

不同逆转录载体系统应用于水牛胎儿成纤维细胞 转基因的探索

邓彦飞, 刘真真, 李云芳, 刘庆友, 罗 婵, 杨素芳, 石德顺
(广西大学 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530005)

摘要:采用2种不同的逆转录病毒载体系统(pMX和pMSCV),构建携带绿色荧光蛋白(*EGFP*)基因的重组载体,探索能高效感染水牛胎儿成纤维细胞(BFFs)的病毒系统和感染方法. 结果发现,2种逆转录病毒系统包装出的重组病毒滴度都能达到 10^6 ,将pMX病毒系统生产的重组病毒经超速离心浓缩后,滴度可达到 10^7 ;2种重组病毒都能感染BFFs,但pMX系统比pMSCV系统更能有效地感染BFFs;通过对病毒的感染方式进行比较,发现使用新鲜病毒连续感染BFFs 2次(每次间隔12 h),或者经过超速离心浓缩后的病毒感染BFFs 1次,可以显著提高感染效率.

关键词:逆转录病毒载体; 转基因; 水牛; 胎儿成纤维细胞
中图分类号:S814.8 文献标志码:A 文章编号:1001-411X(2013)04-0558-06

Infection of Buffalo Fetal Fibroblasts by Two Retrovirus Systems

DENG Yanfei, LIU Zhenzhen, LI Yunfang, LIU Qingyou, LUO Chan, YANG Sufang, SHI Deshun
(State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources,
Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: After two retroviral systems with enhanced green fluorescent protein (*EGFP*) report gene were constructed in this study, the retroviral systems and the infection method suitable for buffalo fetal fibroblasts (BFFs) were investigated. The results revealed that the retrovirus titer of the two systems was 10^6 , and the titer of the pMX system could be up to 10^7 after ultracentrifugation concentration. The infection efficiency of pMX retroviral system was higher than that of the pMSCV retroviral system. Using the fresh retrovirus infected BFFs twice (12 h interval) or ultracentrifugal retrovirus infected BFFs once could improve the infection efficiency.

Key words: retroviral vector; transgene; buffalo; fetal fibroblast

水牛是我国南方重要的家畜品种之一,具有役用、肉用和奶用等多种用途. 水牛低繁殖力、低产奶量一直是传统方式进行育种改良的难题,采用先进的转基因克隆技术有望提高水牛的生产性能. 在转基因技术中,选用合适的方法达到基因转移和表达是生产转基因动物的第一步. 常用的转基因方法主要包括:氯化钙法、脂质体法、电转染法和病毒载体法等^[1]. 目前,常用于运载目的基因的病毒载体主要

包括逆转录病毒载体、慢病毒载体和腺病毒载体. 逆转录病毒载体法以其自身高效的转基因效率,最早被用于基因治疗、转基因研究和诱导多能干细胞(iP-SC)的研究中^[2-3]. 一些常用的逆转录病毒载体有pMSCV、pMIG、pMX和pLXSN等.
逆转录病毒载体转基因系统主要包括运载外源基因的载体,稳定转染到包装细胞的包装蛋白(gag-pol)和包膜质粒携带包膜蛋白(env)^[4]. 病毒的包膜

蛋白决定重组病毒的靶向性,包膜蛋白能否与靶细胞上的受体结合,是病毒载体实现基因转移成功与否的关键.不同物种或同一物种的不同类型细胞,因其细胞表面的受体不同,与不同逆转录病毒的结合能力也不相同.本研究选用2种不同的逆转录病毒包装体系:一种是由小鼠胚胎干细胞病毒(Murine embryonic stem cell virus, M-ESV)改造而来的逆转录病毒载体系统 pMSCV (pMSCV + PT67 包装细胞系),可以通过筛选稳定的产毒细胞系生产重组病毒.另一种是由莫洛尼小鼠白血病病毒(Moloney murine leukemia virus, M-MLV)改造而来的 pMX 逆转录病毒载体系统 (pMX + 包膜质粒 pCMV-VSVG + Platinum-GP 包装细胞系),通过病毒包装后由瞬时产毒细胞生产重组病毒.试验中,将携带 *EGFP* 基因的重组逆转录病毒载体 pMX-EGFP 和 pMSCV-EGFP,分别经过病毒包装后感染水牛胎儿成纤维细胞(BFFs),筛选出适用于 BFFs 的转基因逆转录病毒系统.在最适逆转录病毒系统下,探索能提高感染 BFFs 效率的感染方式.本研究将为逆转录病毒法转基因水牛的生产和水牛 iPSC 的研究提供技术依据.

