

# 基因編輯iPSC克隆細胞庫的高效工作流程開發

## 介紹

隨著細胞治療公司計劃未來從製程開發轉移到臨床製造，他們希望採用強大的工作流程，這些工作流程旨在最好地管理一致性、產品質量並滿足適當的監管要求和製造實踐。

在過去十年中，從事治療性單克隆抗體生產的實驗室採用了一種“克隆衍生 (Clonally-derived)”方法，該方法從細胞庫 (Pools of cells) 中播種單顆細胞，從而限制異質性。此外，這種做法需要克隆性的品質證據 (Quality evidence of Clonality)，支持單細胞分配後的存在，以便提交給藥品機構。

參與克隆人類誘導型多能幹細胞 (Human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 的實驗室將熟悉限制性稀釋 (Limiting dilution, LD) 的做法 (以計算出的每孔 $<1$ 個細胞濃度移液) 或使用熒光激活細胞分選 (Fluorescently activated cell sorting, FACS) 等平台。然而，這些方法通常效率低下 (細胞存活率低和生長率低)，而且不支持基於圖像 (Image-based) 的證據來保證目的，而 FACS 也不利於製造環境。

該過程中的基因編輯步驟也增加了額外的挑戰。基因編輯方法通常會損害細胞健康和存活。根據所用方法的複雜性和類型，這可能會極大地改變項目的規模，以最終找到少數在基因編輯過程中存活下來的細胞，生長成細胞集落 (Colony)，然後在基因分析後確認克隆含有所需的基因組合。根據經驗，對於簡單的基因敲除 (Knockouts)，需要產生100-150個克隆才能產生10個適合建庫 (Banking) 的克隆。對於多個敲入 (Knock-in) 基因編輯，此要求可能是>1000個克隆。在這個規模上，LD 則不是一個實際、有效率的選擇。

Advanced Instruments 之前曾發佈過<sup>(註1)</sup>在使用親代 hiPSC 細胞株進行單細胞接種的工作流程中使用 VIPS™ (Verified In-situ Plate Seeding) 儀器和MatriClone™ (一種 Laminin-based matrix) 技術平台的應用文章。VIPS™ 通過機載成像 (On-board imaging) 提供自動播種和支持克隆性保證。依據基因編輯工作流程的各式挑戰，本篇採用相同的方法來驗證 VIPS™ + MatriClone™ 對於基因編輯 hiPSC 細胞工作流程的有效性。

本篇研究目的在於展示以下項目：

1. 在96孔盤中接種效率高 (每孔接種單顆細胞的百分比)。
2. 高克隆效率 (每孔接種單顆細胞的後續生長百分比)。
3. 產生足夠數量的序列已驗證、適合建庫之克隆(>150)。
4. 圖像形式的質量證據和用於監管提交的克隆性文件。
5. 臨床生產和 GMP 環境兼容的試劑。
6. 建庫克隆應保持幹細胞特徵，包括多能性 (Pluripotency) 和形態 (Morphology)。

## 材料和方法

VIPS™ 是一台自動化的單細胞接種儀，可在極低的細胞壓力下將單個細胞分配到96或384孔盤中。VIPS™ 通過納升 (Nanoliter, nL) 體積液滴的20層Z軸堆疊影像來驗證孔中單個細胞的存在，然後使用 AI 人工智能來識別單個細胞、無細胞或多個細胞的存在。接著，VIPS™ 會自動將培養基填充進每個孔中。VIPS™ 可以獲得完整的全孔圖像 (Whole well imaging) 以證明單顆細胞的存在。這種克隆性 (或稱作“雙鎖”) 的雙重確認點是支持未來監管提交的關鍵組成部分。

本篇使用核糖核蛋白 (Ribonucleoprotein, RNP) 遞送 CRISPR-Cas9 系統，敲除 hiPSC 細胞株中的 EMX1 基因 (參與神經元模式的轉錄因子) 位點。核轉染 (Nucleofection) 後，將 hiPSC 作為單細胞，透過 VIPS™ 或 LD 接種到96孔盤中，然後使用含有 MatriClone™ 的培養基進行培養擴增。孔盤在 VIPS™ 系統上進行每日全孔成像，以確認克隆來源，並追蹤細胞集落的生長。

