

两种报告基因在达摩凤蝶细胞克隆株 RIRI-PaDe-2-C6 中的表达

刘志刚, 丁伟峰, 孙娜, 张欣, 李娴, 谢世聪, 冯颖*

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 国家林业局资源昆虫培育与利用重点实验室, 云南昆明 650224)

摘要: [目的] 前期研究中, 项目组从达摩凤蝶细胞系 RIRI-PaDe-2 中分离培养出单细胞克隆株 RIRI-PaDe-2-C6, 通过感染野生型苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcMNPV) 发现克隆株 RIRI-PaDe-2-C6 对病毒敏感性高于原细胞系 RIRI-PaDe-2。本研究将对达摩凤蝶单细胞克隆株 RIRI-PaDe-2-C6 的生物学特性和外源蛋白表达特性进行研究, 并与原细胞系 RIRI-PaDe-2 进行比较, 评价其用于外源蛋白表达的可行性。[方法] 使用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统构建重组 β -半乳糖苷酶杆状病毒 (AcMNPV-Gal) 和重组分泌型碱性磷酸酶杆状病毒 (AcMNPV-SEAP), 分别侵染 RIRI-PaDe-2 和 RIRI-PaDe-2-C6。在感染后的 24、48、72、96、120、144、168 h 检测 2 种重组蛋白的表达量, 并对 2 个细胞系的形态学、生长曲线、倍增时间及核型进行分析和比较。[结果] 表明: RIRI-PaDe-2 和 RIRI-PaDe-2-C6 均可表达 β -半乳糖苷酶 (β -Gal) 和分泌型碱性磷酸酶 (SEAP), 单细胞克隆株 RIRI-PaDe-2-C6 对重组 β -Gal 的表达水平显著高于原细胞系 RIRI-PaDe-2 ($P < 0.05$), 在接种 AcMNPV-Gal 后 96 h 表达量达到最高。RIRI-PaDe-2-C6 对重组 SEAP 的表达水平与 RIRI-PaDe-2 无显著差异 ($P > 0.05$)。显微观察发现, RIRI-PaDe-2-C6 的细胞类型全部为梭形, 比原细胞系 RIRI-PaDe-2 的细胞组成更加单一。RIRI-PaDe-2-C6 的群体倍增时间为 94.94 h, 比原细胞系 RIRI-PaDe-2 的倍增时间 (67.42 h) 长。核型分析显示, RIRI-PaDe-2-C6 的染色体数量呈正态分布, 数目为 21~82 条, 与 RIRI-PaDe-2 的染色体数目分布范围 (48~97 条) 存在显著差异 ($P < 0.05$)。[结论] 通过单细胞克隆方法获得的克隆株 RIRI-PaDe-2-C6 无论在外源蛋白表达以及基础生物学特性方面均有别于原细胞系 RIRI-PaDe-2。

关键词: 达摩凤蝶; 单细胞克隆; 昆虫细胞系; β -半乳糖苷酶; 分泌型碱性磷酸酶; 重组杆状病毒

中图分类号: Q965.8

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)04-0031-07

Expression of Two Reporter Genes in Clonal Cell Line RIRI-PaDe-2-C6 Developed from *Papilio demoleus* Linnaeus (Lepidoptera: Papilionidae)

LIU Zhi-gang, DING Wei-feng, SUN Na, ZHANG Xin, LI Xian, XIE Shi-cong, FENG Ying

(Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Cultivating and Utilization of Resource Insects of State Forestry Administration, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: [Objective] In the previous research, a monoclonal cell line RIRI-PaDe-2-C6 was established from *Papilio demoleus* cell line RIRI-PaDe-2 and it was found that the two cell lines could be infected by wild-type *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrosis virus (AcMNPV). Especially, RIRI-PaDe-2-C6 was susceptible to AcMNPV and exhibited a higher production of AcMNPV polyhedral per infected cell averagely compared to the parent RIRI-PaDe-2 cells. The aim of this study is to further understand the characteristics of RIRI-PaDe-2-C6 in expressing exogenous genes. [Method] The Bac-to-Bac baculovirus expression system was used to establish recombinant baculovirus carrying β -galactosidase gene and secreted alkaline phosphatase (SEAP) gene. The RIRI-PaDe-2-C6

收稿日期: 2018-01-27

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助项目 (CAFYBB2016ZD005); 中国林业科学研究院资源昆虫研究所中央及公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (rirical2012003M) 资助

