

- Biophys Acta*, **689**(1):55-62.
- [3] Felig, P., 1975, *Annu Rev Biochem*, **44**:933-955.
- [4] Christensen, H. N., 1982, *Physiol Rev*, **62**(4 Pt 1):1193-1233.
- [5] Varoqui, H. Zhu H, Yao D, et al., 2000, *J Biol Chem*, **275**(6):4049-4054.
- [6] Wang, H. Huang W, Sugawara M, et al., 2000, *Biochem Biophys Res Commun*, **273**(3):1175-1179.
- [7] Yao, D. Mackenzie B, Ming H, et al., 2000, *J Biol Chem*, **275**(30):22790-22797.
- [8] Sugawara, M. Nakanishi, T. Fei, Y. J. et al., 2000, *J Biol Chem*, **275**:16473-16477.
- [9] Hatanaka, T. Huang, W. Wang, H. et al., 2000, *Biochim Biophys Acta*, **1467**(1):1-6.
- [10] Chaudhry, F. A. Reimer RJ, Krizaj D, et al., 1999, *Cell*, **99**(7):769-780.

STUDY ON THE FUNCTIONAL DIFFERENCE BETWEEN TWO SUBTYPES OF AMINO ACID TRANSPOTER SYSTEMA

MING Hong LONG Li ZENG Hui Fang LI Jing Kun ZHANG Wen

(The Department of Biology, Kunming Medical College, 650031 China)

ABSTRACT By transient expressing of rat system A amino acid transporters Gln T and STA-2 in monkey fibroblast cell line CV-1 with recombination vaccinia virus expression system, we studied affinity of transporting some amino acids and kinetics of transporting MeAIB, alanine and glutamine by Gln T and SAT-2. Combined with analysis of their amino acid sequences, it suggested that Gln T and SAT-2 played different roles in amino acid transporting in spite of their higher homology in amino acid sequence.

Key Words: System A amino acid transporter Recombination vaccinia virus CV-1 Gln T
SAT-2 Rat

犬 2 型腺病毒 E1 转化细胞系的特性研究

邱 薇^{*,***} 夏咸柱^{**} 范泉水^{*} 扈荣良^{**} 王 雷^{**}

高玉伟^{**} 孙 阳^{*} 尹惠琼^{*} 李刚山^{*}

(*成都军区联勤部军事医学研究所 昆明 650032 **解放军军需大学军事兽医研究所 长春 130062)

摘 要 对筛选到的一株 CAV-2 E1 转化细胞(DK/E1)进行了初步的特性研究。以 DK 细胞为对照,观察到转化细胞的形态与 DK 细胞有明显区别,细胞变长,易聚集生长。通过测定 DK 及 DK/E1 细胞分别在 2%、5% 和 10% 牛血清培养基中的生长曲线,结果发现 DK/E1 细胞的生长速度比 DK 细胞快。用蚀斑和 TCID₅₀ 测定了病毒在 DK 和 DK/E1 细胞上的病毒滴度,结果表明 DK/E1 细胞产生的病毒蚀斑比 DK 细胞的大,TCID₅₀ 测得的病毒滴度比 DK 细胞产生的病毒滴度高。CAV-2 全基因组 DNA 对 DK/E1 细胞和 DK 细胞的转染试验结果表明,5 μ g 和 10 μ g 的 CAV-2 DNA 转染的 DK/E1 细胞,分别在转染后第 14 天和第 11 天均出现了典型的腺病毒细胞病变,而相同量 CAV-2 DNA 转染的 DK 细胞未出现病变,说明 DK/E1 细胞有助于 CAV-2 DNA 的复制和病毒粒子的包装。在 DK/E1 细胞内的重组试验表明,DK/E1 细胞也有利于重组病毒的产生。以上转化特性在 DK/E1 细胞传至 80 代时仍保持不变,说明本试验获得了一株 CAV-2 E1 基因的转化细胞系。

