

基于逆转录病毒载体的外源基因表达系统的评价和应用

叶玲玲^{1*}, 许建^{1,2*}, 李世崇¹, 刘红¹, 刘兴茂¹, 王启伟¹, 陈昭烈¹

1 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

2 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所, 北京 100021

摘要: 逆转录病毒表达系统是基因治疗研究和 RNA 干扰技术广泛采用的外源基因表达系统。文中以增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 基因的表达水平和稳定性为指标, 比较逆转录病毒表达载体 pQCXIN 和 pcDNA3.1(+) 表达质粒介导的外源基因在 HEK293 细胞和 CHO-K1 细胞的表达效率。病毒感染 HEK293 细胞和 CHO-K1 细胞的相对荧光强度 (Relative fluorescence intensity, RFI) 均约为对应的质粒转染细胞的 2 倍。多轮反复感染逆转录病毒表达载体能有效提高 HEK293 细胞表达 EGFP 的效率。HEK293 细胞经 4 轮病毒感染后的 RFI 值较 1 次病毒感染的 RFI 值约提高 2 倍。此外, 逆转录病毒表达载体介导的外源基因表达的稳定性优于质粒转染的外源基因表达。采用携带人重组活性蛋白 C (Recombinant human activated protein C, rhAPC) 基因的 pQCXIN 和 HEK293 细胞进一步验证了逆转录病毒载体介导的外源基因表达效率, 构建了 rhAPC 表达水平为 10~15 $\mu\text{g}/(10^6 \text{ cells}\cdot\text{d})$ 的 HEK293 细胞系。研究结果表明, 逆转录病毒表达系统是有应用价值的介导外源基因在哺乳动物细胞高效表达的技术途径。

关键词: 逆转录病毒, 载体, 外源基因, 表达, 生物技术药物

Evaluation and application of exogenous gene expression system based on retroviral vector

Lingling Ye^{1*}, Jian Xu^{1,2*}, Shichong Li¹, Hong Liu¹, Xingmao Liu¹, Qiwei Wang¹, and Zhaolie Chen¹

1 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

2 Cancer Institute and Hospital, Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China

Abstract: Currently, exogenous gene expression system based on retroviral vector has been widely used as efficient gene expression system in both gene therapeutic research and RNA interference. In this study, we evaluated the efficiency of exogenous gene expression mediated by the retroviral vector in mammalian cells. First, we constructed EGFP (enhanced green fluorescent protein) vector using pcDNA3.1(+) and retroviral vector pQCXIN as backbone vector respectively. Then, we transfected or infected HEK293 cells and CHO-K1 cells with above vector or corresponding retroviral virus, and measured the relative fluorescence intensity (RFI) of EGFP. The results showed that the RFI of the retroviral virus-infected cells was two

Received: October 8, 2010; **Accepted:** January 29, 2011

Supported by: National Major Special Program of New Drug Research and Development (No. 2009ZX09503-011).

Corresponding author: Zhaolie Chen. Tel: +86-10-66948818; Fax: +86-10-63841526; E-mail: chenlz23@sina.com

*These author contributed equally to this study.

“重大新药创制”科技重大专项 (No. 2009ZX09503-011) 资助。

times higher than that of the plasmid-transfected cells. Further experiments revealed repeated virus infection enhanced the expression of EGFP markedly, with RFI increasing twice after four rounds of virus infection. Furthermore, the EGFP expression in HEK293 cells mediated by the retroviral vector was more stable than transfected with plasmid pcDNA3.1(+). Finally, we further validated the efficiency of exogenous gene expression system based on the retroviral vector by expressing recombinant human activated protein C (rhAPC) in HEK293 cells. We obtained HEK293 cell lines with rhAPC expression between 10 and 15 $\mu\text{g}/(10^6 \text{ cells}\cdot\text{d})$. In conclusion, the exogenous gene expression system based on the retroviral vector is an alternative method for the generation of stable and high-expressing mammalian cell lines.

