

技术与方法

用Fugene6制作高滴度慢病毒方法的优化比较

范霖¹ 马志昭² 高山峨¹ 路建伟³ 李思光¹ 潘晓静^{1*}¹同济大学医学院胚胎干细胞研究中心, 上海 200092; ²河北医科大学第二医院神经外科, 石家庄 050000;³同济大学医学院胚胎干细胞库, 上海 200092)

摘要 针对实验室中比较普遍的包装的慢病毒滴度不高的问题, 我们对慢病毒包装过程中的几个关键步骤进行了优化。采用Fugene6同时转染携带GFP的质粒和包装慢病毒所必需的包装质粒进入293T细胞中。通过使用荧光显微观察GFP的表达亮度及流式细胞技术测量GFP阳性细胞的比例来测定病毒滴度。通过优化Fugene6和DNA的比例, 发现当Fugene6和DNA的比例是3:1时获得的慢病毒的滴度最高; 通过对转染后收获病毒的时间的比较, 发现转染48小时后回收所得到的慢病毒滴度最高。

关键词 慢病毒; 滴度; Fugene6

目前, 慢病毒载体已经成为体外细胞感染的一种高效的手段。慢病毒载体较逆转录病毒载体有更广的宿主范围, 对非周期性和有丝分裂后的宿主细胞都能够有效地进行感染^[1,2]。加之安全、低毒性、稳定的特点, 使慢病毒作为实验室研究工具而大受青睐。

出于安全性的考虑, 慢病毒基因被分隔成三到四个基因进行包装^[3,4], 目前在实验室常用的是三质粒系统^[5]。在慢病毒的包装过程中, 需要在293T细胞中同时转染包膜蛋白质粒、整合质粒和携带外源基因的转移质粒。慢病毒基因在293T细胞中进行基因复制和蛋白合成后, 在该细胞体内将慢病毒蛋白包装成具有感染性的慢病毒。包装好的大量病毒颗粒分泌到细胞外的培养基中, 过滤取得上清液后直接用于宿主细胞的感染。慢病毒携带的外源基因进入到宿主细胞之后, 经过反转录, 整合到宿主的基因组, 从而持久地高水平地表达外源基因。但由于慢病毒可能对人体有致癌性, 因此慢病毒的应用目前只停留于研究, 而临床的应用尚未广泛展开。

慢病毒滴度的测定主要有两类方法, 一种是非功能性方法, 另一种是功能性方法^[6]。前者包括p24抗原酶联免疫吸附测定法和q-PCR方法^[7,8], 后者涉及流式细胞术检测报告基因蛋白^[9]。还有应用嘌呤霉素最低致死量法、24孔板稀释荧光显微镜法等进

行慢病毒滴度的测定^[10]。

本研究的目的在于针对用Fugene6包装慢病毒过程中的两个主要步骤: Fugene6和DNA的比例以及转染后收获慢病毒的时间的比较, 从而获得高滴度的慢病毒。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胎牛血清(Thermo)、非必需氨基酸(Gibco)、L-Glutamine(Gibco)、DMEM(Gibco)、Fugene6(Roche)、Opti-MEM(Gibco)、DH5 α 感受态细胞(TIANGEN)。

1.2 质粒和细胞

采用三质粒系统制作慢病毒, 质粒包括: 整合质粒pCMVR Δ 8.9.1、包膜质粒pMD2G和携带GFP的载体质粒。293T细胞的培养基成分为: 88% DMEM、10%胎牛血清、1%非必需氨基酸和1% L-Glutamine。细胞在37°C, 5%的二氧化碳的培养箱中培养。

1.3 Fugene 6与DNA比例的研究

转染前一天, 将293T细胞铺在6孔板中, 每孔75

收稿日期: 2010-11-22 接受日期: 2011-01-20

上海市大学生创新计划(No.1500107029)和河北省医学科学研究重点课题计划(No.20100313)

*通讯作者。E-mail: panxiaojing@tongji.edu.cn

万个细胞。转染当天细胞密度达到50%~80%。我们检验3:2、3:1、6:1、9:1和12:1五种不同Fugene6与DNA的比例对慢病毒滴度的影响。携带GFP的载体质粒:整合质粒:包膜质粒=4:3:1。具体操作步骤详见试剂使用说明书。转染8小时后每孔均更换新鲜的DMEM培养液1.5 ml。48小时后,用过滤的方法收集病毒,并感染细胞,四天后测量滴度。

