

慢病毒载体定量检测方法的研究进展

陈思琪^{1,2}, 张松平², 杨延丽², 李贺平³, 王歆³, 刘幽燕¹

1 广西大学 化学化工学院, 广西 南宁 530000

2 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100190

3 北京永泰瑞科生物科技有限公司, 北京 100176

陈思琪, 张松平, 杨延丽, 等. 慢病毒载体定量检测方法的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2283-2292.

Chen SQ, Zhang SP, Yang YL, et al. Advances in quantification of lentiviral vectors. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2283-2292.

摘要: 免疫疗法正在发展成为一种可用于多种恶性肿瘤的有效且侵入性较小的治疗方法。慢病毒载体 (Lentiviral vectors, LVs) 因其能够稳定地整合相对较大的外源 DNA, 并且有效地转导分裂细胞和非分裂细胞, 已在免疫治疗中显现出巨大潜力。临床应用对慢病毒载体具有较高的质量要求, 需要对最终产品进行严格的质量控制以保证其纯度、效力和安全性。其中慢病毒载体的定量检测是产品研发和质控的关键环节之一。文中总结了 LVs 定量检测的现有方法, 包括流式细胞术 (Fluorescence activated cell sorter, FACS)、P24 酶联免疫法 (P24 enzyme-linked immunosorbent assay, P24 ELISA)、实时荧光定量 PCR 方法 (Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)、纳米粒子跟踪分析 (Nanoparticle tracking analysis, NTA)、可调电阻式脉冲传感 (Tunable resistive pulse sensing, TRPS) 和病毒计数仪 (Virus counter, VC), 并对其优缺点进行比较, 对发展新的检测方法和存在的挑战进行了展望。

关键词: 慢病毒载体, 定量, 感染性滴度, 颗粒分析

Advances in quantification of lentiviral vectors

Siqi Chen^{1,2}, Songping Zhang², Yanli Yang², Heping Li³, Yu Wang³, and Youyan Liu¹

1 College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530000, Guangxi, China

2 State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

3 Beijing YongtaiRuike Biotechnology Co. Ltd., Beijing 100176, China

Abstract: Immunotherapy is becoming an effective and less invasive strategy that can be applied to the treatment of various malignancies. Lentiviral vectors (LVs) have shown great potential in immunotherapy as they can stably integrate relatively large foreign DNA, and effectively transduce dividing and non-dividing cells. Clinical application needs high quality LVs, and therefore strict quality control of the final products is necessary to ensure their purity, efficacy and safety. The quantitative detection of LVs is among the key parts of product development and quality control. In this paper, the existing methods for quantitative detection of LVs are summarized, including fluorescence activated cell sorter (FACS), P24 enzyme-linked immuno sorbent assay (P24 ELISA), real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), nanoparticle

Received: August 12, 2020; **Accepted:** October 15, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21821005).

Corresponding author: Yanli Yang. Tel: +86-10-82545021; E-mail: ylyang@ipe.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 21821005) 资助。

tracking analysis (NTA), tunable resistive pulse sensing (TRPS) and virus counter (VC). Their advantages and disadvantages are listed, and future development and challenges are discussed.

Keywords: lentiviral vectors, quantification, infective titer, particle analysis

近年来, 肿瘤免疫治疗在肿瘤学领域掀起了一场革命, 并逐渐发展为一种有效且侵袭性低的治疗策略, 可应用于各种恶性肿瘤的治疗^[1]。在靶向肿瘤免疫疗法中, 嵌合抗原受体 T 细胞疗法 (Chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T) 显示出优越的响应率, 标志着癌症免疫疗法取得了巨大的成功^[2]。

利用病毒载体是制备 CAR-T 细胞的主要方法。其中慢病毒载体 (Lentiviral vectors, LVs) 因其高效的基因整合和在目标细胞基因中的稳定表达能力, 成为基因治疗的理想工具^[3]。LVs 是通过慢病毒自身的元件进行改造而发展起来的一类能够携带外源基因的病毒载体。其来源主要有: 人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV)、猿类免疫缺陷病毒 (Simian immunodeficiency virus, SIV)、猫免疫缺陷病毒 (Felines immunodeficiency virus, FIV) 等。其中 HIV-1 型载体系统研究得最为广泛和深入。LVs 的整合模式相比其他病毒载体具有显著更低的致癌转化和随机转基因整合风险, 因此使用 LVs 生产的 CAR-T 细胞产品具有很高的安全性和有效性。LVs 还具有高效转导分裂细胞和非分裂细胞的优点, 可以转导多种细胞, 包括难以转导的细胞如造血前体细胞、神经元细胞、淋巴细胞和巨噬细胞^[4]。此外, 其生产成本相比其他病毒和非病毒基因治疗载体更低^[5-6]。目前, 基于慢病毒载体的基因治疗已得到临床试验的数据支持, 例如利用基因修饰的 CD34⁺ 细胞治疗严重遗传疾病和使用 CAR-T 细胞进行恶性血液病治疗, 在临床试验中都得到了可靠的数据并且显现出良好的治疗效果^[7]。

