

网络出版时间: 2018-6-22 17:52 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180621.1453.029.html>

◇技术与方法◇

一种低成本的逆转录病毒感染白血病细胞的方法探析

张慧娟¹ 张 伶² 胡 蓉¹ 江丽霞¹ 钟田雨¹

摘要 为了降低实验成本,解决悬浮细胞难转染问题,本研究进行逆转录病毒包装及感染悬浮细胞—白血病细胞的实验。采用磷酸钙转染方法将逆转录病毒质粒 MSCV-PIG、Gag-pol 与 VSVG 共转染入 293T 细胞,通过旋转法将病毒原液与 KG-1a 白血病细胞共孵育,最后用嘌呤霉素筛选稳定细胞株。逆转录病毒原液感染 KG-1a 细胞 48 h 后 KG-1a 细胞的感染效率约为 10%。但嘌呤霉素稳筛后,携带逆转录病毒载体的 KG-1a 细胞阳性率可达 85% 以上。通过低成本的磷酸钙转染方法获取病毒,采用病毒原液成功感染较难转染的白血病细胞,为做基础研究的科研人员提供借鉴。

关键词 白血病细胞;逆转录病毒载体;磷酸钙转染法

中图分类号 R 33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)08-1304-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.08.029

对于中小城市的科研实验室来说,科研经费严重不足,科研设备不齐全。一旦涉及基础研究如载体构建,科研人员只有去花一笔不菲的费用去公司购买载体。该研究采用低成本的磷酸钙转染试剂进行逆转录病毒的包装,并用病毒原液成功感染悬浮细胞—KG-1a 白血病细胞,大大节省了科研费用,同时解决悬浮细胞难转染的问题,对于在一般科研条件下做基础研究的科研人员,具有很大的参考价值。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 磷酸钙转染试剂的配制:2 mol/L CaCl_2 (将 29.4 g CaCl_2 溶于 100 ml 水,过滤后备用)和 2 × HBSS (将 3.273 g NaCl 、0.149 g KCl 、0.043 g Na_2HPO_4 、0.43 g 无水葡萄糖、2.338 g HEPES 溶于 180 ml 的水,平均分至 2 瓶,分别调节 pH 至 6.95 和 7.05,加水至 100 ml,过滤后备用)。磷酸钙转染

试剂、polybrene 和嘌呤霉素均购自美国 Sigma 公司;RPMI 1640 培养基和 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。

1.2 质粒、菌种和细胞培养 MSCV-PIG (携带绿色荧光蛋白 GFP)、Gag-pol、VSVG 逆转录病毒载体由美国安德森实验室惠赠,pSES-HUS (携带红色荧光蛋白 RFP) 质粒、逆转录病毒包装细胞 293T 细胞、人白血病细胞株 KG-1a 由赣南医学院第一附属医院科研中心保存。在 37 °C、5% CO_2 的条件下用含 10% 的胎牛血清,青霉素 (100 U/ml)、链霉素 (100 U/ml) 和 L-谷氨酰胺 (2 mol/L) 的 DMEM 培养液培养 293T 细胞,RPMI 1640 培养液培养 KG-1a 细胞。

1.3 磷酸钙转染试剂最佳 pH 值选择 将 pSES-HUS 转染入 293T 细胞,将 pH 为 6.95 和 pH 为 7.05 的 HBSS 按 1:9、2:8、3:7……10:0 各配 1 ml 转染时应用各种配比的 HBSS 转染 48 h 后镜下观察细胞红色荧光表达强弱。

1.4 逆转录病毒包装

1.4.1 转染 准备好两个 EP 管:A 管和 B 管。A 管加入 CaCl_2 62.5 μl 、MSCV-PIG 10 μg 、Gag-pol 7.5 μg 和 VSVG 2.5 μg ,振荡混匀。B 管为 500 μl 最佳 pH 的 HBSS 溶液。将 B 液加入 A 管:A 管放在振荡器上,左手拿住 A 管的上端,右手将 B 液一滴一滴加入 A 管,该过程要持续 1~2 min。加完样之后,会有细小的白色沉淀出现,静置 30 min。将长在 10 cm 平皿融合度达 60% 的 293T 细胞去上清液,加入 8 ml 高糖 DMEM。将 1 ml CaCl_2 -DNA-HBSS 混合液均匀地一滴一滴滴入平皿,轻轻混匀,放 37 °C、5% CO_2 培养箱孵育。6~8 h 后换普通培养基。

