

· 基础论著 ·

HIV-1 假病毒包装方法的探讨

徐树莹 乔录新 史宣玲 徐萌 魏飞力 袁霖 石英 陈德喜

【摘要】目的 通过不同方案包装 HIV-1 假病毒, 确定获得高重复性、高稳定性和高滴度假病毒的方法。**方法** 从转染效率影响因素出发, 通过不同的转染方案, 利用 pNL4-3 LucR⁻E⁻质粒与 VSV-G 质粒共转染 293 细胞包装病毒, 分别于 48 h 和 72 h 收取假病毒并重新感染 293 细胞, 48 h 后测荧光素酶报告基因。**结果** 成功包装出 HIV-1 假病毒, 不同包装方案的病毒滴度不同, 测得报告基因最高接近 10⁷ RLUs。**结论** 应用 PEI 转染试剂、大提质粒 pNL4-3 : VSV-G 为 4 : 1 时, 转染效率最高, 包装的假病毒滴度最高。

【关键词】 人类免疫缺陷病毒 I 型; 假病毒; 包装方法

Optimization of packaging the HIV-1 pseudotyped virus XU Shuying*, QIAO Luxin, SHI Xuanling, XU Meng, WEI Feili, YUAN Lin, SHI Ying, CHEN Dexi. *Department of Infectious Diseases, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: CHEN Dexi, Email: dexi09@yahoo.com; YUAN Lin, Email: yuj_lin@hotmail.com

【Abstract】Objective To package HIV-1 pseudotyped virus through different ways, to define methodology of packaging high reproductive, high stable and high titer pseudotyped virus. **Methods** In view of the transfection efficiency factors, through different transfection ways, pNL4-3 LucR⁻E⁻ plasmid and VSV-G plasmid were transfected into 293 cells packaging virus, and the HIV-1 pseudotyped virus after 48 h and 72 h were collected, respectively, then reporter gene after infecting 293 cells for 48 h were detected. **Results** HIV-1 pseudotyped virus were packaged successfully, the virus titer differs from packaging ways, and reporter gene measured up to 10⁷ RLUs. **Conclusion** When using PEI transfection reagent, and plasmid pNL4-3 : VSV-G as 4 : 1, the highest transfection efficiency and the highest viral titer could received.

【Key words】 Human immunodeficiency virus type I ; Pseudotyped virus; Packaging method

艾滋病的病原体为人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV), 该病毒属逆转录病毒。艾滋病又名获得性免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS), 是一种由人类免疫缺陷病毒感染引起的, 并以全身免疫系统严重损伤为主要特点的免疫系统疾病。随着高效抗逆转录病毒治疗 (highly active antiretroviral therapy, HART) 的广泛普及和各种干预措施的有效应用, 尽管 HIV 感染全球范围内正在呈现逐渐减缓的趋势, 但是 AIDS 总感染人数和累计死亡人数仍在不断地攀升^[1]。

HART 治疗失败的主要原因是耐药的产生。目前耐药检测有两类: 基因型耐药检测和表型耐药

检测。表型耐药检测是目前耐药检测的金标准, 而表型耐药检测的基础是包被出高重复性、高稳定性、高滴度的假病毒。假病毒是一种反转录病毒, 带有其他病毒的囊膜蛋白 (或者其他识别受体相关的蛋白), 且具有感染宿主细胞的能力, 但由于进入宿主细胞的病毒基因缺乏或移码, 因此, 虽然具有感染能力的完整病毒颗粒, 但是仅能感染宿主细胞 1 次^[2]。为便于检测与研究假病毒, 在不影响其功能的前提下, 常在构建的假病毒载体中加入特定的易检测的标志基因, 如绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 或萤火虫荧光素酶 (luciferase) 等, 目前在研究病毒株耐药问题方面, 这种假病毒起着重要的作用, 并被广泛应用^[3]。

目前, 关于假病毒包装有不同的方案, 稳定性和可重复率各异, 且病毒滴度不稳定。本研究利用 pNL4-3 LucR⁻E⁻ 质粒 (以下简称为 pNL4-3) 和水泡性口膜炎病毒的外壳糖蛋白 (vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSV-G) 质粒探讨假病毒包装的最佳方案, 以包装出高重复性、高稳定性、高滴度的 HIV-1 假病毒, 报道如下。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.01.003

基金项目: 国家科技重大专项课题 (No. 2012ZX10001002-002-011); 国家自然科学基金 (No. 30910103915); 国家自然科学基金青年基金 (No. 81100288)

