



(10) 申请公布号 CN 116218783 A
(43) 申请公布日 2023.06.06

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/135 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

[illegible]

1. 一种过表达HS3ST5基因的重组BHK-21细胞系,其特征在于,所述重组BHK-21细胞系过表达HS3ST5蛋白。

2. 根据权利要求1所述重组BHK-21细胞系,其特征在于,所述HS3ST5蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

3. 权利要求1或2所述重组BHK-21细胞系的构建方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 构建过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒;

2) 将步骤1)中所述过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒和辅助质粒共同转染细胞,拯救得到过表达HS3ST5基因的重组慢病毒;

3) 将所述过表达HS3ST5基因的重组慢病毒感染BHK-21细胞,经筛选得到稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞系。

4. 根据权利要求3所述构建方法,其特征在于,步骤1)中所述构建方法,用含Xba I和NotI酶切位点的引物扩增HS3ST5基因,得到的扩增片段和慢病毒载体pLOV-CMV-EGFP分别经Xba I和Not I双酶切,酶切片段和线性化载体连接,鉴定,得到过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒。

5. 根据权利要求4所述构建方法,其特征在于,含Xba I和Not I酶切位点的引物包括核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示的正向引物和核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示的反向引物。

6. 根据权利要求3~5任意一项所述构建方法,其特征在于,步骤3)中所述筛选的方法为采用嘌呤霉素进行筛选;

所述嘌呤霉素的浓度为4 μ g/mL。

7. 权利要求1或2所述重组BHK-21细胞系或权利要求3~6任意一项所述构建方法构建得到的重组BHK-21细胞系在增强病毒复制中的应用。

8. 权利要求1或2所述重组BHK-21细胞系或权利要求3~6任意一项所述构建方法构建得到的重组BHK-21细胞系在生产病毒疫苗中的应用。

9. 根据权利要求7或8所述应用,其特征在于,所述病毒包括包括利用HS受体入侵细胞的病毒。

10. 根据权利要求9所述应用,其特征在于,所述利用HS受体入侵细胞的病毒包括口蹄疫病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒和单纯疱疹病毒中的一种或几种。

一种过表达HS3ST5基因的重组BHK-21细胞系及其在增强病毒复制中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种过表达HS3ST5基因的重组BHK-21细胞系及其在增强病毒复制中的应用。

背景技术

[0002] 1961年,英国学者首次从1日龄叙利亚金仓鼠肾脏细胞分离并建立幼仓鼠肾细胞系(Babyhamsterkidney,BHK-21)。BHK-21细胞呈纤维样,可连续传代,是最常见的动物细胞类型之一。BHK-21细胞具有可悬浮培养、生长速度快、病毒敏感谱广等优点,被广泛应用于大规模制备病毒疫苗抗原。目前已有多种病毒利用BHK-21细胞繁殖,包括口蹄疫病毒(Food-and-mouth disease,FMDV)、日本乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus,JEV)、狂犬病毒(Rabies virus,RV)、新城疫病毒(Newcastle disease virus,NDV)和辛德毕斯病毒(Sindbis virus,SV)等。BHK-21细胞被驯化实现悬浮生长以来,在FMD疫苗生产领域应用最为广泛,是FMDV增殖的理想细胞系之一。现今也有利用BHK-21悬浮细胞大量表达重组蛋白而制备亚单位疫苗的报道。因此,BHK-21细胞在生物制品行业是一种较为重要的工程细胞,显示出巨大的应用潜力。为了提升该细胞的生产性能,利用不同策略对BHK-21细胞的改造在持续更新研究中。

[0003] 硫酸乙酰肝素(Heparan sulfate,HS)是一类线性硫酸化的生物大分子。功能性HS在生理条件下携带大量负电荷,通过弱相互作用识别并结合带正电荷的病毒粒子,增强病毒对宿主细胞的感染能力。因此HS可作为受体参与细胞与病毒粒子的相互作用,提高病毒的复制能力。HS已被证明能够辅助包括严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2,SARS-CoV-2)、I型单纯疱疹病毒(Herpes simplexvirus typel,HSV-1)和FMDV等多种病毒入侵细胞,显著提升病毒在宿主细胞上的增殖能力。硫酸基转移酶HS3ST5通过硫酸化反应修饰HS,从而形成3-O-硫酸化的HS,发挥调控HS生物学功能的作用。目前还没有稳定表达HS3ST5的BHK-21细胞系的报道,尚不清楚稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞是否能够增强以HS为受体的病毒的复制性能。

[0004] FMDV是一种经典的小RNA病毒,能够利用HS受体感染宿主细胞。FMDV通过识别并结合细胞膜表面的HS受体而吸附在宿主细胞上,随后在HS介导的内吞作用下进入宿主细胞内,起始病毒的复制。FMDV和HS互作研究多关注于不同FMD毒株和同一毒株上关键氨基酸残基对于HS的利用效率和能力。尚不清楚HS修饰酶HS3ST5对FMDV复制的影响。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种过表达HS3ST5基因的重组BHK-21细胞系,通过过表达HS3ST5基因的细胞系能够增强病毒复制,可大规模制备病毒疫苗抗原。

