

## 研究报告

# 稳定表达 T7 RNA 聚合酶的草鱼鳍条和草鱼性腺细胞系的建立与鉴定

康漪<sup>1,2</sup>, 张奇亚<sup>2</sup>, 柯飞\*<sup>2</sup>

1 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023

2 中国科学院水生生物研究所 水产品种创制与高效养殖重点实验室, 湖北 武汉 430072

康漪, 张奇亚, 柯飞. 稳定表达 T7 RNA 聚合酶的草鱼鳍条和草鱼性腺细胞系的建立与鉴定[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 5051-5062.

KANG Yi, ZHANG Qiya, KE Fei. Establishment of GCF and GCO cell lines stably expressing T7 RNA polymerase[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 5051-5062.

**摘要:**【背景】T7 噬菌体来源的 T7 RNA 聚合酶(T7 RNA polymerase, T7 RNAP)因其特异性高和高效启动转录的特点, 在生物学研究中得到广泛应用。目前已有多种稳定表达 T7 RNAP 的细胞系被构建用于进行 RNA 病毒的反向遗传学研究。草鱼是中国淡水养殖产量最高的鱼类, 但其易受草鱼呼肠孤病毒(一种双链 RNA 病毒)的侵害。该病毒的反向遗传操作系统尚未建立, 影响了对它的深入研究。稳定表达 T7 RNAP 的草鱼细胞系将有助于建立草鱼呼肠孤病毒的反向遗传操作系统。

【目的】使用 Tol2 转座子系统构建稳定表达 T7 RNAP 的草鱼鳍条(grass carp fin, GCF)和草鱼性腺(grass carp ovary, GCO)细胞系, 并鉴定其活性, 以期创建草鱼呼肠孤病毒的反向遗传操作系统提供细胞工具。【方法】利用 PCR 从大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)基因组中扩增出 T7 RNAP 基因, 通过同源重组的方法使其插入 Tol2 转座子载体。同时也构建 T7 RNAP 的 N 端或 C 端连接核定位信号(nuclear localization signal, NLS)的重组 Tol2 转座子质粒。将含有上述基因的重组转座子质粒与表达 Tol2 酶的辅助质粒分别共转染 2 种草鱼细胞, 使用潮霉素 B 进行筛选。对所筛选出的细胞进行蛋白免疫印迹(Western blotting, WB)检测。进一步使用由 T7 启动子驱动的 EGFP 报告质粒进行功能验证, 并比较添加 NLS 对 T7 RNAP 表达和功能的影响。【结果】构建了携带 T7 RNAP 基因的 3 种 Tol2 转座子重组质粒, 转染 2 种细胞筛选后获得了相应的 6 株细胞系。WB 结果显示筛选后的细胞中均有明显的 T7 RNAP 表达条带, 表明 T7 RNAP 在细胞中成功表达。使用由 T7 启动子驱动的 EGFP 质粒对细胞进行转染, 观察到 EGFP 在转染细胞中高效表达, 实验结果表明这 6 株细胞中的 T7 RNAP 均有转录活性。另外, 携带 NLS 序列的 T7 RNAP 在 GCO 细胞中显示出更高的表达及转录活性, 尤其是在 T7 RNAP C 端添加 NLS 时效果最佳。但在 GCF 细胞中未

资助项目: 中国科学院先导 B 项目(XDB0730100); 国家自然科学基金(31972839)

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDB0730100) and the National Natural Science Foundation of China (31972839).

\*Corresponding author. E-mail: kefei@ihb.ac.cn

Received: 2024-06-28; Accepted: 2024-08-13; Published online: 2024-09-20

观察到明显差异。【结论】通过使用 Tol2 转座子系统构建了稳定表达 T7 RNAP 的 GCF 和 GCO 细胞系，能驱动 T7 启动子控制的外源基因的高效转录和表达。NLS 可以通过促进 T7 RNAP 向细胞核的转运来提高其在核内的积累和转录效率，但其效果可能因细胞的类型不同而有所区别。添加 NLS 可进一步增强其表达和转录活性。这些结果为 T7 RNAP 在草鱼呼肠孤病毒研究中的应用提供了基础。

关键词：T7 RNA 聚合酶；草鱼细胞系；稳定表达；转座子；核定位信号

## Establishment of GCF and GCO cell lines stably expressing T7 RNA polymerase

KANG Yi<sup>1,2</sup>, ZHANG Qiya<sup>2</sup>, KE Fei<sup>\*2</sup>

1 College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, Liaoning, China

2 Key Laboratory of Breeding Biotechnology and Sustainable Aquaculture, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, Hubei, China

**Abstract:** [Background] T7 phage-derived T7 RNA polymerase (T7 RNAP) is a commonly employed component of the reverse genetic operating system of viruses, due to its high specificity and efficient initiation of transcription. Several cell lines stably expressing T7 RNAP have been constructed for reverse genetics studies of RNA viruses. The grass carp, the freshwater fish with the highest production in China, is susceptible to grass carp reovirus (a double-stranded RNA virus). However, no grass carp cell line stably expressing T7 RNAP has been reported to date. [Objective] To construct the stable cell lines expressing T7 RNAP by using the Tol2 transposon system from grass carp fin (GCF) and grass carp ovary (GCO) cells and measure their viability, thus providing cellular tools for establishing the reverse genetic operating system for grass carp reovirus. [Methods] The T7 RNAP gene was amplified from the genomic DNA of *Escherichia coli* BL21(DE3) via PCR and inserted into the Tol2 transposon plasmid via homologous recombination. The recombinant Tol2 transposon plasmids carrying T7 RNAP with or without an N-terminal or C-terminal nuclear localization signal (NLS) were constructed. These recombinant plasmids, along with a helper plasmid expressing the Tol2 transposase, were co-transfected into the two grass carp cell lines, followed by selection with hygromycin B. Western blotting (WB) was employed to determine the T7 RNAP expression in the selected cells. An enhanced green fluorescent protein (EGFP) reporter plasmid driven by a T7 promoter was used to validate the functionality of T7 RNAP, and the effects of NLS on the expression and activity of T7 RNAP were studied. [Results] Three recombinant Tol2 transposon plasmids carrying the T7 RNAP gene were successfully constructed. Six stable cell lines expressing T7 RNAP were obtained after selection. WB results confirmed significant expression of T7 RNAP in all the selected cell lines. Transfection with the T7 promoter-driven EGFP plasmid demonstrated high levels of EGFP expression, confirming the transcriptional activity of T7 RNAP in these cell lines. Notably, the GCO cells expressing T7 RNAP with an

NLS, especially with the C-terminal NLS, showed higher expression and transcriptional activity than those without NLS. However, no significant difference was observed in GCF cells. **[Conclusion]** We successfully established stable T7 RNAP-expressing GCF and GCO cell lines by using the Tol2 transposon system. These cell lines demonstrated efficient transcription and expression of genes under the control of the T7 promoter, which could be further enhanced by addition of an NLS. NLS could enhance nuclear accumulation and transcriptional efficiency of T7 RNAP by facilitating its transport into the nucleus, with the effects depending on the cell lines. The results lay a foundation for the application of T7 RNAP in the research on grass carp reovirus.

