

高滴度的含有目的基因 IL-4RA 的逆转录病毒的包装和浓缩

王桂兰¹, 刘翔腾¹, 鲁继荣²

(1. 中山市博爱医院儿内科, 广东 中山 528403; 2. 吉林大学第一医院儿内一科, 吉林 长春 130021)

[摘要] 目的 构建具有高效转染率且含有标记基因的携带白介素 4 受体拮抗剂 (IL-4RA) 基因的重组逆转录病毒载体 pLNC-IL-4RA。方法 将 IL-4RA 基因插入 pLNC-Laz 逆转录病毒载体获得重组的逆转录病毒表达载体 pLNC-IL-4RA, 重组的逆转录病毒表达载体 pLNC-IL-4RA 通过质脂体转染 PA317 细胞进行包装, PA317 抗性克隆经过 G418 的抗性筛选产生并扩增, 将含有病毒的 PA317 细胞培养液上清收集后转染 NIH3T3 细胞进行病毒滴度的测定。结果 扩增后的 G418 抗性克隆经过检测和滴度测定结果显示含有目的基因的逆转录病毒最高的病毒滴度为 1×10^4 CFU/mL。选择含有最高病毒滴度的 PA317 细胞抗性克隆进行基因组的提取和鉴定, 结果显示目的基因 IL-4RA 成功地整合到了宿主的基因组中。结论 含有目的基因 IL-4RA 的逆转录病毒载体经过 PA317 细胞包装后获得了较高的病毒滴度, 为下一步哮喘模型的基因治疗打下了基础。

[中国当代儿科杂志, 2009, 11(9): 761-764]

[关键词] 转染; 包装; 病毒滴度; pLNC-IL-4RA
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)09-0761-04

Packaging and concentrating of high titer of retrovirus containing IL-4RA

WANG Gui-Lan, LIU Xiang-Teng, LU Ji-Rong. Department of Pediatrics, Zhongshan Bo'ai Hospital, Zhongshan, Guangdong 528403, China (Email: wgldcc4685822@tom.com)

Abstract: Objective To construct a recombination retroviral expression vector pLNC-IL-4RA with high efficiency transfection and carrying a screening label. **Methods** IL-4RA was inserted into retroviral vector pLNC-Laz to get recombination retroviral expression vector pLNC-IL-4RA and then transfected into packaging cell line PA317 by liposome transfection. The transfected PA317 cells were obtained and amplified by G418 pressure screening. The cell culture supernatants containing viruses were harvested and the viral titer was determined by NIH3T3 cells infection. **Results** The G418 resistant clones were titrated and checked for the presence of replication virus. The results showed that the highest titer of viral supernatant was 1×10^4 CFU/mL. Genome DNA isolated from the cell clone of the highest titer showed the function gene, IL-4RA cDNA, had integrated into the genome of host cells verified by PCR. **Conclusions** The recombination retroviral vector pLNC-IL-4RA encoding IL-4RA after packaging PA317 cells have higher viral titer. This provides a basis for gene treatment of asthma. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(9): 761-764]

Key words: Transfection; Packaging; Viral titer; pLNC-IL-4RA

IL-4 与 IL-13 近年来被认为是哮喘发病的主要细胞因子, 它们通过共同的受体即 IL-4R α 链片段干预细胞的信号传导通路, 促进哮喘的发生。IL-4、IL-13-STAT6 途径在 B 细胞 IgE 型转换以及 IL-4、IL-13 相关炎症因子表达的过程中起到重要的作用^[1]。遗传突变研究已经证实 IL-4 的 C 末端 Arg121, Tyr124 或 Ser125 被替换后能产生高黏附性的 IL-4R 拮抗剂, 它可以与 B 细胞和 T 细胞结合, 但不产生细胞内的信号传导, 因此可以作为人 IL-4R 拮抗剂。相似的, 鼠 IL-4C 末端的 116 谷氨酸和 119 酪氨酸

