

重组痘苗病毒对不同哺乳动物细胞株的感染效率及 EGFP 表达水平研究

吴婷, 欧山海, 陈敏, 程通, 何水珍, 张军, 夏宁邵*

(厦门大学福建省医学分子病毒学研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 研究重组痘苗病毒对不同哺乳动物细胞的感染效率及表达水平, 可为痘苗病毒表达系统宿主细胞的正确选择提供依据。本研究利用重组绿色荧光蛋白基因的痘苗病毒 WR-EGFP 同时感染不同的哺乳动物细胞株, 利用流式细胞仪检测 EGFP 的表达强度。共使用 20 种哺乳动物细胞株, 其中 10 种人类组织细胞, 2 种猴组织细胞, 8 种小鼠组织细胞。结果表明, 重组痘苗病毒 WR-EGFP 对鼠细胞系 BHK21 和人细胞系 A-549 的感染效率和表达效率最佳; 整体看, 痘苗病毒对多数灵长类动物细胞的感染效率和表达效率优于鼠细胞; 对贴壁细胞的感染效率和表达效率明显优于悬浮细胞; 但没有特别的组织嗜性。

关键词: 重组痘苗病毒; 绿色荧光蛋白; 流式细胞仪

中图分类号: R 373

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005)06-0866-04

痘苗病毒属于痘病毒科, 正痘病毒属, 在人类彻底消灭天花的战斗中一直作为疫苗广泛使用并发挥了关键作用。痘病毒是目前发现的所有病毒中最大、最复杂的一类病毒。在表达外源基因的各种重组病毒载体中, 痘病毒可容纳外源基因的长度和数量最大^[1], 因此有大量的研究将痘苗病毒用于发展高效、安全而且价廉的新型重组活疫苗^[2-4], 其中有些已进入临床试验阶段。痘苗病毒的另一个重要用途是作为高效表达外源基因的载体, 用于获得真核表达重组蛋白产品^[5]。

已有研究证实在实验室中痘苗病毒能在兔肾及睾丸、鸡胚、牛胚、HeLa 和换代细胞及其他多种细胞上繁殖^[6], 但平行定量比较痘苗病毒对多种常用哺乳动物细胞株的感染效率及在不同细胞中的表达效率的研究仍十分少见。本研究平行比较了重组痘苗病毒对多种哺乳动物细胞的感染效率及表达效率, 为痘苗病毒表达系统的合理使用提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 细胞株、病毒和质粒

CV-1、293、143B、HepG2、PLC/PRF/5、WI-38、DMS-114、JC、L-929、P815、TIB75 细胞株购自

ATCC; HeLa、CHO、NIH3T3、Raji、BHK21、A-549、PA317、Verø-E6、LCL-cm 细胞株由本实验室保存。重组痘苗病毒 WR 株和重组痘苗病毒用载体 pV 由香港大学 Ng 教授实验室惠赠。携带增强型绿色荧光蛋白基因的质粒 pEGFP 购自 Clontech 公司。

(2) 仪器

荧光倒置显微镜为 Nikon Diaphot 300 型, 流式细胞仪为 Beckman Coulter EPICS XL。

1.2 方法

(1) 用于重组痘苗病毒 WR-EGFP 的载体 pV-EGFP 的构建

用限制性内切酶 *SmaI* 和 *StuI* 酶切质粒 pEGFP, 回收约 750 bp 的片段, 插入经限制性内切酶 *SmaI* 线性化的载体 pV 中, 即位于痘苗病毒早晚期启动子 P7.5 的下游, 酶切鉴定, 确定 EGFP 基因与启动子方向一致。

(2) 重组痘苗病毒的构建、扩增及病毒滴度测定

参考文献[2]。野生痘苗病毒 WR 感染 CV-1 细胞, 37℃ 2 h 后转染 pV-EGFP 质粒(按产品说明操作), 48 h 后刮下细胞, 冻融 3 次, 作为重组病毒 WR-EGFP 储存液。将重组病毒储存液稀释不同倍数后感染 143B 细胞, 48 h 后挑取蓝色空斑, 进一步用 CV-1 细胞扩增。获得的病毒用 CV-1 细胞测定病毒滴度。

(3) 重组痘苗病毒感染哺乳动物细胞

哺乳动物细胞用胰酶消化吹散后铺 24 孔培养板, 每孔细胞数量约为 1×10^5 。37℃ 培养 12 h 后弃去原培养基, PBS 洗 1 次, 分别加入 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5

