

# 利用 Corning® HYPERStack® 超级细胞工厂 大规模生产慢病毒

CORNING

## 应用指南

Katherine E. Strathearn, Ph.D.  
Mark E. Rothenberg, Ph.D.  
Corning Life Sciences  
Kennebunk, Maine 04043

### 引言

慢病毒是一种体外包装的逆转录病毒,作为一种生物工具已经被越来越广泛地应用于细胞治疗。慢病毒具有以下功能:(a) 可将外源基因准确递送到大多数非分裂细胞中;(b) 将外源基因稳定整合到特定染色体中;(c) 通过各种分子特征修饰(例如,病毒包装过程中修饰糖蛋白)增加其功能性。为了使科研人员和生产厂商在相同体积的细胞培养容器中获得更高的细胞产量, Corning 研发出 HYPERStack 超级细胞工厂,可以提高单位体积的细胞产量。HYPERStack 超级细胞工厂是以 Corning 的 HYPER (High Yield PERFORMANCE) 技术为依托,采用一种透气性薄膜作为细胞贴附生长的表面并消除培养瓶内的空气间隙(图 1)。与传统的细胞培养瓶相比,此设计可以大大增加细胞培养的层数和相应的细胞生长表面积。

标准的慢病毒生产方法是利用单层的细胞培养容器扩增细胞(如 HEK-293LTV),并且该细胞可被用于含有外源基因的慢病毒载体转染从而包装生产慢病毒。本文的研究重点是验证采用 Corning 独有 HYPERStack 超级细胞工厂大规模生产慢病毒的效果。结果表明,与传统的多层细胞培养瓶相比,本实验所用 HYPERStack 超级细胞工厂可以获得更高的病毒产量且病毒效价基本不变,本文证明使用 HYPERStack 超级细胞工厂可以提高慢病毒大规模生产的效率。

### 方法和材料

#### 细胞培养

HEK-293LTV 细胞 (Cell BioLabs, Cat.No.LTV-100) 培养于含有丙酮酸钠 (Corning cellgro®, Cat. No.10-013-CM), 10% FBS (Corning cellgro, Cat. No. 35-010-CV) 和 1X MEM 非必需氨基酸 (Corning cellgro, Cat. No. 25-025-Cl) 的 DMEM 培养基中。

#### DNA 制备

ViraSafe™ 慢病毒双顺反子表达系统 (GFP) 包括 Pantropic (Cell BioLabs, Cat. No.VPK-218-PAN) 和 pLenti-Green Fluorescent Protein (绿色荧光蛋白) 对照载体 (Cell BioLabs, Cat. No. LTV-400), 分别利用热激法转化至 GC10 感受态细胞 (Sigma-Aldrich®, Cat. No.G2544)。慢病毒载体转化单克隆细胞利用 LB 肉汤培养基 (Corning cellgro, Cat. No. 46-050-CM) 培养至 1L 锥形烧瓶中,在 37°C 下以 250 rpm 转速培养 16 小时。使用 AxyPrep™ 无内毒素质粒大提试剂盒 (Axygen, Cat. No. AP-MX-P-25) 纯化慢病毒质粒,用 EnVision® 多功能酶标仪 (Perkin Elmer) 定量,供细胞转染使用。

