

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (6) :688 - 695; 4 June 2014  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.06.012

## EF1 $\alpha$ 启动的高效重组杆状病毒载体的构建及其表达效果

高冬妮, 金丽颖, 葛菁萍\*, 王昆, 安琪, 平文祥\*, 楼庄伟

微生物黑龙江省高校重点实验室, 农业微生物技术教育部工程研究中心, 黑龙江大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150080

**摘要:** 【目的】通过选用哺乳动物细胞特异性启动子—人类延伸因子 1 $\alpha$  启动子 (Elongation factor 1 $\alpha$  promoter, EF1- $\alpha$ )、利用病毒假型化工具—截断型水疱型口膜炎病毒 G 蛋白 (Truncated Vesicular stomatitis virus protein G, 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), 来提高杆状病毒的转导效率及外源基因的表达水平。【方法】从 pFB-VSV-GED-WPRE 出发构建含 EF1 $\alpha$  启动子的 2 个重组杆状病毒转移载体 pWK 和 pWK-ITR。再以增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced Green Fluorescent Protein, eGFP) 基因为报告基因插入 EF1 $\alpha$  启动子的下游, 构建重组转移载体 pWK-eGFP 和 pWK-ITR-eGFP 以及阴性对照 pWK (-)-eGFP。将构建好的重组质粒转染 Sf9 昆虫细胞获得重组杆状病毒, 侵染少突神经胶质细胞 (OL 细胞) 后, 利用倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达情况。【结果】含有 WPRE 和 ITRs 的病毒 BV-WK-eGFP、BV-WK-ITR-eGFP 荧光表达率明显高于阴性对照, 且 ITRs 能够有效延长 eGFP 的表达时间, 比对照组 BV-WK (-)-eGFP 延长了 72 h。经 VSV-GED 假型化的杆状病毒 BV-WK-eGFP、BV-WK-ITR-eGFP 转导 OL 细胞的时间明显缩短, 比阴性对照 BV-WK (-)-eGFP 减少了 24 h, 并且转导效率分别高出阴性对照 25.7% 与 36.5%。【结论】实验证明了 VSV-GED 能够有效提高杆状病毒的转导效率, WPRE 能够显著增强外源基因的表达效率, ITRs 延长外源基因的表达时间。为探究改进型重组杆状病毒在脊椎动物细胞表达外源基因及新型重组活载体疫苗的研发奠定了基础。

**关键词:** 杆状病毒, VSV-GED 病毒假型化, 土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件, 腺伴随病毒末端反向重复序列, 人类延伸因子 1 $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ) 启动子

**中图分类号:** Q93-3      **文章编号:** 0001-6209 (2014) 06-0688-08

随着分子生物学技术和方法的发展及应用, 杆状病毒已被开发成为高效的真核表达载体系统, 用于各种外源基因的表达, 并作为一种新型的疫苗、基

因治疗载体受到人们的高度重视<sup>[1-4]</sup>。但杆状病毒对不同细胞和细胞系的转导效率存在较大差距, 从在人肝癌细胞 (HepG2) 和仓鼠肾细胞 (BHK) 的

**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“功能微生物选育及其产物应用” (Hdtd2010-17); 黑龙江省科技厅“农业微生物发酵技术”科技创新团队; 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (12511423)

\* 通信作者。Tel: +86-451-86608046; Fax: +86-451-86609016; E-mail: gejingping@126.com

**作者简介:** 高冬妮 (1981-), 女, 黑龙江省人, 讲师, 博士, 从事病毒分子生物学研究。E-mail: gaodongni1981@163.com

**收稿日期:** 2013-09-09; **修回日期:** 2013-12-14

95% 到某些细胞的 5%, 尤其是对树突状细胞以及血来源的细胞系转导效率特别低<sup>[5-6]</sup>。此外, 杆状病毒介导的外源基因表达量与工业化大生产的要求有较大差距, 并且持续表达的时间较短。这些因素都限制了杆状病毒表达系统的应用<sup>[7]</sup>。因此, 杆状病毒的研究重点就在于将外源基因的表达时间延长, 提高外源基因在树突状细胞的表达效率及转导效率。

腺伴随病毒末端反向重复序列 (adeno-associated virus (AAV) inverted terminal repeats, ITRs) 长度为 145 bp, 将它置于目的基因表达盒的两侧可以使表达的时间延长, 可以在相对较高的水平持续表达 90 天<sup>[8]</sup>。土拨鼠肝炎病毒 (Woodchuck hepatitis virus) 转录后调控元件 (post-transcriptional regulatory element) 简称 WPRE, 实验证明在目的基因的 3' UTR 插入 WPRE 可以增加表达率并延长表达时间<sup>[9-10]</sup>。较多实验证明能表达截断型的水泡性口炎病毒表面蛋白 G 蛋白 (Truncated Vesicular stomatitis virus protein G, VSV-GED) 的重组杆状病毒载体能够增强基因的转导效率<sup>[11-12]</sup>。

