



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116144707 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 23

(21) 申请号 202211248062.5

C12N 5/10 (2006.01)

(22) 申请日 2022.10.12

C12N 7/00 (2006.01)

C12R 1/93 (2006.01)

(71) 申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所

地址 730070 甘肃省兰州市盐场堡徐家坪1号

(72) 发明人 白兴文 卢曾军 袁红 黄磊
宫晓华 刘在新 包慧芳 李平花
孙普 李冬 马雪青 陈应理
曹轶梅 付元芳 张婧 邓欣雨
焦云娟 王利豪 杨宇轩

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
专利代理师 薛红凡

(51) Int.Cl.

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

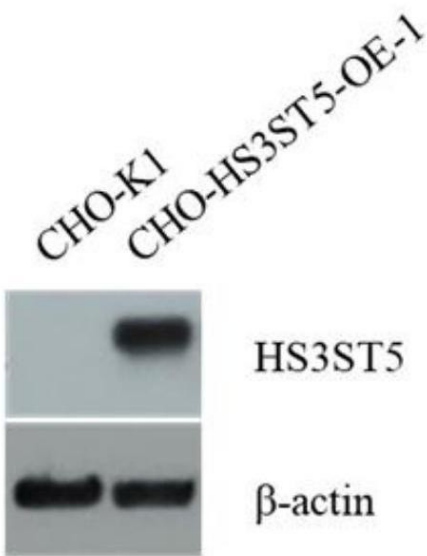
权利要求书1页 说明书9页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种过表达HS3ST5基因的试剂在促进病毒感染中的应用及重组CHO-K1细胞系

(57) 摘要

本发明提供了一种过表达HS3ST5基因的试剂在促进病毒感染中的应用及其构建的重组CHO-K1细胞系,属于基因工程技术领域。本发明提供通过将HS3ST5片段克隆到慢病毒载体中构建出重组慢病毒质粒,再经病毒拯救包装出的慢病毒,感染CHO-K1细胞,获得表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系。稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞会促进FMDV的吸附、内化、基因复制和子代病毒生成,这为研究病毒致病机制提供了工具,为后续制备病毒感染细胞模型提供了基础。



1. 一种过表达HS3ST5基因的试剂在促进病毒感染中的应用。
2. 根据权利要求1所述应用,其特征在于,所述HS3ST5基因的核苷酸序列如SEQ ID NO: 1所示。
3. 根据权利要求1所述应用,其特征在于,所述过表达HS3ST5基因的试剂包括过表达HS3ST5基因的重组载体。
4. 根据权利要求1所述应用,其特征在于,所述提高病毒感染性包括促进病毒吸附和入侵宿主细胞的能力、提高病毒基因复制和子代病毒复制水平。
5. 根据权利要求1~4任意一项所述应用,其特征在于,所述病毒包括利用HS受体入侵细胞的病毒。
6. 根据权利要求5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。
7. 一种稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系,其特征在于,所述重组CHO-K1细胞系过表达HS3ST5蛋白。
8. 权利要求7所述稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1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重组慢病毒;
 - 3) 将拯救得到的重组慢病毒感染CHO-K1细胞,经筛选得到稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系。
9. 根据权利要求8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。
10. 权利要求7所述稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系或权利要求8或9所述构建方法得到的稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系在制备病毒感染细胞模型中的应用。

一种过表达HS3ST5基因的试剂在促进病毒感染中的应用及重组CHO-K1细胞系

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基因的试剂在促进病毒感染中的应用及重组CHO-K1细胞系。