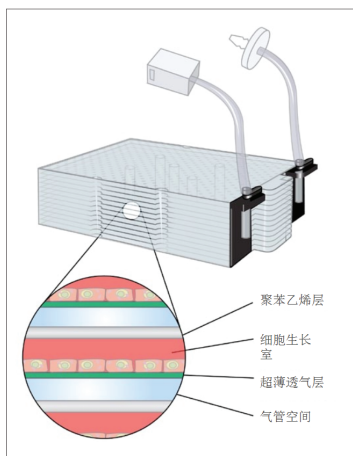


图 1. 康宁 HYPER 技术消除了传统细胞培养瓶顶层的空气间隙

## DNA: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 转染复合物的准备

转染前, 准备含有 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 的 DNA 转染混合物, 其复合物制备基于本实验细胞培养的总生长面积, 其中实验组 Corning HYPERStack 12 层超级细胞工厂的培养面积为 6,000 cm<sup>2</sup>, 对照组 Corning CellSTACK 2 层细胞工厂的培养面积为 1,272 cm<sup>2</sup>。制备混合物, 将 48 mL 新鲜制备的 2XHBS 缓冲液 (50 mM HEPES, 250 mM NaCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.07) 加入到 250 mL 储液瓶 (Corning, Cat. No. 430281) 中标记为“管 A”。以 0.55 μg/cm<sup>2</sup> 的组合比例将以下 DNA 组合加入到 50 mL 离心管中 (标记为“管 B”):

- pLenti- Green Fluorescent Protein(GFP) 对照质粒 (1.8 mg)
- pREV-RSV( 包装质粒 )(768 μg)
- pCgpV( 包装质粒 )(768 μg)
- pCMV-VSVG( 包膜质粒 )(768 μg)

将细胞培养级超纯水 (Corning cellgro, Cat. No. 25-055-CV) 和 1 M CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Cat. No. 21115) 加入到管 B 中, 使其终体积为 48 mL, 室温下孵育 5 分钟。孵育 5 分钟后, 将管 B 的溶液以大约 5 mL/min 的速率逐滴加入管 A, 并在室温下孵育 20 分钟。在加入大约三分之一的 CaCl<sub>2</sub>-DNA 溶液后, 混合物变得浑浊。每个实验设三个重复试验组。请注意: 如果在混合时形成白色沉淀, 则是因为管 B 中的溶液加入管 A 太快或搅拌过度。沉淀物的形成会大大降低转染的效率。

## HEK-293LTV 细胞转染

转染前细胞接种, 将细胞以 100,000 个细胞每平方厘米的密度(0.217 mL/cm<sup>2</sup> 培养基)接种到 CellBIND 表面的 2 层 Corning CellSTACK 细胞工厂 (Corning, Cat. No. 3310) 和 12 层 Corning HYPER Stack 超级细胞工厂中 (Corning, Cat. No. 10012) 中, 并在 37°C(5% CO<sub>2</sub>, 98% 相对湿度) 下培养过夜。第二天, 转染前 8 小时移除培养基, 并换上含有 25 μM 氯喹 (Sigma, Cat. No. C6628) 的新鲜培养基 (0.217 mL/cm<sup>2</sup>)。为获得最佳转染效率, 转染时培养基的 pH 值应为 7.5~7.6。对于更大的细胞培养容器 (例如 36 层 HYPERStack), 含氯喹的培养基需孵育更长时间 (大于 8 小时), 使容器内的培养基与气体和温度达到动态平衡状态。孵育时间过短 (少于 6 小时) 往往会降低转染效率。

转染 293LTV 细胞, 含有 25 μM 氯喹的培养基转移至 2 L 储液瓶中 (Corning, Cat. No. 431644)。移除 95 mL 培养基, 并以约 7 mL/min 的速率逐滴加入 95 mL 上述制备的 DNA: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 复合物溶液。将含有 DNA: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 溶液的培养基移回 HYPERStack 12 层超级细胞工厂, 并在 37°C (3% CO<sub>2</sub>, 98% 相对湿度) 下孵育 16 小时。孵育过后, 经转染培养基换为新鲜培养基继续培养, 48 小时后收集培养基以收获病毒。实验过程中使用 AMG EVOS®FI 显微镜监测绿色荧光蛋白的表达。

## 慢病毒收获

慢病毒经历细胞内包装过程后, 无需细胞裂解即可释放到培养基中。因此, 转染后约 65 小时离心收集培养基上清。为彻底去除细胞碎片和多泡体 (MVB), 用 0.45 μM 的醋酸纤维素膜过滤器 (Corning, Cat. No. 430514/430516) 过滤培养基上清, 并转移至高压灭菌的玻璃瓶 (Corning, Cat. No. 1395-1L/1395-2L)。富病毒, 将从每个容器获得的 35 mL 病毒溶液转移到 Spin-X® 过滤器 (MWCO 100,000)(Corning, Cat. No. 431491) 中, 并 4°C, 3000 xg 离心直至最终体积浓缩至 300 μL。最后将慢病毒浓缩液于 -80°C 保存。图 2 为 HYPERStack 超级细胞工厂生产慢病毒的操作流程。

