

· 论 著 ·

HIV-1 假病毒包装及感染条件优化*

陈丹瑛, 李蕊, 张玥, 宋川, 韩俊燕, 张媛媛[△]

(首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所/新发突发传染病研究北京市重点实验室 100015)

摘要:目的 对人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)假病毒包装及感染条件进行优化,获得高重复性、高稳定性和高滴度的假病毒包装方法和较高的感染效率。方法 采用 pSG3 Δ env 质粒与 pcDNA3.1-SF162 rev/env 质粒共转染 293T 细胞包装病毒,对 HIV 假病毒骨架质粒与 env 真核表达质粒转染比例、转染试剂与质粒比例、假病毒收获时间对 HIV 假病毒包装滴度的影响进行实验,同时对感染过程中假病毒接种剂量与二乙氨基葡聚糖(DEAE-Dextran)使用浓度进行了优化。结果 在包装过程中当 HIV 假病毒骨架质粒与 env 真核表达质粒转染比例为 4:1、转染试剂与质粒比例为 3:1,转染后培养 48 h HIV-1 假病毒的滴度最高;在假病毒感染过程中,15 μ g/mL 的 DEAE-Dextran 可有效增加假病毒的感染效率且不会对细胞造成较大毒性。结论 通过对包装和感染过程中关键条件的优化,可以有效提高 HIV-1 假病毒的包装和感染效率,增加实验技术稳定性,为新型抗艾滋病药物筛选和艾滋病疫苗评价等研究奠定了基础。

关键词:人类免疫缺陷病毒; 假病毒; 包装方法; 二乙氨基葡聚糖

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.15.003 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)15-2172-03

Optimization of package and infection of the HIV-1 pseudotyped virus*

CHEN Danying, LI Rui, ZHANG Yue, SONG Chuan, HAN Junyan, ZHANG Yuanyuan[△]

(Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital Affiliated of Capital Medical University/Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China)

Abstract: Objective To optimize the package and infection conditions of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) pseudovirus, in order to obtain a high-repeatability, high-stability and high-infection titer packaging method of HIV-1 pseudovirus and increase the efficiency of infection. **Methods** In view of the transfection efficiency factors, through different transfection ways, pSG3 Δ env plasmid and pcDNA3.1-SF162 rev/env plasmid were transfected into 293T cells packaging virus, and the HIV-1 pseudotyped virus were collected after 24 h, 48 h and 72 h, respectively, then reporter gene after infecting TZM-bl cells for 48 h were detected. **Results** The HIV-1 pseudovirus was packaged at highest efficiency and titer under optimized conditions, in which the ratio of transfection backbone plasmid and envelope eukaryotic expression plasmid was at 4:1, plasmid mixture and transfection reagent was at 3:1, and the time of harvest of HIV pseudovirus was at 48 h after transfection. During the infection of HIV-1 pseudovirus, diethylaminoethyl dextran(DEAE-Dextran) at the concentration of 15 μ g/mL could increase the efficiency of infection, causing relatively lower toxicity to 293T cell line. **Conclusion** The package and infection efficiency of HIV-1 pseudovirus are increased and the stability of experiment is improved with optimized key conditions. The results have established foundation for the stability of various applications, such as HIV-1 pseudovirus-based new types of anti-AIDS drug screening and AIDS vaccine evaluation.

Key words: human immunodeficiency virus; pseudovirus; package method; DEAE-Dextran

尽管高效抗逆转录病毒治疗(HAART)在很大程度上延长了从感染人类免疫缺陷病毒(HIV)进展为艾滋病的时间,但是长期用药导致的耐药株的出现和药物相关的不良反应都为艾滋病的治愈带来障碍。因此迫切需要研发包括艾滋病疫苗在内的新的治疗手段以及包括病毒抑制剂在内的新型抗艾滋病药物。近年来, HIV-1 假病毒体系得到了很大的发展,成为 HIV 研究领域重要的技术手段。其中以 TZM-bl 细胞为靶细胞的假病毒单周期感染实验应用最广泛^[1]。该方法包括病毒生产和病毒感染检测两个部分,假病毒生产是通过两质粒共转染真核表达细胞实现的。这种假病毒一般由两个质粒包装而成,一个为携带 HIV 包膜蛋白 env 基因的真核表达质粒,另一种质粒包含 env 基因移码突变的 HIV 基因组,将这两个质粒

