

## 重组 hIL-12 病毒在 Sf9 细胞传代中遗传稳定性的研究\*

涂海军, 孟小林\*\*, 徐进平, 鲁伟, 王健

(武汉大学病毒研究所, 湖北武汉 430072)

## Study on Heredity Stability of a Recombinant Baculovirus Expressing Human

## Interleukin-12 in Sf9 Cells during Serial and Undiluted Passages

TU Hai-jun, MENG Xiao-lin\*\*, XU Jin-ping, LU Wei, WANG Jian

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** The strain purified from a baculovirus expressing recombinant human interleukin-12 by plaque selection was serially and undilutedly passaged up to 55<sup>th</sup> generation in *Spodoptera frugiperda* 9(Sf9) cells. Intracellular viral (ICV) DNAs were extracted from the infected Sf9 cells of P<sub>15</sub>, P<sub>25</sub>, P<sub>35</sub>, P<sub>45</sub>, P<sub>55</sub> generation of recombinant baculovirus. A 2.0kb DNA fragment including sequences of P35 cDNA, polyhedrin promoter, P10 promoter and P40 cDNA was amplified by PCR. The sequence analysis indicates that there is no mutation in 2.0kb nucleotide sequence during the P<sub>15</sub> to P<sub>35</sub> passages. However, the point mutation was detected at three nucleotide residue sites in P35 cDNA sequence (461T→C, 517A→G and 630C→T) and one nucleotide "T" was inserted between +1 position of polyhedrin promoter and the upstream of *Bam*H I recognizing site at P<sub>45</sub> generation. When passaging to P<sub>55</sub>, the insertional mutation (-136T-135), deletion mutation (-122T) and point mutation (-168G→T) happened in the P10 promoter cassette besides the above mutations. These results show that serial and undiluted passaging of engineering baculovirus can result in foreign gene mutation.

**Key words:** Human interleukin-12; Engineering baculovirus; Serial and undiluted passage; Heredity stability

**摘要:** 将含重组白细胞介素 12 (hIL-12) 的杆状病毒 (Ac-hIL12) 经空斑纯化后, 在草地贪夜蛾 Sf9 细胞中进行连续无稀释传代到 P<sub>55</sub> 代, 收集被 P<sub>15</sub>、P<sub>25</sub>、P<sub>35</sub>、P<sub>45</sub>、P<sub>55</sub> 代重组病毒感染的细胞, 抽提胞内病毒 (ICV) DNA。根据重组病毒构建的原理, 在 P35 cDNA 和 P40 cDNA 的 3' 末端设计一对引物进行 PCR, 扩增出了包括 P35 cDNA、Polyhedrin 启动子、P10 启动子和 P40 cDNA 序列在内的全长约 2.0kb 片段, 克隆至 T Vector 进行序列测定后发现, 在第 P<sub>15</sub>、P<sub>25</sub> 和 P<sub>35</sub> 代所扩增出的序列没有发生任何突变。但在 P<sub>45</sub> 代, P35cDNA 中就有 3 个碱基发生了点突变 (461T→C, 517A→G 以及 630C→T), Polyhedrin 启动子的 +1 位后插入了一个碱基 T, P40 cDNA 与 P10 启动子区 (230bp) 没有变化; 而第 P<sub>55</sub> 代除了以上碱基突变以外, P10 启动子区 -168 位的 G 替换突变为 T, -136 与 -135 位之间插入一个碱基 T, 以及 -122 位缺失一个碱基 T。以上结果表明杆状病毒在体外细胞连续传代过程中可导致外源基因本身的突变。

**关键词:** 人白细胞介素 12(hIL-12); 工程病毒; 连续无稀释传代; 遗传稳定性

**中图分类号:** S373

**文献标识码:** A

**文章编码:** 1003-5152(2004)02-0141-05

人白细胞介素 -12 (Human interleukin-12, hIL-12) 主要是由抗原提呈细胞产生的一种异二聚

体细胞因子, 能够显著增强 NK/LAK 细胞的杀伤活性, 促进特异性 CTL 细胞的应答能力, 诱导 T 细

收稿日期: 2003-10-28, 修回日期: 2003-11-18

\* 基金项目: 湖北省科技厅“十五”重点攻关项目 (2001AA304B05)

