

AAV 载体 -HPV16-HPV18-HPyV 假病毒的构建及其在干细胞人源病毒检查中的应用*

张峒,陈晓菲,董莹莹,曹译丹,王艳辉,李慧婷,刘明月,王新乐,崔梦姗,付欣悦,张瑞瑞,庞琳**,饶春明**

(北京昭衍药物检定研究有限公司,北京 102605)

摘要 目的:以腺相关病毒为载体设计和制备同时含有多种 DNA 病毒基因片段的假病毒,作为阳性对照品用于分子检测领域的人源病毒检测,弥补病毒分子检测方法缺少野生型病毒对照的不足。**方法:**采用腺相关病毒载体作为假病毒的骨架,分别将人乳头瘤病毒 16 型(HPV16)、18 型(包括 HPV18-1、HPV18-2)和人多瘤病毒 HPyV 3 种病毒共 4 个目的基因片段插入到 1 个病毒载体,通过多质粒共转染的方法进行腺相关病毒假病毒的包装。通过细胞感染实验确认假病毒的感染活性并应用荧光定量 PCR 法对假病毒基因组进行定量分析。**结果:**荧光定量 PCR 检测,假病毒中 HPV16、HPV18-1、HPV18-2 和 HPyV 基因组滴度分别为 7.77×10^8 、 6.77×10^8 、 7.04×10^8 、 1.24×10^9 copies · mL⁻¹。假病毒感染 293T/17 细胞 48 h 后,用荧光定量 PCR 可检测到细胞内假病毒包装的 HPV16、HPV18-1、HPV18-2 和 HPyV 的病毒基因序列,其拷贝数分别为 1.30×10^6 、 6.59×10^5 、 6.27×10^5 、 4.17×10^6 copies · mL⁻¹。平行实验制备的报告基因假病毒感染 293T/17 细胞 48 h 后,该细胞在荧光显微镜下可观察到明显的绿色荧光,进一步表明该假病毒具有感染活性。假病毒作为阳性对照在人间充质干细胞进行适用性验证,4 种病毒基因片段的核酸提取荧光定量 PCR 回收率分别为 94.4%、70.7%、83.1% 和 90.9%。**结论:**本研究腺相关病毒包装方法可以产生具有感染活性的多病毒基因假病毒,该假病毒在干细胞样品病毒荧光定量 PCR 检查中可作为阳性对照代替多种野生型病毒,不仅降低了阳性对照制备成本,而且更具有生物安全性,在提高检测效率的同时,还能够更好地对 qPCR 方法从基因提取到基因扩增整个流程进行质量控制。

关键词:人源病毒;人乳头瘤病毒;人多瘤病毒;腺相关病毒假病毒;滴度;阳性对照;分子检测

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2025)01-30-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-1301

The construction of AAV vector-HPV16-HPV18-HPyV pseudoviruses and application in the examination of human-derived viruses in stem cells*

ZHANG Tong, CHEN Xiao-fei, DONG Ying-ying, CAO Yi-dan, WANG Yan-hui, LI Hui-ting, LIU Ming-yue, WANG Xin-yue, CUI Meng-shan, FU Xin-yue, ZHANG Rui-rui, PANG Lin**, RAO Chun-ming**

(JOINN Drug Quality Research and Testing(Beijing)Co., Ltd., Beijing 102605, China)

Abstract Objective: To employ adeno-associated viruses as vectors to design and prepare pseudoviruses

* 北京市科技计划课题:基因修饰免疫细胞和基因治疗药物质量控制关键技术与服务平台建设(Z221100007922015)

** 通信作者 饶春明 Tel:(010)67869966; E-mail: raochunming@joinn-lab.com

庞琳 Tel:(010)67869966; E-mail: panglin@joinn-lab.com

第一作者 Tel:(010)67869966; E-mail: zhangtong@joinn-lab.com

comprising multiple DNA viral gene fragments. These were used as positive controls for the detection of human viruses in the field of molecular testing, thereby compensating for the absence of wild-type viral controls in viral molecular testing methods. **Methods:** The adeno-associated viral vectors served as the backbone of the pseudoviruses, with a total of four target gene fragments from three viruses incorporated: human papillomavirus type 16 (HPV16), type 18 (including HPV18-1 and HPV18-2) and human polyomavirus (HPyV) were, respectively, inserted into one viral vector, and the adeno-associated viral pseudoviruses were packaged by multiple plasmid cotransfection. The infectious activity of the pseudoviruses was confirmed by a cell infection assay, and a quantitative analysis of the pseudoviruses genome was conducted using fluorescence quantitative PCR. **Results:** The titers of HPV16, HPV18-1, HPV18-2, and HPyV genomes in the pseudoviruses were 7.77×10^8 copies \cdot mL⁻¹, 6.77×10^8 copies \cdot mL⁻¹, 7.04×10^8 copies \cdot mL⁻¹, and 1.24×10^9 copies \cdot mL⁻¹, respectively, as determined by fluorescence quantitative PCR. Following a 48 h period of infection in 293T/17 cells, the viral gene sequences of HPV16, HPV18-1, HPV18-2, and HPyV were successfully identified using fluorescence quantitative PCR with the intracellular pseudoviruses. The copy numbers were 1.30×10^6 copies \cdot mL⁻¹, 6.59×10^5 copies \cdot mL⁻¹, 6.27×10^5 copies \cdot mL⁻¹, and 4.17×10^6 copies \cdot mL⁻¹. Following the infection of 293T/17 cells with the reporter gene pseudoviruses for a period of 48 hours, a distinct green fluorescence was evident under a fluorescence microscope, thereby confirming the infectious activity of the pseudoviruses. The pseudoviruses was employed as a positive control for the verification of applicability in human mesenchymal stem cells, and the recoveries of the four viral gene fragments by fluorescence quantitative PCR for nucleic acid extraction were 94.4%, 70.7%, 83.1% and 90.9%, respectively. **Conclusion:** The present study demonstrates that the adeno-associated virus packaging method can be employed to produce a multiviral gene pseudoviruses with infectious activity. The pseudoviruses can be employed as a positive control for the replacement of multiple wild-type viruses in the viral fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) of stem cell samples.