背景技术

[0002] 硫酸乙酰肝素(HS)是一类线性硫酸化的异构多糖,大量存在于哺乳动物细胞表面和细胞外基质中。HS能与多种配体结合,被认为是一种非特异性细胞表面受体。研究发现HS通过独特的单糖序列协助病毒感染,因此,HS可以作为病毒感染靶细胞的特异性受体。进一步研究表明HS参与病毒的吸附和入胞过程,有利于病毒在宿主细胞内的增殖。1型单纯疱疹病毒(HSV-1)和口蹄疫病毒(FMDV)可以利用HS作为病毒受体感染靶细胞。登革病毒(DENV)和人类免疫缺陷病毒(HIV)等多种病毒利用特定的HS多糖结构感染细胞。此外,对于当前流行的严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2),HS也已被证实作为辅助受体与血管紧张素转化酶2(ACE2)直接结合,促进SARS-CoV-2吸附和入侵宿主细胞。HS生物合成修饰酶通过修饰HS硫酸化程度和多糖结构等影响HS蛋白的结合特异性以及生物学功能。硫酸乙酰肝素3-O-硫酸基转移酶(HS3ST)是HS生物合成的关键酶,能够催化硫酸基团从硫酸基供体转移到氨基葡萄糖的3-OH位置而形成3-O-硫酸化的HS。HS3ST包括7种异构体,其中HS3ST5的生物活性最强。目前,HS3ST5对病毒感染影响的研究还很少,也没有稳定表达HS3ST5细胞系构建及其应用的报道。

[0003] 小RNA病毒在医学和兽医学中具有重要作用,其研究成果具有重要参考价值。FMDV是一种经典的小RNA病毒,常作为模式病毒来研究病毒-宿主之间的相互作用。病毒对宿主细胞表面受体的利用不仅决定了病毒的入侵效率和复制能力,更决定了病毒的宿主范围与致病力。在FMDV野毒株适应细胞培养的过程中,病毒获得了利用HS作为受体感染细胞的能力。FMDV识别并结合细胞膜表面的HS受体而吸附在宿主细胞上,随后通过HS介导的内吞作用进入细胞内。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

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种过表达HS3ST5基因的试剂在促进病毒吸附和入侵宿主细胞中的应用。

[0005] 本发明提供了一种过表达HS3ST5基因的试剂在促进病毒感染中的应用。

[0006] 优选的,所述HS3ST5基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0007] 优选的,所述过表达HS3ST5基因的试剂包括过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒。

[0008] 优选的,所述提高病毒感染性包括促进病毒吸附和入侵宿主细胞的能力、提高病毒基因复制和子代病毒复制水平。

- [0009] 优选的,所述病毒包括利用HS受体入侵细胞的病毒。
- [0010] 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。
- [0011] 本发明提供了一种稳定表达HS3ST5的重组细胞系,所述重组细胞系过表达HS3ST5蛋白。
- [0012] 本发明提供了所述稳定表达HS3ST5的重组细胞系的构建方法,包括以下步骤:
- [0013] 1) 构建过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒;
- [0014] 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共同转染细胞拯救得到过表达HS3ST5重组慢病毒;
- [0015] 3) 将拯救得到的重组慢病毒感染CHO-K1细胞,经筛选得到稳定表达HS3ST5的重组细胞系。
- [0016] 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。
- [0017] 本发明提供了所述稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系或所述构建方法得到的稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系在制备病毒感染细胞模型中的应用。
- [0018] 本发明提供了一种过表达HS3ST5基因的试剂在促进病毒感染中的应用。实验证明,通过RT-PCR技术扩增获得HS3ST5片段,克隆到慢病毒载体中构建出重组慢病毒质粒,再经病毒拯救包装出的慢病毒,然后感染CHO-K1细胞,获得表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系。以FDMV为病毒模型,测定重组CHO-K1细胞上FMDV的吸附、内化、基因复制和子代病毒的水平,最终评价重组细胞对FMDV复制能力的影响,结果显示稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞会促进FMDV的吸附、内化、基因复制和子代病毒生成。可见过表达HS3ST5基因可影响FMDV对细胞的吸附,促进FMDV的感染。这为研究病毒致病机制提供了工具,为后续制备病毒感染细胞模型提供了基础。

附图说明

- [0019] 图1为HS3ST5基因扩增结果;
- [0020] 图2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;
- [0021] 图3为单克隆重组CHO-K1细胞株中EGFP的表达结果;
- [0022] 图4为CHO-HS3ST5-0E-1重组细胞株中HS3ST5蛋白表达分析结果;
- [0023] 图5为CHO-HS3ST5-0E-1重组细胞株中HS3ST5 mRNA水平检测结果;
- [0024] 图6为稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞的生长曲线结果;
- [0025] 图7为稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞的比生长速率结果;
- [0026] 图8重组CHO-K1细胞传代过程中HS3ST5蛋白表达结果;
- [0027] 图9为稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞对FMDV吸附的影响结果;
- [0028] 图10为稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞对FMDV内化的影响结果;
- [0029] 图11为稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞对FMDV基因复制的影响结果;
- [0030] 图12为稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞对子代FMDV增殖的影响结果。