共同转染 293T 细胞,互补地表达 HIV 蛋白,病毒粒子得以包装出芽。但由于新的病毒颗粒其基因组 RNA 无法编码完整的包膜蛋白,所以这种病毒粒子感染 HIV 敏感细胞系后,由于缺少包膜蛋白,不能形成完整的病毒颗粒,失去了感染能力,只能进行一个细胞周期的侵染^[2]。采用假病毒包装系统包装病毒后,收获的上清液中,病毒的滴度不稳定。为了寻求更高效稳定的方法,本文对 HIV 假病毒骨架质粒与 env 真核表达质粒转染比例、转染试剂与质粒比例、假病毒收获时间对 HIV 假病毒包装滴度的影响进行了实验,同时对感染过程中二乙氨基葡聚糖(DEAE-Dextran)使用浓度进行了优化。通过对包装和感染过程中关键条件的优化,可以有效提高 HIV-1 假病毒的包装效率和感染效率,以期新型抗艾滋病药物筛选和艾滋

* 基金项目:北京市医院管理局“青苗”人才计划(QML20151701)。

作者简介:陈丹瑛,女,博士研究生,主要从事感染免疫中病毒宿主相互作用方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: zhangyuanyuan@ccmu.edu.cn。

疫苗评价等研究在技术稳定性方面奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料来源 pSG3 Δ env、pcDNA3.1-SF162 rev/env、TZM-bl 细胞均由中国疾病预防控制中心病毒所曾毅院士实验室惠赠。293T 细胞由北京地坛医院传染病研究所保存。Bright-Glo™ Luciferase Assay System 和 FuGENE HD 转染试剂均购自美国 Promega 公司。X-gal、DEAE-Dextran 购自北京欣经科生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 HIV 假病毒骨架质粒与 env 真核表达质粒转染比例的优化 将 6×10^5 个/孔的 293T 细胞接种至六孔板各孔,过夜培养后汇合度达到 80%。将 pcDNA3.1-SF162 rev/env 质粒和 pSG3 Δ env 质粒按照不同比例(1:1、2:1、3:1、4:1、6:1 和 8:1)加至 100 μ L 无血清的 DMEM 培养基中,每管包含质粒总质量为 2 μ g,混匀后加入 FuGENE HD 转染试剂 6 μ L(质粒与转染试剂的质量体积比为 1:3),轻弹混匀。室温静置 15~30 min。将质粒与转染试剂混合液逐滴加入六孔板各孔中,轻摇混匀。于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱培养 48 h。收获包含假病毒的培养上清,补加胎牛血清(FBS)至终浓度达到 20%。使用 0.45 μ m 滤器过滤病毒原液,分装后冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱以备进一步滴度测定。

1.2.2 质粒与转染试剂比例的优化 采用 1.2.1 所述方法,设定质粒总量为 2 μ g(其中 pSG3 Δ env 质粒和 pcDNA3.1-SF162 rev/env 质粒的质量比为 4:1),按照质粒与转染试剂质量体积比为 2:3、2:4、2:5、2:6、2:7、2:8 的比例加入相应体积的转染试剂 FuGENE HD,培养 48 h 后收获假病毒并进行滴度测定。

1.2.3 质粒转染后培养时间对假病毒滴度的影响 pSG3 Δ env 质粒和 pcDNA3.1-SF162 rev/env 质粒的质量比为 4:1,总质粒质量为 2 μ g,按照质粒与转染试剂质量体积比为 4:1 加入 6 μ L FuGENE HD 转染试剂进行假病毒的包装,分别在转染后 24、48、72 h 收获假病毒并进行病毒滴度测定。