突变成天冬氨酸后, 其产生的变异体 IL-4RA (Q11D/Y119D) 与鼠 IL-4R α 链有相似的绑定功能, 但却没有诱导信号传导的功能^[2]。这样我们就可以通过建立鼠的哮喘模型, 然后给予其鼠 IL-4RA (Q11D/Y119D) 的干预治疗, 从而以此来判断人的 IL-4 的双变异体 R121D/Y124D 基因转染对哮喘的干预作用。

现今已经有很多对小鼠哮喘模型呼吸道局部基因转染的研究报道。综合文献发现目前国内外大多利用腺病毒载体对哮喘模型进行呼吸道转染, 未见

[收稿日期] 2008-11-21; [修回日期] 2009-01-15
[作者简介] 王桂兰, 女, 博士, 副主任医师。主攻方向: 儿童哮喘。
[通讯作者] 鲁继荣, 男, 主任医师, 吉林大学第一医院儿内科, 邮编: 130021。

有用逆转录病毒载体对哮喘模型进行呼吸道转染的研究报道。

作为真核细胞基因转移的载体系统之一,重组逆转录病毒以其能够高效感染宿主细胞,稳定的整合到宿主基因组并传至后代细胞等优点而引人注目,同时,稳定、高效的病毒感染滴度也是使其在基因转移研究中得到更好应用的重要保证。本研究旨在建立携带鼠 IL-4RA (Q11D/Y119D) 基因的、具有理想感染滴度的、稳定的重组逆转录病毒载体系统,从而为使用该系统进行基因转染研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

含新霉素磷酸转移酶 II (NeroR) 和 IL-4RA 目的基因片断的重组逆转录病毒载体在中国军事医学科学院 11 所构建;双嗜性包装细胞系 PA317 由中国军事医学科学院 11 所基因工程研究室扈荣良主任惠赠;小鼠成纤维细胞系 NIH3T3 细胞系由哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室孟庆文博士惠赠。LIPOFECTAMINETM Reagent 购自 Invitrogen 公司,DMEM 培养基、G418 购自 SIGMA 公司;工具酶,一般试剂及培养基均购自 Promega 公司和 Taraka 公司。

1.2 方法

1.2.1 脂质体介导 pLNC-IL-4RA 转染 PA317 细胞
质粒 DNA 经苯酚/氯仿反复抽提或玻璃粉纯化,OD260/OD280 = 1.8,用前过滤除菌。

取 50 mL 细胞培养瓶中旺盛生长期的 PA317 细胞 1:2 分传,37℃,5% CO₂ 条件下,培养 18 ~ 24 h,待细胞 75% 汇片时,准备转染。

脂质体/DNA 复合物的制备在 500 μL 无菌 Eppendorf 管中配液。A 液:将 2 ~ 3 μg DNA 稀释于 250 μL 无血清无双抗的 DMEM 营养液中。B 液:将 30 μL Lipofectamine 稀释于 250 μL 无双抗无血清的 DMEM 营养液中。混合 AB 两液,轻微震荡,充分混匀后,室温放置 30 min,此时如果溶液浑浊,不影响转染。如果出现沉淀,则停止转染。

在 DNA 和 Lipofectamine 作用过程中,将 75% 汇片的细胞用无血清无双抗的 DMEM 营养液清洗 3 次,加入 2 mL 无血清无双抗的 DMEM 营养液。将作用完毕的 DNA/Lipofectamine 混合物,加入到细胞上清中,轻晃摇匀,37℃,5% CO₂ 培养 5 ~ 12 h 后,换入 5% 血清的 DMEM 营养液。

1.2.2 G418 抗性细胞克隆的筛选 转染后的

PA317 细胞在 37℃,5% CO₂ 培养 36 h 后,将细胞按 1:5,1:10,1:15,1:20 分传入 6 孔板中,12 h 后,待细胞贴壁后,加入大于最小致死剂量 G418 的 DMEM 营养液继续培养。由于 G418 对真核生物与原核生物细胞均具有毒性作用,增殖中的细胞对 G418 更为敏感。转染后的细胞根据生长情况,每 3 d 换一次液,随着时间的延长,死亡细胞增加,大约 10 d,可见细胞克隆。同时设阴性对照(未进行转染的 PA317 细胞)以及空白对照(单纯的 DMEM 营养液)。