Keywords: retroviral, vector, exogenous gene, expression, biopharmaceuticals

生物技术药物是 21 世纪生物技术领域中引人关注的研究和产业热点。目前, 采用哺乳动物细胞表达系统生产重组蛋白药物已经成为生物制药产业的主流, 其市场份额已超过全球生物技术药物销售额的 2/3^[1-2]。在以哺乳动物细胞为生产系统的重组蛋白药物的生产中, 获得高效、稳定表达外源目的蛋白的细胞系是其中至关重要的环节^[3-4]。

逆转录病毒表达系统通常由包膜蛋白载体、逆转录病毒载体和包装细胞系组成。逆转录病毒载体携带的外源目的基因整合到宿主细胞时, 具有倾向发生于染色体开放区和转录活跃位点的明显特点^[5-6]。这一基因整合特性能有效地将外源目的基因整合入靶细胞基因组并使之稳定高效地表达。同时, 由于逆转录病毒可以与多种细胞表面蛋白结合而进入细胞, 其宿主细胞范围很广, 具有感染终末分化细胞的能力, 使其成为基因治疗研究、RNA 干扰和基因功能研究中广泛采用的基因转移载体^[7-9]。

2005 年, Bleck 采用逆转录病毒表达系统构建了抗体表达水平达到 1.6 g/L 的 CHO 细胞系^[10]。这一结果提示逆转录病毒表达系统有望成为构建高效、稳定表达外源蛋白的工程细胞系的新的技术途径。基于此, 本研究以增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因的表达水平和稳定性为指标, 考察逆转录病毒表达载体 pQCXIN 介导的外源基因在 HEK293 细胞和 CHO-K1 细胞的表达效率, 并采用 pQCXIN 载体构建了高效表达人重组活性蛋白 C (Recombinant human activated protein C, rhAPC) 的 HEK293 细

胞系。

1 材料与方法

1.1 细胞和质粒

HEK293 细胞和质粒 pcDNA3.1(+)、大肠杆菌 DH5 α 均购自美国 Invitrogen 公司; CHO-K1 细胞购自美国 ATCC; 逆转录病毒表达载体 pQCXIN、包膜蛋白载体 pVSV-G 和病毒包装细胞 GP2-293 均购自美国 Clontech 公司; 质粒 pcDNA3.1/EGFP 和 pcDNA3.1/rhPC 由本实验室构建。

1.2 试剂和培养基

限制性内切酶及 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司; DNA Marker、质粒提取试剂盒和 DNA 纯化回收试剂盒购自美国 Qiagen 公司; 转染试剂 LipofectamineTM2000 购自美国 Invitrogen 公司; G418 购自德国 Merck 公司; DMEM/F12 培养基和胎牛血清购自美国 HyClone 公司; 蛋白 C 标准品和蛋白 C 兔多克隆抗体购自美国 Sigma 公司; HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自上海莱博生物公司。

1.3 携带外源基因的 pQCXIN 逆转录病毒表达载体的构建

EGFP cDNA 和 rhAPC cDNA 分别从质粒 pcDNA3.1/EGFP 和 pcDNA3.1/rhPC 中经 Age I / Pac I 双酶切、琼脂糖凝胶电泳分离、胶回收纯化, 双粘端连入逆转录病毒表达载体 pQCXIN, 构建携带 EGFP 基因的逆转录病毒表达载体 pQCXIN/EGFP 和携带 rhAPC 基因的逆转录病毒表达载体 pQCXIN/rhAPC。

1.4 携带外源基因的重组逆转录病毒的制备和滴定

GP2-293 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中, 37 °C、5% CO₂ 贴壁生长于 75 cm² 培养瓶中, 当细胞的汇合度达到 90% 时, 分别用 pQCXIN/EGFP 和 pVSV-G、pQCXIN/rhPC 和 pVSV-G 进行双质粒共转染。二质粒摩尔比为 1:1, 总量 20 μg, 转染后 5 h 后更换新鲜的含 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养基, 48 h 后收获细胞培养上清。细胞培养上清经 0.45 μm 滤膜过滤器过滤除去细胞碎片后, 50 000×g、4 °C 超速离心 1.5 h, 倒掉上清, 按 100 倍浓缩加入含 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养基悬浮沉淀, -70 °C 超低温冷柜保存。病毒滴定参照文献进行, 并将病毒滴度定义为 GTU/mL (Gene transfer unit per ml)^[11]。浓缩后的病毒滴度为 1×10⁷~2×10⁷ GTU/mL。

