

一种新型慢病毒载体制备方法的建立

A Novel System for Producing Lentiviral Vectors

马 强 李 明 董文其 吴英松*

MA Qiang , LI Ming , DONG Wen-Qi and WU Ying-Song*

南方医科大学生物技术学院, 广州 510515

College of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

摘 要 为了建立新型、高产量的慢病毒载体制备体系,将构建好的主框架质粒 pVECRNA、包装质粒 pGAGPOL 及包膜质粒 pVSVG 通过脂质体共转染至 BHK₂₁ 细胞,再用含有 T7RNA 聚合酶基因的重组痘苗病毒 vTF-3 感染细胞,培养 4d 后,收集培养上清,提取培养上清的 RNA,进行 RT-PCR 反应,将培养上清进行免疫印迹鉴定,将培养上清感染正常的 293T 细胞、HepG₂ 细胞、Vero 细胞,荧光显微镜下观察细胞 GFP 的表达情况,采取 3 × 3 × 3 析因分析方法,优化系统产量,Real-time PCR 方法测定细胞培养上清中病毒载体的拷贝数,利用流式细胞术检测病毒载体滴度。RT-PCR 及 p24 免疫印迹结果均提示在细胞上清中存在慢病毒载体,通过荧光显微镜观察到感染组 293T 细胞、HepG₂ 细胞、Vero 细胞均表达绿色荧光蛋白 GFP,说明此系统制备出的慢病毒载体具有感染性;系统经优化后,培养上清中慢病毒载体拷贝数达到 $(11.71 \pm 0.80) \times 10^{11}$ copies/mL,培养上清原始滴度达到 $(1.3 \pm 0.18) \times 10^8$ tu/mL,高出目前常用制备体系产量 1 个数量级。初步建立了新型慢病毒载体制备体系,为今后该系统的大规模应用提供客观的科学依据。

关键词 慢病毒载体,痘苗病毒,基因治疗

中图分类号 R394 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)05-0958-03

Abstract The aim was to develop a cell culture system capable of producing high titer lentiviral vector stocks with recombinant vaccinia viruses as helpers. BHK₂₁ was co-transfected by three main plasmids containing the transducing plasmid pVECRNA, the packaging plasmid pGAGPOL and the envelop plasmid pVSVG, and thereafter infected with the vaccinia vTF-3 containing bacteriophage T₇ RNA polymerase gene using Lipofectamine2000TM. After 4 days incubation, the culture supernatant of lentiviral vectors was collected and judged by RT-PCR and the Western blot, the results showed that lentiviral vectors were found in the culture supernatant; approximately $(11.71 \pm 0.80) \times 10^{11}$ copies of lentiviral vector RNA were present per mL of cell culture supernatant, as detected by Real-time PCR; the vector stocks with titers was up to $(1.3 \pm 0.18) \times 10^8$ tu/mL, as detected by flow cytometry, which is one order of magnitude higher than the output of classical manufacture system. These results suggest that the new poxviral/lentiviral hybrid system for efficient lentiviral vector production was initially established. It provides the basis for the future development of industrial application.

Key words lentiviral vector, vaccinia virus, gene therapy

慢病毒载体^[1](Lentivectors)可以有效地感染所有哺乳动物细胞,引入宿主细胞的目的基因借助于

Received: January 11, 2007; Accepted: March 20, 2007.

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30300316).

* Corresponding author. Tel: +86-20-61648321; Fax: +86-20-61648554; E-mail: wg@fimmu.com

国家自然科学基金资助(No. 30300316)

慢病毒极易整合到宿主基因组,从而稳定、长期表达目的基因,然而目前慢病毒载体的生产系统产量偏低,影响了慢病毒载体的推广应用。因此本研究以痘苗表达系统^[21]为基础,建立一个通过基因操作技术在体外细胞培养系统中制备高滴度慢病毒载体颗粒的大规模病毒载体培养技术体系,并将该技术应用于其他难以体外大规模培养的 RNA 病毒的制备。该体系包括一株插入 T7RNA 聚合酶基因的重组痘苗病毒 vTF-3 和 3 个重组质粒(图 1),分别为主框架质粒 pVECRNA、包装质粒 pGAGPOL、包膜质粒 pVSVG。其中主框架质粒 pVECRNA 含有 T7 启动子和终止子控制下的慢病毒载体的 DNA 模板,包装质粒 pGAGPOL 含有克隆于痘苗病毒早/晚期启动子和终止子之间的 GAG-POL 编码区,包膜质粒 pVSVG 含有克隆到痘苗病毒早/晚期启动子和终止子之间的 VSV-G 编码区。