This method not only reduces the financial burden associated with the preparation of positive controls, but it also offers enhanced biosafety and improves the efficiency and quality control of the qPCR method, from the extraction of genes to their amplification.

Keywords: human viruses; human papillomavirus; human polyomavirus; adeno-associated viruses pseudoviruses; titer; positive control; molecular detection

干细胞指一类具有自我更新、多向分化潜能的细胞,在再生医学领域有广阔的应用前景。国外已经有数十种产品获批上市,国内也有多款干细胞新药在进行上市申请,涉及糖尿病、心血管疾病、自身免疫性疾病、神经退行性疾病等诸多疑难杂症^[1-3]。人源细胞基质生产的生物制品或是人源细胞制品存在感染人源病毒的风险^[4],为了保障其安全性,需要对其潜在的人源病毒(包括DNA病毒和RNA病毒)进行检测,可采用荧光定量PCR或RT-qPCR技术。人源细胞中有潜在污染风险的DNA病毒包括人乳头瘤病毒^[5-6](human papillomavirus, HPV)、人多瘤病毒^[7](human polyomaviruses, HPyV)等,这些病毒可以感染人体,导致不同类型的疾病,因此相应的人源生物

制品或原材料的病毒检测应涵盖此类病毒。

2020年版《中华人民共和国药典》^[8]三部生物制品通则的生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制中规定,应根据细胞系、株种属来源、组织来源及供体健康状况等确定检测病毒的种类。牛源病毒、猪源病毒、鼠细小病毒等内外源病毒检查均采用指示细胞感染法和(或)细胞免疫荧光法进行检测。国内关于干细胞治疗的指导原则^[9]以及国外的相关法规^[10-12]同样对病毒检查有相关的要求。但由于一些人源病毒在实验室操作风险较高或不易获得野生型毒株,无法在P2实验室内经细胞感染法进行内外源病毒因子检查,因此分子生物学方法目前作为种属特异性病毒检查中人源病毒检查的主要检测

手段,相比于动物试验细胞感染法,分子生物学方法具有灵敏度高、速度快、成本低等优势。但是由于部分病毒野生型毒株的不易获得性,对于以上几种人源病毒,很难得到可用的野生型毒株作为质控对照品,常以质粒标准品作为阳性对照,由于质粒与病毒在结构方面存在较大差异,很难对病毒提取过程进行有效质控。根据待检的目的病毒而设计包装的重组假病毒可弥补病毒分子检测中阳性质控不全面的缺陷。

假病毒是一种人工修饰后的病毒,模拟相应病毒的生物活性或是特异性的核酸序列,达到和真实病毒相近的分析特性,所使用的病毒载体通常是复制缺陷的,因此也具备较高的安全性^[13]。腺相关病毒是一种 DNA 病毒,常被用作基因治疗领域的递送载体^[14-15],其基因组可以被改变为外源基因表达盒,并且可以方便快捷地进行包装^[16],是一个合适的 DNA 假病毒选择。在分子检测领域,对病毒类核酸检测时常需要阳性质控品,由于病毒的核酸具有外壳保护,因此,含相应基因的假病毒与常用的裸核酸如质粒比较更具有可比性。假病毒具有生物安全性的同时可作为测量标准,可用于病毒核酸定性和定量测量方法的验证评价以及实验室的质量控制。

本研究对以上多种人源病毒进行假病毒设计和制备,在同一个 AAV 病毒载体内设计包装 4 种 DNA 病毒扩增序列,使得一种阳性质控对照品同时满足 4 种病毒核酸片段检测的需求,且同一载体内的不同病毒序列的基因组滴度相似,因此既解决了病毒核酸检测阳性质控品的缺陷,又提高了检测效率,降低了成

本。将该假病毒作为阳性对照品在人间充质干细胞样品病毒检测中进行适用性验证,获得理想结果,因此该 AAV 载体假病毒可作为 Q-PCR 阳性对照品应用于干细胞产品人源 DNA 病毒的检查。

1 材料与样品

1.1 主要仪器

1579-AC-GP 生物安全柜购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司, HCP-258 培养箱购自青岛海尔生物医疗股份有限公司, ECLIPSE Ts2R 荧光显微镜购自尼康精机(上海)有限公司, Applied Biosystems™ 7500 实时荧光定量 PCR 仪购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司, Sorvall ST8R 离心机购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 材料

DMEM、FBS 购自 Gibco 公司, Sinofection 转染试剂和 SuperNuclease 核酸酶购自 Sino biological 公司。HEK 293T/17 细胞购自协和细胞中心。pAAV-GFP(货号 32395)、pAdDeltaF6(货号 112867)和 pAAV2, 2(货号 104963)均购自 Addgene 公司。HPV16、HPV18 和 HPyV 的引物、探针和构建于 pUC-18 质粒中的模板 DNA(表 1)由北京擎科生物科技股份有限公司合成。HPV16-HPV18-HPyV 基因序列由北京擎科生物科技股份有限公司合成。PBS(货号 20012-027)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 样品基因组提取试剂盒 FastPure® Viral DNA/RNA Mini Kit Pro(货号 RC323)和探针法定量 PCR 检测试剂盒(货号 Q513)均购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