作者简介: 刘志刚 (1992—), 男, 硕士研究生, 从事昆虫细胞工程相关研究。

* 通讯作者: 冯颖 (1960—), 博士, 研究员, 主要从事昆虫学相关研究. E-mail: rirify@139.com

was infected with recombinant virus. The expression levels of the two recombinant proteins were detected at 24, 48, 72, 96, 120, 144, and 168 hours after infection and compared with RIRI-PaDe-2 cells. The methods of cells morphology analysis, growth analysis and chromosome analysis were used to obtain the biological characteristics of RIRI-PaDe-2-C6. [Result] RIRI-PaDe-2-C6 and RIRI-PaDe-2 could be infected by recombinant baculovirus. The expression of β -galactosidase (β -Gal) was significantly higher than that of RIRI-PaDe-2 ($P < 0.05$), but no significant difference in expression level of secreted alkaline phosphatase (SEAP) was observed between RIRI-PaDe-2-C6 and RIRI-PaDe-2 ($P > 0.05$). All cells were spindle-shaped in RIRI-PaDe-2-C6 which was more homogeneous than RIRI-PaDe-2. The cell population doubling time of RIRI-PaDe-2-C6 was 94.94 hours which was longer than those of RIRI-PaDe-2 (67.42 hours). The averages chromosome numbers of RIRI-PaDe-2-C6 was 52.26 ± 30.48 which was significant different from that of RIRI-PaDe-2 (73.19 ± 24.27). [Conclusion] The differences in expressing exogenous genes and biological characteristics are significant between clone cell line RIRI-PaDe-2-C6 and its parent cell line RIRI-PaDe-2.

Keywords: *Papilio demoleus*; single cell cloning; insect cell line; β -galactosidase; secreted alkaline phosphatase; recombinant baculovirus

昆虫细胞-杆状病毒表达系统(Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System, IC-BEVS)是近年来发展迅速的真核细胞表达系统,具有完备的翻译后加工修饰能力、生物安全性高、对外源基因容量大的特点,能够高效表达外源基因^[1-2]。在基因工程、蛋白工程、工程疫苗、药物研究和开发、生物农药等领域具有重要的应用价值^[3-4]。据统计,已有上千种外源基因在 IC-BEVS 中得到了成功表达,且有 95% 的外源重组蛋白能够被正确的转译、加工以及修饰成具有生物活性的产物^[5]。IC-BEVS 常用的宿主细胞来自鳞翅目和双翅目昆虫细胞系,特别是来源鳞翅目蛾类的昆虫细胞系,如草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞系 Sf21^[6]及其克隆细胞株 Sf9^[7],粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)细胞系 Tn5^[8]及其高产克隆株 High Five^[9],被广泛用于 IC-BEVS^[10];但目前用于外源蛋白表达的昆虫细胞株数量有限,且随着这些细胞系传代次数的增加,细胞开始出现一些退化,如外源蛋白产量减少,细胞增殖速率降低等^[11-12]。因此,建立和筛选具有高效表达外源基因潜力的新细胞系具有重要的意义。

前期研究中,项目组建立了 4 个来源于鳞翅目凤蝶科达摩凤蝶(*Papilio demoleus*)新孵幼虫的细胞系(RIRI-PaDe-1、RIRI-PaDe-2、RIRI-PaDe-3、RIRI-PaDe-4)^[13]。观察发现,这 4 个细胞系均为贴壁细胞,其细胞组成、形态大小都存在不同程度的差异。使用野生型苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrosis virus, AcMNPV)侵染 4 个细胞系发现均能表现出病理学特征,且不同个体对 AcMNPV 的敏感性不同,如有的细胞受病毒侵染后能够产生大量包涵体(occlusion

bodies, OBs),但有的细胞个体却没有明显病变特征。笔者使用半固体培养法结合显微操作系统对这 4 个细胞系进行了单细胞克隆操作,共获得 61 个单细胞克隆株,使用 AcMNPV 侵染这些克隆株并统计细胞产生 OBs 数量,发现其中 1 个克隆株 RIRI-PaDe-2-C6 平均每个细胞产生的 OBs 数量较原细胞系 RIRI-PaDe-2 有显著增高。AcMNPV 具有较广的宿主范围,常作为外源基因的载体在蛾类昆虫细胞中表达外源蛋白,为研究以 AcMNPV 为载体的重组病毒能否在达摩凤蝶细胞系中的表达,在本研究中,笔者利用 Bac-to-Bac 表达系统分别构建了携带 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -Gal)和分泌型碱性磷酸酶(secreted alkaline phosphatase, SEAP)基因的 2 个重组杆状病毒(AcMNPV-Gal 和 AcMNPV-SEAP),这 2 种基因是常用的报告基因,其检测手段较为成熟。用这 2 种重组病毒侵染 RIRI-PaDe-2 细胞系和克隆株 RIRI-PaDe-2-C6,检测宿主细胞对这 2 个报告基因的表达水平;同时对 RIRI-PaDe-2-C6 的细胞形态、倍增时间、染色体数目等基础生物学特性进行研究,为后续利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试细胞