作者简介: 涂海军 (1975-), 男, 湖南籍, 硕士研究生, 从事生物分子制药及昆虫病毒分子生物学研究。

\*\* 通讯作者: 孟小林 (1956-), 男, 山东籍, 教授, 从事生物分子制药及昆虫病毒分子生物学研究。

Corresponding author. Tel: 027-87648217; E-mail: mx18@public.wh.hb.cn

胞和 NK 细胞大量分泌 IFN- $\gamma$ , 启动  $T_H0$  细胞向  $T_H1$  的发育<sup>[1,2]</sup>。hIL-12 是目前所发现的细胞因子中体内免疫活性细胞诱导调节作用最强且范围最广的一种细胞因子, 它参与机体的抗肿瘤、抗过敏、抗感染过程<sup>[3]</sup>。hIL-12 是由不具基因相关性的两个蛋白质亚基 P35 和 P40 通过二硫键相连构成的糖蛋白异二聚体<sup>[2]</sup>。

昆虫杆状病毒载体系统是一个很有应用价值的外源基因表达系统, 此系统具有表达水平高, 能够完成真核基因产物必要的翻译后加工与修饰, 使产物具有与天然产物相似的生物活性等优点。不过已有研究表明随着病毒在生物反应器中或在培养细胞中复制代数的增加病毒多角体数目会减少或外源蛋白产量会逐渐降低<sup>[4,5,10]</sup>。但表达外源蛋白的工程病毒在连续传代过程中是否会导致外源基因本身的突变, 还未见有关报道。本研究将本室构建好的, 在 Sf9 细胞中已传代 10 次的含 hIL-12 的重组病毒 Ac-hIL12 经空斑纯化后在体外细胞 Sf9 中进行无稀释连续传代, 抽提病毒基因组后, 通过 PCR 的方法扩增出包括 P35 cDNA, Polyhedrin 启动子, P10 启动子和 P40 cDNA 在内的共约 2.0kb 的片段, 克隆至 T-Vector 后进行序列测定和分析。随机追踪分析了重组病毒 Ac-hIL12 中 P35 cDNA 和 P40 cDNA 及 P10 和 Polyhedrin 启动子序列随着工程病毒在 Sf9 细胞中无稀释连续传代后的遗传稳定性。现将其结果报道如下:

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

草地贪夜蛾细胞 Sf9、重组病毒 Ac-hIL12、*E.coli* JM109 均为本室保存, pUCm-T Vector 购自上海 Sangon 公司, DNA 序列测定由上海开瑞公司完成。

### 1.2 试剂

胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、TC-100 培养基为 Gibco BRL 产品;  $T_4$  DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司产品; 限制性内切酶 *SphI* 和 *NcoI* 购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit 为 Omega 公司产品; PCR 引物由上海 Sangon 公司合成。

### 1.3 细胞培养

草地贪夜蛾 Sf9 细胞维持于添加了 10% FBS 的 TC-100 培养基中, 培养温度为 27 $^{\circ}$ C, 每 3~4d 传代一次。

### 1.4 重组病毒 Ac-hIL12 的空斑纯化

在每个 35mm 培养皿中接种  $1 \times 10^6$  个 Sf9 细胞, 27 $^{\circ}$ C 静置 1h。吸去培养皿中的培养基, 将 100 $\mu$ L 稀释至  $10^{-3} \sim 10^{-5}$  的病毒接种液分别小心加入培养皿, 将培养皿放在水平的台面上, 室温下放置 1h。融化 3% 的低熔点琼脂糖 (SeaPlaque), 将 1mL 2 $\times$ TC-100+20% FBS 与 1mL 3% 的低熔点琼脂糖均匀混合。病毒吸附细胞 1h 后, 吸去培养皿中的病毒接种物, 用无血清新鲜培养基漂洗细胞一次。每个培养皿加 2mL 凝胶混合物, 室温下 1h, 然后 4 $^{\circ}$ C 15min, 使凝胶凝固。加 100 $\mu$ L 完全培养基于凝胶表面, 将培养皿放在可保湿的盒中, 27 $^{\circ}$ C 保温 5~7d 至空斑形成。

