

应用荧光实时定量 PCR 方法检测重组慢病毒滴度及其感染效率

马海燕, 方彧聃, 张敬之*

(上海交通大学 医学院, 上海市儿童医院上海市医学遗传研究所, 中国上海 200040)

摘要: 慢病毒载体已经广泛应用于动物模型中基因治疗的研究和转基因动物的制备, 而准确地测定重组慢病毒的滴度和感染效率是其关键步骤. 通过荧光实时定量 PCR 的方法定量分析重组慢病毒的颗粒数以及病毒的活性滴度, 并以 GFP 报告基因的方法作为对照来验证定量 PCR 方法的准确性. 研究结果显示, 应用荧光实时定量 PCR 法与 GFP 报告基因法测定得到的病毒活性滴度成正相关, 而且前者可以更加准确地测定病毒滴度和病毒感染效率.

关键词: 慢病毒载体; 荧光实时定量 PCR; 病毒滴度; 整合拷贝数; 感染效率

中图分类号: Q331

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2009)05-0394-05

A Novel Method for the Determination of Recombinant Lentiviral Titer and Infectivity by qRT-PCR

MA Hai-yan, FANG Yu-dan, ZHANG Jing-zhi*

(School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai Children's Hospital, Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai 200040, China)

Abstract: Lentiviral vector is being widely used in the study of gene therapy in animal models and in generating transgenic animals. However, determination of lentiviral particles and their infectivity is essential before their being used. Such a requirement can be accurately achieved by qRT-PCR. Referred by infectious units got from GFP reporter assay, it showed a positive correlation between the two approaches. A reliable, accurate and rapid method is therefore established for the determination of the recombinant lentiviral titer and the infectivity.

Key words: lentiviral vector; qRT-PCR; viral titer; integration copy number; infectivity

(Life Science Research, 2009, 13(5): 394~398)

慢病毒载体是目前应用最广泛的基因运载工具之一, 在基因治疗研究和转基因动物的制备中已显示出其广阔的应用前景. 慢病毒载体是一种反转录病毒载体, 其中以人类免疫缺陷性病毒(HIV-1)载体研究最为深入. 与传统的小鼠白血病病毒载体(MuLV)偏爱整合入基因 5'端相比,

慢病毒载体均匀分布于基因组内, 从而降低了其激活原癌基因的几率^[1-3]. 重组慢病毒载体既能感染分裂期细胞, 也能感染非分裂期细胞^[4]. 它可携带较大的外源基因(约 8 kb 左右)并稳定整合和表达^[5], 加之其诱发的宿主免疫反应相对较小^[6], 使得重组慢病毒载体具有较为广阔的应用

收稿日期: 2009-03-18; 修回日期: 2009-05-16

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2007AA021206); 国家自然科学基金资助项目(30870943); 上海市自然科学基金资助项目(08ZR1412100)

作者简介: 马海燕(1983-), 女, 山东淄博人, 硕士研究生, 主要从事病毒载体在转基因动物制备中的应用研究; *通讯作者: 张敬之(1959-), 男, 上海人, 上海交通大学医学遗传研究所副教授, 博士, 主要从事分子病毒学研究, Tel: 021-62472308, E-mail: jzhang38@hotmail.com.

前景.

无论何种目的使用重组慢病毒,都有必要准确地检测病毒滴度.目前,重组慢病毒滴度的检测方法有:依赖于报告基因的 GFP 荧光检测法、检测慢病毒外壳蛋白 p24 的抗原-抗体法(ELISA 法)和检测其逆转录酶活性的酶学法等.这些方法多存在耗时、费力、检测成本较高、病毒用量多、不适于非报告基因载体等缺点.所以,建立一种快速、简便、准确的慢病毒滴度检测方法,是非常有必要的.

在此,我们介绍一种利用实时定量 PCR 测定重组慢病毒滴度的方法.该方法通过在载体的长末端重复序列区(LTR)设计定量引物,利用荧光实时定量 PCR 测定重组慢病毒中 LTR 拷贝数来测定病毒颗粒数和有效感染的病毒颗粒数.通过与 GFP 报告基因测定法的比较验证,证明该测定方法准确可靠.并且,通过慢病毒颗粒数与实际有活力病毒滴度的比较,可以计算得到重组慢病毒感染效率.多次重复实验证明,该方法具有快速、准确的优点,非常适用于非报告基因载体的病毒滴度及其感染效率的测定.