为获得高质量的 LVs 产品, 保证其有效性及安全性, LVs 产品的质量表征是关键。临床试验中的应用要求准确调整病毒载体剂量和细胞转导

效率。然而由于病毒结构的复杂性, 其检测也面临一些挑战。LVs 中可能同时包含具有转导能力和转导缺陷的病毒颗粒或病毒裂解产物^[7]。此外在载体制备过程中, 宿主细胞不仅可以产生目标病毒颗粒, 还可能产生包括外泌体和微囊泡在内的各种相关杂质^[8]。这些细胞来源的杂质可能具有与 LVs 相近的关键理化性质, 包括尺寸、净电荷和组成, 使其难以分析, 还可能会引起不必要的免疫反应。为了加快 LVs 产品的开发, 迫切需要更加快速的检测技术, 然而传统的病毒滴度等检测方法的检测时间长, 难以满足此需求。这些因素使得 LVs 的准确、快速的定量检测成为难点。本文对现有 LVs 定量检测技术包括基于病毒功能性滴度及颗粒检测的方法进行了综述, 对其优点和局限性进行讨论, 并对未来的检测方法和存在的挑战作了进一步展望。

1 LVs 定量检测方法的分类

LVs 的滴定检测一般可分为生物功能法和物理法 (或非生物功能法)^[9]。生物功能法通过测定 LVs 在特定条件下转导特定细胞系的能力反映病毒的含量及生物活性。常用的两种生物功能法包括: 1) 通过实时荧光定量 PCR 方法 (RT-qPCR) 测定靶细胞中前 LVs 的 DNA 拷贝数; 2) 评估报告基因或转入基因在感染靶细胞中的表达水平。生物功能性滴度检测结果取决于检测方法、载体类型和检测条件^[10]。物理法基于对载体颗粒组分含量或颗粒数量的评价确定病毒滴度 (表 1)。例如测定 P24 衣壳蛋白浓度或基因组 RNA 拷贝数。物理法允许对病毒粒子进行实时定量, 同时提供诸如粒径等信息。通常物理法难以区分感染性和非感染性载体, 因此可能高估了功能载体的滴度, 在预测 LVs 载体转导效率方面有局限性^[11]。

表 1 慢病毒载体现有检测技术的比较

Table 1 Comparison of quantification techniques for LVs

Methods	Principle	Benefits	Drawbacks	References
FACS	Transducing cells by infectious virus are detected by transgene expression	Reflects the infection activity of the virus	Expensive, time-consuming, and limited to LVs that express reporter genes	[6,12-13]
P24 ELISA	The concentration of P24 capsid protein	Easy to operate	Cannot differentiate infectious virus from non-infectious virus and free capsid proteins	[13-15]
RT-qPCR	The copies of viral RNA or provirus' DNA in infected cells	High specificity and sensitivity	Accuracy is dependent on the quality of DNA standards	[16-18]
NTA	Particle number and size distribution	Easy and rapid detection	Low specificity and the accuracy are easily affected by sample purity and test parameters	[13,19]
TRPS	Particle number, size distribution, zeta potential	Multi-parameters, real-time monitoring, and rapid detection	Low specificity and the accuracy are easily affected by sample purity	[20]
VC	Particle number	Fast analysis speed, simple sample preparation, no fluorescent antibody needed, lower cost	A certain size of virus (425 nm) and a certain length of viral genome (49 000 nt/bp) are necessary	[21]

2 生物功能性滴度检测

2.1 流式细胞术 (Fluorescence activated cell sorter, FACS) 测定病毒感染滴度

将 LVs 与靶细胞共培养, 采用流式细胞术计算 LVs 感染目标细胞后其报告基因或转入基因在感染靶细胞中的表达水平, 是测定 LVs 感染滴度的一种非常可靠的方法^[22]。该方法通过将带有荧光标记的 LVs 样品进行逐级稀释, 以保证达到合适的浓度, 加入细胞悬液转导孵育后, 使用光标记流式细胞仪测定荧光阳性细胞的百分比来计算 LVs 滴度。该方法仅可用于携带可靠标记基因的载体的效价测定, 或在有针对 LVs 编码蛋白的特异性抗体可用时进行检测。在这些检测中常用的标记基因包括 neo 抗性基因、绿色荧光蛋白或其他活性染料^[23]。所使用的标记基因应由在转导细胞中活跃的启动子控制 (如 HEK 293T)。该方法不仅用于最终 LVs 产品的测定, 也常用于评价纯化过程, 例如聂蓓娜等^[23]在对不同浓缩方法对 LVs 回收效率的影响进行考察, 发现超滤产生的滴度均高于 1×10^{10} TU/mL, 比超速离心法具有更高的收率。

FACS 法能评价具有感染效力的病毒含量, 但对报告蛋白的转基因表达的功能分析不能区分具有单个或多个整合事件的细胞, 而且在组织特异性启动子的控制下测量转基因表达可能不可靠^[5,14]。此外, 整个测定周期一般需要 4 d, 较为耗时。需要注意的是, 研究表明 FACS 法测定 LVs 滴度受许多因素的影响, 如转导过程、靶细胞的类型和数量等。转导条件的改变甚至会导致同一批载体的效价差异超过 50 倍^[16]。

2.2 实时荧光定量 PCR 方法 (Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)

RT-qPCR 法操作简便, 重复性好, 灵敏度高, 是一种测定 LVs 滴度的最直接的方法。通过 RT-qPCR 方法可以检测非报告基因载体的病毒滴度及其感染效率, 且不受启动子功能的影响^[5]。目前基于 Taqman 和 SybrGreen I qPCR 策略, RT-qPCR 已经被用于定量测定 LVs 不同核酸类物质的滴度, 包括病毒载体中的病毒 RNA、“强停止”负链 cDNA 以及靶细胞感染后的前病毒 DNA 及 mRNA^[24]。

