

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.08.001

• 基础研究 •

实时荧光定量 PCR 法用于重组 SIV-hPEDF 注射液病毒颗粒数的检测*

秦玺[#] 李永红[#] 杨琦 杨靖清 于雷 杨玉帅 徐莉 饶春明[△]

(中国食品药品检定研究院 北京 100050)

摘要 目的:建立重组 SIV-hPEDF 注射液病毒颗粒数检测实时定量 PCR 检测方法。**方法:**在提取重组 SIV-hPEDF 注射液供试品基因组 RNA 后,采用实时定量 PCR 的方法,检测供试品中的病毒颗粒数。**结果:**经过 3 次实验,所得 SIV-hPEDF RNA 标准品标准曲线均线性良好,重组 SIV-hPEDF 注射液供试品中病毒颗粒数检测结果无显著性差异。**结论:**所建立的重组 SIV-hPEDF 注射液病毒颗粒数实时荧光定量 PCR 检测方法重复性好、灵敏、准确,可用于重组 SIV-hPEDF 注射液病毒颗粒数的检测。

关键词:重组 SIV-hPEDF 注射液;实时定量 PCR;病毒颗粒数;质量控制

中图分类号:R927;R392-33 文献标识码:B 文章编号:1673-6273(2015)08-1401-05

Quantitation of Virus Particles in Recombinant SIV-hPEGF Injection by Real-Time PCR*

QIN Xi[#], LI Yong-hong[#], YANG Qi, YANG Jing-qing, YU Lei, YANG Yu-shuai, XU Li, RAO Chun-ming[△]

(National Institute for Food and Drug Control, Beijing, 100050, China)

ABSTRACT Objective: A Real-Time PCR method was developed to quantitatively determine the virus particles in recombinant SIV-hPEGF injection. **Methods:** After extracting the genome RNA in recombinant SIV-hPEDF injection, Real-time PCR was used to quantitatively determine the virus particles in test sample. **Results:** After 3 parallel experiments, the SIV-hPEDF RNA standard had a good linear, and there was no significant difference in the detection results of virus particles in recombinant SIV-hPEGF injection. **Conclusion:** The established method is repeatable, sensitive and accurate, and can be applied in the determination of virus particles in recombinant SIV-hPEGF injection.

Key words: Recombinant SIV-hPEGF Injection; Real-time PCR; Virus particles; Quality control

Chinese Library Classification(CLC): R927; R392-33 **Document code:** B

Article ID: 1673-6273(2015)08-1401-05

前言

色素上皮衍生因子 (Pigment epithelium-derived factor, PEDF), 是属于丝氨酸蛋白酶超家族的一种神经营养因子,具有保护神经,营养神经,抗新生血管生成,抗血管渗漏,促进凋亡,抑制肿瘤等功能^[1-7]。猿猴免疫缺损病毒(Simian Immunodeficiency Virus, SIV)载体是一类慢病毒载体,属于逆转录病毒家族。其特点为携带外源基因片段大,不易引发机体的免疫反应,能够感染分裂细胞和多种非分裂细胞^[8,9],该病毒可以直接整合进细胞基因组^[10],而不需反复感染细胞就可达到持久表达^[9],低滴度的 SIV 病毒液即可达到治疗效果^[11],已成为目前基因治疗用载体的研究热点^[12-15]。重组 SIV-hPEDF 注射液作为一种基因治疗产品,可以在视网膜疾病的治疗方面发挥作用,而其病毒颗粒数的检测是该产品质量控制的一项重要指标。病毒颗粒

数的测定有助于在该产品在使用过程中确定病毒的数量,从而保证疗效,控制副作用。本文提取样品的基因组 RNA 后,采用实时定量 PCR 技术检测样品的病毒颗粒数,建立了重组 SIV-hPEDF 注射液中病毒颗粒数的定量测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料

Trizol LS Reagent 购自 Invitrogen 公司;Dr. GenTLE Precipitation Carrier、RNase-free Water、Recombinant DNase I、Recombinant RNase Inhibitor 购自 TAKARA 公司;Yeast tRNA 购自 Ambion 公司;Taqman RNA-to-Ct 1 step kit 购自 Applied Biosystems 公司;氯仿、异戊醇、无水乙醇、异丙醇均为分析纯;SIV-hPEDF RNA 标准品 (2.5×10^7 copies/ μ L) 和 Enterovirus RNA 标准品 (2×10^7 copies/ μ L) 由本科室保存;PCR 引物合成