1 材料与方法

1.1 材料

组成慢病毒载体的 3 个质粒 FUGW (即含 *eGFP* 基因的转基因质粒), Δ 8.9(编码结构和非结构蛋白基因质粒)和 VSVG(外壳蛋白质粒)由美国 Marine Medical Center Research Institute 王征宇博士惠赠;293T 细胞(人胚肾细胞)购自美国 ATCC (American Type Culture Collection)细胞库;ProFection 购自 Promega 公司;胎牛血清(FBS)、培养液和 Hanks 液及 Salmon Sperm DNA 购自 Gibco BRL;STE 配方为 10 mmol/L Tris pH 7.6, 1 mmol/L EDTA pH 8.0, 0.1 mol/L NaCl.

1.2 FUGW 病毒的制备

当 293T 细胞长至 70% 饱和度时,用磷酸钙法转染,按照 Promega 公司的 ProFection Kit 说明书操作,其中 FUGW 15 μ g, Δ 8.9 10 μ g, VSVG 7.5 μ g, 转染 6 h 后换完全培养液(含 10% FBS 的 DMEM),并在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养约 60 h. 上述病毒培养上清液经离心、过滤后,50 000 g 超速离心 1.5 h 后弃上清,在病毒沉淀上加少量 Hanks 液,获得病毒浓缩液,-80 $^{\circ}$ C 保存待用.

1.3 病毒 RNA 的提取

取 2 μ L 病毒浓缩液进行 DNase 处理,体系中加入 5 μ L 10 \times DNase I Buffer、2 μ L DNase I (5 U/ μ L, Takara Bio Inc, Shiga, Japan)、2 μ L RNase inhibitor (Takara Bio Inc., Shiga, Japan), 用 DEPC 水定容至 50 μ L 反应体系,37 $^{\circ}$ C 45 min. DNase 处理后的混合液,加入 350 μ L STE、20 μ L 10% SDS 和 5 μ L 蛋白酶 K (20 g/L, AMRESCO, Solon, OH), 56 $^{\circ}$ C 15 min 水解. 最后等体积酚、氯仿抽提,两倍体积无水乙醇沉淀,冻干后,20 μ L DEPC 水溶解.

1.4 反转录反应

病毒 RNA 在酚/氯仿抽提、无水乙醇沉淀前,需经过 DNase I 处理,以避免 DNA 污染.根据产品说明书,取 1 μ g RNA、20 pmol RT-PCR 下游引物(5'-GAGAGCTCCAGGCTCAGATC-3')、2 μ L 5 \times RT Buffer、1 μ L MLV 酶(Takara Bio Inc, Shiga, Japan)、水补足至 10 μ L 体系,37 $^{\circ}$ C 1 h.

1.5 实时定量 PCR 分析病毒颗粒数

为了测定制备的慢病毒的病毒颗粒数,应用实时定量 PCR 测定病毒 LTR 拷贝数.其中,引物和探针序列见表 1. 在反应体系中,引物 900 nmol/L, 探针 250 nmol/L, 2.5 μ L 10 \times Ex-Buffer, 15 μ mol Mg²⁺, 2.5 μ mol dNTP, 1 U ExTaqE, 5 μ L 样本,总反应体系为 25 μ L 体积.实时定量 PCR 仪 (Corbett Life Science RG-3000, Sidney, Australia)上反应:95 $^{\circ}$ C 5 min 变性,95 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环,59 $^{\circ}$ C 520 nm 处检测荧光值.软件分析荧光检测数据.