**Keywords:** T7 RNA polymerase; grass carp cell line; stable expression; transposon; nuclear localization signal

T7 RNA 聚合酶(T7 RNA polymerase, T7 RNAP)于 1970 年首次从 T7 噬菌体感染的大肠杆菌(*Escherichia coli*)细胞中分离出来<sup>[1]</sup>。得益于对 T7 启动子序列的高度特异性识别,其能够紧密结合到 T7 启动子,无须依赖任何额外的蛋白质辅助因子进行高效转录<sup>[2]</sup>。T7 RNAP 的结构和功能独特性,为在体外基因表达系统和 RNA 合成技术中实现高度专一和高效率的目标基因表达提供了理想的工具,因而在生物学中被广泛应用<sup>[3-4]</sup>。如利用 T7 RNAP 合成 mRNA,可用于 RNA 疫苗的开发<sup>[5]</sup>。T7 RNAP 也可用于体外合成 RNA 病毒基因组,用于研究病毒复制和基因功能<sup>[6]</sup>。有报道指出,在 T7 RNAP 末端融合核定位信号(nuclear localization signal, NLS),可以显著提高其转录效率,实现对外源基因更高效的表达<sup>[1,4,7]</sup>。

草鱼(grass carp, *Ctenopharyngodon idella*)是鲤科典型的草食性鱼类,广泛分布于中国,是中国年产量最高的淡水养殖鱼类,并已迁徙到欧洲、美洲和非洲<sup>[8]</sup>,但草鱼病毒性疾病的频发严重影响了其养殖效益<sup>[9-12]</sup>。鱼类细胞系在病毒学、毒理学和基础渔业研究中发挥着重要作用<sup>[13-14]</sup>。草鱼鳍条 (grass carp fin, GCF)细胞系和草鱼性腺 (grass carp ovary, GCO)细胞系

均为 20 世纪七八十年代建立的细胞系,实验证明其对包括草鱼呼肠孤病毒在内的多株鱼类病毒敏感,可用来研究病毒的生命周期及致病机理<sup>[14-16]</sup>,但目前尚无将 T7 RNAP 用于草鱼细胞进行外源基因表达的报道。

Tol2 转座子系统是一种来自青鳉(*Oryzias latipes*)基因组的自主转座子,其依靠自身编码的转座酶,以“剪切-粘贴”的方式将特定重复序列之间的区域插入靶细胞基因组中<sup>[17]</sup>。由于其转座效率高、携带外源 DNA 容量较大、插入位点随机并已在多种生物中验证具有转座活性,因而得到广泛应用<sup>[18]</sup>。Wang 等<sup>[19]</sup>将构建好的转座质粒和编码 Tol2 转座酶的 mRNA 共注射到斑马鱼受精卵中,检测标记基因的表达,筛选出成功整合了外源基因的转基因斑马鱼。类似于斑马鱼,该转座子系统也可用于小鼠,通过注射含有 Tol2 转座子的质粒和转座酶 mRNA 到小鼠胚胎,可以生成转基因小鼠,用于研究基因功能和建立疾病模型<sup>[20]</sup>。

本文旨在利用 Tol2 转座子系统构建稳定表达 T7 RNAP 的 GCF 和 GCO 细胞系。通过将 T7 RNAP 编码基因整合进宿主细胞基因组中,使其表达有活性的 T7 RNAP,从而建立一个稳定高效的外源基因表达平台,为草鱼病毒学和

基因功能研究提供新的工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞系

草鱼鳍条细胞系和草鱼性腺细胞系<sup>[14]</sup>由本实验室保存。

#### 1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

M-199 培养基, 赛默飞世尔科技公司; Tol2 转座子载体和辅助质粒, 云舟生物科技(广州)股份有限公司; *TransIT-LT1* 转染试剂, Mirus Bio 公司; 无缝克隆试剂 2×MultiF Seamless Assembly Mix、兔源  $\beta$ -Actin 抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗, 爱博泰克生物科技有限公司; 高保真酶 2×Phanta Flash Master Mix 和大肠杆菌感受态细胞 Fast-T1, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 兔源抗体 T7 RNA polymerase Polyclonal antibody, 武汉三鹰生物技术有限公司; 新生牛血清, 浙江天杭科技股份有限公司。化学发光仪, 上海天能生命科学有限公司; 荧光显微镜, 奥林巴斯公司。

### 1.2 细胞培养

GCF、GCO 细胞传代使用含有 10%新生牛血清及 1%青链霉素混合液的 M-199 培养基。进行转染、抗生素筛选时使用含有 5%新生牛血清及 25 mmol/L HEPES 缓冲液的 M-199 培养基。细胞均在无菌条件下进行传代及转染操作, 于 25 °C 进行培养。

### 1.3 T7 RNAP 表达质粒的构建

构建 T7 RNAP 表达质粒 VB-T7: 根据大肠杆菌 BL21(DE3)的 T7 RNAP 序列设计引物 T7P-F 和 T7P-R 以扩增 T7 RNAP 基因, 根据 Tol2 转座子载体设计引物 VB-F 和 VB-R 以线性化载体。PCR 反应体系: 2×Phanta Flash Master Mix 25  $\mu$ L, 引物 VB-F 和 VB-R (10  $\mu$ mol/L)各

2  $\mu$ L (表 1), 模板(20 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 20  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 60 °C 5 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳后对目的片段进行回收。使用 2×MultiF Seamless Assembly Mix 进行无缝克隆, 采取 10  $\mu$ L 反应体系: 2×MultiF Seamless Assembly Mix 5  $\mu$ L, 线性化载体 2  $\mu$ L, 插入片段 3  $\mu$ L。混合均匀后置于 PCR 仪中 50 °C 孵育 25 min, 连接产物转化大肠杆菌 Fast-T1 感受态细胞。挑取单克隆菌落经 PCR 鉴定出阳性克隆后进行测序验证。