本研究利用杆状病毒为载体, 以增强型绿色荧光蛋白 eGFP 为报告基因, 在其 3' UTR 插入 WPRE 以增加表达率, 并且在绿色荧光蛋白表达盒的两侧插入 ITRs 来延长表达时间, 此外还将杆状病毒经 VSV-GED 假型化以增强转导效率。将构建好的重组质粒转染 Sf9 昆虫细胞, 获得的重组杆状病毒再侵染少突神经胶质细胞 (OL 细胞), 最后利用倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达情况。为新型基因工程疫苗的研制提供了一个高效而稳定的表达载体系统。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌种和细胞:** *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* DH10Bac 由黑龙江大学微生物重点实验室提供; Sf9 昆虫细胞、少突神经胶质细胞 (OL) 由黑龙江大学微生物重点实验室提供。

**1.1.2 主要试剂:** 各种限制性内切酶、去磷酸化酶 (CIAP)、高保真热启动酶 (Primer star) 购自宝生物

工程有限公司; RNA 酶、PCR 产物纯化试剂盒购自 Sigma 公司; T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶购自 Fermentas 有限公司; 质粒抽提、小量胶回收试剂盒购自华舜生物试剂公司; DMEM 培养基购自 Hyclone 公司; Sf900 II SFM、双抗 (青霉素-链霉素)、胚胎牛血清 (Fetal Bovine Serum) 购自 GIBCO 公司; Cellfectin © Reagent 转染试剂购自 Invitrogen 公司。

**1.1.3 质粒:** pFastBac [pH -]、pFastBac1 购自 Invitrogen 公司; pWHV8、pCMV-VSVG 购自 Addgene 公司; pEGFP-C3 购自 Clontech 公司; pAAV-LacZ 购自 Agilent 公司; peglk 由楼庄伟教授馈赠; pMD18-T Vector 购自大连宝生物工程有限公司; pFB-VSV-GED-WPRE、pT-EF1 $\alpha$ 、pWK (-)、pWK、pWK-ITR、pWK (-)-eGFP、pWK-eGFP、pWK-ITR-eGFP 由本实验构建。

**1.1.4 扩增引物:** 应用软件 DNA Star 设计引物用于目的基因的扩增, 并引入相应的限制性内切酶酶切位点, 所有引物均由 Invitrogen 公司合成, 引物保存浓度为 100  $\mu$ mol/L, 保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱, 工作浓度为 20  $\mu$ mol/L, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。引物序列见表 1。

### 1.2 重组转移载体 pWK 的构建及鉴定

以质粒 peglk 为模板, WK2 和 WK3 为引物 PCR 扩增 EF1 $\alpha$  基因, 将 EF1 $\alpha$  基因 PCR 产物胶回收, 与 pMD18-T 连接构建质粒 pT-EF1 $\alpha$ 。以质粒 pCMV-VSV-G、pWHV8 为模板, 以 LM1 和 LM2、LM-10a 和 LM-10b 为引物, PCR 扩增得到 VSV-GED 片段、WPRES 片段。将片段 VSV-GED 和 WPRES 插入质粒 pFastBac1 中, 得到重组质粒 pFB-VSV-GED-WPRE。用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Eco*R I 对质粒 pT-EF1 $\alpha$ 、pFB-VSVGED-WPRE 进行双酶切。将上述两酶切产物 EF1 $\alpha$  (*Xba* I/*Eco*R I)、pFB-VSVGED-WPRE (*Xba* I/*Eco*R I) 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 回收目的条带后用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接, 并将含有 EF1 $\alpha$  的 pFB-VSVGED-WPRE 载体命名为 pWK。取 2  $\mu$ L 上述连接产物 pWK 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素与庆大霉素的 LB 琼脂平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 次日挑取白色菌落摇菌, 碱裂解法提取质粒 DNA, 通过 *Xba* I 与 *Eco*R I 双酶切验证 pWK 构建的正确性。