[0006] 本发明提供了一种过表达HS3ST5基因的重组BHK-21细胞系,所述重组BHK-21细胞系过表达HS3ST5蛋白。

- [0007] 优选的,所述HS3ST5蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。
- [0008] 本发明提供了所述重组BHK-21细胞系的构建方法,包括以下步骤:
- [0009] 1) 构建过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒;
- [0010] 2) 将步骤1)中所述过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒和辅助质粒共同转染细胞,拯救得到过表达HS3ST5基因的重组慢病毒;
- [0011] 3) 将所述过表达HS3ST5基因的重组慢病毒感染BHK-21细胞,经筛选得到稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞系。
- [0012] 优选的,步骤1)中所述构建方法,用含Xba I和Not I酶切位点的引物扩增HS3ST5基因,得到的扩增片段和慢病毒载体pLOV-CMV-EGFP分别经Xba I和Not I双酶切,酶切片段和线性化载体连接,鉴定,得到过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒。
- [0013] 优选的,含Xba I和Not I酶切位点的引物包括核苷酸序列如SEQ IDNO:3所示的正向引物和核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示的反向引物。
- [0014] 优选的,步骤3)中所述筛选的方法为采用嘌呤霉素进行筛选;
- [0015] 所述嘌呤霉素的浓度为4 μ g/mL。
- [0016] 本发明提供了所述重组BHK-21细胞系或所述构建方法构建得到的重组BHK-21细胞系在增强病毒复制中的应用。
- [0017] 本发明提供了所述重组BHK-21细胞系或所述构建方法构建得到的重组BHK-21细胞系在生产病毒疫苗中的应用。
- [0018] 优选的,所述病毒包括包括利用HS受体入侵细胞的病毒。
- [0019] 优选的,所述利用HS受体入侵细胞的病毒包括口蹄疫病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒和单纯疱疹病毒中的一种或几种。
- [0020] 本发明提供了一种过表达HS3ST5基因的重组BHK-21细胞系,所述重组BHK-21细胞系过表达HS3ST5蛋白。本发明以FMDV为病毒模型,测定重组BHK-21细胞系上FMDV的吸附和复制水平,结果显示稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞会促进FMDV的吸附和基因复制。可见BHK-21细胞过表达HS3ST5基因后可影响FMDV对细胞的吸附,促进FMDV的感染。又鉴于BHK-21细胞常常用来大规模制备病毒疫苗抗原,因此本发明提供的过表达HS3ST5基因的重组BHK-21细胞系为病毒疫苗抗原的制备提供了有效工具,为后续研究病毒感染和防治奠定了基础。

附图说明

- [0021] 图1为CHO-K1和BHK-21细胞的HS3ST5基因序列比对结果;
- [0022] 图2为HS3ST5基因扩增结果;
- [0023] 图3为带有EGFP标签的重组慢病毒质粒在HEK-293T细胞中的表达结果;
- [0024] 图4为单克隆重组BHK-21细胞株中EGFP的表达结果;
- [0025] 图5为BHK-HS3ST5-OE-1重组细胞株中HS3ST5蛋白表达分析结果;
- [0026] 图6为BHK-HS3ST5-OE-1重组细胞株中HS3ST5 mRNA水平检测结果;
- [0027] 图7为稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞对FMDV吸附的影响结果;
- [0028] 图8为稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞对FMDV复制的影响结果。

具体实施方式

[0029] 本发明提供了一种过表达HS3ST5基因的重组BHK-21细胞系,所述重组BHK-21细胞系过表达HS3ST5蛋白。

[0030] 在本发明中,所述HS3ST5蛋白的氨基酸序列优选如SEQ ID NO:2所示。

[0031] 本发明提供了所述重组BHK-21细胞系的构建方法,包括以下步骤:

[0032] 1) 构建过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒;

[0033] 2) 将步骤1)中所述过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒和辅助质粒共同转染细胞,拯救得到过表达HS3ST5基因的重组慢病毒;

[0034] 3) 将所述过表达HS3ST5基因的重组慢病毒感染BHK-21细胞,经筛选得到稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞系。

[0035] 本发明构建过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒。

[0036] 在本发明中,所述构建方法,优选含Xba I和Not I酶切位点的引物扩增HS3ST5基因,得到的扩增片段和慢病毒载体pLOV-CMV-EGFP分别经Xba I和Not I双酶切,酶切片段和线性化载体连接,鉴定后得到过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒。

[0037] 在本发明中,所述HS3ST5基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0038] 在本发明中,含Xba I和Not I酶切位点的引物优选包括核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示的正向引物和核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示的反向引物。所述扩增的反应体系优选如下:50℃反转录30min;94℃预变性5min;94℃变性1min,57℃退火1min,72℃延伸2.5min,循环35次;72℃再延伸10min。