具体实施方式

[0031] 本发明提供了一种过表达HS3ST5基因的试剂在促进病毒感染中的应用。

[0032] 在本发明中,所述HS3ST5基因的核苷酸序列优选如SEQ ID NO:1所示。所述过表达HS3ST5基因的试剂优选包括过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒。所述病毒优选包括利用HS受体入侵细胞的病毒。在本发明实施例中,以口蹄疫病毒作为利用HS受体入侵细胞的病毒的代表,研究过表达HS3ST5基因的试剂对病毒感染能力的影响。在本发明实施例中,结果表明过表达HS3ST5基因,有利于促进病毒吸附和入侵宿主细胞的能力、提高病毒基因复制和子代病毒复制水平。

[0033] 本发明提供了一种稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系,所述重组CHO-K1细胞系过表达HS3ST5蛋白。所述HS3ST5蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0034] 本发明提供了所述稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系的构建方法,包括以下步骤:

[0035] 1) 构建过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒;

[0036] 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共同转染细胞拯救得到过表达HS3ST5重组慢病毒;

[0037] 3) 将拯救得到的重组慢病毒感染CHO-K1细胞,经筛选得到稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系。

[0038] 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,得到过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒。所述含Xba I和Not I酶切位点的引物包括核苷酸序列如SEQ ID NO:3 (CGTCTAGAATGAAAAAGCGTAGTAGTG)所示的正向引物和核苷酸序列如SEQ ID NO:4 (ATATGCGGCCGCGGCCAGTTCAATGT)所示的反向引物。所述扩增的条件优选为94℃预变性5min;94℃变性1min,57℃退火1min,72℃延伸2.5min。本发明对酶切和连接的方法没有特殊限制,采用本领域所熟知的酶切连接方法即可。

[0039] 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。

[0040] 在本发明中,所述过表达HS3ST5重组慢病毒的拯救优选2μg/mL嘌呤霉素筛选。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。

[0041] 在本发明中,通过Western Blot分析,所述重组CHO-K1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CHO-K1细胞系能够稳定表达HS3ST5蛋白。同时生长曲线和比生长速度结果表明稳定表达HS3ST5基本不影响CHO-K1细胞的生长性能。

[0042] 在本发明中,稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞会促进FMDV的吸附、内化、基因复制和子代病毒生成。

[0043] 本发明提供了所述稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系或所述构建方法得到的稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系在制备病毒感染细胞模型中的应用。

[0044] 下面结合实施例对本发明提供的一种过表达HS3ST5基因的试剂在促进病毒吸附和入侵宿主细胞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。

[0045] 实施例1

[0046] 一种过表达HS3ST5基因的重组慢病毒质粒的构建方法

[0047] 1. 材料

[0048] 1.1细胞、质粒和病毒

[0049] BHK-21细胞源自中国典型培养物保藏中心,CHO-K1细胞引自美国标准生物制品收藏中心,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。

[0050] 1.2主要试剂和仪器

[0051] 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、F-12K、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 Master Mix购自诺唯赞公司。

[0052] 1.3引物设计与合成

[0053] 根据NCBI上HS3ST5基因序列设计引物对CHO-K1细胞中的HS3ST5基因进行RT-PCR扩增,设计的上游引物为5'-CGTCTAGAATGAAAAAGCGTAGTAGTG-3'(SEQ ID NO:3),下游引物为5'-ATATGCGGCCGCGGCCAGTTCAATGT-3'(SEQ ID NO:4)。GAPDH内参基因的引物:上游引物为5'-CAAGAAGGTGGTGAAGCA-3'(SEQ ID NO:5),下游引物为5'-AAGTGGAAGAGTGAGTGTC-3'(SEQ ID NO:6)以上引物均由金唯智生物技术公司合成。

[0054] 2. 方法

[0055] 2.1 HS3ST5基因的扩增

[0056] 利用上述设计合成的引物扩增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。

[0057] 表1 RT-PCR体系

[0058]	组分	体积
--------	----	----

[0059]	2× One Step Buffer	25 μL
	PrimeScript One Step Enzyme Enzyme	1 μL
	RNA	4 μL
	引物 HS3ST5 (+)	1 μL
	引物 HS3ST5 (-)	2 μL
	水	至 50 μL

