

人神经营养因子-3 重组逆转录病毒的包装与鉴定

欧阳立明² 周涛¹ 薛冲¹ 刘志敏^{1*} 张嗣良²

¹(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

²(华东理工大学生物工程学院 上海 200237)

摘 要 在逆转录病毒载体 pLXSN 中引入人神经营养因子-3(hNT-3), 构建成重组质粒 pLXSN-NT3, 转染包装细胞 PA317 后经 G418 筛选得到几个稳定产毒的细胞克隆。测定这几个克隆的病毒滴度, 最高达到 1.60×10^5 , 且产毒细胞株不产生复制型病毒。PCR 和大乳鼠背根神经节活性检测证明 hNT-3 已整合到宿主细胞基因组并能稳定表达。

关键词 逆转录病毒载体 pLXSN, 人神经营养因子-3(hNT-3), 基因治疗

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0445-04

神经营养因子-3(Neurotrophin-3, NT-3)属于神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)家族类蛋白因子, 能促进多种神经元亚群的发育、生存、迁移和分化, 从而对治疗多种目前尚无较好治疗方法的中枢神经退行性疾病(如帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、亨廷顿舞蹈症、肌萎缩性脊髓侧索硬化症等) 和神经损伤, 具有很大的临床应用价值^[1]。但由于中枢神经系统的血脑屏障阻碍外源药物蛋白进入中枢神经系统, 所以神经营养因子类药物的给药途径就成为限制其临床应用的瓶颈。基因治疗可以使外源基因在治疗靶区持续稳定的表达, 为应用神经营养因子治疗中枢神经系统疾病提供了新的可行性^[2]。本文用逆转录病毒载体构建了人神经营养因子-3 的重组质粒, 包装后获得了稳定产毒的细胞克隆, 它们可以包装产生具有一次感染能力的病毒颗粒, 同时分泌表达外源基因 hNT-3。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 : 限制酶购自 TaKaRa 公司, pfu 扩增酶购自 Sangon 公司, T4 DNA 连接酶、Taq 酶购自华美公司, PCR 产物回收试剂盒、DNA 快速纯化回收试剂盒和细胞基因组 DNA 提取试剂盒购自博大泰克公司, 脂质体 LipofectAMINE、细胞培养基 DMEM 和抗生素 G418 购自 GIBCOL BRL 公司。聚凝胺(Po-

lybrene) 购自 Sigma 公司, 特级胎牛血清购自天津生化制品厂。G418 用 0.1mol/L HEPEX(pH7.5) 液配制成浓度为 40mg/mL 的储存液, 经 0.2 μ m 滤膜过滤除菌后 -20℃ 保存或 4℃ 下存放 2~3 个月; 聚凝胺用 PBS(pH7.4) 配制成浓度为 4mg/mL 储存液, 经 0.2 μ m 滤膜过滤除菌后 -20℃ 保存或 4℃ 下存放 2~3 个月。

1.1.2 质粒及细胞株 : 含 hNT-3 全长片段的质粒 M13mp18-hNT3, 逆转录病毒载体 pLXSN 由军事医学科学院生物工程研究所二室构建和保存; 包装细胞株 PA317、小鼠成纤维细胞 NIH/3T3 由 302 医院基因治疗中心夏小兵博士惠赠。

1.2 方法

1.2.1 pLXSN-hNT3 的构建 : 从 M13mp18-hNT3 中用 pfu 酶 PCR 扩增出 hNT-3 全长片段, 通过设计引物使片段两端带有 EcoR I、BamHI 酶切位点, 以便于克隆。引物序列为:

上游引物 5'-CGGAATTCACCATG TCC ATC TTG TTT TAT G-3' (30mer) 其中 ACC 为有助于真核表达的 KOZAK 序列; 下游引物 5'-CGGGATCC TCA TGT TCT TCC GAT TTT-3' (26mer)

反应条件: 94℃ 5min, (94℃ 40s, 55℃ 40s, 72℃ 90s)₂₅, 72℃ 10min。扩增产物用 PCR 产物回收试剂盒回收后, 用 EcoR I 和 Xba I 酶切, 插入同样酶切的载体 pLXSN, 连接, 转化, 提取转化子质粒进行酶切及 PCR 鉴定。

