一种快速高效分离和纯化重组腺病毒伴随病毒载体的方法

吴小兵① 董小岩① 伍志坚① 屈建国② 侯云德①

(中国预防医学科学院病毒学研究所①病毒基因工程国家重点实验室; ②形态室, 北京 100052.

* Email: wuxb@public.east.cn.net)

摘要 利用 2 型腺病毒伴随病毒(adeno-associated virus type 2, AAV-2)能够抵抗氯仿的特性, 采用"氯仿处理-PEG/NaCl 沉淀-氯仿抽提" 3 个步骤分离、浓缩和纯化重组腺病毒伴随病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV), 整个纯化过程可在 4 h 内完成. 最终从 5 个转瓶生长的 4×10^9 个载体生产细胞中可得到 5×10^{13} 病毒颗粒/mL, SDS-聚丙烯酰胺凝胶结果表明, rAAV 的纯度大于 95%, 电子显微镜下绝大多数病毒颗粒的结构完整. 纯化后的 rAAV 仍保持较强的感染性, 其感染性滴度达到 2×10^{12} 转导单位(transducing unit, TU)/mL, 总的病毒颗粒数与感染性病毒颗粒数的比值为 25. 为 rAAV 大规模生产后的纯化提供了一种简便、快速、低成本的方法.

关键词 重组腺病毒伴随病毒 氯仿 纯化

由 2 型腺病毒伴随病毒(AAV-2)改造而来的重组腺病毒伴随病毒(rAAV)是一种安全、有效的基因转移载体, 已用于多种人类疾病的基因治疗研究. 然而长期以来, 大量、高纯度的 rAAV 一直难以获得, 使其应用受到了限制. 近两年来, rAAV 的大规模制备策略有了突破性进展. 伍志坚和 Conway 等人[1, 2]先后构建了具有 rAAV 包装功能的重组 1 型单纯疱疹病毒(recombinant herpes simplex virus type 1, rHSV-1), 以此感染携带 rAAV 前病毒的载体细胞株, 可方便地实现 rAAV 的大规模生产. 但是, 在 rAAV 的纯化方面目前仍然缺乏高效、简便、低成本的方法. 常规的方法是采用硫酸铵浓缩、氯化铯密度梯度离心进行纯化[3], 这种方法费时、步骤繁琐、回收率低. 由于已初步鉴定出硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparin sulfate proteoglycan)是细胞膜上 AAV-2 的受体[4], 特异性识别成熟 AAV-2 毒粒的单克隆抗体也已成功制备[5], 因此, 利用肝素亲和层析[6,7]或免疫亲和层析[8]可以高效地纯化 rAAV, 但这类方法费用较高, 不易推广. 本研究充分利用了 AAV-2 的外壳能够抵抗氯仿的性质, 采用氯仿处理-PEG/ NaCl 沉淀-氯仿抽提 3 个步骤, 提供了一种快速、简便、高效地分离、浓缩和纯化 rAAV 的新方法.

1 材料与方法

(ⅰ) 主要实验材料. 含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的 rAAV 载体质粒 pSNAV-GFP 为我们课题组将 pGREEN-LANTERN(GIBCO/BRL)上的 GFP 基因插入 pSNAV 载体[9]的多克隆位点构建而成(待发表资料). HeLa 细胞购自 ATCC. BHK/SG1 细胞为我们课题组先前建立的含 GFP 基因表达盒的 AAV 载体细胞株. 上述细胞均用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养. 具有 AAV 复制和包装功能的重组 1 型单纯疱疹病毒——HSV1-rc/ΔUL2 为我们先前重组产生[1], 在 BHK-21 细胞上传代、扩增. 用于细胞大规模培养的转瓶(110 mm × 480 mm)及转瓶机为 Wheaton 公司产品.