表 1 引物序列  
Table 1. Primer sequences

primers	sequences (5'→3')	source	restriction sites
WK2	TGCTCTAGACGTGAGGCTCCGGTGCCC	pegk	<i>Xba</i> I
WK3	CCGGAATTCGGCGGCCGCTGATCGAT TCACGACACCTGAAATGGAAGAAAAA	pegk	<i>Eco</i> R I-Not I-Cla I
LM1	TAAGGATCCTTACGCGAACCGGAAGTCCGAC-3'	pCMV-VSV-G	<i>Bam</i> H I
LM2	CCCAAGCTTACTTTCCAAGTCCGTTCTCTCTAT	pCMV-VSV-G	<i>Hind</i> III
La	TGCTCTAGATTGCTGGCCTTTTGTCTCACATGT	pAAV-lacZ	<i>Xba</i> I
Lb	TGCTCTAGAGTAATTGATTACTATTAATAACTAGTACGCGTGCG	pAAV-lacZ	<i>Xba</i> I
Ra	ATACGGTCCGATGTCTGGATCTCCGGACACGTG	pAAV-lacZ	<i>Rsr</i> II
Rb	ATACGGTCCGGGAGAAAATACCGCATCAGCGC CGGAATTCACGCATGCTTGTGCGAC	pAAV-lacZ	<i>Rsr</i> II
pA	TAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGTTTT	pEGFP-C3	<i>Eco</i> R I-Sal I-Sph I
LM9	ATACGGTCCGTAAGATACATTGATGAGTTGGACAAACCAC	pEGFP-C3	<i>Rsr</i> II
LM-10a	CCGCCTCCCCGCCTGTTTTAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGTTTTA	pWHV8	
LM-10b	TAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTAAAAACAGCGGGGAGGCGG	pWHV8	
eGFP-f	ACTGAATTCGCCACCATGGTGAGCAAGG	pEGFP-C3	<i>Eco</i> R I
eGFP-r	TCAGTCGACTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	pEGFP-C3	<i>Sal</i> I
M13-47	CGCCAGGCTTTTCCCACTCACGAC		

### 1.3 重组转移载体 pWK-I<sub>TR</sub> 的构建

将 L-I<sub>TR</sub>、R-I<sub>TR</sub> 依次引入转移载体 pWK 骨架中,从而构建含有 I<sub>TRs</sub> 重组转移载体 pWK-I<sub>TR</sub>。流程如下:以 pAAV-lacZ 为模板,La (Ra) 和 Lb (Rb) 为引物 PCR 扩增 L-I<sub>TR</sub>、R-I<sub>TR</sub> 基因。用限制性内切酶 *Xba* I 对 L-I<sub>TR</sub> 的 PCR 产物及 pWK 进行单酶切,酶切产物 L-I<sub>TR</sub> (*Xba* I) 和 pWK (*Xba* I) 经胶回收后用 T4 DNA 连接酶 16℃ 过夜连接,连接产物 pWK-L-I<sub>TR</sub> 转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,碱裂解法提取质粒 DNA。将含有 L-I<sub>TR</sub> 的 pWK 命名为 pWK-L-I<sub>TR</sub>。

用限制性内切酶 *Rsr* II 对 R-I<sub>TR</sub> 和 pWK-L-I<sub>TR</sub> 进行酶切,将酶切产物 R-I<sub>TR</sub> (*Rsr* II) 与 pWK-L-I<sub>TR</sub> (*Rsr* II) 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后将目的条带回收,回收的 R-I<sub>TR</sub> (*Rsr* II) 与 pWK-L-I<sub>TR</sub> (*Rsr* II) 用 T4 DNA 连接酶连接,连接产物转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,碱裂解法提取质粒 DNA,将产物命名为 pWK-I<sub>TR</sub>,并对其进行 *Eco*R I, *Pst* I 双酶切鉴定。

### 1.4 重组转移载体 pWK(-) 的构建

将启动子 pT-EF1α 与 pFastBac [pH-] 进行酶切,两酶切产物 pFastBac [pH-] (*Xba* I / *Eco*R I) 和

EF1α (*Xba* I / *Eco*R I) 用 T4 DNA 连接酶连接,并转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,将连接有 EF1α 的 pFastBac [pH-] 命名为 pWK-FB-[pH-]-EF1α,并对其进行酶切鉴定。然后以 pEGFP-C3 为模板,LM9 和 pA 为引物 PCR 扩增 polyA 基因,将 polyA 与 pWK-FB-[pH-]-EF1α 进行 *Eco*R I / *Rsr* II 酶切后连接,将连接有 PolyA 的质粒命名为 pWK(-),即阴性对照质粒,并进行 *Xba* I / *Eco*R I 双酶切检测。

### 1.5 重组转移载体 pWK-eGFP、pWK-I<sub>TR</sub>-eGFP、pWK(-)-eGFP 的构建

首先以 pEGFP-C3 为模板,eGFP-f 和 eGFP-r 为引物 PCR 扩增 eGFP 基因,将 eGFP 基因连接到 pMD18-T vector,阳性质粒命名为 pT-eGFP,用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Eco*R I 对 pT-eGFP、pWK、pWK-I<sub>TR</sub>、pWK(-) 进行双酶切,将片段 eGFP (*Sal* I / *Eco*R I) 和 pWK (*Sal* I / *Eco*R I), pWK-I<sub>TR</sub> (*Sal* I / *Eco*R I)、pWK(-) (*Sal* I / *Eco*R I) 分别进行连接,连接产物转化到 *E. coli* DH5α 感受态细胞,阳性质粒分别命名为 pWK-eGFP, pWK-I<sub>TR</sub>-eGFP, pWK(-)-eGFP,并分别进行 *Sal* I / *Eco*R I 双酶切鉴定。