达摩凤蝶细胞系 RIRI-PaDe-2 及其单细胞克隆株 RIRI-PaDe-2-C6 由中国林业科学研究院资源昆虫研究所建立并保存。培养基为 Zhang 等^[14]根据经典 Grace 昆虫培养基培养经过改良获得的 Grace⁺培养基^[14-15],培养时添加 20% 的 HyClone 胎牛血清(货号 SV30087.02)以促进细胞生长。培养条件为 27℃ 避光恒温培养。

1.2 供试病毒

外源基因分别来自表1所列的2个商业质粒产品,通过PCR扩增获得目的片段并添加酶切位点。使用赛默飞世尔科技有限公司(Thermo Fisher Scien-

tific Inc.)的Bac-to-Bac杆状病毒表达系统(货号10359-016)构建重组杆状病毒AcMNPV-Gal和AcMNPV-SEAP,并取P2代病毒贮备液用于试验。

表1 报告基因来源

Table 1 Two reported gene sources

质粒 Plasmid	引物和酶切位点 Primers and restriction sites	
pSV- β -Galactosidase Control Vector (Promega, Cat. E1081, GenBank: X65335)	5'-GGCGAATTCGTCGTTTTACAACGTCGTGA-3' 5'-GACAAGCTTATTTTGTACACCAGACCA-3'	(EcoRI) (HindIII)
pSEAP2-Control Vector (Clontech, Cat. 631717, GenBank: U89938)	5'-ATGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3' 5'-GGATCCTGCTGCTGCTGAAGCGCCGG-3'	(BamHI)

1.3 重组蛋白表达水平检测

1.3.1 接种病毒 取指数生长期的供试细胞,密度稀释至 1×10^5 个 \cdot mL⁻¹,接种于24孔细胞培养板(Corning,货号3524),每孔1 mL细胞悬液。每个细胞系接种4孔,其中,3孔作为平行对照,1孔作为阴性对照。使用Clontech Laboratories公司的BacPAK杆状病毒快速滴度检测试剂盒(货号631406)测定病毒滴度,稀释病毒液,使每个细胞感染的病毒数达到5(MOI=5)。培养板置于摇床(杭州米欧仪器有限公司,型号GS-20)避光轻摇2 h,使细胞充分吸收病毒;之后小心将每孔中培养基全部吸出,注意避免吸起细胞。然后在每孔中补加2 mL不含病毒的新鲜培养基,置于27℃恒温避光培养。

1.3.2 重组蛋白酶活性检测 接种重组病毒后24 h进行第1次检测,之后每隔24 h检测1次,共检测7次。取接种重组病毒的24孔细胞培养板置于摇板机(DragonLab,型号MX-M)上轻摇15 min,使细胞分泌的重组蛋白均匀分散到细胞液中。每孔取30 μ L细胞上清液作为待测样品,并向原孔补加30 μ L新鲜培养基,使每孔培养液总体积保持不变。使用 β -半乳糖苷酶检测试剂盒((Promega,货号E2000)测定样品中 β -Gal的酶活性。使用Phospha-Light试剂盒(Applied Biosystems,货号T1017)检测样品中SEAP的酶活性。检测使用的多功能酶标仪型号是赛默飞世尔科技有限公司的Varioskan Flash。

1.3.3 酶活性计算 每个细胞系3个平行对照与1个空白对照的酶活性记为S1、S2、S3以及C,计算S1-C、S2-C以及S3-C的平均值(Mean \pm Std.)作为重组蛋白在待测细胞中的表达量。使用Excel(Ver. 1710)以病毒侵染时间为横坐标,重组蛋白酶活性为纵坐标绘制直方图。使用SPSS(Ver. 19)对供试细