1.2.2 细胞培养 :包装细胞 PA317、小鼠成纤维细胞 NIH3T3 均用含热灭活胎牛血清 10% ,青霉素 100u/mL ,链霉素 100u/mL 的 DMEM 培养液培养 ,培养环境为 37℃ 5% CO₂。

1.2.3 DNA 测序 :由 TaKaRa 公司完成 根据目的片段中间的序列合成引物 ,向两头测序。

1.2.4 建立稳定的 hNT-3 重组逆转录病毒产毒细胞系 :用 lipofectAMINE 转染 PA317 细胞 ,方法参见 lipofectAMINE 说明书。转染 24h 后用含 10% 血清的 DMEM 培养基 1:4 传代培养 ;次日在培养基中加入 G418(终浓度 400μg/mL)进行筛选。以后每 3 天换一次液 ,2~3 周后 ,换用含 200μg/mL G418 的维持液以有限稀释法继续筛选 ,直到得到抗性稳定的单克隆。

1.2.5 病毒滴度的测定 :产毒细胞系在培养 3d 后换以无 G418 的完全培养基 ,继续培养 24h 后 ,取培养液经 0.45μm 滤膜过滤 ,即病毒原液 ,立即用于病毒滴度的测定或 -70℃ 保存。感染前一天将 NIH3T3 按 6 × 10⁴ 接种于 6 孔培养板中 ;感染当天 (细胞达到 30% ~ 40% 汇合) ,弃去原培养液 ,加入病毒稀释液 1mL 和终浓度为 4μg/mL 的 polybrene。每一种产毒细胞系的病毒原液都取 10⁻¹ , 10⁻² , 10⁻³ , 10⁻⁴ 个稀释度 ,每个稀释度接 2 孔 (10⁻¹ 用于检测病毒原液中是否存在复制型病毒 ,方法见 1.2.7) 。 37℃ 5% O₂ 下孵育 3h 后 ,补加完全培养基 3mL ,继续培养 24~48h 至 100% 汇合。按 1:10 传代至新鲜培养基 ,培养 12~26h 后换以含有 G418 (400μg/mL) 的完全培养基进行筛选。以后每 3 天换液 ,持续筛选 7~10d ,即可形成细胞克隆 (每克隆 50~100 细胞) 。冷甲醇固定 ,Gimsa 染色计数存活的细胞克隆数。按以下公式计算病毒滴度 :

$$\begin{aligned} \text{G418 抗性 CFU/mL} &= \frac{\text{克隆数}}{\text{病毒稀释液体积 (mL)} \times \text{传代比例} \times \text{稀释度}} \\ &= \frac{\text{克隆数}}{\text{稀释度} \times 10} \end{aligned}$$

1.2.6 产毒细胞克隆的 PCR 鉴定 :为了检验重组的逆转录病毒载体是否整合到了包装细胞的染色体上 ,设计了 3 对引物 ,以产毒细胞株和 PA317 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。

(1) 针对载体特异的 *neo^R* 基因 ,序列为 :

上游 5'-CAAGATGGATTGCACGCAGG-3'(20mer)

下游 5'-CCCGCTCAGAAGAACTCGTC-3'(20mer)

产物长度应为 790bp。

(2) 针对 hNT-3 基因 ,引物同 1.2.1 ,产物长为 790bp。

(3) 针对载体上的病毒包装蛋白基因(*env*) ,用于检

测复制型逆转录病毒的存在 ,序列为 :

上游 5'-ACCTGGAGAGTCACCAACC-3'(19mer)

下游 5'-TACTTTGAGAGGCTGTAGC-3'(20mer)