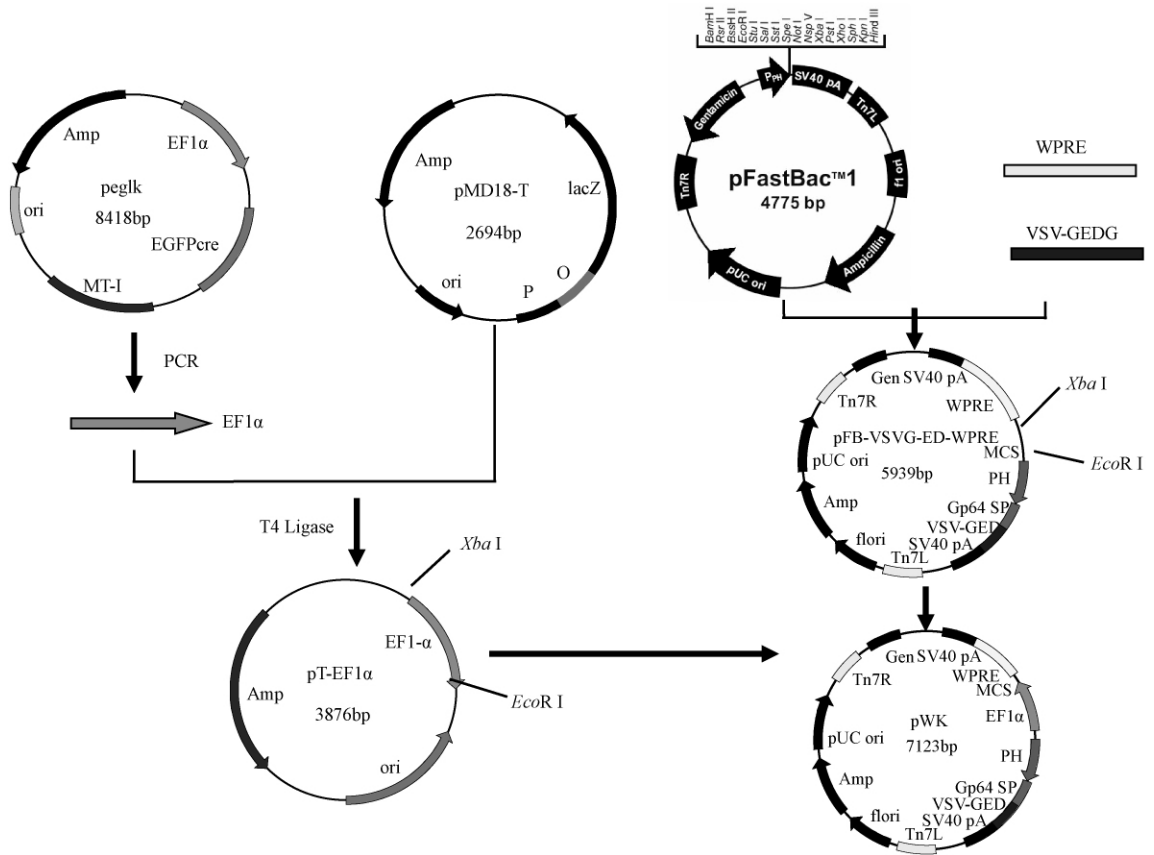


图 1. 重组转移载体 pWK 的构建

Figure 1. Construction of recombinant transfer vector pWK.

## 1.6 重组杆状病毒穿梭载体 Bacmid-eGFP 转染 Sf9 细胞

将 pWK-eGFP、pWK-I $\alpha$ -eGFP、pWK(-)-eGFP 转化 *E. coli* DH10 Bac 感受态细胞, 提取重组 Bacmid DNA 质粒, 制备重组杆状病毒穿梭载体 Bacmid-eGFP, 并分别命名为 Bac-WK-eGFP、Bac-WK-I $\alpha$ -eGFP、Bac-WK(-)-eGFP。再利用重组杆状病毒穿梭载体 Bacmid-eGFP 转染 Sf9 细胞, 具体转染方法按 Cellfectin © Reagent 转染试剂盒说明书进行, 转染 72 h 后收获重组杆状病毒 P1 代。以 eGFP-f 和 M13-47 为引物对收获的 P1 代重组杆状病毒基因组 DNA 进行 PCR 验证。将验证正确的重组杆状病毒 P1 代感染对数生长期的 Sf9 昆虫细胞 2 次, 获得 P2、P3 代病毒储备液, 并按照 Sf9 细胞杆状病毒噬斑检测标准操作规范测定 P1、P2、P3 代病毒滴度, 以获得高滴度的重组杆状病毒并在 OL 细胞中表达。病毒滴度 (pfu/mL) = 每孔斑斑数  $\times$  稀释倍数  $\times$  1/每孔病毒量 (mL), P3 代病毒滴度分别为  $1.23 \times 10^8$  pfu/mL (Bac-WK-eGFP)、 $1.32 \times 10^8$  pfu/