测定病毒感染靶细胞后细胞 DNA 中的重组

载体整合拷贝数, 获得的是有感染效力的病毒颗粒数, 属于生物功能性滴度^[24]。RT-qPCR 法的引物可基于内源性基因, 如常见的调控元件 WPRE 序列设计定量引物^[17]。该基因在正常情况下不存在于动物细胞内, 因此可以用作检测基因。载体的长末端重复序列区 (Long terminal repeats, LTRs) 也是常用的引物设计序列^[25]。测定靶细胞中 DNA 滴度时, 同时选择人源性的单拷贝基因白蛋白 (Albumin, Alb) 基因作为内参基因^[17], 最终计算每个细胞整合的 LVs 基因拷贝数。通过提取病毒 RNA, 经逆转录后进行 RT-qPCR 测定, 计算得到的病毒颗粒数为所有收集到的病毒颗粒总数, 既包括有感染效力的病毒, 也包括无感染效力的病毒, 属于物理法^[25]。基于病毒 RNA 的 RT-qPCR 测定由于同时计算了缺陷或其他非感染性颗粒以及上清液中自由漂浮的载体基因组, 因此可能大大高估了功能滴度。Gregory 等发现靶细胞中的整合前病毒 DNA 滴度相比上清液中的病毒基因组 RNA 滴度大约低了 200 倍, 但前者可能更接近 LVs 制剂的实际功能效价^[18]。Scherr 等通过比较载体上清病毒核酸滴度及靶细胞基因组中 DNA 滴度的结果, 也发现具有感染活性的 LVs 约占 0.1%–1.0%^[26]。RT-qPCR 测定 LVs DNA 整合事件的准确性也相比 FACS 法的传统方法要高^[27]。对比实验发现基于报告基因表达的 FACS 法可能低估了功能病毒滴度, 相比整合转基因的 RT-qPCR 反应滴度结果低了 10–60 倍^[16]。FACS

法结果偏低可能是因为部分报告基因整合后未表达, 或者表达水平低的细胞未被 FACS 检测到。启动子较弱也可能导致报告基因降低表达, 导致 DNA 和报告基因效价的差异。

RT-qPCR 的定量需要采用参照基因的质粒 DNA 作为标准品, 稀释不同浓度后分别作为模板进行 PCR, 并根据标准品的 Ct 值和拷贝数来绘制标准曲线, 然后将 LVs 样品所测得的 Ct 值代入标准曲线获得相应拷贝数, 计算 LVs 滴度^[12,28]。该定量结果在很大程度上取决于标准物质的质量^[5]。随着新型液滴数字 PCR (Droplet digital PCR, ddPCR) 技术的出现, 核酸的定量可不需要参照基因的标准曲线, 进一步简化了样品制备, 提高了检测量。ddPCR 检测主要采用微流控或微滴化方法, 将大量稀释后的核酸溶液分散至芯片的微反应器或微滴中分别进行 PCR, 每个反应器的核酸模板数少于或者等于 1 个。这样经过 PCR 循环之后, 有一个核酸分子模板的反应器就会给出荧光信号, 没有模板的反应器就没有荧光信号 (图 1A)。根据相对比例和反应器的体积, 就可以推算出原始溶液的核酸含量。Wang 等^[29]采用 ddPCR 对 LVs 滴度进行了检测, 并与传统的 FACS 和 RT-qPCR 检测方法进行了比较。三种方法的结果具有较好的一致性, 但 ddPCR 具有更高的灵敏度和精确度, 相对标准偏差 (Relative standard deviation, RSD) 值为 11.1%, 而 FACS 和 RT-qPCR 的 RSD 分别为 18.7% 和 18.6% (图 1B)。

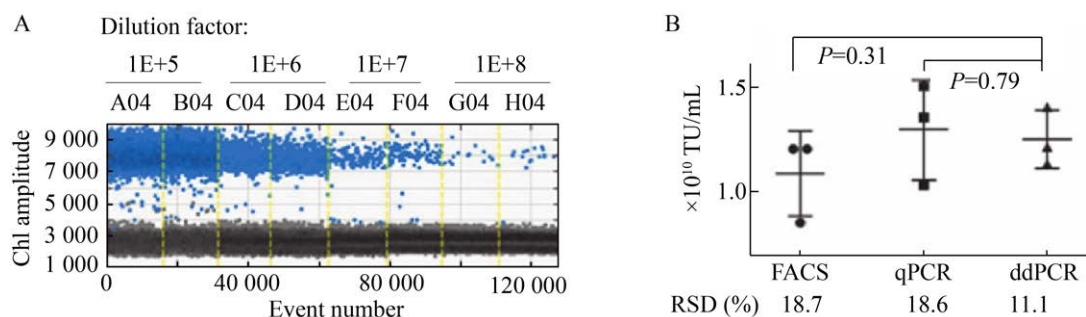


图 1 ddPCR 定量检测 LVs 滴度^[29]

Fig. 1 Quantitative detection of lentiviral titer by ddPCR. (A) ddPCR analysis of genomic DNA of Lenti-GFP infected 293 T cells; (B) Comparison of FACS, qPCR, ddPCR detection of Lenti-GFP titer^[29].