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

3~5月龄水牛胎儿取自南宁市屠宰场, pMSCV 和 pMX 逆转录病毒载体、PT67/Platinum-GP 包装细胞由广西大学郑喜邦老师惠赠, NIH3T3 细胞和 293 细胞由广西大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室保存, pEGFP-C1 由广西大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室保存, DMEM 高糖基础液体培养基 (GIBCO), 青霉素、链霉素 (双抗, 100 ×, GIBCO), 胎牛血清 (FBS, Hyclone), 脂质体转染试剂 (LTX, Invitrogen), G418、促感染剂 Polybrene (Sigma), 胰酶 (Sigma), pMD18-T 克隆载体、*Taq* 酶、内切酶 (*EcoR* I 和 *Xho* I) 和 T4 连接酶 (TaKaRa), 质粒去内毒提取试剂盒 (QIAGEN), 倒置显微镜 (Nikon), 活细胞工作站荧光检测 (Nikon Ti), 0.22 和 0.45 μm 滤器 (Millipore), 引物合成和序列测定 (上海生工生物工程有限公司).

1.2 表达载体构建

以 pEGFP-C1 载体为模版, 采用带有 *EcoR* I (上游) 和 *Xho* I (下游) 酶切位点的特异性引物 (*EGFP* 5'-GAATTCATGCTGAGCAAGGGCGAGGAG, *EGFP* 3'-CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG) 扩增 *EGFP* 基因的编码区, 连接到 pMD18-T 上, 构成 pMD18T-EGFP 载体. 采用 *EcoR* I 和 *Xho* I 分别双酶切 pMD18T-EGFP、pMSCV 和 pMX 质粒. 将酶切获取的 *EGFP*、pMSCV 和 pMX 分别经过胶回收之后, 采用

T4 连接酶, 将 *EGFP* 分别连接到 pMSCV 和 pMX 上, 最终获取能表达 *EGFP* 的逆转录病毒载体 pMSCV-EGFP 和 pMX-EGFP.

1.3 细胞培养

水牛胎儿成纤维细胞的培养: 取水牛胎儿耳部的皮肤组织, PBS 洗 3 次, 体积分数为 75% 乙醇消毒 30 s, 再用 PBS 洗 3 次, 将组织块放入 1.5 mL 的 EP 管中, 剪碎, 用 PBS 冲洗到 50 mL 的离心管中, 加入 5~10 mL 胰酶 (2.5 mg/mL), 37 °C 条件消化 10~15 min (每隔 3~5 min 用移液管吹打 10 下), 加入 30 mL 左右的 DMEM 完全培养基 (DMEM + 体积分数 10% FBS), 混匀之后接种到 10 cm 培养皿, 放入 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 培养箱, 每隔 3~4 d 换液 1 次, 待细胞长到 80% 左右汇合度时, 胰酶消化传代或者液氮冻存备用. PT67 和 Platinum-GP 病毒包装细胞系、NIH3T3 和 293 病毒滴度测定细胞系均采用 DMEM + 体积分数 10% FBS 培养, 胰酶消化法传代, 液氮保存备用.