mL (Bac-WK-I $\alpha$ -eGFP)、 $1.04 \times 10^8$  pfu/mL (Bac-WK(-)-eGFP)。

## 1.7 重组杆状病毒侵染 OL 细胞及绿色荧光蛋白的检测

处于对数生长期的 OL 细胞用胰酶消化吹散后以  $2 \times 10^4$  个细胞/孔接种于 96 孔细胞培养板, 37°C 培养 12 h 后加入感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 40 的 P3 代杆状病毒 Bac-WK-eGFP、Bac-WK-I $\alpha$ -eGFP、Bac-WK(-)-eGFP, 37°C 培养 12 h 后更换新鲜 DMEM 完全培养液。向培养液中加入终浓度为 1 mmol/L 的丁酸钠溶液增强病毒侵染效果。在重组杆状病毒侵染 OL 细胞后培养 24 h, 对报告基因 eGFP 表达情况进行观察。

对重组杆状病毒侵染后的 OL 细胞进行细胞固定及核染色, 利用尼康公司 TE2000 型倒置荧光显微镜观察细胞形态及 eGFP 表达情况, 采集细胞的数字图像, 通过观察表达绿色荧光蛋白的细胞数量和细胞总数, 即可分析出重组杆状病毒的转导效率, 转导效率 = 同一视野下表达绿色荧光蛋白的细胞

数/总细胞数。在本研究中,同一实验组选取6个不同的样本,通过CellProfiler™软件分析得到6个样本的eGFP表达强度,取平均值后定义为“eGFP平均荧光表达强度”,即“eGFP表达效率”。

## 2 结果和分析

### 2.1 重组转移载体 pWK、pWK-ITR、pWK(-)、pWK-eGFP、pWK-ITR-eGFP、pWK(-)-eGFP 的构建结果

pWK、pWK(-)经Xba I与EcoR I双酶切,pWK切出了5939 bp的pFB-VSVGED-WPRE片段及1184 bp的EF1 $\alpha$ 片段,而pWK(-)切出了骨架pFastBac [pH-]及1184 bp的EF1 $\alpha$ 片段,pWK-ITR

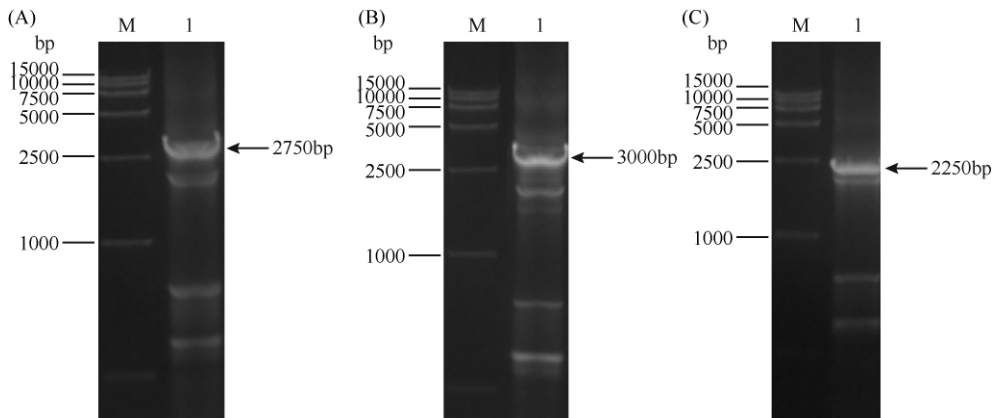


图2. 重组杆状病毒 BV-WK-eGFP、BV-WK-ITRs-eGFP 和 BV-WK(-)-eGFP 的 PCR 结果

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

### 2.3 重组杆状病毒感染 OL 细胞后 eGFP 的表达情况

图4-A表明,重组杆状病毒感染OL细胞后,添加VSV-GED和WPRE元件的BV-WK-eGFP、添加VSV-GED、WPRE和ITRs元件的BV-WK-ITR-eGFP在24h便可在倒置荧光显微镜下检测出绿色荧光。随着时间的延长,荧光表达效率逐渐增加,在72h达到最高峰(绿色荧光表达情况如图3所示),且BV-WK-ITR-eGFP的荧光持续高效表达至144h后开始衰退。而阴性对照组BV-WK(-)-eGFP的荧光出现时间较晚,大约在48h开始检测到荧光的表达,在72h达到最高峰,荧光持续时间相对较短,96h后基本不表达。此外,含有WPRE和ITRs的病