1.4 收集病毒时间的研究

在得出Fugene6和DNA的最佳比例是3:1之后,我们对收集病毒的时间进行了比较。将6孔板中的每一孔转染后的293T细胞按12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h分别回收,并感染细胞,四天后测量其滴度。

1.5 测量病毒滴度

慢病毒滴度的测定有不同的方法,针对实验的不同目的,选择的方法也不相同^[6]。本实验采用流式细胞术的方法进行病毒滴度的定量分析。感染前一天准备好三孔293T细胞,每孔 1×10^5 个。收集转染后24小时的293T细胞的上清液,用45 nm的过滤器过滤细胞上清液。得到的1.5 ml的上清液将全部用来感染细胞。未稀释的全部病毒滤过液(1.5 ml)和等量的含10%FBS的DMEM培养液混合后,滴加

Ploybrene(终浓度为 $8 \mu\text{g/ml}$)。12 h后更换新鲜的培养液。培养2天后进行流式分析病毒滴度。用胰酶收集贴壁细胞,转移到收集管中。用FACS缓冲液冲洗细胞两次,用0.5 ml~1 ml冷的Fixative重悬细胞。表达的GFP可通过流式细胞仪的FL-1通道和FL-2通道检测。病毒滴度可通过如下计算式获得:病毒滴度=细胞数量 $\times 10^5 \times N \times 1000/M$ (N为表达GFP的细胞比例, M为 $1 \mu\text{l}$ 单位的病毒数量)。其中计算式认为含有GFP基因和不含GFP基因的细胞等比例增殖。

2 结果

2.1 Fugene6与DNA的比例是3:1时获得的慢病毒的滴度最高

在将慢病毒的包装质粒和携带GFP的质粒转染入293T细胞12小时之后,荧光显微镜下,经蓝光照射,293T细胞内的GFP蛋白发出绿色荧光。图1可以明显看出,当Fugene6与DNA比例为3:1时,荧光显微镜下的绿色荧光覆盖率最高(图1)。

将用不同Fugene6与DNA比例获得的慢病毒感染293T细胞培养2天后,通过流式细胞分析GFP阳性率。当Fugene6与DNA比例为3:1时,GFP

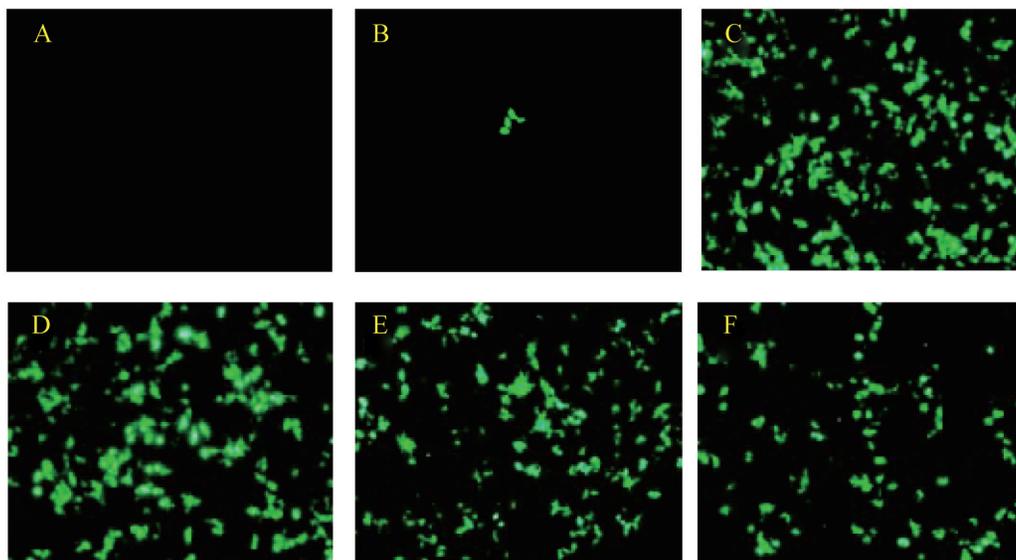


图1 用不同比例的Fugene6和DNA转染293T细胞后的GFP阳性比较

A: 对照组; B: Fugene6:DNA=3:2; C: Fugene6:DNA=3:1; D: Fugene6:DNA=6:1; E: Fugene6:DNA=9:1; F: Fugene6:DNA=12:1。从图1可以看出,当Fugene6和DNA的比例为3:1时,293T细胞的GFP阳性率最高。

Fig.1 The comparison of GFP positive 293T cells after transfected with different ratios of Fugene6 and DNA

A: negative control; B: Fugene6:DNA=3:2; C: Fugene6:DNA=3:1; D: Fugene6:DNA=6:1; E: Fugene6:DNA=9:1; F: Fugene6:DNA=12:1. When the Fugene6 and DNA ratio is 3:1, the 293T cells had the highest GFP expression level comparing with other groups.

