维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2003年第12卷第5期
J Regional Anat & Operative Surg, 2003, Vol. 12, No. 5

一种从培养上清获得高滴度腺病毒的方法

杨世昕，吴 军，罗高兴，易绍萱，贺伟峰，黄赤兵，周立新，李 彦，张 宁，陈希炜，张小蓉
（第三军医大学附属西南医院烧伤研究所，重庆市器官移植基础研究所，重庆 400038）

［摘 要］**目的** 寻找一种有效的提高腺病毒滴度而又不损害其活性的方法。**方法** 腺病毒原液升华冻干后溶解稀释，通过斑点形成实验和免疫组化方法检验其感染活性。**结果** 升华冻干后稀释的腺病毒液感染滴度达到 4.4×10^{12} pfu。**结论** 冻干、稀释是一种提高腺病毒滴度的有效方法。

［关键词］冻干；滴度；腺病毒
［中图分类号］R373 ［文献标识码］A ［文章编号］1672－5042(2003)05－0339－02

A new method to acquire the tite of adenoviruses from culture

YANG Shi-xin, WU Jun, LUO Gao-xing, YI Shao-xuan, HE Wei-feng, HUANG Chi-bing, ZHOU Li-Xing, LI Yan, ZHANG Ning, CHENG Xi-wei, ZHANG Xiao-rong
(Institute of Burn Research, Institute of Transplantation Research, Southwestern Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstracts: Objective To search a new method to improve the tite of adenoviruses without impairing its affection capacity. **Methods** The primary succus of adenoviruses was condensed by sublimation drying and dilution. Its affection was determined by examination of plaque-forming units and imunohistochemical assay. **Results** The tite of adenoviruses could reach as high as 4.4×10^{12} pfu. **Conclusion** Sublimation drying and dilution is a new and efficient method to improve the tite of adenoviruses.

Keywords: sublimation drying; tite; adenoviruses

为了提高腺病毒的滴度，将除蛋白后的腺病毒原液升华冻干再溶解稀释，最后除盐，简称冻干稀释法。最后通过斑点形成实验、病毒液转染细胞的免疫组化检验所得病毒液的感染活性，以证明该方法的有效性。

1 材料

LGJ3－I冷冻干燥机购自军事医学科学院实验仪器厂，25 mm注射式滤器购自 Pall 公司（德国），5 ml 亲合层析柱 HiTrap Protein A 为 Pharmacia 公司产品、凝胶层析柱 PD-10 为 Pharmingen 公司产品，CTLA4Ig-重组腺病毒（Ad-CTLA4Ig）由本室构建[1-2]，293 细胞购自 ATCC（美国），鼠抗人 CTLA-4 单抗购自 Pharmingen 公司，DAB 显色剂（紫蓝型）购自博士德公司。

2 方法

2.1 重组腺病毒的制作

CTLA4Ig-重组腺病毒（Ad-CTLA4Ig）在 293 细胞中进行大量反复扩增，收集培养上清及细胞，反复冻融破碎细胞，10 000 r/min 4 ℃离心 20 min，0.22 μm 膜除菌，经亲合层析柱制作成为腺病毒原液。

［基金项目］国家自然科学基金资助项目（30200264）；国家基金委重点项目（39993430-2）
［收稿日期］2003－10－08 ［修回日期］2003－11－02

2.2 冻干、稀释

将腺病毒原液 500 ml 分装于 10 个直径为 15 cm 广口消毒玻璃器皿置于－60 ℃速冻干机，再冷冻干燥，在 10.3 kPa 压力下真空保持，抽真空 25 h。取出标本收集并用双蒸水溶解稀释成 25 ml，－70 ℃保存。

2.3 病毒滴度的测定

用空斑实验法测定转染液病毒滴度[3]，每一可观察并可区分的细胞病变称为一个蚀斑形成单位（Plaque Forming Unite, PFU）。按以下公式计算病毒滴度：病毒滴度（PFU/ml）＝［每孔细胞数 × 病毒原液稀释度 × 10 个病毒/细胞］/加入病毒液的量（ml）。

2.4 转染

人成纤维细胞依文献[4]行原代培养获得，选用第 3－5 代细胞作为实验用细胞。将冻干稀释制作的病毒转染液加入生长状态良好、增殖活跃的人成纤维细胞于 37 ℃ CO_2 细胞培养箱转染 8 h，洗去转染液加入含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养 24 h。

2.5 免疫细胞法检测细胞 CTLA-4Ig 表达

将转染的人成纤维细胞进行免疫组化法检测 CTLA-4Ig 表达。方法如下：细胞片用多聚甲醛固定，小牛血清封闭后，加 1∶1 000 鼠抗人 CTLA-4 单抗 4℃过夜；滴加 1∶1 000 羊抗鼠 IgG-HRP 室温孵育 30 min；滴加配制好的 DAB 显色剂 10 min，脱水，封片。同时用未转染人成纤维细胞做空白对照。在显微镜下