产物长度应为 410bp ,反应条件均为 97℃ 5min , (94℃ 40s 55℃ 40s ,72℃ 60s)₃₀ ,72℃ 10min。

1.2.7 产毒细胞克隆表达产物的活性检测

取新生大乳鼠 ,无菌条件下取出脊髓 ,在体视显微镜下分离脊髓背根神经节 ,仔细剥去外周鞘膜 ,接种于预先涂有鼠尾胶的 24 孔聚苯乙烯板 ,每孔 2~3 个 ,置于 37℃ 5% CO₂ 孵箱内 ,待贴壁牢固后 ,加入一定稀释度的待测转染细胞培养液 (测活前一天换为无 G418 的无血清培养基) 上清 ,继续培养 48~96h ,观察神经突起生长的粗细、密度和长度等情况并照像记录。用已知活性浓度的 NGF 标准品作为阳性对照 ,未作处理的 PA317 细胞培养液上清和完全培养基作为阴性对照。

1.2.7 逆转录病毒原液中复制型病毒的检测 :在检测病毒滴度时 ,10⁻¹ 病毒稀释液感染孔不用 Gimsa 染色 ,而待其存活细胞生长融合。融合细胞传代后依病毒滴度检测方法以其培养液上清原液感染 NIH3T3 ,观察 G418 筛选后有无存活克隆。

2 结 果

2.1 pcDNA3-hNT3 的构建

将外源基因 hNT-3 通过双酶切定向克隆至表达载体 pLXSN 的 *EcoRI*/*Bam*HI 位点 ,重组质粒经酶切与 PCR 鉴定和测序分析 ,证明 hNT3 已正确插入载体 PLXSN。图 1 为重组质粒 pLXSN-NT3 示意图。图 2 为重组质粒的酶切与 PCR 鉴定的琼脂糖凝胶电泳结果。图 3 为外源基因的部分测序结果。显示克隆到载体中的 hNT3 除第 394 位碱基与 GenBank 报道序列^[3]相比发生同义突变(AGA→CGA)外 ,其余都与报道序列完全一致。

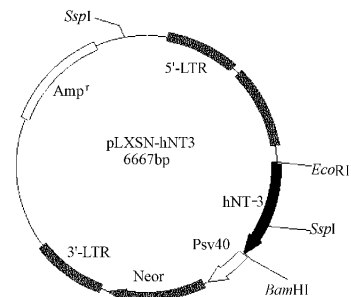


图 1 重组质粒 pLXSN-hNT3 结构示意图

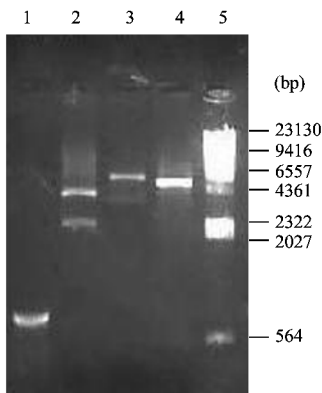


图2 质粒 pLXSN-hNT3 的酶切和 PCR 鉴定

Fig.2 Identifying pLXSN-hNT3 by digested with restriction enzyme and PCR

1. PCR result of the plasmid (790bp) 2. pLXSN-hNT3/*Ssp*I (the theoretical restriction segment of the recombinant plasmid should be 4.3kb and 2.4kb) 3. pLXSN-hNT3/*Eco*R I (6.7kb); 4. pLXSN/*Eco*R I (5.9kb) 5. λ *Hind* III marker

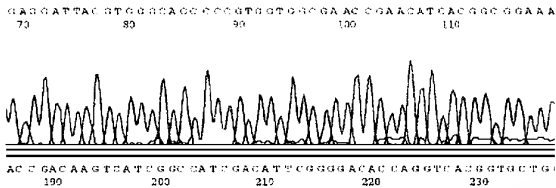


图3 pLXSN-hNT3 质粒部分测序图

Fig.3 Sequencing map of pLXSN-hNT3 (part).

The site 102 is the base different from GenBank (A), and the other bases are the same .

