

HIV-1 假病毒包装的重要影响因素分析

武立伟¹ 潘煦文² 王希东³ 刘建玲^{1*}

(1. 西北大学 陕西 西安 710069)

(2. 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫中心 北京 100101)

(3. 新疆农业大学 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要:【目的】分析影响 HIV-1 假病毒包装的主要因素, 建立该假病毒包装的优化条件。【方法】用单因素分析对比的方法, 比较了对病毒包装效果有重要影响的转染试剂、转染试剂与质粒的数量、培养基血清类型、细胞周期阶段对于病毒包装效果的影响。【结果】对 45 批 150 盘病毒包装结果分析显示, 使用 PEI 转染试剂成本低, 转染效果好, 其 N/P 在 8–40 均可以产生高活性的包装病毒; 用进口血清包装时, 相对于国产血清结果重复性高; 细胞周期处于 S 及 G2/M 期时转染质粒相对于 S 以及 G0/G1 期有较高的病毒活性。【结论】用 PEI 为转染试剂可以包装出高活性的病毒, 包装获取高活性病毒可以通过质粒与 PEI 梯度比例以及血清类型构成多个组合策略来实现。

关键词: 假病毒, HIV-1, 转染试剂

Analysis of factors influencing the infectivity of HIV-1 pseudotyped virus during packaging by cell line

WU Li-Wei¹ PAN Xu-Wen² WANG Xi-Dong³ LIU Jian-Ling^{1*}

(1. Northwest University, Xi'an, Shaaxi 710069, China)

(2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(3. Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

Abstract: [Objective] A serials of factors which may have influence on producing the HIV-1

基金项目: 国家科技重大专项项目(No. 2009ZX09103)

*通讯作者: Tel: 86-29-88302411; 信箱: ljl2003ljl@126.com

收稿日期: 2012-05-16; 接受日期: 2012-10-08

pseudotyped virus are analysed to establish an optimal way to generate this type of virus. **[Methods]** A set of factors such as the transfection reagents, the ratios of plasmid and transfection, the serum in the media and cell cycle is being analysis to find the optimal condition. **[Results]** The optimal N/P is range from 8 to 40, the serum can influence the stability of pseudotype virus and in the stage S and G2/M, transfection efficiency is high than the stage G0/G1. **[Conclusion]** High titers of pseudotyped HIV-1 virus can be obtained by means of using transfection reagents PEI and through combinatorial optimization of PEI, plasmid amount and FBS type.

Keywords: Pseudotyped virus, HIV-1, Transfection reagent

假病毒是指一种反转录病毒, 带有其它病毒的囊膜蛋白(或者其它识别受体相关的蛋白), 并且具有感染宿主细胞的能力, 但进入宿主细胞的病毒基因无法形成具有感染能力的完整病毒颗粒。为了便于检测与研究, 在不影响其功能的前提下, 常在构建的假病毒中加入特定的标志基因, 如 GFP、Luciferase (萤火虫荧光素酶)等, 这种假病毒在研究病毒与宿主间的相互作用、病毒的中和抗体以及基因治疗等方面, 有着重要的应用^[1]。

运用假病毒包装技术研究 I 型人免疫缺陷病毒(HIV-1), 在 1995 年就已经开始应用。在研究膜融合机制以及寻找进入抑制剂时, 常用双质粒系统内包装 HIV 假病毒, 其中一个质粒带有读码框移位的外膜蛋白(Env)基因以及 Vpr 基因, 同时插入了 Luciferase 酶的基因, 并且另一个质粒表达 Env。借助转染试剂, 通过共转染的方式, 将这两种质粒转入 293 或 293T 等细胞, 继续培养后, 收集上清可以获得包装成功的病毒; 该病毒在感染带有 CD4⁺以及共受体的细胞后, 萤火虫荧光素酶基因随着病毒基因组的表达得以激活, 同时由于 Vpr 功能的缺失, 病毒无法实现快速复制, 从而可以借助对该酶的活性检测来反映病毒对于靶细胞的侵染状况^[2]。

