

逆转录病毒载体属 RNA 病毒，但可在受染细胞内反转录产生 DNA 互补链，此 DNA 单链可作为模板合成第二条 DNA 链，第二条 DNA 链可掺入细胞基因组 DNA 中。此病毒可利用宿主细胞的酶自行转录与复制，RNA 可合成蛋白，再包装病毒，RNA 从胞内释放，成为感染性病毒，该载体可经不同方式改变。介导过程可使病毒单拷贝基因组稳定地进入细胞。

首先，逆转录病毒的繁殖必须要有适当的包装细胞系，以利于产生高滴度的病毒，同时还具有适当的结构。如： ψ 2(第一代包装细胞)，PA317(第二代包装细胞)， ψ 1-CRIP、PG13、DA、CFA(第三代包装细胞)，包装细胞可提供逆转录病毒 gag、pol 和 env 蛋白才能使带有包装信号及目的基因的病毒载体 RNA 进行包装，包装细胞只提供 gag、pol 和 env 蛋白而不产生具有复制能力的野生型病毒(RCR)，而第一代包装细胞可产生 RCR，安全性较差；第二代包装细胞，临床上已广泛应用，也未发现产生 RCR，安全性好；第三代包装细胞更加安全，第三代包装细胞中主要区别是病毒结构基因中 env 不同。

反转录病毒作为基因转移的载体有如下特点：①反转录病毒感染细胞的效率高，基因转移率在 10%-100%；②病毒基因转移能将外源基因整合到宿主细胞基因组中外源基因能稳定存在而不丢失；③外源基因整合的拷贝数一般只有一个；④反转录病毒只选择感染分裂细胞；⑤病毒可容纳外源基因的 DNA 长度为<8Kb。

反转录病毒载体的结构：已切除了病毒的结构基因 gag，大部分 pol 和 env，包括两侧的 LTR，被选择(标记)基因和目的基因插入的多聚位点所取代，同时还带有包装信号 ψ 。

(一)可产生特异性逆转录病毒细胞系的建立

1、逆转录病毒载体进入包装细胞系

从细胞质粒中产生感染性病毒包括将质粒导入包装细胞系，可从稳定感染细胞中选择病毒产生细胞或用一个包装细胞系暂时产生的病毒感染另一种有不同包装的细胞系，从中选择病毒的产生细胞。

1.1 准备工作（用品）：

- (1)适当的包装细胞系及培养液
- (2)大多数包装细胞系为鼠源的，含有鼠“Helpe 病毒”，此病毒可帮助被去除某些功能结构基因的逆转录病毒复制，并包装于蛋白衣壳中。
- (3)逆转录病毒质粒 DNA 常构建成含有抗药基因 neo 新霉素基因的载体。
- (4)Hepes-缓冲液(HeBs)
- (5)2mol/L CaCL₂
- (6)含血清及不含血清培养液
- (7)HeBs 15%甘油（HeBs/甘油）
- (8)800mg/L(100×聚凝胺)(肝素对抗物)
- (9)10%~15%DMSO
- (10)10cm、6cm 培养皿
- (11)24 孔、6 孔培养板
- (12)克隆环

1.2 操作步骤:

- (1)转染前, 10cm 培养皿中接种大约 10%~20%皿底面积的包装细胞。
- (2)将 10 μ g 含抗药基因的逆转录病毒质粒 DNA 加入 0.5mL HeBs 中,加入 32 μ L 2mol/L CaCl₂, 轻振动, 加盖 30 分钟, 室温下培养 45 分钟, 直到小的、模糊的兰色沉淀产生。
- (3)从包装细胞中弃去旧液, 轻轻滴入 HeBs-DNA 沉淀于细胞培养皿中心, 使细胞接触 DNA 20 分钟, 每 10 分钟轻轻摇动培养皿, 使溶液均匀, 加入 10mL 培养液, 并于 37 $^{\circ}$ C 放置 4 小时。
- (4)完全吸出培养液, 逐滴加入 2.5mL 的 HeBs/甘油, 放回培养箱继续培养, 如果使用的是 ψ 2/YCRE/YCRIP/PA317 包装细胞系, 需培养 3.5 分钟, 若为 Q2bn 包装细胞系, 需培养 1.5 分钟, 或根据不同包装细胞选用不同时间。迅速弃去 HeBs/甘油, 用 10mL 培养液洗 2 次, 加入含有血清的 5ml 培养液培养 18~24 小时。
- (5)取出培养液用 0.45 μ m 过滤, 可获得含有短期产生病毒的培养上清, -70 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 贮存, 或立即用于其它包装细胞系的感染。
- (6)加入 10ml 培养液于上述已感染的细胞, 继续培养 2~3 天, 继续步骤 10。
- (7)另一包装细胞受感染前 1:10 或 1:20 传代。
- (8)倒去包装细胞的培养液, 加入步骤 5 获得的病毒。方法如下:
对于 10cm 培养皿, 将 0.1 至 1.0mL 病毒贮存液稀释至 3~5mL 的终体积, 加入 800mg/L 聚凝胺至终浓度为 8 mg/L, 培养 1 小时以上。
- (9)若 10cm 培养皿加入 10mL 培养液, 6mL 培养皿中应加入 4mL 培养液, 培养 2~3 天。
- (10)步骤 6 或步骤 9 得到的感染细胞, 2~3 天后按 1:10 或 1:20 传代, 接种于选择培养液培养 3 天, 更换培养液, 继续培养 3~4 天, 直至克隆出现。
- (11)用克隆环挑出分离的克隆, 每个克隆接种 24 孔板或 6 孔板中的二个孔, 生长至 50~90% 底部面积。
- (12)倒去培养液, 换入 1 倍体积的培养液, 继续培养 1~3 天, 收取培养液, 马上滴定, 或者贮存于 -70 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C。
- (13)继续传代克隆细胞直到能被冷冻或被鉴定, 若病毒产生克隆被鉴定, 10%~15%DMSO 保护剂液氮冻存细胞。即产生病毒细胞系建立。