经EcoR I、Pst I双酶切,获得988 bp,1376 bp,5150 bp的片段,与理论值相符,证明了上述质粒构建的正确性。pWK-eGFP、pWK-ITR-eGFP、pWK(-)-eGFP经Sal I和EcoR I双酶切,分别可切出7123、7514、5689 bp的条带及750 bp的eGFP片段,上述质粒构建成功。

### 2.2 重组杆状病毒的 PCR 验证

使用引物eGFP-f和M13-47对收获的P1代重组杆状病毒BV-WK-eGFP、BV-WK-ITR-eGFP、BV-WK(-)-eGFP的基因组DNA进行PCR验证,验证结果如图2,三支重组病毒均扩增出与目的大小相符的条带,证明获得的杆状病毒为含有插入目的片段的阳性病毒。

毒BV-WK-eGFP、BV-WK-ITR-eGFP荧光表达率明显高于阴性对照,ITRs能够有效延长eGFP的表达时间,比对照组BV-WK(-)-eGFP延长了72h。

图4-B表明,经VSV-GED假型化的重组杆状病毒BV-WK-eGFP、BV-WK-ITR-eGFP在72h时的转导效率分别可达57.3%、69.1%,而阴性对照BV-WK(-)-eGFP仅为32.6%。VSV-GED假型化的杆状病毒BV-WK-eGFP、BV-WK-ITR-eGFP转导OL细胞的时间明显缩短,比阴性对照BV-WK(-)-eGFP减少了24h,并且72h的转导效率分别高出阴性对照25.7%、36.5%。说明经过VSV-GED病毒假型化的重组杆状病毒可明显增加病毒进入OL细胞的比率,有效提高了转导效率。

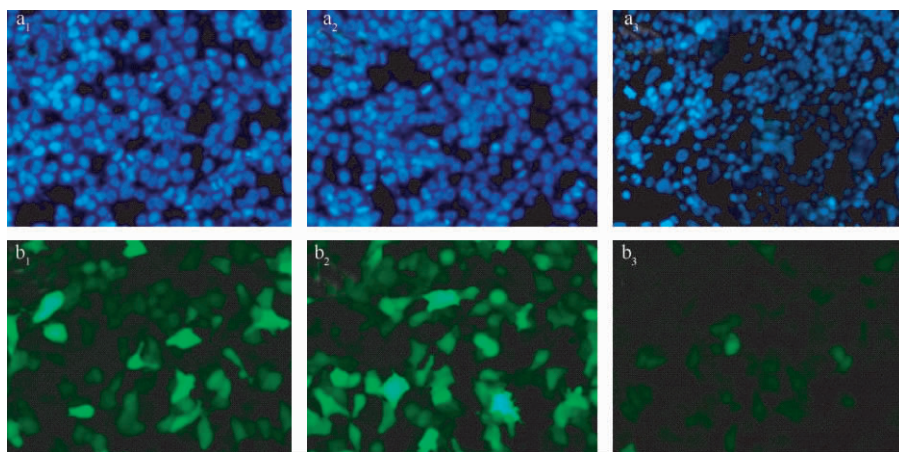


图 3. 重组杆状病毒介导 eGFP 在 OL 细胞中的表达情况 (200  $\times$ , 72 h)

Figure 3. eGFP-expression in OL cells mediated by recombinant baculovirus (200  $\times$ , 72 h), Karyotin of OL-BV-WK-eGFP (a1), BV-WK-ITR-eGFP (a2), BV-WK(-)-eGFP (a3); Expression of eGFP in OL-BV-WK-eGFP (b1), BV-WK-ITR-eGFP (b2), BV-WK(-)-eGFP (b3).

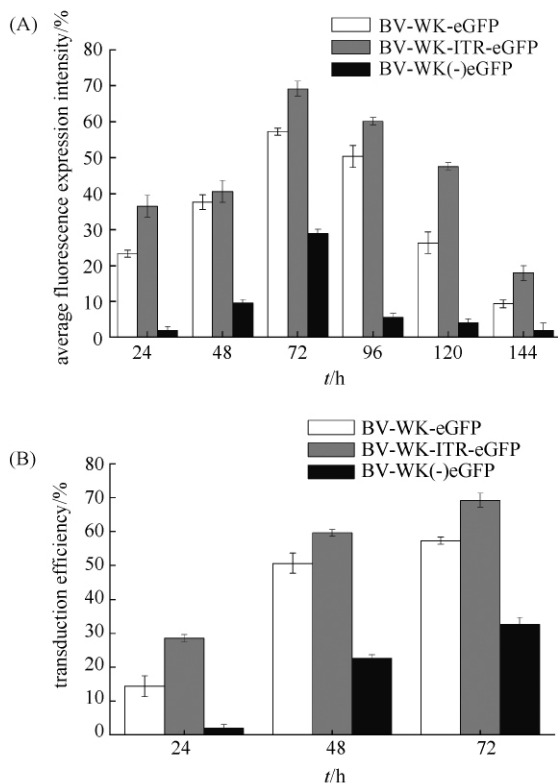


图 4 不同重组杆状病毒的平均荧光表达强度 (A) 及在 OL 细胞中的转导效率 (B)

Figure 4. Average fluorescence expression intensity (A) and transduction efficiency (B) of different recombinant baculovirus in OL cells.