进一步以 VB-T7 为模板构建融合 SV40 NLS 序列的表达质粒。分别使用引物 N-T7P-SV40NLS-F/R、C-T7P-SV40NLS-F/R 对 VB-T7 进行扩增, 将 NLS 融合在 T7 RNAP 基因的 N 端或 C 端。对扩增产物进行回收、无缝克隆连接、转化, 挑取单克隆菌落测序验证。将 N 端融合 NLS 的 T7 RNAP 表达质粒命名为 VB-T7-N-NLS, 将 C 端融合 NLS 的 T7 RNAP 质粒命名为 VB-T7-C-NLS。

### 1.4 检测 T7 RNAP 活性的重组质粒 pEGFP-N3-T7-IRES 的构建

构建含有受 T7 启动子控制的增强型绿色荧光蛋白基因的报告质粒 pEGFP-N3-T7-IRES。根据 pEGFP-N3 载体序列设计特异性引物 N3-T7-F 和 N3-T7-R (表 1), 将该载体上的人巨细胞病毒 (Cytomegalovirus, CMV) 增强子和启动子区域替换为 T7 启动子, 以获得重组质粒 pEGFP-N3-T7。再根据 pEGFP-N3-T7 序列设计特异性引物 N3-T7-IRES-F 和 N3-T7-IRES-R (表 1), 同时合成内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)序列[由生工生物工程(上海)股份有限公司合成], 根据该序列设计引物 IRES-F 和 IRES-R 以将其插入 T7 启动子和 EGFP 编码基因之间。分别扩增 pEGFP-N3-T7 载体与 IRES 并进行回收、

表 1 本文中使用的引物

Table 1 Primers used in this paper

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product (length)
VB-F	GCGTAAACCCAGCTTTCTGTACAAAGTGGCTGTGCC	Linearized transposon vector (5 035 bp)
VB-R	TCGTGTTTCATTCCCATGGTGGCAGCCTGCTTTTTTGTACAAACTTGG	
T7P-F	CACCATGGGAATGAACACGATTAACATCGCTAAGAAC	T7 RNAP (2 676 bp)
T7P-R	CAAGAAAGCTGGGTTTACGCGAACGCGAAGTCCGACTCTAAGATGTC	
N3-T7-F	GTTCCGTTAATACGACTCACTATAGGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCG	Linearized pEGFP-N3 vector (4 260 bp)
	CTAG	
N3-T7-R	GTGAGTCGTATTAACGGAACTCCATATATGGGCTATGAACCTAATGACC	
N3-T7-IRES-F	GATAATATGGCCACAACCATGGTGGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCC	Linearized pEGFP-N3 vector (4 210 bp)
	CG	
N3-T7-IRES-R	GATGCATTTCGCGAGGTAGAGTCCGGTAGCGCTAGCGGATCTGAC	
IRES-F	TACCTCGCGAGTGCATCTAGATATCGGATCC	IRES (619 bp)
IRES-R	GGTTGTGGCCATATTATCATCGTGTTTTTC	
N-T7P-SV40NLS-R	CTGCCACCTTGCGTTTTTCTTGGGTCCCATGGTGGCAGCCTGCTTT	VB-T7-N-NLS (7 723 bp)
	TTTGTAC	
N-T7P-SV40NLS-F	AAACGCAAGGTGGGCAGCGGCTCCATGAACACGATTAACATCGCTAA	
	GAACG	
C-T7P-SV40NLS-R	GCGTTTTTCTTGGGGGAGCCGCTGCCGCGAACGCGAAGTCCGACT	VB-T7-C-NLS (7 721 bp)
	CTAAGATGTC	
C-T7P-SV40NLS-F	CTCCCCCAAGAAAAACGCAAGGTGTAAACCCAGCTTTCTGTACAA	
	AGTGG	

纯化, 纯化产物使用 2×MultiF Seamless Assembly Mix 进行无缝克隆, 转化大肠杆菌 Fast-T1 感受态细胞。对菌液 PCR 鉴定后的阳性菌液进行测序, 获得 pEGFP-N3-T7-IRES 重组质粒。

### 1.5 细胞转染

转染前 1 天在无菌条件下将细胞接种于 12 孔板中, 使其在转染时达到 80%–90% 的密度, 使用 *TransIT-LT1* 转染试剂进行转染。具体步骤为: 0.8 μg Tol2 转座酶表达质粒、0.2 μg VB-T7/VB-T7-N-NLS/VB-T7-C-NLS 质粒、3 μL *TransIT-LT1* 与 100 μL Opti-MEM 混合均匀, 室温孵育 15 min 使其形成转染复合物, 然后加入细胞板中。6 h 后更换细胞板中的培养基继续培养。

### 1.6 稳转细胞筛选

将 GCF、GCO 细胞分别接种于 24 孔板, 在 25 °C 培养箱内培养过夜, 细胞完全贴壁且密

度在 70% 时分别加入含有 20、40、60、80、100、120、140、160、180、200 μg/mL 潮霉素 B 及 5% 胎牛血清的 M-199 培养基, 每 72 h 更换 1 次培养基继续筛选。筛选 14 d 后, 能将所有细胞杀死的最低浓度即为潮霉素 B 抗性的筛选浓度。在上述转染 48 h 的细胞中添加潮霉素 B 进行筛选, 未转染的对照组细胞全部死亡后结束筛选, 更换正常培养基使细胞正常生长。

### 1.7 T7 RNAP 表达产物的检测与鉴定

为检测 T7 RNAP 基因是否已经稳定整合到细胞基因组并能持续表达, 收集多次传代后的细胞进行蛋白免疫印迹 (Western blotting, WB) 检测, 确认蛋白的表达并比较蛋白表达量。细胞于室温、2 000 r/min 离心 5 min 后使用 PBS 重悬, 加入 5×SDS-PAGE Loading Buffer 混匀后沸水浴 10 min, 样品经 4%–20% SDS-PAGE 凝胶电泳进行分离。将分离的蛋白质从凝胶转移