该系统包装病毒后, 收获的上清中, 病毒的滴度不稳定。为了寻求更可靠的方法, 本文试验

了转染试剂、转染试剂与质粒比例以及细胞周期等与病毒包装效果的关系。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞以及试剂

pNL4.3-Luc-R-E 由中国科学院生物物理研究所的唐宏研究员惠赠; pMT3-HXB-2 由中国科学院微生物研究所高福研究员惠赠; GHOST-CXCR4 细胞由武汉大学王利老师惠赠; 293T 细胞由中国科学院微生物研究所病原微生物与免疫学研究室保存。

PEI (线性 25 kD)购自 Ebioscience, 使用前用生理盐水稀释成 2 mg/L 母液; Opti-MEM、DMEM 和 RMPI-1640 购自 Gibco; 胸腺嘧啶核苷(TdR)购自经科宏达; G418、嘌呤霉素和 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen; Fugene HD 和潮霉素购自罗氏公司; 萤火虫荧光素酶底物购自 Promega (E1 500)。

1.2 不同转染试剂包装 HIV-1 假病毒的转染方案

(1) PEI 转染试剂

用直径 10 cm 的细胞培养皿(以下简写成 10 cm 皿)培养 293T 细胞, 按 60%密度时分盘, 至最后一次分盘后 9 h, 更换 OptiMEM 培养基, 30 min 后, 在 1 200 μ L 生理盐水体系中, 用 PEI

72 μg , pNL4.3-Luc-R-E和 pMT-Env 两种质粒按 1:1 (M/M)加入 24 μg , (N/P=24)转染 4 h 后换成 DMEM 培养基。48 h 后收集上清做假病毒活性的测定,测定方法见 1.7 节^[3]。

(2) Eugene 转染试剂

用 Eugene 的微升数与质粒微克数之比为 3:2, 稀释 DNA 用 Opti-MEM, 10 cm 皿共用质粒 12 μg 。转染后 12 h 换培养基。其它与 PEI 法相同^[4]。

(3) Lip2000 转染试剂

每 10 cm 皿用 Lip2000 的 40 μL 数与质粒 24 μg , 脂质体和质粒分别与 1.5 mL Opti-MEM 稀释后,再两者混合,15 min 后加入已经换好 Opti-MEM 的 293T 细胞中,4 h 后换液;48 h 后收集培养上清。

(4) 磷酸钙转染法

配制 2 \times HBS (NaCl 1.636 g, KCl 0.074 3 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.040 g, Glucose 0.238 g, HEPES 1.192 g 用 NaOH 调节 pH 至 7.05, 过滤除菌)以及 2 mol/L CaCl_2 。转染前用 438 μL ddH₂O 稀释 24 μg 质粒,加入 62 μL 的 2 mol/L CaCl_2 混匀后,将该混合物滴入 500 μL 的 2 \times HBS 中,每秒 2 滴,漩涡混匀,室温放置 15 min。将沉淀吹吸均匀,滴入 293T 细胞中,12 h 后换液。48 h 后收集培养上清。

比较以上 4 种转染试剂时,均使用 10 cm 皿培养 293T 细胞,每个试验组重复数不等,共 5 个重复组。培养基使用的均是国产血清,包装后的培养物按 1.7 的方法测定假病毒活性。

1.3 使用 PEI 转染时,质粒与转染试剂合理比例的优化

使用 1.2 中相同的方法,在固定 PEI 数量为 120 μg 的前提下,检测不同质粒加入量 (18–26 μg)条件下合理的 N/P 比例;在固定质粒数量为 24 μg 时,检测不同的 PEI 加入量 (12–60 μg)条件下合理的 N/P 比例。培养基使用的均是国产血清。每个试验组为 3 个重复。

1.4 血清来源对于病毒包装效果的影响

(1) 单次对比试验

分别用含国产以及 Gibco 进口的 10%的胎牛血清培养 293T 细胞,与 1.2 中 PEI 转染的方法类似,在质粒浓度固定为 24 μg 条件下,分别使用了不同的 PEI 量(N/P=分别为 8、16、24、32 和 40)每个 PEI 浓度做 3 个重复。

(2) 历史数据汇总的比较

对于血清对病毒包装效果的影响,本研究也统计了 20 批 80 盘和 5 批进口血清 10 盘细胞病毒包装的效果(参与计算的历史数据中 N/P 比值均为 24)。用 *t* 检验比较两种血清的包装效果。