1.4 逆转录病毒包装

pMSCV-EGFP 稳定产毒细胞系的筛选: 将 PT67 细胞接种到 60 mm 细胞培养皿里, 待细胞到 60%~70% 的汇合度时进行细胞转染. 转染前 2 h 将培养基改换无血清无双抗的 DMEM (双无 DMEM) 3 mL. 采用脂质体 LTX + Plus 法进行转染: 取 1 mL 双无 DMEM, 加入 pMSCV-EGFP 质粒 9 μg 和 Plus 9 μL, 混匀, 室温孵育 5 min; 加入 LTX 12 μL, 混匀, 室温孵育 30 min 后, 均匀滴加到 PT67 细胞培养基中; 5 h 后改换 DMEM 完全培养基, 转染后 48 h 收集病毒上清液, 0.45 μm 的滤器过滤备用. 若需要建立稳定的产毒细胞系, 转染后 48 h 传代, 在培养基中添加 600 μg/mL 的 G418 进行筛选, 每隔 3 d 换液, 筛选 21 d 后克隆形成, 荧光显微镜下通过 *EGFP* 表达挑选克隆, 扩大培养后将细胞冻存. 将细胞复苏后 48 h 收集病毒上清液, 过滤备用.

pMX-EGFP 逆转录病毒的包装: 将 Platinum-GP 包装细胞接种到 60 mm 培养皿里. 转染步骤同使用脂质体 LTX 的转染方法. 其中采用 pMX-EGFP 和包膜质粒 pCMV-VSVG (水泡口炎病毒包膜蛋白) 共转 Platinum-GP 包装细胞, 按照 6 μg pMSCV-EGFP 质粒 + 3 μg pCMV-VSVG (质量比为 2:1) 的量进行. 转染 48 h 后, 即可收集病毒上清液, 0.45 μm 的滤器过滤备用.

1.5 逆转录病毒的浓缩

本试验采用超速离心的方法对病毒进行浓缩. 由于 pMSCV 和 pMX 逆转录病毒系统所使用的包膜蛋白不同 (分别是 10A1 和 VSV-G), 在超速离心力的作用下不会对 VSV-G 所包装出的病毒颗粒造成破坏^[5]. 因此, 本试验仅对 pMX 逆转录病毒系统所产

生的病毒上清液进行超速离心浓缩. 超速离心的参数是:12 000 r/min,4 ℃,120 min. 离心后,去掉上清液,加入 PBS 重悬底部的病毒颗粒,分装备用.

1.6 病毒滴度测定

采用经典的 LaSRT 病毒滴度测定法,通过 *EGFP* 标记的阳性细胞数量计算滴度. pMSCV-EGFP 逆转录病毒滴度测定:在滴度测定前 20 h 左右,接种 NIH3T3 细胞于 96 孔板,每 9 个孔为 1 组. 添加病毒上清液前,换成体积分数为 2% FBS 的 DMEM 培养基 90 μL,在第 1 个孔加入 10 μL 新鲜病毒上清液(病毒包装 48 h 后直接收集的病毒上清液),以后每个孔按体积比 10:1 倍比稀释. 感染 48 h 后,荧光显微镜下统计 *EGFP* 的阳性细胞数,以无 *EGFP* 表达的前一个孔作为计量孔. 计量孔 *EGFP* 阳性细胞数记为 *m*,按照以下公式计算病毒的滴度:病毒滴度 = $m \times (\text{计量孔相对于第 1 孔的稀释倍数} \times 1 \text{ IU}) / \text{第 1 孔加入病毒上清液的体积}$. 新鲜病毒上清液和超速离心浓缩后的 pMX-EGFP 逆转录病毒滴度测定:滴度测定步骤与 pMSCV-EGFP 逆转录病毒滴度测定相

同,用于滴度测定的细胞为 293 细胞.