如先前文獻 (Manos et al.) 所示，與 LD 相比，VIPS™ 組別的每塊孔盤成功衍生自單個細胞的集落數量提高了3-4倍。在這項研究中，從三個 VIPS™ 接種的96孔盤中，生成了100個克隆集落，然後進行選擇和基因分型以確認 EMX1 基因座的 Indel (鹼基插入或缺失)。後續挑選了兩個已確認 EMX1 敲除的克隆進行細胞擴增與表徵。

## 1. 選擇目標基因位點以進行基因編輯、設計與製備 Guide RNA (gRNA)

基因位點 (EMX1) 的選擇基於先前文獻 (Ran et al., 2013)，其中使用 CRISPR/Cas9 技術進行基因編輯。簡而言之，將感興趣的目標序列輸入 Benchling 基因編輯工具中 (Hsu et al., 2013)，並從候選 gRNA 中選擇三個脫靶效應分數最低的 on-target gRNA 進行後續實驗。

## 2. 細胞製備與轉染

在單細胞接種之前，使用 MatriClone™ 配置培養基馴化 hiPSC 細胞株，並至少經過兩次完整繼代。細胞通過團塊繼代技術 (Clump passaging technique)，通常以1:15的分流比在預塗有 MatriClone™ 的6孔盤上進行培養，MatriClone™ 使用方式根據製造商說明。使用培養基是 mTeSR Plus (StemCell Technologies)。

## 3. 細胞池掃描與篩選

在繼代後生長的第3天，使用 Accutase 進行 hiPSC 單細胞解離，計數細胞並針對 Cas9 和 gRNA 的遞送進行調整。將大約 100萬個細胞等分到三個單獨的試管中，並使用 Cas9 和步驟1中的三種不同 gRNA 進行製備。

接著，根據製造商手冊使用 NEON 電穿孔裝置遞送細胞和基因編輯組件。將每個樣品接種到塗有 MatriClone™ 的6孔盤中，並使用 mTeSR + CloneR (StemCell Technologies) 培養基進行擴增。

在第3天時，從每個帶有不同 gRNA 的6孔盤中收集樣本，並使用 TIDE (Tracking of Indels by Decomposition) 分析評估基因編輯效率。簡而言之，首先設計多個引子篩選來自粗細胞裂解物 (Crude cell lysate) 的最佳 PCR 產物。然後從每個孔盤中取出一部分細胞，提取 DNA 並對 PCR 產物進行 Sanger 定序 (雙去氧鏈終止法)。

## 4. 播種、播種參數及饋料

在第5天時，從 TIDE 分析中獲得的基因敲除效率最高的細胞池是 gRNA#2，故選擇它進行 VIPS™ 播種 (圖1)。對於單細胞接種，使用 Accutase 將 hiPSC 集落解離成單細胞，並使用 Spectra 細胞計數器 (Nexcelom) 進行活細胞計數。接種前細胞存活率為85%。在 mTeSR Plus 培養基中將細胞濃度調整為大約10,000個細胞/mL，以獲得最佳的接種效率。溶液中的 MatriClone™ 直接添加到 Cell Reservoir 的培養基中，然後通過 VIPS™ Cell Reservoir 噴嘴分配到每個孔中。每個特定 gRNA 池皆接種5個孔盤。在播種和液滴中確認單顆細胞後，將 125  $\mu$ L 含有 MatriClone™ 和 CloneR 補充劑的培養基通過 VIPS™ 分配系統添加到每個孔中。隨後，透過在接種後第1天和第3天向每個孔添加50  $\mu$ L 培養基來補充96孔盤，並在接種後第5天時完全更換培養基。重複這種餵養 (Feeding) 方案直到第12天。