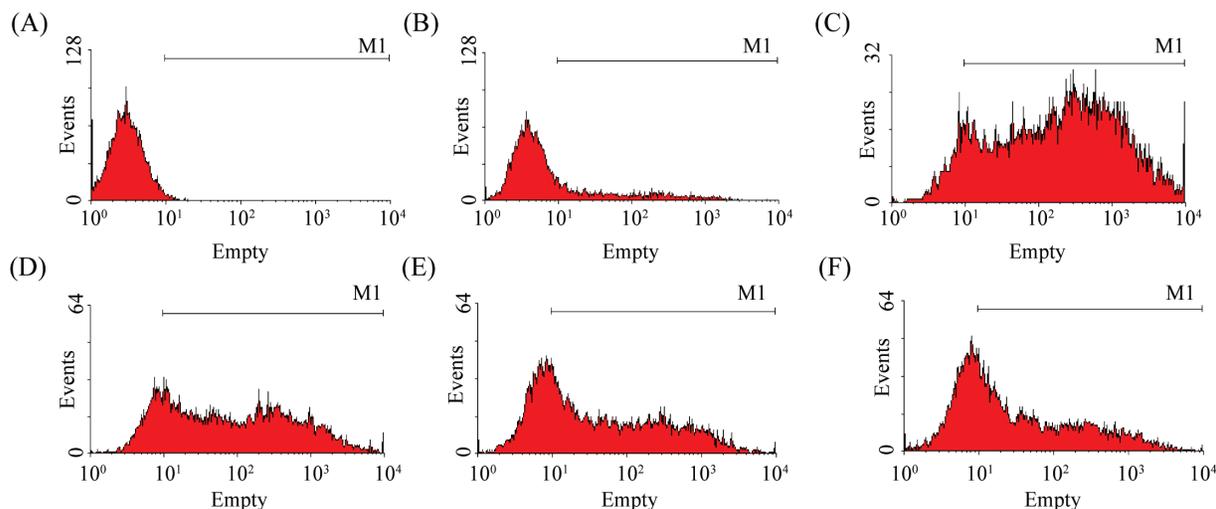


图2 用流式细胞计数法检测用不同比例的Fugene6和DNA感染293T细胞后的GFP阳性率

A: 阴性对照; B: 当Fugene6:DNA=3:2时, GFP阳性率是24.28%; C: 当Fugene6:DNA=3:1时, GFP阳性率是91.87%; D: 当Fugene6:DNA=6:1时, GFP阳性率是81.92%; E: 当Fugene6:DNA=9:1时, GFP阳性率是68.99%; F: 当Fugene6:DNA=12:1时, GFP阳性率是63.42%。

Fig.2 The GFP positive 293T cells were calculated by using flow cytometry technique

A: negative control; B: when Fugene6 and DNA ratio was 3:2, the GFP positive cell ratio was 24.28%; C: when Fugene6 and DNA ratio was 3:1, the GFP positive cell ratio was 91.87%; D: when Fugene6 and DNA ratio was 6:1, the GFP positive cell ratio was 81.92%; E: when Fugene6 and DNA ratio was 9:1, the GFP positive ratio was 68.99%; F: when Fugene6 and DNA ratio was 12:1, the GFP positive ratio was 63.42%.