* 基金项目:863 计划项目(2012AA020805);国家科技重大专项项目(2012ZX09304010)

作者简介:秦玺(1981-),男,博士后,主要研究方向:生物药物质量控制研究,电话:010-67095359, E-mail: xiba315@126.com;

李永红(1976-),男,博士,主要研究方向:生物药物质量控制研究,电话:010-67095359, E-mail: scbjlyh@sina.com;

[#] 为共同第一作者

[△] 通讯作者:饶春明, E-mail: raocm@nicpbp.org.cn

(收稿日期:2014-08-21 接受日期:2014-09-15)

由北京奥科鼎盛生物公司完成。

Enterovirus F-Primer: (5'-ATGCGGCTAATCCCAACCT-3')

Enterovirus R-Primer: (5'-CGTTACGACAGGCCAATCACT-3')

Enterovirus probe: (5'-[VIC]CAGGTGGTCAAAC[MGB]-3')SIV

F3-Primer: (5'-GAGGGTTAGGCAGGGATATGTTTC-3')

SIV R3-Primer: (5'-GTCTCTCTGCTGAAGTCTGTCC-3')

SIV P3-probe: (5'-[HEX]TCTCCACAGATCCATATCCGCG-GCAAT[BHQ]-3')。

1.2 样品基因组 RNA 提取

配制 DNA 酶消化体系: 样品 100 μL , 10 $\times$ DNase I buffer 20 μL , DNase I 8 μL , RNase inhibitor 2 μL , RNase-free water 70 μL 。配制 2 个体系, 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。分别加入 750 μL Trizol LS Reagent, vortex 剧烈混匀 10 s, 快速离心。Enterovirus RNA 标准品稀释至 2.5×10^5 copies/ μL 后, 加入 40 μL 至样品体系中, Yeast tRNA 稀释至 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 后, 加入 10 μL 至样品体系中。加入氯仿: 异戊醇 (24:1) 200 μL , vortex 剧烈混匀 10 s, 室温放置 5 min 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 15000 rpm 离心 15 min。收集上清, 加入助沉剂 Dr. GentLE Precipitation Carrier 6 μL , vortex 混匀 10 s。加入 600 μL 预冷的异丙醇, vortex 混匀 10 s 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 15000 rpm 离心 15 min。去上清, 加入 600 μL 预冷的 75% 乙醇, 轻洗 RNA 沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 15000 rpm 离心 10 min。去上清, 真空干燥 30 min。用 100 μL RNase-free Water 溶解 RNA 沉淀, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待检测。

1.3 RNA 回收率检测

用 Yeast tRNA (20ng/ μL) 稀释 Enterovirus RNA 标准品 (2 copies/ μL 、20 copies/ μL 、 2×10^2 copies/ μL 、 2×10^3 copies/ μL 、 2×10^4 copies/ μL 、 2×10^5 copies/ μL 、 2×10^6 copies/ μL)。用 Taqman RNA-to-Ct 1 step kit 配制 30 个反应体系 (模板分别为 2 个样品 RNA, 7 个浓度的 Enterovirus RNA 标准品, 1 个空白对照, 均为 3 个复孔), 每个体系成分为: 2 $\times$ RT-PCR mix 10 μL , Enterovirus F-Primer (10 μM) 0.2 μL , Enterovirus R-Primer (10 μM) 0.2 μL , Enterovirus probe (10 μM) 0.2 μL , (40 $\times$) Enzyme mix 0.5 μL , Nuclease-free water 4.9 μL , 模板 4 μL 。实时定量 PCR 条件为: 48 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 后, [95 $^{\circ}\text{C}$ 15 sec, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1

min] $\times$ 40 cycles。利用标准曲线定量抽提好的 RNA 样品中 Enterovirus RNA 的浓度, 取三个复孔的平均值作为该样品的 Enterovirus RNA 检测值 (copies/ μL), 计算样品抽提回收率。