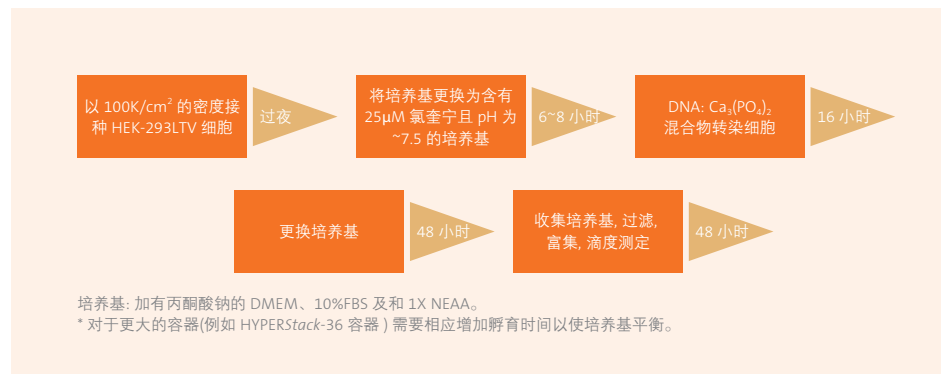


图 2. 康宁 HYPERStack-12 超级细胞进行慢病毒生产的操作步骤。

## 慢病毒滴度测定

Lenti-X™ qRT-PCR 滴定试剂盒购买自 Clontech(Cat. No. 631235), 根据制造商的说明书使用 CFX96 Touch™ 实时 PCR 检测系统 (Bio-Rad) 进行测定。根据 Cq 值、定量循环数及检测数值利用软件来分析慢病毒拷贝数。

## MDBK 细胞转导

为了验证慢病毒颗粒的功能, 将新生产的慢病毒感染 MDBK 牛肾细胞系 (ATCC, Cat. No.CCL22) 并检测靶基因 GFP 蛋白的表达效率。实验流式细胞仪分析结果表明, 1ml 细胞转导需要约 1,000 个慢病毒拷贝。将细胞以 5,000cells/cm<sup>2</sup> 的密度接种到 24 孔板 (Corning, Cat. No. 3527) 上, 并在 37°C(5% CO<sub>2</sub>, 98% 相对湿度) 下培养过夜。

第二天, 以 10 μg/mL 的浓度将编码 GFP 基因的慢病毒浓缩液加入到细胞孔中 (MOI=10)。同时将终浓度为 10 μg/mL 的 Polybrene (Sigma, Cat. No.H9268) 加入到培养基中以提高慢病毒感染效率。使用以下公式计算加入到每个孔中的接毒量 (mL):

$$([\text{细胞数} / \text{cm}^2] \times [\text{孔面积} \text{ cm}^2] \times (\text{MOI} \ 10 [\text{TU} / \text{细胞数}])) / (\text{TU} / \text{mL})$$

72 小时后收获细胞, 通过流式细胞仪分析目的基因绿色荧光蛋白的表达情况。

## 流式细胞仪分析

为了评估目的基因 GFP 的表达情况, 用含有目的基因 GFP 的慢病毒感染 MDBK 细胞, 72 小时后收集培养基上清, 离心除去上清, 细胞重悬浮于 250 μL PBS 中 (Corning, Cat. No. 21-040-CM)。细胞悬液使用 MACSQuant<sup>®</sup> 分析仪器 (Miltenyi Biotec) 进行 GFP 蛋白表达分析。

## 实验结果

### 细胞形态和 GFP 表达

为比较 2- 层细胞工厂和康宁 12 层 HYPERStack 超级细胞工厂之间慢病毒产量的差异, 用从 ViraSafeTM 慢病毒双顺反子表达系统 (GFP) 的慢病毒载体转染 HEK-293LTV 细胞包装慢病毒颗粒。整个实验过程中持续监测细胞形态及 GFP 的表达。转染后约 65 小时收集培养基上清。实验过程中细胞在两种细胞培养器中的细胞形态和 GFP 表达相似 (图 3)。