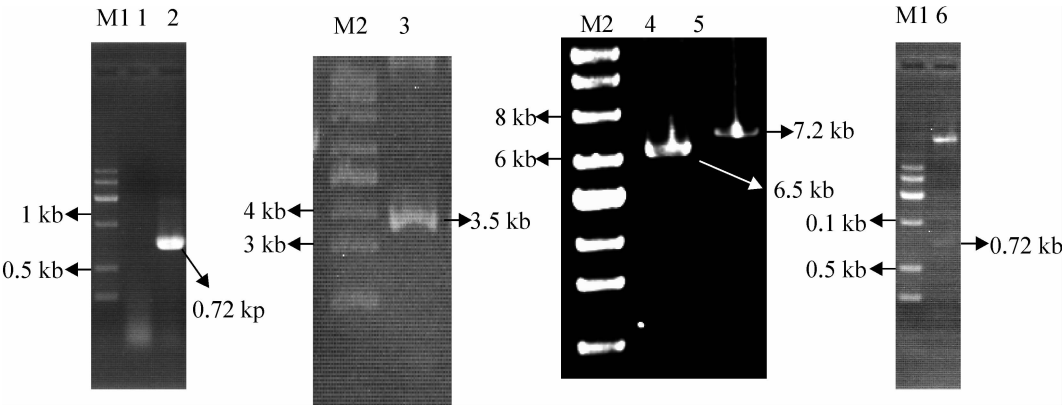
1.7 逆转录病毒感染 BFFs

将 BFFs 复苏后,传至第 3~5 代,感染时的细胞汇合度为 70% 左右,感染时添加病毒的感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 为 30~40,同时添加 6 μg/mL Polybrene 促进感染. 感染 BFFs 时分别按照以下几种方式进行:① pMSCV 逆转录病毒上清液感染 BFFs 1 次,感染 24 h;② pMSCV 稳定产毒细胞系的病毒上清液感染 BFFs 2 次,每次感染 12 h;③ pMX 逆转录病毒上清液感染 BFFs 1 次,感染 24 h;④ pMX 逆转录病毒上清液感染 BFFs 2 次,每次感染 12 h;⑤ 超速离心后的 pMX 逆转录病毒感染 BFFs 1 次,感染 24 h. 感染 24 h 后,改换为 DMEM 完全培养基,72 h 后在活细胞工作站荧光检测 *EGFP* 的表达情况.

2 结果与分析

2.1 构建逆转录病毒表达载体

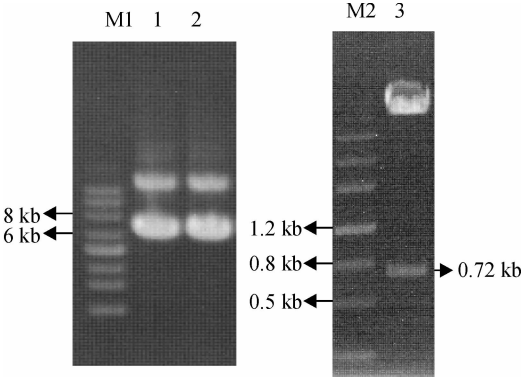
pMSCV-EGFP 和 pMX-EGFP 重组质粒的构建过程见图 1 和图 2.



M1: DNA marker VII; M2: Supercoiled DNA ladder marker; 1: 阴性对照; 2: *EGFP* 目的片段; 3: pMD18T-EGFP; 4: pMSCV 质粒; 5: pMSCV-EGFP 质粒; 6: pMSCV-EGFP 质粒双酶切鉴定.

图 1 pMSCV-EGFP 逆转录表达载体构建

Fig. 1 The construction of pMSCV-EGFP retrovirus vector



M1: Supercoiled DNA ladder marker; M2: DNA marker III; 1, 2: pMX-EGFP 质粒; 3: pMX-EGFP 质粒双酶切鉴定.