1.4 实时定量 PCR 定量基因组 RNA 拷贝数

用 Yeast tRNA (20 ng/ μL) 稀释 SIV-hPEDF RNA 标准品 (25 copies/ μL 、 2.5×10^2 copies/ μL 、 2.5×10^3 copies/ μL 、 2.5×10^4 copies/ μL 、 2.5×10^5 copies/ μL 、 2.5×10^6 copies/ μL)。用 Yeast tRNA (20 ng/ μL) 稀释抽提好的样品 1000 倍。用 Taqman RNA-to-Ct 1 step kit 配制 27 个反应体系 (模板分别为 2 个样品 RNA, 6 个浓度的 SIV-hPEDF RNA 标准品, 1 个空白对照, 均为 3 个复孔), 每个体系成分为: 2 $\times$ RT-PCR mix 10 μL , SIV F3-Primer (10 μM) 0.2 μL , SIV R3-Primer (10 μM) 0.2 μL , SIV P3-probe (10 μM) 0.2 μL , (40 $\times$) Enzyme mix 0.5 μL , Nuclease-free water 4.9 μL , 模板 4 μL 。实时定量 PCR 条件同 1.3。以标准曲线定量抽提好的样品中 SIV-hPEDF 基因组 RNA 的浓度, 取三个复孔的平均值作为该样品的 SIV-hPEDF 基因组 RNA 检测值 (copies/ μL), 计算 SIV-hPEDF 的病毒颗粒数。

1.5 数据处理

回收率检测:

$$\text{Recovery} = \frac{[\text{Enterovirus RNA 检测值}] \times [\text{提取 RNA 总体积}]}{[\text{加入的 Enterovirus RNA 总拷贝数}] \times 100\%}$$

SIV-hPEDF 病毒颗粒数检测:

$$\text{病毒颗粒数 (VP/ml)} = \frac{[\text{SIV-hPEDF 基因组 RNA 检测值}] \times [\text{稀释倍数}] \times [\text{提取 RNA 总体积}]}{[\text{抽提前供试品体积}] \times 1000/2}$$

分别进行 3 次实验, 检测实时定量 PCR 用于病毒颗粒数检测的稳定性。

2 结果

2.1 样品 RNA 抽提回收率检测

用引物 Enterovirus F-Primer、Enterovirus R-Primer 和探针 Enterovirus probe 对稀释好的 Enterovirus RNA 标准品 (2 copies/ μL 、20 copies/ μL 、 2×10^2 copies/ μL 、 2×10^3 copies/ μL 、 2×10^4 copies/ μL 、 2×10^5 copies/ μL 、 2×10^6 copies/ μL)、2 个样品组和空白对照按 1.3 中条件进行实时定量 PCR 扩增。空白对照

