

核衣壳蛋白 VP39 融合 TAT 转导肽对杆状病毒转导哺乳动物细胞的影响

李俐, 王鑫, 尹隽, 钟江

复旦大学生命科学学院微生物学与微生物工程系, 上海 200433

摘要: 为了提高昆虫杆状病毒在哺乳动物细胞中转导基因的效率, 构建了重组杆状病毒 AcRed-tat 和 AcRed。两者都能在哺乳动物细胞内表达红色荧光蛋白作为报告基因。同时, AcRed-tat 带有 HIV-1 Tat 转导肽、病毒主要衣壳蛋白基因 *vp39* 及增强型绿色荧光蛋白(*egfp*)三者的融合基因, 并由杆状病毒多角体启动子表达, 能够在昆虫细胞中表达该 Tat 融合蛋白, 并掺入子代病毒粒子。而 AcRed 作为相应的对照病毒, 带有多角体启动子表达 *vp39* 和 *egfp* 的融合基因。2 株病毒分别转导哺乳动物细胞后, 利用流式细胞仪检测报告基因的表达水平, 发现在 CHO 和 Vero 细胞中 AcRed-Tat 介导的报告基因表达水平明显高于 AcRed, 而在 HEK293 细胞中 2 株病毒介导的报告基因表达水平差异不显著。结果表明 Tat 转导肽可以提高杆状病毒对一部分哺乳动物细胞的转导效率, 为改进杆状病毒-哺乳动物细胞转导载体提供了新的思路。

关键词: 杆状病毒, 哺乳动物细胞, 转导, Tat 转导肽

Tat transduction peptide displayed on the nucleocapsid improved the baculovirus transduction of mammalian cells

Li Li, Xin Wang, Juan Yin, and Jiang Zhong

Department of Microbiology and Microbial Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: In order to improve the transduction efficiency of insect baculovirus in mammalian cells, we constructed two recombinant baculoviruses, AcRed-tat and AcRed. Both viruses expressed red fluorescence protein gene (*dsRed*) as a reporter in mammalian cell lines. AcRed-tat also contained the coding sequence of HIV-1 Tat transduction peptide fused with viral major capsid protein gene *vp39* and enhanced green fluorescence gene (*egfp*) driven by virus polyhedrin promoter. It expressed the Tat fusion protein in infected insect cells, which was incorporated into the nucleocapsids of progeny virus. As a control, AcRed had the fusion gene of *vp39* and *egfp* driven by polyhedrin promoter. Flow cytometry analysis demonstrated that although similar level of red fluorescence was produced in HEK23 cells transduced by the two recombinant viruses, significantly higher red fluorescence level was seen in CHO and Vero cells transduced by AcRed-tat than that by AcRed. These results suggested that Tat transduction peptide might improve the baculovirus-mediated gene expression in some mammalian cells. Our work provided a new approach to improve baculovirus as a gene delivery vector for mammalian cells.

Received: March 10, 2009; **Accepted:** June 10, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30770079).

Corresponding author: Jiang Zhong. Tel/Fax: +86-21-55664332; E-mail: jzhong@fudan.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30770079)资助。

Keywords: baculovirus, mammalian cells, transduction, Tat transduction peptide

杆状病毒(Baculoviridae)是一类感染昆虫的DNA病毒^[1]。研究发现,这种病毒也能够进入包括哺乳动物细胞在内的各种高等动物细胞,但并不复制,对细胞没有明显影响^[2]。如病毒带有CMV IE等哺乳动物细胞可识别的启动子,就可以在这些细胞中实现外源基因表达^[3-4]。因此,杆状病毒被认为是一种极具潜力的新型哺乳动物细胞基因转移载体,具有在一些细胞中基因转移效率高、操作方便、可容纳大片段外源基因、安全性好等优点。但该载体也有一些缺点,特别是它对不同细胞基因转移效率差别大,对某些细胞的转染效率还有待提高。