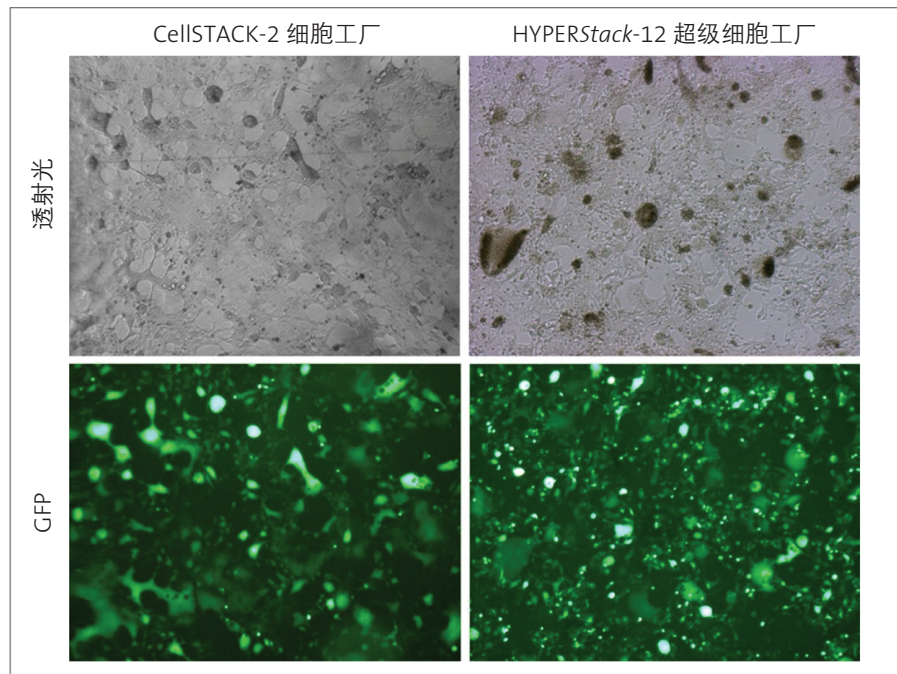


图 3. 康宁 HYPERStack 超级细胞工厂中 GFP 表达分析。具有代表性图像表明康宁 HYPERStack 超级细胞工厂和 2 层细胞工厂中 GFP 表达量相当。所有重复组实验结果一致。使用 Olympus IMT-2 倒置荧光显微镜进行观察, 放大倍数为 10 倍。

### 慢病毒收获

含有慢病毒的培养基上清收集和过滤后, 使用 Lenti-XTM qRT-PCR 病毒滴度试剂盒检测每个培养瓶中编码 GFP 的慢病毒的病毒滴度, 以确定其每 mL 培养基中的病毒拷贝数。与传统的 2- 层细胞工厂的病毒产量相比, 康宁 HYPERStack 超级细胞工厂在单位体积及单位面积上具有相似的病毒产量 (图 4A, B), 但总的病毒产量是 2 层细胞工厂的五倍以上 (图 4C)。这些结果表明, 康宁 HYPERStack 超级细胞工厂中生产的慢病毒在单位面积的病毒滴度与传统的细胞工厂相当, 但总的病毒产量大大增加。