1.4.2 病毒原液收集和感染 KG-1a 细胞 转染 48 h 后收集 293T 细胞上清液,立即在平皿里加入 10 ml DMEM 培养基,继续培养 293T 细胞。病毒原液常温 800 r/min 离心 5 min,用 0.45 μm 滤器过滤上清液以除去细胞碎片。再加入 2 ml 新鲜 DMEM 培养基,加入 12 μl 的 polybrene,使 polybrene 终浓度为 4 g/L,混匀。加入含 KG-1a 细胞的 6 孔板,2 ml/孔。用胶条封板,22 °C、1 800 r/min,离心 45 min 后

2018-03-27 接收

基金项目:江西省卫生计生委科技计划(编号:20165361)

作者单位:¹ 赣南医学院第一附属医院检验科,赣州 341000

² 重庆医科大学检验医学院,重庆 400016

作者简介:张慧娟,女,硕士,讲师,主管技师,责任作者,E-mail:zhzjoe

@163.com

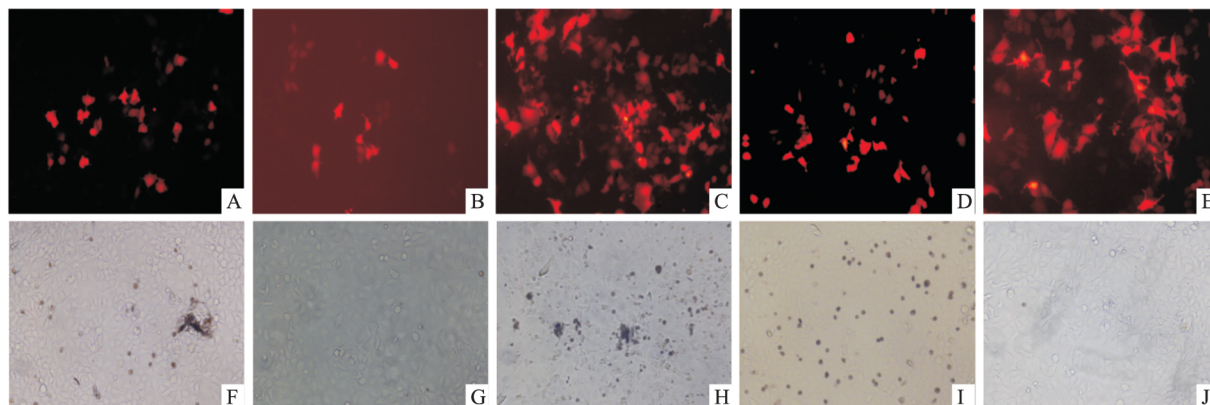


图1 不同 pH 值的 HBSS 溶液转染 293T 细胞后 48 h 荧光图和白光图 ×400

A、F: pH 6.95 与 pH 7.05 的 HBSS 溶液体积比为 6:4 转染 293T 细胞后 48 h 荧光图和白光图; B、G: 体积比为 7:3 时的荧光图和白光图; C、H: 体积比为 8:2 时的荧光图和白光图; D、I: 体积比为 9:1 时的荧光图和白光图; E、J: 体积比为 10:0 时的荧光图和白光图

放入 37℃、5% CO₂ 培养箱。转染 72 h 后第二次收集病毒上清液, 再次感染 KG-1a 细胞, 步骤同上。

1.5 KG-1a 细胞稳筛 病毒感染细胞 3 d 后, 用含嘌呤霉素的 RPMI 1640 培养基换液, 嘌呤霉素终浓度为 2 g/L。稳筛出靶细胞后, 将嘌呤霉素终浓度每 2 d 从 2 g/L 依次降为 1.5、1.0、0.5、0 g/L。

