

构建基于杆状病毒的 BV-T7 杂合表达体系及利用其在哺乳动物和禽类细胞中表达 eGFP 基因

葛菁萍, 唐晓艳, 高冬妮, 宋姗姗, 鲁珊, 楼庄伟, 平文祥*

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】研究重组杆状病毒 BV-T7 杂合表达体系能否有效转导禽类细胞并在禽类细胞中表达外源基因 (eGFP), 从而构建能在禽类细胞中高效稳定表达外源基因的重组杆状病毒表达系统。【方法】本研究利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统, 结合 T7 表达系统, 通过对 eGFP 表达水平的调控来把握噬菌体 T7 RNA 聚合酶 (T7 RNAP) 的功能。利用两支重组杆状病毒, pFastBac-CMV-T7 RNAP 重组杆状病毒为哺乳动物细胞启动子 CMV 调控的噬菌体 T7 RNA 聚合酶的 cDNA; pFB-T7pro-IRES-eGFP-T7ter 重组杆状病毒为 T7 启动子控制的 eGFP 报告基因。将两支重组杆状病毒共同侵染哺乳动物 OL (oligodendrocyte) 细胞、鸡胚成纤维细胞和鸡胚骨骼肌细胞。【结果】两支重组杆状病毒利用 T7 启动子和 T7 RNAP, 在 OL 细胞、鸡胚成纤维细胞和鸡胚骨骼肌细胞中成功表达 eGFP 报告基因, 而且未引起细胞病变, 但在鸡胚原代细胞中 eGFP 的表达相对弱于在 OL 细胞中的表达。在 OL 细胞中重组杆状病毒对细胞的转导效率为 59.5%, 在鸡胚成纤维细胞和鸡胚骨骼肌细胞中转导效率分别为 23.2% 和 33.1%。【结论】本研究构建的基于杆状病毒、T7RNA 聚合酶、T7 启动子 (BV-T7) 杂合表达体系能够在哺乳类细胞及禽类细胞中表达 T7 RNAP, 并利用 T7RNAP 继续高效而稳定地表达外源基因。这为难于体外操作的 RNA 病毒提供了有效的研究方法, 并对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。

关键词: 重组杆状病毒, T7 RNA 聚合酶/启动子, eGFP, OL 细胞, 鸡胚原代细胞

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 03-0318-08

杆状病毒的天然宿主是昆虫细胞, 近年来发现它可作为异源病毒进入哺乳类细胞, 并对哺乳类细胞无毒无害^[1]。多年来随着其分子水平的研究进展, 并通过杆状病毒在多种哺乳类细胞系中介导功能基因表达的研究, 逐渐证明杆状病毒是一种优良的基因治疗载体^[2]。目前发展的 Bac-to-Bac 表达体

系, 由于其构建方便快捷等独特优势, 成为目前最为优秀的杆状病毒表达载体系统^[3]。

在体外表达系统的研究中, 基于噬菌体 T7 RNA 聚合酶 (T7 RNAP) 及其启动子 (T7 promoter) 之间识别的特异性和高效性而建立的表达系统, 是目前在大肠杆菌中克隆和表达重组蛋白的最强大表达系统

基金项目: 国家自然科学基金 (31070446); 黑龙江省教育厅重点项目 (11551z011); 科技创新人才研究专项资金项目优秀学科带头人 (RC2010XK002028); 黑龙江大学高层次人才 (创新团队) 支持计划 (Hdtd2010-47); 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: wenxiangp@yahoo.com.cn

作者简介: 葛菁萍 (1972-), 女, 黑龙江省人, 博士, 教授, 从事病毒分子生物学研究。E-mail: gejingping@126.com

收稿日期: 2011-09-28; 修回日期: 2012-01-15

之一^[4]。由于 T7 RNAP 不需要任何辅助转录因子就能识别 T7 启动子并有极高的转录活性, 并且 T7 启动子具有特殊序列结构, 在哺乳动物细胞中不会出现相互竞争抑制现象。因此人们力求将其引入哺乳类细胞中。但由于真核生物启动子序列的差异和不同组织细胞内转录因子的特异性, 外源基因表达量的差异高达几个数量级^[5]。近年来已有大量事实证明, 已研究成功基于 T7 RNAP 的体内、体外转录系统^[6-8]。Krishnamurthy 等用 MVA-T7 系统拯救出了新城疫病毒 Beaudette C 株, 并将 CAT 基因插到 HN 与 L 基因之间的非必需区获得了表达^[9]。Buchholz 等^[10]建立了可表达 T7RNAP 的 BHK 细胞系衍生物, 并且可以用来拯救大量不同的重组病毒^[11]。Takayama 等^[12]建立了可以稳定表达 T7RNA 聚合酶的 BHK/T7-9 细胞克隆, 与 pC-T7Pol 质粒进行转染, 在雏鸡 β -肌动蛋白强启动子的控制下表达 T7 RNA 聚合酶, 并有效的拯救狂犬病病毒。但是其存在缺点, 如痘病毒对宿主有毒性, 能污染被拯救病毒, 稳定细胞很难建立和培养。