1.2.4 HIV 假病毒 TCID₅₀ 的检测 半数组织培养感染量(TCID₅₀)是 HIV 假病毒滴度的一种表示形式。实验前一天将 TZM-bl 细胞按照每孔 2×10^4 个/100 μ L DMEM 培养基接种于 96 孔细胞培养板。将待测的病毒原液按 1:16 稀释后于 96 孔板做系列的 4 倍稀释,每种病毒每个稀释度做 3 个复孔(每孔含有最适浓度的 DEAE-Dextran),感染 48 h 后弃去培养基,加入含有 0.8% 的甲醛和 0.2% 戊二醛的固定液固定 5 min。最后每孔加入 100 μ L 染色液(5 mmol 铁氰化钾,5 mmol 亚铁氰化钾、2 mmol 氯化镁及 1 g/L X-gal),避光孵育显色 1 h,倒置显微镜下观察,每个细胞孔中的蓝细胞数大于或等于 5,即判断该孔为阳性。采用 Reed-Muench 方法计算 HIV 假病毒 TCID₅₀。

1.2.5 不同浓度 DEAE-Dextran 对 HIV 假病毒感染宿主细胞的影响 接种 2×10^4 个/孔的 TZM-bl 细胞至 96 孔板,过夜培养后,接种 100 TCID₅₀ 的 HIV 假病毒至各孔中,并向各孔加入不同浓度的 DEAE-Dextran(设置终浓度分别为 0、5、10、15、20、40、60 和 80 μ g/mL),每孔对应 1 个不加病毒只加入相应浓度 DEAE-Dextran 的细胞对照,于 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱培养 48 h。

1.2.6 荧光素酶活性测定试验 假病毒感染 TZM-bl 细胞后

48 h 后,加入 100 μ L Bright-Glo™ 反应试剂,室温作用 2 min,混匀后吸取 150 μ L 至 96 孔黑色酶标板,放入 GloMax96 微孔板发光检测仪检测,获得相对荧光单位(RLU)的数值。

2 结果

2.1 HIV 假病毒骨架质粒与 env 真核表达质粒转染比例的优化 pcDNA3.1-SF162 rev/env 质粒和 pSG3 Δ env 质粒按照不同比例转染 293T 细胞 48 h 后收获假病毒,通过感染 TZM-bl 细胞进行 TCID₅₀ 的检测,结果显示,当 HIV 骨架质粒与 env 表达质粒的质量比为 4:1 时,包装出的假病毒滴度最高(10 260 TCID₅₀/mL);质量比为 1:1 和 2:1 时滴度较低(分别为 1 019 和 2 501 TCID₅₀/mL)。

2.2 包装质粒与转染试剂比例的优化 按照 2.1 中结果确定的 HIV 假病毒骨架质粒与 env 真核表达质粒转染最优比例 4:1,转染的质粒总量为 2 μ g。测定在不同的质粒与转染试剂质量体积比情况下假病毒滴度。结果显示,当包装质粒总量与 FuGENE HD 转染试剂质量体积之比为 1:3 时假病毒滴度最高,为 10 260 TCID₅₀/mL;当该比值为 1:1 时假病毒滴度最低,为 254 TCID₅₀/mL。

2.3 质粒转染后培养时间对假病毒滴度的影响 假病毒包装质粒共转染 293T 细胞后 24 h 有假病毒释放至上清,但滴度不高,仅为 640 TCID₅₀/mL;随着时间的增加,假病毒的释放量也逐渐增多,转染后 48 h 达到 10 260 TCID₅₀/mL;转染 72 h 后病毒滴度降至 4 074 TCID₅₀/mL。

2.4 DEAE-Dextran 浓度对 HIV-1 假病毒感染效率的影响 试验中 DEAE-Dextran 的工作浓度为 0~80 μ g/mL,荧光素酶表达量用 RLU 表示,与假病毒感染效率呈正比。不同浓度 DEAE-Dextran 对假病毒感染效率的影响如图 1 所示,在 0~15 μ g/mL 的浓度范围内,假病毒 SF162 的感染效率随着 DEAE-Dextran 浓度的增加而增加;超过 15 μ g/mL 后,假病毒的感染率随着浓度的增加而降低,因此,可以获得假病毒感染宿主细胞所需 DEAE-Dextran 的最佳浓度约为 15 μ g/mL。通过不感染假病毒的细胞对照,当 DEAE-Dextran 浓度超过 20 μ g/mL 后,细胞本底的 RLU 开始降低。