1.5 HEK293 细胞和 CHO-K1 细胞的转染及筛选

1.5.1 阳离子脂质体介导的细胞转染

参照 LipofectamineTM2000 说明书, 转染前 1 天分别将 HEK293 细胞和 CHO-K1 细胞以 7.5×10⁵ 细胞/孔接种 6 孔板, 37 °C、5% CO₂ 培养至细胞形成 80%~90% 的汇合细胞层, 转染前更换不含血清的 DMEM/F12 培养基。取 10 μg 质粒 pcDNA3.1/EGFP 或 pcDNA3.1/rhPC 用不含血清的 DMEM/F12 培养基稀释至 250 μL; 用无血清 DMEM/F12 培养基稀释 10 μL LipofectamineTM2000 至 250 μL。将上述两种液体移入同一 EP 管中混匀, 室温避光放置 20 min 后分别加入对应的 6 孔板中摇匀, 37 °C、5% CO₂ 培养 6 h 后补加含 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养基继续培养 24 h。

1.5.2 重组逆转录病毒的细胞感染

重组逆转录病毒感染前 1 天分别将 HEK293 细胞和 CHO-K1 细胞以 7.5×10⁵ 细胞/孔接种 6 孔板, 37 °C、5% CO₂ 培养至细胞形成 80%~90% 的汇合细胞层, 感染前更换含 1% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基。取 200 μL 逆转录病毒 pQCXIN/EGFP 或

pQCXIN/rhAPC 分别加入对应的 6 孔板中摇匀, 37 °C、5% CO₂ 培养 6 h 后更换含 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养基继续培养 24 h。

1.5.3 转染阳性细胞的筛选和单克隆化

转染 24 h 后, 用 0.25% (W/V) 胰蛋白酶消化 HEK293 细胞并将各孔细胞分别接种至 24 孔板, 4~5 h 细胞贴壁后, 培养基换为含 0.6 g/L G418 和 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基。3~4 d 换液 1 次。直到 2 周后阳性克隆长出。胰酶消化, 扩大培养, 用于外源基因表达强度分析; 或采用有限稀释法将细胞接种于 96 孔板克隆生长、筛选 rhAPC 高效表达 HEK293 细胞系。

1.6 测定和分析方法

采用 Cedex AS20 细胞密度和活力自动分析系统 (Innovatis, Germany) 计数活细胞密度。采用流式细胞仪 (BD FACSCalibur, USA) 分析质粒转染细胞和病毒感染细胞 EGFP 的相对荧光强度 (Relative fluorescence intensity, RFI), 每个检测样品的细胞总数设定为 30 000。转染阳性细胞的 rhAPC 表达水平分析参照文献采用 ELISA 法进行^[12]。

2 结果与分析

2.1 pQCXIN 逆转录病毒表达载体的构建和鉴定

选用 Age I 和 Pac I 位点作为 EGFP cDNA 和 rhAPC cDNA 的克隆位点, 分别将 EGFP cDNA 和 rhAPC cDNA 连入 pQCXIN 中, 正确质粒结构如图 1A、1B 所示, 命名为 pQCXIN/EGFP 和 pQCXIN/rhAPC。所构建的表达载体经 Age I、Pac I 酶切鉴定, 分别出现与预期一致、长度约为 700 bp 和 1 300 bp 的片段 (图 2)。该结果经进一步的测序分析得到证实。

2.2 逆转录病毒表达载体介导的 EGFP 表达效率

分别用 pcDNA3.1/EGFP 质粒转染的 HEK293 细胞和 CHO-K1 细胞, 以及用经由 pQCXIN/EGFP 和 pVSV-G 共转染 GP2-293 细胞制备的携带 EGFP 基因