2 结果

2.1 获取磷酸钙转染法中 HBSS 溶液的最佳 pH

磷酸钙转染法中 HBSS 溶液的 pH 对转染效率有非常大的影响, 为了获取最佳 pH, 本研究将 pH 6.95 和 pH 7.05 的 HBSS 溶液按不同比例混合, 将携带红色荧光的 pSES-HUS 质粒转染至 293T 细胞, 结果显示在 pH 6.95 与 pH 7.05 的 HBSS 溶液体积比在 6:4、7:3、8:2、9:1 和 10:0 时镜下观察到明显的红色荧光, 且 pH 6.95 与 pH 7.05 的 HBSS 溶液体积比值为 8:2 时荧光最多, 转染效率约为 40%, 表明此时为最佳转染 pH。见图 1。因此, 将以此 pH 的 HBSS 做后续实验。

2.2 逆转录病毒感染 KG-1a 细胞 48 h 后荧光效率 磷酸钙法将 MSCV-PIG、Gag-pol 和 VSVG 逆转录病毒质粒共转染入 293T 细胞, 转染 48 h 和 72 h 后分别收集病毒原液感染 KG-1a 细胞。感染 48 h 后 KG-1a 细胞荧光比较稀少和微弱, 荧光感染效率约为 10%, 见图 2。

2.3 药物稳筛 KG-1a 细胞后的荧光效率 逆转录病毒感染 KG-1a 细胞 3 d 后, 加入 2 g/L 嘌呤霉素进行稳筛, 携带有 MSCV-PIG 逆转录病毒载体的 KG-1a 细胞具有抗嘌呤霉素抗性, 能在药物筛选中存活。药物筛选后 KG-1a 细胞荧光增多, 荧光变

亮, 其感染效率大于 85%。见图 3。

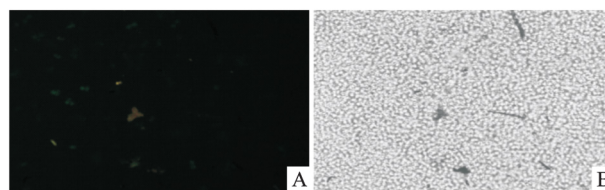


图2 逆转录病毒感染 KG-1a 细胞后 48 h 荧光图和白光图 ×400

A: 逆转录病毒感染 KG-1a 细胞后 48 h 荧光图; B: 逆转录病毒感染 KG-1a 细胞后 48 h 白光图

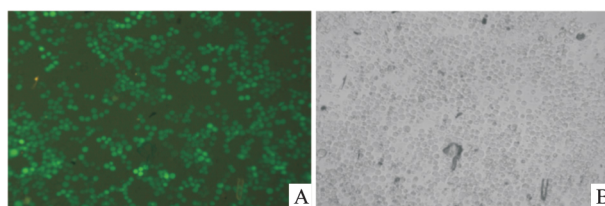


图3 嘌呤霉素筛选 KG-1a 细胞 ×400

A: 加入 2 g/L 嘌呤霉素筛选 KG-1a 细胞荧光图; B: 加入 2 g/L 嘌呤霉素筛选 KG-1a 细胞白光图

2.4 病毒感染靶细胞中需要注意的问题 Polybrene 过量会杀死靶细胞, 当加入 8 g/L polybrene 时, KG-1a 细胞出现皱缩, 胞内有细胞碎片, 见图 4A 箭头所示; 嘌呤霉素过量也会杀死靶细胞, 当加入 4 g/L 嘌呤霉素时, 细胞膜完全破碎, 细胞碎片分散, 只留下细胞影, 见图 4B 箭头所示。

3 讨论

目前, 基因干扰或过表达已经成为实验室研究基因功能的常规手段。无论是干扰或过表达, 都需要质粒转染或病毒感染靶细胞。对于悬浮细胞, 尤

其是白血病细胞株,用质粒转染或腺病毒感染,其转染或感染效率都非常低,只有用逆转录病毒或慢病毒感染效果好。本研究通过磷酸钙转染方法获取逆转录病毒,采用病毒原液感染白血病细胞,并做稳筛,获取高感染率的目的细胞,在降低实验成本的同时也解决了悬浮细胞难转染的问题,为后续的实验研究奠定基础。

