



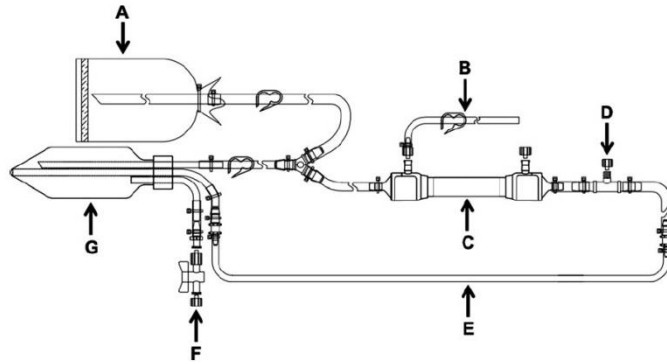
使用串联切向流过滤高效浓缩慢病毒载体

简介

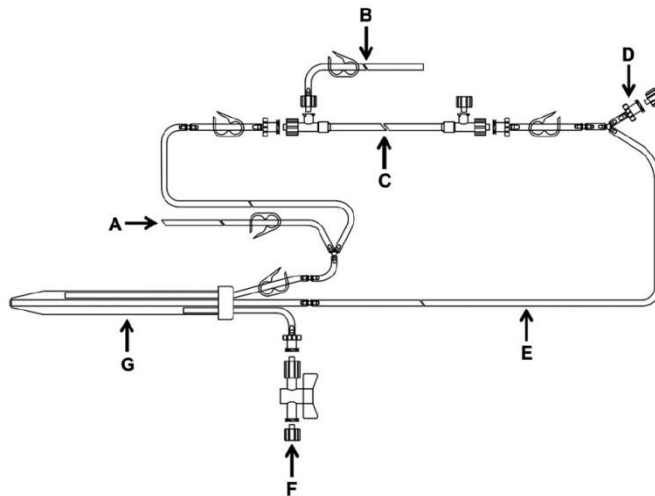
VSV-G-假型自我灭活慢病毒载体是不可或缺的生物实验工具之一，与之前的 γ -逆转录病毒载体不同的是，慢病毒载体可转导非分裂细胞，并可携带更多的转基因盒，在细胞中的转基因表达时间也更长，即可获得更高的滴度，而其遗传毒性相对较低。

一般情况下产毒细胞上清液中的载体滴度足以转导常规细胞系，但原代细胞较难转导，需要进行载体浓缩以获得较高浓度。此外，一些载体因整合了会降低滴度的遗传元件，且大多数细胞类型也不耐受产毒细胞生长培养基或其分泌蛋白，所以浓缩及清洗是慢病毒载体使用的必要步骤。

超速离心是病毒颗粒浓缩的常用方法之一，但其浓缩系数较低，每次处理量也偏小，且繁琐的多步操作会降低病毒颗粒回收率。离心过滤是相对较简单的浓缩方法，但过滤器本身会捕获截留大量载体，造成损耗。相较而言，切向流过滤 (TFF) 操作简单，损耗低，且可通过洗滤过程有效降低产毒细胞代谢物及分泌蛋白，但传统的一步式 TFF 浓缩程度仅可达 50-100 倍，本实验使用两步 TFF，成功将 5.5L 慢病毒载体原液浓缩至 1mL 左右，且回收率高达 97% 以上。而对终产物的质量分析显示，浓缩的慢病毒载体可有效转导原代人 CD34+ 造血干/祖细胞和原代人纤维母细胞，且无明显毒性。



流路1 (FP1) 设计图. A: 进样, B: 滤液, C: 过滤器, D: 压力传感器端口, E: 管路 (过蠕动泵), F: 容器压力释放端口, G: 容器



流路2 (FP2) 设计图. A: 进样, B: 滤液, C: 过滤器, D: 压力传感器端口, E: 管路 (过蠕动泵), F: 容器压力释放端口, G: 容器



实验

实验使用含 pCCL 载体质粒、gag/pol 表达质粒及囊膜表达质粒 pMD.G (VSV-G) 的转染混合液转染 293T 细胞，并于转染后进行丁酸钠诱导，培养一定时间后，分两次回收含 LV 培养基，过 0.8 μ m 过滤器，滤液保存于无菌容器。

切向流过滤使用仕必纯 KrosFlo 研发用 Iii 切向流过滤系统（产品编号：SYR2-U20-01N），第一步操作时，系统配用流路 1 (FP1，产品编号：EZ-M1-500S-260-01N-1，含 500kD 中空纤维过滤器（纤维数量 320，纤维内径 0.5mm，膜表面积 615cm²），第二步操作时，系统配用流路 2 (FP2，产品编号：EZ-CHIL07-01-1，含 500kD 中空纤维过滤器（纤维数量 12，纤维内径 0.5mm，膜表面积 40cm²）。

过滤前先检查流路 (FP1) 完整性，用 DPBS 完全润湿流路后，运行系统，直到 DPBS 排干，关闭端口和阀门，运行泵，直到入口压力达到 5psi 左右，打开滤液端口，由于空气不能渗透润湿的过滤器纤维，如组件完整，则压力降不应超过 0.01psi/s。