## 5. 克隆擴展

在第12天時，依據VIPS™ 的 AI 演算法 (Confluence detection algorithm) 從VIPS™ 播種孔盤中根據形態篩選出 hiPSC 生長克隆 (圖2)。使用基於EDTA的解離試劑，從三個獨立的96孔盤中分離出單個克隆，並小心的將細胞克隆透過團塊繼代方式，從含有 CloneR (僅初始分裂使用) 的培養基中接種到預塗有 MatriClone™ 或 Matrigel® (Corning) 的96孔盤或6孔盤中。在後續繼代中 (p+2播種後)，將10個確認了基因敲除的 hiPSC 克隆擴增到最小6孔盤中，用於冷凍保存和表徵。

## 6. 測序

首先收集擴增克隆的單顆細胞樣品，提取 DNA 並以 Sanger 法進行測序，再通過 TIDE 分析基因敲除程度。大約96個克隆被挑選進行初篩，其中10個樣本被發現具有合適的基因編輯圖譜，並被選用於後續繼代。

## 7. 多能性標記表達、核型表徵

如前述進行表徵。簡而言之，從冷凍保存中解凍恢復兩個選定的 hiPSC 克隆，並在轉移到新孔盤中進行進一步分析之前接種到 Matrigel-coated 6孔盤中。使用 ICC/IF 染色確認多能性標記物 Nanog 和 Tra-1-60。通過 G-banding 對 hiPSC 進行核型分析。