[0060] 2.2过表达HS3ST5重组慢病毒质粒的构建

[0061] 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-CHO-HS3ST5。pLOV-EGFP-CHO-HS3ST5质粒经初步酶切鉴定,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。

[0062] 3.结果

[0063] 3.1HS3ST5基因的扩增

[0064] 利用引物以CHO-K1细胞中的RNA为模板扩增HS3ST5基因。琼脂糖凝胶电泳结果显示成功扩增出CHO-K1细胞中的HS3ST5基因。电泳图如图1,扩增产物条带大小1000bp左右。

[0065] 3.2重组慢病毒质粒的构建及鉴定

[0066] 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-CHO-HS3ST5。将测序正确的阳性质粒大提留存备用。

[0067] 实施例2

[0068] 重组CHO-K1细胞系的构建方法

[0069] 1.过表达HS3ST5重组慢病毒的拯救

[0070] 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0.45um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-30℃储存备用。

[0071] 2.嘌呤霉素筛选浓度的确定

[0072] 将CHO-K1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。

[0073] 3.稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系的构建

[0074] 将慢病毒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CHO-K1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CHO-K1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CHO-K1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。

[0075] 结果

[0076] 稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系的建立及鉴定

[0077] 将阳性重组慢病毒质粒pLOV-EGFP-CHO-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。如图1,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CHO-K1细胞,观察到CHO-K1细胞经过最小浓度为2 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CHO-K1重组细胞系的最佳嘌呤霉素浓度为2 μ g/mL。CHO-K1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。如图2所示,荧光显微镜观察到重组慢病毒感染的CHO-K1细胞发出较强的绿色荧光,说明重组慢病毒成功感染CHO-K1细胞,表明过表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系初步构建成功。构建的重组细胞系命名为CHO-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(如图3)。选取CHO-HS3ST5-OE-1进行HS3ST5蛋白和mRNA表达水平的验证。如图4,Western Blot结果显示与正常CHO-K1细胞相比,重组细胞株CHO-HS3ST5-OE-1成功表达HS3ST5蛋白。如图5,RT-qPCR结果显示与正常CHO-K1细胞相比,CHO-HS3ST5-OE-1中HS3ST5 mRNA水平显著上升。以上结果表明过表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系建立成功。

[0078] 实施例3

[0079] 稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞生长曲线和比生长速率分析

[0080] 重组CHO-K1细胞和正常CHO-K1细胞长满后用胰酶消化下来,使用细胞计数板对细胞悬液进行计数,加入细胞培养基对细胞悬液进行稀释,使得细胞密度达到4 $\times 10^5$ /mL,然后将细胞分至24孔板中,每天选取3个孔的细胞进行计数,持续10天。根据细胞数目绘制细胞生长曲线和比生长速率曲线。

[0081] 结果如图6所示,所有细胞的生长都经历了潜伏期、指数生长期和停滞期。在接种相同细胞密度的情况下,CHO-HS3ST5-OE-1重组细胞与CHO-K1细胞生长曲线相似,细胞数目均在第6天达到峰值。图7显示CHO-HS3ST5-OE-1重组细胞和CHO-K1细胞的比生长速率相似,且比生长速率在第6天后为负值,这与生长曲线结果一致,上述结果表明稳定表达HS3ST5基本不影响CHO-K1细胞的生长性能。

[0082] 实施例4

[0083] 稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞中HS3ST5蛋白表达稳定性分析

[0084] 为了分析重组细胞系中HS3ST5蛋白表达稳定性,对第5和20代的细胞收取蛋白样,检测HS3ST5蛋白的表达是否稳定。

[0085] 通过WesternBlot分析CHO-HS3ST5-OE-1重组细胞传代过程中HS3ST5蛋白表达的稳定性。如图8,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HS3ST5蛋白在重组细胞系中能够稳定表达。