1.5 293T 细胞同期化以及假病毒包装

(1) 同期化处理

经 DMEM 培养 24 h 的 293T 消化后分到 12 孔板中。分孔密度为 30%;37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳培养箱中培养度生长 9 h 后,开始同期化处理;用含 TdR 2 mmol/L 的 DMEM 培养 20 h 同期化处理,用 PBS 洗一次,换新的 DMEM 培养基;培养 9 h 后释放;再次加入 2 mmol/L 胸腺嘧啶核苷继续培养 20 h 同期化后,用 PBS 洗一次,换新的 DMEM 培养基,2 h 以后开始做转染,从 2–24 h,每隔 2 h 做一次转染,每 4 h 换一次液,转染做 3 个重复,同时取两个孔按相同的时间做细胞周期检测。

(2) 假病毒包装

上述同期化后不同时间的细胞,病毒包装使用 PEI 为转染试剂,转染方法为 12 孔板每孔用 pNL4.3-Luc-R-E和 pMT-Env 各 1 μg , PEI 10 μg ,在 100 μL 的总体系形成转染复合物后,转染前 30 min 更换 Opti-MEM 培养基,于 4 h 再换成 DMEM 培养基。48 h 后收集上清做假病毒活性的测定^[3]。

1.6 细胞周期的检测

离心收集细胞,弃上清,用预冷 PBS 洗细胞

两次后加入预冷 70%乙醇,冻于-20 °C;固定,等全部不同时间细胞处理完毕后,离心收集细胞,以 1 mL的PBS洗细胞一次,加入 500 μL PBS 含 50 mg/L 溴化乙锭(PI),100 mg/L RNase A,0.2% Triton X-100,4 °C 避光孵育 30 min,流式分析细胞仪检测,结果用细胞周期拟和软件 ModFit 分析。

1.7 假病毒活性测定方法

接假病毒前 24 h,消化 GHOST-CXCR4 细胞并传至 24 孔板中,细胞浓度为 8×10⁴/孔(细胞培养用含 Gibco 血清 10%的 RMPI-1640 培养基,同时加入 G418 500 mg/L 潮霉素 100 mg/L,嘌呤霉素 50 mg/L,接病毒前,更换新培养基,加入量为 500 μL)。将离心(800×g,10 min)收集的含有病毒的 293T 细胞上清 50 μL 接种到 GHOST-CXCR4 细胞中,待病毒吸附细胞 2 h 后,吸弃含有病毒的培养基,加入新鲜培养基(800 μL)继续培养,每个稀释度做 3 个重复,48 h 后收获并裂解细胞,测定细胞上清中萤火虫荧光酶的活性。

测定时使用 Promega 的 GloMax™ 20/20n 单管荧光测定仪(检测参数设定读数时间为 10 s),取发光底物是 Luciferase Assay System (E1500) 100 μL,加入上述细胞裂解液 20 μL,快速置于仪器读数。

1.8 数据归一化以及统计分析

不同时间培养的细胞假病毒活性测定结果,都校正为 50 μL 培养上清基础。数据需要单因素方差分析(实验结果 2.2)、独立 *t* 检验的(实验结果 2.3)以及相关分析(实验结果 2.4),均用 SPSS 11.0 完成。

2 结果

2.1 不同转染试剂包装的 HIV-1 假病毒的效果统计

表 1 中的数据是多次重复实验的汇总结果,使用 PEI、Fugene 和 Lip2000 明显提高了病毒包装的成功率。特别是使用 Fugene,其成功率很高,但是由于其成本远高于其它转染试剂(PEI 的上千倍,Lip2000 的 2 倍)。因而 PEI 作为 HIV-1 假病毒包装,其效率高、成本低,有着重要的用途。

2.2 使用 PEI 转染佐剂包装时,转染试验与质粒比例对病毒包装的影响

2.2.1 固定 PEI 浓度时,不同质粒数量的病毒包装效果:如图 1 所示,当固定 PEI 浓度(每 10 cm 皿中加入 120 μg),将 PEI 中 N 原子与质粒中 P 原子的比例(N/P)设为 31-52 时,包装的病毒在 N/P 为 44 时显示最大的活性。

