

构建具有巨细胞病毒 (CMV) 启动子的杆状病毒高效表达载体并利用其在鸡胚原代细胞中表达 eGFP 基因

宋姗姗, 葛菁萍*, 李梅, 高冬妮, 金丽颖, 安琦, 平文祥, 楼庄伟

微生物黑龙江省高校重点实验室, 黑龙江大学生命科学学院, 哈尔滨 150080

摘要: 【目的】杆状病毒载体在哺乳动物细胞中不复制, 具有极高的生物安全性, 而通过引入细胞特异性启动子、“病毒假型化”、添加不同功能调控元件等优化手段, 杆状病毒可转导的细胞类型明显增多、转导效率明显增高。优化的重组杆状病毒可以在鸡细胞中表达, 确定重组杆状病毒在鸡细胞中高效表达的条件, 为禽类基因工程疫苗的开发奠定了坚实的基础。【方法】本研究以增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced Green Fluorescent Protein, eGFP) 为报告基因, 构建含巨细胞病毒 (Cytomegalovirus, CMV) 启动子启动的重组转座载体, 并且通过病毒假型化 (TM/CTD of VSV-GED)、添加转录后调控元件 (Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, WPRE) 和腺病毒反向重复序列 (Inverted terminal repeats, ITRs) 等手段优化重组杆状病毒表达载体, 最终利用重组杆状病毒对鸡胚原代细胞的侵染进行 eGFP 的表达, 比较分析不同重组载体对蛋白表达水平的影响。【结果】eGFP 表达结果显示, 12 h 便可在倒置荧光显微镜下检测出 eGFP 的表达, 随着时间的延长, eGFP 表达效率先增加后降低。经过 VSVGED 病毒假型化的重组杆状病毒转导效率从 36% 增加至 48.2%。添加转录后调控元件 WPRE 的重组杆状病毒介导 eGFP 的表达效果与添加 10 mmol/L 丁酸盐法基本相同, 但对细胞几乎没有毒性。从 72 h 内的 eGFP 表达强度看, 只有添加 ITRs 元件的重组杆状病毒的表达强度随着时间的延长而极缓慢增加。【结论】eGFP 表达结果显示, 利用 VSVGED 病毒假型化手段可以提高杆状病毒转导鸡胚原代细胞的效率; 添加转录后调控元件 WPRE 的重组杆状病毒介导 eGFP 的表达效果与添加丁酸盐法基本相同, 可以增强杆状病毒介导报告基因在鸡胚原代细胞中的表达水平; 添加 ITRs 元件的重组杆状病毒具有延长 eGFP 表达时间的作用。

关键词: 杆状病毒, 鸡胚原代细胞, VSVGED 病毒假型化, 调控元件, 腺病毒反向重复序列

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 06-0586-10

杆状病毒在哺乳动物细胞内与其它病毒载体相比, 具有不复制、基因容量大、对细胞无毒性、操作简单等优点。随着转导细胞类型的增多、转导效率的

增高, 杆状病毒作为基因转移载体介导外源基因在哺乳动物细胞中的表达已被人们广泛应用。通过研究人员的努力, 杆状病毒能转导的哺乳动物细胞迅

基金项目: 国家自然科学基金 (31270143); 黑龙江大学高层次人才 (创新团队) 支持计划 (Htdtd2010-17); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12511423); 黑龙江省高等学校科技创新团队 (农业微生物发酵技术)

* 通信作者。Tel: +86-451-86609016; E-mail: gejingping@126.com

作者简介: 宋姗姗 (1986 -), 女, 黑龙江省人, 硕士研究生, 从事病毒分子生物学研究。E-mail: weismxiangaideren@126.com

收稿日期: 2012-10-26; **修回日期:** 2013-01-18

速增加,包括人、猴、猪、鼠、牛、兔以及禽类等细胞,其中肝细胞和肾细胞研究最广泛^[1]。另有研究显示杆状病毒甚至可转导鱼类细胞,通过向纹斑鱼胚胎内直接注入病毒便可完成外源基因的成功表达^[2]。凭借着独特的优势,杆状病毒表达载体系统已在生物、医学等领域得到广泛应用。尤其在病毒样颗粒的生成^[3]、抗体制备与非复制型载体疫苗的研制^[4]、基因治疗与癌症治疗^[5]、组织工程(Tissue engineering)^[6]以及 RNAi 技术^[7]等前沿领域的研究中扮演了重要的角色。

但由于哺乳动物细胞并不是杆状病毒的天然宿主,因此杆状病毒对哺乳动物细胞的嗜性不广泛、转导哺乳动物细胞的效率和转基因表达水平偏低、表达持续时间短暂等方面问题成为限制其进一步发展的瓶颈。就突破“瓶颈”而言,目前国内外学者们主要关注以下几个方面:化学助剂的添加、哺乳动物细胞类型与状态的影响、启动子的类型、基因调控元件的应用、病毒表面的修饰以及转导技术的改良。已有研究表明添加丁酸盐(Butyrate)^[3]、制毛癣素 A(Trichostatin A)^[4]、丙戊酸^[6]等组蛋白脱乙酰基酶(histone deacetylase, HDAC)抑制因子可通过诱导组氨酸高度乙酰化而使染色质处于松弛状态,从而显著增加杆状病毒介导的转基因表达。