## 結果

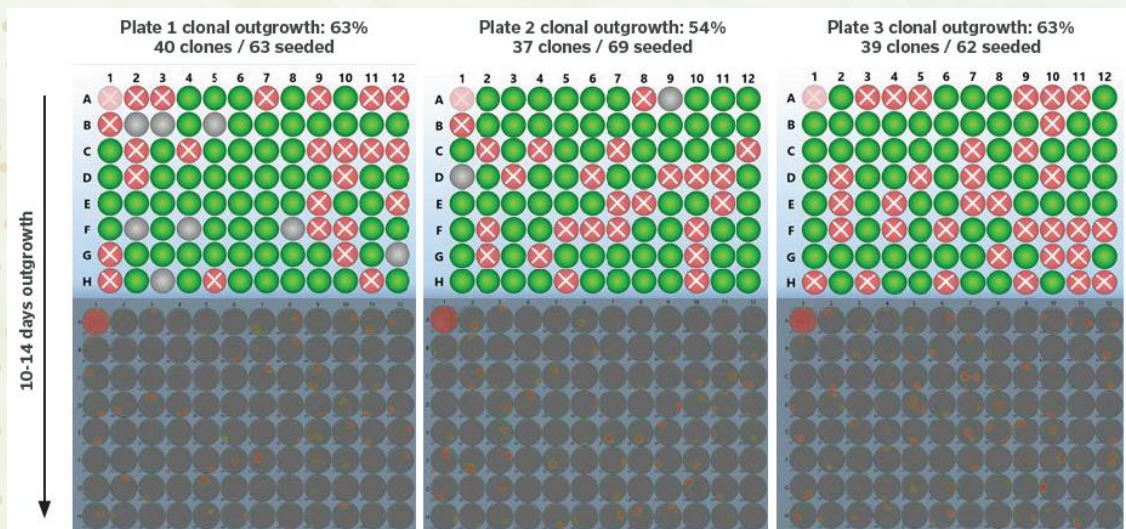


圖1. gRNA#2 細胞池的單細胞接種和克隆生長結果。圖像來自 VIPST<sup>TM</sup> 軟體。

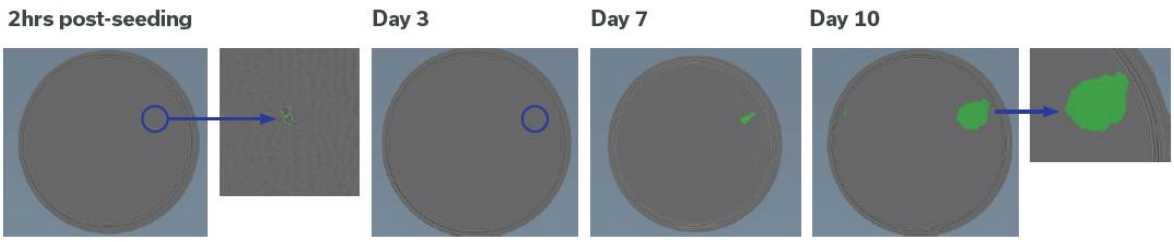


圖2. VIPSTM 的集落形態評估，利用神經網絡演算法檢測 hiPSC 匯合度。

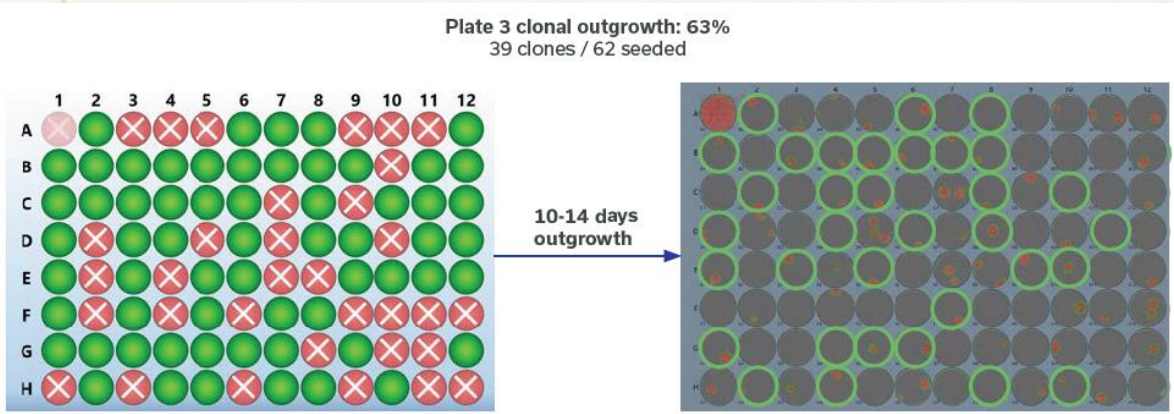


圖3. 基因編輯的 hiPSC 單細胞播種對克隆產物的播種效率示例。

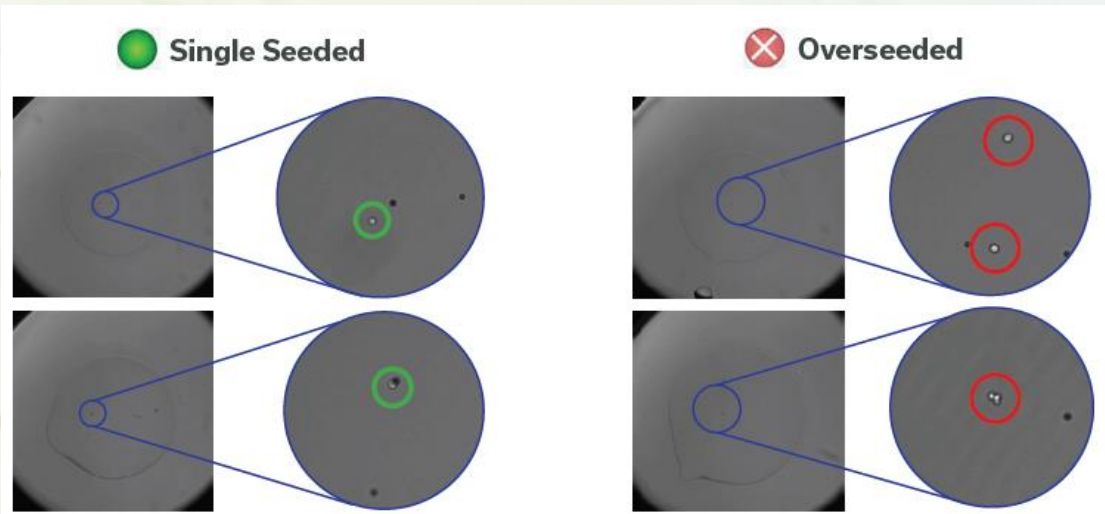


圖4. 分配液滴 (Dispensed droplet) 的自動圖像分析可以從多個細胞、空孔和細胞碎片中分辨出單個細胞，支持克隆性的證據。