提高杆状病毒对哺乳动物细胞的转导效率及介导的外源基因表达水平的途径之一是利用基因工程技术对病毒进行改造。目前,对杆状病毒的改造大都是针对杆状病毒的包膜蛋白GP64^[5-7],以使病毒对哺乳动物细胞表面的分子具有亲和性,提高其进入细胞的效率,或者使其能进入特定的细胞。近年来有研究表明,在一些转导效率低下的细胞中,杆状病毒并非不能进入细胞,而是在进入细胞后,病毒核衣壳滞留在细胞质内,难以进入细胞核进行外源基因表达^[8-9]。目前,有关提高病毒粒子进入细胞核的研究还较少。

Tat转导肽是人免疫缺陷病毒I型(HIV-1)转录因子Tat上富含碱性氨基酸的一段序列,长11个氨基酸残基(47aa~57aa),具有携带蛋白质、核酸等生物大分子进入细胞,并最终定位于细胞核的能力^[10-11]。一般认为Tat转导肽的转导能力是由其一级结构决定的。有文献报道将Tat转导肽融合表达于腺病毒H1-loop时,能提高重组腺病毒进入一些难转染的细胞,如缺失腺病毒受体CAR的细胞的效率^[12],这表明Tat对病毒穿过细胞膜也有帮助。但是Tat转导肽对杆状病毒转导细胞的作用尚未见报道。本实验中,将Tat转导肽与杆状病毒主要衣壳蛋白VP39融合表达,使其掺入病毒粒子,以研究Tat转导肽对杆状病毒进入哺乳动物细胞核和介导基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 重组病毒的构建

以pCMV-DsRed(Clontech公司)为模板,使用引

物Ru与Rd(表1)扩增得到包括CMV启动子和*dsRed*编码序列片段,*Sal* I/*Xho* I双酶切后插入pFastBac1(Invitrogen公司)的相应位点,得到质粒pFB-Red。使用引物Gu与Gd(表1)扩增得到*egfp*基因片段,用*Xho* I/*Kpn* I双酶切后插入pFastBac1的相应位点,得到质粒pFB-EGFP,然后以此质粒为模板用引物Gu与Pad(表1)扩增包含*egfp*与SV40 polyA信号的片段,连入T载体(TaKaRa公司),得到质粒pT-GA。

表1 PCR引物及人工合成Tat转导肽的核苷酸序列
Table 1 Sequences of PCR primers and oligonucleotides for Tat transduction peptide

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Gu	CTCGAGGTGAGCAAGGG
Gd	GGTACCTTTATCTAGACTTGTACAGCTCGTCCATG
Vu	GTCGACATGGAGCTCGCGCTAGTGCCCGTGGGTATGG
Vd	CCACTAGGACGGCTATTCTCCACCTGCT
Ru	CCCTGATTCTGTGGATAACCGTA
Rd	GAGCTCGAGATCTCAGGAACAGGTG
Pad	TTGGAAGTAGATTTCATT
Tat	TTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAG
TatF	GAATTCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGTCGAC
TatR	CAGCTGTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCCTGCCATAGAATTC

以Bacmid(Invitrogen公司)为模板,用引物Vu与Vd(表1)扩增得到杆状病毒核衣壳蛋白基因*vp39*,*Sal* I/*Spe* I双酶切后插入pFastBac1的相应位点,得到质粒pFB-*vp39*。将人工合成的含Tat转导肽编码序列的寡核苷酸TatF与TatR(表1)混合,退火形成双链后,用*Eco*R I/*Sal* I双酶切,插入pFB-*vp39*同样位点,使Tat的读码框与*vp39*基因的读码框融合,得到质粒pFB-Tat/*vp39*。