到 PVDF 膜上, 使用快速封闭液进行封闭。封闭结束后, 将膜与抗 T7 RNAP 的抗体在 4 °C 孵育过夜, 使用 TBST 清洗膜, 去除未结合的一抗。然后将膜与 HRP 标记的山羊抗兔二抗孵育, 1 h 后再次使用 TBST 进行清洗, 去除未结合的二抗。膜经化学发光液显色后, 在化学发光仪中显影观察并拍照记录。

为了鉴定稳转细胞系中表达的 T7 RNAP 是否具有驱动 T7 启动子的活性及其差异, 将筛选后的稳转细胞系接种于 12 孔板, 按上述转染方法使用 *TransIT-LT1* 试剂将 pEGFP-N3-T7-IRES 报告质粒(1 µg/孔)分别转染至不同细胞系。转染后 6 h 更换培养基继续培养, 48 h 后通过荧光显微镜观察荧光数目判断细胞中 T7 RNAP 活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达 T7 RNAP 的系列重组质粒构建结果

三种携带 T7 RNAP 及 NLS 重组质粒的基本结构如图 1A–1C 所示。从大肠杆菌 BL21(DE3) 的基因组中扩增 T7 RNAP 基因, 预期扩增产物大小为 2 676 bp, 电泳结果与预期相符(图 1D)。将其构建于 Tol2 转座载体 VB 上, 使其处于 CMV 启动子下游。对转化重组质粒的菌落进行 PCR 鉴定, 进一步对阳性克隆菌液测序, 结果表明重组质粒 VB-T7 构建成功(图 1E)。进一步基于 VB-T7 重组质粒将 SV40 NLS (PKKKRKV) 编码序列分别融合在 T7 RNAP 的 N 端和 C 端, 以获得重组质粒 VB-T7-N-NLS (图 1F) 与 VB-T7-C-NLS, 测序结果表明质粒构建成功。

### 2.2 T7 RNAP 活性检测重组质粒构建结果

构建含有受 T7 启动子控制的 EGFP 基因报告质粒用来检测细胞中 T7 RNAP 的活性。使用引物 N3-T7-F/R 扩增 pEGFP-N3 质粒, 转化重

组后挑取单克隆菌落进行测序, 结果表明 pEGFP-N3 质粒上的 CMV 增强子及启动子区域被 T7 启动子替换, 成功构建了 pEGFP-N3-T7 质粒。为了将 IRES 插入 pEGFP-N3-T7 质粒的 T7 启动子和 EGFP 编码基因之间, 利用引物 (N3-T7-IRES-F/R、IRES-F/R) 分别扩增 pEGFP-N3-T7 (4 260 bp) 与 IRES (619 bp), PCR 产物大小与预期相符(图 2A)。转化重组后对 pEGFP-N3-T7-IRES 的菌落进行 PCR 鉴定, 电泳结果如图 2B 所示, 单克隆菌落为阳性。对阳性克隆进行测序, 结果表明成功构建重组质粒 pEGFP-N3-T7-IRES。

### 2.3 表达 T7 RNAP 细胞系的筛选结果

细胞杀灭曲线实验结果表明, 对于 GCF 与 GCO 细胞, 潮霉素 B 的最佳筛选浓度分别为 120 µg/mL 与 100 µg/mL (图 3A、3B)。

转染后加入上述浓度的潮霉素 B 对细胞进行筛选, 约 14 d 后对照组细胞无存活, 结束筛选。细胞经过筛选并继续培养后共获得 6 株细胞: GCF-T7、GCF-T7-N-NLS、GCF-T7-C-NLS、GCO-T7、GCO-T7-N-NLS 和 GCO-T7-C-NLS (图 3C)。

### 2.4 T7 RNAP 蛋白质印迹检测结果

以未转染的 GCF 细胞为阴性对照, 对 GCF-T7、GCF-T7-N-NLS、GCF-T7-C-NLS、GCO-T7、GCO-T7-N-NLS、GCO-T7-C-NLS 进行蛋白质印迹检测。结果如图 4 所示, T7 RNAP 蛋白大小约为 99 kDa, 在筛选的稳转 T7 RNAP 质粒的细胞系中均能检测出明显的 T7 RNAP 蛋白条带, 而空白对照组无对应条带。说明 T7 RNAP 已稳定插入目的细胞基因组中, 并可以进行稳定的蛋白表达。另外, 对比结果也显示 GCF-T7-C-NLS、GCO-T7-C-NLS 细胞系的 T7 RNAP 蛋白表达量高于其他几株细胞。