胞系表达的酶活性进行 t 检验,确定它们对重组蛋白的表达水平是否存在显著差异($P < 0.05$)。

1.4 细胞生物学特性研究

1.4.1 细胞形态学观察 使用Olympus IX71倒置生物显微镜进行观察并拍照,使用Adobe Photoshop CS6 Extended中的“计数工具”分别对每张照片中不同形态的细胞(分为圆形、梭形及多边形)进行计数统计,计算各细胞系不同形态细胞所占比例的平均值和标准差。使用Olympus CellSens图像分析软件对细胞系中圆形细胞的直径进行测量(梭形细胞计算长轴),每个细胞类型统计的样本数(n)不少于100个细胞,并计算其平均值和标准差。

1.4.2 细胞生长曲线绘制及倍增时间计算 取指数生长期的供试细胞,密度稀释至 2×10^5 个 \cdot mL⁻¹,接种于96孔细胞培养板(Corning,货号3997),每孔100 μ L细胞悬液。每个细胞系接种4孔,作为平行对照,共接种7板,置于27℃恒温避光培养。每隔24 h取1板进行细胞活力检测。使用普洛麦格生物产品有限公司的Cell Titer 96 Aqueous单溶液细胞增殖检测试剂盒(货号G3582)进行细胞活力检测,连续检测7天。使用Excel(Ver. 1710)以检测时间作为横坐标,活细胞吸光度值作为纵坐标绘制细胞密度随培养时间变化的生长曲线图,根据曲线走势确定细胞进入指数生长期阶段,再根据刘冰洁等^[16]所述公式计算细胞群体倍增时间。

1.4.3 核型分析 取指数生长期的供试细胞,根据Mitsubishi^[17]所述方法进行细胞固定制片,其中,低渗溶液KCl的浓度为0.6%。使用Nikon ECLIPSE E800生物显微镜进行观察并拍照,挑选染色体清晰且分散比较好的细胞样本进行染色体计数(样本数 ≥ 100),根据Yeh等^[18]所述方法进行统计分析。使用Photoshop(Ver. 13.0.1)中的“计数工具”对各细

胞系的染色体条数进行统计,每个细胞系统计的样本数(n)不少于100个细胞。使用SPSS(Ver. 19)对供试细胞系染色数量进行频数分析并绘制直方图以及正态曲线。使用SPSS(Ver. 19)对供试细胞系染色体数量进行 t 检验,确定它们是否存在显著差异($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 重组蛋白表达水平

由试验结果可以看出,RIRI-PaDe-2和RIRI-PaDe-2-C6均检测到重组 β -Gal和SEAP酶活性(图1、2),表明2种重组蛋白基因在RIRI-PaDe-2和RIRI-PaDe-2-C6细胞中得到了表达。从图1所列重组 β -Gal酶活性变化情况可见,克隆株RIRI-PaDe-2-C6在7个时间点表达的重组蛋白酶活性较原细胞系RIRI-PaDe-2都高接近1倍。在侵染AcMNPV-Gal后的96h供试细胞系及其克隆株对重组 β -Gal的表达量均达最高,此时对供试2个细胞系/株进行独立样本 t 检验(Independent-Sample T Test),结果显示:Levene方差齐性检验 $F = 1.928, P = 0.259 > 0.05$,认为2组方差相等, $t = 3.682, df = 3, P = 0.035 < 0.05$,说明克隆株RIRI-PaDe-2-C6对重组 β -Gal的表达水平显著高于原细胞系RIRI-PaDe-2,之后表达量呈缓慢降低的趋势。

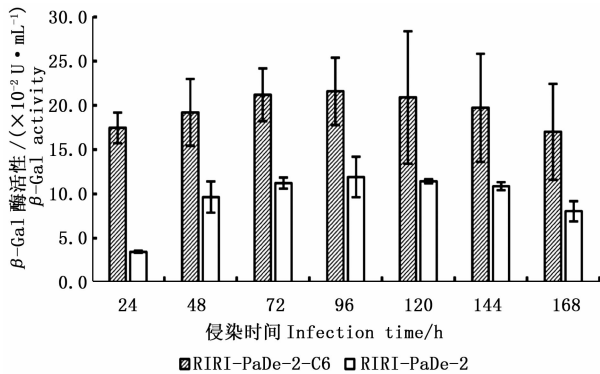


图1 重组 β -Gal酶活性随2个供试细胞系侵染AcMNPV-Gal后168h内变化直方图

Fig. 1 Histogram depicting the presence of recombinant β -Gal expressed by two insect cell lines at various time points after inoculation with AcMNPV-Gal during 168 h postinfection period