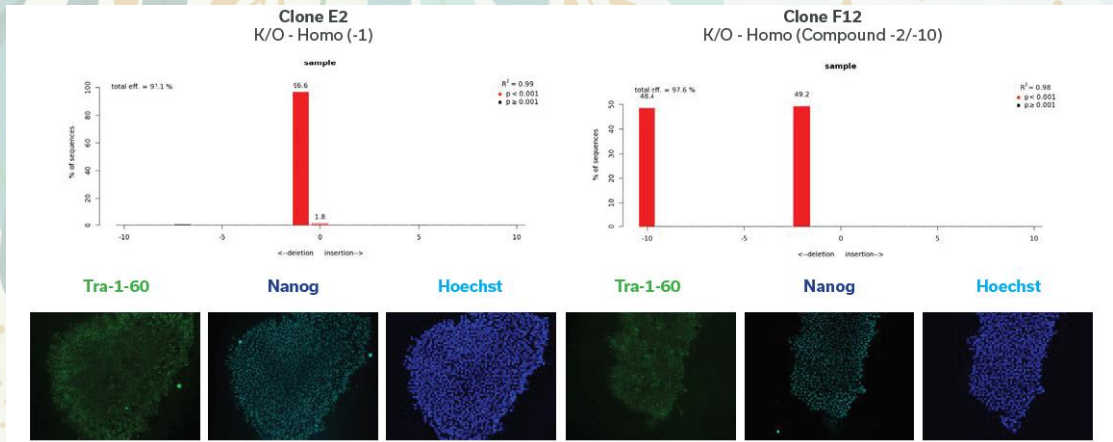


圖5. 擴展 hiPSC 克隆的表徵、基因編輯程度和多能性標記物表達：克隆 E2 是 Homozygous deletion，兩個等位基因均有一個鹼基缺失；克隆 F2 是 Compound Homozygous deletion，其中一個等位基因缺失2個鹼基對，另一個等位基因缺失10個鹼基對。

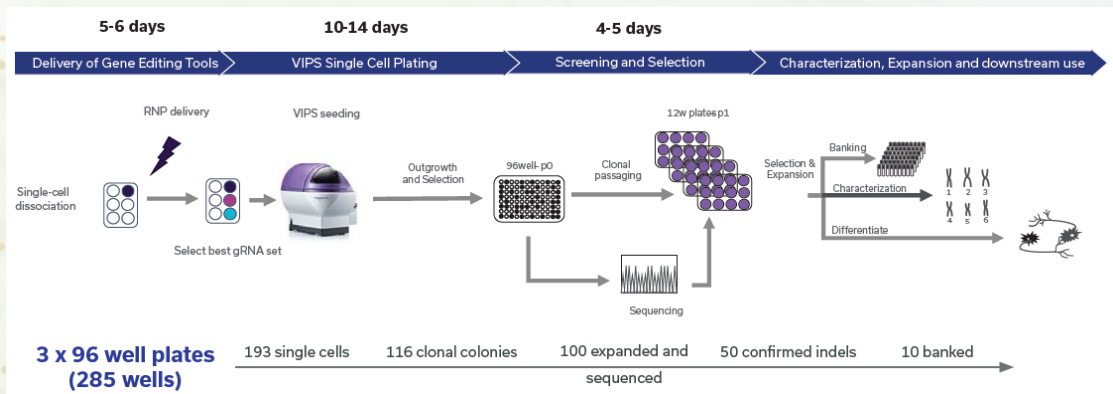


圖6. 用於單細胞接種、基因編輯的 iPSC 細胞自動化工作流程設計，用於建立具有克隆性證據的細胞庫。

## 結果與結論

先前文章<sup>(註1)</sup>展示了 iPSC 單細胞克隆工作流程中利用 VIPSTM 和 MatriClone™ 的顯著改進，與限制性稀釋 (LD) 相比，每 96孔盤的克隆集落數量顯著增加1。