(ⅱ) 表达 GFP 的 rAAV(rAAV-GFP)的生产. 将 BHK/SG1 细胞扩大培养后接种到 5 个转瓶中, 培养液体积为每个转瓶 200 mL. 细胞长满后(共约 4×10^9 个细胞)将培养液倾出, 加 10 mL

辅助病毒 HSV-rc/ΔUL2(MOI = 0. 1), 低速转动吸附病毒 2 h. 每个转瓶加 200 mL 无血清 1640 培养液 37℃低速转动培养. 为避免纯化时体积过大, 24~36 h 后, 将每个转瓶中的液体弃去 100 mL. 继续培养 24~48 h 直到细胞完全病变、容易脱落时, 盖紧瓶盖剧烈振摇, 将瓶壁上的细胞全部洗脱至培养液中. 收集合并 5 个转瓶的培养物.

(ⅲ) rAAV 的纯化. 步骤见图 1. 将收集的培养物定义为初始物. 加入 1/10 体积的氯仿, 置于 37℃摇床中剧烈振摇 1 h, 加入固体氯化钠至终浓度 1 mol/L, 振摇溶解. 4℃, 12 000 r/min 离心 15 min. 取出上层水相, 弃去氯仿和沉淀. 加 PEG8000 至终浓度 10%(*w*/*v*), 振摇溶解后冰浴放置 1 h, 11 000 r/min 离心 15 min. 将上清弃去, 用 5 mL PBS^{2+} 缓冲液将各离心管管底和管壁上的沉淀吹打洗脱下来合并, 将其分装至 1. 5 mL 塑料离心管中(0.6 mL/管), 此时的 rAAV 定义为中间产物. 加入 DNase 和 RNase 至终浓度 1 μg/mL, 室温下消化 30 min. 加等体积的氯仿抽提. 4℃, 12 000 r/min 离心 5 min, 在无菌操作下小心吸出上层水相. 该液体即为浓缩和纯化的 rAAV-GFP 病毒液, 定义为终产物. 总回收率 = 终产物的感染性病毒颗粒数/初始物的感染性病毒颗粒数.

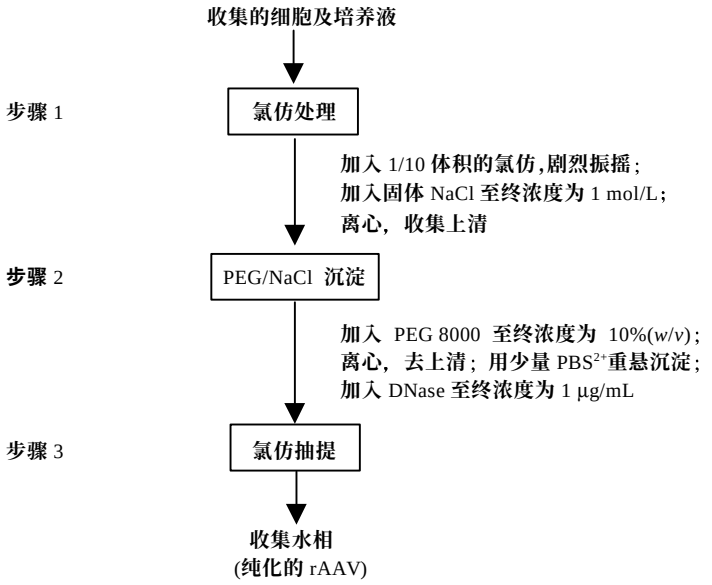


图 1 用三步法分离、浓缩、纯化 rAAV 的示意图

(ⅳ) 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)检测 rAAV 的纯度. 按文献[9]方法灌制 SDS-PAGE 分离胶和积层胶,分离胶浓度为 10%. 分别取纯化的病毒液和最后一步氯仿抽提前的病毒液 20 μL, 加 2×加样缓冲液 20 μL, 沸水浴 3 min. 每个加样孔加样 10 μL. 电泳完毕后用考马斯亮蓝染色, 用相应的脱色液脱色直到显出低背景、清晰的条带.

(ⅴ) rAAV 病毒的电子显微镜分析. 纯化的 rAAV-GFP 经钨酸盐负染后, 置于 150 目的镍网上, 电子显微镜观察.