从图2所列重组SEAP酶活性变化情况可见,RIRI-PaDe-2对重组SEAP的表达量随AcMNPV-SEAP侵染时间增长而逐渐提高,到96h达到最大表达量,随后逐渐降低。克隆株RIRI-PaDe-2-C6对

重组SEAP的表达量在侵染病毒后的168h中均呈逐渐增加的趋势。虽然在24、48、72、96h检测重组SEAP酶活性较RIRI-PaDe-2的低,但之后的120、144、168h克隆株RIRI-PaDe-2-C6对重组SEAP的表达水平高于原细胞系RIRI-PaDe-2。对供试细胞系和克隆株的表达最高酶活性进行独立样本 t 检验,结果显示:Levene方差齐性检验 $F = 0.061, P = 0.821 > 0.05$,认为2组方差相等, $t = -0.766, df = 3, P = 0.499 > 0.05$,表明克隆株RIRI-PaDe-2-C6对重组SEAP的表达水平与原细胞系RIRI-PaDe-2接近。

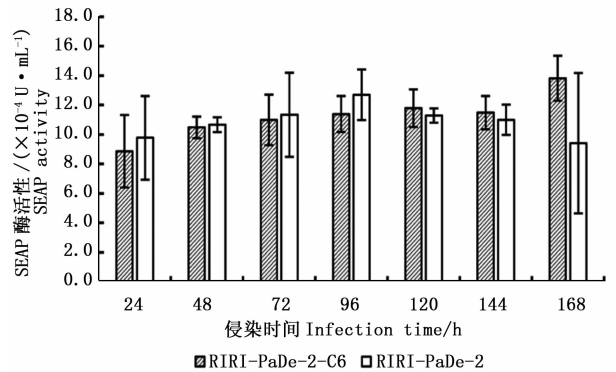


图2 重组SEAP酶活性随2个供试细胞系侵染AcMNPV-SEAP后168h内变化直方图

Fig. 2 Histogram depicting the presence of recombinant SEAP expressed by two insect cell lines at various time points after inoculation with AcMNPV-SEAP during 168 h postinfection period

2.2 生物学特征

2.2.1 细胞形态学观察 RIRI-PaDe-2的细胞类型组成为圆形和梭形(图3A),其中,圆形细胞所占比例最大,约占(83.87 \pm 4.07)% (平均值 \pm 标准差,下同),直径从11.43 ~ 26.99 μm 不等(样本 $n = 101$ 个细胞);其次是梭形占(16.13 \pm 4.07)%,长度从20.41 ~ 62.09 μm 不等($n = 100$),平均长度为(31.58 \pm 7.48) μm 。克隆株RIRI-PaDe-2-C6全部为梭形细胞(图3B),长度从16.06 ~ 45.29 μm 不等($n = 103$),平均长度为(27.83 \pm 5.53) μm (图3C)。比较2个细胞系的形态学特征发现,克隆株RIRI-PaDe-2-C6的细胞类型组成较原细胞系RIRI-PaDe-2简单,细胞的长度分布范围较原细胞系中的梭形细胞窄,且细胞平均长度小于原细胞系。

2.2.2 生长曲线及倍增时间 从克隆株RIRI-PaDe-2-C6的生长曲线走势(图4)可以辨别出:该克隆株指数生长期为细胞接种后第24h开始一直到

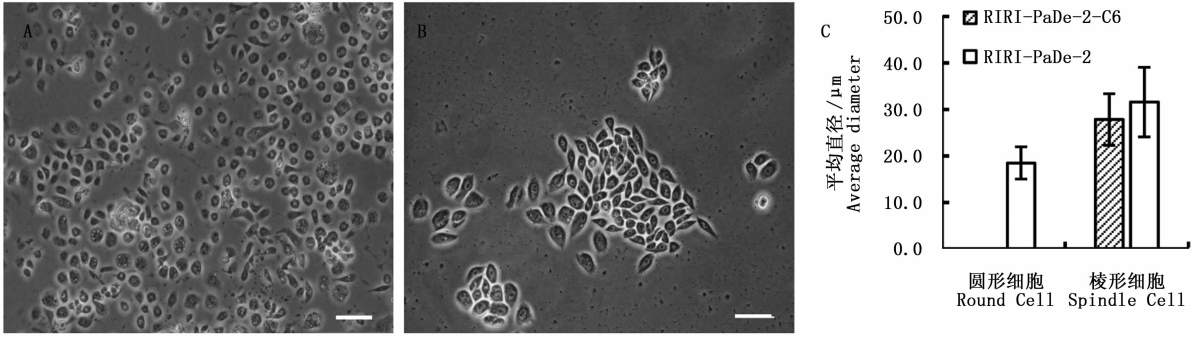


图3 细胞系 RIRI-PaDe-2 (A) 和克隆株细胞 RIRI-PaDe-2-C6 (B) 的形态照片 (比例尺为 50 μm), 以及圆形和梭形细胞在 2 个供试细胞系中的平均直径对比直方图 (C)