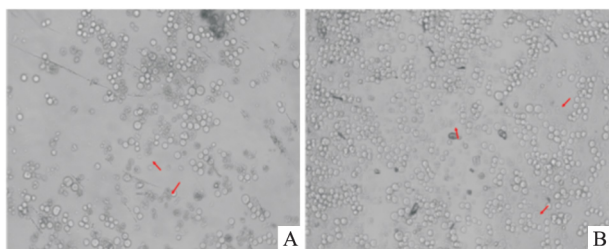


图4 polybrene 或嘌呤霉素过量对 KG-1a 细胞的影响 ×400

A:加入 8 g/L polybrene 对 KG-1a 细胞的影响;B:加入 4 g/L 嘌呤霉素对 KG-1a 细胞的影响

磷酸钙转染法与常用的脂质体转染法相比,经济实惠,价格低廉,适合进行大规模的病毒包装,但是要获得高效稳定的转染效率仍旧是实验研究中要面临的难题^[1]。影响磷酸钙法转染效率的两个关键点是 HBSS 的 pH 值和形成的磷酸钙颗粒大小。本研究将不同体积比的 pH 6.95 和 pH 7.05 的 HBSS 溶液混合,结果显示只有在 8:2 时 293T 细胞荧光最多,转染效率最高,而在其他比例如 0:9、1:8 中,红色荧光稀少。可见,在极小范围内改变 pH 值,可以极大地影响转染效率。这也可能是在实验中为何使用商品化的磷酸钙转染试剂,总是转染效果不佳的原因。另外一个影响磷酸钙法转染效率的是磷酸钙颗粒大小。有研究^[2]表明形成 1~3 μm 大小的磷酸钙颗粒对提高磷酸钙法转染效率非常关键。本研究是将 HBSS 溶液逐滴地加入在振荡中的 CaCl₂-DNA 混合物中,随后静置 30 min,这样才能形成最佳大小的磷酸钙沉淀。漩涡振荡的时间长短会影响转染效率^[3]。

逆转录病毒液离心过滤后,与 6 孔板内 KG-1a 细胞共孵育,同时加入 polybrene。采用旋转法在 22℃、1 800 r/min 离心 45 min,可以加大病毒颗粒与 KG-1a 细胞的接触面,增加病毒感染效率。Polybrene 是一种多聚阳离子聚合物,广泛用于病毒介导的基因转染,有助于提高病毒感染效果^[4-5]。其作用机制可能是通过中和细胞表面唾液酸与病毒颗粒之间的静电排斥从而促进吸附作用。研究^[6]报道,

与用病毒原液比较,采用病毒浓缩液细胞感染效率可大大提高。但是,病毒浓缩提纯需要超速离心或购买商品化的纯化柱纯化。对于中小城市的实验室,一般并不具备进行病毒浓缩的超速离心机,而购买纯化柱纯化,太过昂贵。本研究采用未经浓缩的病毒原液感染白血病 KG-1a 细胞,其感染率确实低,只有 10% 左右。但是,经过嘌呤霉素稳筛,携带病毒载体的靶细胞阳性率可以高达 85%,完全满足后续的实验研究。

在病毒感染靶细胞过程中,还需要注意:polybrene 过量或嘌呤霉素过量都可能杀死靶细胞。因此,在实验时,最好先做预实验筛选出最佳的药物浓度,既不损伤细胞又可获得最佳的感染效率。此外,还有许多实验细节需要注意:转染质粒的量要足够多,以保证后面包装出足够量的病毒感染靶细胞;嘌呤霉素稳筛出靶细胞后,进行药物撤离时,必须逐渐降低药物浓度,而不能立刻将药物浓度降为零,否则,靶细胞非常容易死亡。

本研究采用价格低廉的磷酸钙转染法进行病毒包装。创新之处在于用旋转离心法将病毒和靶细胞共孵育,采用未经浓缩的病毒原液感染难转染的白血病细胞,并通过药物成功地稳筛出阳性细胞株,保证后续研究。这对于需要做基础研究但科研条件一般的实验室来说,具有重要的借鉴价值。

参考文献

- [1] Neumann S, Kovtun A, Dietzel I D, et al. The use of size-defined DNA-functionalized calcium phosphate nanoparticles to minimise intracellular calcium disturbance during transfection [J]. *Biomaterials* 2009, 30(35):6794-802.
- [2] Jiang M, Chen G. High Ca²⁺-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures [J]. *Nat Protoc* 2006, 1(2):695-700.
- [3] 况野,房有荣,刘丽,等.一种高效稳定的磷酸钙转染 HEK293T 细胞的方法 [J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)* 2015, 41(4):407-13.
- [4] Nasri M, Karimi A, Allahbakhshian Farsani M. Production, purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes [J]. *Cytotechnology* 2014, 66(6):1031-8.
- [5] Zhao C, Wu N, Deng F, et al. Adenovirus-mediated gene transfer in mesenchymal stem cells can be significantly enhanced by the cationic polymer polybrene [J]. *PLoS One* 2014, 9(3):e92908.
- [6] 黄会杰,葛岩,罗国兰,等.难转染悬浮细胞 OCI-LY8 慢病毒过表达稳定细胞株的构建 [J]. *广东医学* 2014, 35(9):1323-6.

