



携EGFP基因的逆转录病毒包装细胞的分选和滴度测定

逆转录病毒载体是基因治疗中最常用的病毒载体，它具有将目的基因高效转染细胞，并稳定表达的优点[1]。目前逆转录病毒载体通常采用新霉素磷酸转移酶基因作为筛选标记，筛选并得到有效的包装细胞克隆需要4~6周，这种方法具有周期长、繁琐等缺点[2]，寻找新的有效快捷的获得包装细胞的方法是简化逆转录病毒载体应用的基础。

绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)是一种能发出绿色荧光的报道分子，近年来在研究中得到了广泛的应用[3]。流式细胞仪的发展使其具有了分选功能，依据GFP的荧光标记，利用流式细胞仪的分选功能已成功的获得了高纯度的GFP⁺细胞[4]。因此，本实验将依据GFP荧光标记利用流式细胞仪分选快速获得重组逆转录病毒包装细胞并对其滴度进行测量，以期获得有效快捷的获得包装细胞的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

pLEGFP-C1质粒购自Biosciences Clontech 公司，双嗜性包装细胞系PA 317、NIH3T3小鼠成纤维细胞为本中心常规保存，TripureTM Isolation Reagent、T₄ DNA连接酶购自瑞士罗氏公司，脂质体转染试剂盒LipofectAMINE2000、G418、HAT、HT购于GIBCO 公司，Taq DNA聚合酶、dNTP、质粒提取及纯化试剂盒WizardTM Plus Minipreps、PCR片段回收及纯化试剂盒Wizard T Mini-column购自Promega公司，标准DNA相对分子质量标准物DL-2000购于TaKaRa公司，流式细胞仪(冷源氩离子气体激光器5500-A)购于Becton Dickinson公司。

1.2 包装细胞的准备与转染

包装细胞PA317于HAT培养液中选择性培养5 d，换以HT培养液过渡培养4 d，转入含10%小牛血清的普通DMEM培养液中培养。在转染前1 d，选择生长状态良好的细胞，用0.25%胰蛋白酶消化后将 6×10^5 细胞接种于90 mm培养皿中，置37 °C、5% CO₂ 孵箱内培养24 h。转染前4 h换10 ml新鲜完全DMEM培养液，置37 °C、5% CO₂ 孵箱内培养。用脂质体转染法将pLEGFP质粒转染PA317 细胞，方法如下：取8 μg纯化的pLEGFP质粒稀释于500 μl无血清的DMEM培养液中，20 μl LF2000转染试剂稀释于500 μl无血清的DMEM培养液中，5 min内将二者混匀，室温孵育20 min后将混合物逐滴加入接种PA317 细胞的培养皿中，置37 °C、5%CO₂ 孵箱内培养16 h，换完全DMEM培养液继续培养36 h，荧光显微镜观察转染情况，并准备流式细胞仪分选。

1.3 多克隆源性的包装细胞获得

细胞转染后48 h，胰酶消化，悬浮于PBS中，被流式细胞仪分选。分选窗口设置为EGFP阳性的正常形状的分散细胞，启动Autoclone装置，分选速度为每秒2 000个细胞，回收纯度95%。为了获得稳定表达包装细胞，实行连续流式细胞仪分选，间隔5 d，每次分选后的样本分别培养2周和3月并行流式细胞仪分析荧光表达的细胞。

1.4 单克隆源性包装细胞的获得

对于流式细胞仪连续分选得到的多克隆源性的包装细胞，通过流式细胞仪的cyclone装置，将单个细胞引导到96孔板，每孔100 μ l完全培养液，2~3周，通过荧光显微镜观察克隆(克隆>100细胞)。选择3个克隆，分别培养2周和3月作流式细胞仪荧光分析。

1.5 分泌重组逆转录病毒的包装细胞系的鉴定

采用TripueTM Isolation Reagent提取获得的多克隆源性的包装细胞和8个单克隆源性的包装细胞基因组DNA，以EGFP-C的引物进行PCR。取100 μ l病毒上清，异硫氰酸胍一步法提取病毒RNA，先用随机六聚体引物进行反转录，再以EGFP-C的引物进行PCR，扩增产物进行电泳分析。EGFP-C的5'引物为5'-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3'，3'引物为5'-ACCTACAGGTGGGTCTTTCATTCCC-3'，扩增片段大小为233 bp。

1.6 包装细胞滴度的测定

选取经鉴定含有病毒的多克隆源性的包装细胞和6个单克隆源性的包装细胞行病毒滴度测定，测定以NIH3T3细胞为指示靶细胞。2 \times 10⁵ NIH3T3细胞培养1 d后，吸去培养液，加入1 ml 倍比稀释的包装细胞上清液(1 \times 10⁻²，1 \times 10⁻⁴，1 \times 10⁻⁶/ml)，置37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱内培养5 h，补加5 ml完全DMEM培养液继续培养24 h，换以含有500 μ g/ml G418的完全DMEM培养液7~14 d，直至细胞集落形成，结晶紫染色，计数并计算集落形成率(Colony forming unit, cfu)。