由于 T7 表达体系在细胞中的作用过程为, 先合成少量 T7 RNAP, 而后激活 T7 启动子, 从而启动外源基因表达, 因此人们一般先使用携带 T7 RNAP 基因的真核载体侵染细胞, 再使用含 T7 启动子的真核载体感染细胞, 即一种“感染-感染”的过程, 从而起到激活 T7 启动子启动外源基因表达的目的。另外, 有研究者使用共感染策略, 即将含有 T7 RNAP 基因的载体与含有 T7 启动子的两个载体共同感染细胞, 从而启动外源基因的表达。已有研究证明“感染-感染”与“共感染”策略的对比中, 外源基因的表达量几乎不受影响^[13]。

本研究即基于共感染策略, 构建在哺乳动物细胞和禽类细胞中完成瞬时表达的杆状病毒-T7 RNA 聚合酶 (BV-T7) 杂合表达体系。与以往应用广泛的痘苗病毒-T7 表达体系相比, BV-T7 表达体系的最大优点是在哺乳动物和禽类细胞中无致病基因的复制且不引起细胞病变, 此外利用它完成病毒拯救能够回收到高滴度的感染性病毒粒子。这为难于体外操作的 RNA 病毒提供了有效的研究方法, 并对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。为外源基因在哺乳动物细胞和禽类细胞中的高效表达提供了一个全新的表达体系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、DH10Bac 由本实验室提供; 鸡胚成纤维细胞、鸡胚骨骼肌细胞由本实验室制备; Sf9 昆虫细胞由本实验室冻存; SPF 鸡胚由哈尔滨兽医研究所惠赠; OL 细胞由哈尔滨医科大学张凤民教授惠赠。

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; 核染色试剂 (bisBenzimide H 33342 trihydrochloride) 购自 SIGMA 公司。PCR 仪 (Effendorf GA Germany); 凝胶成像分析系统 (美国 Alpha Innotech 公司); Beckman 高速冷冻离心机 (Beckman instrument's, INC.); 二氧化碳培养箱 (Thermo 公司); TE2000 倒置荧光显微镜 (NIKON)。

1.1.3 质粒: pMD18-T Vector, 购自大连宝生物工程有限公司; pEGFP-C3、pIRES、pET-30a、pFastBac [PH]、pFastBac-CMV-T7 RNAP 由楼庄伟教授惠赠; pMD-T7-IRES, pMD-GFP-T7ter, pFB-T7pro-IRES-GFP-T7ter 为实验室自行构建质粒。

1.2 引物设计

本研究所用引物是根据 GenBank 中所收录的各载体的全核苷酸序列或病毒基因组序列所设计的 (表 1)。

1.3 质粒构建各片段的克隆

以质粒 pEGFP-C3、pET-30a、pIRES 2 μ L 为模板, 按照 TAKARA 公司 Taq 酶 50 μ L 反应体系使用方法, 以 LS-1 和 LS-2、LS-3 和 LS-4、LS-5 和 LS-6 为引物, 扩增 754 bp eGFP 片段、194 bp T7 terminator 片段、617 bp 含有 T7 promoter 的 IRES 片段, PCR 反应循环程序如 Takela 说明书。1% 琼脂糖电泳鉴定 PCR 产物。按华舜小量胶回收试剂盒说明书回收 PCR 产物。LS-1、LS-4 为引物, 进行融合 PCR 的方法获得 910 bp 的 GFP-T7 ter 片段, 各片段与 pMD18-T 载体于 16 $^{\circ}$ 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 pMD-GFP-T7 ter、pMD-T7-IRES。

表 1 本文所用引物列表

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences of primers (5'→3')	Restriction sites
LS-1	TATCTGCAGCGCCACCATGGTGAGCAAG	<i>Pst</i> I
LS-2	CCCCAAGGGGTTATGCTATTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	-
LS-3	CATGGACGAGCTGTACAAGTAATAGCATAACCCCTTGGGGC	-
LS-4	ATACTCGAGGCTAGGGCGCTGGCAAGT	<i>Xho</i> I
LS-5	CTAGAATTCTAATACGACTCACTATAGAATTGCGCCCTCTCCCT	<i>EcoR</i> I
LS-6	TATCTGCAGTTATCATCGTGTTCCTCAAAGGAAA	<i>Pst</i> I
M13	GTTTCCAGTCACGAC	-
M13	CAGGAAACAGCTATGAC	-
ZL-1	GCCAAGCTTATGAACACGATTAACATCGCTAAG	<i>Hind</i> III
ZL-2	TAAGGATCCTTACGCGAACGCGAAGTCCGAC	<i>Bam</i> H I