(ⅵ) rAAV 病毒物理滴度检测. 用地高辛标记(Boehinger Mannhein 试剂盒)的 GFP 探针点杂交方法检测纯化的病毒液中 rAAV-GFP 的物理滴度(病毒颗粒数/mL). 将质粒 pSNAV-GFP 准确定量, 用稀释缓冲液以一系列稀释度稀释后点到尼龙膜上. 取 10 μL 纯化的病毒液用

PBS^{2+}缓冲液稀释 10 倍，加 DNase 和 RNase 至终浓度 1 μg/mL，37℃消化 1 h. 沸水浴 5 min 之后置于冰浴中. 用稀释缓冲液以 1∶10 作系列稀释后点膜. 120℃烤膜 30 min. 68℃预杂交 1 h. 加探针 68℃杂交过夜，洗膜，显色. 通过计算 pSNAV-GFP 的分子数，再乘以与其杂交信号强度一致的病毒液样品的稀释倍数得出 rAAV-GFP 的物理滴度.

(Ⅶ) rAAV-GFP 感染性滴度的测定. 在 24 孔培养板上接种 HeLa 细胞，5×10^5细胞/孔. 培养过夜后，吸出培养液；取 10 μL 纯化的病毒液稀释至 1 mL，以 1∶10 作系列稀释，每孔加不同稀释度的病毒液 0.5 mL，37℃培养 1 h. 每孔加 5 型腺病毒(Ad5)50 μL(MOI = 5)及培养液 0.5 mL. 37℃培养 36 h 后在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光细胞，计数其中某孔的绿色细胞数 n($10<n<100$). rAAV-GFP 病毒滴度(转导单位/mL) = $n \times$ 稀释倍数 $\times$ 1 000/5.

2 结果

2.1 rAAV-GFP 的分离、浓缩与纯化

纯化步骤的流程图见图 1，主要包括氯仿处理-PEG/NaCl 沉淀-氯仿抽提 3 个步骤. 纯化的终产物用 5 mL PBS^{2+}即可溶解，与 500 mL 的起始物相比浓缩至原体积的 1/100，总回收率约为 90%.

2.2 rAAV-GFP 的纯度

AAV-2 的外壳由 3 种蛋白质组成，即 VP1, VP2, VP3，分子量依次为 87, 72, 62 ku. AAV 病毒颗粒中 VP1, VP2, VP3 蛋白的比例约为 10∶1∶1，在 SDS-PAGE 电泳后形成 3 条特征性条带. 用 SDS-PAGE 分析了不同阶段 rAAV- GFP 的纯度，结果见图 2. 在 rAAV 的终产物(泳道 2)和中间产物(泳道 3)中均可见到代表 AAV 外壳蛋白 VP1, VP2, VP3 的 3 条带，在中间产物中还可见到各种分子量的其他蛋白质，而终产物的背景则非常低，这表明氯仿抽提可以有效地去除杂蛋白，而 rAAV 没有明显的损失. 经计算机扫描分析，在 rAAV-GFP 的终产物中，rAAV-GFP 的纯度大于 95%. 在等体积未经浓缩的 rAAV-GFP 起始物中未见明显的外壳蛋白. 需要指出的是，与其他研究者所采用的银染或 Western 印迹分析方法相比，本文采用的考马斯亮蓝染色方法的灵敏度较低，提示检测到的外壳蛋白浓度相当高.