[0086] 实施例5

[0087] 稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞对FMDV吸附的影响

[0088] 通过检测FMDV 3D mRNA表达水平评价重组CHO-K1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℃预冷FMDV,4℃放置2h使FMDV充分吸附细胞,再用4℃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。其中RT-qPCR所用的检测引物参考已发表文献中的RT-qPCR引物,扩增FMDV 3D基因的上游引物为5'-ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA-3'(SEQ ID NO:6),下游引物为5'-GCGAGTCCTGCCACGACGGA-3'(SEQ ID NO:7);扩增内参基因GAPDH基因的上游引物为5'-CAAGAAGGTGGTGAAGCA-3'(SEQ ID NO:8),下游引物为5'-AAGTGAAGAGTGAGTGTC-3'(SEQ ID NO:9)。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 $\Delta\Delta CT$ 法计算FMDV 3D的相对mRNA拷贝数。

[0089] 表2 FMDV 3D的RT-qPCR反转录体系

	成分	体积
	RNA	(1000/浓度) μL
[0090]	5 $\times$ RFMix	4 μL
	水	至 20 μL

[0091] 表3 FMDV 3D的RT-qPCR的扩增体系

	成分	体积
	2 $\times$ TB Green Premix EX Taq	10 μL
[0092]	cDNA	2 μL
	上游引物	0.4 μL
	下游引物	0.4 μL
[0093]	ROX Dye	0.4 μL
	水	6.8 μL

[0094] 利用RT-qPCR试验检测CHO-HS3ST5-OE-1重组细胞对FMDV内化的影响。如图9,相对于正常CHO-K1细胞,稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞中的FMDV mRNA水平显著提高,CHO-HS3ST5-OE-1中病毒mRNA水平是对照细胞中的4.3倍,表明稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞有利于FMDV的吸附。

[0095] 实施例6

[0096] 稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞对FMDV内化的影响

[0097] 检测FMDV在重组CHO-K1细胞中内化的试验步骤如下:前期操作同吸附实验,4℃预

冷的PBS缓冲液洗去未吸附的FMDV,细胞在37℃中放置0.5h,再用pH 2.5的PBS缓冲液处理细胞5min以灭活吸附但是未内化的病毒,随后加入RNA裂解液,收取样品后提取RNA,用实施例5中记载的RT-qPCR方法检测内化FMDV的3D mRNA水平。

[0098] 利用RT-qPCR试验检测CHO-HS3ST5-OE-1重组细胞对FMDV内化的影响。如图10,相对于正常CHO-K1细胞,稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞中的FMDV mRNA水平显著提高,CHO-HS3ST5-OE-1中病毒mRNA水平是对照细胞中的5.9倍,表明稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞有利于FMDV的内化。

[0099] 实施例7

[0100] 稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞对FMDV基因复制的影响

[0101] 用MOI为1的病毒接种重组CHO-K1细胞,置于37℃培养箱,分别在5、10、15、20、25、30、35和40h后加入RNA裂解液收取样品。提取RNA,用RT-qPCR方法检测FMDV的3D mRNA水平。

[0102] 利用RT-qPCR试验检测CHO-HS3ST5-OE-1重组细胞对FMDV基因复制的影响。如图11,对于所有时间点样品,相较于正常CHO-K1细胞,稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞中的FMDV mRNA水平显著提高。CHO-HS3ST5-OE-1重组细胞和正常CHO-K1细胞中的FMDV mRNA水平在25h样品中达到峰值,此时CHO-HS3ST5-OE-1中的FMDV mRNA水平是对照细胞中的2.9倍。上述结果说明稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞提高了FMDV的基因复制。

[0103] 实施例8

[0104] 稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞对子代FMDV繁殖的影响

[0105] 利用FMDV感染稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞,通过蚀斑形成试验对子代病毒定量。MOI为1的FMDV接种重组CHO-K1细胞和正常CHO-K1细胞,置于37℃培养箱,4、8、12和16h后分别收取样品,蚀斑试验测定样品中的FMDV蚀斑形成单位(PFU)。

[0106] 收取FMDV感染重组CHO-K1细胞和正常CHO-K1细胞不同时长后的样品,通过蚀斑形成试验对子代FMDV定量。如图12,在所有时间点样品中,相较于正常CHO-K1细胞,稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞上的蚀斑数目均显著提高。病毒感染25h后FMDV蚀斑数目达到峰值,此时CHO-HS3ST5-OE-1中的蚀斑数目是对照细胞中的2.2倍。以上结果表明稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞增强了子代FMDV的繁殖。