杆状病毒转导不同细胞的效率存在很大差异,杆状病毒的转导效率还与细胞的分化程度密切相关。病毒转导效率的差异可能来源于病毒进入细胞的效率或核运输的效率不同;而转基因表达水平的差异可能是由不同分化进程中不断变化的细胞转录机制造成的。不同的细胞类型对启动子存在偏好性,从而影响转基因表达的水平。一般认为鸡 β -肌动蛋白启动子组成的复合启动子(CMV early enhancer/chicken β -actin promoter, CAG)强于 CMV 启动子,在 CHO、COS-1 和 HEK293 细胞系中 CMV 和 RSV 启动子均有较好的活性,但猴空泡病毒 40 启动子(Simian Virus 40, SV40)启动子相对于 CMV 和肉瘤病毒长末端重复序列启动子(Respiratory Syncytial Virus, RSV)而言活性较弱^[7]。实验证明,将杆状病毒同源重复序列 hr1 作为增强子可提高杆状病毒介导的外源基因的表达量^[8]。将 CMV 启动子 5' 端增强子序列融合于神经元特异性的血小板衍生生长因子 β (Platelet-derived growth factor β , PDGF)或星形胶质细胞特异性的神经胶质酸性蛋白

(Glial fibrillary acidic protein, GFAP)上游构成的杂合启动子可以显著提高转基因在神经细胞中的表达水平,分别在两种杂合启动子的表达盒两侧添加腺伴随病毒 AAV 的反向重复序列(Inverted terminal repeats, ITRs)则可显著延长转基因高水平表达的持续时间,在第 90 天依然能够检测到报告基因的表达^[9]。水疱型口膜炎病毒 G 蛋白(Vesicular stomatitis virus protein G, VSVG)是应用最为广泛的杆状病毒表面展示技术的外源肽,因为它可以同时增加杆状病毒在体外^[6]和体内^[9]的转导效率,显著增加杆状病毒的细胞嗜性。然而表面展示 VSVG 会使载体的毒性增加,引起明显的细胞融合反应。通过展示截断型的 VSVG(Truncated VSVG, VSVGED)可解决这一问题。VSVGED 包括 21 个氨基酸的外功能区、跨膜区(TM)和胞浆区(CTD),可增加杆状病毒对多种类型细胞的转导效率,且大大降低载体的毒性^[8]。

本课题组发现杆状病毒可以转导鸡胚骨骼肌细胞和鸡胚成纤维细胞等非哺乳动物细胞,并能在哺乳动物细胞启动子 CMV 的启动下表达报告基因增强型绿色荧光蛋白 eGFP(Enhanced Green Fluorescence Protein, eGFP)。本文利用重组杆状病毒对鸡胚原代细胞进行侵染来表达 eGFP 的方法,比较分析不同重组载体对蛋白表达水平的影响,从而为利用杆状病毒介导外源基因表达提供帮助。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞:大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、DH10Bac 由本实验室提供;鸡胚骨骼肌细胞由本实验室制备;SPF 鸡胚由哈尔滨兽医研究所惠赠;Sf9 昆虫细胞由本实验室提供。

1.1.2 主要试剂和仪器:Cellfectin[®] Reagent、Sf900 II SFM 培养基购自 Invitrogen 公司;Reverse Transcription System Kit 购自 Promega 公司;DMEM 培养基购自 Hyclone 公司;胎牛血清购自 PAA 公司;双抗溶液(青霉素、链霉素)购自 GIBCO 公司;各种限制性内切酶、细胞裂解液购自 TaKaRa 公司;DNA 胶回收试剂盒购自华舜公司。TE2000 型倒置荧光显微镜,购自尼康英士特株式会社;PCR 仪,购自 Eppendorf GA Germany;Steri-Cyde371 气套式二

氧化碳培养箱,购自FORMA公司;BCM-1000A生物洁净工作台,购自苏州安泰空气技术有限公司。

1.1.3 质粒: pMD18-T Vector 购自大连宝生物工程有限公司; pEGFP-C3、pWHV8、pAAV-LacZ、pFastBac [PH] 由楼庄伟教授惠赠; pCMV-VSVG 购自Addgene公司; pMD-eGFP、pFB/SD-PH、pFastBac1-CMV-eGFP 为实验室自行构建质粒。

1.2 引物设计

应用 DNASTar 软件设计引物,用于扩增各个目的片段。设计过程中,严格控制各引物与模板匹配部分 Tm 值为 $60.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 。所有引物均由金思特科技有限公司合成。引物保存浓度 $100 \mu\text{mol/L}$,保存于 -70°C 冰箱,工作浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$,保存于 -20°C 冰箱。

表 1. 引物序列

Table 1. Primer sequences

Primers	Sequences (5'→3')	Restriction site
LM-6	TGCTCTAGATAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTC	Xba I
LM-7	GTGAATTCGGAGCTCTGCTCGAGCGAGGCCTGATCTGACGGTTCACTAAACCAGCTCT	EcoR I -Sac I -Xho I -Stu I
LM-8	CGGAATTCACGCATGCTTGTCTGACGTTAATCAACCTCTGATTACAAAATTTGTGA	EcoR I -Sph I -Sal I
LM-9	ATACGGTCCGTAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCAC	Rsr II
LM-10a	CCGCCTCCCCGCTGTTTTAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTA	
LM-10b	TAAAACCTCTACAAATGTGCTATGGCTGATTAACAGCGGGGAGGCGG	
LM-11	TGCTCTAGATTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT	Xba I
LM-12	TGCTCTAGAGTAATTGATTACTATTAATACTAGTACGCGTGGC	Xba I
LM-13	ATGTCTGGATCTCCGGACACGTG	
LM-14	ATACGGTCCGGAGAAAATACCGCATCAGGGC	Rsr II
eGFP-f	ACTGAATTCGCCACCATGGTGAGCAAGG	EcoR I
eGFP-r	TCACTCGACTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	Sal I
M13-47	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	

1.3 重组转移载体 pLM 和 pLM-ITRs 的构建

以质粒 pEGFP-C3、pWHV8 为模板,以 LM-6 和 LM-7、LM-8 和 LM-10b、LM-10a 和 LM-9 为引物,PCR 扩增得到 CMV 片段、WPRE 片段和 pA 片段。以 LM-9 和 LM-8 为引物,WPRE 片段和 pA 片段进行融合 PCR 获得 soe2 片段。CMV 片段和 soe2 片段分别与 pMD18-T Vector 于 16°C 连接过夜,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,经蓝白斑筛选,以碱裂解法小量制备质粒,并进行酶切和 PCR 鉴定,将阳性重组质粒命名为 pT-CMV 和 pT-soe2 (图 1)。