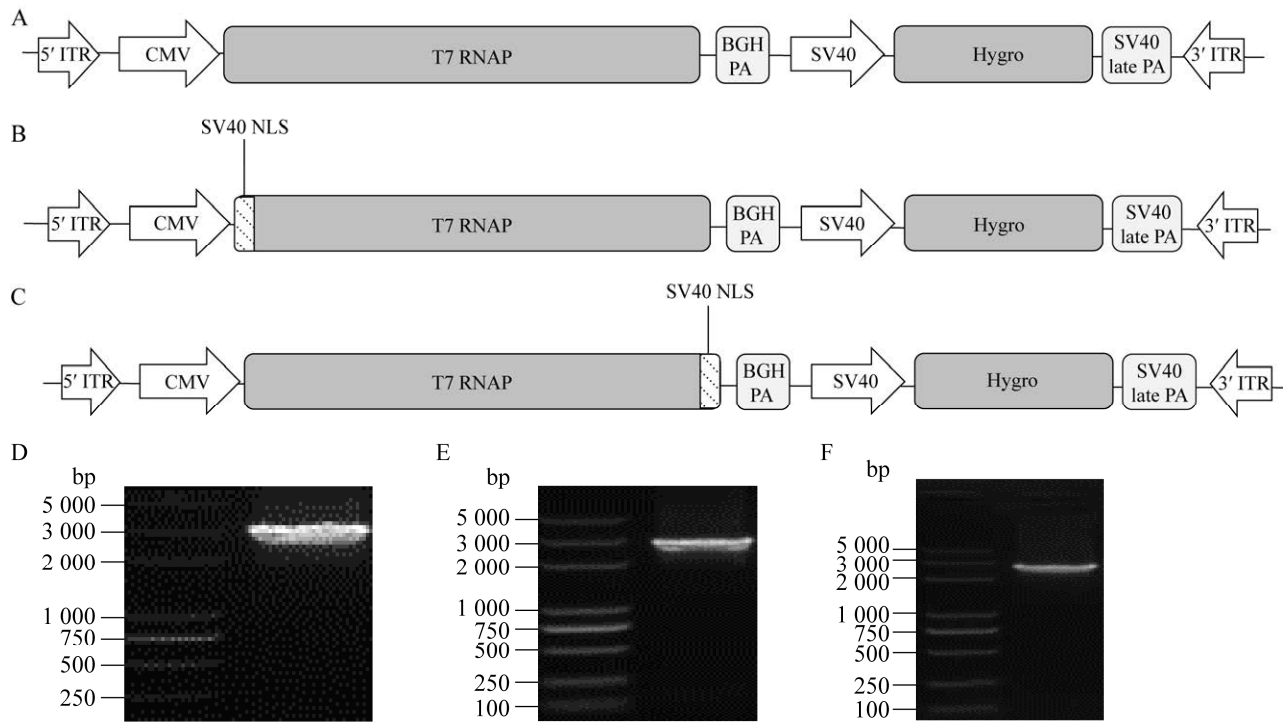


图 1 重组质粒结构示意及 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图 A: VB-T7 质粒结构示意图. B: VB-T7-N-NLS 质粒结构示意图. C: VB-T7-C-NLS 质粒结构示意图. D: T7 RNAP 基因 PCR 扩增结果. E: 重组质粒 VB-T7 菌落 PCR 检测结果. F: 重组质粒 VB-T7-N-NLS 菌落 PCR 检测结果

Figure 1 Structure of recombinant plasmids and agarose gel electrophoresis of PCR products. A: Structure of VB-T7 plasmid. B: Structure of VB-T7-N-NLS plasmid. C: Structure of VB-T7-C-NLS plasmid. D: T7 RNAP gene PCR amplification result. E: Recombinant plasmid VB-T7 colony PCR assay result. F: Recombinant plasmid VB-T7-N-NLS colony PCR assay result.

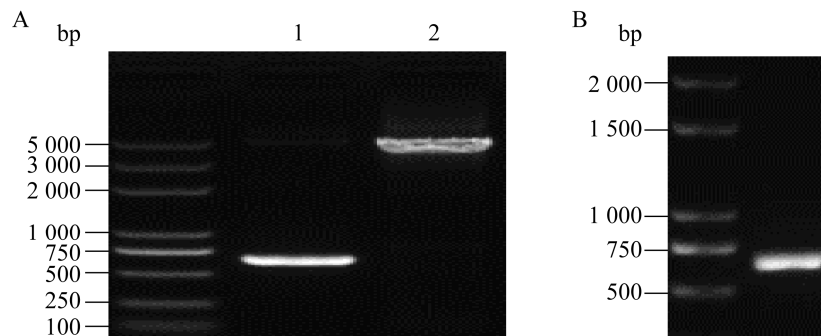


图 2 活性检测重组质粒的构建 A: pEGFP-N3-T7-IRES 重组质粒 PCR 电泳图. 1: IRES 基因 PCR 扩增结果; 2: pEGFP-N3-T7 载体 PCR 扩增结果. B: pEGFP-N3-T7-IRES 重组质粒菌液 PCR 检测结果

Figure 2 Construction of recombinant plasmids for activity detection. A: PCR electropherogram of pEGFP-N3-T7-IRES recombinant plasmid. 1: Result of PCR amplification of IRES gene; 2: Result of PCR amplification of pEGFP-N3-T7 vector. B: pEGFP-N3-T7-IRES recombinant plasmid bacteriophage PCR assay result.