作者单位: 100069 北京, 首都医科大学附属北京佑安医院感染科 (徐树莹、徐萌、袁霖); 首都医科大学附属北京佑安医院北京市肝病研究所 (乔录新、魏飞力、石英、陈德喜); 清华大学医学部艾滋病综合研究中心 (史宣玲)

通讯作者: 陈德喜, Email: dexi09@yahoo.com; 袁霖, Email: yuj_lin@hotmail.com

材料与方法

一、材料

DMEM高糖培养基购自上海Hyclone公司；胎牛血清购自四季青生物工程材料有限公司；胰酶、青链霉素等购自美国Gibco公司；离心柱法小量提取质粒试剂盒、大量提取质粒试剂盒购自北京康为世纪公司；培养皿购自Corning公司；TurboFect™ in vitro Transfection Reagent (Fermentas公司)、Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen公司)、聚乙烯亚胺polyethylenimine (polysciences, Inc, PEI)、pNL4-3 Luc R⁻E⁻质粒 (Lopez教授惠赠)；VSV-G质粒 (清华大学史宣玲教授惠赠)；293细胞 (西安交通大学夏海滨教授惠赠)。

二、方法

1. 提取 pNL4-3 LucR⁻E⁻ 和 VSV-G 质粒：分别按照康为世纪离心柱法提取质粒试剂盒说明书、康为世纪大提质粒试剂盒说明书、磁珠法提取 pNL4-3 和 VSV-G 质粒，分别电泳鉴定并测浓度和纯度。

2. 设计不同转染方案，pNL4-3 和 VSV-G 质粒共转染 293 细胞：(1) 细胞分盘：用胰酶消化 293 细胞， $4 \times 10^5 \sim 8 \times 10^5$ 细胞/cm² 的密度平铺于 35 mm 培养皿，每孔 2 ml 含 10% 完全培养基 (使细胞贴壁后所占总面积达到培养皿面积的 70% ~ 90%)，根据细胞贴壁情况于含 5% CO₂ 的 37 °C 的孵箱中培养 8 ~ 24 h 后转染。

(2) 制备 DNA 混合物 (转染试剂)：①转染试剂不同：下面以每个 35 mm 孔为例，准备 100 μl 无血清 DMEM 培养基，按每孔 4 : 1 比例加入 pNL4-3 质粒 4 μg、VSV-G 质粒 1 μg (均为大提质粒)，混匀后分别加入 PEI 转染试剂 4 μl (4 mg/ml)、磷酸钙转染试剂 2 μl (1 mol/L，边加边震荡混匀防止沉淀形成而影响转染效率)、Lipofectamine™ 2000 Reagent 2 μl、TurboFect™ in vitro Transfection Reagent 2 μl，充分混匀。② pNL4-3 质粒和 VSV-G 质粒的比例不同：100 μl 无血清 DMEM，每孔 pNL4-3 质粒的量为 4 μg，分别按照 pNL4-3 : VSV-G 的比例 1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、6 : 1 和 8 : 1 加入 VSV-G 质粒 (均为大提质粒)，混匀后加入 PEI 转染试剂 4 μl (4 mg/ml)，充分混匀。③质粒提取方式不同：100 μl 无血清 DMEM 培养

基，每孔加入 PEI 转染试剂 4 μl，按 4 : 1 比例加入 pNL4-3 质粒 4 μg、VSV-G 质粒 1 μg，分别为离心柱法小提的质粒、大提试剂盒提取的质粒、磁珠法提取的质粒，充分混匀。

(3) 加样并收取假病毒：静置 30 min 后逐滴加入相应六孔板中，做好标记，此时最终六孔板的体积为 1 ml。4 ~ 6 h 后更换 37 °C 预热的 10% 完全培养基，每孔 2 ml。分别于 48 h 和 72 h 收上清，高速离心 10 min 或用 0.2 μm 过滤器过滤后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

3. 荧光素酶报告基因检测：(1) 感染前一天，消化并接种 293 细胞于 96 孔细胞培养皿，置于 5% CO₂、饱和湿度的 37 °C 培养箱内培养过夜。

(2) 待细胞密度达到 70% 时按总体积 20% 加入制备好的假病毒 (分别按 4 : 1、8 : 1、16 : 1、32 : 1 和 64 : 1 比例进行稀释)，感染 48 h 后，吸去培养基，用冰冷的 1 倍浓度 PBS 洗涤细胞 3 次，尽量将液体吸尽。