表 1 不同转染试剂包装 HIV-1 假病毒时的结果						
Table 1 The statistical results on the effect of different infection reagent in pseudotyped virus produce						
	最高的活性(荧光指数) The highest activity (Fluorescence index)	主要活性区 (荧光指数) Main active area (Fluorescence index) (Ten thousand)	批次 Batch	盘数 Plate number	活性大于 5 万的批次 Activity more than 50 000 batches	成功率 Success rate (%)
PEI	12 461 821	10-100	20	80	15	75
Fugene	803 560	5-80	5	10	5	100
Lip2000	1 360 398	10-150	5	10	4	80
磷酸钙法 Calcium phosphate methods	1 279 944	10-100	10	40	3	30

2.2.2 固定质粒浓度时, 不同 PEI 量对包装效果的影响(图 2): 将每皿质粒量固定后, 改变 PEI 加入的量, N/P 在 16 以上时, 病毒包装效果明显强于 N/P 小于 16 的组。

比较 2.2.1 与 2.2.2 的实验发现, 两者高活性的 N/P 值差别很大, 同样的实验现象也出现在不同批次试验中, 固定质粒浓度条件试验也有最高活性出现在 N/P=40 的结果, 因而, 除了质粒与转染试剂之比, 其它影响因素对于病毒包装有着重要影响。

2.2.3 使用 PEI 批量包装的结果: 按照每 10 cm 皿加入质粒 24 μ g, PEI 转染试剂 120 μ g 的条件下, 我们统计了 2010–2011 年 20 批(每批细胞盘数不

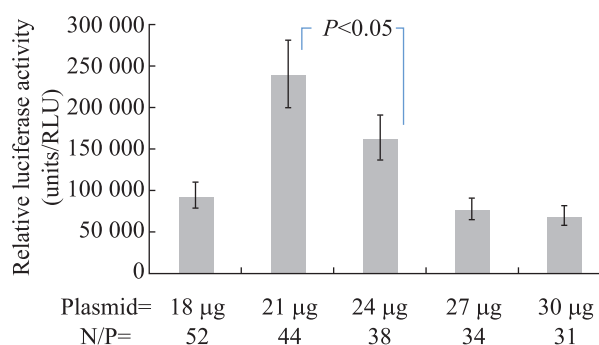


图 1 固定 PEI 时, 不同质粒数量包装的假病毒活性
Fig. 1 The pseudotyped virus activities at different plasmid with fixed PEI concentration

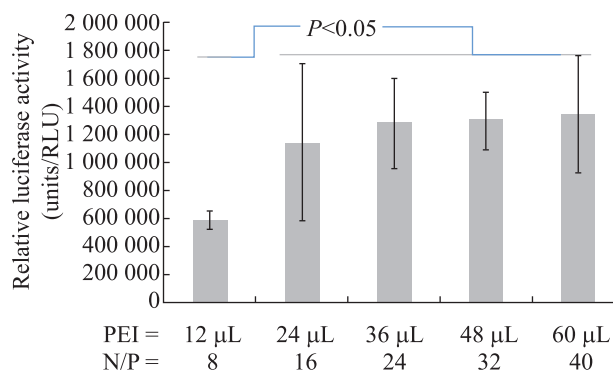


图 2 固定质粒数量时, 不同 PEI 加入量包装的假病毒活性

Fig. 2 The pseudotyped virus activities at different PEI with fixed plasmid concentration

等, 在 1–5 盘之间, 每批数据取均值并剔除统计误差超 3 个标准差的盘的数据, 不含进口血清的包装数据, 统计的 PEI 与质粒的 N/P 值为 24)假病毒包装的结果, 其每次平均的荧光素酶活性, 按从大到小的顺序排列后, 绘于图 3 中。从结果看, 即便是规范了质粒的纯度(超螺旋大于 90%, $OD_{260/280}$ 在 1.80–1.90 之间)、转染试剂(冻存分装不超过 2 次)、培养基、细胞生长密度以及转染与检测条件等因素后, 同样条件下, 不同批次培养细胞所包装的病毒, 其活性仍有极大的差别, 8 批平均活性达到或超过 100 万荧光指数, 但 2 万–50 万的次数占到 12 批。这两大类活性相差 10 倍以上。