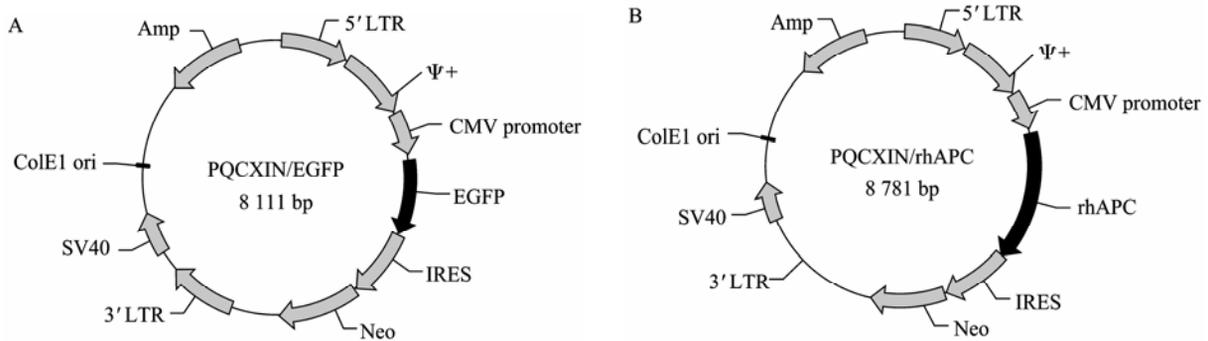


图1 pQCXIN 逆转录病毒表达载体的结构示意图

Fig. 1 Diagrams of recombinant retroviral vectors. (A) pQCXIN/EGFP retroviral vector. (B) pQCXIN/rhAPC retroviral vector.

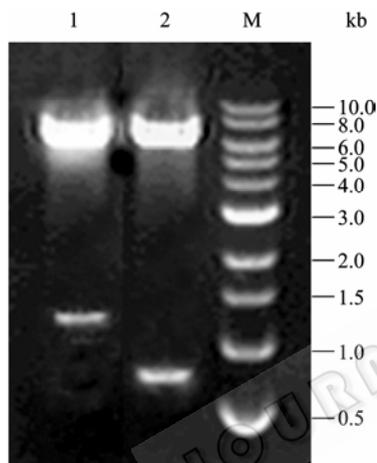


图2 pQCXIN 逆转录病毒表达载体的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant retroviral vectors by enzyme digestion. 1: pQCXIN/rhAPC retroviral vector digested with *Age* I and *Pac* I; 2: pQCXIN/EGFP retroviral vector digested with *Age* I and *Pac* I; M: DNA marker.

的重组逆转录病毒分别感染的 HEK293 细胞和 CHO-K1 细胞, 经过 400 mg/L G418 加压筛选 2 周, 收集细胞进行流式分析, 考察逆转录病毒表达载体介导的 EGFP 表达效果。HEK293 细胞经质粒转染或病毒感染后, EGFP 表达阳性细胞比例基本相同, 约占细胞总数的 80% 左右 (图 3A、B); 病毒感染 CHO-K1 的 EGFP 表达阳性细胞比例则明显高于质粒转染的 CHO-K1 细胞 (图 3C、D)。定量分析 EGFP 表达阳性细胞的相对荧光强度, 病毒感染 HEK293 细胞和 CHO-K1 细胞的 RFI 均约为对应质

粒转染细胞的 2 倍 (图 3E)。

2.3 逆转录病毒表达载体反复感染 HEK293 细胞的 EGFP 表达

将经由 pQCXIN/EGFP 和 pVSV-G 共转染 GP2-293 细胞制备的携带 EGFP 基因的重组逆转录病毒一次感染后的 HEK293 细胞的 RFI 值设定为 1, 并据此考察逆转录病毒表达载体多轮反复感染 HEK293 细胞的 EGFP 表达。图 4 为 HEK293 细胞经 2~4 轮逆转录病毒表达载体反复感染后流式细胞分析的 RFI 相对值。RFI 的相对值随逆转录病毒表达载体感染次数的增加而升高, 4 轮病毒感染 HEK293 细胞的 RFI 值较 1 次病毒感染 HEK293 细胞的 RFI 值约提高 2 倍 (图 4)。结果提示, 多轮反复感染逆转录病毒表达载体能通过增加 HEK293 细胞中 EGFP 基因的拷贝数提高 EGFP 的表达效率。