图 2 pMX-EGFP 逆转录表达载体的构建

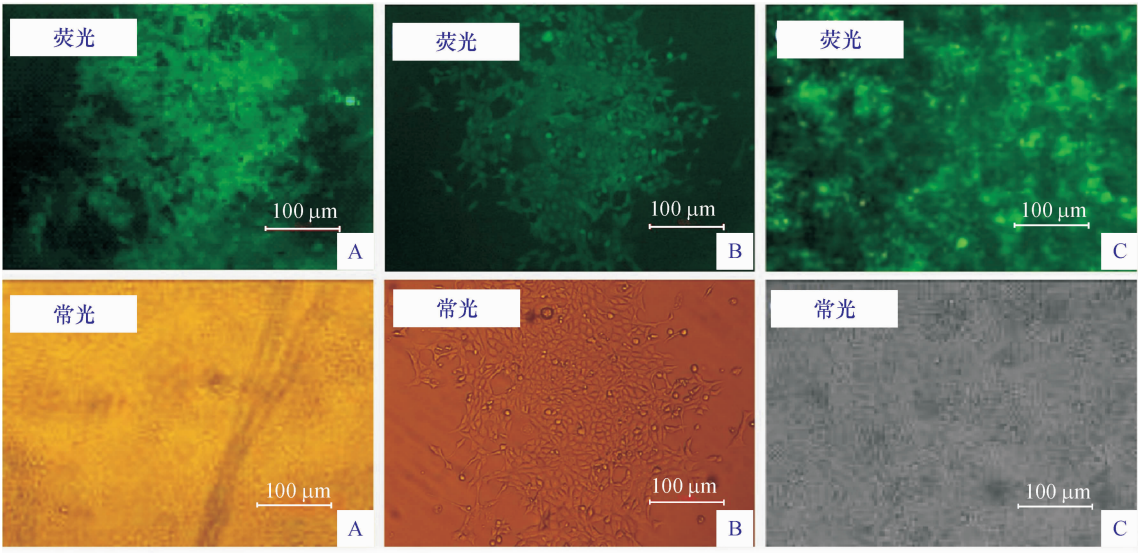
PCR 扩增得到 *EGFP* 的长度为 0.72 kb(图 1 - 泳道 2),将 *EGFP* 连接到 pMD18-T 载体上(图 1 - 泳道 3),经过 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后,T4 连接酶连接到经过相同双酶切的 pMSCV 和 pMX 载体上,组建 pMSCV-EGFP 和 pMX-EGFP 表达质粒(图 1 - 泳道 5 和图 2 - 泳道 1、泳道 2). 采用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对 2 个表达质粒进行双酶切鉴定后可以看到明显的目的条带(图 1 - 泳道 6 和图 2 - 泳道 3).

2.2 病毒的包装和阳性产毒细胞株的筛选

将 pMSCV-EGFP 转入包装细胞 PT67,48 h 后在荧光显微镜下可以观察到 *EGFP* 的表达(图 3A). 将细胞分盘培养后,添加 600 μg/mL 的 G418 进行筛

Fig. 2 The construction of pMX-EGFP retrovirus vector

选,获得能稳定生产逆转录病毒并表达 *EGFP* 细胞株(图 3B). 同样,pMX-EGFP 结合 pCMV-VSVG 共转 platinum-GP 细胞,48 h 后同样能检测到 *EGFP* 的表达(图 3C).



A: pMSCV 病毒包装; B: pMSCV 稳定产毒细胞株; C: pMX 病毒包装.

