

携 EGFP 基因的逆转录病毒包装细胞的分选和滴度测定

张银刚¹, 郭雄¹, 周京军², 鱼兵³, 刘兵³ (1西安交通大学医学院环境与疾病相关基因教育部重点实验室地方病研究所, 陕西 西安 710061; 2第四军医大学²基础部生理教研室, 陕西 西安 710032; 3唐都医院中心实验室, 陕西 西安 710038)

摘要:目的 探讨利用荧光激活细胞分选技术获得有效重组逆转录病毒包装细胞系的方法。方法 用脂质体介导 pLEGFP 转染 PA317 细胞, 用荧光显微镜观察转染结果; 依据 EGFP 荧光利用流式细胞仪的分选技术获得多克隆和单克隆源性的包装细胞, 并利用 PCR、RT-PCR 对其鉴定; 以 NIH3T3 为靶细胞, 对其滴度进行测定。结果 荧光显微镜显示用脂质体介导的方法成功的转染 PA317 细胞, 在 4 次连续流式细胞仪分选后得到了稳定表达的多克隆和单克隆源性的包装细胞。PCR 和 RT-PCR 分别从多克隆和单克隆源性的包装细胞基因组 DNA 以及多克隆和部分 (6/8) 单克隆源性的包装细胞培养上清中的重组逆转录病毒 RNA 中扩增出了插入的 EGFP 片段。滴度测定显示得到的包装细胞能够产生有效的病毒滴度。结论 荧光激活细胞分选技术是获得有效病毒滴度的包装细胞的有效方法。

关键词: EGFP; 重组逆转录病毒载体; 荧光激活细胞分选技术; 基因转染

中图分类号: R456 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2005)01-0030-03

Sorting of packaging cells for retroviral vector carrying green fluorescent gene and viral titer determination

ZHANG Yin-gang¹, GUO Xiong¹, ZHOU Jing-jun², YU Bing³, LIU Bing³

¹Institute of Endemic Disease, Education Ministry Key Laboratory of Environment and Disease-Related Genes, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; ²Department of Physiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; ³Central Laboratory, Tangdou Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

Abstract: Objective To develop a method for acquisition of efficient and stable retroviral packaging cells on the basis of fluorescence-activated cell sorting (FACS) technique. **Methods** PA317 cells were transfected by the recombinant retroviral vector pLEGFP via liposome, and the result of transfection was examined using fluorescent microscope. Polyclones and monoclonal of the packaging cells were obtained with FACS and identified by PCR and reverse transcriptional PCR (RT-PCR). NIH3T3 cells were used to determine the virus titer in the supernatant. **Results** Examination under fluorescence microscope confirmed the success of cell transfection with the retrovirus, and polyclonal and monoclonal cells with efficient and stable expression were obtained after FACS. The inserted EGFP gene fragment could be amplified by PCR from the genomic DNA of the polyclonal and monoclonal cells and by RT-PCR from the retrovirus RNA in the supernatant of monoclonal cell culture and some of the monoclonal cell cultures (6/8). Determination of the virus titer in the cell culture supernatant showed efficient viral production by the cells. **Conclusion** FACS is an efficient method for obtaining stable retroviral packaging cells.

Key words: EGFP; retroviral vector; fluorescence-activated cell sorting; gene transduction

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。

收稿日期: 2004-06-08

基金项目: 国家自然科学基金(30400163; 30371252)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30400163; 30371252)

作者简介: 张银刚 (1971-), 男, 在读博士, 主治医师, 电话: 029-82655091, E-mail: zyingang@263.net

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 μl 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 TripureTM 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 μl 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'-ACCTACAGGTGGGGTCTTTCATTCCC-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。 2×10^5 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 (1×10^{-2} , 1×10^{-4} , 1×10^{-6} /ml), 置 37 °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 μg/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)。

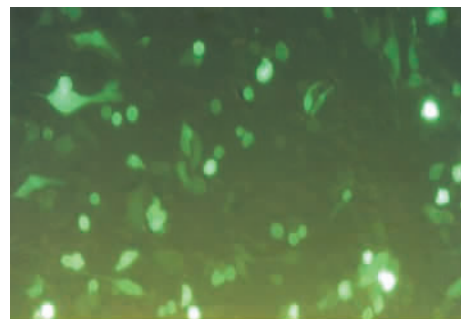


图 1 PA317 转染 48 h 后的荧光相片(原放大倍数: $\times 100$)

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)。

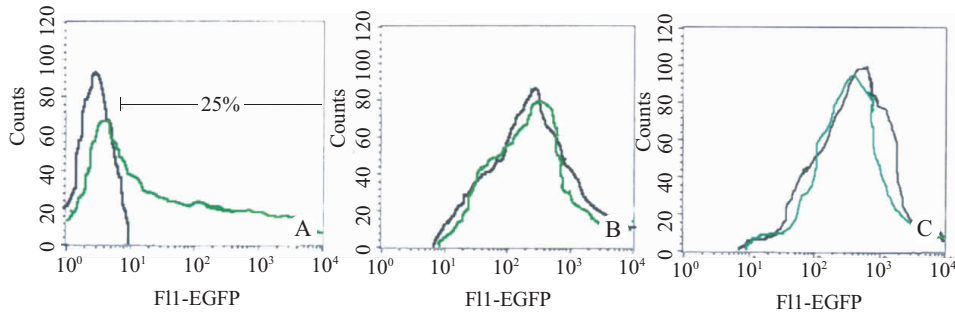


图 2 流式细胞仪分析

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克隆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,而单克隆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)。