[0107] 由上述实施例可知,通过RT-PCR技术扩增获得HS3ST5片段,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-CHO-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CHO-K1细胞,嘌呤霉素持续筛选10d后获得表达HS3ST5的重组CHO-K1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CHO-K1细胞株。有报道称CHO-K1细胞中的HS3ST1、2、4、5和6基因发生转录但是不能表达蛋白,建立的重组CHO-K1细胞成功表达出了HS3ST5蛋白,表明CHO-K1细胞本身具有表达HS3ST5蛋白的能力,但可能由于受到多种因素调控,导致CHO-K1细胞的内源性HS3ST5蛋白表达沉默或水平太低以至于无法检测。还检测了第5和15代重组CHO-K1细胞中的HS3ST5蛋白表达遗传稳定性,发现筛选出的阳性单克隆重组CHO-K1细胞能够持续稳定地表达HS3ST5蛋白,说明HS3ST5基因已被稳定整合进CHO-K1细胞中,也说明获得的靶细胞具有良好的遗传稳定性。此外,本研究还分析了重组CHO-K1细胞的生长速率和比生长速率,结果显示重组细胞和正常细胞具有相似的生长趋势,表明过表达HS3ST5不影响CHO-K1细胞的生长特性。总的来说,

成功建立了稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞系。

[0108] 利用建立的稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞,以FDMV为病毒模型,测定重组CHO-K1细胞上FMDV的吸附、内化、基因复制和子代病毒的水平,最终评价重组细胞对FMDV复制能力的影响。结果显示稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞会促进FMDV的吸附、内化、基因复制和子代病毒生成。总的来说,稳定表达HS3ST5的重组CHO-K1细胞提高了FMDV的复制能力。还可以看出,HS3ST5通过影响FMDV对细胞的吸附进而影响FMDV的整个感染过程。这与文献报道相符,即HS3ST修饰的HS能够促进CMV和HSV-1等病毒的吸附水平进而促进病毒的感染。

[0109] 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。

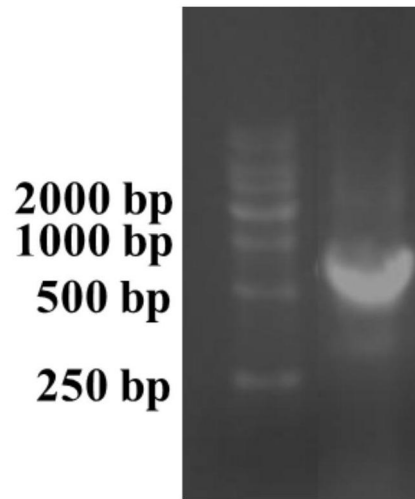
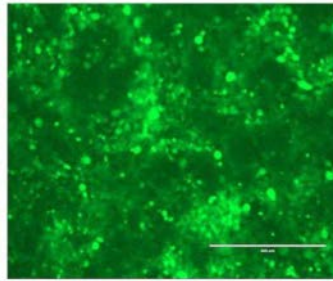