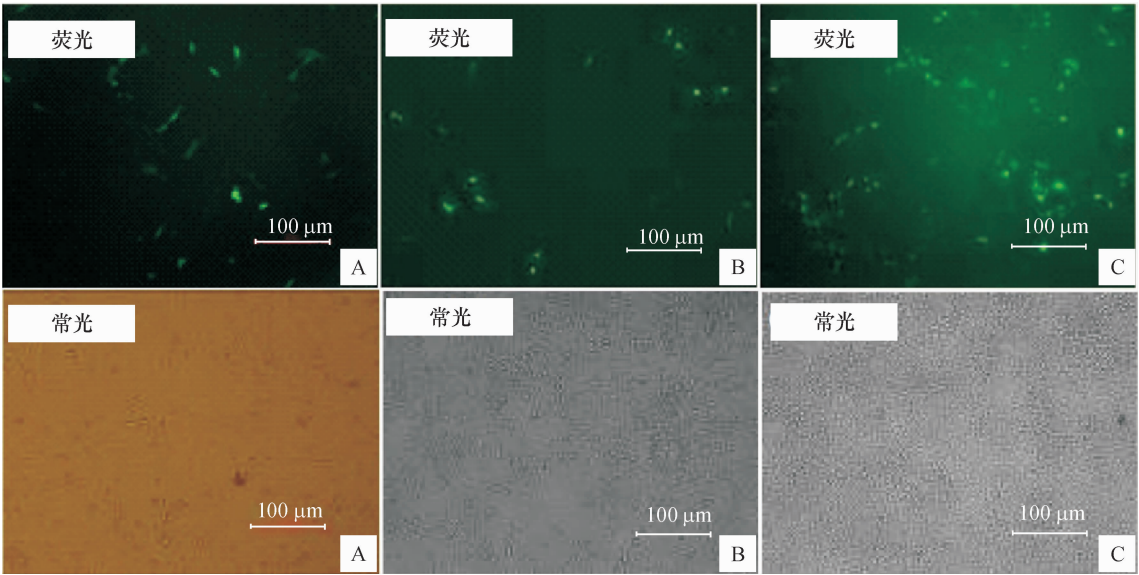
图3 病毒包装和产毒细胞系的荧光检测

Fig.3 EGFP expression in the packaging cells after virus packaging

2.3 逆转录病毒滴度

采用 NIH3T3 细胞和 293 细胞分别对 2 种逆转录病毒的滴度进行检测. 结果发现,pMSCV 和 pMX

逆转录系统包装出来的病毒滴度都可达 10^6 ;pMX 逆转录病毒系统所包装的病毒经过超速离心浓缩后可达 10^7 (图 4).



A: pMSCV 病毒,滴度 10^6 ; B: MX 新鲜病毒,滴度 10^6 ; C: pMX 超速离心病毒,滴度 10^7 .