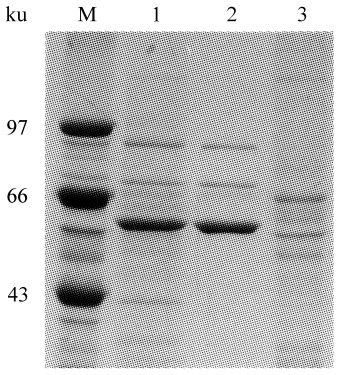


图 2 rAAV-GFP 纯化的不同阶段 SDS-PAGE 考马斯亮蓝的染色结果

M 为分子量标准蛋白(Promega)；1 为未经纯化的 rAAV-GFP(从 500 mL 起始物中取 5 μL)；2 为纯化的 rAAV-GFP(从 5 mL 终产物中取 5 μL)；3 为未经最后一步抽提的 rAAV-GFP(从 5 mL 中间产物中取 5 μL)

2.3 纯化后 rAAV-GFP 的电子显微镜分析

rAAV-GFP 经负染后用电子显微镜观察，结果见图 3. 大量的 rAAV 颗粒清晰可见，绝大多数病毒颗粒是完整的，少数颗粒是病毒装配的中间形式，未见病毒的空壳形式. 结果表明，纯化后的 rAAV-GFP 终产物中含有高浓度、高纯度的 rAAV 颗粒.

2.4 纯化后 rAAV-GFP 的滴度

用地高辛标记的 GFP 基因作探针，点杂交检测了病毒颗粒中的 rAAV 基因组. 纯化后

rAAV-GFP 的物理滴度约为 5×10^{13} 病毒颗粒/mL. 用转基因表达的方法测定纯化后 rAAV-GFP 的感染性滴度约为 2×10^{12} 转导单位/mL. 病毒颗粒总数与感染性病毒的比例为 25, 说明经过一系列处理后, rAAV 的感染能力未见明显丧失.

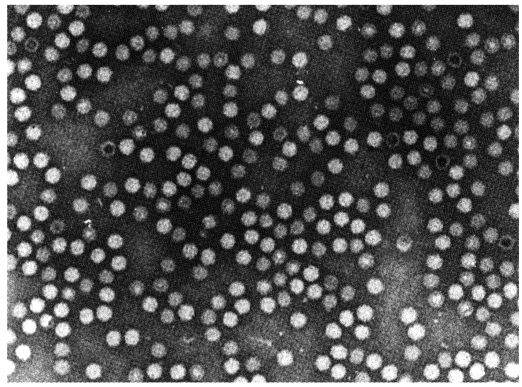


图 3 纯化的 rAAV-GFP 的电子显微镜分析 ($\times$54 800)

3 讨论

由于 rAAV 在基因治疗研究中的地位正在日益提高, 有关 rAAV 规模化生产的策略研究屡见报道, 然而对于 rAAV 纯化方法的研究却不多见. 随着 rAAV 大规模生产技术的成熟, 解决 rAAV 的纯化问题显得尤为重要. 传统的纯化方法[3]采用硫酸铵分步盐析法将 rAAV 与细胞碎片分离并使之浓缩, 然后用 2~3 轮氯化铯梯度超离心获得 rAAV 组分, 最后用透析方法除去氯化铯和其他盐类. 这种方法费时费力、回收率低, 同时 rAAV 的感染性也有较大的损失, 而且, 氯化铯对人体具有潜在的毒性, 因此, 这种方法已逐渐被淘汰. 许多研究者致力于发展新的纯化方法. Grimm 等人[8]利用能特异性识别成熟 AAV 毒粒的单克隆抗体 A20[5], 发展了一种免疫亲和柱层析的 rAAV 纯化方法, 能在一个工作日内完成纯化步骤, 回收率达到 70%, 纯度达到 80%. 由于肝素是 AAV 天然受体的类似物[4], 另外两个实验室分别发展了肝素亲和层析的纯化方法. 采用这种纯化方法的潜在问题是很多细胞蛋白质也同肝素结合, 因此需要解决如何去除杂蛋白的问题. Zolotukhin 等人[7]采取的办法是先用碘狄醇密度梯度离心, 得到"半纯化"的 rAAV, 再用肝素亲和层析进行纯化, 可使回收率达到 50%~70%, 纯度可达 99%. Clark 等人[6]则先用脱氧胆酸裂解细胞, 离心得到上清后 56℃加热 45 min 灭活辅助病毒. 脱氧胆酸裂解与热处理可使蛋白变性形成絮状沉淀, 离心去除沉淀后再进行肝素亲和层析, 结果表明这种方法回收率高于 70%, 纯度可达 99%. 尽管这些方法使 rAAV 的纯化过程大大简化, 回收率有较大提高, 但亦有成本高、处理大体积样品能力有限、实验条件和仪器设备要求高等缺点, 因此仍需寻找快速、简便、高效、低成本的纯化方法.