[0039] 本发明对Xba I和Not I双酶切和连接的方法没有特殊限制,采用本领域所熟知的Xba I和Not I双酶切和连接的方法即可。所述鉴定的方法优选为载体测序,所述测序用引物核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示。

[0040] 得到过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒后,本发明将所述过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒和辅助质粒共同转染细胞,拯救得到过表达HS3ST5基因的重组慢病毒。

[0041] 在本发明中,所述共同转染细胞优选包括质量份的组分:10份重组慢病毒质粒、7.5份psPAX2辅助质粒、2.5份pMD2.G辅助质粒。所述共同转染细胞时转染试剂优选为Lipofectamine 2000。本发明对细胞的种类没有限制,采用本领域所熟知的细胞即可,在本发明实施例中,以HEK-293T细胞作为侵染细胞。

[0042] 得到重组慢病毒后,本发明将所述重组慢病毒感染BHK-21细胞,经筛选得到稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞系。

[0043] 在本发明中,所述重组慢病毒感染BHK-21细胞的方法优选为,将慢病毒液和完全细胞培养基按照1:1体积比混匀制成混合培养基,加入对数期的BHK-21细胞中,每隔24h更换依次混合培养基。

[0044] 在本发明中,所述筛选的方法优选为采用嘌呤霉素进行筛选。所述嘌呤霉素的浓度为4μg/mL。

[0045] 在本发明中,重组BHK-21细胞系优选包括验证。所述验证的方法优选包括RT-qPCR检测和Western Blot分析。在本发明实施例中,经过RT-qPCR检测,得到筛选的细胞系中HS3ST5 mRNA水平显著上升,说明成功构建得到过表达HS3ST5的重组细胞系。通过Western Blot分析,所述重组BHK-21细胞系第5和20代重组细胞系表达HS3ST5蛋白的水平无显著差

异,说明所述重组BHK-21细胞系能够稳定表达HS3ST5蛋白。

[0046] 在本发明中,稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞会促进FMDV的吸附和复制。

[0047] 本发明提供了所述重组BHK-21细胞系或所述构建方法构建得到的重组BHK-21细胞系在增强病毒复制中的应用。

[0048] 本发明提供了所述重组BHK-21细胞系或所述构建方法构建得到的重组BHK-21细胞系在生产病毒疫苗中的应用。

[0049] 在本发明中,所述病毒优选包括包括利用HS受体入侵细胞的病毒。所述利用HS受体入侵细胞的病毒包括口蹄疫病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒和单纯疱疹病毒中的一种或几种。在本发明实施例中,以口蹄疫病毒为例加以说明重组BHK-21细胞系在提高病毒复制中的应用。

[0050] 下面结合实施例对本发明提供的一种过表达HS3ST5基因的重组BHK-21细胞系及其在增强病毒复制中的应用进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0051] 实验材料和试剂来源说明

[0052] 1.细胞、质粒和病毒

[0053] BHK-21细胞源自中国典型培养物保藏中心,HEK-293T细胞源自中国典型培养物保藏中心, JM109感受态细胞购自TaKaRa公司, pMD2. G、psPAX2和pLOV-CMV-EGFP质粒购自Invitrogen公司,经典O型口蹄疫疫苗株O/HN/CHA/93 (Cathay)由中国国家口蹄疫参考实验室提供。

[0054] 2.主要试剂和仪器

[0055] 兔源HS3ST5多克隆抗体购自Novus公司,鼠源 β -actin单克隆抗体购自康为世纪公司, RNeasy Mini Kit购自Qiagen公司,磷酸盐缓冲液(PBS)购自BI生物公司,黄芪胶购于MP Biomedicals公司,高糖DMEM、MEM培养基、Lipofectamine 2000、Opti-MEM培养基和胰酶购自Invitrogen公司,胎牛血清(FBS)和嘌呤霉素购自Gibco公司,质粒小量提取试剂盒和质粒大量提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,慢病毒快速检测卡购自北京博奥龙免疫技术有限公司, ChamQ SYBR qPCR MasterMix购自诺唯赞公司。

[0056] 3.引物设计与合成

[0057] 根据NCBI上HS3ST5基因序列设计引物,通过RT-PCR扩增BHK-21细胞中的HS3ST5全长基因,设计上游引物为5'-ATGAAAAGCGTAGTAGTGATGAGT-3' (SEQ ID NO:3),下游引物为5'-TTAGGGCCAGTTCAATGTCCTCCCAGTGAT-3' (SEQ ID NO:4)。RT-qPCR试验扩增HS3ST5基因片段的上游引物序列为5'-CCATTGCCCCTGTTGAAAGCC-3' (SEQ ID NO:6),下游引物序列为5'-CCGGAATTCATGCAGCAGAC-3' (SEQ ID NO:7);内参基因GAPDH的上游引物序列为5'-CAAGAAGGTGGTGAAGCA-3' (SEQ ID NO:8),下游引物序列为5'-AAGTGAAGAGTGAGTGTC-3' (SEQ ID NO:9)。RT-qPCR试验扩增FMDV 3D基因的上游引物序列为5'-ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA-3' (SEQ ID NO:10),下游引物序列为5'-GCGAGTCCTGCCACGACGGA-3' (SEQ ID NO:11)。以上引物均由金唯智生物技术公司合成。