图4 不同逆转录病毒的滴度测定

Fig.4 Virus titer test of different retroviruses

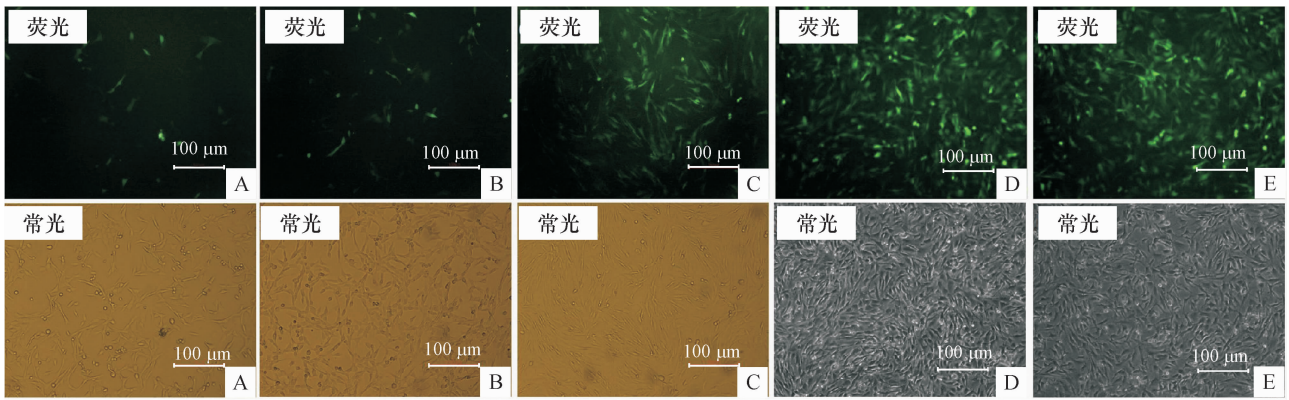
2.4 不同逆转录病毒系统感染 BFFs

筛选能有效感染 BFFs 的不同逆转录病毒系统和最佳感染方式,荧光显微镜下观察 BFFs 中 *EGFP* 的表达情况. 结果表明:采用 pMSCV-EGFP 病毒上清液感染 BFFs 1 次或者 2 次,荧光视野下只有少量的

BFFs 表达 *EGFP*,尤其是 1 次感染组只有零星的细胞表达 *EGFP*(如图 5A、5B);而采用 pMX-EGFP 病毒上清液感染 BFFs 1 次后可以看到大部分细胞呈 *EGFP* 阳性(如图 5C),当采用 2 次感染的方式或者超速离心浓缩后感染 BFFs 1 次可以显著地提高感染

效率(图 5D、5E). 因此, pMX 系统比 pMSCV 逆转录病毒系统更适合于感染 BFFs, 能有效地实现基因的

转移和表达. 同时, 增加病毒的感染次数和提高病毒的滴度可以显著提高逆转录病毒感染 BFFs 的效率.



A: pMSCV 1 次感染; B: pMSCV 2 次感染; C: pMX 1 次感染; D: pMX 2 次感染; E: pMX 超速离心后感染.

图 5 2 种逆转录病毒感染 BFFs 后荧光检测

Fig. 5 EGFP expression in BFFs after retrovirus infection

3 讨论

本研究主要探索能高效实现基因转移并在 BFFs 中表达的逆转录病毒载体系统. 构建能表达绿色荧光蛋白的 pMSCV-EGFP 和 pMX-EGFP 2 种逆转录病毒表达载体, 经过各自的病毒包装体系生产重组病毒, 感染 BFFs, 通过 EGFP 在 BFFs 中的表达情况, 确定能高效感染 BFFs 的逆转录病毒系统. 同时, 采用病毒 1 次感染、2 次感染和超速离心浓缩后感染等 3 种方式感染 BFFs, 探讨能高效感染 BFFs 的最佳感染方式. 结果表明: pMX 逆转录病毒系统感染 BFFs 的效率高于 pMSCV 逆转录病毒系统; pMX 逆转录病毒 2 次感染或者超速离心后感染的方式能更有效地感染 BFFs.

目前, 容易被逆转录病毒感染的靶细胞主要是人和小鼠的细胞, 病毒法在人和小鼠细胞的转基因操作中应用最多^[6]. 由于物种间和细胞间的差异, 其他物种的体细胞能否通过合适的逆转录病毒系统, 实现基因转移和表达, 有待进一步探索. 这主要是因为不同重组逆转录病毒系统生产的假病毒在感染靶细胞时具有靶向性, 感染不同靶细胞的效率不同. 逆转录病毒在携带目的基因进入靶细胞, 并实现表达的过程中, 受到诸多因素的影响, 如逆转录病毒载体的结构、包装细胞包装病毒的稳定性、包膜蛋白的靶向性、靶细胞表面的受体和靶细胞的生长状态等^[7]. 本研究使用 2 种经典的逆转录病毒系统中, pMSCV 的包装细胞为经过 NIH3T3 改造而来的 PT67 细胞, 整合了病毒包装所需的 gag-pol 和包膜蛋白 10A1^[8]; pMX 的包装细胞为经过 293 细胞改造而来