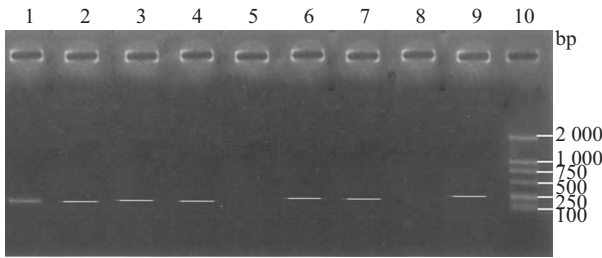


图 3 包装细胞系上清的 RT-PCR 鉴定

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 $8.6 \times 10^4/\text{ml}$,6 个单克隆分别为 0.6×10^5 、 6.2×10^6 、 1.3×10^4 、 $5.6 \times 10^4/\text{ml}$ 、 3.1×10^5 、 $6.6 \times 10^4/\text{ml}$ 。这些结果证实获得的包装细胞系能够具有有效的滴度。

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。

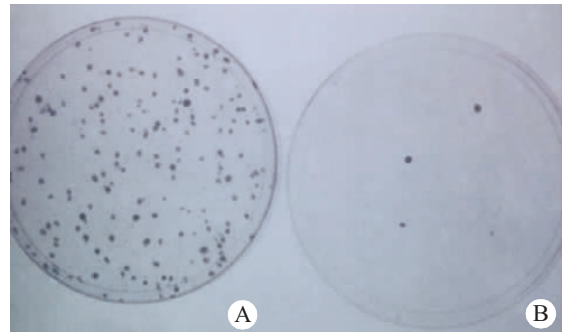


图 4 重组逆转录病毒产生细胞的 cfu 测定结果

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

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

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。

(下转 36 页)

3 讨论

本研究采用分段表达的形式在大肠杆菌中表达了 S 蛋白 S1、S2 功能域的主要部分 rSa 和 rSb。为了验证这两段重组蛋白的免疫原性,将这两段重组蛋白分别作为抗原与 SARS 确诊病人血清和免疫了 DNA 疫苗的鼠血清进行 ELISA 检测,发现这两个重组蛋白都可以与 SARS 病人血清发生特异性反应,这说明大肠杆菌表达的分段重组 S 蛋白具有相似 SARS-CoV S 蛋白的抗原性,有可能作为检测 SARS 的抗原组分来使用。

本研究中首次使用了分泌型真核表达载体 pSec-TagB 来构建 S 基因 DNA 疫苗。小鼠抗血清以 1:100 稀释后仍能与灭活的天然 SARS 全病毒发生较强的特异性反应,与 pcDNA3.1 相比,用分泌型真核表达载体(pSecTagB)构建的 SARS 病毒 4 个主要结构蛋白基因的 DNA 疫苗刺激机体产生抗血清的能力较强(另文发表)。这提示所构建的 S-DNA 疫苗能够在小鼠机体中表达出类似天然状态的 SARS 病毒抗原蛋白,进而产生了针对 SARS-CoV S 蛋白的特异性抗体。同时免疫小鼠产生的抗血清也能与大肠杆菌表达的重组蛋白发生特异性的反应,这也间接说明所表达的分段重组 S 分段蛋白保留了天然状态 S 蛋白的大多数特异抗原表位。由于此真核表达载体为分泌型表达载体,它有可能使真核细胞内表达的蛋白更容易分泌至胞外进入血液刺激淋巴细胞产生免疫反应。这为 DNA 疫苗制备提供了一个新的思路和选择,但人体对于 SARS 冠状病毒的免疫应答机制以及刺突蛋白对免疫应答的影响尚需进一步研究。

(上接 32 页)

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,通过含新霉素的培养液中选择。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] Poutanen SM, Low DE, Henry B, *et al.* Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(20): 1995-2005.
- [2] Liu SQ, Guo T, Ji XL, *et al.* Bioinformatics of SARS-CoV Proteomics and its Relationship in Evolution [J]. *Chin Sci Bull*, 2003, 48(13): 1359-68.
- [3] Wang CZ, Qi ZH. The biological characteristics of SARS virus and its related coronavirus [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2003, 35(6): 495-502.
- [4] Gallagher TM, Buchmeier MJ. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis [J]. *Virology*, 2001, 279(2): 371-4.
- [5] Popova R, Zhang X. The spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection [J]. *Virology*, 2002, 294(1): 222-36.
- [6] Walgate R. SARS vaccine race: US and European groups moving forward, but WHO would rather put SARS "back in the box", Available May 2 at <http://www.biomedcentral.com/news/20030502/03>
- [7] Yi Y, Duan SM, Zhang MC, *et al.* Cloning and expression of SARS coronavirus spike gene fragment and its application [J]. *Chin J Virol*, 2003, 19(3): 267-8.
- [8] Ruan YJ, Wei CL, Ee LA, *et al.* Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *The Lancet*, 2003, Available May 9 at <http://image.thelancet.com/extras/03art4454web.pdf>
- [9] Ye X, Meng X, Dong JB, *et al.* Current research on SARS coronavirus vaccine [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2003, 30(3): 331-4.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, *et al.* *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 2nd. New York: Cold Spring Laboratory press, 1989. 332.
- [11] Whitton JL, Rodriguez F, Zhang J, *et al.* DNA immunization: mechanistic studies [J]. *Vaccine*, 1999, 17(13-14): 1612-9.

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 FACS sorting [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.