[0058] 实施例1

[0059] BHK-21细胞中HS3ST5基因的扩增

[0060] 利用上述设计合成的引物扩增BHK-21细胞中HS3ST5基因。PCR反应体系如表1,反

应条件如下:50℃反转录30min;94℃预变性5min;94℃变性1min,57℃退火1min,72℃延伸2.5min,循环35次;72℃再延伸10min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后进行DNA琼脂糖凝胶回收,回收产物送至金唯智生物技术公司测序。

[0061] 表1RT-PCR体系

	组分	体积
	2× One Step Buffer	25 μL
	PrimeScript One Step Enzyme Enzyme	1 μL
[0062]	RNA	4 μL
	上游引物 HS3ST5 (+)	1 μL
	下游引物 HS3ST5 (-)	2 μL
	水	至 50 μL

[0063] BHK-21细胞中HS3ST5基因的扩增结果:

[0064] 以提取的BHK-21细胞基因组为模板,利用设计的引物扩增HS3ST5全长基因。琼脂糖凝胶电泳结果显示成功扩增出BHK-21细胞中的HS3ST5基因。电泳图如图1,扩增产物条带大小1000bp左右。将目的条带胶回收后送至公司测序,序列测定结果显示BHK-21中的HS3ST5基因序列长度为1038nts,而之前测定的CHO-K1中的HS3ST5基因序列长度为981nts。

[0065] 利用Megaalign软件进一步对BHK-21和CHO-K1细胞的HS3ST5进行序列比对,发现两种细胞中HS3ST5基因序列具有明显差异。

[0066] 结果如图2所示,相较于BHK-21细胞中的HS3ST5基因,CHO-K1细胞中的HS3ST5基因在N端连续缺失46nts,提示两种细胞中HS3ST5基因的功能可能具有差异。

[0067] 实施例2

[0068] 过表达BHK-21细胞源HS3ST5重组慢病毒质粒的构建

[0069] 慢病毒载体pLOV-CMV-EGFP经Xba I和NotI酶切,回收8000bp的片段。将回收片段和HS3ST5扩增片段连接而构建重组慢病毒质粒,重组质粒命名为pLOV-EGFP-BHK-HS3ST5。pLOV-EGFP-BHK-HS3ST5质粒经琼脂糖凝胶电泳鉴定,将阳性质粒送至金唯智生物技术公司进行测序,测序引物为:5'-CGGTGAATGCTGGTGGCATC-3' (SEQ ID NO:5)。大量提取鉴定正确的阳性重组质粒以及辅助质粒pMD2.G和psPAX2。

[0070] HS3ST5重组慢病毒质粒的构建及鉴定结果:

[0071] 将pLOV-CMV-EGFP载体用Xba I和Not I双酶切,琼脂糖凝胶电泳观察到2条片段,回收8000bp片段,并与BHK-21细胞源HS3ST5的扩增片段进行连接。连接产物经琼脂糖凝胶电泳初步鉴定后,将阳性克隆送测进行鉴定,结果表明成功构建重组慢病毒质粒pLOV-EGFP-BHK-HS3ST5。将测序正确的阳性质粒大提留存备用。

[0072] 实施例3

[0073] 1. 过表达HS3ST5重组慢病毒的拯救

[0074] 将正常的HEK-293T细胞铺在10cm的细胞培养皿中,细胞状态良好且密度长至70%时,利用Lipofectamine 2000转染试剂进行质粒转染(10μg重组慢病毒质粒+7.5μg psPAX2辅助质粒+2.5μg pMD2.G辅助质粒)。6h后往细胞培养皿中轻轻加入4ml的高糖DMEM完全培

培养基,放置37℃培养箱中培养,期间利用荧光显微镜多次观察转染细胞的绿色荧光强度,48h后收取细胞上清液并用0.45μm滤器过滤。使用慢病毒快速检测卡测定上清液中慢病毒的滴度,过滤后的慢病毒液放至-40℃冰箱储存备用。

[0075] 2. 嘌呤霉素筛选浓度的确定

[0076] 将BHK-21细胞平铺至六孔板中,细胞密度长至90%后,分别加入浓度为1、2、3、4、5和6μg/mL的嘌呤霉素处理细胞,每隔24h重新加药处理。7d后观察六孔板细胞存活情况,无细胞存活的最低药物浓度即为嘌呤霉素筛选的最佳浓度。