维普资讯 http://www.cqvip.com

观察、照相。

3 结果

3.1 滴度测定

根据公式计算，病毒原液滴度为 7×10^8 pfu/ml(公式假定10个病毒感染一个细胞)，冻干稀释后的病毒滴度为 4.4×10^{12} pfu/ml。

3.2 转染细胞形态观察

转染293细胞逐渐圆缩，堆聚、漂浮，由于局部细胞的脱落漂起而出现无细胞区，其周边有细胞附着即病毒病变空斑，常称空斑。而转染人成纤维细胞贴壁生长形态良好，台盼蓝拒染只有0.1%的细胞染成蓝色，与未转染相应细胞在形态、活性上均未见明显差异。

3.3 免疫组化分析

免疫组化染色显示，胞浆棕黄为阳性细胞。人成纤维细胞转染8 h后培养24 h阳性细胞为20%，60 h达高峰约70%细胞阳性。

4 讨论

近年来基因治疗研究取得了迅速的发展，其中腺病毒具有制备简单、宿主范围广泛、感染率高、安全性好等特点，近年已发展成基因治疗临床实验中的常用载体[5]，而且既能感染正在分裂的细胞，又能感染非分裂细胞，是活体基因治疗的首选病毒载体[6]。基因治疗的首要环节是如何简便而高效地将外源基因导入靶器官，而腺病毒必须达到足够的滴度才能有效地转染组织器官，以往我们的研究[7-8]证明用腺病毒载体在体内外都要求达到足够的滴度才能有效转染，所以如何有效的收集腺病毒和提高腺病毒的滴度在基因治疗中就起了非常关键的作用。用传统的密度梯度方法纯化病毒不仅耗时、繁琐，而且获得的存活病毒量很低。同时复制缺陷的重组腺病毒转染组织器官后在表达外源基因的同时，也表达低水平的病毒蛋白。这就要求提高病毒颗粒中活性病毒的含量，这样用较低剂量病毒即可获得高剂量病毒的治疗效果，同时又可减少腺病毒的毒性反应。因此如何提高腺病毒的滴度而又不损害其活性成了需要解决的一个课题。

氯化铯密度梯度离心(通常为40 000 r/min, 38 h)法回收与纯化病毒，通常可获得 1×10^{11} pfu 的高滴度病毒[9]。从实验证明冷冻干燥技术将病毒原液浓缩50倍而病毒滴度高达 3×10^{12} pfu；免疫组化结果显示该病毒可使80%人成纤维细胞转染表达，表明其具有很高的转染效率。本方法在冻干浓缩过程使病毒生命活动处于半永久性的休眠状态，不发生和少发生变异，而氯化铯密度梯度离心因纯化过程中超高速度长时间离心处理可撕裂许多病毒表面主要受体蛋白，从而使部分病毒失去感染性。

冷冻干燥，全名为真空冷冻干燥，又称冻干或升华冻干。它是将液体先冻结成固体，然后在低温和真空的条件下，从冻干状态不经过液体而直接升华除去水分的一种干燥方法。该技术在生物制品干燥过程中能较好地保持物质的生物和生命性，普遍用于细菌、真菌和一些病毒长期保存。我们将该技术通过冻干腺病毒提取液，将获得病毒冻干粉剂加以稀释从而获得高滴度的病毒转染液，这种简单的方法可以有效地提高腺病毒的滴度，在腺病毒量很少的情况尤其适用。该方法的缺点在于冻干过程中没有清除病毒提取液中的蛋白和电解质，所以采用该方法只能应用于体外实验研究，要获得高纯度的体内研究用病毒还有待进一步改进。

[参考文献]

[1] 易绍萱，吴 军，姜 庆，等. 人CTLA4胞外区cDNA的克隆及Ig融合蛋白表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报，2000，22(9)：834-837.

[2] 罗高兴，吴 军，易绍萱，等. 重组腺病毒载体局部转染介导CTLA4Ig延长小鼠移植皮肤的存活[J]. 中华烧伤杂志，2000，16(1)：37-39.

[3] 徐国恒，凌 雁，万 有，等. 人TH基因重组腺病毒的构建及生物学活性研究[J]. 神经解剖学杂志，1998，14(4)：315-317.

[4] 刘鼎新，吕证宝. 细胞生物学研究方法与技术[M]. 北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1990. 160-162.

[5] Caruso M, Khiem PN, Kwong YL, et al. Adenovirus-mediated interleukin-12 gene therapy for metastatic colon carcinoma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(21): 11302-11306.

[6] Verma IM, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects[J]. Nature, 1997, 389(6648): 239-242.

[7] 杨世昕，吴 军，罗高兴，等. 重组腺病毒介导CTLA4Ig基因在人源性细胞中的表达[J]. 重庆医学，2001，30(5)：385-387.

[8] 杨世昕，吴 军，卞修武，等. CTLA4Ig基因表达对鼠皮肤移植免疫抑制作用的研究[J]. 第三军医大学学报，2001，23(7)：759-761.

[9] 李建光，贞松贤二. 腺病毒介导性基因导入血管平滑肌细胞[J]. 临床心血管病杂志，1999，15(2)：81-84.

(编辑：张集建)