表 1 研究中 HPV16-HPV18-HPyV 假病毒使用的引物、探针和模板 DNA

Tab. 1 Primers, probes and template DNAs used in this research

用途 (purpose)	名称 (name)	核酸序列 (nucleotide sequence)
HPV16 正向引物 (forward primer for HPV16)	HPV16-F	5- CAGATACACAGCGGCTGGTTT -3
HPV16 反向引物 (reverse primer for HPV16)	HPV16-R	5- TGCATTTGCTGCATAAGCACTA -3
HPV16 荧光探针 (fluorescent probe for HPV16)	HPV16-P	5- FAM-TGACCACGACCTACCTCAACACCTACACAGG-TAMRA -3
HPV18 正向引物 1 (forward primer for HPV18-1)	HPV18-F1	5- CTTAGATCAATATCCCCTTGGACG -3
HPV18 反向引物 1 (reverse primer for HPV18-1)	HPV18-R1	5- TTGGCAGGTTTAGAAGACGTAG -3
HPV18 荧光探针 1 (fluorescent probe for HPV18-1)	HPV18-P1	5- FAM-TTTTGGTTCAGGCTGGATTGCGTCGC-BHQ-1-3
HPV18 正向引物 2 (forward primer for HPV18-2)	HPV18-F2	5- AGAGGATTGGAACCTTTGGTGT -3
HPV18 反向引物 2 (reverse primer for HPV18-2)	HPV18-R2	5- GCAGCATCCTTTTGACAGCTAAT -3
HPV18 荧光探针 2 (fluorescent probe for HPV18-2)	HPV18-P2	5- VIC-CCCGCCAACTACTAGTTTGGTGGATACAT-BHQ-1 -3
HPyV 正向引物 (forward primer for HPyV)	HPyV-F	5- AGTCTTTAGGGTCTTCTACCTTT -3
HPyV 反向引物 (reverse primer for HPyV)	HPyV-R	5- GGTGCCAACCTATGGAACAG -3
HPyV 荧光探针 (fluorescent probe for HPyV)	HPyV-P	5-FAM-TCATCACTGGCAAACAT-TAMRA -3

表 1 (续)

用途 (purpose)	名称 (name)	核酸序列 (nucleotide sequence)
HPV16 模板 DNA (template DNA for HPV16)	p-HPV16	5- ATATGTTGCACGCACAAACATATATTATCATGCAGGAACATCCAGACTAC TTGCAGTTGGACATCCCTATTTTCCTATTAATAAACCTAACAAATAACAAAATA TTAGTTCCTAAAGTATCAGGATTACAATACAGGGTATTTAGAATACATTTACC TGACCCCAATAAGTTTGGTTTTCTGACACCTCATTTTATAATCCAGATA C CAGCGGCTGGTTTGGGCTGTGTAGGTGTGAGGTAGGTCGTGGTCAG CCATTAGGTGTGGGCATTAGTGGCCATCCTTTATAATAAAATTGGATGACAC AGAAAATGCTAGTGCTTATGCAGCAAATGCAGGTGTGGATAATAGAGA ATGTATATCTATGGATTACAAACAAACACAATTGTGTTTAAATTGGTTGCAAAC CACCTATAGGGGAACACTGGGGCAAAGGATCCCCATGTACCAATGTTGCAGT AAATCCAGGTGATTGTCCACCATTAGAGTTAATAAACACAGTTATTCAGGAT GGTGATATGTTGATACTGCTTTGG-3
HPV18 模板 DNA (template DNA for HPV18)	p-HPV18	5- AACTGCAGATGTTATGTCCTATATTCATAGTATGAATAGCAGTATTTT AGA GGATTGGAACCTTGGTGTTC CCCCCC CCGCAACTACTAGTTGGTGGAT ACATATCGTTTTGTACAATCTGTGCTATTACCTGTCAAAAGGATGCTGC ACCGGCTGAAAATAAGGATCCCTATGATAAGTTAAAGTTTGGAAATGTGGAT TTAAAGGAAAAGTTTCTTTAGACTTAGATCAATATCCCTTGGACGTA AATTTTGGTTCAGGCTGGATTGCGTCGCAAGCCACCATAGGCCCTCGCA AACGTTCTGCTCCATCTGCCACTACGCTCTTCTAAACCTGCCAA CGCTGTG CGGTACGTGCCAGGAAGTAATATGTGTGTGT-3
HPyV 模板 DNA (template DNA for HPyV)	p-HPyV	5-TCTATGTCTATGTGGAGTAAAAAGAATAAATATTATGCCAGCACACAT GTGCTACTAATAAAAAGTTACAGAATATTTTCCATAAGTTTTTATACAGAA TTTGAGCTTTTTCTTTAGTAGTATACACAGCAAAGCAGGCAAGGGTCTATTA CTAAATACAGCTTGACTAAGAAACTGGTGTAGATCAGAAGGAA AGTCTTTA GGGTCTTCTACCTTTCTTTTTCTTGGGTGCTGTGGAGTGTGAGAATCT GCTGTTGCTTCT TCATCACTGGCAAACAT ATCTTCATGGCAAAATAAATCTT CATCCCATTTTTCAATAAAGGAGCTCCACCAGGACTCCCACTCTTCT GTTC ATAGGTTGGCACCTATAAAAAAATAATTA CTTAGGGCCTTTAAATATTTT CTTATTTATCTAAATATAAGTTAGTTACCTTAAAGCTTTAGATCTCTGAAGGG AGTTTCTCCAATATTTGGACCCACCATTGCAGAGTTTCTTCAAGTTAGGTCTA AGCCAAACCACTGTGTGAAGCAGTCAATGCAGTAGCAATCTATCCAAACCAA GGCC-3