关键词: 犬 2 型腺病毒 E1 转化细胞系 转染 重组

腺病毒作为最常用的病毒载体之一,在基因表达和基因治疗方面已被广泛应用,动物腺病毒载体目前也已成为病毒载体研究中的热点。犬 2 型腺病

本文 2002 年 8 月 14 日收到,2003 年 1 月 18 日接受。

全军“十五”医药卫生重点项目资助(01-Z-092)。

*** 通讯作者。E-mail: qiuwei66@hotmail.com

毒(CAV-2)是目前广泛应用的用于预防犬传染性肝炎、传染性喉气管炎的疫苗,也是犬科动物腺病毒载体疫苗研究的一个候选者。CAV-2 E1区的mRNA是在病毒感染细胞后最先出现的转录产物,其基因产物涉及到病毒DNA复制和鼠类细胞转化,缺失E1区的腺病毒是复制缺陷型的,病毒不能在人和动物体内生长和传播^[1]。293人胚肾细胞^[2]是腺病毒诱导的肿瘤细胞系,可以表达腺病毒E1区编码的基因产物,E1区缺失的腺病毒能在293细胞系上传代或增殖。人腺病毒的基因组及其E1缺失性基因组在293细胞中可以有效地装配成具有感染性的病毒粒子。理论上,缺失E3区的腺病毒能在DK细胞上增殖而无需辅助细胞,但Mittal等^[3]在构建牛3型腺病毒载体时发现,尽管只部分缺失了E3区,用MDBK细胞进行细胞内同源重组,却无法得到重组病毒,只有通过E1转化的MDBK细胞中才获得重组病毒。犬2型腺病毒的载体构建也经过多年的研究。Kremer等^[4]用CAV-2强毒株Toronto A 26/61株构建了缺失E1区并表达LacZ的重组病毒,而用CAV-2疫苗株Manhattan株构建重组病毒则未能成功,至今仍未见报道E3区缺失或插入外源基因的CAV-2重组病毒。有研究表明,犬腺病毒E1区转化的细胞能提高病毒基因组DNA的转染效率^[5]。由于犬腺病毒在293细胞上不具感染性,为进行狂犬病毒糖蛋白基因重组活疫苗的研究,首先要获得有助于犬腺病毒基因组包装成感染性病毒粒子及犬腺病毒DNA与目的基因的体内重组以获得重组病毒的辅助细胞,为此,本研究对CAV-2 SY株E1基因表达质粒转化DK细胞后建立的DK/E1转化细胞系进行了部分特性研究。

材料与方法

1. 细胞与试剂

DK细胞为一种犬肾传代细胞系,DK及DK/E1细胞由本室保存,新生犊牛血清购自Hyclone公司。

2. 生长曲线测定

将DK和DK/E1细胞消化后计数,按相同细胞数量接种6孔板,分为2%、5%和10%牛血清的DMEM培养的3组,置37℃ 5% CO₂培养箱中培养,分别于接种后第1天、第3天、第5天和第7天时消化,细胞计数,绘制生长曲线图。

3. 产毒滴度的比较

1) 蚀斑法 在培养瓶中分别接种相同量的DK及DK/E1细胞,同步接种等量的CAV-2,在细胞长满单层后,倾弃营养液,用适量不含酚红不含血清的MEM营养液洗涤

细胞2次,以除去死亡的细胞和含酚红的营养液。将保温于44℃左右含2%犊牛血清的营养琼脂糖(1%琼脂糖,2%牛血清的无酚红MEM)注入细胞培养瓶内无细胞的一面,再将培养瓶缓慢翻转,使营养琼脂糖均匀地覆盖在细胞表面,厚度约2mm,在无菌罩中放置30min,待完全凝固后倒置于37℃ 5% CO₂温箱中继续培养。5天之后以0.04%的中性红(用0.85%的生理盐水配制)染色,继续培养10h左右,观察蚀斑。

2) 测定TCID₅₀法 在培养瓶中分别接种相同量的DK及DK/E1细胞,待长满单层后接种等量的CAV-2,2-3天后出现明显细胞病变,反复冻融三次后收毒。在24孔板中测定TCID₅₀。

4. CAV-2全基因组DNA的转染试验

1) CAV-2 DNA的提取^[6] DK细胞按常规消化传代后37℃静置培养,待细胞长满单层后按培养液量的1/10接入CAV-2种毒,37℃静置培养至80%的细胞出现病变时弃上清,倒置30min使培养液流尽。在55×10⁵mm(38cm²)的培养瓶中加入2ml裂解液(1% SDS, 10mmol/L Tris-Cl, 10mmol/L EDTA, pH7.5)室温作用10min裂解细胞,将黏性的裂解物移至离心管中,37℃作用5min,其间轻轻倒转离心管20次,再加入0.5ml 5mol/L NaCl,混匀,37℃作用5min以除去大部分细胞DNA,然后置冰水浴中3h或4℃过夜,15 000rpm离心15min,取上清液至另一离心管中,加入与上清等体积的TE饱和酚,室温混匀10min,10 000rpm离心10min,弃上清,将酚相及界面再用TE抽提两次以除去余留的DNA和RNA片段,然后在酚相及界面中加入1.5倍体积的乙醇,冰浴10min,5 000rpm离心10min,将沉淀用乙醇和乙醚各洗一次后悬浮于0.5ml的TE(100mmol/L NaCl和0.5% SDS)中,再加250μg蛋白酶K,37℃作用至沉淀消失。然后用等体积TE饱和酚抽提两次,将水相用等体积正丁醇抽提一次,加入等体积异丙醇于-80℃放置10min,12 000rpm离心10min,弃上清,用70%乙醇洗沉淀两次,再溶于0.36ml TE中,加40μl 3mol/L 乙酸盐和2.5倍体积的乙醇重沉淀,70%乙醇洗一次,干燥,溶于适量TE中。