### 1.5 Ac-hIL12 在 Sf9 中的连续无稀释传代

将约  $2 \times 10^6$  个 Sf9 细胞转移至 25cm<sup>2</sup> 的 Flask 细胞培养瓶中, 静置 1h 后, 吸去培养基, 将空斑纯化的 Ac-hIL12 约 1mL 病毒液对 Sf9 进行攻毒 1h, 吸去病毒接种液, 用无血清培养基轻微漂洗细胞一次, 然后将被感染的细胞培养在 5mL 添加了 10% FBS 的 TC-100 培养基中。3~4d 后, 从上代感染细胞中吸取 1mL 未稀释的上清液, 按同样的方法感染另一瓶 Sf9 细胞。从空斑实验中挑取的纯化的 Ac-hIL12 病毒株为 P<sub>0</sub> 代, 在 Sf9 细胞中无稀释连续传代至 P<sub>55</sub> 代。

### 1.6 Ac-hIL12 胞内病毒 (ICV) DNA 的抽提

从一个 25cm<sup>2</sup> 的 Flask 细胞培养瓶中收集被病毒感染 3~4d 后的细胞, 2000r/min 离心 10 min。3mL PBS 重悬细胞沉淀, 再离心一次。用 2mL 的细胞裂解缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, 400 mmol/L NaCl, 2mmol/L EDTA, pH8.0) 重悬细胞沉淀, 加入蛋白酶 K 至终浓度为 0.5mg/mL, 37 $^{\circ}$ C 过夜。加入 10% SDS 至终浓度为 1%, 37 $^{\circ}$ C 保温 2h, 苯酚-氯仿抽提 3 次, 加入十分之一体积的 3mol/L 乙酸钠溶液 (pH5.2), 2.5 倍体积的无水乙醇混匀后 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 2h。12000 r/min 离心 15 min, 75% 的乙醇洗涤一次, 室温自然风干, 用 TE 或水溶解, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.7 Ac-hIL12 中 2.0kb 片段的 PCR 扩增与克隆

根据 Ac-hIL12 的构建方法<sup>[5]</sup>设计如下引物: 上游引物 FP 为: 5'AGTGACGAGCTATCTGATGCTTCCTAA 3' 和下游引物 RP 为: 5'TGGA-TCCCTAACTGCAGGGCACAGATG3'。利用抽提的胞内病毒 (ICV) DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增的目的片段包括 660bp 的 P35 cDNA、365bp 的 P10 启动子与 Polyhedrin 启动子区序列、987bp 的 P40 cDNA 共约 2.0kb (图 1), 并将该片段克隆至

## pUCm-T Vector.

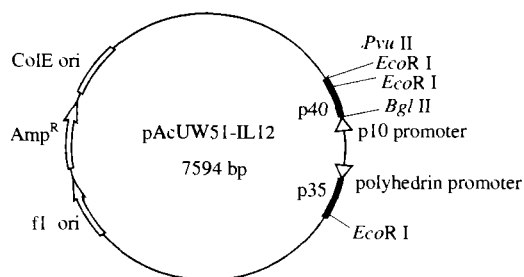


图 1 构建 Ac-hIL12 的 pAcUW51-IL12 结构示意图

Fig. 1 Map of organization recombinant plasmid pAcUW51-IL12 for constructing Ac-hIL12

## 1.8 DNA 序列的测定与分析

用 M13 通用引物对所克隆的片段进行序列测定, 由上海开瑞公司完成。利用 GeneDoc 软件对测定的 DNA 序列进行联配、分析和比较。Bioedit 软件和 Prosite 数据库对氨基酸序列进行分析。