表 1 实时定量 PCR 引物及探针序列
Table 1 The sequences of primer and probe of Real-time PCR

Primer	Sequences
LTR-F	5'-ACAGCCGCTAGCATTTCAT-3'
LTR-P	5'-GAGAGCTCCAGGCTCAGATC-3'
LTR-Probe	5'-ACATGGCCCCGAGAGCTGCATCC-3'

1.6 不同剂量 FUGW 病毒感染 293T 细胞

取病毒浓缩液,按 10 倍稀释法,取 0.1、0.01、0.001 μ L 病毒浓缩液(即用实时定量 PCR 检测法,定量慢病毒颗粒数为:6.32 \times 10⁷、6.32 \times 10⁶、6.32 \times 10⁵),用含有 8 mg/L Polybrene 促感染(Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, MO)且不含血清的培养液逐级稀释后,感染 293T 细胞(1.5 \times 10⁶/孔),37 $^{\circ}$ C 2 h. 然后,加入完全培养液培养细胞 2 d,

至荧光显微镜下观测绿色荧光蛋白表达情况。

1.7 病毒感染细胞内 DNA 的提取

细胞经 2 d 培养后,用胰酶将细胞消化,收集入 1.5 mL EP tube 中,200 g,5 min,将细胞沉淀下来。加入 200 μ L STE、20 μ L 10% SDS、10 μ L 蛋白酶 K,混匀后,37 $^{\circ}$ C 4 h。加入等体积酚,振荡混匀,15 000 g,离心 12 min;吸取上清,加入等体积的氯仿,振荡混匀,15 000 g 离心 6 min;吸取上清,加入 1/10 体积 3 mol/mL NaAc,两倍体积的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 沉淀 1 h 以上;混合液 15 000 g,4 $^{\circ}$ C 离心 20 min;弃上清,沉淀风干,100 μ L TE 溶解。

1.8 实时定量 PCR 测定重组载体整合拷贝数

为了测定被感染的 293T 细胞内重组载体的整合,用实时定量 PCR 检测上述被抽提的基因组 DNA 中 LTR 的拷贝数。具体方法同 1.5。

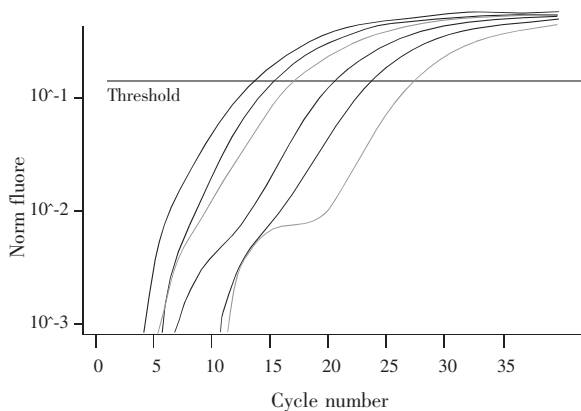


图 1 定量 PCR 反应荧光强度曲线

Fig.1 Fluorescence intensity curve of Real-time PCR

2.2 实时定量 PCR 检测病毒载体整合拷贝数,计算病毒滴度

取病毒浓缩液,按照 10 倍稀释,分别取 0.1、0.01、0.001 μ L 病毒浓缩液感染 1.5×10^6 293T 细胞,感染 2 d 后,应用实时定量 PCR 检测不同病毒量感染的细胞 DNA 中 LTR 整合拷贝数,结果显示,0.1、0.01、0.001 μ L 病毒感染的细胞中外源基因整合的拷贝数分别为 5.32×10^6 、 9.28×10^5 、 4.48×10^4 。定量 PCR 的系统参数为: $R = 0.99$, $R^2 = 0.99$, Efficiency = 1.01,各参数值表明实验检测的准确性和可信性。

当一个病毒感染细胞并将外源基因整合入基因组后,由于其末端发生跳跃过程,使得每条 DNA 单链上含有两个完整的 LTR,因此,在被整合的细

2 结果

2.1 实时定量 PCR 检测病毒颗粒数

本实验中,定量 PCR 引物设计在 LTR 区,由于一个慢病毒含有两个病毒基因拷贝,因此,在计算病毒颗粒数时,LTR 拷贝数除以 2 即为病毒颗粒数。应用实时定量 PCR 检测到病毒 LTR 拷贝数为 1.26×10^{12} /mL,定量 PCR 反应荧光强度曲线及标准曲线见图 1、图 2。通过计算,得到病毒颗粒数为 6.32×10^{11} /mL。