收稿日期: 2004-11-03

基金项目: 福建省科技重大专项(2004YZ01)资助

作者简介: 吴婷(1973-), 女, 博士。

* 通讯作者: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn

PFU 的 WR-EGFP 和 1×10^5 PFU 的痘苗病毒 WR, 37℃ 培养 2 h 后更换为 2% 的原培养基, 继续培养 24 h 和 48 h 后进行观察和检测。

(4) 流式细胞仪检测病毒感染效率及阳性细胞平均荧光强度

待检测的细胞经胰酶消化并吹散为单细胞悬液, 细胞悬浮液经 200 目的尼龙网过滤后使用流式细胞仪检测, 激发波长为 488 nm, 检测波长为 525 nm, 用 EXPO32 软件对采集的数据进行分析。

2 结果

2.1 痘苗病毒对不同哺乳动物细胞的感染效率及表达效率比较

用 MOI 0.01、0.1 和 1 的携带 EGFP 报告基因的重组痘苗病毒 WR-EGFP 对 10 种人细胞、2 种猴组织细胞以及 8 种小鼠细胞进行感染, 在 48 h 后利用流式细胞仪计算细胞发出绿色荧光的百分比(细胞感染率)

和平均荧光强度(表 1, 结果为 3 次实验的平均值)。

结果表明, 在各种哺乳细胞株中, 痘苗病毒对鼠 BHK21 和人 A-549 细胞的感染效率及表达效率均最高, 甚至仅以 MOI 0.01 的低剂量即可达到 90% 以上的感染率, 当以 MOI 0.1 以上剂量感染时感染率接近 100%, 平均荧光强度在 400 以上。痘苗病毒对 143B 的感染效率与 BHK21 和 A-549 接近, 而表达效率稍低一些, 但也明显高于其他细胞。对 PLC/PRF/5、WI-38、HepG2、Hela 和 DMS 114 细胞在 MOI 1 剂量时也在 90% 左右, 表达效率稍低一些, 荧光强度在 200~300 左右。痘苗病毒对两株悬浮细胞(LCL-cm 和 Raji)的感染效率和表达效率均很低, 即使以 MOI 1 的高剂量感染, 也仅能达到 30% 左右的感染率, 感染细胞内的平均荧光强度仅为 50 左右。293 细胞是人贴壁细胞中唯一低表达的细胞, 虽然感染效率可达 80% 左右, 但感染细胞的平均荧光强度仅为 60.0, 与两株悬浮细胞(LCL-cm 和 Raji)相当。在 2 株猴贴壁细胞株中, 病

表 1 重组痘苗病毒 WR-EGFP 对不同细胞系的基因转移效率及表达效率

Tab. 1 Efficiency of gene-transfer and gene-expression of recombinant vaccinia virus WR-EGFP in different cell lines

细胞株	组织来源	特征	转染效率(%) [*]			平均荧光强度 [*]		
			MOI= 0.01	MOI= 0.1	MOI= 1	MOI= 0.01	MOI= 0.1	MOI= 1
人								
A-549	肺癌	粘附	93.8	98.7	98.9	326.0	453.3	467.7
143B	骨肉瘤	粘附	96.5	98.5	98.6	230.7	277.7	363.0
PLC/PRF/5	肝癌	粘附	89.9	96.6	95.4	188.3	273.7	274.7
WI-38	胚肺	粘附	80.3	93.1	98.0	142.0	178.0	244.3
HepG2	肝癌	粘附	73.7	92.3	99.8	157.5	227.8	323.0
Hela	宫颈癌	粘附	67.0	84.4	87.5	150.7	303.0	384.0
DMS114	肺癌	粘附	22.0	75.0	89.1	60.5	148.0	201.0
293	胚肾	粘附	58.4	78.8	83.8	81.0	85.7	60.0
LCL-cm	永生化 B 淋巴细胞	悬浮	0.5	6.0	28.7	26.5	40.0	53.0
Raji	Burkitt 淋巴瘤	悬浮	0.8	9.9	24.9	33.7	43.6	50.9
猴								
CV-1	肾脏	粘附	92.2	98.6	99.1	363.7	441.3	358.3
Verø-E6	肾脏	粘附	4.0	20.5	76.1	14.0	22.7	24.5
啮齿类								
BHK21	肾脏	粘附	96.8	99.6	99.9	429.0	446.3	482.0
TIB75	肝脏	粘附	29.7	72.1	91.9	92.0	136.5	271.0
JC	乳腺癌	粘附	4.6	27.3	90.7	95.0	122.0	228.0
PA317	胚胎成纤维	粘附	2.9	22.3	60.1	37.0	49.0	50.0
NIH3T3	胚胎成纤维	粘附	3.3	22.8	68.5	23.5	22.4	28.0
L-929	皮下结缔组织	粘附	2.8	12.9	59.5	8.7	9.2	16.3
CHO	卵巢	粘附	0.7	8.0	50.2	9.3	9.2	13.1
P815	肥大细胞	悬浮	0.1	0.7	11.0	4.9	14.9	12.5