## 2 结果

## 2.1 Ac-hIL12 中 2.0kb 片段的 PCR 扩增及其克隆

以抽提的第 P<sub>15</sub>、P<sub>25</sub>、P<sub>35</sub>、P<sub>45</sub>、P<sub>55</sub> 代 ICV DNA 为模板, 用 FP 和 RP 为一对引物扩增包括 P35 cDNA, Polyhedrin 启动子, P10 启动子和 P40cDNA 在内的总长约 2.0kb 的片段, 经琼脂糖电泳检测有一条 2.0kb 的特异条带, 与预期的相符 (图 2)。并将扩增得到的目的片段克隆至 pUCm-T Vector, 构建成重组质粒 pUCm-T/2.0。并用 T Vector 上的 *Sph*I 和 *Nco*I 的酶切位点进行了双酶切和单酶切鉴定 (图 2)。

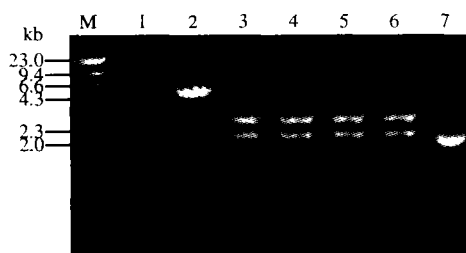


图 2 PCR 扩增和 pUCm-T/2.0 的酶切鉴定

Fig. 2 The PCR amplification of 2.0kb DNA fragment and restriction analysis of the pUCm-T/2.0

M. Lambda DNA/*Hind*III Marker; Lane 1, negative control of pUCm-T plasmid/*Sph*I+*Nco*I; Lane 2, the digestion of pUCm-T/2.0 plasmid with *Sph*I; Lane 3-6, the double restriction digestion of pUCm-T/2.0 plasmid with *Sph*I and *Nco*I; Lane 7, the PCR amplification of 2.0kb DNA fragment

## 2.2 2.0kb 片段的序列测定及其分析

将 PCR 扩增的 2.0kb 片段克隆至 pUCm-T Vector, 筛选到阳性克隆后进行序列测定。测序结果显示在我们进行病毒传代过程中 P40 cDNA 始终与原序列一致, 没有发生任何的突变; P35 cDNA 在第 P<sub>15</sub> 代、P<sub>25</sub> 代、P<sub>35</sub> 代与原序列一致, 但是当病毒在细胞中连续传代到 P<sub>45</sub> 代, 在该片段内部就开始有突变发生。在第 P<sub>45</sub> 代和 P<sub>55</sub> 代, P35 cDNA 在相同的 3 个碱基位点发生了替换突变, 其中第 461 位碱基由 T→C, 使第 154 位氨基酸由 Phe (TTT) →Ser (TCT), 第 517 位碱基由 A→G, 使第 173 位氨基酸由 Asn (AAC) →Asp (GAC); 而第 630 位碱基由 C→T, 没有改变第 210 位氨基酸 (GAC→GAT) (图 3)。P10 和 Polyhedrin 启动子区, 在第 P<sub>15</sub> 代、P<sub>25</sub> 代、P<sub>35</sub> 代都未见有突变发生。但是病毒传代到了 P<sub>45</sub> 代, 发现在 Polyhedrin 启动子的 5'UTR 区+1 位后, *Bam*HI 酶切位点前插入了一个碱基 T (图 4 B)。传代到第 P<sub>55</sub> 代, 启动子区的突变更加明显, 除了在第 P<sub>45</sub> 代已经发生的突变以外, 在 P10 启动子的转录起始位点的上游-168 位的 G 替换突变为 T, -136 位与-135 位之间插入一个碱基 T 和-122 位缺失一个碱基 T (图 4 A)。