(3) 每个培养孔中加入 50 μl 预冷的细胞裂解液 (0.1 mol/L KH₂PO₄ 加 1 mmol/L DTT) 于 4 °C 或冰上放置 10 min 裂解细胞。然后每孔加入 ATP 与 Luciferin 混合反应液 (ATP 终浓度为 0.625 mmol/L，Luciferin 终浓度为 1 mg/ml) 共 100 μl。迅速混匀，在荧光素发光仪上读数。

结 果

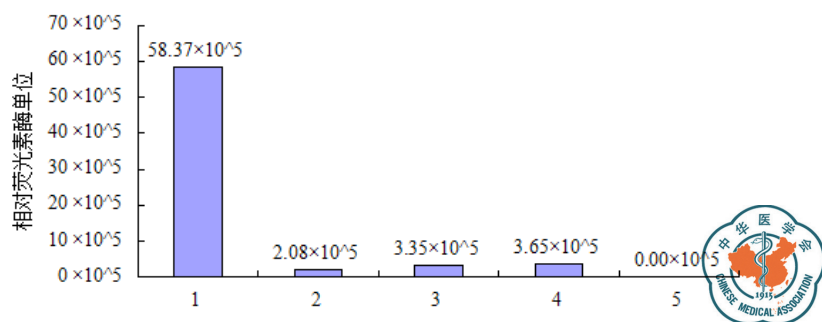
一、影响转染效率的因素

1. 细胞转染所用质粒浓度和纯度不同：采用康为世纪大提质粒试剂盒提取质粒、康为世纪小提质粒试剂盒提取质粒、磁珠法提取质粒。大提质粒的 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.8 ~ 2.0，且 A₂₆₀/A₂₃₀ > 2.0，浓度最高，纯度较高；离心柱法小提质粒和磁珠法提取的质粒浓度相对较低，纯度较低，见表 1。

2. 细胞转染所用转染试剂不同：得到的假病毒的滴度不同：图 1 可见应用 PEI 转染试剂的转染效率最高，得到的病毒滴度最高，报告基因荧光素酶的活性为 5.8×10^6 相对荧光素酶单位 (relative luciferase units, RLUs)，较磷酸钙转染试剂、Lipofectamine™ 2000 Reagent 和 TurboFect™ in vitro Transfection Reagent 均高出 10 倍以上，而比单独的

表 1 不同提取方式所得质粒的浓度及纯度

样本	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	浓度 (ng/μl)
康为世纪大提 pNL4-3 质粒	5.081	2.818	2.321	2.19	1.80	454
康为世纪大提 VSV-G 质粒	3.253	1.809	1.589	2.05	1.80	363
康为世纪小提 pNL4-3 质粒	2.853	1.611	1.578	1.81	1.77	143
康为世纪小提 VSV-G 质粒	1.172	0.700	0.885	1.32	1.67	160
磁珠法大提 pNL4-3 质粒	1.984	1.119	1.256	1.58	1.77	140
磁珠法大提 VSV-G 质粒	2.635	1.495	1.813	1.45	1.76	132



注: 1: PEI 转染试剂; 2: 磷酸钙转染试剂; 3: Lipofectamine™ 2000 Reagent; 4: TurboFect™ in vitro Transfection Reagent; 5: 阴性对照孔