3 物理法检测

3.1 P24 ELISA

采用 ELISA 方法检测 LVs 衣壳蛋白 P24 的浓度水平也是针对不含报告基因的 LVs 常用的一种检测方法。采用双抗体夹心 ELISA 法测定抗原, 即将抗 P24 单克隆抗体包被于微孔板中, 将待测样品置于其中共孵育, 样品中 P24 抗原则与抗体结合形成 P24 单抗-抗原复合物, 加入酶标 P24 单抗再次孵育, 酶标抗体与单抗-抗原复合物上的 P24 抗原结合, 形成 P24 单抗-抗原-酶标抗体的夹心结构, 最后与底物反应显色, 终止反应后用酶标仪测定 *OD* 值。根据估计, 每个 LVs 含有 2 000 个 P24 分子, 1 ng 的 P24 相当于 1.25×10^7 个 LVs^[30]。

由于 P24 滴度检测结果也包括了非功能性的 LVs 的测定, 因此该方法同样高估了感染性病毒的滴度。此外, 它还检测了游离的、非 LVs 上的 P24 蛋白, 这些蛋白在标准质粒共转染后释放到了上清液中, 会进一步高估滴度结果。因此 P24 蛋白浓度与功能滴度之间往往只有粗略的相关性^[16]。P24 滴度的另一个缺点是有限的线性范围 (13–200 pg/mL), 样品往往需要大量稀释, 影响检测再现性^[22]。虽然 P24 滴度不能反映病毒感染活性, 但也具有一定的参考意义。根据文献报道, FACS 法测定的感染性滴度与 P24 含量计算的 LVs 颗粒数的比值通常在 1/100–1/1 000^[24]。Geraerts 等^[22]对比了 RT-qPCR 检测 RNA 滴度、FACS 法和 P24 ELISA 法 3 种方法的结果, 3 种方法的梯度稀释结果均具有较好的线性响应, R^2 分别为 0.99、0.93 和 0.94。此外, FACS 法结果与其他两种方法的比值和均能体现出不同 LVs 载体设计上的差异, 具有一定相关性, 但 RT-qPCR 和 P24-ELISA 二者之间的结果并没有一一对应的关系^[22]。为了减少游离 P24 对 LVs 滴度检测的影响, 一些 ELISA 试剂盒 (QuickTiter™ Lentivirus Titer ELISA Kit, Cell Biolabs) 加入专用试剂将 LVs 从游离 P24 中分离出来 (图 2), 定量测定只与 LVs 相关的 P24 水平^[19]。

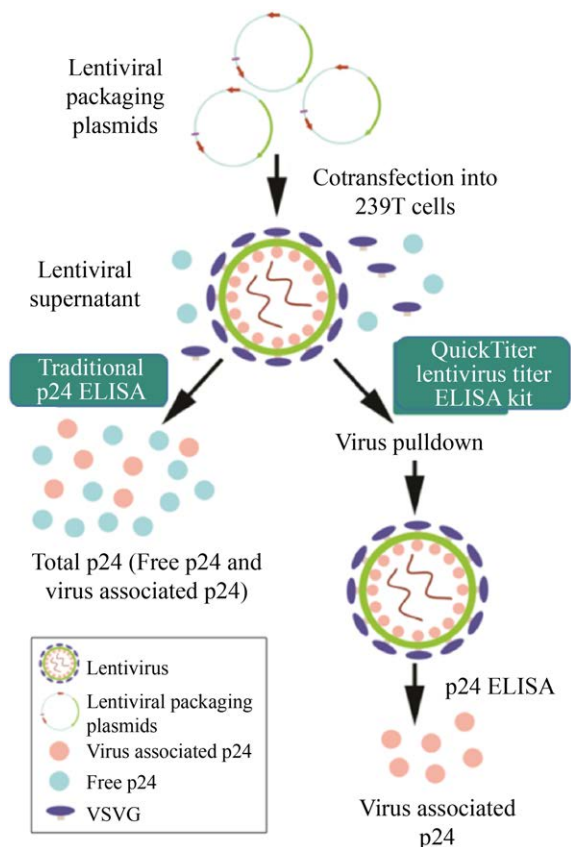


图 2 QuickTiter™ Lentivirus Titer ELISA Kit 与传统试剂盒的对比图 (<https://www.cellbiolabs.com/lentivirus-associated-p24-elisa-kit>)

Fig. 2 Comparison chart of QuickTiter Lentivirus Titer ELISA Kit and traditional kit.

3.2 纳米粒子跟踪分析 (Nanoparticle tracking analysis, NTA)

NTA 是一种较新的颗粒检测技术, 可以快速获得尺寸分布与颗粒计数信息, 适用于分析 30–1 000 nm 的颗粒, 如病毒和病毒聚集物等^[20]。NTA 分析技术的原理是利用溶液中粒子的布朗运动产生的散射光, 通过显微镜和电荷耦合器件 (CCD) 照相机记录颗粒的布朗运动随时间的函数分布图, 首先计算粒子扩散系数, 然后通过斯托克-爱因斯坦方程分别和实验变量 (如粒子数、样品体积等) 计算流体动力直径和粒子浓度。由于 NTA 方法同时测量单个粒子, 具有检测速度快的优点, 最快的检测时间可以在 5 min 内完成。