注 (note): 模板 DNA 中,加粗部分代表引物结合序列,加粗斜体代表探针结合序列 (the bold letters present the primer binding nucleotides, the bold-italic letters present the probe-binding nucleotides); 双下划线部分为 HPV18-2 引物扩增部分,单下划线部分为 HPV18-1 引物扩增部分 (the double underlined letters present the amplification sequence of HPV18-2, the underlined letters present the amplification sequence of HPV18-1)

1.3 样品

人间充质干细胞 (human mesenchymal stem cell, HMSC) 为供试品留样。

2 方法与结果

2.1 病毒载体设计与构建

在 NCBI 数据库中检索 3 种病毒的全基因组序列,选择保守序列进行引物设计,据此分别设计包含 HPV16、HPV18 (包含 HPV18-1 和 HPV18-2 2 个序列)、HPyV 组合假病毒的病毒保守序列 (假病毒载体插入基因序列信息同表 1 中模板 DNA)。

构建含有 HPV16、HPV18 和 HPyV 3 段人源病毒保守序列的腺相关病毒载体,将 3 段人源病毒序列进

行组合,以 2 型腺相关病毒载体 pAAV-GFP (addgene, 32395) 为骨架,病毒基因序列插入位置为腺相关病毒载体 SacI 至 HindIII 序列之间,得到 pAAV-HPV16-HPV18-HPyV,构建完成后进行酶切和测序验证。提取 pAAV-HPV16-HPV18-HPyV 质粒以及 pAdDeltaF6 质粒和 pAAV2.2 质粒,用于包装 2 型血清型衣壳的腺相关病毒。

以三质粒腺相关病毒包装系统进行假病毒的设计,病毒载体结构和插入序列位置如图 1 所示。构建的病毒载体通过双酶切的方式验证基因插入成功,pAAV-HPV16-HPV18-HPyV 载体采用 NcoI/XhoI 双酶切进行验证,均可见 2 条明显的切割条带 (图 2)。

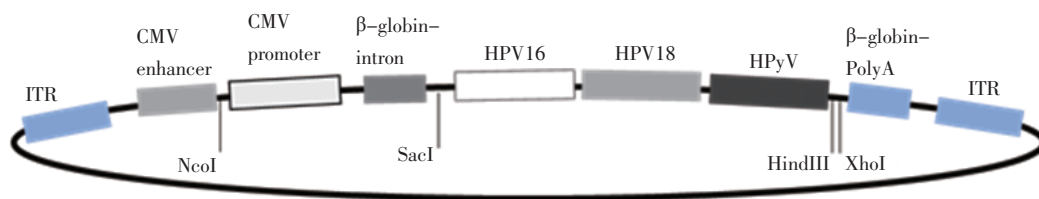
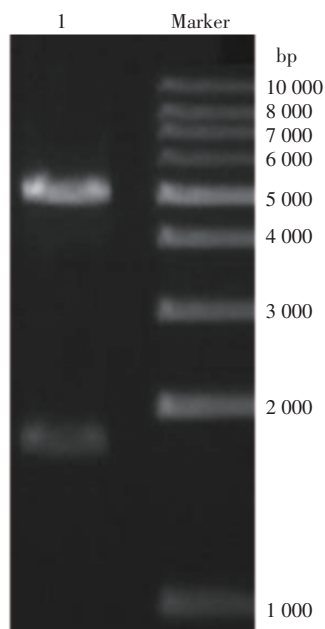


图1 人源病毒假病毒载体结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the structure of the HPV16-HPV18-HPyV pseudoviruses vector



1. pAAV-HPV16-HPV18-HPyV 载体 NcoI/XhoI 双酶切 (pAAV-HPV16-HPV18-HPyV vector digested by NcoI and XhoI)

图2 载体双酶切结果图

Fig. 2 Results of vector double enzyme digestion

2.2 病毒载体包装与收获

分别包装只含有 eGFP 报告基因的病毒对照 PSV-eGFP 以及含有 HPV16-HPV18-HPyV 序列的假病毒 PSV-HPV16-HPV18-HPyV。HEK293T/17 细胞复苏后至少传代 1 次后使用。于接种前一天按 1×10^5 cells \cdot cm⁻² 进行铺板, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜。转染前 2 h, 汇合度达到 60%, 将培养基更换为无血清培养基。按照 0.2 μg \cdot cm⁻² 总质粒 DNA 用量, 将质粒 DNA 用 DMEM 稀释, 按照 1 μg 质粒 DNA 使用 1 μL 转染试剂用量, 将 Sinofection 转染试剂用 DMEM 稀释。将质粒 DNA 和转染试剂稀释液合并, 轻轻混合并在室温下孵育 5 min。将培养基吸出, 加入 DNA 转染试剂复合物, 轻轻混匀, 在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中孵育 4~6 h 后更换为含有 10% FBS 的 DMEM 完全培养基。