从质粒pT-GA上用*Sac* I/*Sal* I切下*egfp*-polyA片段,用*Eco*R I/*Sac* I分别从pFB-*vp39*与pFB-Tat/*vp39*上分别切下*vp39*片段及Tat/*vp39*融合片段,*Eco*R I/*Sal* I双酶切的pFB-Red分别与*egfp*-polyA、*vp39*,及*egfp*-polyA、Tat/*vp39*进行3个片段的连接,使*vp39*或Tat/*vp39*与*egfp*融合,分别得到带有*vp39/egfp*和Tat/*vp39/egfp*融合基因的质粒pFB-Red-tat

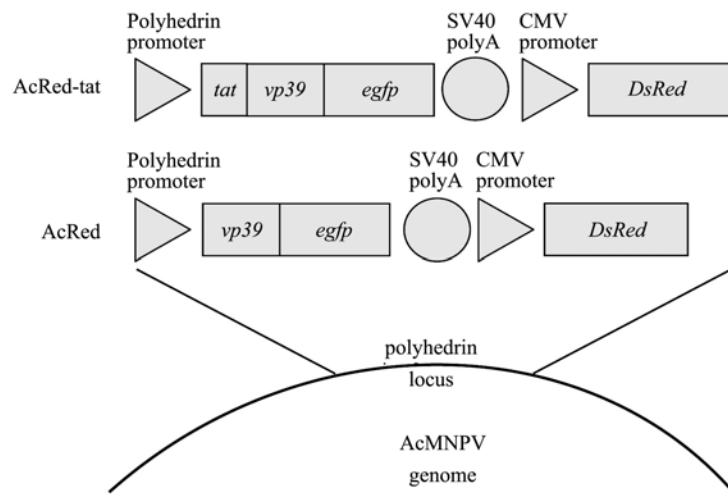


图 1 重组病毒结构示意图

Fig. 1 Diagram of recombinant baculoviruses. *egfp*: enhanced green fluorescence protein gene; *vp39*: baculovirus major capsid protein gene; *tat*: Tat transduction peptide sequence; *dsRed*: red fluorescence protein gene.

与 pFB-Red。这 2 个质粒还同时都带有 *dsRed* 基因表达框，它们的结构示意图见图 1。以上质粒经酶切、PCR 和 DNA 测序鉴定正确后，利用 Bac-to-Bac 系统(Invitrogen 公司)，得到重组杆状病毒 AcRed-tat 和 AcRed(图 1)。抽取重组病毒基因组，用 PCR 验证正确。

1.2 细胞培养、病毒扩增和效价测定

草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞系 Sf9 27°C 培养于含 10%胎牛血清的 TNM-FH 培养基(Sigma-Aldrich)中。HEK293、CHO 细胞系 37°C 培养于添加 10%的胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(Gibco 公司)中。Vero 细胞系 37°C 培养于添加 10%的胎牛血清的 DMEM 高糖培养基(Gibco 公司)中。

病毒在单层培养的 Sf9 细胞中扩增，再在悬浮培养的 Sf9 细胞中大量扩增。细胞培养液以 2000 r/min 离心 5 min，收集澄清的病毒液，保存于 4°C 备用。病毒效价使用 TCID₅₀ 法测定。

1.3 Western blotting 检测融合蛋白的表达

AcRed-tat 和 AcRed 分别以感染复数(MOI)约为 5 感染 Sf9 细胞，72 h 后收集细胞，用 SDS-PAGE(凝胶浓度 10%)分析总蛋白，并通过 Western blotting 检测融合蛋白的表达。第一抗体为兔抗 EGFP 抗体(珠海百奥公司，稀释倍数 1:5000)，或抗 Tat 转导肽的单克隆抗体(Santa Cruz 公司，稀释倍数 1:1000)。第二抗体分别为碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG，或羊