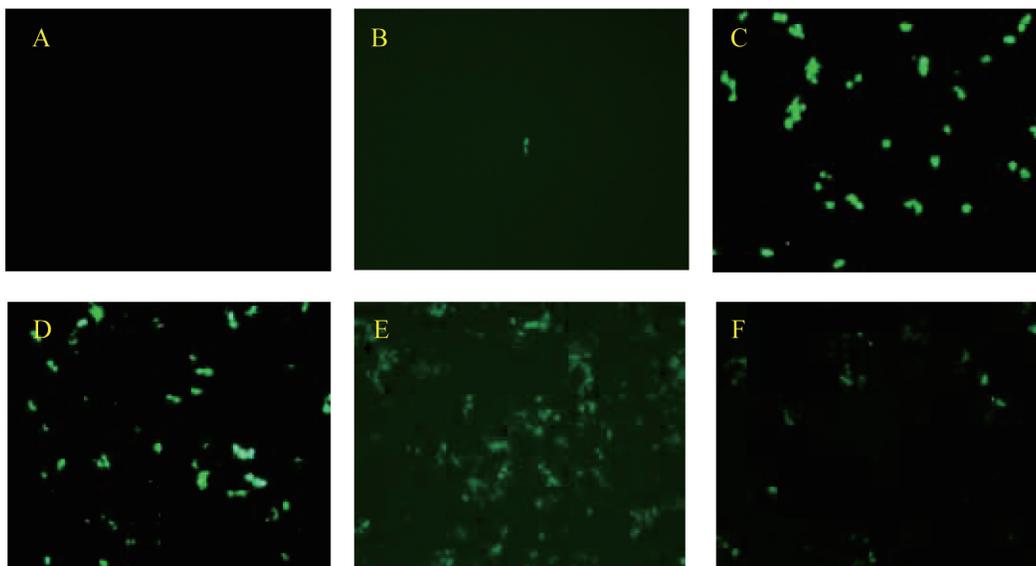


图3 Fugene6和DNA的比例为3:1包装病毒时, 不同病毒收集时间对病毒感染能力的影响

A: 阴性对照; B: 在转染12小时后收集的病毒感染293T细胞后GFP的阳性表现; C: 在转染24小时后收集的病毒感染293T细胞后GFP的阳性表现; D: 在转染36小时后收集的病毒感染293T细胞后GFP的阳性表现; E: 在转染48小时后收集的病毒感染293T细胞后GFP的阳性表现; F: 在转染60小时后收集的病毒感染293T细胞后GFP的阳性表现。

Fig.3 The GFP positive 293T cells after infected with lentivirus collected at different time points

A: negative control; B: there were very few cells with GFP positive expression when infected with lentivirus collected after 12 hours; C: the GFP positive 293T cells when infected with lentivirus collected after 24 hours; D: the GFP positive 293T cells when infected with lentivirus collected after 36 hours; E: the GFP positive 293T cells when infected with lentivirus collected after 48 hours; F: the GFP positive 293T cells when infected with lentivirus collected after 60 hours.