1.3.1 重组转移载体 pLM 的构建: 载体 pFB/LM-PH 和 pT-CMV 经 Xba I 和 EcoR I 酶切连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞后验证质粒。阳性质粒命名为 pFB/SD-PH-CMV。用 Rsr II 和 EcoR I 对载体 pFB/LM-PH-CMV 和 pT-soe2 进行双酶切,酶切产物连接转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞后验证质粒,阳性质粒命名为 pLM。

1.3.2 重组转移载体 pLM-ITRs 的构建: 以质粒 pAAV-LacZ 为模板,以 LM-11 和 LM-12 为引物 PCR 扩增左侧 ITR (ITR-L)、以 LM-13 和 LM-14 为引物 PCR 扩增右侧 ITR (ITR-R),得到 ITR-L 片段

和 ITR-R 片段。用 Xba I 对载体 pLM 和片段 ITR-L 进行单酶切,连接后转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,阳性质粒命名为 pLM-ITR-L。用 Rsr II 对载体 pLM-ITR-L 和片段 ITR-R 进行单酶切,连接后转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞后验证质粒,阳性质粒命名为 pLM-ITRs (图 2)。

1.4 重组转移质粒 pLM-eGFP 与 pLM-ITRs-eGFP 的构建

以 pEGFP-C3 为模板,eGFP-r 和 eGFP-f 为引物,PCR 扩增得到 eGFP 片段,连接到 pMD18-T vector,阳性质粒命名为 pT-eGFP,用 Sal I 和 EcoR I 对载体 pLM、pLM-ITRs 和 pT-eGFP 进行双酶切,酶切产物经胶回收,连接转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,阳性质粒分别命名为 pLM-eGFP 和 pLM-ITRs-eGFP。

1.5 重组杆状病毒的获得

SEM 法制备感受态细胞 *E. coli* DH10Bac,质粒 pLM-eGFP 和 pLM-ITRs-eGFP 转座 *E. coli* DH10Bac。涂布于含有抗生素 (含终浓度为 $50 \mu\text{g/mL}$ Kan、 $7 \mu\text{g/mL}$ Gen、 $10 \mu\text{g/mL}$ Tet 和终浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$ IPTG 和 $40 \mu\text{g/mL}$ X-Gal) 的平板中,经蓝白斑筛

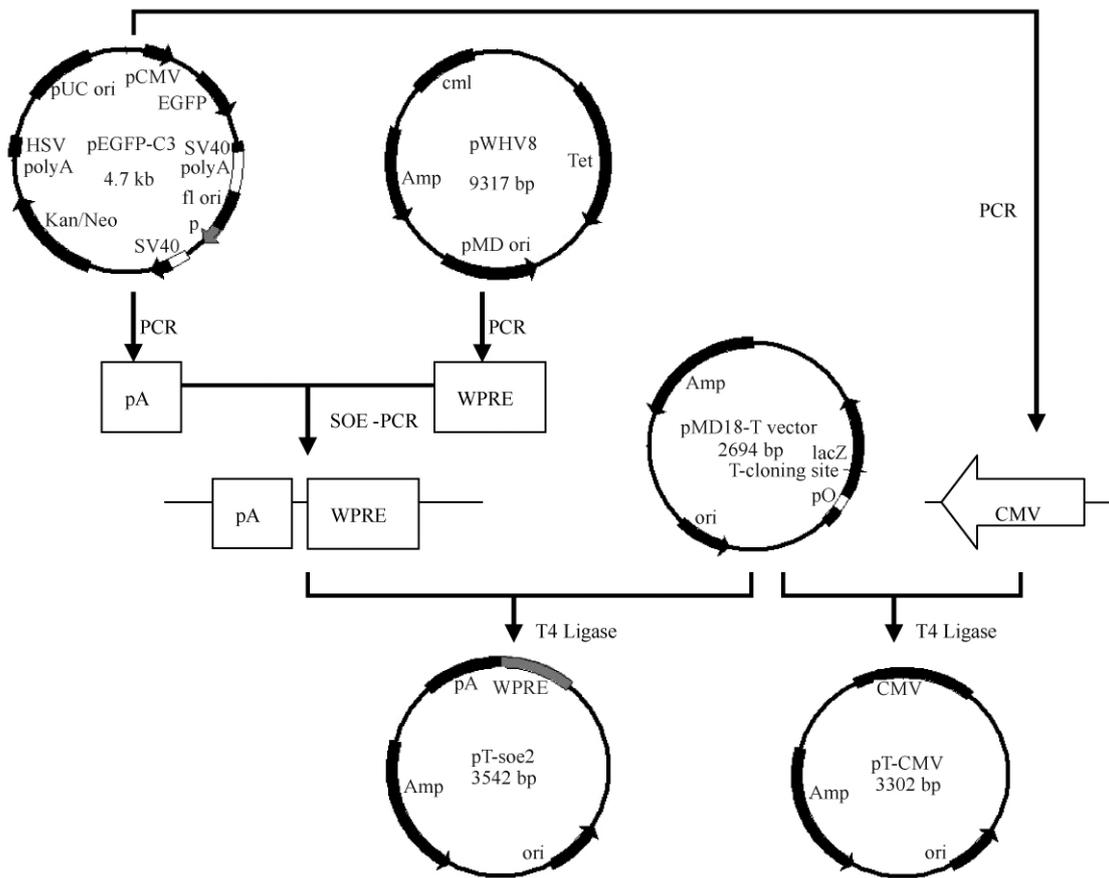


图 1. 重组中间载体的构建策略图

Figure 1. Construction strategy map of recombinant vector.