抗鼠 IgG (均购自 Sigma-Aldrich 公司，稀释倍数 1:20 000)。以 BCIP/NBT 为底物，进行显色反应。

1.4 细胞培养液中病毒颗粒的提取

病毒 AcRed 和 AcRed-tat 感染 Sf9 细胞 72 h 后，收集细胞上清液。经 5000 r/min 离心 15 min 清除细胞及碎片后，将约 30 mL 上清液小心加到 25% (W/W)蔗糖垫上，4°C 下高速离心 100 000 × g，2 h。收集沉淀，用 100 μL TE(10 mmol/L Tris·HCl, 1.0 mmol/L EDTA, pH 7.5)悬浮后，同上进行 Western blotting 检测。

1.5 杆状病毒感染哺乳动物细胞

24 孔板每孔接种约 5×10^4 的 HEK293、CHO 或 Vero 细胞，37°C 培养过夜，然后分别以 AcRed-tat 和 AcRed 感染细胞，MOI=200。感染时，首先吸去培养液，用磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4)漂洗细胞，然后加入适量经 PBS 稀释的病毒液，27°C 孵育 6 h。吸去病毒液，用 PBS 漂洗细胞后加入 400 μL 新鲜培养基，置于 37°C, 5% CO₂ 下培养。在不同时间点观察病毒感染和外源基因表达。

1.6 流式细胞仪检测

病毒 AcRed 和 AcRed-tat 感染细胞 48 h 后，用胰酶消化细胞。待细胞悬浮后，加入含血清的培养基终止反应。细胞悬液 3000 r/min 离心 5 min 收集细胞，用 PBS 漂洗 1 次后，用流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)检测表达红色荧光的细胞比例和平

均荧光强度, 每次检测 10 000 个细胞, 数据结果用 CELLQUEST 分析软件分析。

2 结果与分析

2.1 重组病毒 AcRed-tat 与 AcRed 的构建

经过一系列基因克隆过程, 利用 Bac-to-Bac 系统得到了目标重组病毒 AcRed-tat, 该病毒可在感染的昆虫细胞中表达 Tat 转导肽、EGFP 和病毒核衣壳主要结构蛋白 VP39 的融合蛋白(图 1)。同时还构建了对应的对照病毒 AcRed, 可表达 EGFP 和 VP39 的融合蛋白。2 种病毒都能在哺乳动物细胞中表达红色荧光蛋白作为报告基因(图 1)。分别提取 2 株重组病毒的基因组 DNA, 用 PCR 验证, 结果如图 2。AcRed 仅能由 Vu/Rd 引物对扩增出约 3.5 kb 的产物, 而用 Tat/Rd 引物对时无扩增产物。AcRed-tat 的基因组能以 Vu/Rd 和 Tat/Rd 两对引物分别扩增出约 3.5 kb 的产物, 与预期大小一致, 证明重组病毒的构建成功。

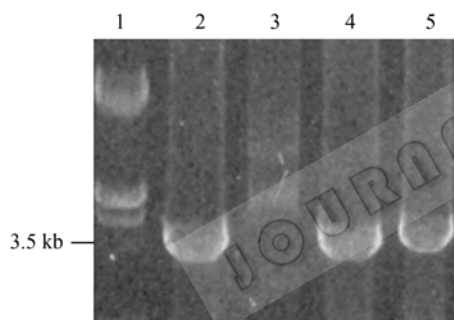


图 2 PCR 验证重组病毒

Fig. 2 PCR products confirmed the success of recombinant baculovirus construction. 1: DNA size marker, λ DNA *EcoR* I/*Hind* III; 2,3: PCR results using the primer pairs of Tat/Rd, and the template of AcRed-tat (2) or AcRed (3) DNA, respectively; 4, 5: PCR results using the primer pairs of Vu/Rd, and the template of AcRed-tat (4) or AcRed (5) DNA, respectively.