2.3 血清类型对于病毒包装效果的影响

使用 1.2.3 节单次对比实验的结果如图 4 所示, 所用的国产血清组总体假病毒活性显著低于 Gibco 血清组。本次试验中, 理想的 N/P 在 16–24 之间时, 进口血清包装包装的病毒是国产血清的 2.6 倍。说明血清质量是影响病毒包装效果的重要因素。

但是, 统计了 20 批 80 盘与 5 批进口血清 10 盘细胞病毒包装(N/P 均为 24)的效果(图 5), 发现进口血清包装时假病毒活性处于较高水平, 但独立 t 检验差异不显著。说明影响病毒包装的因素较多, 血清类型只是其中一个方面。

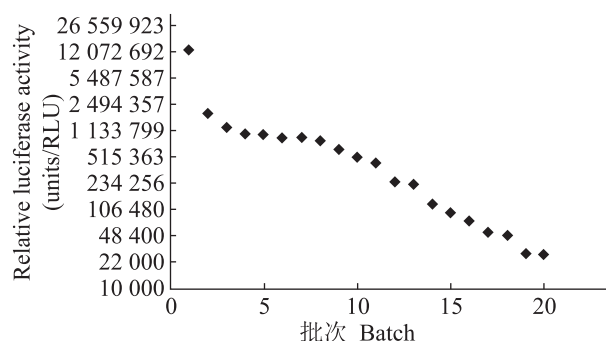


图 3 使用 PEI 包装的假病毒活性汇总

Fig. 3 The summary of pseudotyped virus activities transfected by PEI

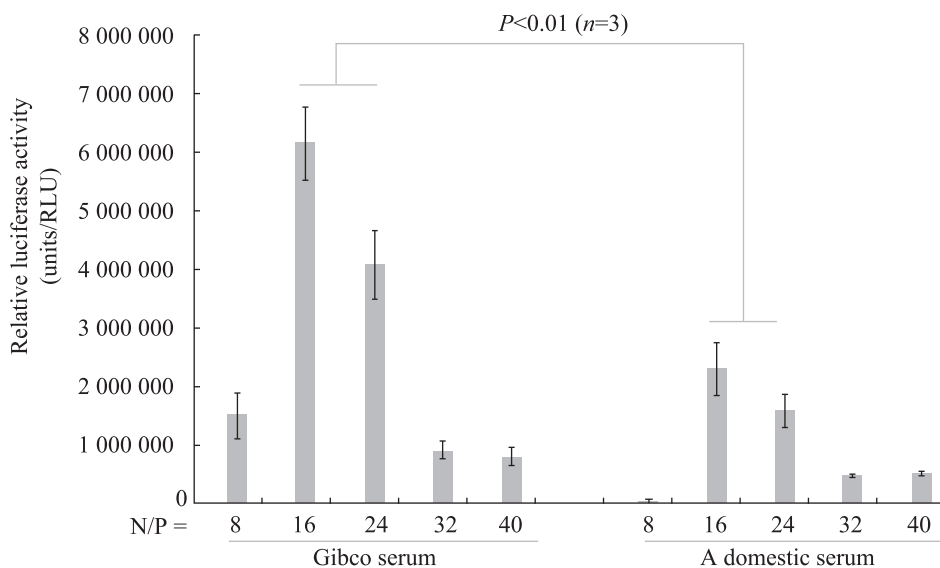


图4 不同血清来源培养基对假病毒活性的影响对比试验

Fig. 4 The influence of different source fetal bovine serum in pseudotyped virus produce

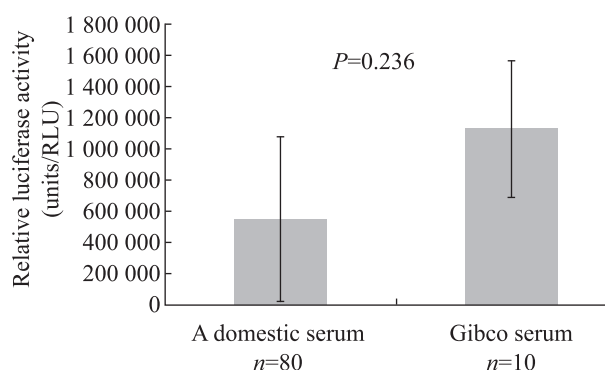


图5 PEI 转染时不同血清来源培养基对假病毒活性影响的统计结果

Fig. 5 Statistical results on the effect of different source fetal bovine serum in pseudotyped virus produce