* : 结果为 3 次实验的平均值。

毒对 CV-1 的感染率和表达效率很高,与人 143B 细胞相当,但对 Ver θ -E6 细胞的感染率较低,表达效率尤其低,甚至低于人悬浮细胞。

虽然鼠 BHK21 细胞是所检测细胞系中感染效率和表达效率均最高的细胞系之一,但与灵长类动物细胞相比,痘苗病毒对多数鼠细胞系的感染效率和表达效率均要差许多。其中 TIB75 细胞和 JC 细胞相对较好,在用高剂量病毒感染时,能获得 90% 左右的感染率,感染细胞的平均荧光强度也可达到 200~300 的水平。而病毒对其他 4 株鼠贴壁细胞即使以 MOI 1 的病毒感染,感染率也仅能达到 60% 左右,平均荧光强度低于 50。病毒对鼠悬浮细胞 P815 的感染效率最低,MOI 1 病毒感染的感染率仅 11.0%,平均荧光强度仅 12.5%。

2.2 重组痘苗病毒基因转移效率与细胞组织器官来源的关系

将重组痘苗病毒对同一种属内不同组织器官来源细胞的基因转移效率进行比较,从表 1 的结果可看出,痘苗病毒对不同组织来源细胞株的基因转移效率和表达效率可以十分接近,例如肾来源 BHK21 细胞和肺来源的 A-549 细胞,肝癌细胞 PLC/PRF/5 和肺纤维母细胞 WI-38(SV40 转化的肺成纤维细胞);而对同一组织器官来源的不同细胞株的基因转移效率可存在明显差别,例如对猴肾细胞 CV-1 和 Ver θ -E6 等。因此可以认为痘苗病毒对哺乳动物细胞的基因转移效率与细胞的组织来源没有明显的必然联系。

3 讨论

痘苗病毒已被广泛应用于疫苗载体及重组蛋白表达,但平行定量比较痘苗病毒对多种常用哺乳动物细胞株的感染效率及表达效率的研究仍十分少见。由于目前有痘苗病毒、杆状病毒、腺病毒、逆转录病毒、脂质体转染等多种方法介导外源基因在哺乳动物细胞中的表达,在为某种细胞株选择基因转移载体时往往缺乏研究数据做比较。本研究以重组痘苗病毒 WR-EGFP 为模式病毒,分析痘苗病毒对 20 种常用细胞株的感染效率和 EGFP 表达水平,结果表明,重组痘苗病毒 WR-EGFP 对鼠细胞系 BHK21 和人细胞系 A-549 的感染效率和表达效率最佳,这两种细胞是利用痘苗病毒在哺乳动物细胞中表达外源蛋白的很好选择。整体上看,痘苗病毒 WR 株的感染效率和表达效率对多数灵长类动物细胞可有很好的感染效率和表达效率,而对多数鼠细胞的感染效率和表达效率较差。对贴壁细胞的感染效率和表达效率明显优于悬浮细胞,但对

不同组织来源的细胞没有特别的偏嗜性。该结果对于我们为某种细胞株选择最佳的基因表达载体具有指导意义。

研究过程中我们发现 MOI 为 0.01、0.1 和 1 的重组痘苗病毒 WR-EGFP 感染细胞后 24 h,它们的感染效率和表达效率有较大差别,但经过 48 h 的孵育,这种差别变得很小(结果未显示),这些结果提示,在利用重组痘苗病毒系统大量表达外源蛋白时,可通过降低病毒滴度,延长孵育时间的办法达到节省病毒的目的。

