

Усовершенствование продукции рекомбинантных аденоассоциированных вирусов 9-го серотипа в клетках линии HEK293T

Научный руководитель – Иматдинов Ильназ Рамисович

Алиев Тимур Илхамович

Аспирант

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук,
Новосибирск, Россия

E-mail: aliev.timur99@yandex.ru

Введение. На основе диких серотипов аденоассоциированных вирусов (AAV) получают рекомбинантные AAV (pAAV). Геном pAAV вместо нативных генов содержит экспрессионную кассету: трансен и регуляторные элементы, фланкированные инвертированными концевыми повторами. Способность AAV доставлять трансгены в живой организм нашло своё применение в получении трансгенных животных и генной терапии. Подобное широкое применение AAV требует крупномасштабной продукции. Цель нашего исследования – оптимизация процесса производства рекомбинантных вирусных частиц AAV 9-го серотипа.

Материалы и методы. Линии HEK293T и L929 культивировали в среде DMEM-F12 с содержанием 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота – FBS. Для трансфекции применялся реагент Lipofectamine 2000. Для определения титра AAV (числа векторных геномов в 1 мл, вг/мл) клетки-продуценты инкубировали в 0.05% растворе Triton-X100 для высвобождения векторных частиц из клеток. Суспензию обрабатывали бензонуклеазой. ПЦР в реальном времени проводили на приборе QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, используя праймеры на область ITR AAV. Достоверность различий между группами данных оценивали с применением t-критерия Стьюдента и теста Тьюки. Различия принимались за достоверные при $p < 0.01$.

Результаты. Показано, что объединение двух вспомогательных плазмид pHelper и pRC в одну приводит к повышению титра в 4 раза по сравнению с классическим методом трансфекции тремя плазмидами. Сокращение соотношения вспомогательной плазмиды и плазмиды с экспрессионной кассетой до 1 : 0.6 привело к повышению титра в 3 раза. При дальнейшей оптимизации производственной среды выявлено, что наибольший титр около 4×10^{12} вг/мл достигался при продукции в DMEM с добавлением 2% или 4% FBS независимо от содержания глюкозы (1 и 4.5 г/л). Функциональность собранных вирусных частиц подтверждена путём трансдукции клеток L929.

Выводы. В результате проведенных исследований была усовершенствована продукция AAV9 в адгезивных клетках линии HEK293T.