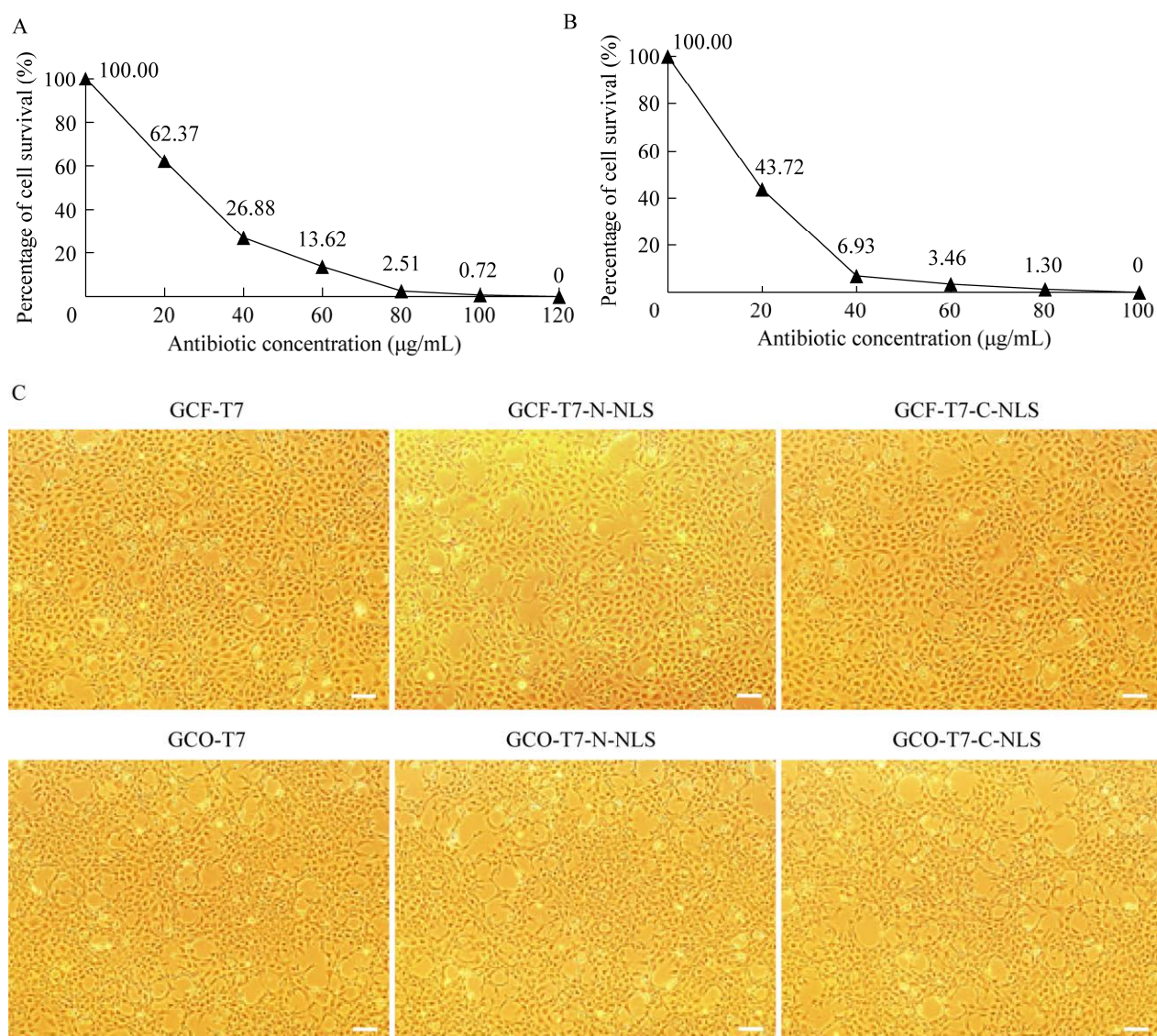


图3 细胞的抗生素筛选 A: GCF 细胞潮霉素 B 杀灭曲线; B: GCO 细胞潮霉素 B 杀灭曲线; C: 稳转细胞的显微观察图. 标尺: 100  $\mu\text{m}$

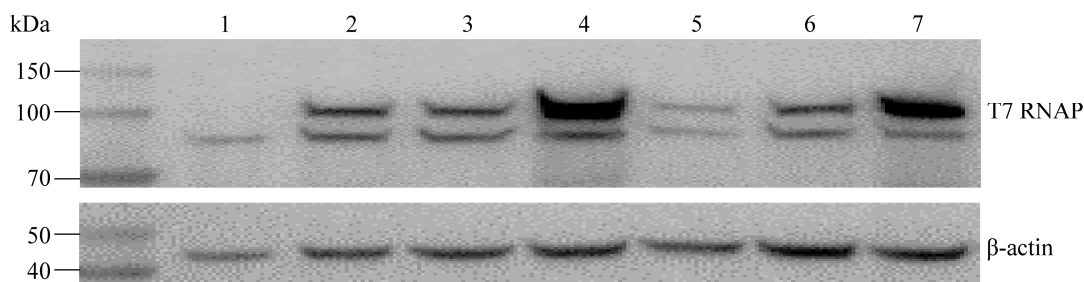
Figure 3 Antibiotic screening of cells. A: GCF cell hygromycin B killing curve; B: GCO cell hygromycin B killing curve; C: Cell lines obtained after screening. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

## 2.5 T7 RNAP 活性检测结果

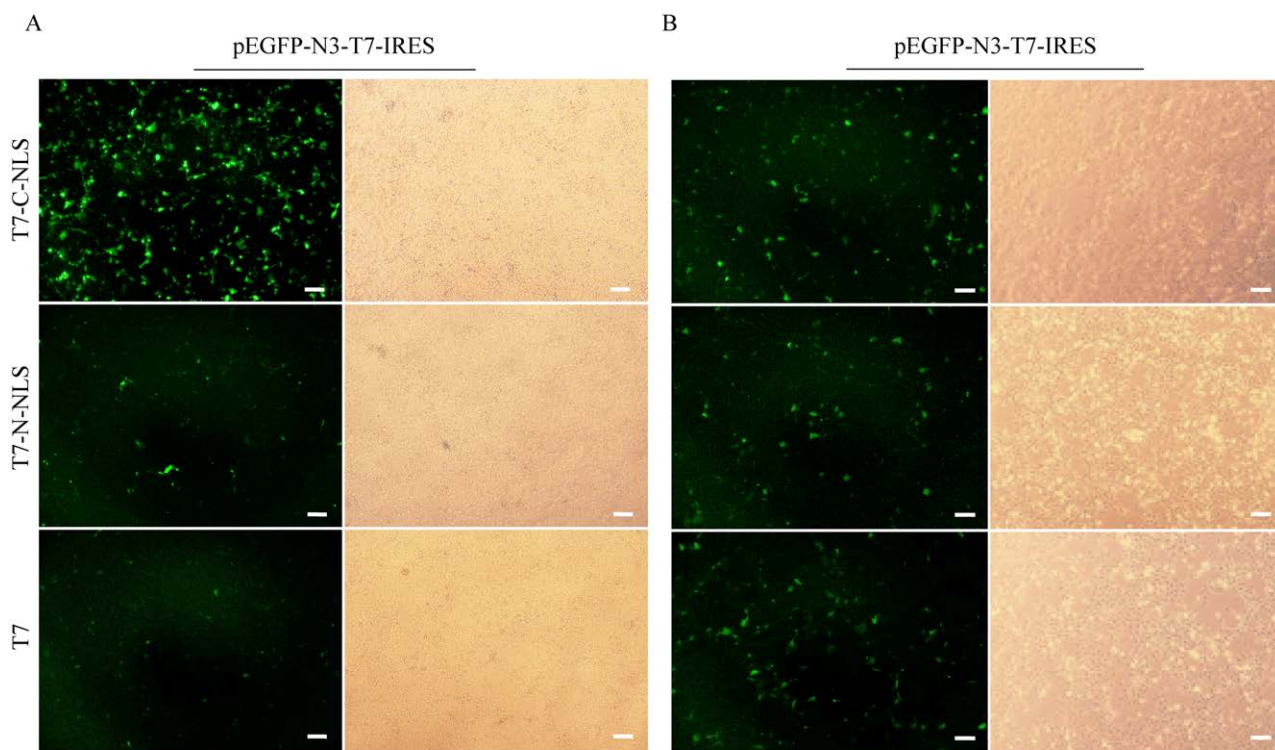
在荧光显微镜下观察转染 pEGFP-N3-T7-IRES 后的细胞, 可见能稳定表达 T7 RNAP 的细胞系中均有特异性荧光产生, 而正常细胞中未出现荧光, 表明 GCF 及 GCO 细胞中的 T7 RNAP 具有转录活性(图 5)。对于 GCO 细胞,

GCO-T7-C-NLS 细胞系在转染 pEGFP-N3-T7-IRES 质粒后的荧光数目明显高于 GCO-T7 细胞系及 GCO-T7-N-NLS 细胞系。说明对于 GCO 细胞, 在 T7 RNAP C 端融合 NLS 可以有效增强 T7 RNAP 活性, 实现更好的表达效果。但对于 GCF 细胞, GCF-T7 与 GCF-T7-N-NLS、GCF-T7-C-NLS





**图 4** 细胞中 T7 RNAP 蛋白免疫印迹检测 1: GCF 阴性对照; 2: GCO-T7; 3: GCO-T7-N-NLS; 4: GCO-T7-C-NLS; 5: GCF-T7; 6: GCF-T7-N-NLS; 7: GCF-T7-C-NLS. 检测  $\beta$ -actin 的表达作为内参  
 Figure 4 Western blotting detection of T7 RNAP in cells. 1: GCF negative control; 2: GCO-T7; 3: GCO-T7-N-NLS; 4: GCO-T7-C-NLS; 5: GCF-T7; 6: GCF-T7-N-NLS; 7: GCF-T7-C-NLS. Detection of  $\beta$ -actin expression as an internal reference.