2.2 稳定的产毒细胞系的建立

在 G418 筛选下 ,经有限稀释法 ,得到 10 个有稳定抗性的单克隆 ,分别为 2C3 ,1E6 ,1E4 ,2F5 ,1G4 ,2B10 ,1F11 ,1C2 ,1C5 ,1B3。这表明 ,重组逆转录病毒质粒 pLXSN-hNT3 已稳定转染到包装细胞系 PA317。在包装细胞系中 ,外源目的蛋白基因及 G418 抗性基因 *neo^R* 获得了转录 ,转录出的 mRNA 一方面可以翻译产生外源目的蛋白及 G418 抗性 ,另一方面能被细胞系产生的病毒外壳蛋白识别和包装 ,形成具有感染能力的病毒颗粒。不过 ,这种病毒颗粒的基因组 RNA 仍然不能编码结构蛋白 ,也就不能自行装配出子代病毒颗粒 ,所以又被称为假病毒颗粒(Pseudovi-

ral particles)。它只有一次感染能力 ,不会从感染的靶细胞中扩散出来 ,是安全的基因转移载体。

2.3 病毒滴度测定与复制型病毒检测

为了获得高滴度的产毒细胞系以便在后续基因治疗实验中有效感染靶细胞 ,需要对上述 10 个有稳定抗性的单克隆进行滴定 ,即集落形成单位(CFU)的测定。10 个产毒细胞系的滴定结果如表 1。

表中可见 ,10 个产毒细胞系中以 2F5 的滴度最高 ,达到 2.8×10^5 。一般而言 ,滴度在 $9 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 以上者即可用于基因治疗的外体靶细胞转染。

以感染病毒后筛选成活细胞的上清再次感染 NIH3T3 ,结果不能形成对 G418 有抗性的克隆 ,证明 10 个产毒细胞系都不产生复制型病毒。

2.4 对稳定产毒细胞系的 PCR 检验

以产毒细胞株 2F5 和未转染的 PA317 细胞基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增 ,结果如图 4。可见 2F5 细胞基因组 DNA 能扩增出 *neo^R*、*env*、hNT-3 基因 ,而 PA317 细胞基因组 DNA 中不能扩增出 hNT-3 基因和 *neo* 基因 ,只能扩增出 *env* 基因。表明筛选得到的产毒细胞株 2F5 基因组中已整合有载体和外源基因片段。

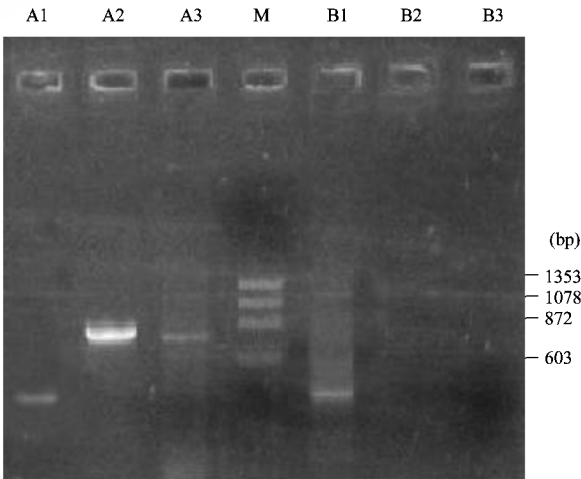


图4 稳定产毒细胞株的 PCR 检验结果

Fig.4 The PCR result of stable retroviral-producing cell clone

A. the PCR result of 2F5 genome DNA ,B. the PCR result of PA317 genome DNA ; 1 2 3 is the PCR result of *env* gene(410bp) ,*neo^R* gene (790bp) and hNT-3(790bp) respectively ,M. Φ X174/ *Hae* III DNA marker

表 1 10 个产毒细胞系的病毒滴度测定结果

Table 1 The titration of 10 retroviral-producing package cell clones

Cell clones	2C3	1E6	1G4	1E4	2F5	2B10	1F11	1C2	1C5	1B3
CFU/mL	7.4×10^4	1.6×10^5	9.0×10^4	3.6×10^4	2.8×10^5	2.3×10^3	5.0×10^4	2.0×10^4	9.4×10^3	8.0×10^3

2.5 产毒细胞克隆表达产物的活性检测

用大乳鼠背根神经节检测产毒细胞克隆 2F5 表达产物的活性,用已知活性浓度的 NGF 标准品作为阳性对照,未作处理的 PA317 细胞培养液上清和 DMEM 培养基作为阴性对照,结果见图 5。2F5 细胞株的培养上清处理的背根神经节长出的神经突起粗壮,而 PA317 样品中神经突起无生长或有细弱的生长及少量许旺氏细胞迁出。相比之下,产毒细胞克隆 2F5 的表达产物可以明显促进背根神经节神经突起的生长,而且这种效用可维持 1 周以上。同时用 2F5 细胞和 PA317 细胞上清的 5 倍、10 倍稀释液处理背根神经节,均无明显的神经突起生长。说明 2F5 细胞上清液中 hNT-3 表达量较少。