通过完整性测试后，开始浓缩含 LV 培养基。整个

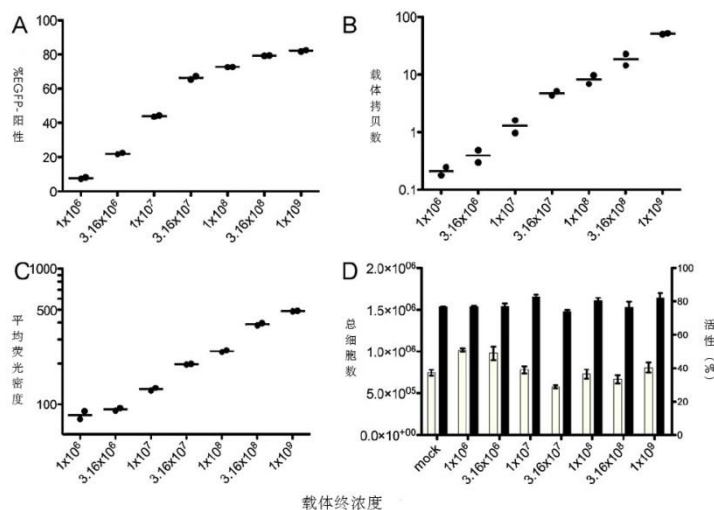
过程中，监测入口压力，并维持为 6psi 以下。第一步操作可将 5.5L 料液浓缩至 50mL，即浓缩 100 倍左右。浓缩的载体再用 1000mL 含胎牛血清的洗滤缓冲液进行恒量洗滤。之后，将系统流路更换为 FP2，通过完整性测试后，将第一步获得的 50mL 浓缩液进一步浓缩至 1mL，即总浓缩达 5000 倍。该步入口压力维持为 9psi 以下。

随后，通过 HT-29 细胞载体转导实验确认滴度，并使用多重实时 PCR 技术进行绝对定量分析。同时，以终浓度载体转导原代人 CD34+造血干/祖细胞，确认浓缩后载体的转导效力。此外，构建针对诱导多能性干细胞 (iPSC) 生成的复合 STEMCCA 载体，以相同的方法进行浓缩，检测其转导和重编程原代人纤维母细胞的能力。

结果

使用 TFF 进行 LV 浓缩可获得极高的浓缩系数和回收率，且对浓缩后 LV 的冻融实验显示，终产物具有良好的稳定性。

为测试浓缩 LV 的质量，进行了原代人 CD34+造血干/祖细胞的转导实验，结果显示，转导非常成功，且随载体浓度的增加，转导成功率亦明显上升，而无明显毒性。而在原代人纤维母细胞转导



不同浓度载体转导CD34+细胞7天后的测试结果。A：流式细胞分析EGFP+细胞百分率；B：实时PCR分析得载体拷贝数；C：EGFP+细胞平均荧光密度；D：细胞数量及活性



实验中，含有高效 STEMCCA 元件的载体可有效转导并重编程原代人纤维母细胞，形成诱导多能性干细胞，且成功率随载体浓度增加而提高。

使用两步切向流过滤可以高倍数、高回收率地浓缩 LV，工艺稳定，重复性好。针对 CD34+ 的转导和表达实验表明浓缩后产物无明显毒性，而高浓度 STEMCCA 载体制备及诱导实验证明，该工艺可用于大规模复杂载体的生产和浓缩。

讨论

问题解答

问题	解决方案
过滤器完整性测试失败	更换过滤器
流路泄漏	检查流路所有连接，如有松动，则拧紧
过滤器阻塞	如含 LV 培养基中有过多的颗粒或蛋白质（血清），则过滤器可能会阻塞。可使用无血清培养基，以降低含 LV 培养基中的蛋白质含量。如使用无血清培养基，而滤液流速降低，可关闭滤液端口，增加过滤器内部压力，以疏通堵塞膜孔
入口压力过高	降低背压，并降低流速
凝聚	如果蛋白质清除较多，可能会导致聚集增加。可在洗滤缓冲液中保留部分蛋白质，避免使用纯 DPBS 进行洗滤
过热	FP2 在使用时可能会变热，影响载体稳定性。可将样品容器及管路置于冰上进行操作。

技术比较

其它浓缩技术	优势	劣势
超速离心	原理简单，大分子或颗粒等共浓缩成分较少	无法达到高浓缩倍数，有污染风险，操作繁琐，较难进行大规模处理
超滤	操作相对简单，可进行中等规模以上的处理	无法达到高浓缩倍数，有污染风险，过滤器截留大量载体造成损耗，负电荷物质形成共浓缩
层析	无需特殊设备，大分子或颗粒等共浓缩成分较少	进行大规模处理非常困难且繁琐

参考文献：

Cooper,A.R., Patel,S., Senadheera,S., et al., Highly efficient large-scale vector concentration by tandem tangential flow filtration. Journal of Virological Methods, 2011, 177: 1-9.

联系我们

仕必纯中国有限公司

上海市浦东新区长柳路58号证大立方大厦1509室

电话：021-6881 0228 · 400 628 4448 (中国大陆地区免费客服电话)

传真：021-6091 9246

邮箱：spectrum.cn@spectrumlabs.com

网站：www.spectrumlabs.com