1.2.3 产毒细胞的克隆 将 96 孔板中每孔加入 10% 血清的 DMEM 营养液,把长出细胞克隆的 6 孔板,在灯光下观察,可见单个细胞克隆,呈明显的不透明状,用记号笔画圈标记克隆的位置,在超净工作台上用无菌枪头挑取细胞克隆,打入 96 孔板,长满后,依次传入 24 孔板,6 孔板,30 mL 细胞培养瓶,50 mL 细胞培养瓶,逐步扩大培养,扩大培养时,G418 的浓度为 300 μg/mL,血清添加量为 10%。

1.2.4 产毒细胞上清的收取及浓缩 将得到的 G418 抗性克隆在含有 G418 的选择培养液中扩大培养,收集病毒前 1 d 将阳性细胞 1:2 分传,待产毒细胞生长至 50% ~ 90% 汇片时,弃去培养液,加入半量的、新鲜的 10% 的培养液,第 2 天收取培养上清。差速离心浓缩病毒上清,具体步骤为:4℃,10 000 r/min,离心 15 min。弃沉淀,上清 4℃ 40 000 r/min,离心 2 h。离心管置于冰浴条件下,1% 体积的 10% DMEM 营养液重悬沉淀,重悬时,使用同一吸管以避免损失,约 15 min 吹打一次,避免产生气泡(气泡的产生会使病毒蛋白变性)。

1.2.5 克隆细胞株基因组的提取以及目的基因的 PCR 扩增 克隆细胞株基因组的提取参照文献 [3]。引物的设计为了保证 IL-4RA 的 cDNA 全部整合至 PA317 细胞基因组中,采用突变引物,同时设阴性对照、阳性对照和空白对照。阴性对照为未被转染的 PA317 细胞;空白对照为无论是含有目的基因还是不含目的基因的 PA317 细胞基因组均不存在。

IL-4RA-F: 5'-GAATTCATGGGTCTCAAC-CCCCAGCT-3'

IL-4RA-R: 5'-TCGCGACTACGAGTCATC-CATGTCCATGAT-3'

1.2.6 IL-4RA 重组逆转录病毒的滴度测定 在进行滴度测定的前一天,将 NIH3T3 细胞以 1 × 10⁵ 传代于 6 孔板中,每孔 2 mL 待细胞生长至 50% ~ 80% 汇片时,弃掉原培养液,加入 1 mL 含有 10 μL

和 100 μL 病毒上清的新鲜培养液,37℃下温浴 4 h,然后再加入新鲜培养液,3 mL 继续培养 48 h,将细胞 1:10 传代于新的 6 孔板中,加 G418(500 μg/mL)筛选 10 天,记数所形成的克隆数,按如下公式计算滴度:G418 抗性 CFU/ml = 克隆数/病毒原液的体积 (ml) × 稀释度^[4]。

1.2.7 高滴度重组病毒的筛选 比较已知滴度的重组逆转录病毒,筛选出滴度最高的重组病毒-80℃保存,用于下一步实验研究。

2 结果

2.1 PA317 细胞抗性克隆形成

将重组逆转录病毒载体 pLNC-IL-4RA 转染正常生长的 PA317 细胞,在 300 μg/mL G418 筛选条件下大部分细胞死亡,被成功转染的细胞获得 G418 抗性存活而形成克隆,未被转染的 PA317 细胞以及空白对照组上述条件下 10 d 后未见细胞克隆形成。

2.2 PCR 扩增结果

PA317 细胞抗性克隆扩大培养后提取细胞株基因组,利用 IL-4RA 特异性突变引物进行 PCR 扩增得到约 423 bp 的条带,与目的基因 IL-4RA 片断大小相等,而未转染的 PA317 细胞和空白对照中没有扩增出 423 bp 大小的片断,说明扩增具有特异性(图 1)。

2.3 重组病毒感染滴度测定

收获的重组病毒感染正常生长的 NIH3T3 细胞后,在 G418(500 μg/mL)筛选条件下大部分细胞死亡,被病毒感染的细胞获得 G418 抗性存活形成克隆,图 2 为 NIH3T3 细胞抗性克隆染色后的结果。