选,碱裂解法提取 Bacmid DNA,重组 Bacmid DNA 命名为 Bac-LM-eGFP 与 Bac-LM-I TRs-eGFP 用于下一步转染。

按 Cellfectin® Reagent 转染试剂盒说明书,分别将 1 μg Bac-LM-eGFP 和 Bac-LM-I TRs-eGFP 重组 Bacmid DNA 用脂质体转染试剂转染对数生长期的 S₉ 昆虫细胞,转染后倒置显微镜下观察 S₉ 细胞,第 72 h 细胞出现感染迹象时收集上清,4℃ 避光保存,即为 P1 代病毒。提取所获病毒 DNA,分别以 M13-47 和 eGFP-f 为引物对其进行 PCR 鉴定。将重组杆状病毒反复感染对数生长期的 S₉ 昆虫细胞 2 次,获得高滴度 P2、P3 代病毒储备。病毒滴度测定按照 S₉ 细胞杆状病毒噬斑检测标准操作规范 (Invitrogen 公司, No. 10359)。病毒滴度 (pfu/mL) = 每孔空斑数 × 稀释倍数 × 1/每孔病毒量 (mL)。P3 代重组杆状病毒滴度分别为 1.1 × 10⁸ pfu/mL (BV-LM-eGFP)、1.2 × 10⁸ pfu/mL (BV-LM-I TRs-eGFP)。

1.6 重组杆状病毒介导报告基因 eGFP 在鸡原代细胞中的表达

12 日龄鸡胚原代细胞 (鸡胚骨骼肌细胞),以 2 × 10⁴ 个/孔的细胞密度接种到 96 孔细胞培养板,于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养 12h。加入 50 MOI (multiplicity of infection, 感染复数) 的 BV-LM-eGFP、BV-LM-I TRs-eGFP 以及对照样本 BV-FB-CMV-eGFP 病毒 P3 储备,进行病毒侵染,37℃ 培养 12 h 后更换新鲜 DMEM 完全培养液。侵染后 24 h 开始观察 eGFP 报告基因的表达,每隔 24 h 观察一次。转导试验方案设计如表 2。

利用 NIKON TE2000 型倒置荧光显微镜观察细胞形态及荧光表达情况。荧光核染料染色后,随机选择区域,通过观察在 UV (紫外光) 滤光片通道下细胞核发荧光情况和同一视野下 G (绿光) 滤光片通道下绿色荧光蛋白的表达情况,然后对该区域的细胞做统计分析。表达效率 = 表达绿色荧光蛋白的细胞数/同一视野下的总细胞数。

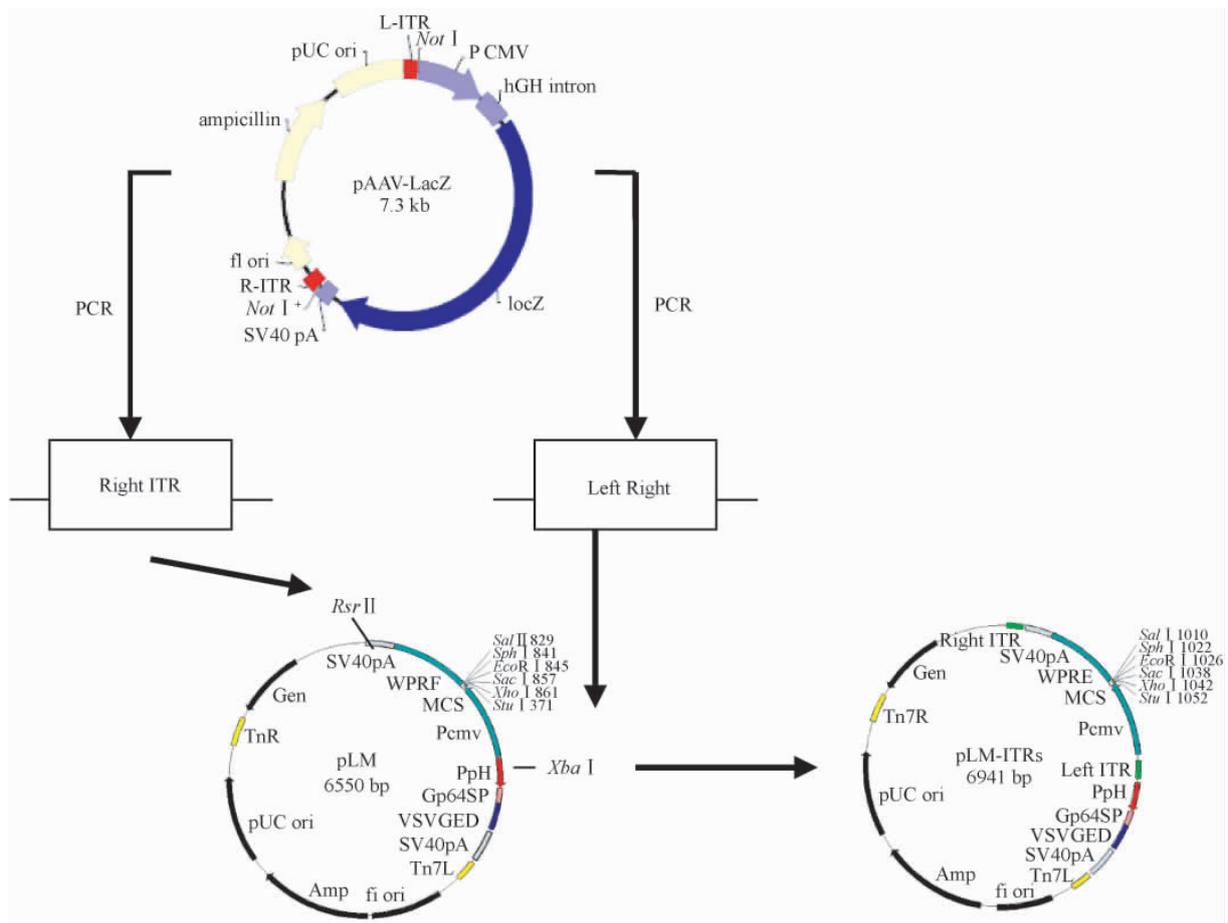


图 2. 重组转移载体 pLM-ITRs 的构建

Figure 2. Construction strategy map of recombinant transfer vector pLM-ITRs.