2.4 HEK293T 细胞的周期与病毒包装的关系

用 ModFit 分析后的结果如图 6 所示, 按该结果, 293T 细胞的周期时间为 20 h, 其中 G0/G1 期为 8 h, S 期为 7 h, G2/M 期为 5 h。

从图 7 中可以明显看出, 同期化后, 除第一个 2 h 外, 其它的数值随时间呈下降趋势, 将周期中各种细胞的比率与假病毒活性荧光数值做相关分析, 结果如下:

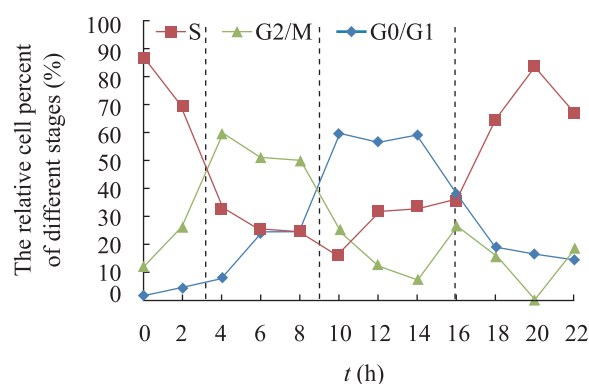


图6 293T 细胞测定的周期结果

Fig. 6 The cell cycle result of HEK 293T

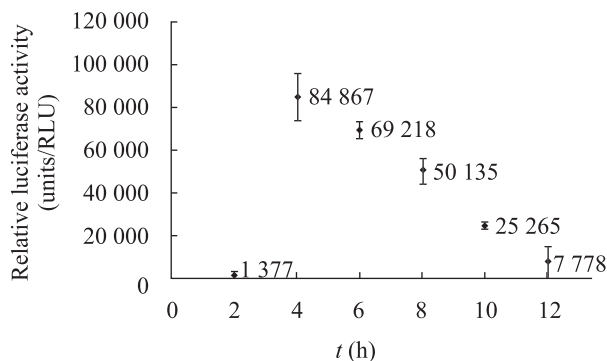


图7 同期化后, 不同时间包装病毒的活性

Fig. 7 The pseudotyped virus activities at different times after cell synchronization by TdR

$R(\text{RLU}, \text{G0/G1})=0.380\ 4; (n=6, P=0.457)$

$R(\text{RLU}, \text{S})=0.454\ 9; (n=6, P=0.365)$

$R(\text{RLU}, \text{G2/M})=0.928\ 8; (n=6, P=0.007<0.01^{**})$

因而, 293T 细胞的转染, 应以其处于 G2/M 期为适宜的阶段。

3 讨论与分析

虽然 HIV-1 假病毒包装技术在 1995 年已经出现, 而且经过不断的发展, 已经出现在新的更为高效的病毒包装技术, 比如用鼠白血病病毒^[5]的骨架, 通过优化 Env 基因的密码子来实现高滴度表达等方法, 但是对于 HIV 病毒多种亚型以及多种 Env 的突变株进行研究时, 将每一种都做类似的优化需要较多的工作量, 因而提高病毒的包装效率仍是首选方案。

为了得到高的转染效率, 使用持续时间较长的转染试剂会有较好的效果, 这是常用磷酸钙转染法的原因之一, 但是磷酸钙转染法在试验中, 常因操作者的差异而结果变动很大; 本研究统计的成功率只有 30% (表 1); 另一个低毒性的转染试剂是罗氏公司的 Fugene HD (或 6)^[6], 也可以 12 h 以后换液或者不用, 但是该转染试剂成本昂贵, 而且按转染试剂推荐的最低使用量时转染效率也比其它转染试剂差。使用脂质体 2000 可以获得稳定的效果, 但是成本高, 相比之下, PEI 的优势就很明显。我们用 PEI 甚至包装出上千万荧光值的病毒。