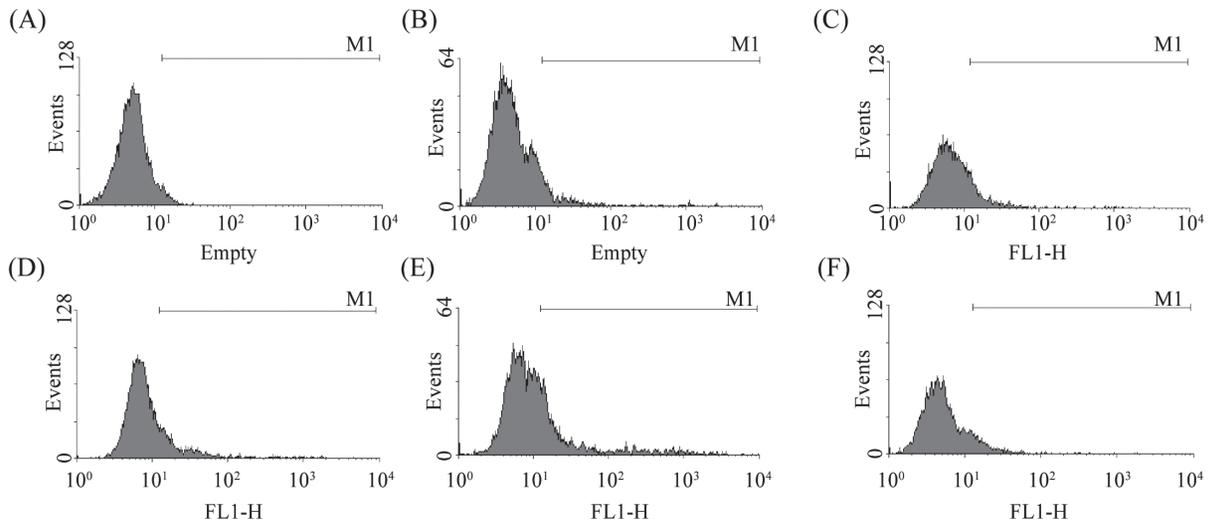


图4 用流式细胞计数法检测不同时间段收集的慢病毒感染293T细胞后的GFP阳性率

A: 阴性对照; B: 在转染12小时后收集的病毒感染293T细胞后GFP的阳性率是8.09%; C: 在转染24小时后收集的病毒感染293T细胞后GFP的阳性率是16.29%; D: 在转染36小时后收集的病毒感染293T细胞后GFP的阳性率是19.81%; E: 在转染48小时后收集的病毒感染293T细胞后GFP的阳性率是28.37%; F: 在转染60小时后收集的病毒感染293T细胞后GFP的阳性率是12.97%。

Fig.4 Flow cytometry results on GFP positive 293T cells after infected with lentivirus collected at different time points

A: negative control; B: the GFP positive ratio was 8.09% when infected with lentivirus collected after 12 hours; C: the GFP positive ratio was 16.29% when infected with lentivirus collected after 24 hours; D: the GFP positive ratio was 19.81% when infected with lentivirus collected after 36 hours; E: the GFP positive ratio was 28.37% when infected with lentivirus collected after 48 hours; F: the GFP positive ratio was 12.97% when infected with lentivirus collected after 60 hours.

阳性的细胞比例是91.87%。当Fugene6与DNA比例为3:2、6:1、9:1和12:1时, GFP阳性的细胞比例分别是24.28%、81.92%、68.99%、63.42% (图2)。

当Fugene6与DNA比例为3:2、3:1、6:1、9:1、12:1时, 慢病毒的滴度分别是: 3.24×10^7 、 1.22×10^8 、 1.09×10^8 、 9.20×10^7 、 8.46×10^7 (tu/ml)。

2.2 质粒转染后48小时收集的慢病毒的感染效率最高

我们在转染后12 h、24 h、36 h、48 h、60 h收集慢病毒。将慢病毒过滤后直接感染293T细胞。12小时后更换新鲜的DMEM培养基。24小时后部分293T细胞在荧光显微镜下发出绿光。在病毒感染2天后测量滴度。在转染后48小时收集的慢病毒所感染的293T细胞中, 28.37%的293T细胞GFP阳性, 显著高于其它时间段收集的慢病毒的感染效率 (图3)。

在12 h、24 h、36 h和60 h收集的慢病毒所感染的293T细胞的GFP阳性率分别是: 8.09%、16.29%、19.81%、12.97%, 与荧光显微镜下观察到的结果一致 (图4)。

通过病毒滴度的计算, 得出在12 h、24 h、36 h、48 h和60 h收集的慢病毒的滴度分别为: 1.08×10^7 、

2.17×10^7 、 2.64×10^7 、 3.78×10^7 、 1.73×10^7 (tu/ml)。荧光显微镜和流式细胞术的检验结果表明, 当收集时间超过48小时时, 病毒滴度开始下降。在转染后48小时收集的慢病毒的感染效率最高。

3 讨论

慢病毒载体的研究发展得很快, 研究得也非常深入。该载体可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上, 从而达到持久性表达。在感染能力方面可有效地感染神经元细胞、肝细胞、心肌细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞等多种类型的细胞^[11], 从而达到良好的基因治疗效果。慢病毒这些独特的特点, 成为基因研究的有力工具, 为快速研究疾病的治疗带来了便利。

在转染质粒时, 我们采用了1 μ g的GFP质粒作为实验基础。我们不否认加大质粒的用量可以改变实验结果。事实上, 我们也用过4 μ g的质粒来做转染。我们观察到在转染后有大量的293T细胞死亡。当Fugene6和DNA的比例大于3:1时, 慢病毒的滴度非常接近, 没有显著差异。由于病毒数量较多, 细胞较少, 几乎所有细胞均被感染, 对比不出由于不

同Fugene6与DNA比例及不同收集时间而造成的病毒滴度的影响。

本课题只针对使用Fugene6转染试剂制作慢病毒过程中试剂与DNA的使用比例、病毒收集的时间进行比较研究。此外,影响慢病毒滴度还有许多方面^[12,13]。比如不同的转染试剂对慢病毒滴度的影响,由于各种转染试剂转染特点、价格不同,本实验只选用了Fugene6做为转染试剂,未与其它转染试剂做比较。此外包膜质粒种类的不同对病毒滴度的高低也有影响,使用pHCMV表达质粒包装的病毒比普通质粒包装的病毒,其滴度要高1~3个数量级。Polybrene的使用与否、慢病毒的冻存、293T细胞的培养状态对获得的病毒滴度都有一定的影响。同时,不同的细胞系对慢病毒的感染效率的影响也是一个需要考虑的因素。