此时计算得到的病毒颗粒数为所有收集到的病毒颗粒总数,既包括有感染效力的病毒,也包括无感染效力的病毒。为了测定制备得到的病毒实际滴度(即单位体积内有感染效力的病毒颗粒数),我们将不同剂量病毒感染细胞,分别用 GFP 报告基因法和定量 PCR 法测定病毒滴度。

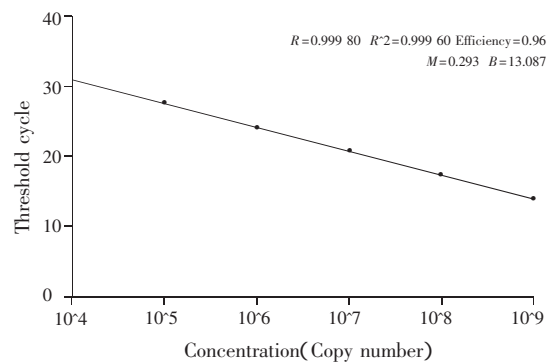


图 2 定量 PCR 标准曲线

Fig.2 Standard curve of Real-time PCR

胞基因组,一个慢病毒颗粒=LTR 拷贝数/4。通过计算,得到病毒滴度为 $(1.59 \pm 0.64) \times 10^{10}$ IU/mL。

2.3 GFP 报告基因检测法测定病毒滴度

同时将 0.1、0.01、0.001 μ L 病毒浓缩液感染 2 d 后的细胞,置于荧光显微镜下观测。镜检结果显示,GFP 阳性细胞数逐级递减,0.1、0.01、0.001 μ L 病毒量感染的细胞中,GFP 阳性率分别为 52%、6%、0.5%,呈现较好的倍比关系(图 3)。

通过公式:病毒滴度=感染细胞数 \times GFP 阳性率 \times 病毒稀释倍数 \div 病毒量,得出病毒滴度为 $(8.10 \pm 0.79) \times 10^9$ IU/mL。

2.4 GFP 报告基因检测法与定量 PCR 检测法所得病毒滴度比较,验证定量 PCR 检测法准确性

通过比较 GFP 报告基因检测法和实时定量

PCR 检测法(表 2),可以看出,与我们预期结果一致,实时定量 PCR 法检测结果与 GFP 报告基因检测法检测结果成正相关. 多次重复实验结果均表明,两者的检测结果成稳定的正相关性. 而且,实时定量 PCR 检测法不依赖 GFP 蛋白正常

表达,对整合入宿主基因组但不能正常表达的病毒仍然能够在其检测范围之内,因此,实时定量 PCR 的检测结果更接近实际值,能够更加准确的检测病毒滴度.

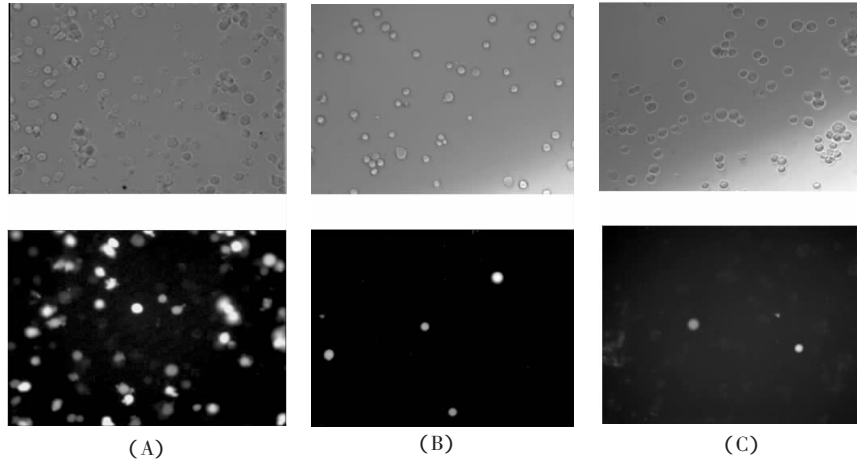


图 3 逐级稀释的慢病毒感染 293T 细胞后 GFP 的表达情况
(A) 0.1 μL 病毒感染细胞;(B) 0.01 μL 病毒感染细胞;(C) 0.001 μL 病毒感染细胞.