**图 5** T7 RNAP 活性检测显微镜观察图 左列为荧光观察图,右列为同视野普通光镜观察图. A: GCO-T7、GCO-T7-N-NLS、GCO-T7-C-NLS 细胞转染 pEGFP-N3-T7-IRES 后显微观察; B: GCF-T7、GCF-T7-N-NLS、GCF-T7-C-NLS 细胞转染 pEGFP-N3-T7-IRES 后显微观察. 标尺: 100  $\mu$ m

Figure 5 Microscopy view of T7 RNAP activity assay. The left column is the fluorescence observation and the right column is the observation by normal light microscope with the same field of view. A: Microscopic observation of GCO-T7, GCO-T7-N-NLS, GCO-T7-C-NLS cells after transfection with pEGFP-N3-T7-IRES; B: Microscopic observation of GCF-T7, GCF-T7-N-NLS, GCF-T7-C-NLS cells after transfection with pEGFP-N3-T7-IRES. Scale bar: 100  $\mu$ m.

在转染报告质粒后所观察到的荧光数目无显著差异,表明对于 GCF 细胞, T7 RNAP 末端不融合 NLS 也能有较高的转录活性。

### 3 讨论

稳定表达 T7 RNAP 的细胞系在病毒学中的一个重要应用是 RNA 病毒的反向遗传学。由于 T7 启动子起始转录高效且起始位点较准确,研究者们可在体外培养细胞系中利用 T7 RNAP 高效转录生成与野生型一致的病毒 RNA,进而拯救出病毒。如 Fu 等<sup>[21]</sup>利用慢病毒载体介导构建了稳定表达 T7 RNAP 的人胚肾细胞 293FT 株细胞,实现了肠道病毒 71 型 (enterovirus 71) cDNA 克隆的快速拯救。在哺乳动物细胞中常用慢病毒载体等来建立稳定表达外源基因的细胞系,而鱼类细胞中该类方法的有效性尚需探索。本文利用来自鱼类的 Tol2 转座子系统,成功构建了稳定表达 T7 RNAP 的草鱼细胞系,也为该系统在不同鱼类细胞系中的应用提供了参考。

呼肠孤病毒是一类宿主范围极广,具分节段双链 RNA 基因组的病毒<sup>[22-23]</sup>。从脊椎动物到植物、真菌均已分离出呼肠孤病毒<sup>[23]</sup>。而草鱼养殖中危害最严重的病毒性出血病正是由草鱼呼肠孤病毒引起<sup>[24-25]</sup>。借助 T7 RNAP 系统,研究者们已在几种重要的呼肠孤病毒中开发出基于质粒的反向遗传操作系统。Kobayashi 等<sup>[26]</sup>将哺乳动物正呼肠孤病毒 (Mammalian orthoreovirus, MRV) 基因组 10 个节段的 cDNA 分别克隆到 T7 启动子与 T7 终止子之间,然后转染到预先感染表达 T7 RNAP 的重组痘苗病毒的细胞中,成功拯救出了有活性的呼肠孤病毒。该系统依赖重组痘苗病毒表达的 T7 RNAP,使后代病毒中混有重组痘苗病毒,需进一步挑斑分离。他们随后构建了稳定表达 T7 RNAP 的

幼仓鼠肾 (baby hamster kidney, BHK) 细胞,使用该细胞成功进行了哺乳动物正呼肠孤病毒 cDNA 克隆的拯救<sup>[27]</sup>,使呼肠孤病毒的反向遗传操作不依赖于其他病毒的感染。哺乳动物正呼肠孤病毒反向遗传操作系统的建立是呼肠孤病毒研究领域的重要突破。运用类似的策略,基于稳转 T7 RNAP 的细胞,蓝舌病毒(反刍动物重要呼肠孤病毒病原)和轮状病毒(引起婴幼儿腹泻的呼肠孤病毒)的反向遗传操作系统被相继建立<sup>[28-29]</sup>。

尽管如此,水生动物呼肠孤病毒(包括草鱼呼肠孤病毒)的反向遗传操作系统至今仍未取得成功,稳定表达 T7 RNAP 的草鱼细胞系也未见报道。因此,本文构建并鉴定了稳定表达 T7 RNAP 的草鱼细胞系,以期创建草鱼呼肠孤病毒的反向遗传操作系统提供细胞工具。另外,本文的对比实验表明 NLS 有助于 T7 RNAP 在 GCO 细胞中转录功能的发挥,也可为进一步的应用提供参考。

### 4 结论

本文实验结果证明了使用 Tol2 转座子系统在草鱼细胞中实现外源基因稳定表达的可行性,同时验证了通过添加核定位信号(NLS)优化 T7 RNA 聚合酶表达的有效性,相应的 T7 RNAP 稳转细胞系的建立为草鱼病毒学和基因功能研究提供了平台。

### REFERENCES

- [1] CHAMBERLIN M, McGRATH J, WASKELL L. New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7[J]. *Nature*, 1970, 228(5268): 227-231.
- [2] LIANG QY, TU BW, CUI L. Recombinant T7 RNA polymerase production using *ClearColi* BL21(DE3) and animal-free media for *in vitro* transcription[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2024, 108(1): 41.