hiPSC 的基因編輯則進一步增加了該工作流程的複雜性，並對活細胞和所得集落的選擇更加嚴格。編輯和多次編輯的概率計算，意味著每個項目可能產生更多的克隆集落。這需要更多的孔盤、更高程度的自動化並需要在播種克隆的同時記錄克隆性證據，以便這些數據可以作為 IND (新藥研究) 申請的提交文件。

本研究展示了使用 VIPSTM/MatriClone™ 組合平台敲除 EMX1 基因的代表性基因編輯工作流程。使用 VIPSTM 的播種效率平均為65%，在三個完全鋪滿的96孔盤中，其克隆效率為60% (或更高) (圖3)。

本篇從擴展的100個克隆中成功獲得了10個合適的克隆。此外，VIPSTM 系統與其基於人工智能的偵測相結合，提供了單個細胞存在的質量證據，準確地將單個細胞從多個細胞和聚集體中分離出來 (圖4)。VIPSTM 系統的另一個好處是能夠捕獲每日全孔圖像 (從第0天開始)，除了質量保證外，還可以追蹤克隆保證的集落生長。重要的是，本篇證明了選擇用於儲存的 hiPSC 克隆保持了其多能性標記表達和核型的表徵標準 (圖5顯示的兩個克隆之數據)。

除了 VIPS™ 平台的技術優勢之外，時間要求通常也是一個關鍵因素。這會影響用於製造的組織培養組合之商業佔用時間。重要的是，本篇所描述的工作流程可以在短短25天內完成 (圖 6)，並且只需要在3個96孔盤中播種，後續即可產生100個克隆。通過提高效率 and 減少材料，依據本篇研究估計典型基因編輯工作流程的時間最多可減少50%。因此，通過提高整體效率，VIPS™ 平台允許更複雜的編輯項目。此外，VIPS™ 系統提供質量數據保證和報告，允許實時評估和合規性。

而對於更具挑戰性的基因敲入 (Knock-in) 項目，上述過程將更加低效，這意味著每塊孔盤的集落數可能更少，因此需要更多的孔盤才能獲得目標集落數。相信這個工作流程的穩健性對於開發 iPSC 衍生細胞療法的任何人員來說，可能會直接影響克隆性的標準、一致性和可信度。此外，通過 GMP 等級試劑以及儀器安裝和操作認證服務，減輕了將該工作流程從製程開發轉化為臨床製造環境的法規監管負擔。

這裡應該注意的是，用於同種異體細胞治療的克隆來源之主細胞庫應該建立在

GMP 條件下。進一步的工作流程將涉及測試不同的解離試劑、ROCK 抑製劑和培養基，以獲得與 GMP 製造環境兼容的組合。相信這一工作流程將成為優質細胞治療實驗室的標準。

## Publication References

1. [Manos et al. Standardizing the process for viable, high efficiency single cell cloning of hiPSCs whilst ensuring maintenance of phenotype.](#)
2. [Ran, F., Hsu, P., Wright, J. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc 8, 2281–2308 \(2013\).](#)
3. [Hsu, P., Scott, D., Weinstein, J. et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat Biotechnol 31, 827–832 \(2013\).](#)

文章來源：[Development of a Highly Efficient, Documented Workflow for Making Clonal Cell Banks of Gene-Edited iPSCs \(Advanced Instruments\)](#)

註1：High Efficiency Single Cell Cloning of hiPSCs While Ensuring Maintenance of Phenotype (Advanced Instruments)