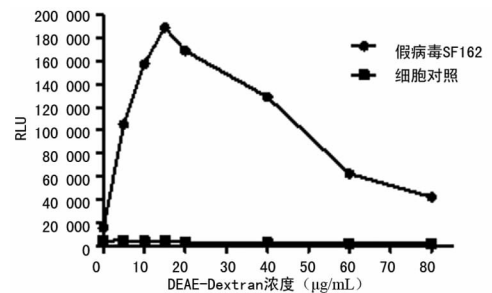


图 1 不同浓度的 DEAE-Dextran 与假病毒感染的 RLU 相关性

3 讨论

HIV 假病毒感染细胞系统的建立使得 HIV 的相关研究有了更进一步的发展,具有传统研究方法无法替代的优势。通过改造使得它们在感染细胞后不能形成具有感染活性的成熟 HIV 病毒颗粒,而只能完成“一个细胞周期”的感染,因此,为广谱中和抗体的筛选、病毒-宿主相互作用的研究、疫苗免疫效果的评价以及抗病毒药物的筛选等提供了安全性高,重复性好,稳定可靠的实验手段。

本实验采用的是 HIV 假病毒感染 TZM-bl 的细胞系统。TZM-bl 细胞为表达 CD4、CXCR4 和 CCR5 的 HeLa 细胞系,细胞内含有 Tat 调控的荧光素酶和 β -半乳糖苷酶基因,细胞一旦被 HIV 感染,Tat 转录激活使得报告基因活化表达,且表达水平与病毒感染量成正相关,由此可以反映假病毒在宿主细胞内复制情况并可进行滴度测定。

HIV env 蛋白的表达量是影响假病毒包装效率的关键因素^[3-4],可以通过 env 基因的密码子优化提高病毒滴度,但是对于不同亚型的 HIV-1 env 突变株的研究,若将每一个突变株的 env 基因都进行优化,费时耗力且成本投入较大,因此首先应考虑如何提高假病毒的包装和感染效率。本实验比较了不同因素对包装和感染效率的影响,实验设计遵循单一变量原则,结果发现,骨架质粒与 env 真核表达质粒的比值对假病毒的包装效率影响较大,该比值为 4:1 时包装效率最高。而包装质粒与转染试剂的比值也决定了质粒通过脂质体进入细胞的效率,实验表明,当该比值为 2:6 时,假病毒包装效率最高。但是随着转染试剂量的增加(该比值达到 2:8 时),并没有进一步提高假病毒的滴度,滴度反而降低了,推测可能由于转染试剂的毒性影响了细胞的状态,进一步影响假病毒的包装。转染后培养时间也是一个影响病毒滴度的关键因素,质粒进入细胞后开始基因的转录、表达和翻译,转染 24 h 后病毒各个蛋白的表达水平还很低,所以包装出的病毒滴度也很低;转染 72 h 后,由于获得的假病毒只具备单轮感染活性,释放在上清中的假病毒无法再次感染细胞,其中一部分可能被降解,因此滴度也较低。实验证明,转染后 48 h 收获假病毒可获得较高滴度。

DEAE-Dextran 是一种高分子量的阳离子多聚物,能促进哺乳动物细胞捕获外源的 DNA,实现瞬时的有效表达,是最早应用哺乳动物细胞转染试剂之一^[5-6]。DEAE-Dextran 等阳离子多聚物很早就被证实可以增加逆转录病毒体外感染效率^[7]。像其他转染试剂一样,高浓度的 DEAE-Dextran 也会具有细胞毒性。既往文献^[8-9]显示,不同实验室所使用的 DEAE-Dextran 浓度不尽相同,而且 DEAE-Dextran 对细胞的毒性与其来源和批次有关,因此在使用新一批的 DEAE-Dextran 前,最好进行剂量效应实验,以便确定其最佳使用浓度^[8]。本实验条件下,假病毒 SF162 在 DEAE-Dextran 浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,有较高的感染效率。而当其浓度超过 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞对照孔的 RLU 值较之不加 DEAE-Dextran 的细胞对照孔 RLU 值有所降低,提示高浓度的 DEAE-Dextran 会对细胞活力有一定的影响。