2.2 重组病毒 AcRed-tat 与 AcRed 感染的昆虫细胞中融合蛋白的表达

分别以重组病毒 AcRed、AcRed-tat 感染 Sf9 细胞(MOI=5), 72 h 后收集细胞进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 分别用抗 EGFP 和抗 Tat 转导肽的抗体检测融合蛋白 VP39-EGFP 与 TAT-VP39-EGFP 的表达, 结果如图 3A。由图可见,

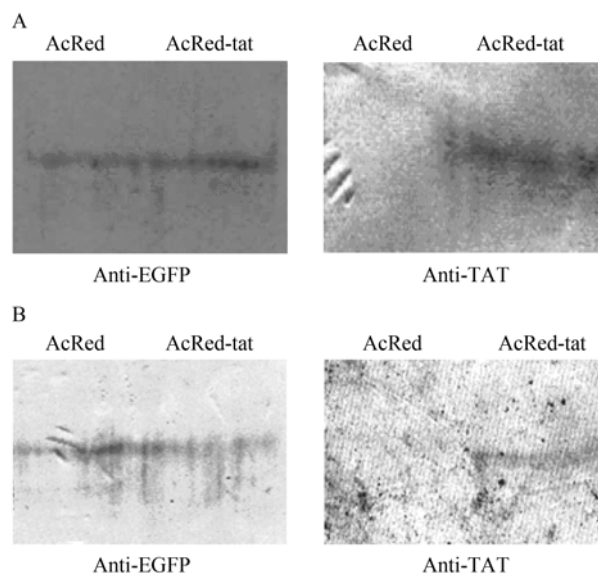


图 3 Western blotting 检测融合蛋白在 Sf9 细胞中的表达(A)和在病毒粒子中的存在(B)

Fig. 3 Western blotting analysis of fusion proteins in infected Sf9 cells and in the virions. The total cellular protein of Sf9 cells infected with AcRed or AcRed-tat(A), or in the virions pelleted from the infected culture medium (B) were analyzed with Western blotting using antibody against EGFP and Tat peptide, as indicated.

2 个重组病毒感染的细胞中都表达了带有 EGFP 的融合蛋白, 大小均约为 69 kD, 与预期一致。同时, AcRed-tat 表达的蛋白带有 Tat 转导肽, AcRed 表达的蛋白则没有。

2.3 AcRed-tat 与 AcRed 病毒粒子上融合蛋白的存在

从 AcRed-tat 和 AcRed 感染的 Sf9 细胞上清中分离出芽型病毒粒子(BV), 用 Anti-EGFP 和 Anti-TAT 抗体分别检测病毒粒子中 TAT-VP39-EGFP 和 VP39-EGFP 的存在。结果如图 3B。用 Anti-EGFP 抗体在 2 种 BV 中均检测到 69 kD 的条带, 用 Anti-TAT 抗体在 AcRed-tat BV 中检测到相应条带, 而在 AcRed 中则没有。这一结果表明融合蛋白成功地掺入了病毒粒子中。

2.4 重组病毒 AcRed-tat、AcRed 在哺乳动物细胞中表达报告基因的比较

分别以重组病毒 AcRed-tat 和 AcRed 感染 HEK293、CHO 和 Vero 细胞(MOI = 200), 48 h 后用流式细胞仪检测表达红色荧光的细胞, 结果如图 4。与对照病毒 AcRed 相比, 带有 Tat 转导肽的杆状病