表 2. BV-FB-CMV-eGFP、BV-LM-eGFP 和 BV-LM-ITRs-eGFP 三种杆状病毒的转导试验方案设计

Table 2. Experimental design of the transduction in BV-FB-CMV-eGFP, BV-LM-eGFP and BV-LM-ITRs-eGFP

Virus	MOI	Transduction time	Final concentration of butyrate	Components in the virus	Purpose of the experiment
BV-FB-CMV-eGFP	50	12h	10mmol/L	CMV	Control samples
BV-LM-eGFP	50	12h	10mmol/L	CMV, VSVGED WPRE	Enhance the efficiency of viral transduction, Optimize virus-mediated eGFP expression levels.
BV-LM-ITRs-eGFP	50	12h	10mmol/L	CMV, VSVGED WPRE, ITRs	Extend the expression time of virus-mediated reporter gene in the recombinant virus.

2 结果和分析

2.1 重组转移载体 pLM、pLM-eGFP、pLM-ITRs 和 pLM-ITRs-eGFP 的构建结果

重组转移载体 pLM 经 *Xba* I 和 *Eco*R I 酶切出现 2 个条带, 分别符合 5.1 kb 的 pFB/SD-PH 和 610 bp CMV 片段的大小。重组转移载体 pLM-ITRs

应用 *Pst* I 和 *Eco*R I 进行双酶切, 出现 5.1 kb、988 bp 和 803 bp 条带, 证明 ITR-L 正向插入载体, 3 个条带与正向连接时条带大小相符, 说明 ITR-L 正向插入到载体 pLM 中。应用 *Sal* I 和 *Eco*R I 对质粒 pLM-eGFP, pLM-ITRs-eGFP 进行双酶切, pLM-eGFP 酶切后均获得 6.6 kb pLM 载体和 750 bp eGFP 片段, 与理论大小相符。pLM-ITRs-eGFP 酶切后均获得与 7.0 kb pLM 载体和 750 bp eGFP 片段大小, 与

理论大小相符。

2.2 重组杆状病毒的 PCR 鉴定

按照方法 1.5 收获获得重组杆状病毒 BV-LM-eGFP 与 BV-LM-ITRs-eGFP, 以其 DNA 为模板, M13-47 和 eGFP-f 为引物进行 PCR 鉴定。鉴定结果如图 3, 两支重组病毒均扩增出与目的大小相符的条带, 证明获得的重组为含有插入片段的阳性病毒。

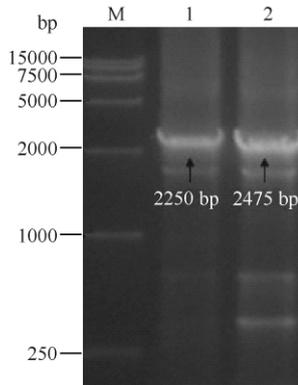


图 3. 重组杆状病毒 BV-LM-eGFP 和 BV-LM-ITRs-eGFP 的 PCR 结果

Figure 3. PCR results of recombinant baculovirus BV-LM-eGFP and BV-LM-ITRs-eGFP. Lane 1 is PCR product of BV-LM-eGFP; lane 2 is PCR product of BV-LM-ITRs-eGFP; M is DL2000 DNA Marker.

2.3 重组杆状病毒报告基因 eGFP 在鸡原代细胞中的表达

杆状病毒感染鸡胚原代细胞后, 12 h 便可在倒置荧光显微镜下检测出强度十分微弱 eGFP 的表达, 且 3 组实验差别不明显。随着时间的延长, eGFP 表达效率先增加后降低(图 4): CellProfiler™ 软件检测表达 eGFP 的细胞平均荧光强度。与未做处理的鸡原代细胞相对比, 24 h 时 3 个试验组细胞荧光表达强度, BV-LM-ITRs-eGFP 稍强一些; 48 h 时荧光表达强度各组达到最高峰 BV-LM-eGFP 与 BV-LM-ITRs-eGFP 介导的荧光表达较 BV-FB-CMV-eGFP 稍强一些, BV-LM-eGFP 与 BV-LM-ITRs-eGFP 介导的荧光表达无明显差别; 72 h 时荧光强度逐渐降低; 96 h 时细胞几乎观察不到荧光的表达。

2.3.1 VSVGED 病毒假型化对重组杆状病毒转导效率的影响: 如图 5 显示, 病毒转导效率随着时间的延长呈现先增大后减小的趋势, 在 48 h 时呈现最高峰, 此时的转导效率数值即可间接表示病毒进入

细胞的比率。48 h 的柱状图显示, 未经过 VSVGED 假型化的对照样本 BV-FB-CMV-eGFP 转导效率为 36%, 而经过 VSVGED 病毒假型化的重组杆状病毒转导效率为 48.2%, 说明经过 VSVGED 病毒假型化的重组杆状病毒可以明显增加病毒进入鸡胚原代细胞的比率。