病毒浓缩也可以显著地提高其滴度。超速离心法在各实验室已经广泛地使用。超速离心法所需要的时间比较长,设备的要求比较高,价格相对昂贵。如果不通过超速离心也能获得高滴度的慢病毒是最省时、最有效、最经济的做法。

综上所述,本实验通过对慢病毒包装过程中的关键步骤的优化实验,得出当Fugene6和DNA的比例是3:1时获得的慢病毒的滴度最高;在转染后48小时是收集慢病毒的最佳时间。我们不排除不同的包装系统、不同的细胞系对慢病毒滴度的影响。

参考文献(References)

- 1 Salmon P, Trono D. Production and titration of lentiviral vectors. *Curr Protoc Hum Genet* 2007, Chapter 4, unit4.21.
- 2 Naldini L. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr Opin Biot* 1998; 9(5): 457-63.
- 3 Naldini L BU, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272: 263-7.
- 4 Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(21): 11381-8.
- 5 Buchsacher GL, Wong-Staal F. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 2000; 95(8): 2499-504.
- 6 Geraerts M, Willems S, Baekelandt V, Debyser Z, Gijssbers R. Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnol* 2006; 6: 34.
- 7 Kutner RH, Zhang XY, Reiser J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc* 2009; 4(4): 495-505.
- 8 马海燕, 方或聃, 张敬之. 应用荧光实时定量PCR方法检测重组慢病毒滴度及其感染效率. *生命科学研究* 2009; 13: 394-8.
- 9 Geraerts M, Michiels M, Baekelandt V, Debyser Z, Gijssbers R. Upscaling of lentiviral vector production by tangential flow filtration. *J Gene Med* 2005; 7(10): 1299-310.
- 10 杨靖, 宋波, 赵国强, 王茜, 韩志强, 许予明. 慢病毒RNAi载体的制备及滴度测定方法的建立. *中原医刊* 2007; 34(10): 32-3.
- 11 Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubel A, Spitz L, *et al*. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 1993; 365(6447): 666-9.
- 12 Logan AC, Nightingale SJ, Haas DL, Cho GJ, Pepper KA, Kohn DB. Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors. *Human Gene Therapy* 2004; 15(10): 976-88.
- 13 Sena-Estevés M, Tebbets JC, Steffens S, Crombleholme T, Flake AW. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes. *J Virological Methods* 2004; 122(2): 131-9.

The Optimized Protocol of Making High Titer Lentivirus by Using Fugene6

Lin Fan¹, Zhi-Zhao Ma², Shan-E Gao¹, Jian-Wei Lu³, Si-Guang Li¹, Xiao-Jing Pan^{1*}

(¹Tongji University Medical School, Stem Cell Research Center, Shanghai 200092, China; ²Hebei Medical University Second Hospital, Neurosurgery, Shijiazhuang 050000, China; ³Tongji University Medical School Embryonic Stem Cell Bank, Shanghai 200092, China)

Abstract Lentivirus has been used widely as an exogenous gene delivery tool. However, it is relatively difficult to get high titer lentivirus. The purpose of this article was to modify two critical steps during the lentivirus packaging procedure in order to get high titer lentivirus. The two critical steps were the ratio between transfection agent and target vector, and the lentivirus collecting time. Fugene6 was used as the transfection agent. Plasmid carrying green fluorescent protein (GFP) sequence was used as the target vector. Packaging plasmid, envelope plasmid and target vector were co-transfected into the 293T cells. The GFP positive 293T cells were visualize by fluorescence microscope. The percentage of GFP positive cells were analyzed by flow cytometry. We found that when the ratio of Fugene6 and target DNA was 3:1, the lentivirus titer was the highest comparing with other options. The lentivirus collected at 48 hours after transfection had the highest infection property.

Key words lentivirus; titer; Fugene6

Received: November 22, 2010 Accepted: January 20, 2011

This work was supported by the Shanghai University Student Creative Plan (No.1500107029) and Key Medical Research Plan of Hebei Province (No.20100313)

*Corresponding author. E-mail: panxiaojing@tongji.edu.cn