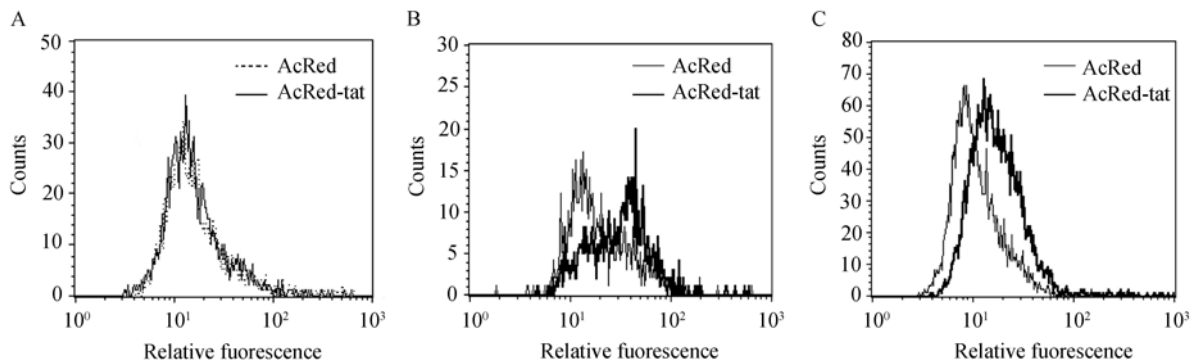


图 4 流式细胞仪分析 AcRed-tat 与 AcRed 转导的哺乳动物细胞中红色荧光蛋白的表达

Fig. 3 Flow cytometry analysis of red fluorescence protein (DsRed) expression in mammalian cells infected by AcRed-tat and AcRed. (A) HEK293 cells. (B) CHO cells. (C) Vero cells.

毒 AcRed-tat 感染 CHO 和 Vero 细胞后荧光强度分布峰明显地向荧光增强的方向移动, 红色荧光的水平比 AcRed 分别提高了约 60% 和 37% (图 4B, 4C), 表明 Tat 转导肽能提高杆状病毒对这 2 株细胞的转导能力。而 2 株病毒感染 HEK293 细胞后的荧光强度分布峰几乎重合, 荧光强度仅有 5% 的差别 (图 4A), 表明 Tat 转导肽对杆状病毒转导 HEK293 细胞没有明显作用。

3 讨论

本研究构建了 2 株重组杆状病毒 AcRed-tat 和 AcRed, 可在感染昆虫细胞时分别表达 Tat-VP39-EGFP 融合蛋白和 VP39-EGFP 融合蛋白。同时, 在分离纯化的病毒粒子中分别检测到相应的融合蛋白, 提示融合蛋白已与其他天然 VP39 蛋白一起掺入成熟的病毒粒子中。由于 TAT 与 VP39 融合, 而 VP39 是病毒核衣壳的主要结构蛋白, 因此可以推测 TAT 应主要位于病毒核衣壳上。同时, 这 2 株进入哺乳动物细胞后, 都能由 CMV IE1 启动子表达的红色荧光蛋白作为报告基因。研究结果表明, 带有 Tat 转导肽融合蛋白的杆状病毒转导 Vero 细胞和 CHO 细胞时红色荧光的表达水平显著提高, 幅度分别为 60% 和 37%。但是在 HEK293 细胞中, Tat 转导肽对基因表达的影响有限, 与对照相比仅差约 5%。这种细胞间的差异可能与杆状病毒对不同细胞系转导效率差异较大有关。杆状病毒转导 HEK293 细胞的效率较高, 其介导的外源基因表达水平也较高, 但它对 Vero 细胞和 CHO 细胞的转导效率相对

较低, 病毒介导的外源基因表达水平有限, 所以在该 2 株细胞中 Tat 转导肽对提高外源基因表达水平的作用更加显著。

本研究所构建的重组杆状病毒, 其病毒粒子上除了携带有 Tat 转导肽外, 还同时带有绿色荧光蛋白 (EGFP)。该设计的本意是要借助 EGFP 跟踪病毒感染过程和病毒颗粒进入细胞核的情况。Western blotting 检测表明带有 EGFP 的融合蛋白在病毒感染的昆虫细胞中得到了表达, 也成功地掺入了病毒粒子, 但可能由于融合蛋白掺入病毒粒子的效率不够高, 以及检测灵敏度的问题, 实验中只能在一小部分被感染的哺乳动物细胞中观察到绿色荧光蛋白的存在 (结果未显示)。初步结果提示在 Vero 和 CHO 细胞中带有 Tat 的重组病毒进入细胞核的效率得到了一定的提高。