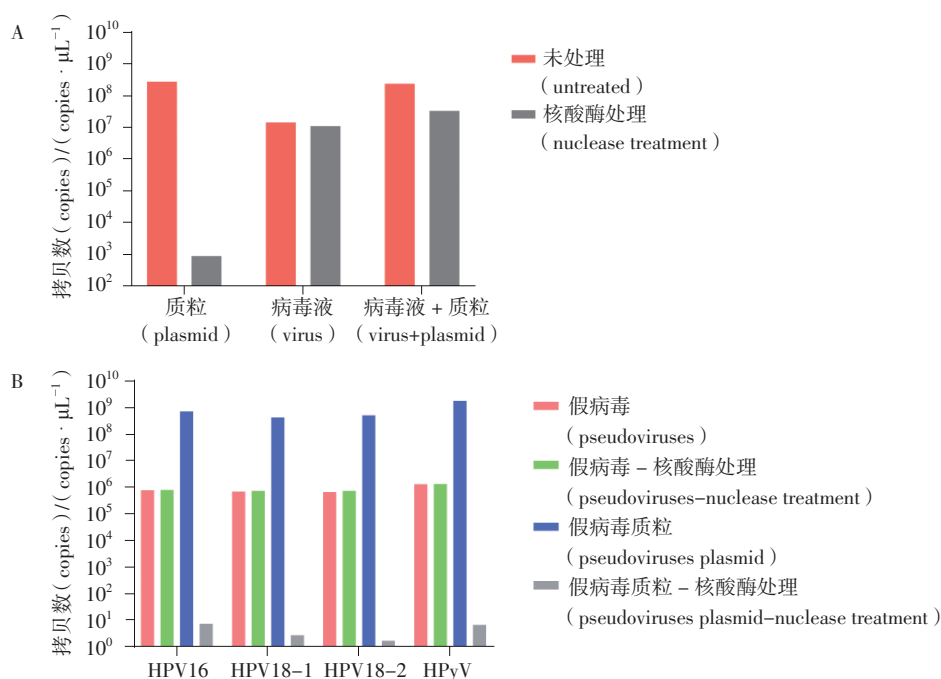
转染后 48 h, 观察细胞状态并在荧光显微镜拍摄绿色荧光报告基因的表达情况。明场观察下, 转染了假病毒质粒、转染了报告基因 eGFP 以及未转染的细胞状态相似, 含 eGFP 的报告基因的腺相关病毒, 在转染后 80% 可以明显观察到绿色荧光, 说明包装病毒过程中细胞转染效率较高。

转染后 72 h 收获培养上清, 3 000 g, 在 4 °C 下离心 5 min, 用 0.45 μm 滤膜过滤得到病毒液, 分装保存于 -80 °C 备用。

2.3 病毒载体核酸酶处理

收获的病毒上清液使用核酸酶进行处理, 核酸酶终浓度为 50 U \cdot mL⁻¹, 条件为 4 °C 下处理 4 h, 以去除病毒液中游离核酸的干扰。为确认核酸酶消化游离核酸的效果, 将 PSV-HPV16-HPV18-HPyV 假病毒与 5×10^8 copies \cdot μL⁻¹ 质粒按照 1 : 1 比例进行混合, 同时设立单独假病毒对照和单独质粒对照, 比较核酸酶消化前后各组基因组滴度的变化。提取病毒基因组前 80 °C 处理 30 min 对病毒进行灭活处理。

对比质粒和假病毒通过核酸酶处理前后 HPV16 基因拷贝数。通过核酸酶处理, 质粒的基因拷贝数可从 10^8 copies \cdot μL⁻¹ 下降至 10^2 copies \cdot μL⁻¹, 10^7 copies \cdot μL⁻¹ 滴度假病毒和 10^8 copies \cdot μL⁻¹ 质粒混合样品在核酸酶处理后基因组滴度下降至 10^7 copies \cdot μL⁻¹ (图 3), 说明假病毒收获液中有残留质粒基因, 核酸酶可去除 9.9×10^7 copies \cdot μL⁻¹ 的残留质粒, 通过核酸酶处理的方式, 可保证包装的假病毒质控对照品滴度的准确性。核酸酶处理前后假病毒收获液分别用 HPV16、HPV18-1、HPV18-2 和 HPyV 目的基因的引物对其进行扩增检测, 结果显示核酸酶处理前拷贝数 $6.6 \times 10^5 \sim 1.3 \times 10^6$ copies \cdot μL⁻¹, 核酸酶处理后相比处理前基因拷贝数变化范围在 1.9%~6.7%, 没有明显变化, 提示通过质粒转染表达收获的假病毒液中含有较少的游离基因。



A. 使用 4 °C 孵育 4 h 的条件进行病毒样品的质粒去除效果 (plasmid removal effect of virus samples using nuclease 4 °C incubation for 4 h)

B. 不同假病毒序列核酸酶处理的对比结果 (comparative results of nuclease treatment of different pseudoviruses sequence)

图 3 假病毒收获步骤去除质粒污染结果

Fig. 3 Pseudoviruses harvesting steps to remove plasmid pollution

2.4 假病毒检测

使用 qPCR 的方法对包装得到的假病毒进行滴度检测。按照 FastPure® Viral DNA/RNA Mini Kit Pro 试剂盒说明书提取病毒基因组, -20 °C 冻存备用, 使用假病毒对应的 3 种病毒基因的引物对和探针对其进行荧光定量 PCR 扩增, 扩增体系: 2 × AceQ Universal U+Probe Master Mix V2 15 μL; 上下游引物 (10 μmol · L⁻¹) 各 0.75 μL, 探针 (10 μmol · L⁻¹) 0.38 μL, 模板 7.5 μL, 无核酸酶水补足至 30 μL。在 Applied biosystems ABI 7500 Real Time PCR 仪上完成 qPCR 反应, 50 °C 下反应 2 min, 95 °C 下反应 10 min, 然后按以上参数进行 40 个循环: 95 °C 15 s, 58 °C 1 min, 收集荧光信号。分别以含有病毒序列的质粒作为标

准品质粒, 梯度稀释至 2 × 10⁷~2 × 10³ copies · μL⁻¹ 5 个浓度点作为标准曲线各点, 稀释标准品浓度至 20 copies · μL⁻¹ 得到灵敏度对样品。qPCR 反应结束后, 分析数据, 数值结果以 Ct 值为纵坐标, 以拷贝数的对数为横坐标拟合标准曲线, 计算假病毒载体中不同病毒基因的核酸滴度。