2.4 逆转录病毒表达载体介导的 EGFP 表达稳定性

表 1 为质粒转染或逆转录病毒表达载体感染的 HEK293 细胞在撤除 G418 筛选压力后连续传代过程中的 RFI 值变化。经过 6 次连续传代, 质粒转染 HEK293 细胞的 RFI 值由 290.47 降至 88.89, 下降幅度为 69.4%; 经过 1 到 4 轮病毒感染 HEK293 细胞的 RFI 值的下降幅度分别为 44.5%、22.4%、37.5% 和 21.5%。结果提示, 逆转录病毒表达载体介导的外源基因表达的稳定性优于质粒转染的外源基因表达。

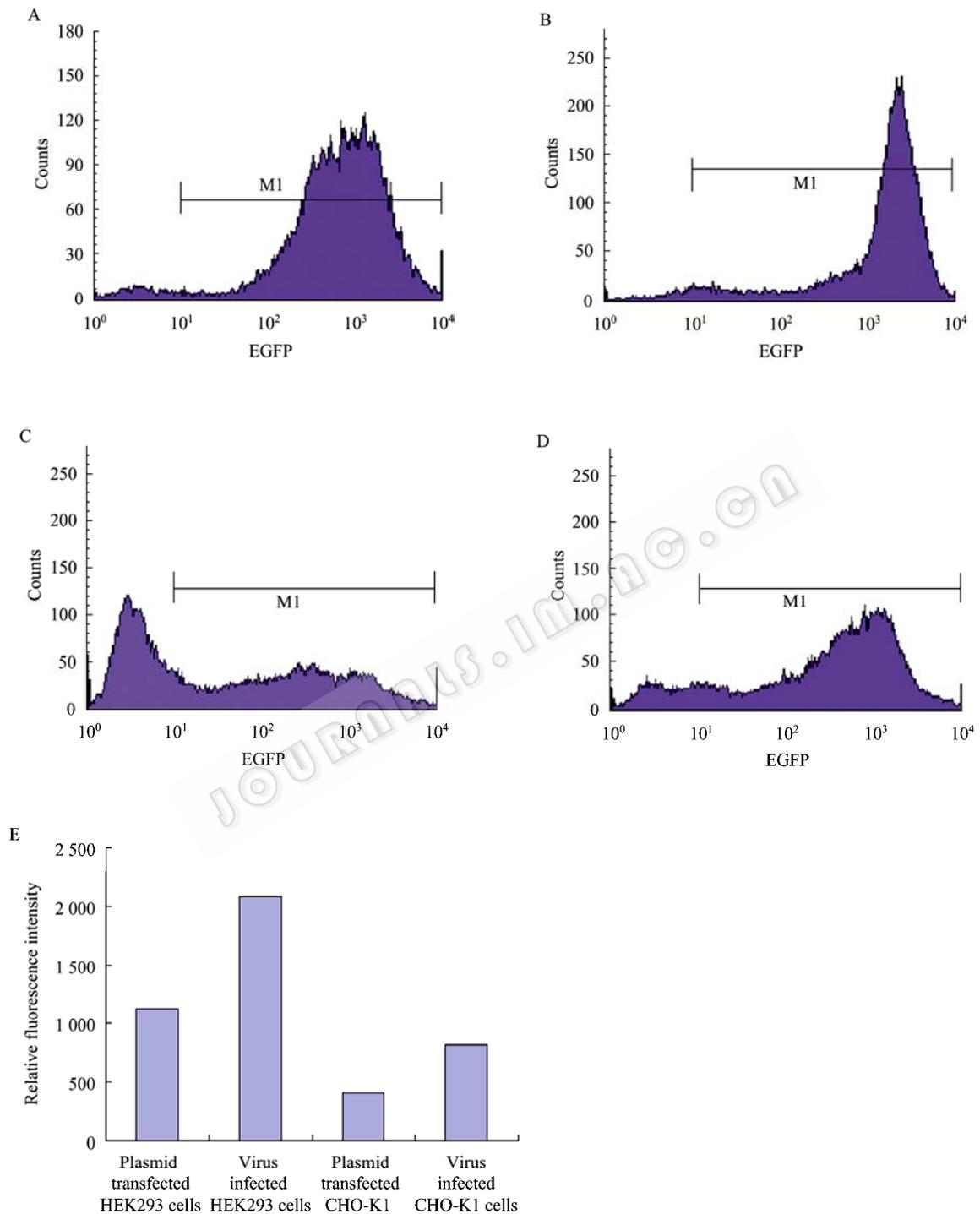


图3 质粒转染或病毒感染介导的 EGFP 在 HEK293 细胞和 CHO-K1 细胞表达的流式细胞分析

Fig. 3 Analysis the effect of EGFP expression in both HEK293 and CHO-K1 cells via plasmid transfection or virus infection. (A) Plasmid transfected HEK293 cells. (B) Virus infected HEK293 cells. (C) Plasmid transfected CHO-K1 cells. (D) Virus infected CHO-K1 cells. (E) RFI in both HEK293 and CHO-K1 cells via plasmid transfection or virus infection. Results are expressed as the mean value of duplicate samples from different experiment. EGFP: enhanced green fluorescent protein.

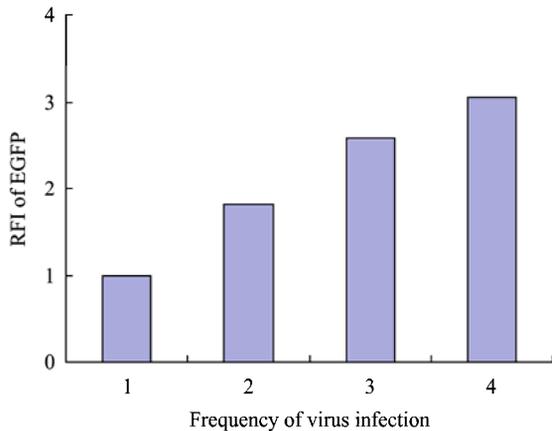


图 4 HEK293 细胞经多轮反复逆转录病毒载体感染的 EGFP 表达情况

Fig. 4 EGFP expression of the HEK293 cells with repeated virus infection. Results are expressed as the mean value of duplicate samples from different experiment.

2.5 逆转录病毒表达载体介导的 rhAPC 高效表达