Fig. 3 Photomicrographs of cell line RIRI-PaDe-2 (A) and its cloning cell RIRI-PaDe-2-C6 (B)

(The scale is 50 μm), and histogram depicting the presence of average diameters of round and spindle cells in two insect cell lines (C)

第 144 h 为止。根据公式计算 RIRI-PaDe-2-C6 的细胞群体倍增时间为 94.94 h, 较原细胞系 RIRI-PaDe-2 的倍增时间 67.42 h 长。

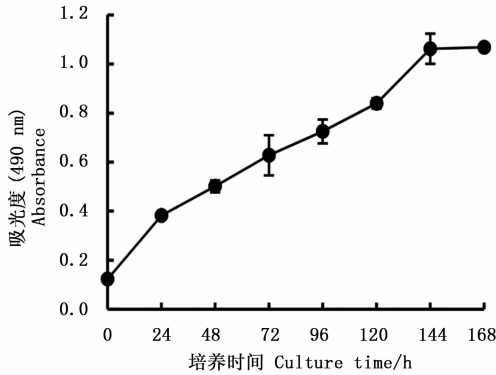


图4 RIRI-PaDe-2-C6 细胞生长曲线

Fig. 4 Growth curves of RIRI-PaDe-2-C6

2.2.3 核型分析 在 1 000 倍光学显微镜下观察

发现,达摩凤蝶细胞系的染色体呈点状聚集于核区,且数量众多,无法通过染色体形态进行辨认,只能进行数量统计分析。克隆株 RIRI-PaDe-2-C6 及其原细胞系 RIRI-PaDe-2 的染色体条数分布统计结果见图 5。从图 5 可以看出:2 个细胞系/株染色体数量均呈正态分布,其中,克隆株 RIRI-PaDe-2-C6 的平均染色体数目为(52.26 ± 30.48)条,RIRI-PaDe-2 的平均染色体数目为(73.19 ± 24.27)条,克隆株细胞染色体分布范围较原细胞系 RIRI-PaDe-2 窄,说明克隆株的细胞组成较原细胞系更单一。对这 2 个供试细胞系/株染色体数目进行独立样本 *t* 检验,结果显示:Levene 方差齐性检验 $F = 0.468, P = 0.494 > 0.05$,认为 2 组方差相等。 $t = 7.207, df = 361, P = 0.000 < 0.05$,说明细胞系 RIRI-PaDe-2 和它的克隆株 RIRI-PaDe-2-C6 的染色体数目存在显著差异。

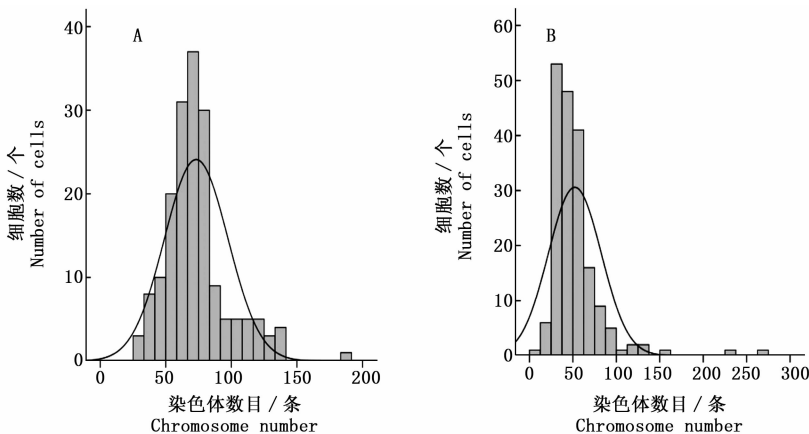


图5 达摩凤蝶细胞系 RIRI-PaDe-2 ($n = 176$) (A) 及其克隆株 RIRI-PaDe-2-C6 ($n = 187$) (B) 染色体数目分布 (n 为统计的细胞数)