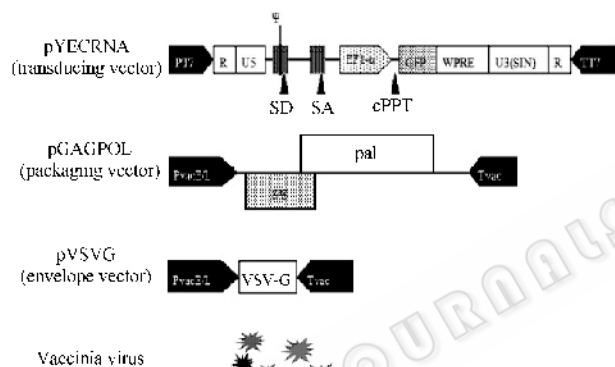


图 1 本系统示意图

Fig. 1 The representation of the three-plasmid hybrid lentiviral-vector production system

在六孔板中每孔接种约 5×10^5 个 BHK₂₁ 细胞,培养过夜,第二天按脂质体 Lepofectamine2000TM说明书步骤将 pVECRNA、pGAG-POL、pVSVG 共同转染细胞 4 h 后,加入含有 T7 RNA 聚合酶基因的重组痘苗病毒 vTF-3,此重组痘苗病毒表达的 T7 RNA 聚合酶,直接指导 pVECRNA 转录慢病毒载体主框架 RNA,并且痘苗病毒 RNA 聚合酶直接指导 pGAGPOL 和 pVSVG 的蛋白表达。2h 后,吸去培养上清,用无血清 DMEM 洗涤 3 次,每孔加入 2.5mL 含 10% FCS 的 DMEM,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,pVSVG 表达的蛋白 VSV-G 包装由 pVECRNA 转录的主框架 RNA 以及 pGAGPOL 表达的参与慢病毒载体逆转录整合所需酶类,形成慢病毒载体,经胞吐作用释放到培养上清中,96h 后收集培养上清^[3]。

本系统以 Moss 等人^[21]发明的 VV/T7 瞬时表达

系统为基础构建,以期获得高拷贝数的慢病毒载体。本系统蛋白表达迅速,产量高,原因在于 T7 RNA 聚合酶由痘苗病毒指导合成,慢病毒载体的 RNA 由 T7 RNA 聚合酶指导合成,使得慢病毒载体的生产不依赖慢病毒天然复制途径,充分发挥痘苗病毒表达系统瞬时高效特点,避开细胞障碍的限制,提高慢病毒载体滴度。此外,痘苗病毒表达不依赖宿主细胞,不涉及 RNA 从胞核到胞质的转运,这样可以完全去除 REV 蛋白编码序列和 RRE 元件,只保留 HIV-1 来源的 GAG-POL 蛋白编码序列,最大限度减少了病毒源性序列,使系统表达效率提高,利于产量提高。本生产系统在经典 VV/T7 的基础上又增加了两个在痘苗启动子控制下的真核表达质粒,将慢病毒顺式作用元件与反式作用蛋白分离,避免了在生产过程中 RCVC (replication competent virus) 的产生,使得生产系统的生物安全性提高,并且本生产系统融合了质粒瞬时表达生产系统中生产周期短,构建省时,灵活度高等优点。慢病毒载体与辅助痘苗病毒物理特性相差很大,通过简易的过滤装置能够去除绝大部分辅助痘苗病毒,如果随后能够构建成功复制缺陷性辅助痘苗病毒,则此系统生产的慢病毒载体有望能够直接应用于基础研究及临床应用。

采用 RT-PCR 方法检测整合入慢病毒载体主框架 RNA 中的 WPRE (土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件) 元件来验证慢病毒载体的存在^[41],结果 pVECRNA、pGAGPOL、pVSVG 共转染的细胞培养上清 RT-PCR 反应呈阳性;将 pVECRNA、pGAGPOL、pVSVG 以及辅助痘苗病毒 vTF-3 共转染 BHK₂₁ 细胞后采用荧光显微镜观察发现 BHK₂₁ 表达报告基因 GFP;利用 p24 的单抗以及标记有 cy3 的二抗对 pVECRNA、pGAGPOL、pVSVG 共转染的 BHK₂₁ 细胞的间接免疫荧光实验结果发现细胞 BHK₂₁ 出现明显的红色荧光。将 pVECRNA、pGAGPOL、pVSVG 共转染至 BHK₂₁ 细胞后,收集培养上清,利用 p24 单抗进行 Western blotting 分析鉴定培养上清中慢病毒载体的存在,结果在此细胞培养上清中检测到 24kD (p24) 的条带;将收集的培养上清分别感染 293T 细胞、HepG2 细胞、Vero 细胞,24h 后,在荧光显微镜下观察到这三株细胞均表达报告基因 GFP;采用 Real Time PCR 方法测定培养上清中慢病毒载体的拷贝数,取培养上清,依次经足量的 DNA 酶、RNA 酶、蛋白酶 K 处理去除破碎细胞中释放的未被 VSVG 包装的慢病毒载体 RNA 以及质粒 DNA 后,提取 RNA,采