## 3 讨论

本研究室利用杆状病毒 AcNPV 作为外源基因的表达载体已经构建成了含 hIL-12 P35 和 P40 两个蛋白质亚基基因的重组病毒 Ac-hIL12, 使 P35 亚基位于 Polyhedrin 启动子下游, P40 亚基位于 P10 启动子下游 (图 1)。并分别在草地贪夜蛾 Sf9 细胞和银纹夜蛾虫体中获得成功的表达<sup>[8]</sup>。为了跟踪重组病毒 Ac-hIL12 中外源基因 P35 cDNA 和 P40 cDNA 在草地贪夜蛾 Sf9 细胞传代过程中的遗传稳定性, 将重组病毒 AchIL-12 在草地贪夜蛾 Sf9 细胞中进行连续无稀释传代后, 收集被重组病毒感染细胞, 抽提感染细胞胞内病毒 (ICV) DNA。利用 FP 和 RP 为引物, 从重组病毒中扩增出了包括 P35 cDNA, Polyhedrin 启动子, P10 启动子和 P40 cDNA 序列在内的全长约为 2.0 kb 的 DNA 片段。经序列测定和分析比较, 结果表明: 工程病毒传代到第 P<sub>35</sub> 代, 外源基因 P35 cDNA 和 P40 cDNA 以及 P10 和 Polyhedrin 启动子序列都未发生突变; 传代到第 P<sub>45</sub> 代和 P<sub>55</sub> 代, P35 cDNA 中就有 3 个碱基发生了点突变 (图 3)。其中第 461 位碱基的突变使第 154 位氨基酸由 Phe (TTT) →Ser (TCT); 第 517 位碱基的突变使第 173 位氨基酸由 Asn (AAC)

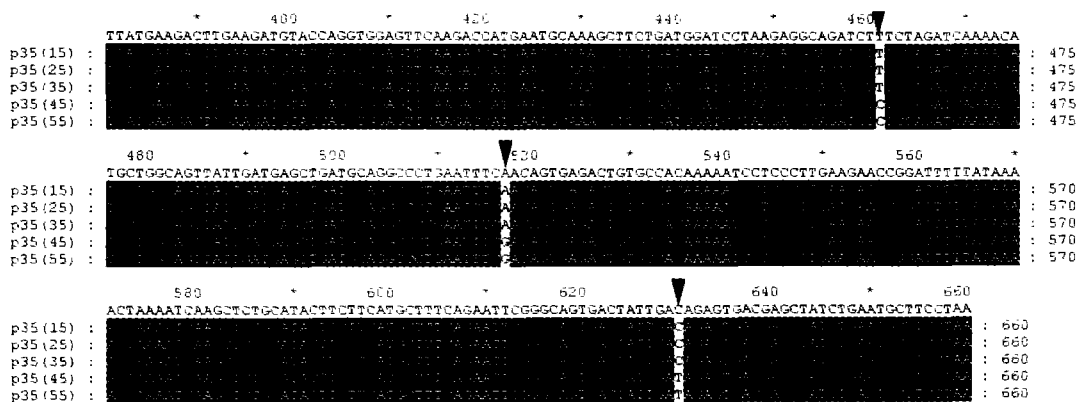


图 3 P35 cDNA 突变区域的序列分析

Fig. 3 The alignment result of P35 cDNA at the P<sub>15</sub>, P<sub>25</sub>, P<sub>35</sub>, P<sub>45</sub>, P<sub>55</sub> generation and sequence analysis of P35 cDNA mutation region. The thick triangular arrows indicate the mutation sites in P35 cDNA sequence: 461T→C results in Phe(TTT) to Ser(TCT); 517A→G also Asn(AAC) to Asp(GAC). 630 C→T is non-sense mutation.