此外, NTA 可同时获得颗粒的尺寸和颗粒数量信息, 在定量分析的同时, 可分析所得样品的尺寸分布及聚集情况。Papanikolaou 等^[13]采用 NTA 分析了通过超滤制备 LVs 的效果, 表明制备得到的 LVs 颗粒的平均直径为 100 nm 左右, 为尺寸正常的颗粒, 并且检测到了少量 400–500 nm 的聚集 (图 3)。NTA 检测的缺点同样是无法区分感染性与非感染性的病毒。Papanikolaou 等将 NTA 的颗粒计数结果与 FACS 法进行比较, 仅有约 0.1% 的病毒具有感染活性。尽管 NTA 无法反映感染滴度, 但 Kumru 等^[31]发现 NTA 颗粒计数的结果与 RT-qPCR 测定病毒基因组拷贝数的结果的相关性达到 $R^2=0.80$ 。作者进一步利用 NTA 检测速度快的优势, 对大量稳定剂进行了筛选, 并成功获得了能够减少在容器吸附和冻融过程中病毒颗粒损失的稳定剂。以上应用表明, NTA 作为一种快速检测方法用于建立 LVs 的制备工艺具有一定优势。需要注意的是, 为了保证检测结果的准确性, NTA 检测过程中需要保持颗粒数在 10^7 – 10^9 颗粒/mL。此外, NTA 对多分散样品, 例如未经纯化的样品的表征准确性较差^[15]。

3.3 可调电阻式脉冲传感 (Tunable resistive pulse sensing, TRPS)

对病毒类产品的质量控制在不仅包括纯度和定量, 最理想的情况下是实时获得更多的参数, 比

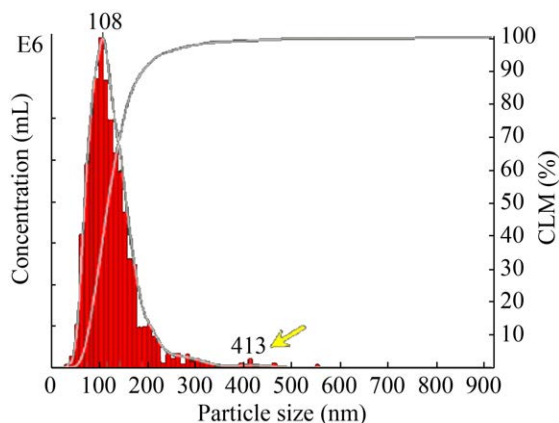


图 3 慢病毒载体颗粒的 NTA 分析图^[13]
Fig. 3 NTA analysis of lentivirus particles^[13].

如尺寸分布、电荷性、浓度等。TRPS 是一种实时的纳米颗粒分析技术^[32], 能够在几种不同的纳米粒子包括二氧化硅纳米粒子、DNA 包裹的纳米粒子、腺病毒和脂质体中测量纳米粒子的粒度和粒度分布, 具有良好的准确性、精密度和灵敏度^[33]。这项技术基于库尔特原理, 采用非导电膜上的一个孔将两个电解质流体室与一个电极隔开, 两个电极建立稳定的基线电流 (图 4A, Current)。将样品加载到其中一个流体室中, 当样品中的颗粒通过孔隙时, 基线电流发生形变, 即产生“阻塞事件” (图 4B, Blockades)。通过监测阻塞事件数、震级和阻塞宽度等 (图 4C), 可以原位阐明样品颗粒的 zeta 电位、尺寸大小和浓度^[34]。TRPS 通过机械拉伸调节空隙的性质, 使颗粒的测量范围可从 40 nm 到 200 μm , 适合 LVs 等病毒的分析^[34]。

Ikeda 等使用 TRPS 量化了来自稳定慢病毒细胞系 STAR-A-HV 的慢病毒载体颗粒^[15]。结果表明, TRPS 所测得的颗粒浓度 (7.99×10^{10} 颗粒/mL) 明显高于 FACS 滴度 (1.08×10^6 颗粒/mL), 但低于 RT-qPCR 法 (2.33×10^{12} 颗粒/mL)。这表明只有

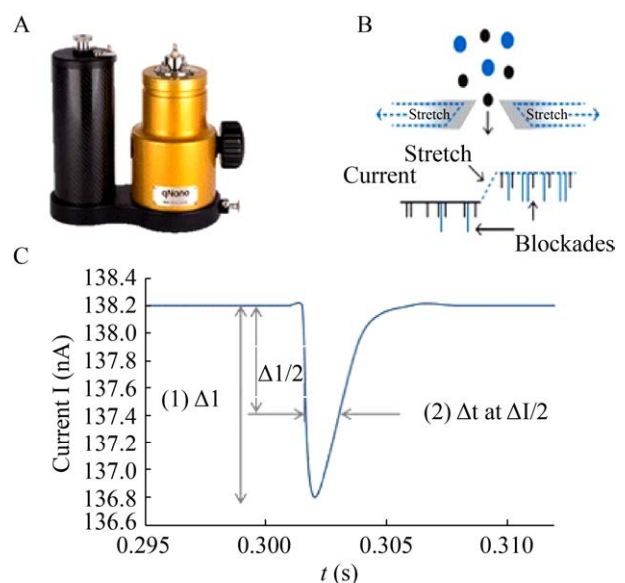


图 4 TRPS 装置及原理示意图^[34]
Fig. 4 TRPS device and schematic diagram^[34]. (A) TRIPS installation diagram. (B) TRPS schematic. (C) TRIPS monitoring map.

