

腺病毒的包装，纯化和感染

技术背景： Adeasy 系统利用了腺病毒具有的高感染能力，可高度浓缩等优点，并破坏了腺病毒基因组中的早期基因 E1，使之成为较为安全、高效的病毒载体。利用带有 E1 基因的 293 细胞作为包装细胞，通过倍比扩增，富集病毒颗粒，并通过 CsCl 梯度离心，透析进行分离纯化。对绝大多数的细胞株可以达到近乎 100% 的感染效率。但需要指出的是 Adeasy 同样具有所有病毒载体或转染试剂都不可避免的细胞毒性问题。

所需试剂：

- 293 细胞；
- 重组好的腺病毒质粒；
- Pac I 限制性内切酶；
- 质粒回收相关试剂；
- 细胞培养、转染相关试剂；
- TBS: 10mM Tris, 0.9% NaCl, pH8.1;
- 40% CsCl: 28.45 g CsCl 溶于 42.7 ml 的 TBS 中，4 度保存；
- 15% CsCl: 9.085 g CsCl 溶于 47.69 ml 的 TBS 中，4 度保存；
- Beckman 离心管：14*89 mm，SW41 转头；
- Polybrene (sigma)，10 mg/ml；
- 透析袋：Spectrum Co.（成卷供应，带少量甘油，硫化物与重金属），MW=8000~14400；
- 灭菌甘油。

操作流程：

1. 293 细胞(E1-transformed human embryonic kidney cells 在转染前 24 小时接种于 1 或 2 个 60 mm 培养盘中，使之在转染时细胞汇合率为 50-70%；
2. 在转染前，用 Pac I 处理目的质粒（一般一个 60 mm 细胞盘需要 6 μ g DNA）。处理后质粒用乙醇沉淀并重悬于 20 μ l 无菌水中；
3. 用 PEI 或其他转染试剂将 6 μ g Pac I 处理过的质粒转染细胞；

4. 8 个小时后移去混合液，加入 4 ml DMEM 完全培养液（10% CBS，1% Pen/Strep）；
5. 在转染后 7 到 10 天用细胞刮（而不是胰酶）将细胞从瓶中刮下并移入 50ml 锥形管。离心后将细胞重悬于 2.0 ml PBS 或全培液中。于液氮中冻结细胞，37°C 水浴中溶解，剧烈振荡。此步骤共进行 4 次。注意保存时不要反复冻融，可保存于-20°C；
6. 将 293 细胞以 50-70% 的汇合率铺于 60 mm 培养盘中，以 30-50% 的体积比加入含病毒上清液。在感染后 2-3 天即可看到明显的细胞裂解或 CPE 现象；
7. 在有 1/3 到 1/2 的细胞脱离漂浮时，通常是感染后 3-5 天收集病毒。可进一步通过 Western blot 或 PCR（5 μ l 病毒上清加上 10 μ l PCR-grade Protease K，55°C 消化 1 小时，然后煮沸样品 5 min，离心后取 1-2 μ l 进行 PCR 反应）证实重组腺病毒的存在；
8. 按步骤 5 的方法收集病毒上清。在这种情况下一般至少可收集到 10^7 infectious particles/ml 的病毒。每轮的扩增应能提高一个数量级的梯度；
9. 为了进一步扩增，将步骤 8 获得的病毒上清进一步感染 100 mm 培养盘的细胞，按步骤 5 的方法收集病毒，并进而将其感染 150 mm 细胞培养盘中的 293 细胞，以获得足够量的病毒；
10. 将 15% CsCl 和 40% CsCl 加入 Beckman 离心管中制备 CsCl 梯度溶液；
11. 将最终富集病毒颗粒的病毒上清滴加于 CsCl 梯度溶液上；
12. 超速离心，30000 rpm，4 度离心 16 个小时；
13. 离心后，应有两条带。位置较高，颜色较弱的条带主要为腺病毒空壳，不具感染能力；位置较低，颜色较亮的条带含有我们需要收集的活病毒颗粒。用 16 号针头将这一条带收集；
14. 在 TBS 中透析一小时，随后在含有 10% 甘油的 TBS 中透析两次，每次一小时；
15. 将纯化的腺病毒分装于 EP 管中；
16. 在 Eppendorf Biophotometer 中测量透析液中的总蛋白量，1 μ g 病毒蛋白相当于 4×10^9 病毒颗粒；
17. 长期保存于-70 度中，短期可保存于 4 度，切忌反复冻溶；

18. 由于腺病毒对不同细胞株的感染效率存在差异，且考虑到病毒颗粒的细胞毒副作用，通常通过梯度感染的方法确定所需的病毒用量。以相对细胞数 1: 1, 10: 1, 100: 1, 1000: 1 的病毒颗粒感染靶细胞；加入相对培养液体积 1: 1000 的 Polybrene。在 37 度下平板离心 30 分钟；
19. 感染 8~12 小时后换液。将含有病毒的培养液小心移入含有消毒液的废液缸中，加入适量全培液。

参考文献：

1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 95, pp. 2509–2514, March 1998, A simplified system for generating recombinant adenoviruses.
2. Current Protocols in Human Genetics (2004) 12.4.1-12.4.25.