### 3 讨论

#### 3.1 改进型重组杆状病毒的构建

虽然杆状病毒在介导外源基因的表达、基因治疗、组织工程等方面具有众多优势,是一种理想的工具,但它也有自身的不足之处<sup>[13-14]</sup>。本实验针对其转导树突状细胞的效率低、表达效率较工业化生产要求差距大、表达时间短等问题,通过使用哺乳动物细胞 EF1 $\alpha$  启动子及同时添加 WPRE、VSV-GED、ITRs 元件,构建改进型重组杆状病毒表达载体 pWK-ITR 使上述不足得以解决。在目前的研究报道中,虽然证实 WPRE、VSV-GED、ITRs 元件在提高杆状病毒介导外源基因表达方面具有重要作用,但很少有研究将三种元件同时应用于杆状病毒载体,并在 OL 细胞中表达外源基因,本实验构建的改进型重组杆状病毒解决了其对树突状细胞转导效率低的问题,具有较强的创新性。

#### 3.2 VSV-G 假型化杆状病毒转导效率的比较

有文献报道经 VSV-GED 假型化的杆状病毒转导效率比未经假型化的杆状病毒在转导鼠脾细胞效率上相差 15 倍<sup>[15]</sup>。在本实验中 BV-WK-eGFP、BV-WK-ITR-eGFP 的转导效率较阴性对照 BV-WK(-)-eGFP 明显提高,可能与 OL 细胞表面含有 VSV-GED 的受体有关,使得高转导效率得以实现。但是与文献报道的 15 倍有明显差距,这可能与细胞

系的种类有关系。其真正原因还需对多种细胞系进行比较后方可探讨出。

### 3.3 WPRE 对于 eGFP 表达效率的影响

WPRE 是强大的 RNA 顺式作用元件,通过提高 RNA 的多聚磷酸化可以实现转录后水平的调控。实验证明在目的基因的 3' UTR 插入 WPRE 可以增加外源基因的表达率和延长表达时间。有文献报道最佳培养条件和加入 WPRE 联合作用时能够使得外源蛋白的表达强度提高 60 倍<sup>[10]</sup>。

在本实验中,含有 WPRE 的病毒与阴性对照相比可较为明显的观察到 eGFP 表达强度的提高。在表达高峰时含 WPRE 的病毒 BV-WK-eGFP、BV-WK-ITR-eGFP 的 eGFP 表达强度显著高于阴性对照 BV-WK(-)-eGFP。