PSV-HPV16-HPV18-HPyV 假病毒 qPCR 检测病毒基因组 3 次平均滴度分别为 7.77 × 10⁸ copies · mL⁻¹, HPV18-1 (引物组 1, FAM 荧光信号) 病毒滴度为 6.77 × 10⁸ copies · mL⁻¹, HPV18-2 (引物组 2, VIC 荧光信号) 滴度为 7.04 × 10⁸ copies · mL⁻¹, HPyV 病毒滴度为 1.24 × 10⁹ copies · mL⁻¹。假病毒 qPCR 检测结果详见表 2。

表 2 假病毒基因组滴度检测结果

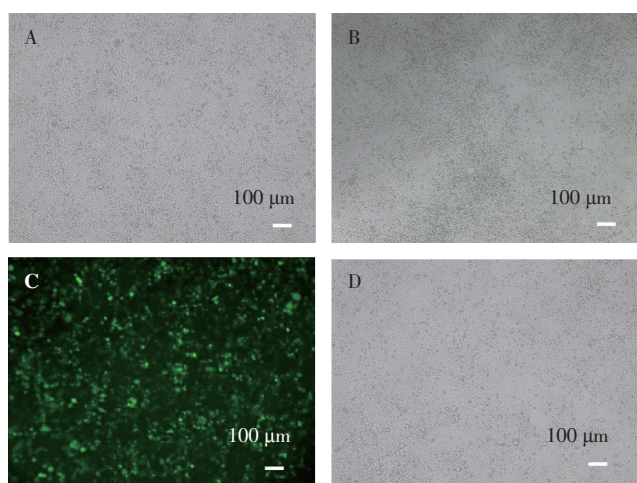
Tab. 2 Result of pseudoviruses genome copies titer

	滴度 (titer) / (copies · mL ⁻¹)			平均值 (average value) / (copies · mL ⁻¹)	标准差 (standard deviation) / (copies · mL ⁻¹)	RSD/%
	1	2	3			
HPV16	7.67 × 10 ⁸	7.83 × 10 ⁸	7.81 × 10 ⁸	7.77 × 10 ⁸	0.07 × 10 ⁸	0.93
HPV18-1	6.70 × 10 ⁸	6.45 × 10 ⁸	7.16 × 10 ⁸	6.77 × 10 ⁸	0.30 × 10 ⁸	4.4
HPV18-2	6.89 × 10 ⁸	6.65 × 10 ⁸	7.58 × 10 ⁸	7.04 × 10 ⁸	0.39 × 10 ⁸	5.6
HPyV	1.13 × 10 ⁹	1.46 × 10 ⁹	1.14 × 10 ⁹	1.24 × 10 ⁹	0.16 × 10 ⁹	12.5

2.5 假病毒感染性实验

为验证包装的假病毒是否具有感染性,进行了细胞感染实验。将 293T/17 细胞以完全培养基按照 1×10^5 cells \cdot cm⁻² 接种于 12 孔板,培养过夜。将假病毒用含 5%FBS 的 DMEM 维持培养基稀释 10 倍,每孔接种 1 mL,37 °C 孵育 2 h 后更换为新鲜的维持培养基。感染 48 h 后在荧光显微镜下观察荧光表达情况,收获病毒感染后的细胞,用 1 mL PBS 清洗 2 次后提取细胞基因组,使用相应的引物探针检测细胞内的病毒保守序列。

以 293T/17 细胞作为靶细胞,感染 48 h 后观察细胞状态以及绿色荧光表达情况,结果可见,AAV 载体假病毒、报告基因病毒和未感染组细胞形态类似,均无明显细胞病变和死亡,其中报告基因病毒在荧光显微镜下可以观察到明显的绿色荧光,说明本方法可以包装出有感染性的病毒(图 4)。



A. 未感染 (uninfected) B. PSV-eGFP 感染 (infected by PSV-eGFP)
C. PSV-eGFP 感染后荧光观察 (fluorescence observation after PSV-eGFP infection) D. PSV-HPV16-HPV18-HPyV 感染 (infected by PSV-HPV16-HPV18-HPyV)

图 4 假病毒感染活性检测

Fig. 4 Infectivity activity detection of pseudoviruses

对感染后细胞基因组进行检测,可检测到假病毒内包装的 HPV16、HPV18-1、HPV18-2 和 HPyV 的病毒序列,其拷贝数分别为 1.30×10^6 、 6.59×10^5 、 6.27×10^5 、 4.17×10^6 copies \cdot mL⁻¹,证明本研究所用的腺相关病毒包装方法可以产生具有感染活性的病毒(图 5)。

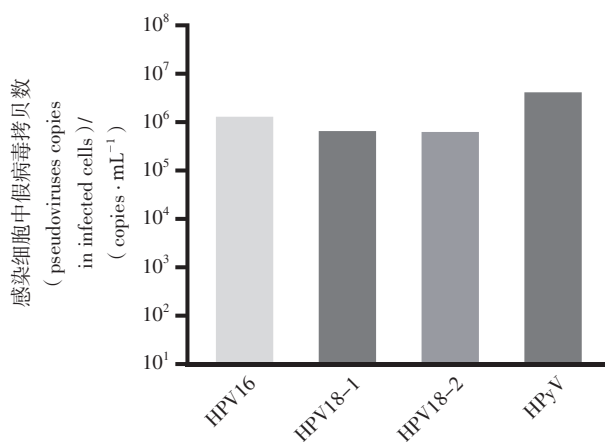


图 5 感染细胞中假病毒拷贝数检测

Fig. 5 Detection of pseudoviruses copies in infected cells

2.6 含人源病毒基因的假病毒在细胞制品病毒核酸检测中的应用

HMSC 制成每管 2.5×10^6 cells 的细胞沉淀用于 HPV16、HPV18、HPyV 病毒 qPCR 法检测。检测过程中设置滴度为 200 copies \cdot μL⁻¹ 的 PSV-HPV16-HPV18-HPyV 假病毒为阳性对照、加入相同滴度的假病毒于细胞沉淀样品为适应性样品,同时设立阴性对照和无模版对照,检测方法同“2.4”项假病毒检测。