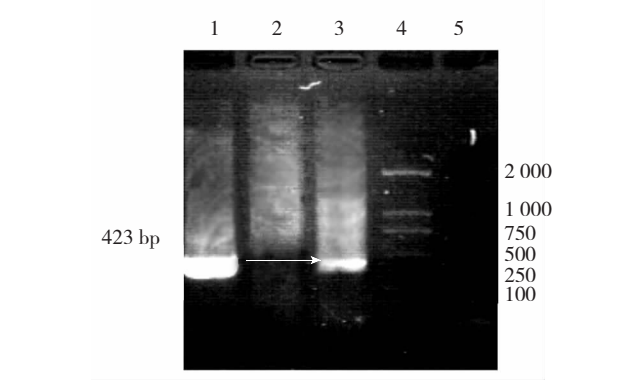


图 1 克隆细胞株基因组中目的基因 IL-4RA 的 PCR 结果 被转染成功的 PA317 细胞在 PCR 扩增后可见到 423 bp 的目的条带(箭头所指),而未被转染的 PA317 细胞则未见到目的条带,空白对照组亦未见到目的条带。1:阳性对照;2:阴性对照;3:IL-4RA;4:Marker DL2000;5:空白对照

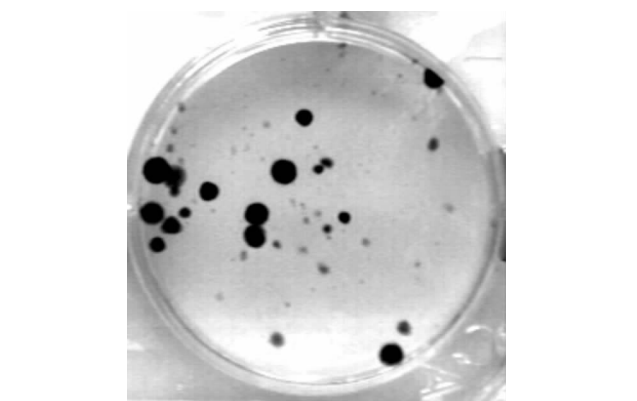


图 2 重组病毒感染 NIH3T3 细胞后 G418 筛选出的克隆 P4 细胞株感染 NIH3T3 细胞后经 G418 筛选出的抗性克隆。

重组逆转录病毒载体转染包装细胞后获得了整合有 IL-4RA 的 5 株产毒细胞 P1、P2、P3、P4、P5。重组逆转录病毒在 NIH3T3 细胞上测定感染滴度,其中 P4 细胞株产毒滴度最高为 1×10^4 CFU/mL。

3 讨论

基因治疗是将特定的基因转入患者特定的靶细胞以最终达到治疗基因紊乱性疾病的治疗方法。随着基因治疗的深入开展,建立安全高效的基因转移载体系统成为至关重要的研究课题。目前应用较多的逆转录病毒、腺病毒、脂质体等载体,虽已取得了一定的实验结果,但都存在一些问题,不同程度地阻碍和延缓了基因治疗的进程。随着基因重组技术及包装细胞系的不断发展,重组逆转录病毒载体已经克服了传统载体的诸多弊端^[5,6],并初步用于临床试验^[7],这无疑是实现安全高效基因转移的一次新的飞跃,能否真正做到临床广泛应用,基础研究的突破势在必行。

本研究选用的包装细胞系 PA317,属于第 2 代包装细胞系,含有逆转录病毒 PAM3 基因组,除 ψ 信号缺失外,5'LTR 部分缺失,3'LTR 被 SV40 的 polyA 信号取代,这种包装结构与载体结构至少要经过两次独立的重组才能形成有复制能力的野生型病毒,安全性高,而且 PAM3 的 env 来自 4070A 双嗜性逆转录病毒,可产生双嗜性病毒颗粒,从而扩大了病毒的寄主范围^[8]。