实验中观察到 AcRed-tat 在 Vero 细胞和 CHO 细胞中表达报道基因的水平与 AcRed 在 HEK293 细胞中的水平相当, 但仍低于杆状病毒在肝细胞中表达报道基因的一般水平。这可能意味着影响杆状病毒在哺乳动物细胞中介导外源基因的表达的限制因素还有很多, 尚有待进一步研究。

总之, 将 Tat 与病毒核衣壳蛋白融合表达能提高杆状病毒转导细胞的效率, 提高杆状病毒介导的外源基因表达水平。这为提高杆状病毒对一些难转导细胞的转导效率提供了新的思路。进一步可以通过改进设计, 提高 Tat 转导肽掺入病毒粒子的效率来提高这种杆状病毒载体-哺乳动物细胞载体的性能。

REFERENCES

- [1] Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, *et al.* On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch Virol*, 2006, **151**(7): 1257–1266.
- [2] Andersson M, Warolén M, Nilsson J, *et al.* Baculovirus-mediated gene transfer and recombinant protein expression do not interfere with insulin dependent phosphorylation of PKB/Akt in human SHSY-5Y and C3A cells. *BMC Cell Biol*, 2007, **8**(1): 6.
- [3] Hofmann C, Sandig V, Jennings G, *et al.* Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(22): 10099–10103.
- [4] Boyce FM, Bucher NL. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(6): 2348–2352.
- [5] Yang DG, Chung YC, Lai YK, *et al.* Avian influenza virus hemagglutinin display on baculovirus envelope: cytoplasmic domain affects virus properties and vaccine potential. *Mol Ther*, 2007, **15**(5): 989–996.
- [6] Ge J, Huang Y, Hu X, *et al.* A surface-modified baculovirus vector with improved gene delivery to B-lymphocytic cells. *J Biotechnol*, 2007, **129**(3): 367–372.
- [7] Saitoh R, Ohtomo T, Yamada Y, *et al.* Viral envelope protein gp64 transgenic mouse facilitates the generation of monoclonal antibodies against exogenous membrane proteins displayed on baculovirus. *J Immunol Meth*, 2007, **322**(1–2): 104–117.
- [8] Kukkonen SP, Airene KJ, Marjomäki V, *et al.* Baculovirus capsid display: a novel tool for transduction imaging. *Mol Ther*, 2003, **8**(5): 853–862.
- [9] Barsoum J, Brown R, McKee M, *et al.* Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis G glycoprotein. *Hum Gene Ther*, 1997, **8**(17): 2011–2018.
- [10] Vivès E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 1997, **272**(25): 16010–16017.
- [11] Sandgren S, Cheng F, Belting M. Nuclear targeting of macromolecular polyanions by an HIV-Tat derived peptide. Role for cell-surface proteoglycans. *J Biol Chem*, 2002, **277**(41): 38877–38883.
- [12] Liu S, Zhang MQ, Zheng W, *et al.* Genetically modified adenoviral vector with the protein transduction domain of Tat improves gene transfer to CAR deficient cells. *Biosci Rep*, 2009, **29**(2): 103–109.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

家畜性别控制技术

(应用生物技术大系丛书)

李喜和 主编

978-7-0-025186-2 ¥45.00 2009年9月出版

本书共分七章，内容以家畜胚胎的性别鉴定和移植、精子分离性控冻精的生产和人工授精为主线，同时涉及哺乳动物性别分化和性别决定机制、雌雄家畜生殖周期特点以及相关的动物克隆技术、动物干细胞研究和转基因技术的研究和应用情况。在内容写作方面，以编著者多年来进行研究和应用积累的一手资料为主，注重实际操作细节和典型事例介绍。

本书是一部理论内容和应用技术兼顾的实用性生物技术书籍，同时也对从事生殖生物学、发育生物学、繁殖学、兽医学和生殖生物工程技术的科研和教学人员具有一定的参考价值。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：李韶文（010-64000849） 周文字（010-64031535）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>