1.4 杆状病毒转移载体 pFB-T7-IRES-GFP-T 7ter 的构建

利用限制性内切酶用 *EcoR* I 和 *Pst* I 分别双酶切 pMD-T7-IRES 和 pFastBac [PH] 质粒载体,酶切产物 T4 连接酶连接,连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,经抗性筛选,以碱裂解法小量制备质粒得到重组质粒 pFB-T7-IRES。将 pMD-GFP-T7 ter 和 pFB-T7-IRES 分别用 *Pst* I 和 *Xho* I 进行双酶切,将纯化的双酶切产物连接转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。挑取单菌落,经酶切和 PCR 鉴定筛选到阳性重组子,命名为 pFB-T7-IRES-GFP-T 7ter(图 1)。

1.5 重组杆状病毒的构建

SEM 法制备感受态细胞 *E. coli* DH10Bac,质粒 pFB-T7-IRES-GFP-T7 ter 转座 *E. coli* DH10Bac。涂布于含有抗生素(含终浓度为 50 μ g/mL 卡那霉素、7 μ g/mL 庆大霉素、10 μ g/mL 四环素、和终浓度为 100 μ g/mL IPTG 和 40 μ g/mL X-Gal)的平板中,经蓝白斑筛选,碱裂解法提取 Bacmid DNA,利用 M13 引物 PCR 鉴定筛选,重组 Bacmid 命名为 Bacmid-T7-IRES-GFP-T 7ter 用于下一步转染。

按 Cellfectin[®] Reagent 转染试剂盒说明书,将 1 μ g 自行构建的 pFB-T7pro-IRES-GFP-T7ter 重组杆状病毒和 pFastBac-CMV-T7 RNAP 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 细胞逐渐发生改变,至 3d 细胞出现感染迹象时,收集上清 4 $^{\circ}$ C 避光保存,即为 P1 代病毒。提取所获病毒 DNA,分别以 ZL-1 和 ZL-2、LS-5 和 LS-4 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 \times 稀释倍数 \times 1/每孔病毒量(mL)。P3 代重组杆状病毒的滴度分别为 1.1×10^8 pfu/mL (BV CMV-T7 RNAP)、 1×10^8 pfu/mL (BV T7-GFP-T7 ter Titer)。

1.6 重组杆状病毒在哺乳动物细胞和鸡细胞中表达 eGFP 报告基因

OL 细胞以 2×10^4 个/孔的细胞密度接种到 96 孔细胞培养板。37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。同时加入 50 MOI (multiplicity of infection,感染复数)的 BV-CMV-T7 RNAP 和 BV-T7-IRES-GFP 病毒 P3 储备,开始病毒的侵染。37 $^{\circ}$ C 培养 12h 后更换新鲜 DMEM 完全培养液。为增强侵染,向培养液中加入终浓度为 1 mM 的丁酸钠溶液。在重组杆状病毒侵染后培养 24h 观察 eGFP 报告基因的表达。

制备 10 日龄 SPF 鸡胚成纤维细胞和取 12 日龄鸡制备胚骨骼肌细胞, 10^6 个/mL 密度将细胞接种到培养瓶中,每瓶 5 mL,于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中培养。长成单层后按一定滴度接种重组杆状病毒,于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中继续培养。在重组杆状病毒侵染后培养 24 h 观察 eGFP 报告基因的表达。

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。用 4% 多聚甲醛 25 $^{\circ}$ C 固定 10 min, PBS 洗涤 1 次。每孔加入 50 μ L 荧光核染料 (5 μ g/mL), 25 $^{\circ}$ C 静置 20 min; 弃去液体,加入 100 μ L PBS 洗涤 3 次,使固定后的细胞浸泡在 PBS 溶液中, 4 $^{\circ}$ C 保存。细胞核染色后,利用 NIKON