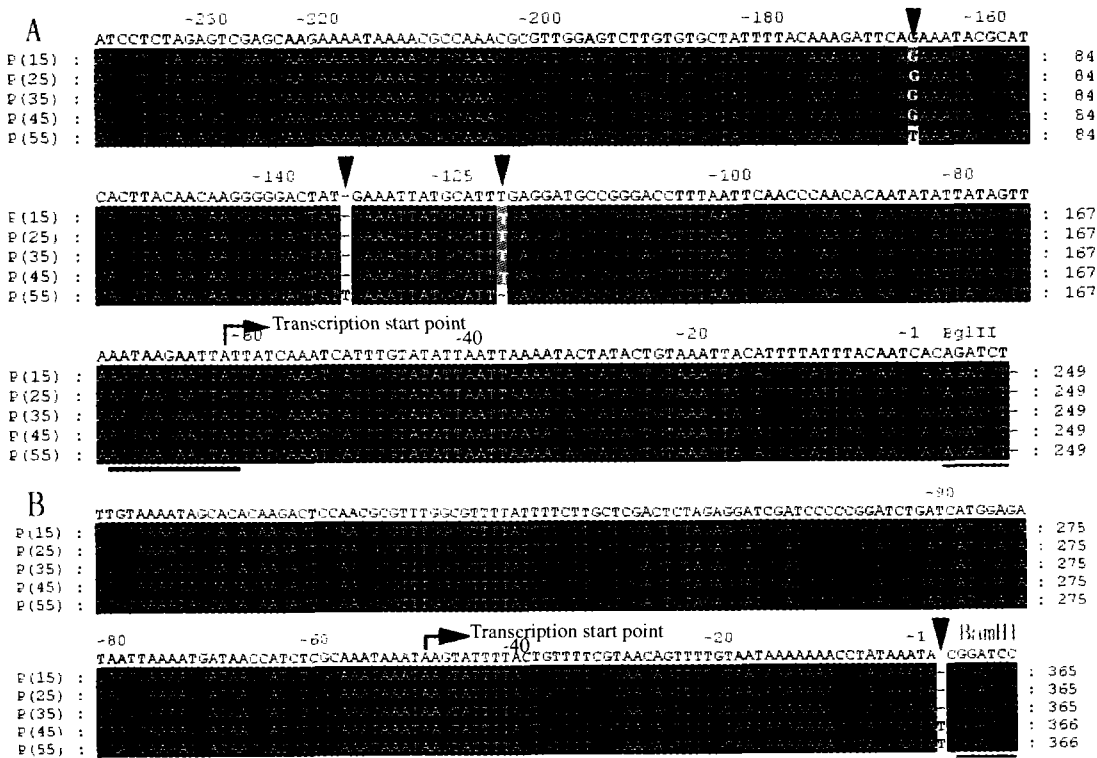


图 4 P10 和 Polyhedrin 启动子区突变序列分析

Fig. 4 Analysis of mutation nucleotides in P10 and Polyhedrin promoter cassettes

The bent arrows represent transcription start point and direction. The thick triangular arrows indicate the mutation sites. The thick underlines show the 12-nt key sequences for transcription of P10 and Polyhedrin promoter. The thin underlines show restriction enzyme recognizing sites of BamHI and BglII. (A) The alignment result of P10 promoter cassette of the P<sub>15</sub>, P<sub>25</sub>, P<sub>35</sub>, P<sub>45</sub>, P<sub>55</sub> generation; (B) The alignment result of Polyhedrin promoter cassette of the P<sub>15</sub>, P<sub>25</sub>, P<sub>35</sub>, P<sub>45</sub> and P<sub>55</sub> generation.

→Asp (GAC); 第 630 位碱基为无义突变。在 IL-12 的 P35 亚基氨基酸序列中, 苯丙氨酸 (Phe) 为非极性的疏水性 aa, 突变为极性的亲水性的丝氨酸 (Ser); 天冬酰胺 Asn 为不带电荷的极性 aa, 突变

成带负电荷的酸性天冬氨酸 (Asp)。从氨基酸的生化性质并应用 Bioedit 软件和 Prosite 数据库分析表明这些氨基酸序列的改变可能会使 P35 亚基的疏水性减弱, 而亲水性增强, 酸性增强, IL-12 的 pI 值