图 1 不同转染试剂得到假病毒滴度的比较

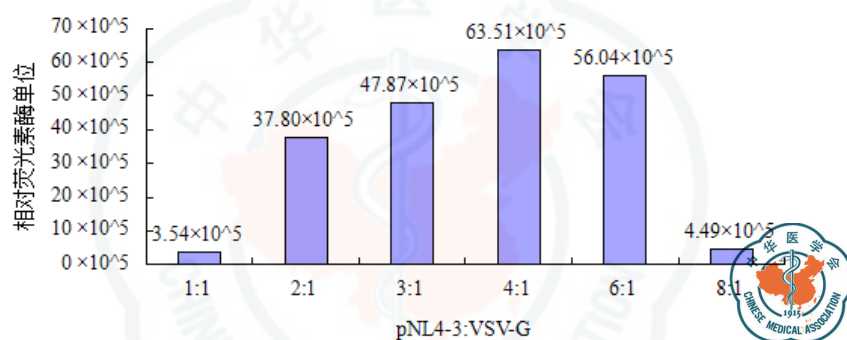


图 2 pNL4-3 : VSV-G 不同得到假病毒滴度的比较

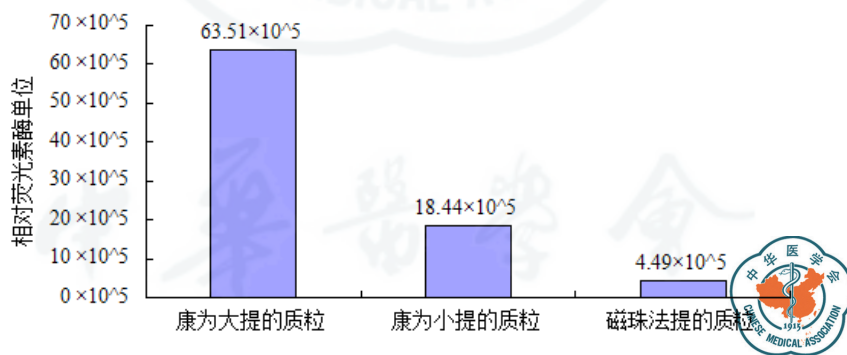


图 3 质粒不同得到假病毒滴度的比较

HIV-1 核心 (阴性对照) 高 1000 ~ 10 000 倍。

核心质粒 pNL4-3 与外壳糖蛋白 VSV-G 质粒的比例不同: 核心质粒 pNL4-3 与 VSV-G 的比例不同, 转染效率不同。由图 2 可以看出, 当 pNL4-3 : VSV-G 为 4 : 1 时, 转染效率最高, 从而假病毒滴度最高, 达 6.35×10^6 RLUs。

4. 转染选用的质粒提取方法不同: 假病毒的滴度不同: 由图 3 可见, 采用康为世纪试剂盒大提的质粒包装出的 HIV-1 假病毒滴度最高, 相对荧光素

酶单位为 6.35×10^6 RLUs; 磁珠法提取的质粒最低, 为 4.49×10^5 RLUs; 离心柱法提取的质粒介于二者之间, 为 1.84×10^6 RLUs。

二、感染细胞中报告基因的表达水平与加入病毒量的相关性

HIV-1 假病毒感染 293 细胞后, 细胞报告基因的表达与病毒滴度呈剂量依赖性关系。由图 4 可见, 用倍比稀释的病毒感染细胞 48 h 后, 检测荧光素酶报告基因, 可见病毒滴度越小, 受感染细胞表达的

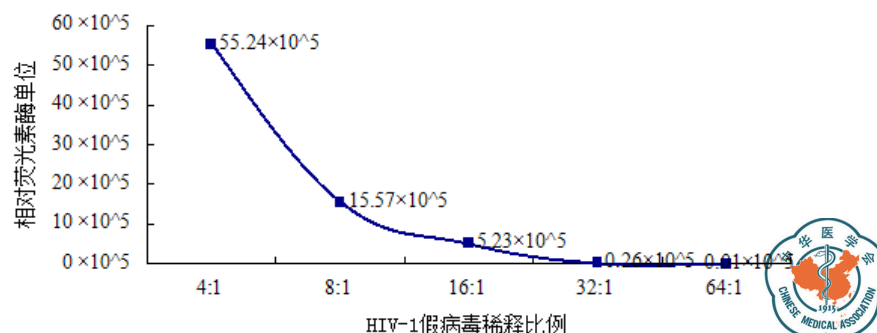


图4 细胞报告基因的表达水平与感染病毒量的相关性

荧光素酶越少,由此可以通过报告基因来反映病毒的表达情况。

讨 论

由于 HIV-1 核心基因 (pNL4-3Luc.R⁻E⁻) 敲除了 HIV-1 的外壳基因 (env), 因此, 其单独转染细胞后形成的 HIV-1 核心由于无外壳蛋白而不能感染宿主细胞^[4]。水泡性口膜炎病毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 受体广泛存在于多种细胞内^[5], 因此, 本研究将表达其外壳蛋白的质粒与 pNL4-3Luc.R⁻E⁻ (带有荧光素酶报告基因的 HIV-1 核心基因) 共转染 293 细胞 48 h 后, 细胞表达水泡性口膜炎病毒糖蛋白 (VSV-G) 和 HIV-1 核心, 即可被组装成为 HIV-1 假病毒并存在于细胞培养液中^[6], 收取细胞培养液并重新感染 293 细胞 48 h 后可以通过荧光素酶报告基因来反映 HIV-1 假病毒的滴度水平。