0.001%的病毒粒子具有传染性。这一结果与报道的 NTA 及 P24 等其他检测方法测定结果相比,具有感染活性的病毒所占比率降低了 100 倍^[13,24]。由于 FACS 滴度检测受病毒载体及检测参数的影响,因此不同实验室及检测技术的检测结果实际上难以互相比。但基于颗粒分析的技术确实有可能过高地估计了病毒载体数量,因为样品中可能还存在细胞碎片等干扰物。经过一定的分离方法去除干扰性的杂质后,获得的结果会更加准确。Heiderdeng 等^[34]提出了一个结合尺寸排阻色谱 (Size exclusion chromatograph, SEC) 和 TRPS 的集成平台,分析 LVs 粒子的收率和纯度,并通过颗粒大小和表面电荷迁移率表征 LVs 制剂,用于监测 LVs 的生产和纯化。根据 TRPS 的结果不仅检测到了 SEC 不同收集组分中的颗粒浓度 (图 5A),还对所收集颗粒的尺寸分布进行了分析 (图 5B),得到的平均尺寸与 NTA 的结果具有一致性^[34]。通过比较不同种类 LVs 产品的电荷迁移率,可以反映 LVs 的表面化学性质的改变 (图 5C),因此 TRPS 可以进一步发展为鉴定不同病毒类型或状态的工具。

3.4 病毒计数仪 (Virus counter, VC)

目前,美国 ViroCyt 公司已经开发出一种类似流式细胞仪的设备病毒计数仪 (Virus counter, VC),适用于液体样本中的包括慢病毒等多种病毒的定量。VC 使用两种不同的荧光染料对病毒样本进行染色:一种与蛋白质结合,另一种用与核酸结合。染色后的病毒通过活动室时被激光激发后,被标记的蛋白与核酸分别产生相应荧光信号。只有同时具有蛋白与核酸信号的颗粒才会被计算为病毒颗粒。该检测技术具有分析速度快、样品制备简单的优点。VC 使用的病毒染料为非特异性,相比于 FACS 需要特异性的荧光抗体,成本更低。经过 30 min 左右的染色,VC 可在 10 min 之内,最短 5 min 完成对带有荧光染料的病毒颗粒分析。

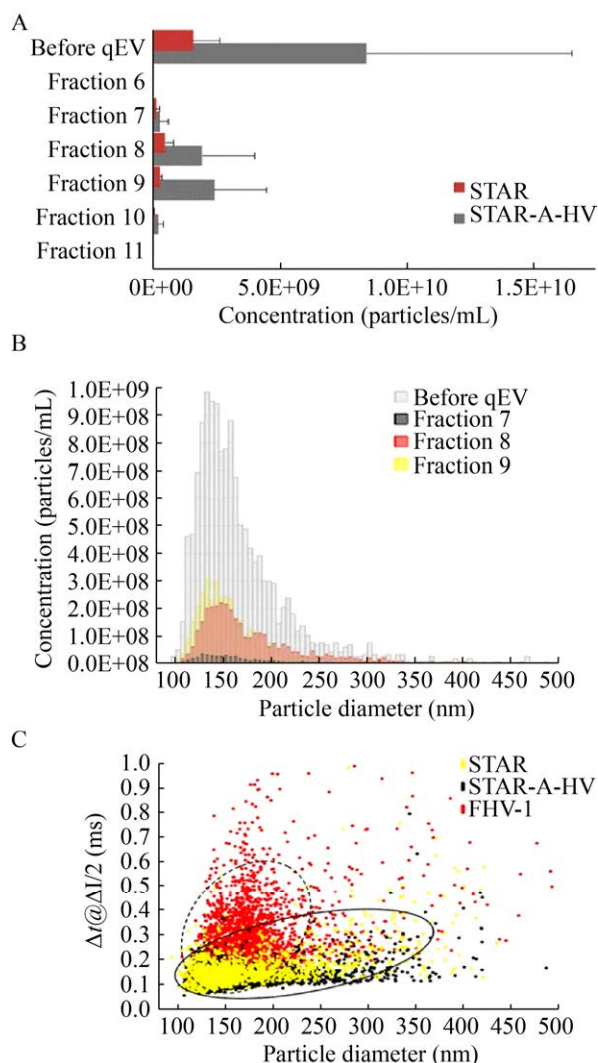


图 5 TRPS 浓度、大小、电荷分布图^[34]
Fig. 5 TRPS concentration, size and charge distribution^[34].

为了保证足够的检测信号和可靠的结果,VC 检测要求病毒尺寸大于 25 nm,并需要病毒基因组有一定的长度 (>9 000 nt/bp),因此 LVs 能满足检测要求。其可靠的测量范围是 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^9$ 颗粒/mL^[15]。Gates 等^[21]采用与表达水泡性口炎病毒的 G-糖蛋白 (G-glycoprotein of vesicular stomatitis virus, VSV-G) 表位的完整慢病毒载体颗粒具有高亲和力的血清特异性荧光标记抗体,通过 VC 实现了 LVs 的快速定量。