降低。但并没有改变在 P35 亚基上在 (93) Asn-Glu-Ser (95) 和 (107) Asn-Gly-Ser(109) 两个三肽序列中 Asn 的酰胺氮原子上进行了 N-连接的糖基化作用<sup>[11]</sup>, 对 P35 亚基 aa 序列中分子间和分子内二硫键的形成也没有明显的影响 (Peptidestructure 软件分析)。至于对其高级结构的形成及其功能的影响未能进一步研究与分析。在启动子序列中, Polyhedrin 启动子下游的+1 位与 BamH I 酶切位点之间插入了一个碱基 T。到第 P<sub>55</sub> 代, 除了 P35 cDNA 的 3 个点突变和 Polyhedrin 启动子的+1 位有一个插入突变外, 在 P10 启动子的转录起始位点的上游-168 位的 G 替换突变为 T, -136 位与-135 位之间插入一个碱基 T 和-122 位缺失一个碱基 T (图 4)。杆状病毒表达载体中常用的启动子一般为病毒复制非必需的晚期基因 Polyhedrin 的启动子和极晚期基因 P10 的启动子。研究表明他们都是晚期或极晚期强启动子, 在病毒感染晚期能够使外源基因获得高水平或超量表达, 并且它们具有相似的包含有 12nt 的转录起始的核心序列 AATAAGTATTT/AT, 而转录起始位点上游的 TATA box 和 CAAT box 的有无对转录的影响不大<sup>[12,13]</sup>。本研究中启动子区虽然发生了突变, 但并没有影响启动子的核心序列的结构 (图 4), 可能不会影响 Polyhedrin 启动子和 P10 启动子的强度与转录效率。

本研究的结果显示重组病毒 Ac-hIL12 在草地贪夜蛾 Sf9 细胞中进行连续无稀释传代过程中, 在 P<sub>35</sub> 代前, 其遗传是稳定的。但传代到 P<sub>45</sub> 代和 P<sub>55</sub> 代, 外源基因就会发生突变, 不利于外源基因的表达。已有研究表明杆状病毒在体外细胞连续传代过程中, 病毒基因组本身会发生变异或产生大量的缺损干扰颗粒 (DIPs)<sup>[10]</sup>, 导致滴度下降, 或外源蛋白表达量降低<sup>[4,5]</sup>。本研究证明还可能会导致外源基因本身的突变, 所以在利用杆状病毒表达外源基因时, 应尽量减少病毒的传代, 以避免外源蛋白表达量的下降和外源基因的变异。

## 参考文献

- [1] Kobayashi M, Fitz L, Ryan M. *et al.* Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes [J]. *J Exp Med*, 1989, 170: 827-46.
- [2] Wolf S F, Temple P A, Kobayashi M. *et al.* Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells [J]. *J Immunol*, 1991; 146: 3074-81.
- [3] Mario P. Colombo. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2002 (13): 155-168
- [4] Tramper J, Vlaskovits J M. Some engineering and economic aspects of continuous cultivation of insect cells for the production of baculoviruses [J]. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1986, 469: 279-288.
- [5] Burand J P, Summers M D. Alteration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA upon serial passage in cell culture [J]. *Virology*, 1982, 119: 223-229
- [6] Faulkner P. Baculovirus [A]. In: Pathogenesis of Invertebrate Microbial Disease [C]. Davidson E (ed). New York: Osmun & Co., 1981. 3-37
- [7] Mackinnon E A, Henderson J F, Stoltz D B. *et al.* Morphogenesis of nuclear polyhedrosis virus under conditions of prolonged passage in vitro [J]. *J Ultrastruct Res*, 1974, 49(3): 419-435
- [8] 徐进平, 孟小林, 王健, 等. 人白介素-12 在银纹夜蛾中的表达纯化及其生物活性 [J]. *中国病毒学*, 2002, 17(4): 340-343.
- [9] Krell P J. Passage effect of virus infection in insect cells [J]. *Cytotechnology*, 1996, 20: 125-137.
- [10] Kool M, Voncken J W. *et al.* Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutations with defective interfering properties [J]. *Virology* 1991, 183: 739-746.
- [11] Trinchieri G, Scott P. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions [J]. *Res. Immunol.* 1995, 146, 423-431.
- [12] Weyer U, Possee R D. Analysis of the promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus P10 gene [J]. *J Gen Virol*, 1989, 70: 203-208.
- [13] Possee R D & Howard S C. Analysis of the polyhedrin gene promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus [J]. *Nucl Acids Res*, 1987, 15: 10233-10248.