分别用经由 pQCXIN/rhAPC 和 pVSV-G 共转染 GP2-293 细胞制备的携带 rhAPC 基因的重组逆转录病毒感染 HEK293 细胞和 pcDNA3.1/rhAPC 质粒转染 HEK293 细胞。经过 400 mg/L G418 加

压筛选 2 周, 病毒感染和质粒转染 HEK293 细胞的 rhAPC 表达水平分别为 326.4 ng/(10⁶ cells-d) 和 8.6 ng/(10⁶ cells-d), 逆转录病毒载体介导的 rhAPC 效率明显高于质粒转染介导的 rhAPC 表达 (表 2)。在 96 孔板采用有限稀释法对病毒感染 HEK293 细胞进行克隆并经 ELISA 筛选, 获得了 3 株 rhAPC 表达水平为 10~15 μg/(10⁶ cells-d) 的 HEK293 细胞系。

3 讨论

HEK293 细胞为来源于人胚胎的转化细胞系, 其不仅体外培养性状良好, 且不存在啮齿类病毒感染的潜在威胁。此外, HEK293 细胞具有 CHO 细胞缺乏的 γ-羧基化修饰和有效水解原肽以及表达完全人型糖基化的重组蛋白的能力。HEK293 细胞的上述优点使其成为日益受到重视的生物技术药物生产系统, 采用 HEK293 细胞生产的重组蛋白药物和重组腺病毒载体也已分别获得 FDA 和 SFDA 的批准上市^[3]。

表 1 质粒转染或病毒感染的 HEK293 细胞在连续传代过程中的 RFI 值变化

Table 1 Change of RFI of both plasmid transfected and virus infected HEK293 cells during continuous passage

Treatment	RFI of the HEK293 cells at different passage					
	1	2	3	4	5	6
Plasmid transfection	290.47	487.38	212.39	242.33	91.31	88.89
One time of virus infection	455.25	754.29	298.15	319.32	246.28	252.69
Two times of virus infection	699.56	861.81	495.96	703.70	503.49	542.69
Three times of virus infection	977.77	1168.09	706.38	831.90	554.47	611.69
Four times of virus infection	923.55	1234.79	551.97	853.08	708.08	724.75