用 Universal PCR Master Mix 试剂盒在 PE5700 型全自动荧光定量 PCR 分析仪上进行分析,流式细胞术测定病毒载体滴度,即在六孔板中分别接种 293T 细胞,将培养上清梯度稀释,分别感染 293T 细胞,24h 后将细胞处理成单细胞悬液,流式细胞仪计数 GFP 阳性细胞数,计算病毒滴度,所用公式:病毒滴度 (t_u)_{mL} = GFP 阳性细胞百分数 × 感染的细胞总数 × 细胞的稀释倍数^[4],细胞的稀释倍数取曲线线性范围内的数值,以确保单拷贝的病毒载体感染单个细胞。

痘苗表达系统对于制备细胞系具有一定的选择性,病毒与制备细胞数比例(MOI)以及质粒用量对于制备细胞系能否达到最佳的生产效率具有重要的影响,故采用 $3 \times 3 \times 3$ 析因方差设计,分析细胞株类型、病毒与制备细胞数比例(MOI)以及质粒用量的最佳优化方案,进而得到体系最佳产量,由最后的实验结果分析得到细胞的种类,质粒的用量以及痘苗病毒的感染比例对系统的产量均有统计学意义,并且在以 6 孔板为例,BHK₂₁ 为生产细胞,细胞数量约为 5×10^5 个每孔,用每个细胞 1 个痘苗病毒的比例感染(MOI),质粒用量为 22 μ g,系统中质粒用量比例为 pVECRNA:pGAGPOL:pVSVG = 5:5:1,培养 96h 后,培养上清中的病毒载体拷贝数最高,达到 $(11.71 \pm 0.80) \times 10^{11}$ copies/mL。取病毒载体拷贝数最高时的培养上清测病毒载体的滴度,结果滴度达到 $(1.3 \pm 0.18) \times 10^8$ tu/mL。目前各种生产慢病毒载体的系统的产量在未浓缩前基本维持在 $10^6 \sim 10^7$ 数量级之间,而本系统的产量在未浓缩前已经达到 10^8 数量级,超过同类系统产量 1 个数量级。

综上所述,我们已经初步建立了慢病毒载体的

新型制备方法,本项研究可以为国内外的科研及临床工作人员提供经济实用的慢病毒载体,利用此方法我们也已经建立了重组 HCV 的制备体系^[5],然而通过该方法制备的慢病毒载体中含有感染性痘苗病毒的污染,给慢病毒载体的分离纯化带来不便,为了解决这一问题,我们正在构建 D13L 基因缺陷型痘苗病毒。D13L 基因是痘苗病毒的必要基因,其表达产物是痘苗病毒颗粒组装所必需的,其表达的限制或阻抑对于病毒转录和 DNA 复制没有影响,但能够阻碍痘苗病毒颗粒的形成。因此使用 D13L 阴性痘苗病毒重组体生产慢病毒载体,可得到几乎没有辅助痘苗病毒污染的慢病毒载体,有望直接应用于临床。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of non dividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996, **27**: 2263 - 2267.
- [2] Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(21):11341 - 11348.
- [3] MA Q (马强), Li M (李明), Wu Y (吴英松). Application of a vaccinia replication system for manufacturing of lentiviral vectors. *Journal of Tropical Medicine* (热带医学杂志), 2006, **6**: 503 - 506.
- [4] Lizee G, Aerts JL, Gonzales MI, et al. Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction as a method for determining lentiviral vector titers and measuring transgene expression. *Hum Gene Ther*, 2003, **14**(6):497 - 507.
- [5] Wu YS, Feng Y, Dong WQ, et al. A vaccinia replication system for producing recombinant hepatitis C virus. *World J Gastroenterol*, 2004, **10**(18):2670 - 2674.