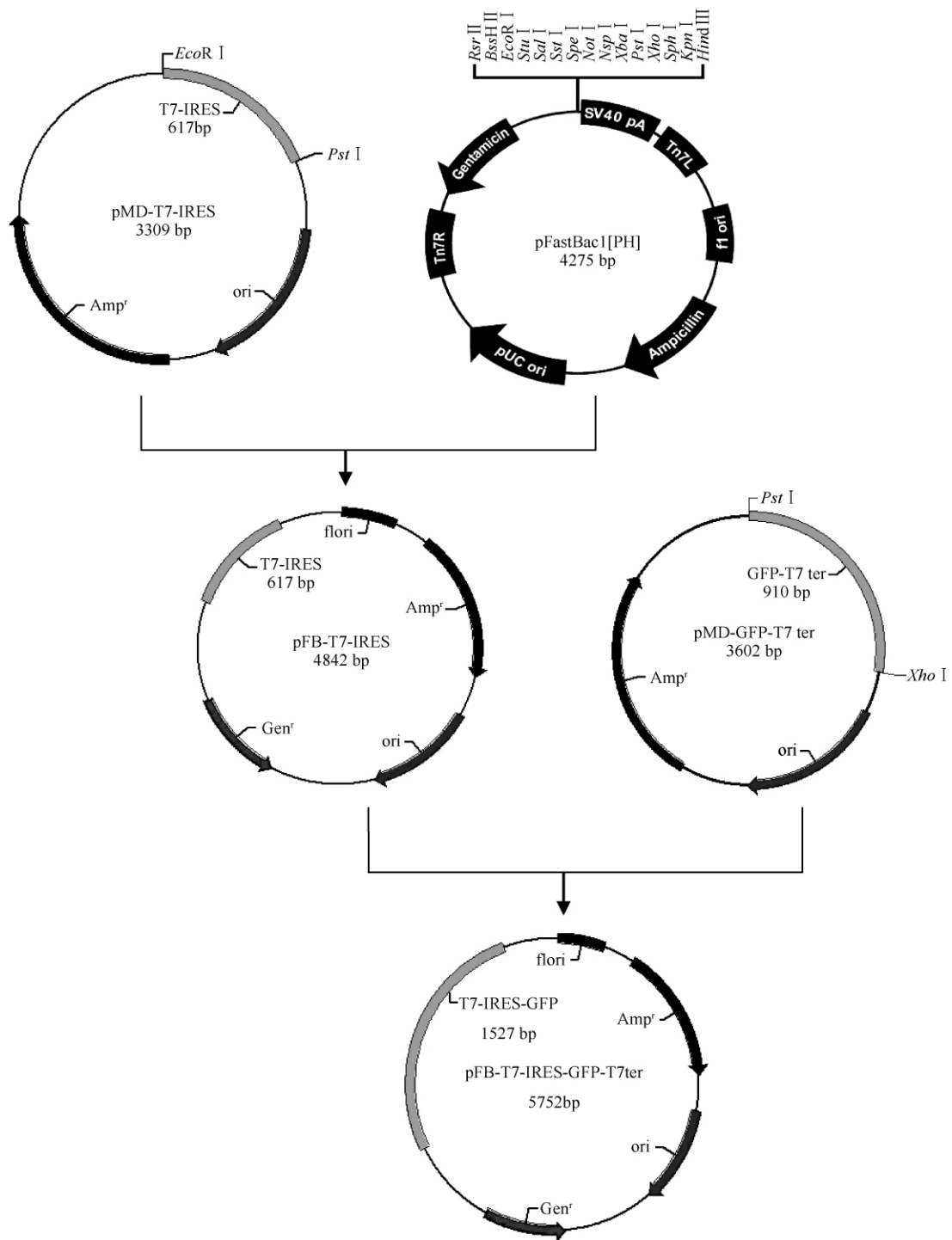


图 1 杆状病毒转移载体 pFB-T7-IRES-GFP-T7ter 的构建
 Fig. 1 Construction of baculovirus transfer vector pFB-T7-IRES-GFP-T7ter.

TE2000 型倒置荧光显微镜观察细胞形态及荧光表达情况。分别在 UV 光和 G 光下观察细胞, 以在 UV 光下观察到的发荧光细胞核数代表细胞总数; 在 G 光下, 表达 eGFP 的细胞为绿色, 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 eGFP 的表达率, 该表达率也代表重组杆状病毒对细胞的转导效率。CellProfiler™ 软件检测表达 eGFP 的阳性细胞的比例和细胞平均荧光强度。

2 结果和分析

2.1 eGFP 基因、T7 terminator 片段和 IRES 片段克隆

将试验获得的 754 bp eGFP 片段和 194 bp T7 terminator 片段进行融合 PCR,获得 910 bp GFP-T7 ter 片段。将得到的 GFP-T7 ter 片段和 617 bp 含有 T7 promoter 的 IRES 片段,分别与 pMD18-T 载体于 16℃ 连接过夜,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,获得重组质粒,分别命名为 pMD-GFP-T7 ter 和 pMD-T7-IRES。将两个重组质粒进行酶切和 PCR 鉴定。pMD-T7-IRES 经 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切得到 T 载体 (2692 bp) 和 IRES (617 bp); pMD-GFP-T7 ter 经 *Pst* I 和 *Xho* I 酶切得到 T 载体 (2692 bp) 和 GFP-T7 ter (910 bp),各片段大小正确。