4 总结与展望

综上所述,目前已有多种生物功能性及非生物功能性滴度的检测方法用于LVs的定量及质量控制。带有报告基因的LVs的功能性滴度可以使用FACS法进行滴定。对于缺乏基因标记物的LVs,或携带在293 T细胞中可能不起作用的启动子的LVs,则可通过RT-qPCR定量测定基因组DNA中的病毒基因的滴度。对LVs的非功能性滴度检测方法众多,尤其是随着纳米颗粒检测新技术如NTA、TRPS的应用,可实现对病毒单个颗粒的计数。在基因治疗中,感染性LVs的比例会极大地影响基因转导的效率,因此是LVs产品质量控制的重要参数。通过比较功能性滴度与非功能性滴度的比例,可以反映感染性颗粒的比例,对开发LVs制备工艺及制剂质量都具有很好的指导作用。根据文献中的结果,感染性病毒在总颗粒中往往只占极小的一部分。导致非感染性病毒颗粒产生的原因包括:1)病毒形成时产生无感染性的颗粒如病毒空壳、未成功组装的亚基蛋白等;2)制备过程中外界因素如纯化过程中的环境压力、溶液条件等造成病毒活性降低或失活^[15]。此外一个尚未研究清楚的问题是细胞产生的其他脂类囊泡如外泌体对LVs颗粒计数的干扰。外泌体是病毒培养时常见的“污染物”,并不会影响病毒感染滴度的测定,但具有与LVs相近的尺寸甚至组成。这些因素可能也是导致不同LVs产品检测结果差异较大的原因之一。

理想的LVs质量控制方法应该具有准确性、重复性、尽量快的检测速度,并能提供尽可能多的质量信息。尽管FACS、RT-qPCR及P24 ELISA法应用最广,但很多研究结果发现,这些方法之间往往一致性较差,且容易受LVs自身性质及操作条件的影响,导致不同实验室之间的结果也存在差异^[35]。目前还没有一个被广泛接受的适用于所有应用的标准方法,针对一种慢病毒载体的滴度检测大多通过同时采用几种方法分析对比,来

增强结果的准确性^[5]。尽管目前在LVs中应用尚不多,但NTA或TRPS等方法在病毒分析上的应用已经越来越广泛。这些颗粒分析技术能够对LVs在定量的同时分析病毒的尺寸、电荷,反映病毒聚集等,为我们提供更多的质量信息,且具有检测速度快的优点。事实上,有更多的分析技术已经应用在了病毒的检测。例如尺寸排阻色谱和场流分级(Field-flow fraction, FFF),与多角度光散射(Multi-angle laser light scattering, MALLS)检测器偶联后可以实现对不同尺寸颗粒的分离,并同时颗粒浓度测定及分子量、尺寸的测定,已经应用于流感病毒及多种病毒样颗粒的检测^[36],可以分析不同的病毒亚型。同样,在针对纳米颗粒的研究中,毛细管电泳(Capillary electrophoresis, CE)也是一项重要的表征技术,Mironov等^[37]建立了病毒定量CE(Viral quantitative capillary electrophoresis, VqCE)来定量病毒颗粒。VqCE与qPCR类似,然而VqCE的优势是能够区分完整的病毒组分和游离的DNA。将这些分离技术与颗粒检测技术结合,可以更好地区分LVs产品中不同的粒子,提供更详细、准确的质量信息。

REFERENCES

- [1] Del Paggio JC. Cancer immunotherapy and the value of cure. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(5): 268-270.
- [2] Liu M, Guo FK. Recent updates on cancer immunotherapy. *Precis Clin Med*, 2018, 1(2): 65-74.
- [3] Vormittag P, Gunn R, Ghorashian S, et al. A guide to manufacturing CAR T cell therapies. *Curr Opin Biotech*, 2018, 53: 164-181.
- [4] Vannucci L, Lai M, Chiuppesi F, et al. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol*, 2013, 36(1): 1-22.
- [5] Poorebrahim M, Sadeghi S, Fakhr E, et al. Production of CAR T-cells by GMP-grade lentiviral vectors: latest advances and future prospects. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2019, 56(6): 393-419.
- [6] Piscopo NJ, Mueller KP, Das A, et al.