[0077] 3. 稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞系的构建

[0078] 将慢病毒液和完全细胞培养基按照1:1体积混匀制成混合培养基,将正常的BHK-21铺在六孔板中,用混合培养基进行培养。待细胞长满六孔板后,转至细胞培养瓶中,继续加入混合培养基培养,期间每隔24h更换一次混合培养基。7d后利用荧光显微镜观察细胞经慢病毒感染后的绿色荧光程度。用最佳浓度的嘌呤霉素处理慢病毒感染后的细胞,每隔24h更换带有嘌呤霉素的完全培养基。7d后存活的BHK-21细胞几乎均为携带重组慢病毒质粒的重组细胞。把过表达HS3ST5的重组BHK-21细胞计数后稀释成单个细胞加入到96孔板中,待细胞长成一团后,用显微镜观察是否为单个克隆。细胞长满后,对单克隆重组细胞进行扩大培养和冻存,并通过Western Blot和实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测单克隆重组细胞中HS3ST5的表达水平。Western Blot试验使用的一抗为兔源HS3ST5多克隆抗体和鼠源β-actin单克隆抗体,使用的二抗为HRP标记的山羊抗小鼠IgG和HRP标记的山羊抗兔IgG。RT-qPCR方法的反转录体系见表2,反转录程序为37℃15min,85℃5s。RT-qPCR方法的扩增体系见表3,扩增反应程序为95℃30s预变性;95℃5s,60℃30s,72℃30s,40个循环;95℃15s,60℃1min,95℃30s,60℃15s。利用ΔΔCT法计算HS3ST5的相对mRNA拷贝数。

[0079] 表2HS3ST5的RT-qPCR反转录体系

[0080]	成分	体积
	RNA	(1000/浓度) μL
	5×RFMix	4 μL
	水	至 20 μL

[0081] 表3HS3ST5的RT-qPCR的扩增体系

[0082]	成分	体积
	2×TB Green Premix EX Taq	10 μL
	cDNA	2 μL
	上游引物	0.4 μL
	下游引物	0.4 μL
	ROX Dye	0.4 μL
[0083]	水	6.8 μL

[0083] 稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞系的建立及鉴定结果:

[0084] 将阳性重组慢病毒质粒pLOV-EGFP-BHK-HS3ST5转染HEK-293T细胞,48h后用荧光显微镜观察细胞是否发出绿色荧光。结果如图3所示,荧光显微镜下可观察到转染细胞中产生较强的绿色荧光。由于重组慢病毒质粒携带EGFP蛋白标签,EGFP蛋白在HEK-293T细胞中的成功表达说明重组慢病毒质粒成功转染进HEK-293T细胞,表明过表达重组慢病毒拯救成功。用梯度浓度的嘌呤霉素处理BHK-21细胞,观察到BHK-21细胞经过最小浓度为4 μ g/mL的嘌呤霉素筛选一周后,细胞全部死亡。因此确定筛选BHK-21重组细胞系的最佳嘌呤霉素浓度为4 μ g/mL。

[0085] BHK-21细胞经成功拯救的重组慢病毒感染和最佳浓度的嘌呤霉素筛选后,用荧光显微镜观察细胞是否发出绿色荧光。结果如图4所示,荧光显微镜观察到重组慢病毒感染的BHK-21细胞发出较强的绿色荧光,说明重组慢病毒成功感染BHK-21细胞,表明过表达HS3ST5的重组BHK-21细胞系初步构建成功。构建的重组细胞系命名为BHK-HS3ST5-OE,从重组细胞系中挑选3个荧光较强的单克隆细胞株冻存留用。

[0086] 选取BHK-HS3ST5-OE-1进行HS3ST5蛋白和mRNA表达水平的验证。结果如图5所示,Western Blot结果显示与正常BHK-21细胞相比,重组细胞株BHK-HS3ST5-OE-1中HS3ST5蛋白水平显著上升。

[0087] RT-qPCR结果如图6所示,与正常BHK-21细胞相比,BHK-HS3ST5-OE-1中HS3ST5 mRNA水平显著上升。以上结果表明稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞系建立成功。

[0088] 实施例4

[0089] 稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞对FMDV吸附的影响

[0090] 通过检测FMDV 3D mRNA表达水平评价重组BHK-21细胞对FMDV吸附的影响。先对细胞进行计数,加入感染剂量(MOI)为1的4 $^{\circ}$ C预冷FMDV,4 $^{\circ}$ C放置2h使FMDV充分吸附细胞,再用4 $^{\circ}$ C预冷的PBS缓冲液洗去未吸附的FMDV,随后加入RNA裂解液,收取样品后提取RNA,用RT-qPCR方法检测吸附至细胞表面FMDV的3D mRNA水平。RT-qPCR方法的反转录体系见表4,反转录程序为37 $^{\circ}$ C 15min,85 $^{\circ}$ C 5s。RT-qPCR方法的扩增体系见表5,扩增反应程序为95 $^{\circ}$ C 30s预变性;95 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,40个循环;95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 1min,95 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 15s。利用 $\Delta\Delta$ CT法计算FMDV 3D的相对mRNA拷贝数。