2.3.2 WPRE 与 ITRs 对 eGFP 表达强度的影响:

随着培养时间的延长, 对照样本对照样本 BV-FB-CMV-eGFP 添加 10mmol/L 丁酸盐溶液的 eGFP 表达强度呈先增加后降低的趋势, 48 h 时达到最高峰; 重组有 WPRE 的实验样本 BV-LM-eGFP 与对照样本变化趋势基本相同, 不同时间段间强度差异不显著, 但表达强度却略高于对照样本。说明在基因水平重组 WPRE 调控元件与添加丁酸盐溶液对 eGFP 表达强度的增强效果基本相同, 可以用前者替代后者实现表达强度的增强以避免丁酸盐对细胞的伤害; 重组有 ITRs 的实验样本 BV-LM-ITRs-eGFP 随时间的延长呈缓慢上升趋势, 虽然强度差异不显著, 且由于细胞状态不好导致无法观察 96 h 以后 eGFP 表达强度变化趋势, 但通过该实验可以初步推断在基因水平重组 ITRs 元件可以维持或延长 eGFP 稳定表达时间。

另外, 在实验操作及数据统计中发现, 72 h 前添加丁酸盐溶液的对照样本细胞总数明显少于未添加丁酸盐的实验样本, 如图 5, 证明添加丁酸盐可以提高 eGFP 表达强度, 但对细胞具有毒性; 而在基因水平添加 WPRE 元件不但可以达到与丁酸盐相同的增强效果, 且对细胞几乎没有毒性。

3 讨论

选择合适的表达调控元件对提高靶基因的表达效率具有明显的作用。但无论添加哪种调控元件, 目前研究中只是将其中一种单独应用于调控杆状病毒对外源基因的表达, 并且集中于哺乳动物细胞的研究, 对禽类细胞的相关研究很少。本项目尝试添加多种调控元件到杆状病毒中进行遗传修饰和改造, 在提高外源基因表达水平的基础上, 延长外源基因的表达时间, 并通过不同的组合了解三者之间在禽类细胞中的相互关系。

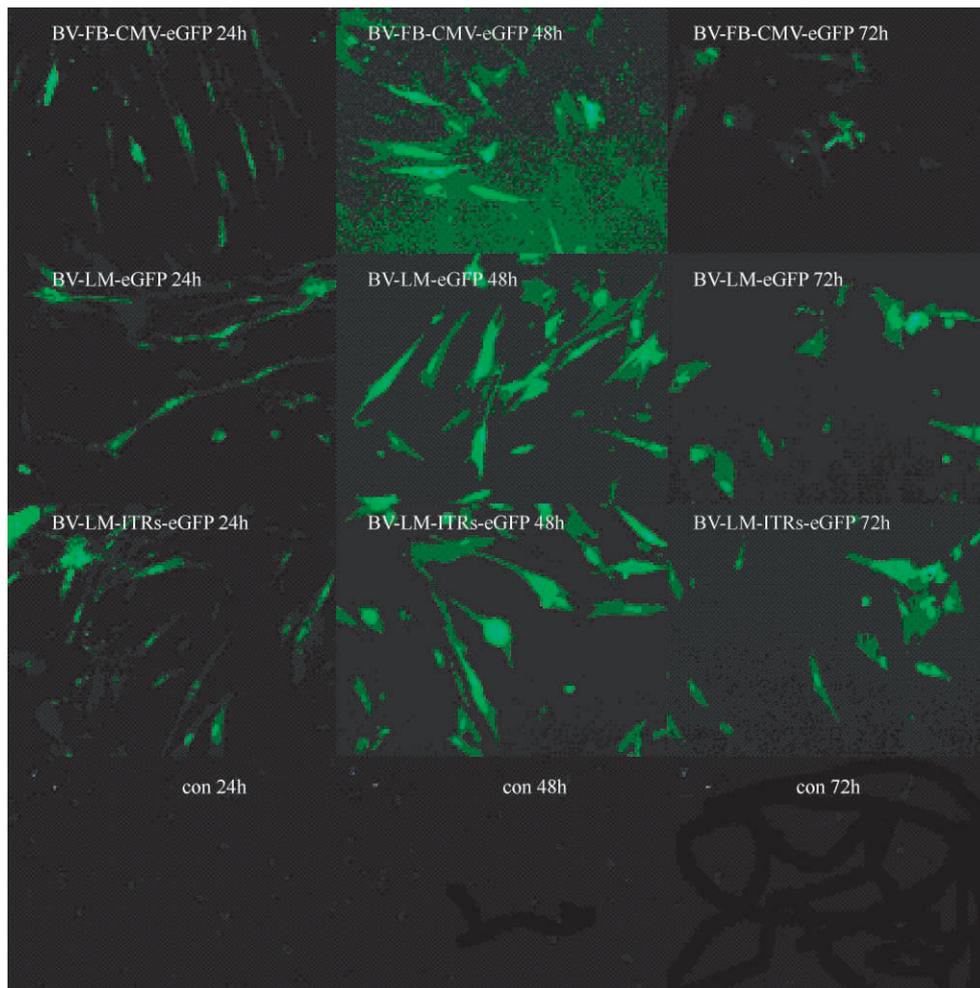


图 4. 重组杆状病毒介导 eGFP 在鸡原代细胞中的表达 (200 ×)

Figure 4. eGFP-expression in chick embryo cells mediated by recombinant baculovirus (200 ×).

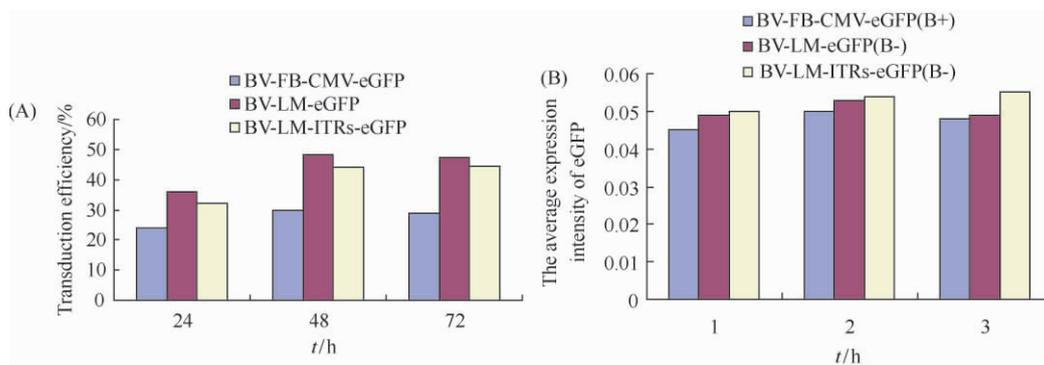


图 5. 不同重组杆状病毒的转导效率 (A) 和 eGFP 表达强度 (B)

Figure 5. Transduction efficiencies (A) and expression intensities of eGFP (B) on different recombinant baculovirus.