图1



pLOV-EGFP-CHO-HS3ST5

图2

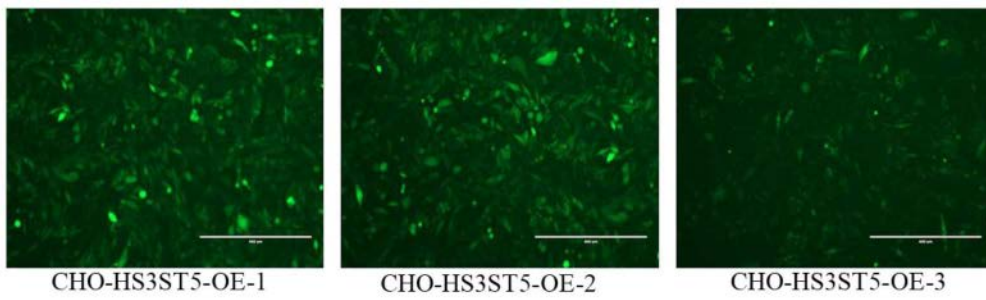


图3

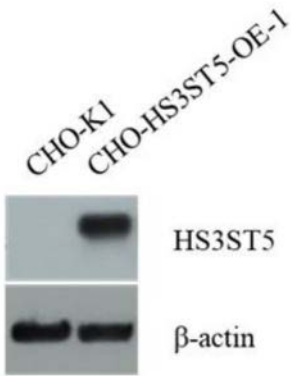


图4

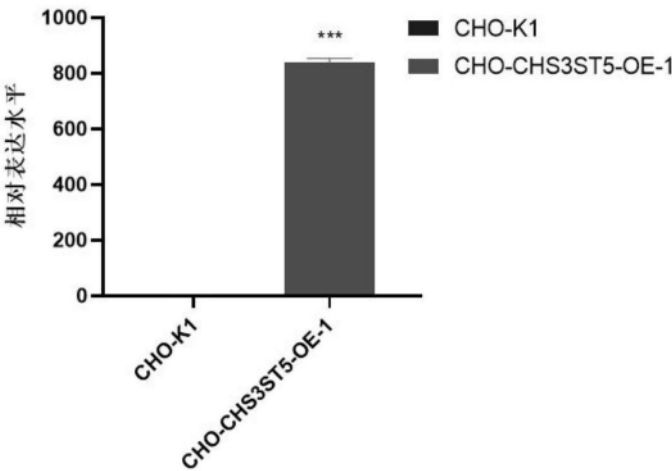


图5

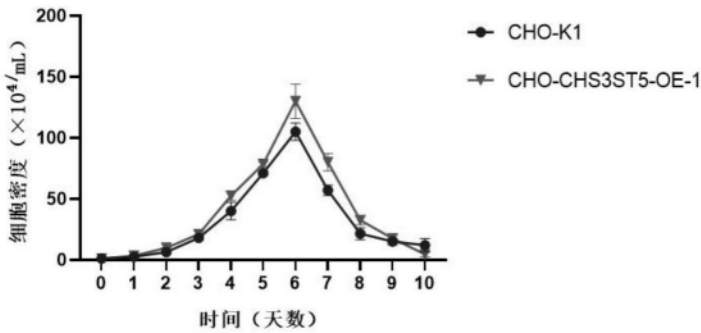


图6

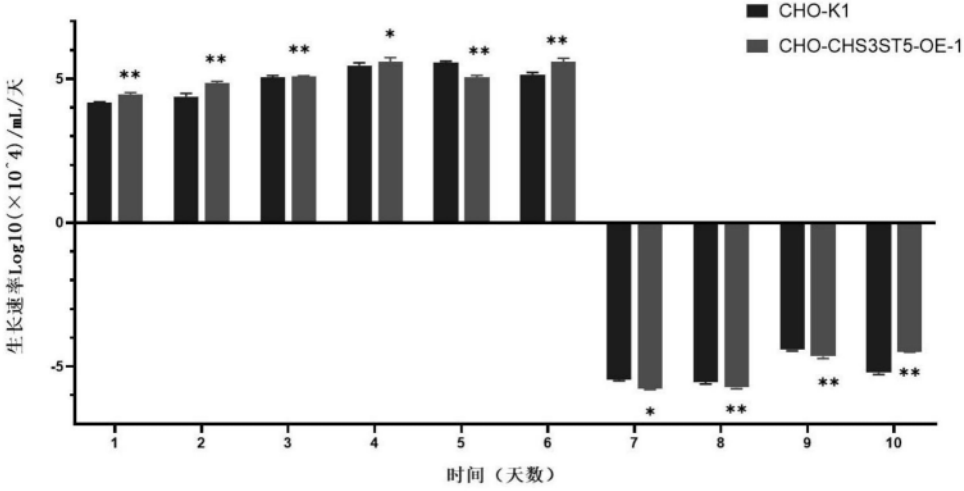