[0091] 表4FMDV 3D的RT-qPCR反转录体系

[0092]	成分	体积
	RNA	(1000/浓度) μ L
	5 $\times$ RFMix	4 μ L
	水	至20 μ L

[0093] 表5FMDV 3D的RT-qPCR的扩增体系

[0094]	成分	体积
	2 $\times$ TB Green Premix EX Taq	10 μ L
	cDNA	2 μ L
	上游引物	0.4 μ L
	下游引物	0.4 μ L
	ROXDye	0.4 μ L
	水	6.8 μ L

[0095] 结果:

[0096] 利用RT-qPCR试验检测BHK-HS3ST5-OE-1重组细胞对FMDV吸附的影响。结果如图7所示,相对于正常BHK-21细胞,稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞中的FMDV mRNA水平显著提高,BHK-HS3ST5-OE-1中病毒mRNA水平是对照细胞中的3.5倍,表明稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞有利于FMDV的吸附。

[0097] 实施例5

[0098] 稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞对FMDV复制的影响

[0099] 用MOI为1的病毒接种重组BHK-21细胞,置于37℃培养箱,分别在4、6、8、10、12和16h后加入RNA裂解液收取样品。提取RNA,用RT-qPCR方法检测FMDV的复制水平。

[0100] 结果:

[0101] 利用RT-qPCR试验检测BHK-HS3ST5-OE-1重组细胞对FMDV基因复制的影响。结果如图8所示,对于所有时间点样品,相较于正常BHK-21细胞,稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞中的FMDV mRNA水平显著提高。BHK-HS3ST5-OE-1重组细胞和正常BHK-21细胞中的FMDV mRNA水平在12h样品中达到峰值,此时BHK-HS3ST5-OE-1中的FMDV mRNA水平是对照细胞中的1.8倍。上述结果说明稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞提高了FMDV的复制水平。

[0102] 由上述实施例可知,通过RT-PCR技术扩增获得BHK-21细胞内的HS3ST5基因,克隆到pLOV-CMV-EGFP载体中从而构建出重组慢病毒质粒,再利用脂质体转染技术使重组慢病毒质粒pLOV-EGFP-BHK-HS3ST5与辅助质粒pMD2.G和psPAX2转染进入HEK-293T细胞,收获HEK-293T细胞包装出的慢病毒,然后感染BHK-21细胞,嘌呤霉素持续筛选10d后获得表达HS3ST5的重组BHK-21细胞系,通过有限稀释法和绿色荧光强度观察筛选出稳定表达HS3ST5的单克隆重组BHK-21细胞株。

[0103] 利用建立的稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞,以FMDV为病毒模型,测定重组BHK-21细胞上FMDV的吸附和复制的影响。结果显示稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞能够促进FMDV的吸附和复制。因此,稳定表达HS3ST5的重组BHK-21细胞明显提高了FMDV的复制能力。