AAV-2 的外壳对氯仿具有天然的抵抗性, 而 rAAV 与 AAV-2 的外壳完全一样, 因此氯仿有可能成为分离和纯化 rAAV 的有效工具. 我们参照了λ 噬菌体的分离和纯化方法[10]并加以改进, 提出了"氯仿处理-PEG/NaCl 沉淀-氯仿抽提"的 rAAV 纯化方法. 第 1 步氯仿处理可达到 3 个目的: (ⅰ) 可彻底灭活辅助病毒, 同时免去了热灭活(56℃, 30~60 min)的步骤; (ⅱ) 可以很容易地裂解细胞, 与常规的方法(反复冻融 3 次)相比, rAAV 的释放更快速、有效; (ⅲ) 可使大量的细胞蛋白质变性、沉淀, 易于离心除去. 第 2 步采用 1 mol/L NaCl/10%PEG 代替硫酸铵对 rAAV 进行浓缩, 可使 rAAV 浓缩至原体积的 1/100. 最后一步氯仿抽提可非常有效地除去残留的 PEG 及不需要的蛋白质, 同时并不损失 rAAV. 整个纯化过程在 4 h 内即可完成, 纯化后的 rAAV 终产物可在 4℃保存 1 个月以上而滴度没有明显降低. 残留的少量氯仿可通过生物化学方法进一步除去.

与传统的氯化铯密度梯度离心方法相比，本方法快速、回收率高，同时不降低 rAAV 的感染能力. 与最近发展起来的几种柱层析方法相比，本方法成本低廉，在工艺上有明显优势. 用本方法获得的 rAAV 可用于基因治疗的体外实验和动物实验，进一步纯化后可获得临床级的 AAV 产品. 该方法适合于大规模分离和纯化 rAAV 病毒，并使其生产工艺化，尤其适用于以 HSV 病毒为辅助病毒产生的 rAAV 的纯化，也可用于无辅助病毒包装系统或无细胞体外包装系统生产的 rAAV 的纯化.

参 考 文 献

1 伍志坚，吴小兵，侯云德. 具有 AAV 载体包装功能的重组 HSV 的产生. 科学通报, 1999, 44(5): 506~509

2 Conway J E, Rhys C M J ap, Zolotukhin I, et al. High-titer recombinant adeno-associated virus production utilizing a recombinant herpes simplex virus type 1 vector expressing AAV-2 Rep and Cap. Gene Therapy, 1999, 6: 986~993

3 Synder R O, Xiao X, Samulski R J. Production of recombinant adeno-associated viral vectors. In: Dracopoli N, ed. Current Protocols in Human Genetics. New York: John Wiley, 1996

4 Summerford C, Samuski R J. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for high-titer recombinant adeno-associated virus type 2 virions. J Virol, 1998, 72: 1438~1445

5 Wistuba A, Kern A, Weger S, et al. Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 virions. J Virol, 1997, 71: 1341~1352

6 Clark K R, Liu X, McGrath J P, et al. Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. Hum Gene Ther, 1999, 10: 1031~1039

7 Zolotukhin S, Byrne B, Mason E, et al. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. Gene Therapy, 1999, 6: 973~985

8 Grimm D, Kern A, Rittner K, et al. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. Hum Gene Ther, 1998, 9: 2745~2760

9 伍志坚，吴小兵，侯云德. 系列腺病毒伴随病毒载体的构建及表达β-半乳糖苷酶的研究. 病毒学报, 2000, 16(1): 1~6

10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbour Press, 1989

(2000-03-09 收稿, 2000-06-19 收修改稿)