2 结果

2.1 包装细胞的准备与转染

经HAT选择性培养，PA317细胞生长受抑制，但无明显细胞死亡，换入正常培养基后，细胞恢复正常生长状态，表明所用细胞株无变异，可用来作为逆转录病毒的包装细胞。用脂质体转染法，成功的将pLEGFP逆转录病毒表达载体转染入PA317细胞，转染48 h后，荧光纤维镜下可见荧光蛋白的表达(图1)。

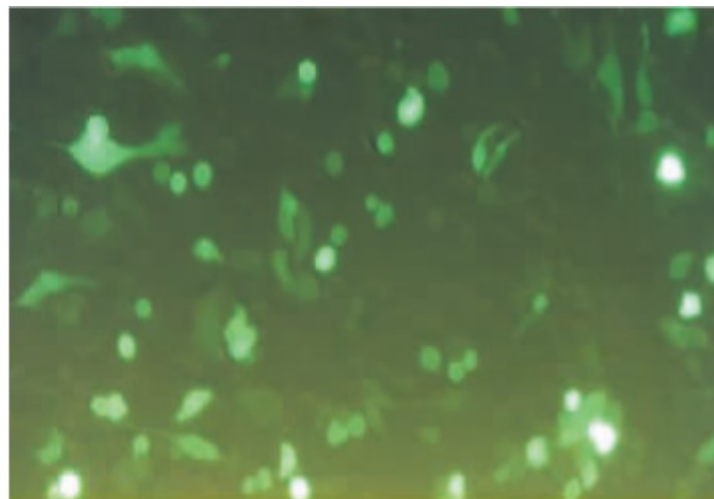


图1 PA317转染48 h后的荧光相片(原放大倍数: \times 100)

Fig.1 Florescence of PA317 cells 48 h after retrovirus transfection (Original magnification: \times 100)

2.2 多克隆源性的包装细胞获得

脂质体转染细胞48 h，经流式细胞仪分析，转染率为25%(图2A)。连续4次分选后，得到的样本经2周和3月培养后，流式细胞仪分选显示已获得稳定表达的多克隆源性的包装细胞(图2B)。

2.3 单克隆源性的包装细胞获得

通过流式细胞仪的cyclone装置，获得了单克隆源性的包装细胞，克隆率为80%。对其中的3个克隆，分别培养2周和3月作流式细胞仪荧光分析显示，均获得稳定表达的单克隆源性的包装细胞(图2C)。