2、病毒滴度鉴定

在分离产生病毒的克隆后, 需进行病毒滴度的测定, 常用的方法是用病毒感染目的细胞, 可根据载体 RNA 或蛋白的出现粗略定量分析。

2.1 准备工作:

- (1)病毒贮存液 (步骤 5 所得)
- (2)目的细胞系(NIH3T3 成纤维细胞)
- (3)G418 或其它选择性药物

2.2 操作步骤:

- (1)目的细胞系 NIH3T3 细胞在感染前一天按 1:10 至 1:20 接种 6cm 培养皿。
- (2)感染当日, 弃去目的细胞培养旧液, 加入含病毒的贮存液(步骤 5 所得), 用 1~2ml 含 0.01~0.1 病毒贮存液感染 6cm 培养皿目的细胞 (或者 3~5ml 用于 10cm 培养皿中的细胞), 加入 800 mg/L 聚凝胺至终浓度为 8 mg/L, 培养 1~3 小时, 37 $^{\circ}$ C。
- (3)加入培养液, 稀释聚凝胺至 2 mg/L, 再继续培养 2~3 个细胞周期(NIH3T3 细胞周期为 2~3 天)。

(4)-a, 如果病毒带有组化标记基因, 如 LacZ, 用 X-gal 染色感染细胞。按步骤 6 计算蓝色克隆的数量以得到病毒的滴度。

(4)-b, 如果病毒携带抗药基因, 传代细胞应选择培养条件。如果抗药基因为 neo, 细胞按 1:10 至 1:20 传代, 接种含有 G418 的两个 10cm(或 6cm)培养皿中, 培养 3 天。

(5) 更换培养液(含选择性 G418 药物)共培养 7-10 天, 此时克隆应该非常明显, 计算克隆数。

(6) 滴度计算公式:

$G418\text{-RCFU(集落形成单位)/m} = \text{克隆数/病毒体积(mL)} \times \text{复制因子} \times \text{接种率}$

若为(4)-a 中所叙, 病毒携带 LacZ, 用 X-gal 染色细胞根据显示的克隆数, 计算病毒的滴度, 其公式为:

$X\text{-gal CFU/mL} = X\text{-gal 阴性克隆数/病毒体积(mL)}$

(7) 其它方法再鉴定产生病毒的克隆, 细胞所产生的病毒基因无重新排列或缺失。

2.3 X-gal 对感染细胞的染色方法(此方法可使该病毒感染细胞着色, 可用于直接测量病毒滴度)。

(1) 准备工作

除以上各种实验用品外, 尚需:

- ① 带有 LacZ 编码病毒的转染(或感染)的细胞;
- ② 固定液: 0.05% 戊二醛或 2% 多聚甲醛;
- ③ X-gal 染液。

(2) 操作步骤

- ① 倒去培养液, 向感染细胞的皿中加入固定液(6cm 皿加 2mL, 10cm 皿加 5mL), 加 2% 多聚甲醛室温固定 60 分钟, 或 0.05% 戊二醛固定 5~15 分钟。
- ② 去除固定液, 用 PBS 洗 3 次, 第二次洗涤时放置 10 分钟, 首次和末次洗涤时则快速。
- ③ 加入最小体积的 X-gal 溶液, 盖住细胞 37°C 1 小时或过夜, 阳性细胞(病毒感染细胞)则成兰色。

(二) 原代培养正常上皮细胞的逆转录病毒转染

通过将病毒基因转染到上皮细胞中, 使细胞可在体外无限生长, 保持正常上皮细胞的特点。

1、准备工作:

(1) 产生病毒的细胞系, 方法见上。

(2) DMEM 培养液 谷氨酰胺 0.02 μ g/mL

胰岛素 0.25 μ g/mL

转铁蛋白 0.12 μ g/mL

葡萄糖 67.5 μ g/mL

10% 小牛血清

聚凝胺 1 μ g/mL

氢化考的松 0.02 μ g/mL

(3) 丝裂霉素 C、胰酶、6cm 培养皿

2、操作步骤:

(1) 病毒产生细胞系暴露于丝裂霉素 C(4 mg/L)2 小时, 洗干净后, 胰酶消化, 按 5×10^6 接种 6cm 培养皿, 培养液为 DMEM。

(2) 待转染的原代培养正常上皮细胞接种于铺有以上细胞的培养皿中, 培养 3 天。

(3)更换培养液，继续培养 24 小时。

(4)取 50 μ L 培养上清，进行病毒滴度检测，方法同前， $9\times 10^3\sim 7\times 10^4$ 集落形成单位/mL 可用于转染。

(5)正常上皮原代培养 10 天后，取贴在饲养层细胞的上皮细胞，保留至上皮细胞数生长量足够选择。

(6)在上皮细胞生长 2~4 周内，成活的克隆用克隆环挑出，再继续使用三轮有限稀释法建立单个细胞系克隆。

3、鉴定：

按病毒所带有的抗药基因进行选择培养筛选，或其它方法鉴定转染细胞，方法见后。

4、注意事项：

无论用什么方法将 DNA 导入细胞，暂时或稳定的转染率很大程度取决于细胞的类型。不同的细胞系对获取外源性 DNA 以及表达的能力相差几个数量级。此外，一种方法对一种培养细胞有效，但对另一种培养细胞可能无效。