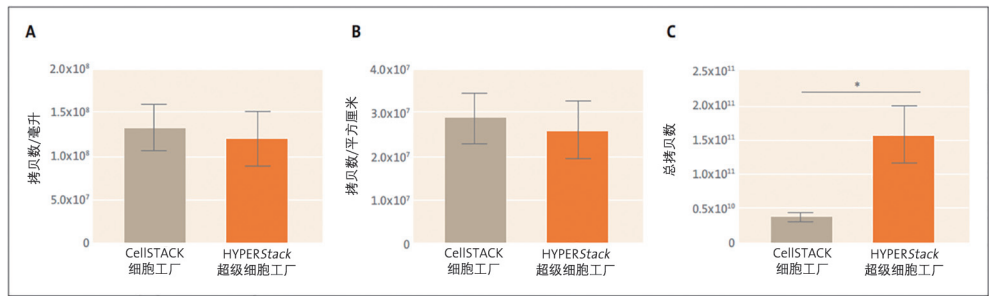


图 4. 与 2 层细胞工厂相比, 康宁 HYPERStack 超级细胞工厂可支持生产不同类型病毒且产量更高。(A) 用 Lenti-X™ qRT-PCR 病毒滴度试剂盒测得的慢病毒滴度。(B) 单位平方厘米 HYPERStack 超级细胞工厂生产的慢病毒与细胞工厂没有显著性差异。(C) HYPERStack 超级细胞工厂的生产的慢病毒总产量明显更高。t 检验, \* p < 0.05, N = 3。

### MDBK 细胞中的 GFP 表达

为验证 HYPERStack 超级细胞工厂生产的慢病毒与 2 层细胞工厂生产的慢病毒具有相同的功能, 我们用含有 GFP 基因的慢病毒感染 MDBK 细胞, 分析目的基因 GFP 的表达情况。慢病毒感染细胞的 MOI 值为 10。接毒 72 小时后, 收集细胞并用流式细胞仪对 GFP 表达分析。结果表明, MDBK 感染不同来源的慢病毒 72h 后, 大于 80% 的细胞均表达绿色荧光蛋白 (图 5, 两次独立重复实验)。所有的结果表明, 与传统的细胞工厂相比, HYPERStack 超级细胞工厂单位面积 (cm<sup>2</sup>) 生产的慢病毒滴度相当。

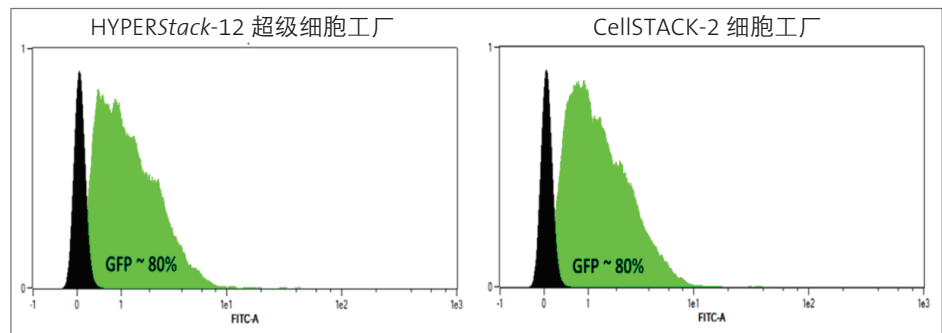


图 5. 流式细胞仪分析结果显示慢病毒感染的 MDBK 细胞中 GFP 的表达量没有显著性差异。结果显示, 与非感染 MDBK 细胞(黑色)的对照组相比 GFP(绿色)细胞的表达情况。经两次独立实验, 无论是哪个培养器皿生产的慢病毒, 感染 MDBK 细胞后, GFP 表达效率均大于 80%。

### 总结

本研究表明, HYPER 气体透气膜细胞培养技术作为传统细胞培养技术的替代品, 可用于大规模慢病毒的生产且表现更好。

- ▶ 与传统多层细胞培养容器相比, Corning HYPERStack 超级细胞工厂可以进行大规模慢病毒生产, 单位面积 (cm<sup>2</sup>) 的病毒产量与滴度相当, 总的病毒产量更高。
- ▶ 与传统多层细胞培养容器相比, 在 HYPER 技术平台上产生的慢病毒颗粒表现出相当的感染水平。
- ▶ 康宁 HYPER 产品技术可提供具有更大表面积的大容器, 以进一步提高病毒产量。

**CORNING**

☎ 400-600-0207  
✉ CLSCHINA@corning.com  
🌐 www.corning.com/lifesciences/china

**FALCON**

🌐 www.cls-china.cn  
🌐 www.cellculturesuccess.com

**AXYGEN**

**GOSSSELIN**

**PYREX**