使用线性 PEI 将质粒转染到 293 细胞的优化条件, Reed 等做了较系统的研究^[3]。而且给出了在 XDC293 细胞系中的优化条件; 在 XDC293 细胞中, N/P 在 17.5–22.5 之间都有很好的转染效果, 低于 12.5 效果较差, 高于 22.5 以上没有试验, 转染质粒的使用量在 N/P 为 17.5 时, 用 6–19 μg (折算为 10 mm 平皿时) 转染效果差别不大。在实验中, 我们发现 N/P 超过 30 以上 (N/P 在 32–44 质粒量为 24 μg), 包装病毒能呈现很高的活性, 但

是稳定性变差。对不同批次细胞观察发现, 包装出的病毒的活性的稳定性与细胞生长的表观评价的相关联 (细胞的表现评价有 3 个方面, 细胞均匀度; 边缘, 基质, 内部颗粒等形态学方法; 细胞增长速度)。表观评价好的细胞 (细胞均匀; 边缘清晰, 基质中颗粒少, 细胞内部颗粒均匀; 生长加倍速度在 20 h 以内的细胞) 在高 N/P 值下可以包装出较高活性的病毒, 但是细胞培养很难每批都达到完全相似的表现效果, 而且表观指标评价依靠经验, 有很大的不确定性。因此, 将 N/P 与质粒用量固化为某一个最优的数值的做法是片面的, 最好是按 N/P=16–40 之间, 同一批细胞包装几个梯度的 N/P 比, 其中会有活性最好的组合。

实验中发现, 国产血清由于批次、厂家的不同, 包装的病毒活性差别很大。而使用 Gibco 的血清时, 包装的病毒, 即使用不同的 N/P 时, 其活性也很靠近, 虽然统计检测两者没有显著差异, 但进口血清重复性高是不容置疑的 (因为前期用国产血清培养后, PEI 包装后再用进口血清, 不用进口血清组活性低于进口组 10 倍, 数据未显示)。

在排除质粒、转染试剂、培养基、细胞生长密度等因素后, 同样条件下, 不同批次培养细胞所包装的病毒, 其活性仍有极大的差别 (10 倍以上)。前述中已经分析细胞状态是一个较大的影响因素。由于细胞生长的表观评价比较主观, 因而我们首先选择了可度量并可控制的指标——细胞的周期来分析它与包装效果的关系, 从实验数据看, 细胞处于 G2/M 期的比例与包装出病毒的活性显著相关, 这与 Brunner 等转化 Hela 以及姚元虎转化癌细胞的结果 (认为处于 S 以及 G2/M 期效果最好) 相类似^[7–8]。由于 TdR 对 293T 细胞同期化操作较为简便, 在病毒包装前使用同期化技术, 有利于消除细胞状态的影响, 保证包装病毒

结果的一致性。

[附注: 本实验是在具有生物安全实验二级资格实验室进行, 所有活性材料均在实验结束使用 84 消毒液消毒并 1×10^5 Pa、30 min 灭菌处理后才释放到环境中。]

参 考 文 献

- [1] Briggs JAG, Wilk T, Fullwr SD. Do lipid rafts mediate virus assembly and pseudotyping?[J]. Journal of General Virology, 2003, 84(4): 757-768.
- [2] Connor RI, Chen BK, Choe S, et al. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes[J]. Virology, 1995, 206(2): 935-944.
- [3] Reed SE, Staley EM, Elizabeth M, et al. Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors[J]. Journal of Virological Methods, 2006, 138(1/2): 85-98.
- [4] Jacobsen LB, Calvin SA, Calvin SA, et al. FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power[J]. Methods, 2004, 33(2): 104-112.
- [5] Siegert S, Thaler S, Wagner R, et al. Assessment of HIV-1 entry inhibitors by MLV/HIV-1 pseudotyped vectors[J]. AIDS Research and Therapy, 2005, 2: 7.
- [6] 范霖, 马志昭, 高山峨, 等. 用 Fugene6 制作高滴度慢病毒方法的优化比较[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(4): 385-390.
- [7] Brunner S, Fürtbauer E, Sauer T, et al. Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation[J]. Molecular Therapy, 2002, 5(1): 80-86.
- [8] 姚元虎, 刘永彪, 冯永, 等. 聚乙烯亚胺转导效率与肿瘤细胞周期分布相关性分析[J]. 中国临床保健杂志, 2006, 9(3): 297-300.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Hind*Ⅲ、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。