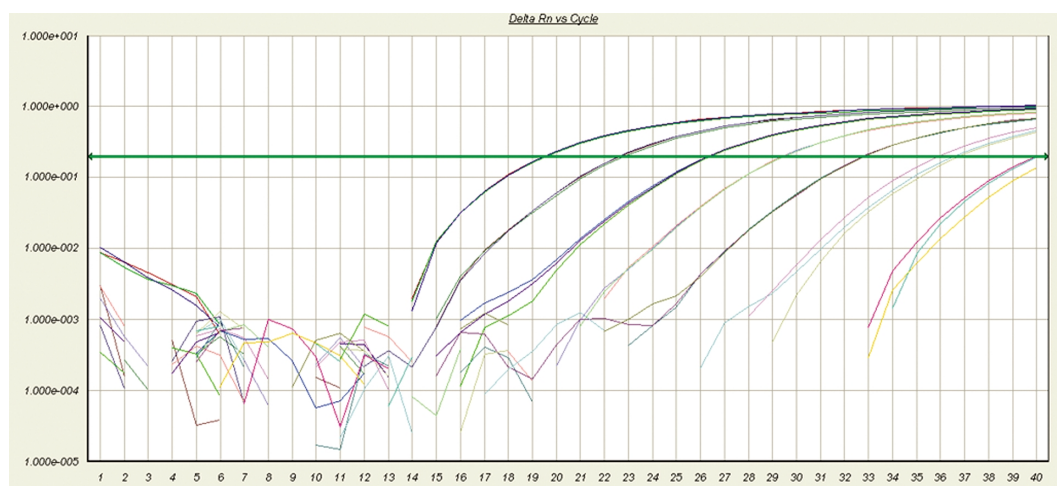


图 1 Enterovirus RNA 标准品扩增曲线

Fig.1 Amplification curve of Enterovirus RNA standard

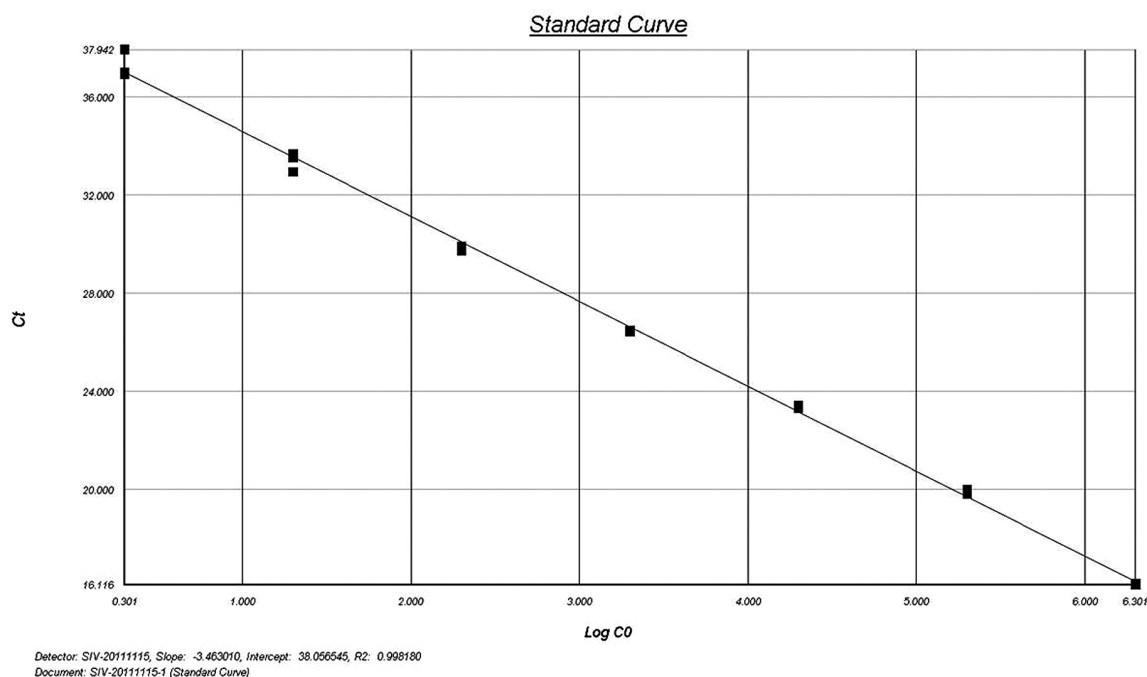


图2 Enterovirus RNA 标准品标准曲线

Fig.2 Standard curve of Enterovirus RNA standard

组无反应, Enterovirus RNA 标准品扩增曲线如图 1 所示, 实验误差很小。取 3 个复孔的平均值做出 Enterovirus RNA 标准品的标准曲线, 如图 2 所示, 以起始模板浓度(copies/ μ L)的对数为 X 轴, Ct 值为 Y 轴做的回归曲线, 线性方程为 $Y = -3.463\lg X + 38.057$, 相关系数 $R^2 = 0.998$, 符合定量要求。2 个样品组平均值落在标准曲线上的结果即为其 Enterovirus RNA 的检测值, 分别为 7.55×10^4 copies/ μ L 和 7.18×10^4 copies/ μ L, 通过计算, 2 个样品组的抽提回收率分别 75.5% 和 71.8%, 表明整个 RNA 抽提实验结果是准确可信的。

2.2 病毒颗粒数检测

用引物 SIV F3-Primer、SIV R3-Primer 和探针 SIV P3-probe 对稀释好的 SIV-hPEDF RNA 标准品 (25 copies/ μ L, 2.5×10^2 copies/ μ L, 2.5×10^3 copies/ μ L, 2.5×10^4 copies/ μ L, 2.5×10^5

copies/ μ L, 2.5×10^6 copies/ μ L)、2 个样品组和空白对照按 1.3 中条件进行实时定量 PCR 扩增。空白对照组无反应, SIV-hPEDF RNA 标准品扩增曲线如图 3 所示, 3 个复孔间扩增曲线基本重合, 表明实验误差很小。取 3 个复孔的平均值做出 SIV-hPEDF RNA 标准品的标准曲线, 如图 4 所示, 以起始模板浓度(copies/ μ L)的对数为 X 轴, Ct 值为 Y 轴做的回归曲线, 线性方程为 $Y = -3.336\lg X + 37.322$, 相关系数 $R^2 = 0.996$, 符合定量要求, 表明该方法是准确可靠的。2 个样品组平均值落在标准曲线上的结果即为其 SIV-hPEGF 基因组 RNA 的检测值, 分别为 3.00×10^4 copies/ μ L 和 2.55×10^4 copies/ μ L, 通过计算, 2 个样品组的病毒颗粒数检测值分别为 1.5×10^{10} VP/ml 和 1.3×10^{10} VP/ml。