Fig.3 GFP expression in infected 293T cells after 10 fold dilution

(A) 293T cells infected by 0.1 μL virus ;(B) 293T cells infected by 0.01 μL virus ;(C) 293T cells infected by 0.001 μL virus.

表 2 GFP 报告基因检测法与定量 PCR 检测法测得病毒滴度比较
Table 2 Comparison of lentivirus titer determined by GFP reporter assay and qRT-PCR approach

Dose of viral particles		6.3×10^7	6.3×10^6	6.3×10^5
GFP reporter assay	Percentage of GFP ⁺ cells	52.0%	6.0%	0.5%
	Infectious units	7.8×10^5	9.0×10^4	7.5×10^3
qRT-PCR assay	Infectious units	1.3×10^6	2.3×10^5	1.1×10^4

注:病毒感染 293T 细胞数为 1.5×10^6 .

Notes :293T cells in each well are: 1.5×10^6 .

2.5 荧光实时定量 PCR 法测定病毒实际感染效率

通过计算公式:感染效率=有效感染病毒数/感染细胞总病毒颗粒数×100%,得到该实验中慢病毒的感染效率为: $2.65 \pm 1.07\%$.

3 讨论

慢病毒载体的研究,目前以 HIV-1 最为深入.慢病毒载体构建的基本原理是将 HIV-1 基因组中的基本骨架与编码其功能蛋白相分离,分别改建成载体质粒和表达包装蛋白的质粒,并将两种成分共转染入细胞,从中获得只有一次感染能力而没有复制能力的 HIV-1 载体假病毒^[7],从而提高了其应用的安全性.近年来,越来越多的研究者利用慢病毒载体系统作为在动物模型研究

基因治疗的导入系统,并取得良好的效果^[8-10].与此同时,利用慢病毒载体介导制备转基因动物的研究也得到发展,慢病毒载体介导成功制备了转基因小鼠^[11,12]、转基因猪^[13]、转基因牛^[14]等动物,为基因工程领域的研究奠定基础.

由于慢病毒载体的基因转导效率主要取决于病毒滴度,这就使得慢病毒滴度及其感染效率的检测变得很重要.目前,通行的慢病毒滴度检测方法有:1) p24 等抗原酶联检测法(p24 ELISA 方法).其缺点是:商业化的 ELISA 试剂盒往往太贵,约 6 000 元人民币一盒.而且蛋白含量检测结果不能直接反映其拷贝数;2) 使用报告基因系统,无法检测其真实颗粒数及不携带报告基因的假病毒滴度;3) 检测逆转录酶活性,用量

大,操作复杂及准确性差。

本文所阐述的通过实时定量 PCR 法测定 LTR 拷贝数来检测病毒滴度的方法,能在提高慢病毒滴度检测准确性的同时,缩短检测时间、减少检测成本。相比传统检测方法,实时定量 PCR 检测法有以下特点:1) 由于本检测方法中,实时定量 PCR 的检测引物设计在慢病毒载体的 LTR 区,因此检测不依赖于所携带的外源基因;2) 传统的 GFP 报告基因检测方法依赖绿色荧光蛋白的表达,对于外源基因整合入宿主基因组中但由于基因沉默而未能表达 GFP 蛋白的细胞无法检测,致使滴度测定不能准确地反应病毒的感染效率;而实时定量 PCR 检测法不依赖 GFP 报告基因的功能表达,因此其准确程度更高;3) 报告基因检测法,因其感染和表达效率随宿主细胞而异,而利用实时定量 PCR 方法,直接检测病毒的颗粒数和整合入宿主基因组内的外源基因的拷贝数,从而大大提高了其检测的准确性。