表 2 ELISA 检测病毒感染和质粒转染的 HEK293 细胞的 rhAPC 表达水平

Table 2 rhAPC expression in HEK293 cells infected by retrovirus or transfected by recombinant plasmid by ELISA

Vector type	Dilution folds	OD ₄₅₀	rhAPC expression (ng/(10 ⁶ cells-d))	Relative expression of rhAPC
pcDNA3.1/rhPC	1	0.331	8.60	1.0
PQCXIN/rhPC	10	0.970	326.40	38.0

哺乳动物细胞的基因组非常庞大, 其中包含为数众多的外源基因整合位点, 如 CHO 细胞基因组中大概有 15 000 个整合位点, 但其中能使外源基因高效表达的转录活跃位点为数不多, 大约只有 15 个位点^[13]。通常的质粒转染等方法只能将外源目的基因随机整合到宿主细胞基因组内, 因此, 即使经过大量的筛选, 获得高效表达外源目的基因的细胞系的几率仍非常低。

逆转录病毒载体携带的外源目的基因整合到宿主细胞时, 整合位点通常位于 DNase I 高敏感性区域内的染色体开放区和转录活性区, 这些区域与 DNA 的复制、转录和重组密切相关^[14]。本研究的结果证实, 对比质粒转染介导的外源基因表达, 逆转录病毒表达载体在介导外源基因表达的效率和稳定性方面均有明显的优势。此外, 逆转录病毒表达载体介导的外源基因表达还可通过病毒的多轮感染有效地提高整合于宿主细胞转录活性区的外源基因的拷贝数。这一基因整合特性为外源目的基因的高效表达提供了可能, 并由此大大提高了获得外源基因高效表达细胞系的几率。虽然, 逆转录病毒表达载体介导外源基因高效表达需要以操作相对繁琐的高滴度病毒制备为前提, 但仍不失为一种有发展潜力和应用前景的、能有效提高外源基因在哺乳动物细胞表达效率的技术途径。

REFERENCES

- [1] Dingermann T. Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges. *Biotechnol J*, 2008, 3(1): 90-97.
- [2] Dutton G. Trends in monoclonal antibody production. *Gen Eng Biotechnol News*, 2010, 30(4): 22-27.
- [3] Durocher Y, Butler M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20(6): 700-707.
- [4] Strohl WR, Knight DM. Discovery and development of biopharmaceuticals: current issues. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20(6): 668-672.
- [5] Bushman F, Lewinski M, Ciuffi A, et al. Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(11): 848-858.
- [6] Daniel R, Smith JA. Integration site selection by retroviral vectors: molecular mechanism and clinical consequences. *Hum Gene Ther*, 2008, 19(6): 557-568.
- [7] McTaggart S, Al-Rubeai M. Retroviral vectors for human gene delivery. *Biotechnol Adv*, 2002, 20(1) 1-31.
- [8] Størvold GL, Gjernes E, Askautrud HA, et al. A retroviral vector for siRNA expression in mammalian cells. *Mol Biotechnol*, 2007, 35(3): 275-282.
- [9] Löw R. The use of retroviral vectors for tet-regulated gene expression in cell populations. *Methods Mol Biol*, 2009, 506: 221-242.
- [10] Bleck GT. An alternative method for the rapid generation of stable, high-expressing mammalian cell lines. *Bioproc J*, 2005, 4: 43-51.
- [11] Liu H, Liu XM, Li SC, et al. A high-yield and scaleable adenovirus vector production process based on high density perfusion culture of HEK293 cells as suspended aggregates. *J Biosic Bioeng*, 2009, 107(5): 524-529.
- [12] Boyer C, Rothschild C, Wolf M, et al. A new method for the estimation of protein C by ELISA. *Thromb Res*, 1984, 36(6): 579-589.
- [13] Thyagarajan B, Calos MP. Site-specific integration for high-level protein production in mammalian cells. *Methods Mol Biol*, 2005, 308: 99-106.
- [14] Mooslehner K, Karls U, Harbers L. Retroviral integration sites in transgenic Mv mice frequently map in the vicinity of transcribed DNA regions. *J Virol*, 1990, 64(6): 3056-3058.