将制备好的假病毒 PSVHPV16-HPV18-HPyV 应用于人间充质干细胞的病毒核酸检测,以 200 copies \cdot μL⁻¹ 滴度的 PSVHPV16-HPV18-HPyV 为阳性对照,相同滴度的阳性对照加入到 2.5×10^6 个细胞的间充质干细胞样品中作为样品适用性对照,以确定样品中是否存在影响核酸提取和检测的干扰物质。结果显示,假病毒阳性对照提取后进行 PCR 扩增的 HPV16、HPV18-1、HPV18-2 和 HPyV 基因组滴度分别为 266、181、195、143 copies \cdot μL⁻¹,适用性样品检测到的基因组滴度分别为 251、128、162、130 copies \cdot μL⁻¹,4 种病毒基因的回收率分别为 94.4%、70.7%、83.1%、90.9%。阴性对照和检测的干细胞样品中均未检出病毒的序列。说明假病毒可在细胞基质样品的病毒核酸检查中模拟野生型病毒,作为阳性质控对照。

3 讨论

近年来,随着细胞和基因治疗领域的兴起,越来越多的人源干细胞、修饰的免疫细胞和人源的病毒载体不断涌现,由于其中不乏一些活细胞制剂产品,从生产到临床使用之间的周期较短,因此需要更为快速的检测方法。基于 qPCR 的检测方法具有快速、灵敏的优势,因此可应用于干细胞制剂病毒安全性检查。

AAV 载体构建的假病毒可以作为 DNA 病毒 qPCR 检测中的阳性质控品,保证检测的可靠性。

本研究所选择的 3 种病毒均为常见的人源病毒。人乳头瘤病毒(HPV)是一种主要通过性传播的传染性病原体,可能导致男性和女性患上 HPV 相关癌症,几乎所有的宫颈癌都与 HPV 有关,头颈癌(HNC)、肛门生殖器癌等与 HPV 感染有关。高危型的 HPV16 和 HPV18 导致最多的 HPV 相关癌症和约 70% 的宫颈癌和癌前宫颈病变。人多瘤病毒原发感染主要为无症状,再度激活可能会导致泌尿系统疾病^[17],或是致命性的中枢神经系统脱髓鞘疾病^[18]。

因此人源病毒 HPV16、HPV18 和 HPyV 病毒的快速检测在人源干细胞产品的病毒安全评价中是十分必要的。国内外监管机构对于人源生物制品或细胞基质的法规及指导原则中都明确要求检测包含 HPV16、HPV18 和 HPyV 病毒在内的一些人间传染病病毒,如《中华人民共和国药典》^[8]、CDE 干细胞指导原则^[9]、FDA 细胞和基因治疗法规^[10-11]、ICH 法规^[12]中均有相关描述。

假病毒与真病毒衣壳结构和理化特性不完全相同,即使相同病毒不同型别也有差异。例如 AAV 病毒颗粒,不同血清型间亦有较大差异,其结构和理化特性是不同的,其感染细胞种类也不尽相同^[19]。因此最完美的方案是选择与待测病毒同一毒株作为病毒分子检测的质控对照品,但部分人源病毒的危险性又导致在一般实验室内很难获取,所以想得到与待测病毒完全一致的病毒对照是现实情况下无法实现的。现阶段很多实验室采用质粒作为质控对照品^[20-21]。假病毒虽然和真病毒不能完全一致,但作为病毒分子检测的质控对照品,从对照品同质性的要求上来讲,假病毒相对目前使用的质粒对照品有明显的优势。本研究制备的假病毒,其 PCR 核酸扩增片段基因序列与真实病毒相同,病毒结构与真实病毒类似,病毒核酸有病毒外壳保护,相比于质粒,在进行提取等实验操作时可以更真实反映真病毒的情况。除此以外,假病毒还具有一定的感染能力,在细胞感染实验中可以检测到转入细胞内的核酸序列和报告基因的表达,这是质粒所不具备的。在实际检测的应用中,假病毒作为阳性对照以及适用性样品均可以正常检出目标病毒序列,证明了实际使用的可行性。由于假病毒不包含原本的病毒全基因且 AAV 是复制依赖的病毒^[22],因此其复制和增殖是极其受限的,只有

在额外提供 AAV 病毒基因和辅助病毒同时存在的条件才能扩增,其安全性具有较高的保障。

病毒提取中会采用蛋白酶裂解病毒的蛋白质外壳后释放出病毒核酸,再利用吸附柱特异性吸附核酸,实现病毒核酸的提取,因此假病毒和待测病毒在提取这一操作时过程是一致的^[23]。而采用相同方法处理质粒对照时,蛋白酶消化的步骤对于质粒是非必要的,即使蛋白酶失效,质粒对照仍旧存在于样本体系中,可以被后续的吸附柱吸附,成功提取到;但是待测病毒的核酸会因为蛋白酶失效而无法裂解释放,进而导致后续的吸附柱无法有效吸附到病毒核酸,这会导致质粒对照可以正常检测到,而待测病毒无法被检测到。因此假病毒是比质粒更合适的提取过程对照品。