2.2 杆状病毒转移载体 pFB-T7-IRES-GFP-T 7ter 的构建

按照杆状病毒转移载体的构建策略,获得重组质粒 pFB-T7-IRES-GFP-T 7ter。分别以 ZL-1 和 ZL-2、LS-1 和 LS-2、LS-3 和 LS-4、LS-5 和 LS-6 为引物,进行 PCR 反应验证质粒,分别得到与预期相符的 194 bp 的 T7 terminator 片段、617 bp 的 IRES 片段、754 bp 的 eGFP 基因和 2.65 kb 的 T7 RNAP 基因片段。表明 pFB-T7-IRES-GFP-T 7ter 重组质粒构建成功。

2.3 重组杆状病毒的筛选与鉴定

将利用引物 PCR 鉴定筛选的重组转移载体 pFB-T7-IRES-GFP-T 7ter 转化 *E. coli* DH10Bac,获得 Bacmid (Bacmid-T7-IRES-GFP-T7ter),该重组 Bacmid DNA 转染 Sf9 昆虫细胞,72 h 后细胞出现感染迹象。收取发生病变的细胞上清,提取病毒 DNA,以 BV-CMV-T7 RNAP 为模板 DNA,以 ZL-5 和 ZL-6 为引物进行 PCR 反应。以 BV-T7-IRES-GFP 为模板 DNA,分别以 LS-4 和 LS-5、ZL-5 和 ZL-6 为引物进行 PCR 反应。1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,在 BV-CMV-T7 RNAP 中得到了 2.65 kb 的 T7RNAP 目的条带;在 BV-T7-IRES-GFP 中,得到了约 1.5 kb 的 T7-IRES-GFP 目的条带(图 2)。说明重组 bacmid 构建成功并获得带有目的片段的重组杆状病毒。

2.4 重组杆状病毒在 OL 细胞和鸡细胞中的表达

重组杆状病毒 (BV-CMV-T7 RNAP; BV-T7-

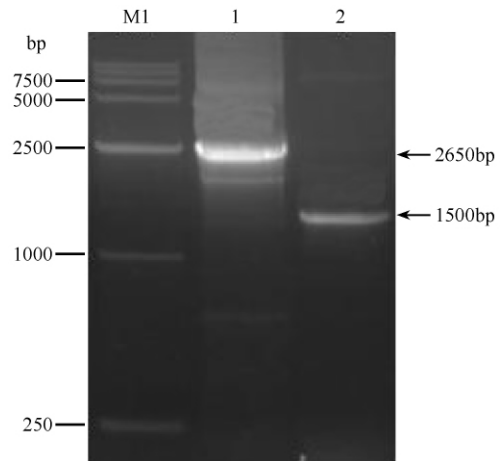


图 2 组杆状病毒 P1 代病毒核酸鉴定结果

Fig.2 The PCR result of P1 recombinant baculovirus DNA. Lane M1, DNA marker mixture DL15000; Lane 1, PCR amplification of T7 RNAP; Lane 2, PCR amplification of T7-IRES-GFP.

IRES-GFP) 共感染 OL 细胞、鸡胚成纤维细胞和鸡胚骨骼肌成纤维细胞,同时两支重组杆状病毒分别感染细胞,互为负对照。感染 48h 后,观察荧光表达情况。在重组杆状病毒共感染的细胞中观察到 eGFP 的表达,而在二者分别感染的细胞中,均未见荧光表达(图 3)。但在鸡胚原代细胞中 eGFP 的表达相对弱于在 OL 细胞中的表达。在 OL 细胞中重组杆状病毒对细胞的转导效率为 59.5%,在鸡胚成纤维细胞和鸡胚骨骼肌细胞中转导效率分别为 23.2% 和 33.1%。

3 讨论

反向遗传学是针对 RNA 病毒发展起来的,实现了直接对 DNA 操作来研究 RNA 病毒的基因结构与功能。应用体外转录来拯救病毒的反向遗传学方法应用比较普遍,但是体外制备病毒基因组 RNA,成本高、RNA 不稳定、转染效率不高等缺点。因此,急需建立一种无需体外制备 RNA、拯救效率高的体内拯救病毒的方法。我们选择 T7 RNAP 系统作为拯救病毒的转录体系,将体外表达转为体内表达。在真核启动子 CMV 的调控下表达 T7 RNAP,从而调控在 T7 启动子控制下的外源基因在体内进行转录。