IL-4RA 是 IL-4 和 IL-13 的拮抗剂,IL-4 和 IL-13 在哮喘发病的始动环节起重要的作用^[9],在哮喘发病的始动环节拮抗 IL-4 和 IL-13,有望从根本上控制哮喘的发作,本试验采用的逆转录病毒载体有能够整合到宿主细胞基因组并持续表达目的蛋白的特

点,所以其用于人类基因转染的治疗有着可观的前景,本试验所得到的含有目的片断的逆转录病毒可以进行下一步哮喘模型的基因干预研究,从而为人类哮喘的基因治疗提供了实验基础。

[参 考 文 献]

[1] Foster PS, Webb DC, Yang M, Herbert C, Kumar RK. Dissociation of T helper type 2 cytokine-dependent airway lesions from signal transducer and activator of transcription 6 signalling in experimental chronic asthma[J]. Clin Exp Allergy, 2003, 33(5):688-695.

[2] Grunewald SM, Werthmann A. An antagonistic IL-4 mutant prevents type I allergy in the mouse; inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system completely abrogates humoral immune response to allergen and development of allergic symptoms in vivo[J]. J Immunol, 1998, 160(8):4004-4009.

[3] 萨姆布鲁克 J, 霍里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京:科学出版社, 1995, 465-467.

[4] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 RE. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京:科学出版社, 1998, 319-320.

[5] Meyer F, Finer M. Gene therapy: progress and challenges[J]. Cell Mol Biol, 2001, 47(8):1277-1294.

[6] 张蟬, 邵艳军. 基因治疗的病毒载体系统[J]. 生物技术, 2007, 17(1):90-93.

[7] Rainov NG, Kramm CM, Banning U, Rieman D, Holzhausen HJ, Heidecke V, et al. Immune response induced by retrovirus-mediated HSV-tk/GCV pharmacogene therapy in patients with glioblastoma multiforme[J]. Gene Ther, 2000, 7(21):1853-1858.

[8] Miller AD, Rossman GJ. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression[J]. Biotechniques, 1989, 7(9):980-990.

[9] 姚泽忠. 细胞因子网络与支气管哮喘[J]. 国外医学呼吸系统分册, 2001, 21(3):137-139.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

2010 儿科高级研修班招生简章

上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心是上海市人民政府与美国世界健康基金会 (Project HOPE) 的合作建设项目,是一所集医疗、科研和教学于一体的儿科综合性医院。医院技术力量雄厚,设施齐全,拥有国家和市级重点学科,如小儿心血管中心、血液肿瘤科和儿童保健科。上海儿童医学中心自建院起,始终秉承“培训—培训者”(Training-Trainer)理念,为全国各地尤其是贫困和欠发达地区培训了大批儿科方面的骨干型人才,并通过他们又培养了一大批儿科专业人士,从而提高和推动当地的儿童医疗健康事业提供了最有力的支持,儿科高级研修班就是这一理念的最佳体现。

招生地区:不限

要求:① 进修医生:本科毕业;二级医院需工作 5 年以上;三级医院需工作 4 年以上。② 进修护士:中专以上学历;二级医院需工作 5 年以上;三级医院需工作 3 年以上。

培训科目:招生专业:急救与 PICU 科、新生儿与 NICU 科、儿内科(包括,消化、呼吸、肾脏、风湿免疫、神经、内分泌)、血液肿瘤科、小儿外科、小儿骨科、麻醉科、放射科、儿保科。

培训时间:2010 年 3 月——2011 年 2 月(一年)

奖学金:被录取者均属获得奖学金者,将享有免收进修费、住宿费并给予生活津贴(医生 10000 元/年,护士 8000 元/年)。

报名办法:请报名者将个人简历、进修科目、一位正高级职称医师推荐信、盖有单位公章的介绍信于 2009 年 11 月 30 日前寄联系人。面试时间和面试地点另行通知。

联系地址:上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心;上海东方路 1678 号(200127)

电话:021-38626161 × 3190/3082 传真:021-50904612

请从医院网站索取申请表,网址:www.scmc.com.cn

联系人:上海儿童医学中心-科教部 杨子贵,陆梅华

上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心科教部

2009 年 8 月