3.1 VSVG 对重组杆状病毒转导效率的影响

杆状病毒表面展示系统是近年发展起来的一种新的真核生物表面展示系统。通过与病毒衣壳或囊膜蛋白融合表达,可以将外源肽展示在杆状病毒表

面,形成刺猬状“伪病毒”^[10]。该技术得到广泛应用的原因为其不但可以同时增加杆状病毒在体外和体内的转导效率,而且还可显著增加杆状病毒的细胞嗜性^[11]。但是表面展示 VSVG 会使载体的毒性增

加,引起明显的细胞融合反应^[12],因此通过展示截断型的 VSVG (Truncated VSVG, VSVGED) 可解决这一弊端^[13]。大量实验报道,VSVGED 假型化的杆状病毒可以显著增加杆状病毒的转导效率,即提高表达外源蛋白的细胞占被转导细胞总数的比例^[14]。这种增强作用依赖于较低的 MOI 值(小于 200),当 MOI 大于 200 时,转导效率的增强将被抑制。

本实验设计中根据“重组杆状病毒感染复数及培养时间对 eGFP 表达效率影响”的实验数据显示,MOI 40 到 MOI 50 时达到最高峰。确定选择 MOI 50 进行病毒的转导实验,并选择重组杆状病毒 BV-FB-CMV-eGFP 作为对照样本,初步尝试探索 VSVGED 假型化的重组杆状病毒 BV-LM-eGFP 与 BV-LM-ITRs-eGFP 在较低的 MOI 值下是否可以在进一步提高杆状病毒的转导效率,进而相对增加 eGFP 的表达水平。

实验结果初步证明经过 VSVGED 病毒假型化的 BV-LM-eGFP 与 BV-LM-ITRs-eGFP 转导效率高于未经过假型化的 BV-FB-CMV-eGFP。因此可以初步推知应用 VSVGED 病毒假型化修饰的杆状病毒在 MOI 50 时转导鸡胚原代细胞可提高病毒的转导效率。但是,“继续降低 MOI 值时 VSVGED 病毒假型化的重组杆状病毒的转导效率会如何变化”或“MOI 值对 VSVGED 病毒假型化的重组杆状病毒的影响是否与 MOI 值对对照样本的影响相同”等问题依然值得进一步探讨。

3.2 WPRE 及 ITRs 对重组杆状病毒介导的 eGFP 表达强度的影响

WPRE (Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, WPRE) 是位于病毒 3' 非编码区的 RNA 顺式作用元件,它可以借助多个替代途径或借助多个替代途径共同作用来促进 RNA 的胞核质运输,在 RNA 水平上增加转基因的表达强度^[15]。有报道称,这种通过应用 WPRE 而产生的转基因高水平表达效果与添加丁酸盐法的效果相当,却不具有细胞毒性^[16],这使得 WPRE 已经广泛应用于基因治疗相关的载体,如慢病毒、腺伴随病毒、腺病毒等病毒类载体。

在本试验中,根据前期试验结果证明丁酸盐终浓度达到 10 mmol/L 时表达强度最高。因此设计对

照样本实验过程中添加 10 mmol/L 丁酸盐,而含有 WPRE 调控元件的 BV-LM-eGFP 与 BV-LM-ITRs-eGFP 不添加丁酸盐。从而尝试探讨添加 WPRE 调控元件与添加丁酸盐溶液对重组杆状病毒介导 eGFP 表达强度的影响。从细胞总数的比较结果中看出,添加丁酸盐的对照样本细胞总数明显少于不添加丁酸盐的实验样本,而从 eGFP 表达强度的结果中得出二者 eGFP 表达强度无明显差异,这初步证明了基因水平添加 WPRE 元件对 eGFP 表达的增强作用与添加丁酸盐溶液法基本相同。但“WPRE 在基因水平上的添加是完全无细胞毒性,还是毒性小于丁酸盐”等问题还值得进一步探讨。

ITRs (Inverted terminal repeats, ITRs) 是腺伴随病毒 AAV 的反向重复序列,可显著延长转基因高水平表达的持续时间。ITRs 可能通过维持染色体游离状态和增加转基因转录活性的方式增强转基因的表达水平,尤其是 ITRs 的加入并不影响具体组织特异性启动子的杆状病毒对细胞类型的偏好型。

在本试验中,在 eGFP 表达 72 h 时,3 支病毒均出现明显的细胞总数下降现象,这可能是由于鸡胚原代细胞培养至 72 h 时细胞病变比例明显增加导致细胞贴壁不牢固,在细胞核染色的冲洗过程中大量细胞随冲洗液流失造成的。正是由于细胞状态在 72 h 后明显衰退,导致无法观察并分析 ITRs 对 eGFP 表达持续时间是否有延长作用。但是从 72 h 以内的表达强度看出,只有添加了 ITRs 元件的 BV-LM-ITRs-eGFP 随时间的延长而极缓慢增加,这就预示着 ITRs 可能具有延长 eGFP 表达时间的作用。但确切的结论似乎无法在细胞水平得出,因此将 BV-LM-ITRs-eGFP 以疫苗形式直接注入鸡体以检测 ITRs 的作用是值得进一步探讨的。