- [3] HE W, ZHANG XY, ZOU Y, LI J, CHANG L, HE YC, JIN QH, YE JR. Effective synthesis of circRNA *via* a thermostable T7 RNA polymerase variant as the catalyst[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024, 12: 1356354.
- [4] CRUNKHORN S. Improving mRNA production[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2023, 22(1): 19.
- [5] VOGEL AB, KANEVSKY I, CHE Y, SWANSON KA, MUIK A, VORMEHR M, KRANZ LM, WALZER KC, HEIN S, GULER A, LOSCHKO J, MADDUR MS, OTA-SETLIK A, TOMPKINS K, COLE J, LUI BG, ZIEGENHALS T, PLASCHKE A, EISEL D, DANY SC, et al. BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2[J]. *Nature*, 2021, 592(7853): 283.
- [6] WANG MY, WU JY, CAO XA, XU L, WU JH, DING HY, SHANG YJ. Developments in negative-strand RNA virus reverse genetics[J]. *Microorganisms*, 2024, 12(3): 559.
- [7] JI SF, THOMFORDE J, ROGERS C, FU I, BROYDE S, TRETYAKOVA NY. Transcriptional bypass of DNA-protein and DNA-peptide conjugates by T7 RNA polymerase[J]. *ACS Chemical Biology*, 2019, 14(12): 2564-2575.
- [8] HELLWEG S, CANALS LMI. Emerging approaches, challenges and opportunities in life cycle assessment[J]. *Science*, 2014, 344(6188): 1109-1113.
- [9] 张奇亚, 桂建芳. 水产动物的病毒基因组及其病毒与宿主的相互作用[J]. *中国科学(生命科学)*, 2014, 44(12): 1236-1252.  
ZHANG QY, GUI JF. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals[J]. *Scientia Sinica (Vita)*, 2014, 44(12): 1236-1252 (in Chinese).
- [10] CAO L, NAYLOR R, HENRIKSSON P, LEADBITTER D, METIAN M, TROELL M, ZHANG WB. Global food supply. China's aquaculture and the world's wild fisheries[J]. *Science*, 2015, 347(6218): 133-135.
- [11] MENG XY, JIANG QQ, YU XD, ZHANG QY, KE F. Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha (eEF1A) inhibits *Siniperca chuatsi* rhabdovirus (SCRV) infection through two distinct mechanisms[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(11): e0122623.
- [12] ZHANG QY, KE F, GUI L, ZHAO Z. Recent insights into aquatic viruses: emerging and reemerging pathogens, molecular features, biological effects, and novel investigative approaches[J]. *Water Biology and Security*, 2022, 1(4): 100062.
- [13] JIANG QQ, LI Z, ZHANG QY, KE F. A novel cell line established from skin tissue of gibel carp (*Carassius gibelio*) is susceptible to *Carassius auratus* herpesvirus infection[J]. *Water Biology and Security*, 2024, 3(2): 100253.
- [14] LU YA, LANNAN CN, ROHOVEC JS, FRYER JL. Fish cell lines: establishment and characterization of three new cell lines from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1990, 26(3 Pt 1): 275-279.
- [15] LIU J, YU C, GUI JF, PANG DW, ZHANG QY. Real-time dissecting the entry and intracellular dynamics of single reovirus particle[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2797.
- [16] FU XZ, LIN Q, LIANG HR, LIU LH, HUANG ZB, LI NQ, SU JG. The biological features and genetic diversity of novel fish rhabdovirus isolates in China[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(9): 2829-2834.
- [17] KAWAKAMI K, SHIMA A. Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish *Danio rerio*[J]. *Gene*, 1999, 240(1): 239-244.
- [18] SANDOVAL-VILLEGAS N, NURIEVA W, AMBERGER M, IVICS Z. Contemporary transposon tools: a review and guide through mechanisms and applications of *Sleeping beauty*, *piggyBac* and *Tol2* for genome engineering[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(10): 5084.
- [19] WANG PC, DENG H, XU R, DU JL, TAO RK. Improvement in Tol2 transposon for efficient large-cargo capacity transgene applications in cultured cells and zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Zoological Research*, 2024, 45(3): 567-574.
- [20] LALONDE RL, WELLS HH, KEMMLER CL, NIEUWENHUIZE S, LERMA R, BURGER A, MOSIMANN C. *pIGLET*: safe harbor landing sites for reproducible and efficient transgenesis in zebrafish[J]. *Science Advances*, 2024, 10(23): eadn6603.
- [21] FU MX, BAI JJ, GAO S, CHANG ZM, ZHOU X, LONG JE. Construction and characterization of an infectious cDNA clone of enterovirus 71: a rapid method for rescuing infectious virus based on stable cells expressing T7 polymerase[J]. *Archives of Virology*, 2021, 166(2): 627-632.
- [22] CHEN DJ, WANG D, WEI F, KONG YF, DENG JH,

- LIN XM, WU SQ. Characterization and reverse genetic establishment of cattle derived Akabane virus in China[J]. BMC Veterinary Research, 2021, 17(1): 349.
- [23] KOMOTO S, SASAKI J, TANIGUCHI K. Reverse genetics system for introduction of site-specific mutations into the double-stranded RNA genome of infectious rotavirus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(12): 4646-4651.
- [24] QIU T, LU RH, ZHANG J, ZHU ZY. Complete nucleotide sequence of the S10 genome segment of grass carp reovirus (GCRV)[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2001, 44(1): 69-74.
- [25] 桂朗, 张奇亚. 中国水产动物病毒学研究概述[J]. 水产学报, 2019, 43(1): 168-187.
- GUI L, ZHANG QY. A brief review of aquatic animal virology researches in China[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(1): 168-187 (in Chinese).
- [26] KOBAYASHI T, ANTAR AAR, BOEHME KW, DANTHI P, EBY EA, GUGLIELMI KM, HOLM GH, JOHNSON EM, MAGINNIS MS, NAIK S, SKELTON WB, WETZEL JD, WILSON GJ, CHAPPELL JD, DERMODY TS. A plasmid-based reverse genetics system for animal double-stranded RNA viruses[J]. Cell Host & Microbe, 2007, 1(2): 147-157.
- [27] KOBAYASHI T, OOMS LS, IKIZLER M, CHAPPELL JD, DERMODY TS. An improved reverse genetics system for mammalian orthoreoviruses[J]. Virology, 2010, 398(2): 194-200.
- [28] PRETORIUS JM, HUISMANS H, THERON J. Establishment of an entirely plasmid-based reverse genetics system for Bluetongue virus[J]. Virology, 2015, 486: 71-77.
- [29] KANAI YT, KOMOTO S, KAWAGISHI T, NOUDA R, NAGASAWA N, ONISHI M, MATSUURA Y, TANIGUCHI K, KOBAYASHI T. Entirely plasmid-based reverse genetics system for rotaviruses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(9): 2349-2354.