2.3 重复性检测

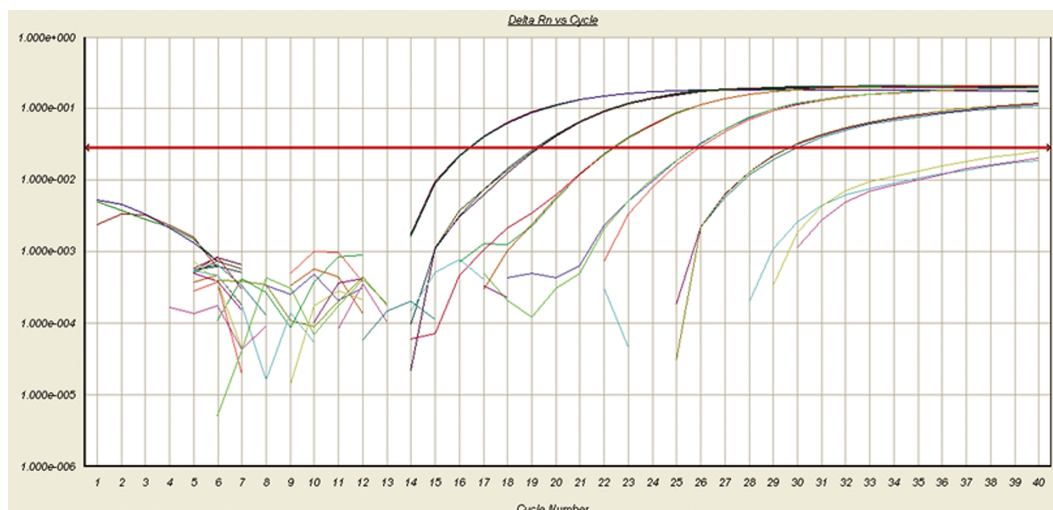


图3 SIV-hPEDF RNA 标准品扩增曲线

Fig.3 Amplification curve of SIV-hPEDF RNA standard

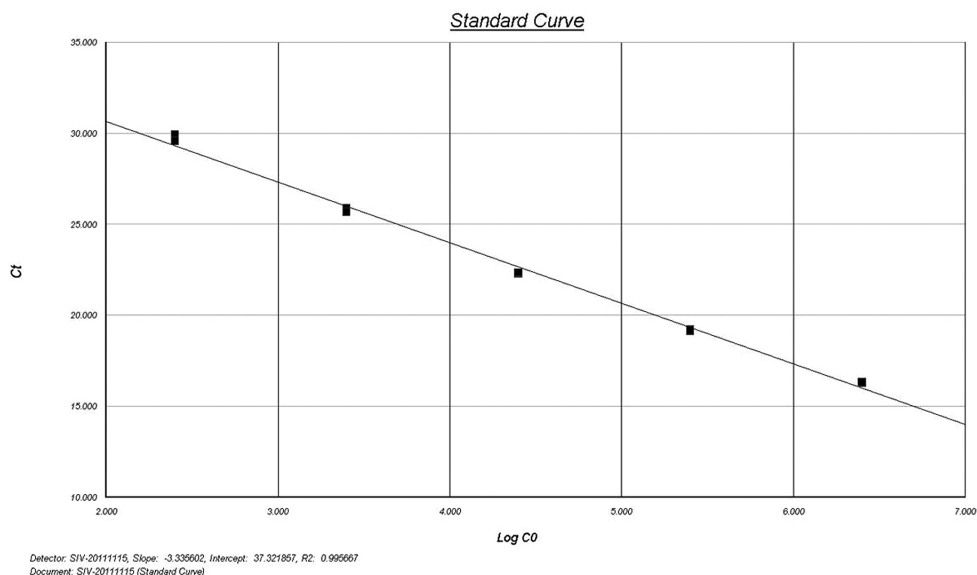


图 4 SIV-hPDF RNA 标准品标准曲线

Fig.4 Standard curve of SIV-hPDF RNA standard

经过 3 次独立实验,3 次实验结果如表 1 所示。3 次实验得出的病毒颗粒数均符合规定,且差异不大,表明实时定量 PCR

法用于重组 SIV-hPDF 注射液中病毒颗粒数的定量检测是准确可靠的。

表 1 Real-Time PCR 3 次实验结果

Table 1 Results of 3 times Real-Time PCR

	First time		Second time		Third time	
	I	II	I	II	I	II
Recovery rate	75.5%	71.8%	69.3%	75.6%	69.6%	65.6%
Virus Particles (VP/ml)	1.5×10^{10}	1.3×10^{10}	1.1×10^{10}	1.3×10^{10}	1.3×10^{10}	1.3×10^{10}
Average(VP/ml)	1.4×10^{10}		1.2×10^{10}		1.3×10^{10}	
RSD			7.7			

3 讨论

PEDF 是一个多功能蛋白,广泛存在于人体的各个器官中,在多个环节上发挥抑制肿瘤的作用。通过 SIV 病毒载体,可将 PEDF 转入肿瘤细胞或缺陷细胞中,从而达到预防肿瘤和治疗肿瘤的目的。而 SIV 病毒载体作为逆转录病毒的一员,比一般的逆转录病毒具有更大的优势,集中表现在 SIV 病毒载体可携带更大容量的基因片段,能够感染非分裂细胞,可延长目的基因表达时间,以及不易诱发机体免疫反应等。既增强了其在基因治疗领域的宿主的适用范围,又使安全性和治疗效果得到加强^[16]。