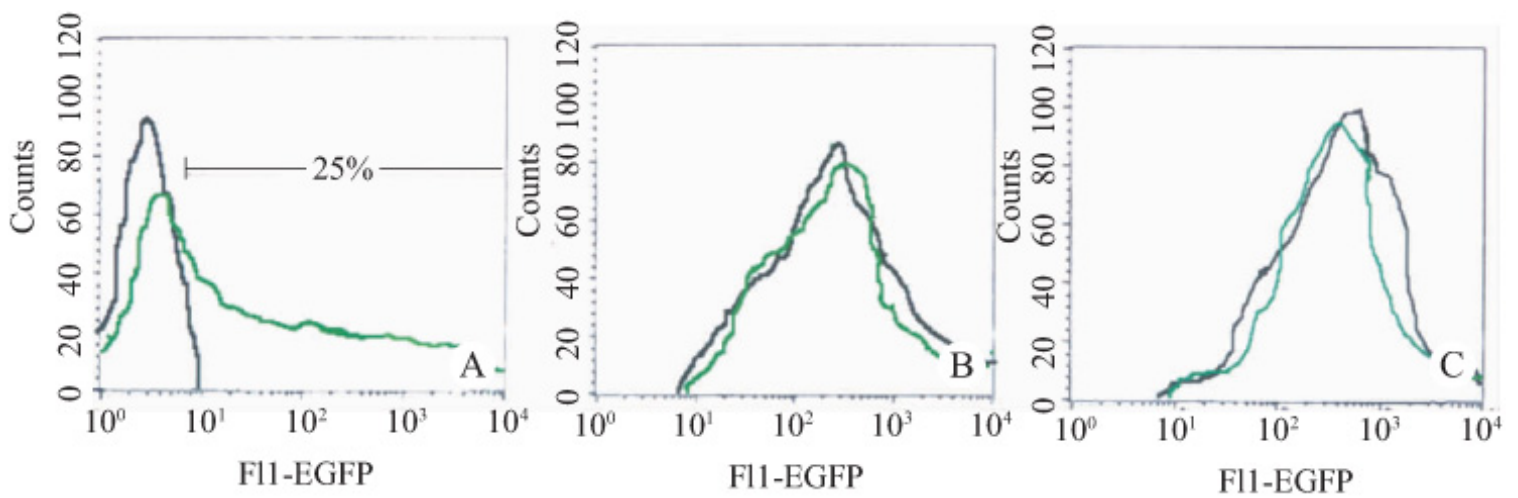


图2 流式细胞仪分析

Fig.2 Analysis with flow cytometry

A: Initial analysis following liposome-mediated retroviral transfection of the cells (the black line shows control group, and the green line shows experiment group). B: Analysis of the polyclonal packaging cells (black and green lines indicate cells 2 weeks and 3 months after transfection); C: Analysis of monoclonal packaging cells (black and green lines indicate cells 2 weeks and 3 months after transfection)

2.4 分泌重组逆转录病毒的包装细胞系的鉴定

PCR结果显示多克隆源性和单抗源性的包装细胞基因组都含有EGFP的基因，表明外源基因已插入包装细胞的基因组中。RT-PCR结果显示多克隆源性的包装细胞上清有病毒的分泌，而单抗源性的包装细胞上清8个中6个有病毒分泌，2个无病毒存在(图3)。

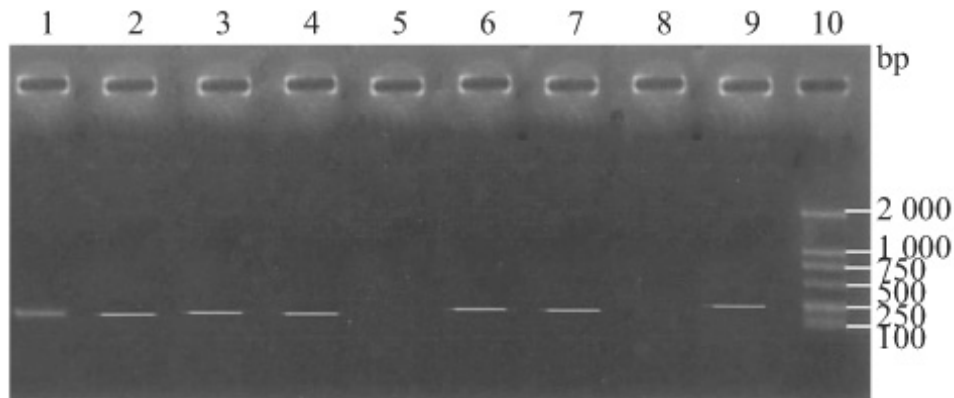


图3 包装细胞系上清的RT-PCR鉴定

Fig.3 RT-PCR identification of the supernatant of packaging cell culture
Lane 1: Polyclonal packaging cells; Lanes 2-9: Monoclonal packaging cells; Lane 10: DNA marker DL-2000

2.5 包装细胞滴度的测定

经感染的NIH3T3细胞，G418筛选， 10^{14} d镜下可见抗性细胞集落形成，结晶紫染色如图4。经计算，多克隆源性的包装细胞的cfu为 8.6×10^4 /ml，6个单克隆分别为 0.6×10^5 、 6.2×10^6 、 1.3×10^4 、 5.6×10^4 /ml、 3.1×10^5 、 6.6×10^4 /ml。这些结果证实获得的包装细胞系能够具有有效的滴度。

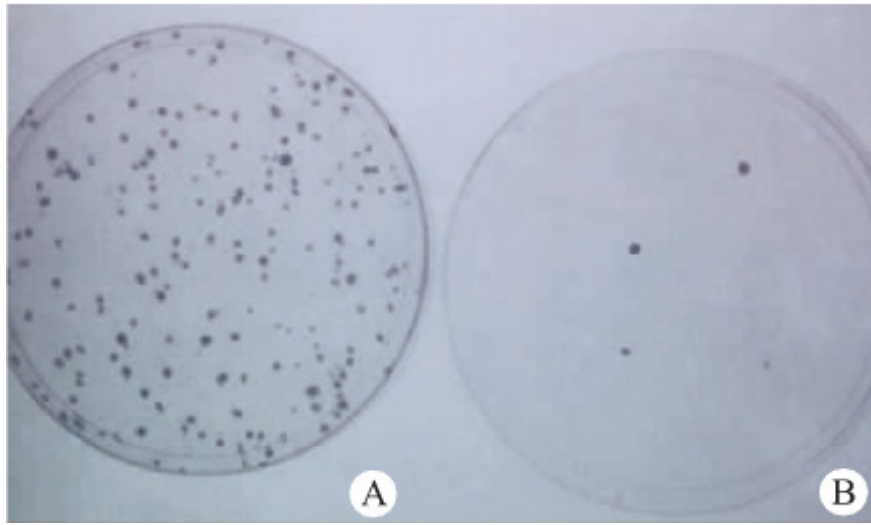


图4 重组逆转录病毒产生细胞的cfu测定结果

Fig.4 Determination of the colony-forming unit of cells producing the recombinant retrovirus