本研究所涉及的检项为外源病毒因子检查,检测对象是病毒颗粒,即便污染的外源因子不是病毒颗粒形式的,其存在形式大多为裸核酸、非病毒类蛋白质包裹形成的复合体、转染遗留的转染试剂包裹的核酸等,这几种可能存在形式的核酸在提取时依旧需要采用试剂盒,这些形式中最难提取到的是核酸蛋白复合体的形式^[23],但这又与假病毒和真病毒类似,裸核酸甚至无需提取也可以直接进行检测,转染试剂复合体不稳定,经过样本处理和提取步骤后也会形成裸核酸或是蛋白复合体的形式,因此假病毒的对照不仅可以作为存在于病毒粒子内核酸形式的对照,同时也可以作为其他类型的核酸的对照。

综上所述,本研究腺相关病毒包装方法可以产生具有感染活性的多病毒基因假病毒,该假病毒在干细胞样品病毒荧光定量 PCR 检查中可作为阳性对照代替多种野生型病毒进行定性检测,不仅降低了阳性对照制备成本,而且更具有生物安全性,在提高检测效率的同时,还能够更好地对 qPCR 方法从基因提取到基因扩增整个流程进行质量控制。

参考文献

- [1] PITTENGER MF, DISCHER DE, PÉAULT BM, *et al.* Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress [J]. *NPJ Regen Med*, 2019, 4: 22
- [2] KIMBREL EA, LANZA R. Next-generation stem cells—ushering in a new era of cell-based therapies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(7): 463
- [3] SAGOO P, GASPAR HB. The transformative potential of HSC gene therapy as a genetic medicine [J]. *Gene Ther*, 2023, 30(3-4): 197

- [4] BARONE PW, WIEBE ME, LEUNG JC, *et al.* Viral contamination in biologic manufacture and implications for emerging therapies [J]. *Nat Biotechnol*, 2020, 38(5): 563
- [5] GHITTONI R, ACCARDI R, CHIOCCA S, *et al.* Role of human papillomaviruses in carcinogenesis [J]. *Ecancermedicallscience*, 2015, 9: 526
- [6] MUÑOZ N, BOSCH FX, DE SANJOSÉ S, *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(6): 518
- [7] WU Z, GRAF FE, HIRSCH HH. Antivirals against human polyomaviruses: Leaving no stone unturned [J]. *Rev Med Virol*, 2021, 31(6): e2220
- [8] 中华人民共和国药典 2020 年版 . 三部 [S]. 2020: 11
ChP 2020.Vol III [S]. 2020: 11
- [9] 国家药品监督管理局 . 人源干细胞产品药学研究与评价技术指导原则 (试行) [EB/OL]. (2023-04-27) [2024-11-28]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1dfacaa7804aca84d648edb83b10c40b>
NMPA. Technical Guidelines for Pharmaceutical Research and Evaluation of Human Stem Cell Products (Trial) [EB/OL]. (2023-04-27) [2024-11-28]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1dfacaa7804aca84d648edb83b10c40b>
- [10] FDA. Considerations for the Use of Human- and Animal-Derived Materials in the Manufacture of Cellular and Gene Therapy and Tissue-Engineered Medical Products (April 2024) [EB/OL]. (2024-05-15) [2024-11-28]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considerations-use-human-and-animal-derived-materials-manufacture-cell-and-gene-therapy-and-tissue>
- [11] FDA. Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications (Guidance for Industry) (February 2010) [EB/OL]. (2019-05-17) [2024-11-28]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/characterization-and-qualification-cell-substrates-and-other-biological-materials-used-production>
- [12] ICH. Q5A(R2) Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin (January 2024) [EB/OL]. (2024-01-10) [2024-11-28]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q5ar2-viral-safety-evaluation-biotechnology-products-derived-cell-lines-human-or-animal-origin>
- [13] 董占柱, 高雪军, 余黎 . 假病毒的应用研究进展 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2014, 42(2): 59
- DONG ZZ, GAO XJ, YU L. Advances in application of pseudovirus [J]. *Prog Microbiol Immunol*, 2014, 42(2): 59
- [14] WANG D, TAI PWL, GAO G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(5): 358
- [15] BALAKRISHNAN B, JAYANDHARAN GR. Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy [J]. *Curr Gene Ther*, 2014, 14(2): 86
- [16] GRIMM D, KAY MA, KLEINSCHMIDT JA. Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6 [J]. *Mol Ther*, 2003, 7(6): 839
- [17] GRAF FE, HIRSCH HH. BK polyomavirus after solid organ and hematopoietic cell transplantation: one virus-three diseases [M]// MORRIS MI, KOTTON CN, WOLFE C. *Emerging Transplant Infections*. Cham: Springer Nature, 2020: 1
- [18] CORTESE I, REICH DS, NATH A. Progressive multifocal leukoencephalopathy and the spectrum of JC virus-related disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(1): 37
- [19] WANG JH, GESSLER DJ, ZHAN W. *et al.* Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases [J]. *Sig Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 78
- [20] 张峰, 高丽英, 宋雪, 等 . 实时荧光定量 PCR 共检测人疱疹病毒 6 型和 7 型核酸方法的建立和应用 [J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(9): 1565
ZHANG F, GAO LY, SONG X, *et al.* Establishment and application of quantitative real-time PCR for co-detection of HHV-6 and HHV-7 [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(9): 1565
- [21] 王金林, 史亚茹, 王文韬, 等 . 实时荧光定量及数字 PCR 技术在病毒检测中的应用及研究进展 [J]. *医学诊断*, 2023, 13(3): 320
WANG JL, SHI YR, WANG WT, *et al.* Application and research progress of real-time fluorescence quantitative PCR and digital PCR techniques in virus detection [J]. *Med Diagnosis*, 2023, 13(3): 320
- [22] CLÉMENT N, GRIEGER JC. Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2016, 3: 16002
- [23] SHIN JH. *Nucleic Acid Extraction Techniques* [M]// TANG YW, STRATTON C. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Boston: Springer, 2013: 209

(本文于 2024 年 12 月 3 日收到)