本研究通过抽提得到病毒基因组 RNA,然后采用实时定量 PCR 法检测基因组 RNA 的浓度,根据一个病毒中有两条相同基因组 RNA 的原则折算为病毒数颗粒。由于 RNA 抽提过程常常存在损失,造成最终结果的准确性受影响,我们在抽提前加入一定量 Enterovirus RNA 内标,抽提结束后对 Q-PCR 检测 Enterovirus RNA 的浓度,计算回收率,用于评价整个抽提纯

化过程中 RNA 的损失率,从而保证 RNA 抽提步骤不影响最终结果的准确性。

传统的 OD260 法检测病毒颗粒数,虽然操作简单,但其检测灵敏度较低,在本研究中,由于每剂量成品中 RNA 含量较低,无法用 OD260 法定量,该方法在此并不适用。GFP 报告基因检测方法依赖于绿色荧光蛋白的表达,适用范围窄。实时定量 PCR 广泛用于微量 DNA 的精确检测,检测范围广、精密度高,灵敏性强^[17-20]。本研究中,实时定量 PCR 法不仅可以对病毒颗粒数予以精确的定量^[21],而且由于在提取基因组 RNA 过程中,使用 DNase 去除了 DNA 的影响,所测得的病毒颗粒数较精确的反映了病毒液中完整病毒颗粒的数量^[22],且可用于所有慢病毒载体病毒颗粒数的检测。在本研究中,通过 3 次重复实验,可以发现,采用实时定量 PCR 的方法检测 SIV-hPDF 病毒注射液的病毒颗粒数是稳定可重复的。总之,建立的实时定量 PCR 法对于 SIV-hPDF 病毒注射液病毒颗粒数的检测是比较准确、可靠的,可以应用于 SIV-hPDF 病毒注射液病毒颗粒数检测的质量控制。

参 考 文 献(References)