在真核蛋白表达中,另一常用系统为昆虫杆状病毒系统^[7,8]。不久前我们曾用类似的细胞株平行比较过重组昆虫杆状病毒的基因转移及表达效率^[9,10]。与昆虫杆状病毒相比,重组痘苗病毒同样是对贴壁细胞的感染率和表达效率明显优于悬浮细胞,对灵长类细胞明显优于小鼠细胞。不同的是昆虫杆状病毒需以 MOI 50 的高剂量才能对敏感细胞有较高的感染率,感染率最高不超过 90%,感染 48 h 后感染细胞的平均荧光强度最高仅 227.8,多数低于 100。而痘苗病毒对多数敏感细胞仅以 MOI 0.01 的低剂量即可获得超过 90% 的感染率,用 MOI 0.1 剂量病毒可获得接近 100% 的感染率,而感染 48 h 后感染细胞的平均荧光强度最高可大于 400,大多数在 200 以上。但痘苗病毒 WR 株的一个缺陷是对多数敏感细胞,在病毒感染细胞 72 h 左右即会导致大多数细胞死亡,而昆虫杆状病毒感染的细胞可较长时间存活。因此如何选择合适的哺乳动物细胞表达系统,还需根据实验的目的进行具体分析。

参考文献:

- [1] Carroll M W, Moss B. Poxviruses as expression vectors [J]. *Current Opinion Biotech.*, 1997, 8(5): 573- 577.
- [2] Kaufman H L, Wang W, Manola J, et al. Phase II randomized study of vaccine treatment of advanced prostate cancer (E7897): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group [J]. *J. Clin. Oncol.*, 2004, 22(11): 2122- 2132.
- [3] Roque-Resendiz J L, Rosales R, Herion P. MVA ROP2 vaccinia virus recombinant as a vaccine candidate for toxoplasmosis [J]. *Parasitology*, 2004, 128(Pt 4): 397- 405.
- [4] Corona Gutierrez C M, Tinoco A, Navarro T, et al. Therapeutic vaccination with MVA E2 can eliminate precancerous lesions (CIN 1, CIN 2, and CIN 3) associated with infection by oncogenic human papillomavirus [J]. *Hum. Gene Ther.*, 2004, 15(5): 421- 431.
- [5] Bleckwenn N A, Bentley W E, Shiloach J, et al. Exploring vaccinia virus as a tool for large-scale recombinant protein expression [J]. *Biotechnol. Prog.*, 2003, 19(1): 130- 136.

- [6] 闻玉梅. 现代医学微生物学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999. 872- 885.
- [7] Kost T A, Condreay J P. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors[J]. Trends Biotechnol., 2002, 20(4): 173- 180.
- [8] Huser A, Hofmann C. Baculovirus vectors: novel mammalian cell gene-delivery vehicles and their applications[J]. Am. J. Pharmacogenomics, 2003, 3: 53- 63.
- [9] 程通, 许辰煜, 王颖彬, 等. 杆状病毒用于哺乳动物细胞快速高效表达外源基因的研究[J]. 生物工程学报, 2003, 19(5): 581- 587.
- [10] 许辰煜, 程通, 卢五迅, 等. 杆状病毒对不同哺乳动物细胞基因转移及表达效率的研究[J]. 生物工程学报, 2004, 20(1): 73- 77.

The Infection Efficiencies and EGFP Expression Levels of Recombinant Vaccinia Virus in Different Mammalian Cell Lines

WU Ting, OU Shan-hai, CHEN Min, CHENG Tong,
HE Shu-zhen, ZHANG Jun, XIA Ning-shao*

(Research Center for Medical Molecular Virology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Vaccinia virus was widely used as gene expressing vector in mammalian cell lines and candidate recombinant vaccine vector, thus parallel comparison of the infection and expression efficiencies of recombinant vaccinia virus in different mammalian cell lines is essential for correctly choosing suitable expressing host cell lines. In this study, different MOI of recombinant vaccinia virus WR-EGFP were used to infect several different mammalian cell lines simultaneously, after 48 h p. o. i., and flow cytometer was used to detect the intensity of green fluorescence emitted by GFP. Twenty different mammalian cell lines were infected, including 10 human cell lines, 2 monkey cell lines and 8 rodent cell lines. Results showed that recombinant vaccinia virus WR-EGFP could infect hamster kidney cell BHK21 and human cell A-549 with the highest infection efficiency and expression efficiency. For most primate cell lines, WR-EGFP has higher infection efficiency and expression efficiency than rodent cell lines, and both efficiencies are higher in adherent culture cell lines than in suspend culture cell lines, but no obvious partiality was observed for cells coming from different organ origin. At 24 h p. o. i., different MOI of WR-EGFP infected cell and expressed GFP with markedly different intensity, but at 48 h p. o. i., the difference became negligible, which implies lower dosage of virus and longer culture can be used to express target proteins. Comparing with baculoviruses, vaccinia virus has higher infection and expression efficiency in mammalian cell lines with lower MOI, but may lysis most cell lines after 72 h p. o. i., which seldom happen when infecting with baculoviruses.

Key words: vaccinia virus; green fluorescent protein; flow cytometer