目前,临床上及实验室所应用的定量 PCR 方法,通常是检测整合入宿主细胞的基因拷贝数,因此,是对有活力病毒滴度的测定。而本文所介绍的方法,是通过直接裂解病毒,利用荧光实时定量 PCR 检测总的病毒颗粒数,并结合传统的慢病毒活力滴度的检测方法,对病毒颗粒的感染效率进行检测。所以本方法更适于被应用于研究病毒制备、感染过程中各因素对病毒感染效率的影响。

病毒浓缩和感染过程中,由于受超离的压力、反复冻融、受体细胞易感性、病毒自身半衰期等诸多因素影响,使得有效的病毒数要低于其总颗粒数。为了确定实验中病毒的用量,需要预测病毒的实际感染效率。利用本文所介绍的实时定量 PCR 方法,检测慢病毒颗粒数及有活性的病毒滴度,通过计算有活力的病毒颗粒和总病毒颗粒的比值,我们可以得到每次制备的病毒的感染效率。在我们的实验中,所得到的病毒在 293T 细胞的实际感染效率为 4% 左右。而且多次实验表明,反复冻融对病毒感染效率具有很大影响。病毒实际感染效率的测定,为我们在进行具体实验中确定病毒用量具有实际指导意义。

经本实验室多次重复试验,结果均表明荧光实时定量 PCR 法是一种高效、准确、快速的检

测重组慢病毒滴度及其感染效率的方法,为重组慢病毒载体的应用奠定了基础。

致谢:感谢任兆瑞教授对本文的悉心指导。

参考文献(References):

- [1] WU X, LI Y, CRISE B, *et al.* Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration[J]. *Science*, 2003, 300 : 1749-1751.
- [2] DEPALMA M, MONTINI E, SANTONIDESIO F R, *et al.* Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells[J]. *Blood*, 2005, 105(6) : 2307-2315.
- [3] SCHRODER A R, SHINN P, CHEN H, *et al.* HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots[J]. *Cell*, 2002, 110 : 521-529.
- [4] JAKOBSSON J, ERICSON C, JANSSON M, *et al.* Targeted transgene expression in rat brain using lentiviral vectors[J]. *Neurosci Res*, 2003, 73(6) : 876.
- [5] 张敬之,郭歆冰,谢书阳,等. 用慢病毒载体介导产生绿色荧光蛋白(GFP)转基因小鼠[J]. 自然科学进展(ZHANG Jing-zhi, GUO Xin-bin, XIE Shu-yang, *et al.* Production of transgenic mice carrying green fluorescence protein gene by a lentiviral vector-mediated approach[J]. *Progress in Nature Science*), 2006, 16(8) : 827-832.
- [6] STEWART S A, OYLOCHOOM D M, PALLISER D, *et al.* Lentivims-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells[J]. *RNA*, 2003, 9(4) : 493-501.
- [7] 刘茵. 慢病毒载体在转基因动物研制中的应用[J]. 国际遗传学杂志(LIU Yin. Application of lentiviral vectors in transgenic animal development[J]. *Int J Genet*), 2007, 30(5) : 374-377.
- [8] MAY C, RIVELLA S, CALLEGARI J, *et al.* Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin[J]. *Nature*, 2000, 406(6791) : 82-86.
- [9] HAN X D, LIN C, CHANG J, *et al.* Fetal gene therapy of α -thalassemia in a mouse model[J]. *PNAS*, 2007, 104(21) : 9007-9011.
- [10] LI W, XIE S Y, GUO X B, *et al.* A novel transgenic mouse model produced from lentiviral germline integration for the study of β -thalassemia gene therapy[J]. *Haematologica*, 2008, 93(3) : 357-362.
- [11] LOIS C, HONG E J, PEASE S, *et al.* Germline transmission and tissuespecific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors[J]. *Science*, 2002, 295 : 868-872.
- [12] PFEIFER A, IKAWA M, DAYN Y, *et al.* Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99 : 2140-2145.
- [13] HOFMANN A, KESSLER B, EWERLING S, *et al.* Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral emtovera vectors[J]. *EMBO Reports*, 2003, 4 : 1054-1060.
- [14] HOFMANN A, ZAKHARTCHENKO V, WEPPERT M, *et al.* Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes[J]. *Biol Reprod*, 2004, 71 : 405-409.