A: Diluted supernatant (10:2); B: Diluted supernatant (10:4)

3 讨论

依据EGFP荧光，通过流式细胞仪分选技术，本实验获得了多克隆源性及单克隆源性的包装细胞，通过滴度测定，获得的包装细胞系能够具有有效的滴度。

荧光激活细胞分选技术获得高纯度的GFP⁺的细胞已有较多研究。为了获得稳定表达GFP⁺细胞，Van Tendeloo[4]首次通过连续流式细胞仪分选技术成功的获得了稳定表达GFP⁺ K562 细胞株。本实验也应用了连续荧光激活细胞分选技术，4次分选后同样得到了多克隆源性的稳定表达GFP⁺细胞系，其数量较多，不需要扩增即可满足实验需要。为了获得单克隆源性的GFP⁺细胞系，本实验利用流式细胞仪的cyclone装置，成功的将单个细胞置入96孔板中，1~2周获得单细胞源性的克隆，克隆率达80%。

但值得关注是，这种方法得到的多克隆源性、单细胞源性的包装细胞是否能分泌有效的病毒滴度。本实验对获得包装细胞系进行了病毒分泌物的鉴定和滴度的测定。结果显示，多克隆源性和单细胞源性的包装细胞都能够具有有效的感染滴度。这个结果与Hanazono[5]研究有差异，他们认为GFP基因具有较高的重组率，故GFP表达的包装细胞具有较低的滴度。我们推测产生这种差异的原因可能是本实验所用的GFP为变异体EGFP有关。

在测定的8个单克隆源性包装细胞系中，虽然都有外源基因EGFP插入，但有2个克隆无病毒的分泌，存在假克隆的现象。这种现象在新霉素筛选的方法中同样也存在。更多的学者[6]倾向与有外源基因插入宿主基因组之前要线性化有关，因为断裂部位是随机的。因此有可能产生GFP有表达但无产生病毒能力的细胞株。

传统的获得逆转录病毒包装细胞系的方法是依靠Neo基因筛选标记，通过含新霉素的选择性培养基中选择。由于抗生素所诱导的过度的蛋白代谢的负荷将严重影响细胞的生长，故这种方法获得有效克隆通常需要4~6周[7]。而依据GFP荧光通过流式细胞仪分选技术的方法没有给细胞产生代谢负荷，具有快速、方便等优点，尤其对于获得多克隆源性的包装细胞。

本实验显示荧光激活细胞分选技术是得到有效病毒滴度的包装细胞的有效方法。

参考文献：

[1] Somia N. Gene transfer by retroviral vectors: an overview[J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 246: 463-90.

[2] Dornburg R. The history and principles of retroviral vectors[J]. *Front Biosci*,

2003, 8: 818-35.

[3] Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior[J]. Chem Rev, 2002, 102(3):759-81.

[4] Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Van Broeckhoven C, et al. Efficient generation of stably electrotransfected human hematopoietic cell lines without drug selection by consecutive FACsorting[J]. Cytometry, 2000, 41(1): 31-5.

[5] Hanazono Y, Yu JM, Dunbar CE, et al. Green fluorescent protein retroviral vectors: low titer and high recombination frequency suggest a selective disadvantage[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(11): 1313-9.

[6] Gubin AN, Reddy B, Njoroge JM, et al. Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 236: 347-50.

[7] Chinswangwatanakul W, Lewis JL, Manning M, et al. Use of G418 resistance to select cells retrovirally transduced with the Neo(R) gene[J]. Exp Hematol, 1998, 26(3): 185-7.

参考文献:

[1] Somia N. Gene transfer by retroviral vectors: an overview[J]. Methods Mol Biol, 2004, 246: 463-90.

[2] Dornburg R. The history and principles of retroviral vectors[J]. Front Biosci, 2003, 8: 818-35.

[3] Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior[J]. Chem Rev, 2002, 102(3):759-81.

[4] Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Van Broeckhoven C, et al. Efficient generation of stably electrotransfected human hematopoietic cell lines without drug selection by consecutive FACsorting[J]. Cytometry, 2000, 41(1): 31-5.

[5] Hanazono Y, Yu JM, Dunbar CE, et al. Green fluorescent protein retroviral vectors: low titer and high recombination frequency suggest a selective disadvantage[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(11): 1313-9.

[6] Gubin AN, Reddy B, Njoroge JM, et al. Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 236: 347-50.

[7] Chinswangwatanakul W, Lewis JL, Manning M, et al. Use of G418 resistance to select cells retrovirally transduced with the Neo(R) gene[J]. Exp Hematol, 1998, 26(3): 185-7.