

提高H9N2亚型禽流感病毒的拯救效率条件的优化

贾佳 赵永祥
(广西医科大学 广西南宁 530000)

摘要:目的:在原有的8质粒转染体系的基础上,提高H9N2亚型禽流感病毒8质粒转染的效率。方法:以脂质体细胞转染法,用293T细胞和MDCK细胞共转染A/Chicken/Jiangsu/SH14(H9N2)禽流感病毒的8个连接在PHW2000载体上的反向遗传质粒,并且NS片段携带有GFP绿色荧光基因。通过TPCK胰酶的浓度,DMSO,尿囊液的作用,以及转染后孵育时间来摸索出最佳的转染条件。转染后48h用倒置荧光显微镜检测绿色荧光,并计算出转染效率。结果:通过统计学分析结果可见,转染后8h,使用DMSO处理后再加入1ug/mL的TPCK胰酶,转染效率最高,绿色荧光表达的最多。结论:我们通过联合DMSO和TPCK的方法一定程度上提高了H9N2亚型禽流感病毒8片段转染的效率。

关键词:转染 H9N2亚型禽流感病毒 TPCK胰酶 DMSO

中图分类号:R51

文献标识码:A

文章编号:1674-2060(2016)04-0134-01

随着反向遗传技术的发展,卢建红等^[1]将H9N2的八个片段连接到PHW2000载体上,利用八质粒转染体系成功转染出具有有效价的病毒。但是由于其在细胞上转染的效率低,导致重组病毒拯救效率低。所以本文通过多种方案摸索,希望能够优化出一种更加适合H9N2亚型禽流感病毒拯救的细胞转染方法。

1 材料和方法

1.1 材料

8个反向遗传质粒由本实验室提供;DMEM完全培养基(含10%胎牛血清和1,000 units/mL青霉素/链霉素), PolyFect[®]Transfection Reagent(Qiagen), TPCK胰酶购自Sigma公司,DMSO(上海浩然生物公司),SPF鸡胚购于北京梅里亚公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒的制备

将已经构建好的质粒按照常规方法进行转化转入DH5a大肠杆菌感受态体内,用LB培养基扩大培养12~16h后,按照质粒抽提纯化试剂盒提取质粒。测定质粒的浓度,所得质粒A260/A280比值在1.8~2.0之间。

1.2.2 细胞培养

人肾上皮细胞293T和犬肾细胞MDCK均来自本实验室传代细胞,用10%DMEM培养基在37℃、5%CO₂条件下培养。

选择处于生长旺盛阶段的细胞用于转染。细胞用胰酶消化后,293T细胞

MDCK细胞按照比例传代至6孔板内培养,待细胞密度达到60~80%后开时转染。

1.2.3 转染

参考脂质体说明书和潘宁^[2]的脂质体转染条件优化方案,在灭菌的1.5mL指形管中将各500ng的8个反向遗传质粒按照1:1与100uL Opti-MEM混匀相同质量的,再加10uL脂质体,室温静置10 min,加入600uL10%DMEM完全培养基终止反应,将DNA-lipo复合体逐滴均匀地加入细胞培养液中,6h后加入0.5、1.0、1.5、2.0ug/ml的TPCK胰酶。或者是100uL尿囊液、DMSO(用PBS稀释成10%DMSO500uL覆盖在细胞上2.5min后,弃液加2mL无抗无血的DMEM,12h后换成10%DMEM)^[3]、10%DMSO+100uL尿囊液、10%DMSO+TPCK胰酶。

1.2.4 GFP表达的检测及转染效率的评价

细胞转染24h后在488nm的倒置荧光显微镜拍照检测GFP的表达情况,每个视野分别用可见光和488nm激发光拍照。绿色荧光蛋白阳性的细胞占总细胞的比例即为转染效率。在每个实验条件下进行2次独立试验,每次试验随机选取4个视野,以平均值±方差来表示(x±SD)表示。数据分析采用SPSS 15.0软件进行方差分析。

2 结果与分析

通讯作者:赵永祥

2.1 TPCK胰酶的量对转染效率的影响

六孔板每孔细胞接种密度为2×10⁵,293T细胞与MDCK细胞比例为3:1,各质粒量为500ng。按照上述标准的脂质体转染方法,在转染6h后加入0.5、1.0、1.5、2.0、2.5ug/mL的TPCK胰酶。转染48h后检测转染情况。结果显示0.5ug/mL(78.0±4.1%),1ug/mL(85.0±6.0%),1.5ug/mL(73.0±6.0%),2ug/mL(68.0±0.4%),故1ug/mL的TPCK胰酶转染效率最高。

2.2 DMSO 和尿囊液对转染效率的影响

按照上述方法转染6h后,分别加入1ug/mL的TPCK胰酶、100uL的尿囊液、10%的DMSO、10%DMSO+100uL尿囊液、10%DMSO+1ug/mL的TPCK胰酶。结果显示用10%DMSO处理并加1ug/mL的TPCK胰酶效率最高。

2.3 孵育时间对转染效率的影响

所有条件按照上述最佳筛选结果。细胞与脂质体-DNA 孵育时间从4h ~ 24h,结果显示8h为最佳孵育时间(P<0.01)

2 讨论

绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)^[4]是在美国西北海岸所盛产的水母中所发现的一种蛋白质。利用该标记不仅效率高,对细胞无毒害作用,且不影响细胞的增殖和分化,是较为理想的标记物。细胞转染技术是研究特定的基因表达调控及基因治疗的重要技术之一,选择合适的细胞转染方法对提高细胞转染率至关重要。低致病性的弱毒在进行细胞转染时,必须要加入TPCK胰酶酶切生成有活性的HA,病毒才能有效的感染细胞。DMSO可以可逆的干扰核孔蛋白的疏水结构而增加核孔的通透性,促进pDNA进入细胞核从而提高转染效率^[5]。本实验联合使用DMSO和TPCK胰酶,提高了H9N2亚型禽流感病毒的转染效率。为重组H9N2禽流感病毒的拯救提高了一定的效率。

参考文献

- [1] 卢建红,邵卫星,龙进学,刘玉良,石火英,刘秀梵.H9N2禽流感病毒反向遗传系统转录/表达载体的构建和验证.中国病毒学 2005,20(4):388~392.
- [2] 潘宁,章蔼然,侯颖春.脂质体介导法转染肿瘤细胞效率的优化.生物技术 2008,18(6):47~50
- [3] 林建,朱立麒,秦涛,庾庆华,杨倩.DMSO 和薄荷醇增强脂质体介导的Bcap-37细胞转染效率的研究.中国畜牧兽医学会动物解剖学及组织胚胎学分会第十七次学术研讨会论文集(下): 2012; 2012.
- [4] 赵华,梁婉琪,杨永华,张大兵.绿色荧光蛋白及其在植物分子生物学研究中的应用.植物生理学报 2003, 39(2):171~178.
- [5] 石岩.NLS 和 DMSO 提高核糖体区打靶载体转染效率的研究.中南大学; 2009.