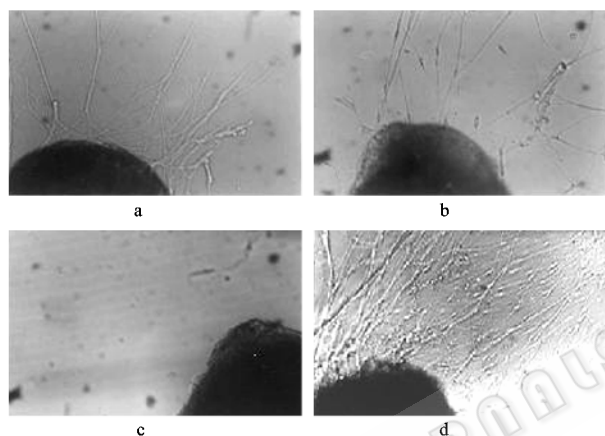


图 5 产毒细胞克隆表达产物的活性检测结果

Fig.5 Detecting the bioactivity of hNT-3 expressed in cells by rat dorsal ganglion
a. 10 times dilution of 2F5 cell culture supernatant ;
b. PA317 cell culture supernatant ; c. DMEM medium ;
d. 2 ng/mL NGF standard product

3 讨 论

本实验应用的载体 pLXSN 缺失了逆转录病毒的结构蛋白基因 *gag*、*pol* 和 *env*, 因而是复制缺陷型载体,它必须借助辅助病毒或包装细胞提供的病毒复制所必需的反式作用蛋白,才能包装产生子代重组病毒。本实验采用的包装细胞 PA317 是目前使用最广泛的一种包装细胞系统,它来源于 NIH3T3,整合有单拷贝辅助病毒基因组,由于缺失了 ψ 包括信号 3'LTR 和部分 5'LTR 等病毒顺式结构,因此和病毒载体之间重组产生辅助病毒的概率大大减低。本实验发现包装细胞 PA317 本身也有微弱的促进神经节神经突起生长的作用,这是因为 PA317 细胞基因组中也有 NT-3 基因,但其表达相对于重组了外源基因的细胞而言要弱得多。

本文获得了能稳定产生高滴度假病毒的细胞株,可以用来感染动物皮肤或肌肉的原代成纤维细胞来进行动物试验,进而还可以感染人皮肤或肌肉的原代成纤维细胞进行临床基因治疗,因此该重组产毒包装细胞株的建立为下一步感染靶细胞,最终应用于临床基因治疗打下了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Blesh A, Grill R J, Tusynski M H *et al.* Neurotrophin gene therapy in CNS models of trauma and degeneration. *Prog Brain Res*, 1998, **117**: 473 ~ 484
- [2] Travis J. New optimism blooms for developing treatments. *Science*, 1992, **258**: 218 ~ 220
- [3] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>

The Package and Identifying of hNT-3 Recombinated Retroviral Vector

OUYANG Li-Ming² ZHOU Tao¹ XUE Chong¹ LIU Zhi-Min^{1*} ZHANG Si-Liang²

¹(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

²(College of Bioengineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract hNT-3 was inserted into retroviral vector pLXSN to get pLXSN-NT3, and it was transfected into packaging cell line PA317 to form G418 resistant cell clones. The G418 resistant clones were titrated and checked for the existence of replication viral. Genome DNA isolated from the cell clone of highest titration showed the function gene hNT-3 cDNA had integrated into the genome of host cells verified by PCR. And bioassay of the clone's cell culture supernatant exhibited that it can induce neurite overgrowth in the primary cultures of rat spinal cord dorsal root ganglions as compared with controls.

Key words retroviral vector pLXSN, human neurotrophin-3 (hNT-3), gene therapy