Fig. 5 Chromosome number distribution in cell line RIRI-PaDe-2 ($n = 176$) (A) and its cloning cell RIRI-PaDe-2-C6 ($n = 187$) (B) developed from the neonate larvae of *Papilio demoleus* (n : sample size)

3 讨论

虽然经过30年的发展,IC-BEVS的各种技术不断进步,表达了多种蛋白,表达产量也得到了提高。但也有一些因素制约了IC-BEVS的进一步发展和应用,如昆虫细胞内N端糖基化途径与哺乳动物细胞不同。昆虫细胞内缺乏哺乳动物细胞所具备的N-乙酰葡萄糖氨转移酶II、半乳糖基转移酶/N-乙酰氨基半乳糖转移酶、 α -2,3-唾液酸转移酶和 α -2,6-唾液酸转移酶等延长N-糖链的糖基转移酶^[19-20],导致表达的部分哺乳动物蛋白无活性,限制了IC-BEVS在生产药用蛋白领域的应用。Palomares等^[21]对黑脉金斑蝶(*Danaus plexippus*)细胞系DpN1的糖基化研究发现,DpN1表达的重组蛋白糖基化程度较粉纹夜蛾(*T. ni*)细胞系Tn5B1-4更加完全,并认为它可以代替常见工程细胞系进行复杂糖基化蛋白的生产,因此,建立更多的蝶类细胞系和克隆株,开展外源基因在蝶类细胞中的表达特性研究很有意义。作为新建蝶类细胞系,达摩凤蝶细胞中外源蛋白的糖基化修饰水平尚未可知,本研究对达摩凤蝶细胞系RIRI-PaDe-2及其克隆株RIRI-PaDe-2-C6的外源蛋白表达特性进行研究,希望获得外源基因表达水平高的细胞系,为下一步达摩凤蝶细胞系的糖基化研究奠定基础。

从结果可以看出:通过单细胞克隆技术确实能够获得较原细胞系RIRI-PaDe-2表达水平更高的克隆株RIRI-PaDe-2-C6,但与IC-BEVS常用的宿主细胞系Sf9相比其表达水平仍较低。相同试验条件下Sf9表达重组 β -Gal和SEAP的最高酶活性分别为 $(4.132 \pm 0.942) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(4.196 \pm 0.923) \times 10^{-2} \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,较RIRI-PaDe-2-C6分别高出19和35倍,所以RIRI-PaDe-2-C6还无法作为IC-BEVS的工程细胞株用于生产。笔者推测造成这种结果的主要原因是达摩凤蝶并不是AcMNPV的天然宿主。自然界中杆状病毒具有高度的宿主特异性,一种病毒往往只能感染亲缘性较近的少数几种昆虫,但这种宿主特异性是相对的,每种病毒有一个原始宿主,但也往往可以感染若干替代宿主。一般来说,替代宿主对病毒的感受性较原始宿主低^[22]。AcMNPV的宿主域较广,能感染多种鳞翅目昆虫。正是这个原因使AcMNPV成为IC-BEVS最常用的载体而被用于构建重组病毒,在其敏感型宿主细胞内能够大量表达外源蛋白。由此可见,重组病毒表达载体的选

择是影响外源蛋白表达水平的重要因素。目前已知有多种方法可用于提高外源蛋白在IC-BEVS的表达水平,如共表达伴侣蛋白^[23-24]、开发转基因细胞^[25]、延长转染后宿主细胞寿命以及延缓重组蛋白降解^[26]等。这些基于细胞和病毒改造的生物技术为外源蛋白在IC-BEVS中高效表达提供了可能,但达摩凤蝶细胞系及其克隆株能否通过上述方法提高外源基因表达水平还待进一步研究。

4 结论

综上所述,达摩凤蝶细胞系RIRI-PaDe-2及其克隆株RIRI-PaDe-2-C6均能表达 β -半乳糖苷酶和分泌型碱性磷酸酶,通过单细胞克隆方法获得的克隆株RIRI-PaDe-2-C6对外源蛋白的表达水平与原细胞系RIRI-PaDe-2有一定区别,特别是对重组 β -Gal的表达水平显著高于原细胞系RIRI-PaDe-2($P < 0.05$)。在生物学特性方面,克隆株RIRI-PaDe-2-C6与原细胞系RIRI-PaDe-2-C6也存在明显差异,研究结果为后续改进驯化宿主细胞系和外源基因表达提供了可能和基础。

参考文献:

- [1] Hu Y C. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2005, 26(4): 405-416.
- [2] Sokolenko S, George S, Wagner A, et al. Co-expression vs. co-infection using baculovirus expression vectors in insect cell culture: Benefits and drawbacks[J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(3): 766-781.
- [3] Ikononou L, Schneider Y J, Agathos S N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62(1): 1-20.
- [4] Swiech K, Picanço-Castro V, Covas D T. Human cells: new platform for recombinant the rapetuc protein production[J]. Protein Expression and Purification, 2012, 84(1): 147-153.
- [5] van Oers M M, Pijlman G P, Vlak J M. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology[J]. The Journal of General Virology, 2015, 96(Pt 1): 6-23.
- [6] Vaughn J, Goodwin R, Tompkins G, et al. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal, 1977, 13(4): 213-217.
- [7] Smith G, Summers M, Fraser M J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector[J]. Molecular and Cellular Biology, 1983, 3(12): 2156-2165.
- [8] Hink W F. Established insect cell line from the Cabbage Looper,

- Trichoplusia ni*[J]. *Nature*, 1970, 226(5244): 466–467.
- [9] Granados R R, Guoxun L, Anja C G D, *et al.* A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1994, 64(3): 260–266.
- [10] Contreras-Gomez A, Sanchez-Miron A, Garcia-Camacho F, *et al.* Protein production using the baculovirus-insect cell expression system[J]. *Biotechnology Progress*, 2014, 30(1): 1–18.
- [11] Donaldson M S, Shuler M L. Effects of long-term passaging of BTI-Tn5B1-4 insect cells on growth and recombinant protein production [J]. *Biotechnology Progress*, 1998, 14(4): 543–547.
- [12] L ery X, Charpentier G, Bellonck S. DNA content analysis of insect cell lines by flow cytometry [J]. *Cytotechnology*, 1999, 29(2): 103–113.
- [13] 丁伟峰,冯颖,张欣,等. 四个达摩凤蝶新孵幼虫细胞系的建立及其生物学特性[J]. *昆虫学报*, 2015, 58(8): 826–835.
- [14] Zhang X, Feng Y, Ding W F, *et al.* Establishment and characterization of an embryonic cell line from *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigoniidae)[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal*, 2011, 47(4): 327–332.
- [15] Zhang X, Feng Y, Ding W F, *et al.* Characterization of a new insect cell line that is derived from the neonate larvae of *Papilio xuthus* (Lepidoptera: Papilionidae) and its susceptibility to AcNPV [J]. *Tissue and Cell*, 2012, 44(3): 137–142.
- [16] 刘冰洁,李小平,赵丽君,等. 人子宫内膜癌耐醋酸甲羟孕酮细胞株的建立[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2014, 15(4): 341–344.
- [17] Mitsuhashi J. Karyotype Analysis[M]// *Invertebrate Tissue Culture Methods*. Tokyo:Springer Japan, 2002: 321–323.
- [18] Yeh S, Lee S, Wu C, *et al.* A cell line (NTU-MV) established from *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Pyralidae): Characterization, viral susceptibility, and polyhedra production[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2007, 96(2): 138–146.
- [19] Shi X, Jarvis D L. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system [J]. *Current Drug Targets*, 2007, 8(10): 1116–1125.
- [20] Tomiya N, Narang S, Lee Y C, *et al.* Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines[J]. *Glycoconjugate Journal*, 2004, 21(6): 343–360.
- [21] Palomares L A, Joosten C E, Hughes P R, *et al.* Novel insect cell line capable of complex N-Glycosylation and sialylation of recombinant proteins [J]. *Biotechnology Progress*, 2003, 19(1): 185–192.
- [22] 刘丽华. 杆状病毒宿主域的研究进展[J]. *中国蚕业*, 2006, 27(2): 95–98.
- [23] Zhang L, Wu G, Tate C G, *et al.* Calreticulin promotes folding/dimerization of human lipoprotein lipase expressed in insect cells (Sf21) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(31): 29344–29351.
- [24] Fourneau J, Cohen H, van Ender P M. A chaperone-assisted high yield system for the production of HLA-DR4 tetramers in insect cells [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2004, 285(2): 253–264.
- [25] Kost T A, Condreay J P, Jarvis D L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(5): 567–575.
- [26] Ho Y, Lo H R, Lee T C, *et al.* Enhancement of correct protein folding in vivo by a non-lytic baculovirus[J]. *Biochemical Journal*, 2004, 382(Pt 2): 695–702.

(责任编辑:张玲)