### 3.4 ITRs 对于 eGFP 表达的影响

本实验通过连续传代培养 OL 细胞发现含有 ITRs 的病毒比阴性对照的表达时间长 72 h。从而证明了本实验通过添加 ITRs 来延长表达时间的正确性。但是与所报道文献的 90 天超长表达还有较大差距,究其原因可能与所用的细胞系、培养条件、病毒感染的剂量有关。但是 ITRs 的添加的确使得其向临床应用迈出了一大步,它可以对机体产生长效的保护,省去了多次免疫的繁重工作。有研究证明,ITRs 将病毒单链的基因组转换为环状高分子量的多连体,并且增强这些多联体的稳定性和持久性<sup>[16]</sup>,但有关于 ITRs 在机体内的具体作用还有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(5) : 567-575.
- [2] Poomputsa K, Kittel C, Egorov A, Ernsta W, Grabherr R. Generation of recombinant influenza virus using baculovirus delivery vector. *Journal of Virological Methods*, 2003, 110(1) : 111-114.
- [3] Zhang XJ, Godbey WT. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, 58(4) : 515-534.
- [4] Song JH, Liang CY, Chen XW. Transduction of avian cells with recombinant baculovirus. *Journal of Virological Methods*, 2006, 135(2) : 157-162.
- [5] Abe T, Hemmi H, Miyamoto H, Moriishi K, Tamura S, Takaku H, Akira S, Matsuura Y. Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *Journal of Virology*, 2005, 79(5) : 2847-2858.
- [6] Condreay JP, Witherspoon SM, Clay WC, Kost TA. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Cell Biology*, 1999, 96(1) : 127-132.
- [7] Hu YC. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacological Sinica*, 2005, 26(4) : 405-416.
- [8] Wang CY, Wang S. Adeno-Associated Virus Inverted Terminal Repeats Improve Neuronal Transgene Expression Mediated by Baculoviral Vectors in Rat Brain. *Human Gene Therapy*, 2005, 16 : 1219-1226.
- [9] Mahonen AJ, Airene KJ, Purola S, Peltomaac E, Kaikkonen MU, Riekkinen MS, Heikuraa T, Kinnunen K, Roschiera MM, Wirtha T, Ylä-Herttua S. Post-transcriptional regulatory element boosts baculovirus-mediated gene expression in vertebrate cells. *Journal of Biotechnology*, 2007, 131(1) : 1-8.
- [10] Xu ZL, Mizuguchi H, Mayumi T, Hayakawa T. Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulation element enhances transgene expression from adenovirus vectors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General Subjects*, 2003, 1621(3) : 266-271.
- [11] Barsoum J, Brown R, Mckee M, Boyce FM. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Human Gene Therapy*, 1997, 8(17) : 2011-2018.
- [12] Wang CY, Li F, Yang Y, Guo HY, Wu CX, Wang S. Recombinant baculovirus containing the Diphtheria toxin A gene for malignant glioma therapy. *Cancer Research*, 2006, 66(11) : 5798-5806.
- [13] Kitagawa Y, Tani H, Limn CK, Matsunaga TM, Moriishi K, Matsuura Y. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *Journal of Virology*, 2005, 79(6) : 3639-3652.
- [14] 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.
- [15] Hu YC. Baculoviral Vectors for Gene Delivery: A Review. *Current Gene Therapy*, 2008, 8(1) : 54-65.

[16] Kaikkonen MU, Raity JK, Airene KJ, Wirth T, Heikura T, Ylä-Herttuala S. Truncated vesicular stomatitis virus G protein improves baculovirus transduction efficiency in

vitro and in vivo. *Gene Therapy*, 2006, 13 (11) : 304–312.

## Construction of recombinant baculovirus vectors started by EF1 $\alpha$

Dongni Gao, Liying Jin, Jingping Ge<sup>\*</sup>, Kun Wang, Qi An, Wenxiang Ping<sup>\*</sup>, Zhuangwei Lou

Key Laboratory of Microbiology, Engineering Research Center of Agricultural Microbiology, Ministry of Education, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, Heilongjiang Province, China

**Abstract** **【Objective】** To improve the transduction efficiency of baculovirus and exogenous gene expression level, we chose a mammalian cell-specific promoter-human extension factor 1 $\alpha$  promoter (EF1- $\alpha$ ), used virus pseudotyped tools – truncated vesicular stomatitis virus protein G (VSV-GED), added woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE) and adenovirus inverted terminal repeats (ITRs). **【Method】** We constructed two improved recombinant baculoviruses transfer vectors named pWK and pWK-ITR with the pFB-VSV-GED-WPRE. The recombinant transfer vectors pWK-eGFP, pWK-ITR-eGFP and pWK(-)-eGFP were constructed by inserting the Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) reporter gene into the downstream of EF1 $\alpha$  promoter. Constructed recombinant plasmid transfected Sf9 insect cells, and observed the expression of green fluorescent protein by using the inverted fluorescence microscope. **【Results】** The fluorescence expression rate of BV-WK-eGFP, BV-WK-ITR-eGFP containing WPRE and ITRs was significantly higher than the negative control, ITRs can effectively extend the expression time of eGFP, the expression time of eGFP in BV-WK-eGFP and BV-WK-ITR-eGFP increased 72 hours compared to the negative control BV-WK(-)-eGFP. The transduction time of VSV-GED pseudotyped baculovirus BV-WK-eGFP, BV-WK-ITR-eGFP was obviously shorten in OL cells, and reduced 24 hours compared to the negative control BV-WK(-)-eGFP, transduction efficiency were higher 25.7% and 36.5% than the negative control BV-WK(-)-eGFP, respectively. **【Conclusion】** The experiments proved that the VSV-GED could effectively improve the transduction efficiency of baculovirus, WPRE could enhance the expression efficiency of the exogenous gene significantly, and ITRs extend the expression time. The research will lay a foundation to explore improved recombinant baculovirus express exogenous genes in vertebrate cells and research the new recombinant live vector vaccine.

**Keywords:** baculovirus, VSV-GED pseudotyped virus, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE), adeno-associated virus (AAV) inverted terminal repeats (ITRs), elongation factor 1 $\alpha$  promoter (EF1- $\alpha$ )

(本文责编: 张晓丽)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-451-86609016; Fax: +86-451-86609016; E-mail: gejingping@126.com

Received: 9 September 2013 / Revised: 14 December 2013