参考文献

- [1] Lu L, Yu L, Wang KJ. Baculovirus surface-displayed hemagglutinin of H5N1 influenza virus sustains its authentic cleavage, hemagglutination activity and antigenicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 358 (2) :404-409.
- [2] Leisy DJ, Lewis TD, Leong JA, Rohmann GF. Transduction of cultured fish cells with recombinant

- baculoviruses. *Journal of General Virology*, 2003, 84 (5) : 1173-1178.
- [3] Wagle M, Jesuthasan S. Baculovirus-mediated gene expression in zebrafish. *Marine Biotechnology*, 2003, 5 (1) :58-63.
- [4] Huang KS, Lo WH, Chung YC, Lai YK, Chen CY, Chou SJ, Hu YC. Combination of baculovirus-mediated gene delivery and packed-bed reactor for scalable production of adeno-associated virus. *Human Gene Therapy*, 2007, 18 (11) :1161-1170.
- [5] Hervas-Stubbs S, Rueda P, Lopez L, Leclerc C. Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN. *The Journal of Immunology February*, 2007, 178 (4) :2361-2369.
- [6] Wang L, Shan L, Yin J, Zhao M, Su D, Zhong J. The activation of lytic replication of Epstein-Barr virus by baculovirus-mediated gene transduction. *Archives of Virology*, 2006, 151 (10) :2047-2053.
- [7] Chuang CK, Sung LY, Hwang SM, Lo WH, Chen HC, Hu YC. Baculovirus as a new gene delivery vector for stem cells engineering and bone tissue engineering. *Gene Therapy*, 2007, 19 (14) :1417-1424.
- [8] Sung LY, Lo WH, Chiu HY, Chen HC, Chung CK, Lee HP, Hu YC. Modulation of chondrocyte phenotype via baculovirus-mediated growth factor expression. *Biomaterials*, 2007, 28 (23) :3437-3447.
- [9] Hu YC, Tsai CT, Chang YJ, Huang JH. Enhancement and prolongation of baculovirus-mediated expression in mammalian cells: focuses on strategic infection and feeding. *Biotechnology Progress*, 2003, 19 (2) :373-379.
- [10] Kramer OH, Gottliche M, Heinzel T. Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2001, 12 (7) :294-300.
- [11] Lee HP, Ho YC, Hwang SM, Sung LY, Shen HC, Liu HJ, Hu YL. Variation of baculovirus harbored transgene transcription among mesenchymal stem cell derived progenitors leads to varied expression. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97 (3) :649-655.
- [12] Spenger A, Ernst W, Condreay JP, Kost TA, Gerbherr R. Influence of promoter choice and trichostatin A treatment on expression of baculovirus delivered genes in mammalian cells. *Protein Expression and Purification*, 2004, 38 (1) :17-23.
- [13] Viswanathan P, Venkaiah B, Kumar MS, Rasheedi S, Vrati S, Bashyam MD, Hasnain SE. The homologous region sequence hr1 of Autographa californica multinucleocapsid polyhedrosis virus can enhance transcription from non-baculoviral promoters in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278 (52) :52564-52571.
- [14] Liu BH, Wang X, Ma YX, Wang S. CMV enhancer/human PDGF-promoter for neuron-specific transgene expression. *Gene Therapy*, 2004, 16 (11) :52-60.
- [15] Mahonen AJ, Airene KJ, Purola S, Peltomaai S, Kaikkonen MU, Riekkinen MS, Heikura T, Kinnunee K, Roschier MM, Wirth T, Yia HS. Post-transcriptional regulatory element boosts baculovirus-mediated gene expression in vertebrate cells. *Journal of Biotechnology*, 2007, 131 (1) :1-8.
- [16] Wang KC, Wu JC, Chung YC, Ho YH, Chang MD, Hu YC. Baculovirus as a highly efficient gene delivery vector for the expression of hepatitis delta virus antigens in mammalian cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 89 (4) :464-473.

Construction of baculovirus vector with cytomegaoviyns promoter to express eGFP in primary chicken embryo cells

Shanshan Song, Jingping Ge^{*}, Mei Li, Dongni Gao, Liying Jin, Qi An, Wenxiang Ping, Zhuangwei Lou

Key Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China

Abstract: [Objective] Baculovirus is known as a safe vector candidate due to its non-replication in mammalian cells. The tropism to different cells and transduction efficiency can be improved by introducing cell-specific promoter, VSV-GED and different functional regulatory elements. The optimized pseudotyped recombinant baculovirus can express *eGFP* gene in primary chicken cells, which provides us a new approach to develop engineered poultry vaccines. [Method] The pseudotyped recombinant baculoviruses were constructed with cytomegaoviyns (CMV) promoter, VSV-GED, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE) and inverted terminal repeats (ITRs). The recombinant baculoviruses contained *eGFP* reporter gene were transfected chicken primary cells, and the *eGFP* protein expression levels mediated by different baculoviruses were analyzed. [Results] The expression of *eGFP* was detected at 12 hours after infection. The transduction efficiency of the pseudotyped recombinant baculoviruses increased from 36% to 48.2% by inserting VSV-GED. The expression effect of *eGFP* in recombinant baculovirus carrying WPRE element was similar to that by adding 10mmol/L butyrate. However, the WPRE elements are nontoxic to cells. Within 72 hours, the expression intensity of *eGFP* in the recombinant baculovirus with ITRs increased gradually. [Conclusion] The VSV-GED element can improve the transduction efficiency and WPRE can increase the reporter gene *eGFP* expression levels mediated by baculovirus in chicken primary cells. The recombinant baculovirus with the ITRs elements can extend the expression time of *eGFP*.

Keywords: baculovirus, chicken primary cell, pseudotyped virus, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, inverted terminal repeats

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270143), by the High-level Talents (innovation team) Projects of Heilongjiang University (Htd2010-17) and by the Education Department of Heilongjiang Province

^{*} Corresponding author. Tel: +86-451-86609016; E-mail: gejingping@126.com

Received: 26 October 2012/Revised: 18 January 2013