近年来发展的以表达 T7 RNAP 的痘病毒为基础的体内拯救方法,已经成功地从一些 RNA 病毒的 cDNA 克隆中拯救到了感染性病毒^[14]。但是痘病毒

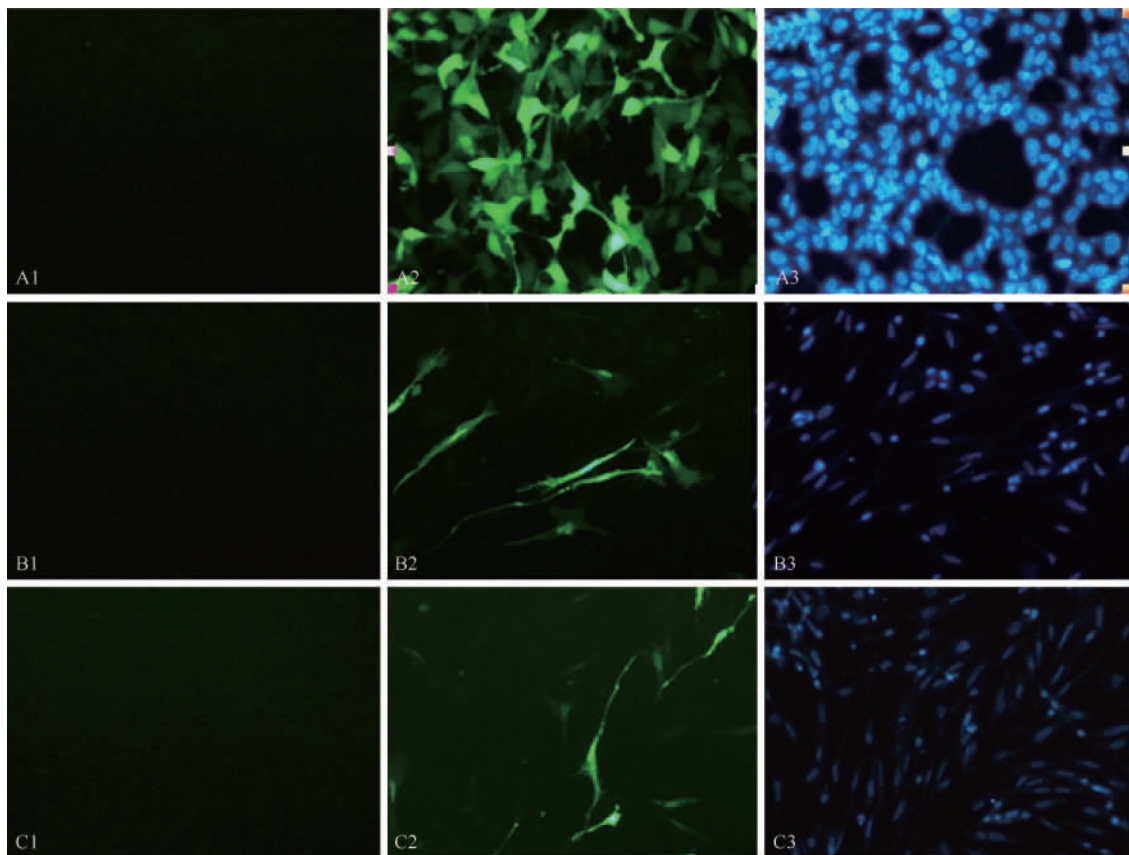


图3 荧光显微镜观察杆状病毒转染 OL 细胞、鸡胚成纤维细胞、鸡胚骨骼肌细胞 48h 后表达 eGFP 报告基因 (200 ×)

Fig. 3 Fluorescence microscopy of eGFP expression in OL cells, CEF cells and myoblast cells transfected with baculovirus at 48 h post transfection (200 ×). Expression of eGFP in OL cells (A), CEF cells (B) and myoblast cells (C). The negative control of OL cells (A1), CEF cells (B1) and myoblast cells (C3). The eGFP were expressed in OL cells (A2), CEF cells (B2) and myoblast cells (C2) at 48 h post transfection. The OL cells (A3), CEF cells (B3) and myoblast cells (C3) transduced with baculovirus were stained with bisBenzimide H 33342 trihydrochloride.

毒株可使宿主细胞病变,降低病毒拯救效率,并且易导致全长基因组与辅助质粒基因发生同源重组,子代痘病毒的释放同时也会干扰重组子代病毒的释放,干扰对目的产物的分析的缺点。为了克服痘病毒的缺点,建立了无痘病毒拯救系统,即构建可以稳定表达 T7RNAP 的细胞系来完成病毒拯救,如 BSR T7/5、BHK/T7-9^[11-12]。但是稳定细胞很难建立和培养。而我们应用的杆状病毒无以上缺点,具有新型活载体疫苗的潜力。田飞鹏等^[15]发现杆状病毒经过修饰也可以在哺乳动物细胞内成功表达外源基因,并用于如丁型肝炎病毒^[16]、沙波病毒^[17]等疫苗研究。但是在禽类细胞中的研究较少。本研究构建的重组杆状病毒通过转导的方式将带有 T7RNA 聚合酶和 T7 启动子的质粒导入到真核细胞中,在哺乳动物 OL 细胞和鸡胚成纤维细胞、鸡胚骨骼肌细胞中成功表达 eGFP 报告基因,转导效率分别为