网络出版时间: 2018-6-22 17:52 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180621.1453.030.html>

血小板参数在判断慢性丙型肝炎 RNA 水平中的价值

张 夏¹ 杜丹丹² 翟志敏³ 郭进京¹

摘要 以 78 例丙肝抗体阳性患者为研究对象,分析血小板计数(PLT)、血小板分布宽度(PDW)、平均血小板体积(MPV)、血小板压积(PCT)及丙肝 RNA 载量。HCV-RNA 阳性组 PLT 和 PCT 减低,PDW 和 MPV 增高($P < 0.001$);RNA 阳性组中低 HCV-RNA 载量组有更高的 PLT 和 PCT,更低的 PDW 和 MPV ($P < 0.05$);HCV-RNA 的高低和各参数间相关性分析显示 HCV-RNA 载量和 MPV 呈正相关性($r = 0.306$, $P = 0.026$)和 PLT($r = 0.493$, $P < 0.001$),PCT($r = 0.444$, $P = 0.001$)呈负相关性,和 PDW 相关性分析无统计学意义($r = 0.258$, $P = 0.063$)。血小板参数能辅助判断丙肝病毒复制的严重程度。

关键词 丙型肝炎;血小板参数;病毒载量

2018-04-25 接收

基金项目:教育部高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20103420110001)

作者单位:¹ 阜阳市人民医院检验科,阜阳 236000

² 阜阳市第二人民医院心内科,阜阳 236000

³ 安徽医科大学第二附属医院血液内科,合肥 230601

作者简介:张 夏,女,副主任检验师,本科;

郭进京,男,副主任检验师,硕士,责任作者,E-mail: 969521266@qq.com;

翟志敏,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: zzzm889@163.com

中图分类号 R 512.6+3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)08-1307-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.08.030

持续的丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV)感染引起的丙型肝炎易导致肝脏纤维化,进而发展成肝硬化,约 20% 患者转化为肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[1]。肝炎患者有较高的血小板减少的发生率,由于肝炎病毒感染和血小板的减少密切相关,美国血液学会免疫性血小板减少性紫癜诊疗指南推荐长期血小板减少的患者,应常规检测肝炎病毒^[2]。该研究旨在分析丙型肝炎患者 RNA 的载量和血小板相关参数的关系,为临床治疗方案的选择、病情疗效监测提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 回顾性分析 2014 年 1 月~2016 年 12 月阜阳市人民医院住院期间检测出丙肝抗体阳性并做丙肝 RNA 检测的患者 78 例。其中男 32 例,女 46 例,年龄 21~82 岁,中位年龄 54 岁,排除能引起三系减低的血液系统疾病及病例资料不完全

A low cost method of retrovirus infection in leukemic cells

Zhang Huijuan¹, Zhang Ling², Hu Rong¹, et al

(¹Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou 341000;

²School of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

Abstract To reduce experimental cost and solve the problem for hard to transfect vectors in suspension cells, this study takes an experiment for packaging retrovirus and infecting suspension cells such as leukemic cells. The retroviral vectors MSCV-PIG, Gag-pol and VSVG were transfected into 293T cells by calcium phosphate transfection method. Then, the unconcentrated viral liquids were incubated with KG-1a leukemic cells by centrifugation. At last, puromycin was used to screen stable cell lines. Infection of KG-1a cells with retrovirus stock solution for 48 h, the efficiency of infection was about 10%. However, the percentage of KG-1a cells which successfully infected by retrovirus was more than 85% after puromycin screening. The retrovirus is packaged by the low-cost calcium phosphate transfection method and the hard-to-transfected leukemic cells are successfully infected by unconcentrated viral liquids, which offers reference to fundamental researchers.

Key words leukemic cells; retroviral vector; calcium phosphate transfection method