该假病毒的特点是: 对宿主细胞的选择性与水泡性口膜炎病毒一致, 因此, 可感染不同种属来源和组织来源的细胞系^[7]; VSV-G 与宿主细胞受体结合并协助 HIV-1 进入细胞, 在 HIV-1 核心进入细胞后则表现为 HIV-1 的特性, 进行逆转录、整合、过程^[8]; 由于 HIV-1 的基因组 (pNL4-3Luc.R⁻E⁻) 中敲除 env、vpr 和 nef 基因, 使得该假病毒颗粒仅能感染细胞 1 次并在感染的细胞内复制, 但不能再次进行包装和繁殖, 故可以在常规的实验室进行操作^[9], 对于研究操作人员更有安全性; 在 nef 基因的位置引入了报告基因 (荧光素酶基因或绿色荧光蛋白基因), 其表达水平与病毒滴度呈剂量依赖性关系, 因此, 测定报告基因的表达情况可以来反映 HIV-1 的复制水平^[10], 本研究采用的是萤火虫荧光素酶基因, 具有更加客观、更便于计算等优点。

而病毒包装有很多影响因素, 如细胞的状态、

转染时细胞的密度、质粒的浓度与纯度、核心质粒与包膜蛋白质粒的比例和转染试剂的不同等^[11]。本研究通过不同包装病毒方案进行比较, 发现用 PEI 转染试剂最合适, 本转染试剂价格较低、对细胞毒性较低、转染效率较高、可重复率较高、操作简单, 是表型耐药研究中比较完美的选择。核心质粒 pNL4-3 与包膜基因 VSV-G 的比例在 4 : 1 时转染效率最高。质粒的浓度和纯度对于转染效率也是至关重要的, 磁珠法大提质粒可能由于纯度不高且含有对细胞有毒性的物质而使得转染效率较低, 离心柱法小提质粒可能由于浓度和纯度不高使得转染效率较低。本研究结果显示, 被感染细胞中报告基因的表达水平与加入的病毒量呈线性依赖关系^[12], 因此, 被感染细胞中荧光素酶基因的表达水平可以体现 HIV-1 的复制水平, 并以此来研究药物抑制试验, 计算药物的半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, MIC₅₀)^[13], 在此研究基础上确定了最佳的假病毒包装方法学之后, 对以后的临床患者用药的耐药情况检测具有重要的价值。

参 考 文 献

- Jiang T, Kuhen KL, Wolff K, et al. Design synthesis and biological evaluations of novel oxindoles as HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Part I[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 6(8): 2105-2108.
- Seaman MS, Janes H, Hawkins N, et al. Tiered categorization of a diverse panel of HIV-1 env pseudoviruses for assessment of neutralizing antibodies[J]. J Virol, 2010, 84(3): 1439-1452.
- Kirschner M, Monrose V, Paluch M, et al. The production of cleaved, trimeric human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope glycoprotein vaccine antigens and infectious pseudoviruses using linear polyethylenimine as a transfection reagent[J]. Protein Expr Purif, 2006, 48(1): 61-68.
- Polonis VR, Brown BK, Borges AR, et al. Recent advances in the characterization of HIV-1 neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination[J]. Virology, 2008, 375(2): 315-320.
- DePolo NJ, Reed JD, Sheridan PL, et al. VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human

- serum[J]. *Mol Ther*,2000,2(3):218-222.
- 6 Simek MD, Rida W, Priddy FH, et al. Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm[J]. *J Virol*,2009,83(14):7337-7348.
- 7 Mañes S, del Real G, Lacalle RA, et al. Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection[J]. *EMBO Reports*,2000,1(2):190-196.
- 8 Münk C, Brandt SM, Lucero G, et al. A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2002,99(21):13843-13848.
- 9 del Real G, Jiménez-Baranda S, Mira E, et al. Statins inhibit HIV-1 infection by down-regulating Rho activity[J]. *J Exp Med*,2004,200(4):541-547.
- 10 Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, et al. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management [J]. *J Infect Dis*,2005,192(6):958-966.
- 11 Wu X, Yang ZY, Li Y, et al. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1[J]. *Science*,2010,329(5993):856-861.
- 12 Gazzard BG, Pozniak AL, Rosenbaum W, et al. An open-label assessment of TMC 125-a new, next-generation NNRTI, for 7 days in HIV-1 infected individuals with NNRTI resistance[J]. *AIDS*,2003,17(18):F49-F54.
- 13 Cane P, Chrystie I, Dunn D, et al. Time trends in primary resistance to HIV drugs in the United Kingdom: multicentre observational study[J]. *BMJ*,2005,331(7529):1368-1368.
- (收稿日期: 2013-09-26)
(本文编辑: 孙荣华)

徐树莹, 乔录新, 史宣玲, 等. HIV-1 假病毒包装方法的探讨 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8 (1): 12-16.