59.5%、23.2% 和 33.1%,而作为阴性对照的转染的细胞观察不到绿色荧光。与虞结梅等^[18]将 pcDNA3.1(+)/T7 RNP 和 pcDNAII/EGFP/TER 重组质粒共转染小仓鼠肾细胞 BHK,共转染后 48 h,发现约 20% - 30% 的细胞表达 eGFP 相比,具有更高的转导效率。由此证明在 CMV 调控下的 T7RNA 聚合酶在真核细胞内顺利表达并与 T7 启动子相互作用,介导转录的顺利进行,从而使得 eGFP 在真核细胞中成功转录并表达。

我们推测共感染表达体系被摄入真核细胞后,其表达依赖于宿主细胞的遗传表达机制,即由真核启动子 CMV 调控 T7 RNA 聚合酶的合成,进而启动 T7 启动子下游目的基因的表达。其作用原理可能为,首先由进入细胞核的 BV-CMV-T7 RNAP 所含的真核启动子元件 CMV 启动子调控 T7RNAP 的表达,然后产生 T7 RNAP 再作用于 BV-T7-IRES-GFP

存在的 T7 IRES 中的原核启动子元件 T7 启动子,调控下游目的基因的表达。常用的真核生物 T7 启动子系统一般是在细胞质中表达 T7 RNAP 并在细胞质中转录和翻译外源基因,但这只能是暂时性表达^[19]。而本研究构建的质粒 pFB-T7-IRES-GFP 中已融合进核定位因子,可使细胞质中的 T7 RNA 聚合酶进入到核内,从而使外源基因转录在核内进行,提高了细胞表达的稳定性。利用 T7 RNAP 进行 T7 启动子启动转录时,启动强度与常用的 CMV 启动子相近。但由于 T7 启动子/T7 RNA 聚合酶系统具有的特异性,避免了 CMV 启动子直接启动外源基因的表达水平的高度不稳定性(有时可相差 100 倍以上)^[20]。这是该表达系统的又一个优点。

本研究首次将构建的 BV-T7 杂合表达体系在哺乳动物细胞 OL 中成功表达 eGFP 报告基因,并进一步证明它可以在鸡胚成纤维细胞和鸡胚骨骼肌细胞中获得表达,从而推断,该体系可以有效导入禽类细胞,这为禽类疫苗开发提供了先进而高效的新型基因工程载体。使用 BV-T7 表达体系再结合反向遗传操作技术可为禽类 RNA 病毒的拯救提供一条有效途径。

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] Liu X , Li K , Song J , Liang C , Wang X , Chen X. Efficient and stable gene expression in rabbit intervertebral disc cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Spine* , 2006 , 31 (7) : 732-735.
- [3] Kost TA , Condreay JP. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends in Biotechnology* , 2002 , 20 (4) : 173-180.
- [4] Parks CL , Wang HP , Kovacs GR , Vasilakis N , Kowalski J , Nowak RM , Lerch RA , Walpita P , Sidhu MS , Vdem SA. Expression of a foreign gene by recombinant canine distemper virus recovered from cloned DNAs. *Virus Research* , 2002 , 83 (1/2) : 131-147.
- [5] Chaudhry Y , Skinner MA , Goodfellow IG. Recovery of genetically defined murine norovirus in tissue culture by using a fowlpox virus expressing T7 RNA polymerase. *Journal of General Virology* , 2007 , 88 (8) : 2091-2100.
- [6] Govindarajan D , Buchholz UJ , Samal SK. Recovery of avian metapneumovirus subgroup C from cDNA: cross-recognition of avian and human metapneumovirus support proteins. *Journal of Virology* , 2006 , 80 (12) : 5790-5797.
- [7] Yoneda M , Guillaume V , Ikeda F , Sakuma Y , Sato H , Wild TF , Kai C. Establishment of a Nipah virus rescue system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2006 , 103 (44) : 16508-16513.
- [8] Zheng HX , Liu XT , Shang YJ , Wu JY , Bai XW , Jin Y , Sun SQ , Gou HC , Jian H , Feng X , Yin SH , Guo JH , Cong GZ , Liu ZX , Chang HY , Ma JW , Xie QG. Infective viruses produced from full-length complementary DNA of swine vesicular disease viruses HK/70 strain. *Chinese Science Bulletin* , 2006 , 51 (17) : 2072-2078.
- [9] Krishnamurthy S , Huang ZH , Siba K. Recovery of a virulent strain of Newcastle disease virus from cloned cDNA: Expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation. *Virology* , 2000 , 278 (1) : 168-182.
- [10] Buchholz UJ , Finke S , Conzelmann KK. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture , and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *Journal of Virology* , 1999 , 73 (1) : 251-259.
- [11] Enterlein S , Volchkov V , Weik M , Kolesnikova L , Volchkova V , Klenk HD , Muhlerger E. Rescue of recombinant Marburg virus from cDNA is dependent on nucleocapsid protein VP30. *Journal of Virology* , 2006 , 80 (2) : 1038-1043.
- [12] Takayama-Ito M , Yamada K , Hosokawa J , Sugiyama M , Minamoto N. Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse genetics system. *Microbiology and Immunology* , 2003 , 47 (8) : 613-617.
- [13] de Wit E , Spronken MI , Vervaeke G , Rimmelzwaan GF , Osterhaus AD , Fouchier RA. A reverse genetics system for Influenza A virus using T7 RNA polymerase. *Journal of General Virology* , 2007 , 88 (4) : 1281-1287.
- [14] Harty RN , Brown ME , Hayes FP , Wright NT , Schnell MJ. Vaccinia virus-free recovery of vesicular stomatitis virus. *Journal of Molecular Microbiology Biotechnology* , 2001 , 3 (4) : 513-517.
- [15] 田飞鹏 , 曹轶梅 , 卢曾军. 杆状病毒介导外源基因在