图7

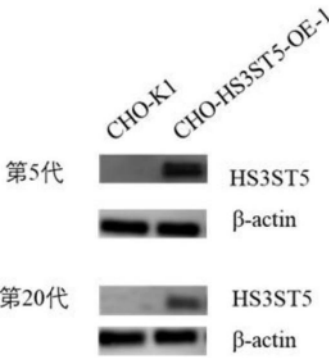


图8

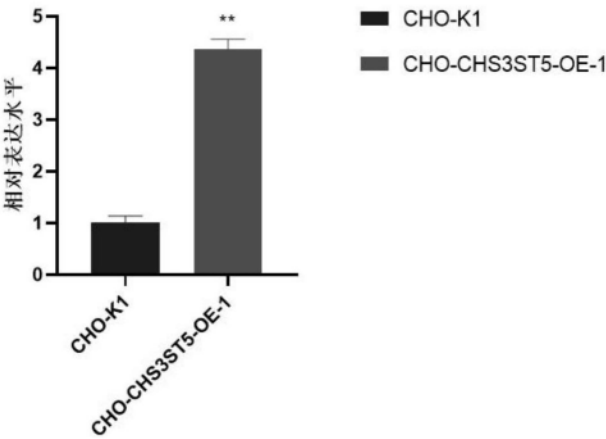


图9

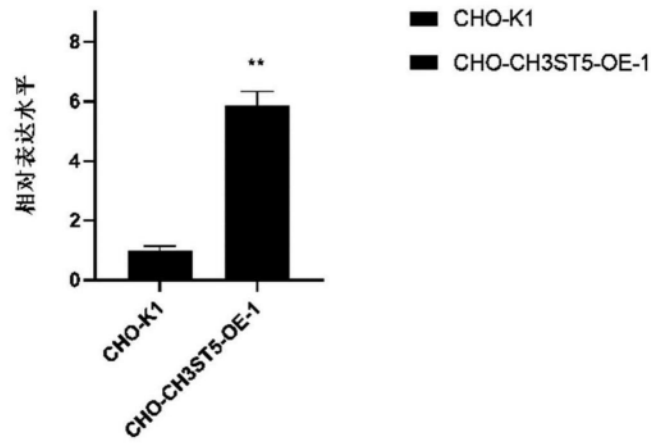


图10

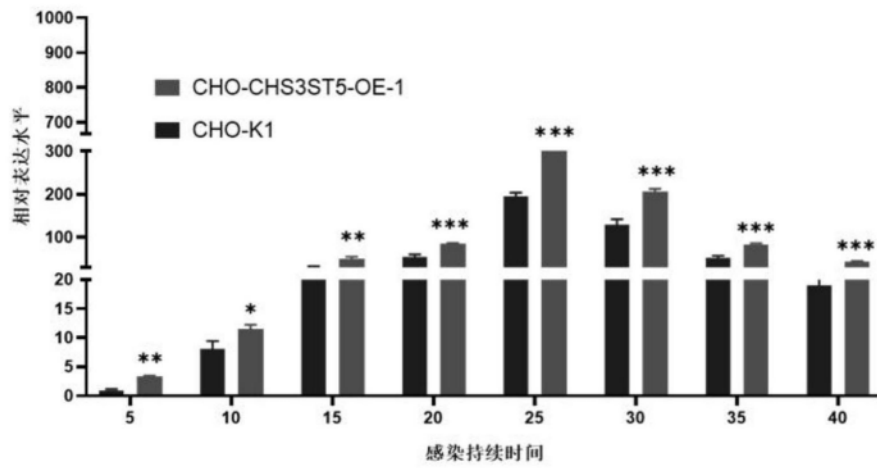


图11

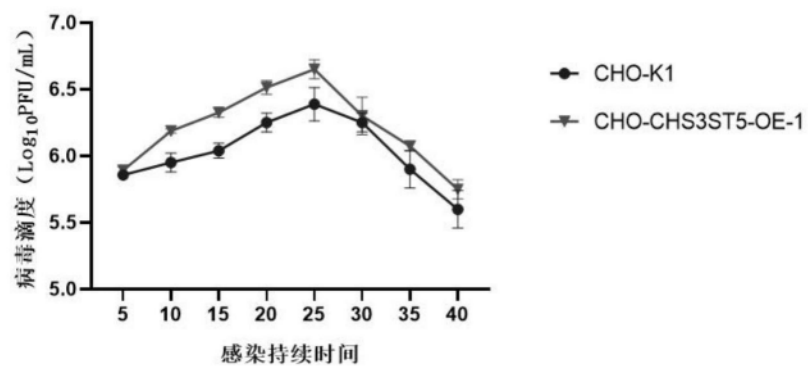


图12