- [1] Tombran-Tink J, Barnstable CJ. PEDF: a multifaceted neurotrophic factor[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4(8): 628-636
- [2] Becerra SP. Focus on Molecules: Pigment epithelium—derived factor (PEDF)[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 82(5): 739-740
- [3] Phillips NJ, Ziegler MR, Radford DM, et al. Allelic deletion on chromosome 17p13.3 in early ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(3): 606-611
- [4] Takita H, Yoneya S, Gehlbach PL, et al. Retinal neuroprotection against ischemic injury mediated by intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(10): 4497-4504
- [5] Alcantara MB, Dass CR. Pigment epithelium-derived factor as a natural matrix metalloproteinase inhibitor: a comparison with classical matrix metalloproteinase inhibitors used for cancer treatment [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2014, 66(7): 895-899
- [6] 张忠红, 梁洁. 眼内新生血管与细胞因子[J]. *国际眼科杂志*, 2006, 6(1): 158-163
Zhang Zhong-hong, Luan Jie. Intraocular neovascularization and cytokine [J]. *International Journal of Ophthalmology*, 2006, 6(1): 158-163
- [7] Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, et al. Pigment epithelium-derived factor gene therapy targeting retinal ganglion cell injuries: neuroprotection against loss of function in two animal models [J]. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(5): 559-565
- [8] Wunderlich S, Haase A, Merkert S, et al. Induction of pluripotent stem cells from a cynomolgus monkey using a polycistronic simian immunodeficiency virus-based vector, differentiation toward functional cardiomyocytes, and generation of stably expressing reporter lines[J]. *Cell Reprogram*, 2012, 14(6): 471-484
- [9] Watanabe N, Ohashi K, Tatsumi K, et al. Genetically modified adipose tissue-derived stem/stromal cells, using simian immunodeficiency virus-based lentiviral vectors, in the treatment of hemophilia B[J]. *Hum Gene Ther*, 2013, 24(3): 283-294
- [10] Kashiwakura Y, Ohmori T, Mimuro J, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells expressing coagulation factor ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(9): 1802-1813
- [11] Bender B, Hoffmann OI, Negre D, et al. Low titer lentiviral transgenesis in rodents with simian immunodeficiency virus vector[J]. *Biotechniques*, 2013, 55(3): 137-140
- [12] Verhoeven E, Cosset FL, Negre D. Production of SIV vectors for gene delivery [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2011, 2011 (4): pdb. prot5598
- [13] Durand S, Cimorelli A. The inside out of lentiviral vectors [J]. *Viruses*, 2011, 3(2): 132-159
- [14] Ikeda Y, Yonemitsu Y, Miyazaki M, et al. Acute toxicity study of a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector for retinal gene transfer in nonhuman primates [J]. *Hum Gene Ther*, 2009, 20(9): 943-954
- [15] Ikeda Y, Yonemitsu Y, Miyazaki M, et al. Stable retinal gene expression in nonhuman primates via subretinal injection of SIVagm-based lentiviral vectors [J]. *Hum Gene Ther*, 2009, 20(6): 573-579
- [16] 赵世巧, 冯文莉. 基因治疗的病毒载体研究进展[J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2005, 26(10): 709-711
Zhao Shi-qiao, Feng Wen-li. Research of virus vectors using in gene therapy [J]. *Sect Clin Biochem & Lab Med Foreign Med Sc*, 2005, 26(10): 709-711
- [17] 王兰, 李永红, 饶春明. 实时定量 PCR 检测重组技术产品中宿主基因组 DNA 残留[J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(10): 1593-1596
Wang Lan, Li Yong-hong, Rao Chun-ming. Determination of residual host genomic DNA in recombinant products by real-time PCR [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2009, 29(10): 1593-1596
- [18] Gosiewski T, Jurkiewicz-Badacz D, Sroka A, et al. A novel, nested, multiplex, real-time PCR for detection of bacteria and fungi in blood [J]. *BMC Microbiol*, 2014, 14(1): 144
- [19] Liu Z, Zhang P, Tang S, et al. Urine real-time polymerase chain reaction detection for children virus pneumonia with acute human cytomegalovirus infection[J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14(1): 245
- [20] Feng C, Mansouri S, Bluhm BH, et al. Multiplex real-time PCR assays for detection of four seedborne spinach pathogens [J]. *J Appl Microbiol*, 2014, 117(2): 472-484
- [21] Atkinson EM, Debelak DJ, Hart LA, et al. A high-throughput hybridization method for titer determination of viruses and gene therapy vectors [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26(11): 2821-2823
- [22] Thomas MA, Lichtenstein DL, Krajcsi P, et al. A real-time PCR method to rapidly titer adenovirus stocks[J]. *Methods Mol Med*, 2007, 130: 185-192
- [23] 朱克超, 葛腾飞, 于在诚. 食管鳞状细胞癌中紧密连接蛋白 occludin、ZO-1 的表达及其临床意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(5): 437-540
Zhu Ke-chao, Ge Teng-fei, Yu Zai-cheng. Expression and clinical significance of tight junction proteins (occludin and ZO-1) in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2012, 47(5): 437-540(In Chinese)
- [24] Tobioka H, Isomura H, Kokai Y, et al. Occludin expression decreases with the progression of human endometrial carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2004, 35(2): 159-164
- [25] Steed E, Balda MS, Matter K. Dynamics and functions of tight junctions[J]. *Trends Cell Biol*, 2010, 20: 142-149

(上接第 1555 页)