[0104] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

```

AT GCT ATT T CAAACAGCAGGT GT GGT GAGACAGAAAGCT CCT GGT ACT GGGAAAGCGT T GT CGT T GT GAGT T T GT GT GT CT T T GCCAGAGT T GGGAGCT T GGT AGGT CCAGCCCAT T T GCCCT GT T GAAAGCCG
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
AT GCT ATT T CAAACAGCAGGT GT GGT GAGACAGAAAGCT CCT GGT ACT GGGAAAGCGT T GT CGT T GT GAGT T T GT GT GT CT T T GCCAGAGT T GGGAGCT T GGT AGGT CCAGCCCAT T T GCCCT GT T GAAAGCCG
T CAGGCT GAGT T GCCACT CCGAGCCCT GCAGT T T AAGAGAGGT CT GCT GCAT GAAT T CCGGAAGGGCAACT CT T CCAAGGAGCAGGT T GCCTT CCAT GACCT GGT CCAGCAGCT CCCCAGGCCAT T AT CAT CGGGG
140 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290
T CAGGCT GAGT T CCGACT CCGAGCCCT GCAGT T T AAAAGAGGT CT GCT GCAT GAAT T CCGGAAGGGCAACT CT T CCAAGGAGCAGGT T GCCTT CCAT GACCT GGT CCAGCAGCT CCCCAGGCCAT T AT CAT CGGGG
T CAGGCT GAGT T CCGACT CCGAGCCCT GCAGT T T AAAAGAGGT CT GCT GCAT GAAT T CCGGAAGGGCAACT CT T CCAAGGAGCAGGT T GCCTT CCAT GACCT GGT CCAGCAGCT CCCCAGGCCAT T AT CAT CGGGG
GGGCCCT GCT AGAGAT GT T GAACCT GCAT CCT GCAGT GGT CAAAGCT T CT CAAGAGAT CCACT T CT T T GACAAT GAT GAGAAT AT GCCAAGGGT AT T GAGT GGT ACAGGAAAAAGAT GCCT T T T CCT ACCCT CAG
320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440
GGGCCCT GCT AGAGAT GT T GAACCT GCAT CCT GCAGT GGT CAAAGCT T CT CAAGAGAT CCACT T CT T T GACAAT GAT GAGAAT AT GCCAAGGGT AT T GAGT GGT ACAGGAAAAAGAT GCCT T T T CCT ACCCT CAG
GGGCCCT GCT AGAGAT GT T GAACCT GCAT CCT GCAGT GGT CAAAGCT T CT CAAGAGAT CCACT T CT T T GACAAT GAT GAGAAT AT GCCAAGGGT AT T GAGT GGT ACAGGAAAAAGAT GCCT T T T CCT ACCCT CAG
AGCCCGGCTT AT T T CAT CACAGAAAGGT T CCGAAAGGAT T T AAAAAAT GAAT CAT CCAAT CAAGCT GT T GAT CAT T GT CAGGAGGCCGACCACACGAGCGAT T T CT GAT T ACAT CAGGT GCT AGAGGGGAAGGA
470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
AGCCCGGCTT AT T T CAT CACAGAAAGGT T CCGAAAGGAT T T AAAAAAT GAAT CAT CCAAT CAAGCT GT T GAT CAT T GT CAGGAGGCCGACCACACGAGCGAT T T CT GAT T ACAT CAGGT GCT AGAGGGGAAGGA
AGCCCGGCTT AT T T CAT CACAGAAAGGT T CCGAAAGGAT T T AAAAAAT GAAT CAT CCAAT CAAGCT GT T GAT CAT T GT CAGGAGGCCGACCACACGAGCGAT T T CT GAT T ACAT CAGGT GCT AGAGGGGAAGGA
CT AT AAGT T T GAGAAGCT AGCCAT AGACCTT AAT ACCT GCGAGGT GAACACGAAAT ACAAGGCGT T AGGACCAGCAT CT ACACGAAGCAT CT GGAGCGCT GGT GAGT ACT T T CCAAT T GAACAGT T CCACAT CG
630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750
CT AT AAGT T T GAGAAGCT AGCCAT AGACCTT AAT ACCT GCGAGGT GAACACGAAAT ACAAGGCGT T AGGACCAGCAT CT ACACGAAGCAT CT GGAGCGCT GGT GAGT ACT T T CCAAT T GAACAGT T CCACAT CG
CT AT AAGT T T GAGAAGCT AGCCAT AGACCTT AAT ACCT GCGAGGT GAACACGAAAT ACAAGGCGT T AGGACCAGCAT CT ACACGAAGCAT CT GGAGCGCT GGT GAGT ACT T T CCAAT T GAACAGT T CCACAT CG
T CACCGAGCT CT GCGGAACT ACAGCT CGT GGAGAAAT T CT T AAACCT T CCT CCGAGGAT AAGT CAGT ACAAT T T AT T T CAAT GCT ACCAGAGGGT T T T ACT GT T T GCGAT T T AACAT T AT CT T T AAT AAGT GC
760 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910
T CACCGAGCT CT GCGGAACT ACAGCT CGT GGAGAAAT T CT T AAACCT T CCT CCGAGGAT AAGT CAGT ACAAT T T AT T T CAAT GCT ACCAGAGGGT T T T ACT GT T T GCGAT T T AACAT T AT CT T T AAT AAGT GC
T CACCGAGCT CT GCGGAACT ACAGCT CGT GGAGAAAT T CT T AAACCT T CCT CCGAGGAT AAGT CAGT ACAAT T T AT T T CAAT GCT ACCAGAGGGT T T T ACT GT T T GCGAT T T AACAT T AT CT T T AAT AAGT GC
T CACCGAGCT CT GCGGAACT ACAGCT CGT GGAGAAAT T CT T AAACCT T CCT CCGAGGAT AAGT CAGT ACAAT T T AT T T CAAT GCT ACCAGAGGGT T T T ACT GT T T GCGAT T T AACAT T AT CT T T AAT AAGT GC
CGCAT CCAT CCAGAGGT AGACCCCT CT GT CGT T ACCAAAT T GCGCAAT T CT T T CAT CCT T T AAT CAAAAAT T T T ACCAGAT CACT GGGAGGACAT T GAAT GGGCCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060
CGCAT CCAT CCAGAGGT AGACCCCT CT GT CGT T ACCAAAT T GCGCAAT T CT T T CAT CCT T T AAT CAAAAAT T T T ACCAGAT CACT GGGAGGACAT T GAAT GGGCCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
CGCAT CCAT CCAGAGGT AGACCCCT CT GT CGT T ACCAAAT T GCGCAAT T CT T T CAT CCT T T AAT CAAAAAT T T T ACCAGAT CACT GGGAGGACAT T GAAT GGGCC

```

图1

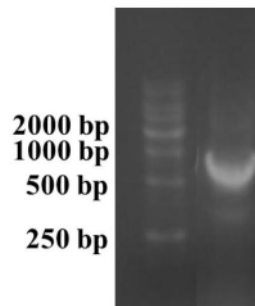
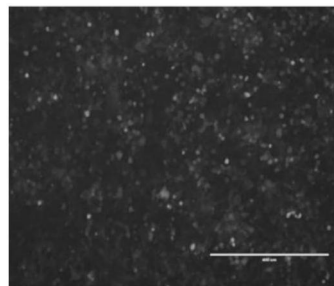