- Bioengineering solutions for manufacturing challenges in CAR T Cells. *Biotechnol J*, 2018, 13(2): 1700095.
- [7] Hansen E, Lee K, Melotti S, et al. Characterization of nanoparticles in lentiviral vector preparations. *Mol Ther*, 2016, 24(S1): S280.
- [8] Tang VA, Renner TM, Fritzsche AK, et al. Single-particle discrimination of retroviruses from extracellular vesicles by nanoscale flow cytometry. *Sci Rep*, 2017, 7: 17769.
- [9] Ding BJ, Kilpatrick DL. Lentiviral vector production, titration, and transduction of primary neurons//Zhou R, Mei L, Eds. *Neural Development*. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, 1018: 119-131.
- [10] BardeI, Salmon P, Trono D. Production and titration of lentiviral vectors. *CurrProtocNeurosci*, 2010, 53(1): 4.21.1-4.21.23.
- [11] Radcliffe PA, Sion CJM, Wilkes FJ, et al. Analysis of factor VIII mediated suppression of lentiviral vector titres. *Gene Ther*, 2008, 15(4): 289-297.
- [12] 靖崔, 薇韦, 罗建辉. 复制能力慢病毒检测方法的研究进展. *中国新药杂志*, 2019, 28(22): 2718-2723.
- Jing C, Wei W, Luo JH. Progress in the detection method of replication-competent lentivirus. *Chin J New Drug*, 2019, 28(22): 2718-2723 (in Chinese).
- [13] Papanikolaou E, Kontostathi G, Drakopoulou E, et al. Characterization and comparative performance of lentiviral vector preparations concentrated by either one-step ultrafiltration or ultracentrifugation. *Virus Res*, 2013, 175(1): 1-11.
- [14] Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J*, 2012, 443(3): 603-618.
- [15] Heider S, Metzner C. Quantitative real-time single particle analysis of virions. *Virology*, 2014, 462/463: 199-206.
- [16] Böcker W, Rossmann O, Docheva D, et al. Quantitative polymerase chain reaction as a reliable method to determine functional lentiviral titer after *ex vivo* gene transfer in human mesenchymal stem cells. *J Gene Med*, 2007, 9(7): 585-595.
- [17] 张飞飞, 孙文, 耿琦, 等. 一种检测慢病毒滴度的实时荧光定量 PCR 方法. *生物技术通讯*, 2019, 30(4): 523-527, 588.
- Zhang FF, Sun W, Geng Q, et al. A real-time fluorescence quantitative PCR method for detecting lentivirus titer. *Lett Biotechnol*, 2019, 30(4): 523-527, 588 (in Chinese).
- [18] Lizée G, Aerts JL, Gonzales MI, et al. Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction as a method for determining lentiviral vector titers and measuring transgene expression. *Hum Gene Ther*, 2003, 14(6): 497-507.
- [19] Shen CJ, Yang YX, Han EQ, et al. Chimeric antigen receptor containing ICOS signaling domain mediates specific and efficient antitumor effect of T cells against EGFRv III expressing glioma. *J Hematol Oncol*, 2013, 6: 33.
- [20] Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by Nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res*, 2010, 27(5): 796-810.
- [21] Gates T, Montange R, Shives K, et al. Rapid, real time quantification of lentivirus particles using antibody-based detection on the virus counter 3100. *Cytotherapy*, 2018, 20(5): E7-E8.
- [22] Geraerts M, Willems S, Baekelandt V, et al. Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnol*, 2006, 6: 34.
- [23] 聂蓓娜, 许晨光, 万晓春. 科研级嵌合抗原受体慢病毒浓缩方法对比研究. *集成技术*, 2020, 9(3): 36-43.
- Nie BN, Xu CG, Wan XC. Comparisons of laboratory-grade lentivirus concentration methods for chimeric antigen receptor T cell preparation. *J IntegrTechnol*, 2020, 9(3): 36-43 (in Chinese).
- [24] Delenda C, Gaillard C. Real-time quantitative PCR for the design of lentiviral vector analytical assays. *Gene Ther*, 2005, 12(S1): S36-S50.
- [25] 马海燕, 方戛聘, 张敬之. 应用荧光实时定量 PCR 方法检测重组慢病毒滴度及其感染效率. *生命科学研究*, 2009, 13(5): 394-398.
- Ma HY, FangYD, Zhang JZ. A novel method for the determination of recombinant lentiviral titer and infectivity by qRT-PCR. *Life Sci Res*, 2009, 13(5): 394-398 (in Chinese).
- [26] Scherr M, Battmer K, Blömer U, et al. Quantitative determination of lentiviral vector particle numbers by real-time PCR. *Bio Techniques*, 2001, 31(3):

520-526.

- [27] Sastry L, Johnson T, Hobson MJ, et al. Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Ther*, 2002, 9(17): 1155-1162.
- [28] Barczak W, Suchorska W, Rubiś B, et al. Universal real-time PCR-based assay for lentiviral titration. *Mol Biotechnol*, 2015, 57(2): 195-200.
- [29] Wang Y, Bergelson S, Feschenko M. Determination of lentiviral infectious titer by a novel droplet digital PCR method. *Hum Gene Ther Method*, 2018, 29(2): 96-103.
- [30] Sena-Esteves M, Gao G. Titration of lentivirus vectors. *CSH Protocols*, 2018: 281-285.
- [31] Kumru OS, Wang Y, Gombotz CWR, et al. Physical characterization and stabilization of a lentiviral vector against adsorption and freeze-thaw. *J Pharm Sci*, 2018, 107(11): 2764-2774.
- [32] Arjmandi N, Van Roy W, Lagae L, et al. Measuring the electric charge and zeta potential of nanometer-sized objects using pyramidal-shaped nanopores. *Anal Chem*, 2012, 84(20): 8490-8496.
- [33] Yang L, Broom MF, Tucker IG. Characterization of a nanoparticulate drug delivery system using scanning ion occlusion sensing. *Pharm Res-Dordr*, 2012, 29(9): 2578-2586.
- [34] Heider S, Muzard J, Zaruba M, et al. Integrated method for purification and single-particle characterization of lentiviral vector systems by size exclusion chromatography and tunable resistive pulse sensing. *Mol Biotechnol*, 2017, 59(7): 251-259.
- [35] Murphy ME, Vin CD, Slough MM, et al. Design of a titering assay for lentiviral vectors utilizing direct extraction of DNA from transduced cells in microtiter plates. *Mol Ther Meth Clin D*, 2016, 3: 16005.
- [36] Kondylis P, Schlicksup CJ, Zlotnick A, et al. Analytical techniques to characterize the structure, properties, and assembly of virus capsids. *Anal Chem*, 2018, 91(1): 622-636.
- [37] Mironov GG, Chechik AV, Ozer R, et al. Viral quantitative capillary electrophoresis for counting intact viruses. *Anal Chem*, 2011, 83(13): 5431-5435.

(本文责编 陈宏宇)