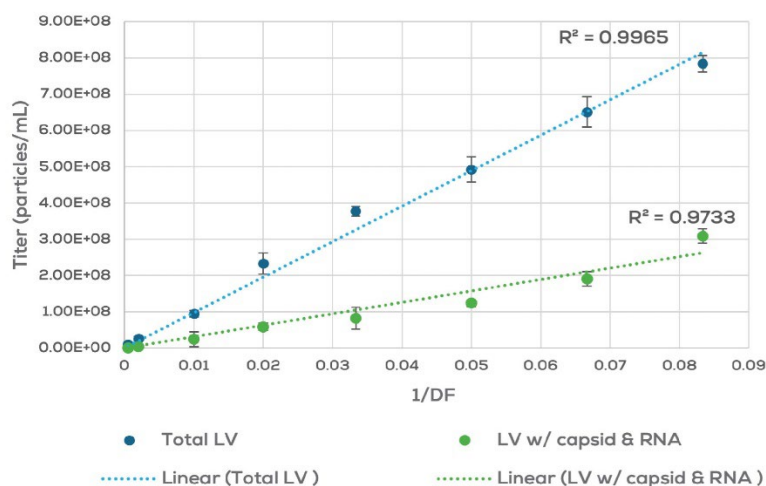


图 5: Leprechaun 测定的 SARS-CoV-2 刺突蛋白假型化 LV 滴度的线性范围。误差棒为标准偏差

特异性假型化 LV 分析方法

Flex Luni 芯片完成表面功能化准备好后，只需要少于 25 μL 的样品，就可以获取 LV 滴度、RNA 含量、是否存在团聚体和 EV 污染物等信息。对 SARS-CoV-2 刺突蛋白假型化 LV 的粗制品和 PEG 纯化后的样品分析显示，该纯化过程成功地富集了同时含有衣壳和 RNA 的 LV 颗粒（图 6A）。纯化样品中含 RNA 的 LV 的滴度增加了 100 倍，这与 qRT-PCR 测定的基因滴度的变化一致。同时含有衣壳和 RNA 的 LV 在样品中的比例从 14%（粗制品）提高到了 35%（纯化后）。然而，EV 污染物分析显示，在最终纯化后的产品中仍有较高滴度的非病毒 EV 污染物存在（图 6B）。由于 EV 有着和 LV 相似的粒度大小和密度，标准的 LV 纯化方法，会同时纯化富集 EV。因此，人们越来越关注测量和表征 LV 相关产品中 EV 的含量，以满足监管部门的要求^②。有趣的是，非病毒性 EV 颗粒的比例从粗制品中的 58% 上升至纯化样品中的 72%，这表明 PEG 纯化工艺在去除这些 EV 污染物方面完全无效。

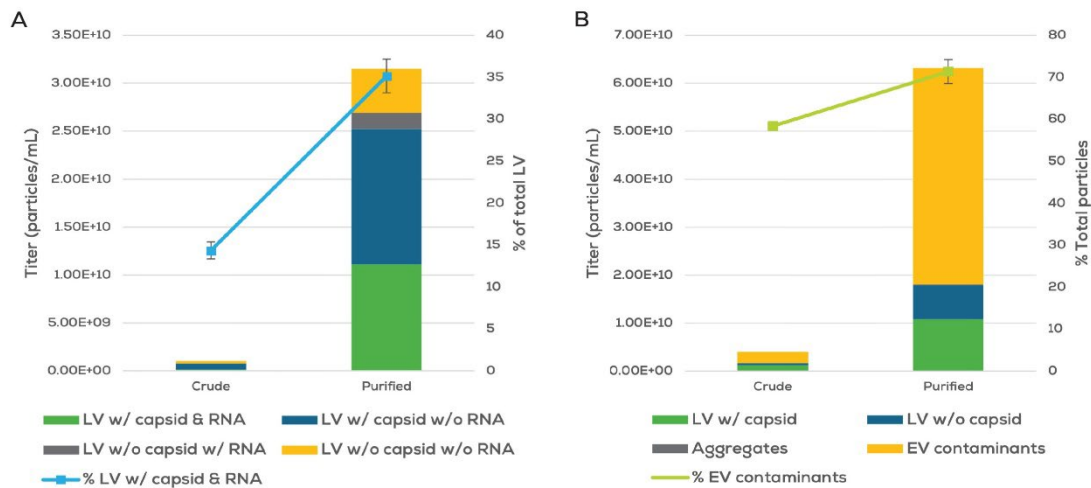


图 6：利用 Leprechaun 分析粗制的以及纯化的 SARS-CoV-2 刺突蛋白假型化 LV。
 (A) 来自于慢病毒 Flex RNA 试剂盒的数据，提供了关于该 LV 颗粒的结构组成及 RNA 存在与否的信息。(B) 慢病毒 Flex EV 试剂盒给出 LV 滴度信息以及 EV 污染物分析。

每次实验重复 3 次 (n=3)，误差棒为标准偏差

结 论

LV 假型化修饰是提高靶细胞转染的特异性和效率的有效手段。大多数 LV 分析技术都集中在衣壳蛋白或 RNA 载荷上，而没有提供关于病毒包膜蛋白的相关信息。Leprechaun 不但确认了 LV 假型化，同时还检查了病毒衣壳蛋白和 RNA，这意味着您可以确信测量的是正确的东西。

Flex Luni 芯片是很容易进行定制化抗体修饰的，并有两种选择。如果您想知道含有 RNA、结构完整的 LV 的滴度，那么请选择 Flex RNA 试剂盒。如果您想监测 LV 的纯度，确认体系中污染物 (EV) 是否有效被去除，这时您可以选择 Flex EV 试剂盒。

Leprechaun 是一款测量粗制品和纯化样品中特异性假型化 LV 滴度、EV 污染物以及团聚体的平台，我们相信，无论包膜蛋白是什么，无论样品所处的环境有多么复杂，在 Leprechaun 的帮助下，您都能将您的制备工艺和分析方法开发提升到一个新的水平，实现从样品收获到最终产品的 LV 质量全面监测。

参考文献

1. Pseudotyping lentiviral vectors: when the clothes make the virus. Duverge A. and M. Negroni. *Viruses*, 2020. 12, 1311

2. Critical assessment of purification and analytical technologies for enveloped viral vector and vaccine processing and their current limitations in resolving co-expressed extracellular vesicles. *Vaccines*, 2021. 9(8): 823



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