的 Platinum-GP 细胞, 整合了 gag-pol, 而包膜蛋白需要另外的包装质粒(本试验使用 pCMV-VSVG)提供^[7]. 结果表明, pMX 逆转录病毒系统所包装的逆转录病毒感染 BFFs 的效率显著高于 pMSCV 系统. 除了 BFFs 不易被感染之外^[9], 不同包装系统本身的组成也会影响感染效率: 如 pMX 载体骨架本身表达外源基因的能力高于 pMSCV; pMSCV 所使用的包装细胞 PT67 整合了全部逆转录病毒包装所需的元件, 长期的体外扩增可能会导致某个元件丢失或者重组, 影响包装病毒的能力; 2 个包装系统所使用的包膜蛋白不同, VSV-G 包装出的病毒为泛嗜性逆转录病毒 (Pantropic retrovirus), 能感染的靶细胞范围较广, 而 10A1 所包装出的病毒为兼嗜性逆转录病毒 (Amphotropic retrovirus), 感染靶细胞的范围相对较窄; 与之对应的是, 水牛体细胞上所存在的能结合不同病毒的受体和受体的量也会影响感染效率^[6].

在找到能感染 BFFs 的合适逆转录病毒包装系统之后, 病毒的滴度和不同的感染方式也会影响逆转录病毒的感染效率. 一个细胞所接触的病毒颗粒的数量, 即感染复数的大小, 是决定病毒能否结合靶细胞的重要因素. 通常采用对病毒进行超速离心浓缩, 或者增加感染次数来提高病毒的滴度和感染复数^[10]. 本研究对 pMX 逆转录病毒系统包装的病毒进行超速离心后感染 BFFs 1 次, 或者使用新鲜病毒感染 BFFs 2 次, 都能更有效地感染 BFFs. 这说明, 对于一些不易被感染的细胞, 可以通过提高病毒的滴度和增加感染次数来提高感染效率. 同时, 本试验中也添加了促感染试剂 Polybrene 对细胞进行处理, 消除细胞和病毒颗粒之间的电荷排斥, 促进感染效率.

值得说明的是,在同样的病毒滴度和感染方式下,pMSCV 系统不易感染 BFFs,在荧光显微镜下只有零星的几个细胞表达 *EGFP*. 通过荧光显微镜就能准确地判断 pMX 系统感染 BFFs 的效率显著高于 pMSCV 系统,因此,本试验没有采用流式细胞技术等统计感染效率. 对适合于水牛体细胞转基因操作的逆转录病毒系统进行探索,可以为转基因水牛生产和水牛 iPSCs 生产等提供研究基础.

参考文献:

[1] 刘中华,王华岩,乔宪凤,等. 转基因技术在动物遗传改良上的应用进展[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(2): 481-486.

[2] BUSHMAN F D. Retroviral integration and human gene therapy[J]. J Clin Invest, 2007, 117(8): 2083-2086.

[3] TAKAHASHI K,YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 2006, 126(4): 663-676.

[4] MILLER A D,ROSMAN G J. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression [J]. Biotechniques, 1989, 7(9): 980-990.

[5] BURNS J C, FRIEDMANN T, DRIEVER W, et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retrovi-

ral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(17): 8033-8037.

[6] ANNENKOV A E, DALY G M, CHERNAJOVSKY Y. Highly efficient gene transfer into antigen-specific primary mouse lymphocytes with replication-deficient retrovirus expressing the 10A1 envelope protein [J]. J Gene Med, 2002, 4(2): 133-140.

[7] KITAMURA T, KOSHINO Y, SHIBATA F, et al. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: Powerful tools in functional genomics [J]. Exp Hematol, 2003, 31(11): 1007-1014.

[8] MILLER A D,CHEN F. Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry [J]. J Virol, 1996, 70(8): 5564-5571.

[9] DENG Yanfei, LIU Qingyou, LUO Chan, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from buffalo (*Bubalus bubalis*) fetal fibroblasts with buffalo defined factors [J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(13): 2485-2494.

[10] 叶玲玲,许建,李世崇,等. 基于逆转录病毒载体的外源基因表达系统的评价和应用[J]. 生物工程学报, 2011, 27(8): 1225-1231.

【责任编辑 柴 焰】