- 哺乳动物细胞中表达的研究进展. 微生物学通报 (*Institute of Microbiology*), 2009, 25 (1): 1876-1881.
- [16] Chiang YW, Wu JC, Wang KC, Chou ST, Hu YC. Varied Properties of Hepatitis-Delta Virus-like Particles Produced by Baculovirus-Transduced Mammalian Cells. *The Open Biotechnology Journal*, 2007, 1 (1): 34-40.
- [17] Oka T, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Katayama K, Wakita T, Takeda N. Self-assembly of sapovirus recombinant virus-like particles from polyprotein in mammalian cells. *Microbiology and immunology*, 2009, 53 (1): 49-52.
- [18] 虞结梅, 杨兵, 谢灿. T7 RNA 聚合酶的克隆及其介导基因转录功能的鉴定. 安徽医科大学学报 (*Acta Universitatis Medicinalis Anhui*), 2007, 42 (3): 272-275.
- [19] Cheng X, Li Y, Xiong K, Xie Y, Aizicovici S, Snodgrass R, Wagner TE, Platika D. A novel nonviral cytoplasmic gene expression system and its implication in cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther*, 1995, 2 (4): 281-289.
- [20] Ribas AV, Ho PL, Tanizaki MM, Raw I, Nascimento AL. High-level expression of tetanus toxin fragment C-thioredoxin fusion in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2000, 31 (2): 91-94.
- [18] 虞结梅, 杨兵, 谢灿. T7 RNA 聚合酶的克隆及其介

Construction of BV-T7 hybrid expression system based on baculovirus to express target gene eGFP in mammalian and chicken cells

Jingping Ge, Xiaoyan Tang, Dongni Gao, Shanshan Song, Shan Lu, Zhuangwei Lou, Wenxiang Ping*

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

Abstract: [Objective] To investigate whether the recombinant baculovirus BV-T7 hybrid expression system can be effectively transduced into chicken cells *in vitro*, and whether it can express the foreign genes (eGFP). [Method] We established a hybrid baculovirus-T7 RNA polymerase system for transient expression in mammalian cells and chicken cells. Two recombinant baculoviruses were constructed, one carrying cDNA of bacteriophage T7 RNA polymerase, with a nuclear localization signal, under the control of a mammalian promoter and the other expressing eGFP gene under the control of T7 promoter. The constructed recombinant baculoviruses co-infected mammalian oligodendrocyte cells, as well as chicken embryo fibroblasts cells and chicken embryo skeletal muscle cells. [Results] The eGFP activity was detected in mammalian cell lines and embryo fibroblasts cells and chicken embryo skeletal muscle cells. The recombinant baculovirus transduction efficiency of oligodendrocyte cells was 59.5%, and in CEF cells and myoblast cells the transduction efficiencies were 23.2% and 33.1%. [Conclusion] BV-T7 hybrid expression could be expressed T7 RNAP in mammalian cells and avian cells.

Keywords: recombinant baculovirus, T7 RNA polymerase/T7 promoter, eGFP, OL cells, chike-embryo primary cells

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31070446), by the Education Department of Heilongjiang Province Key Project (11551z011), by the Technological Innovation Projects of Special Funds for Outstanding Academic Leaders (RC2010XK002028), by the Advocacy Project for Higher Talent Innovation Teams of Heilongjiang University (Hdtd2010-17) and by the Education Department of Heilongjiang Province Scientific Technology Research Project (12511423)

* Corresponding author. Tel: +86-451-86608046; Fax: +86-451-86609016; E-mail: wenxiangp@yahoo.com.cn

Received: 28 September 2011 / Revised: 15 January 2012