综上所述,本研究通过对包装和感染过程中关键条件的优

化,有效地提了 HIV-1 假病毒的包装和感染效率,增加实验技术稳定性,为新型抗艾滋病药物筛选和艾滋病疫苗评价等研究在实验技术稳定性方面奠定基础。

参考文献

- [1] 王佑春. HIV 假病毒体系在病毒特性研究和检测中的应用[C]. 2012 全国临床微生物与感染免疫学术研讨会论文集. 重庆:中华医学会,2012:4-5.
- [2] Briggs JA, Wilk T, Fuller SD. Do lipid rafts mediate virus assembly and pseudotyping? [J]. J Gen Virol, 2003, 84 (Pt 4):757-768.
- [3] Hammarskjold ML, Heimer J, Hammarskjold B, et al. Regulation of human immunodeficiency virus env expression by the Rev gene product[J]. J Virol, 1989, 63(5): 1959-1966.
- [4] Lu XB, Heimer J, Rekosh D, et al. U1 small nuclear RNA plays a direct role in the formation of a rev-regulated human immunodeficiency virus env mRNA that remains unspliced[J]. Proc Natl Acad Sci, 1990, 87(19):7598-7602.
- [5] Yokoyamakobayashi M, Kato S. Recombinant f1 phage particles can transfect monkey COS-7 cells by DEAE dextran method [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 192(2):935-939.
- [6] Rupprecht AP, Coleman DL. Transfection of adherent murine peritoneal macrophages with a reporter gene using DEAE-dextran[J]. J Immunol Methods, 1991, 144 (2):157-163.
- [7] Konopka K, Stamatatos L, Larsen CE, et al. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection by cationic liposomes; the role of CD4, serum and liposome-cell interactions[J]. J Gen Virol, 1991, 72(Pt 11):2685-2696.
- [8] Montefiori DC. Measuring HIV neutralization in a luciferase reporter gene assay[J]. Methods Mol Biol, 2009, 485: 395-405.
- [9] Nie JH, Wang WB, Wen ZH, et al. Optimization and proficiency testing of a pseudovirus-based assay for detection of HIV-1 neutralizing antibody in China[J]. J Virol Methods, 2012, 185(2):267-275.
- [10] Omland T, de Lemos JA, Sabatine MS, et al. A sensitive cardiac troponin T assay in stable coronary artery disease [J]. N Engl J Med, 2009, 361(26):2538-2547.
- [11] Gravning J, Smedsrud MK, Omland T, et al. Sensitive troponin assays and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in acute coronary syndrome: prediction of significant coronary lesions and long-term prognosis[J]. Am Heart J, 2013, 165(5):716-724.

(收稿日期:2017-03-09 修回日期:2017-05-17)

(上接第 2171 页)

脑血管病杂志, 2011, 9(11):1299-1300.

- [7] Pang A, Hu Y, Zhou P, et al. Corin is down-regulated and exerts cardioprotective action via activating pro-atrial natriuretic peptide pathway in diabetic cardiomyopathy[J]. Cardiovasc Diabetol, 2015(14):134.
- [8] 刘晓峰. 血浆同型半胱氨酸与 B 型钠尿酸联合检测在急性心肌梗死中的应用评价[J]. 检验医学, 2013, 28(5): 379-381.
- [9] 曾静. 肌钙蛋白 I 与超敏 C 反应蛋白联合检测对冠心病的诊断意义[J]. 海峡药学, 2015, 27(2):123-124.

(收稿日期:2017-03-13 修回日期:2017-05-21)