图2



pLOV-EGFP-BHK-HS3ST5

图3

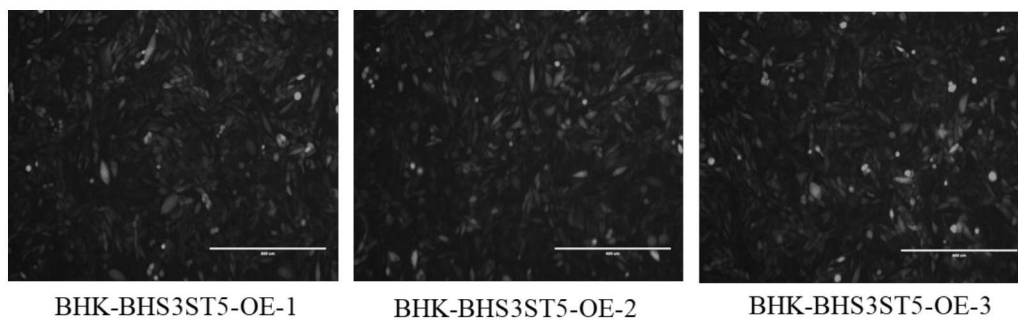


图4



图5

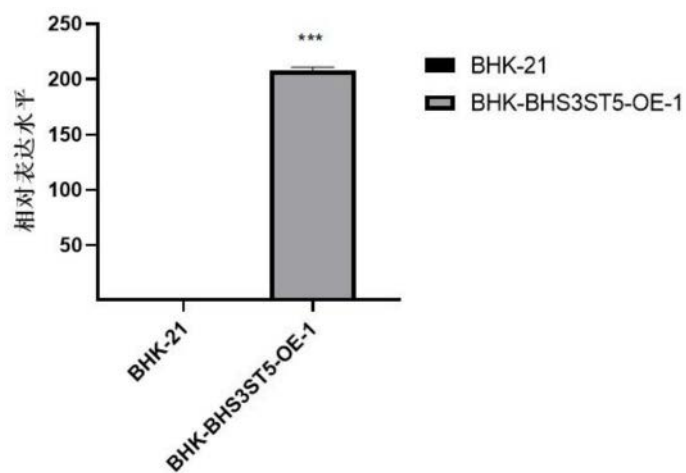


图6

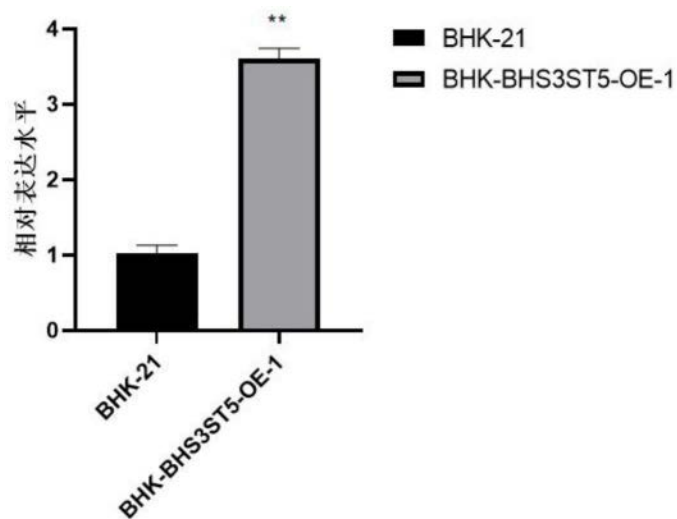


图7

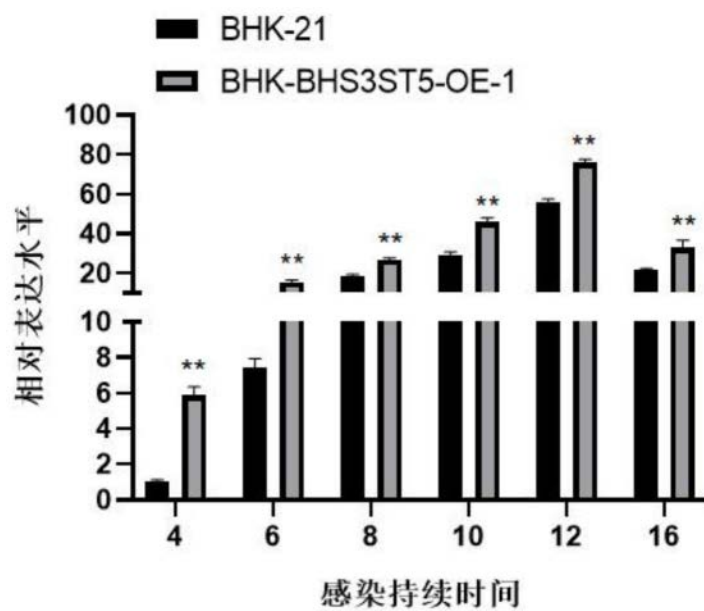


图8