2) 全基因组的转染 DK及DK/E1细胞分别消化后稀释至1-3×10⁵/ml,取2ml细胞悬液接种于六孔板中,37℃ 5% CO₂培养箱中培养18-24h,至50%-80%铺满;各用100μl无血清MEM稀释10μl和25μl Lipofectamine Reagent,分别与100μl无血清MEM稀释的5μg CAV-2 DNA和10μg CAV-2 DNA轻混均匀,置室温15-45min;以上两种混合物各加入0.8ml无血清MEM,混匀后覆盖在经2ml无血清MEM洗过的细胞上,37℃ 5% CO₂培养箱中培养12h后,加入1ml含20%血清的MEM,37℃ 5% CO₂培养箱中继续培养12h,再用含2%血清的MEM换液,置37℃ 5% CO₂培养箱中继续培养,5天后将细胞消化传至培养瓶中,观察有无细胞病变,无病变的每4天原瓶消化传代,观察病变。

5. 细胞内同源重组构建重组病毒试验

1) 质粒的制备 将大量提取并纯化的 pBE3LCGFP 重组质粒经 Sca I 线性化后,用酚:酚:仿(1:1):氯仿各抽提一次,乙醇沉淀,75%乙醇洗两次,干燥后溶于适量无菌水中,测定 DNA 浓度, -20℃ 冻存备用。

2) CAV-2 与 pBE3LCGFP 质粒在 DK/E1 细胞内的同源重组 在六孔板中接种消化后稀释至 $1-3 \times 10^5$ /ml 的 DK/E1 细胞, 2ml 细胞悬液/孔。在进行转染前先接种约 10PFU/cell 的 CAV-2, 37℃ 吸附 1h, 弃上清, 用无血清 DMEM 洗涤一次, 每孔用 10 μ g 线性化的含有绿色荧光报告基因的 pBE3LCGFP 质粒(此质粒由本室构建)进行转染。7 天后反复冻融 3 次收集细胞, 离心除去细胞碎片, 用适当稀释的上清液接种单层 DK/E1 细胞, 待出现病变后镜检, 观察荧光。

6. DK/E1 细胞的遗传稳定性

对筛选到的 DK/E1 细胞进行了遗传稳定性实验。细胞经多次传代后, 每隔 10 代, 提取 DK/E1 细胞的 RNA, 通过 RT-PCR 检测 E1A 的转录, 以检测转染 CAV-2 E1 的 DK/E1 细胞株的遗传稳定性。

结 果

1. DK 及 DK/E1 细胞的生长曲线

通过细胞记数, 绘制了 DK 及 DK/E1 细胞分别在 2%、5% 和 10% 牛血清培养基中的生长曲线, 从生长曲线可看出 DK/E1 细胞的生长速度比 DK 细胞快, 在 2% 牛血清的培养基中也能良好生长, 且细胞间的接触抑制减小, 在相同时间内细胞数量明显比 DK 细胞的多(图 1、图 2 和图 3)。

2. DK 及 DK/E1 细胞对 CAV-2 的培养增殖影响

通过蚀斑和 TCID₅₀ 测定, 发现 CAV-2 在 DK/E1 2% 牛血清生长曲线

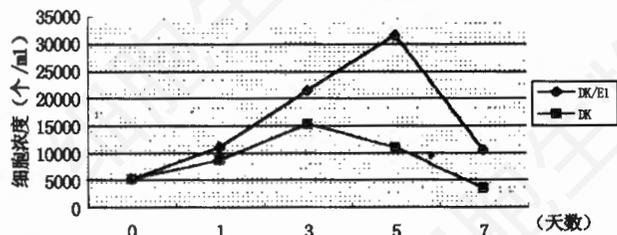


图 1 2% 牛血清培养基中 DK 及 DK/E1 细胞的生长曲线

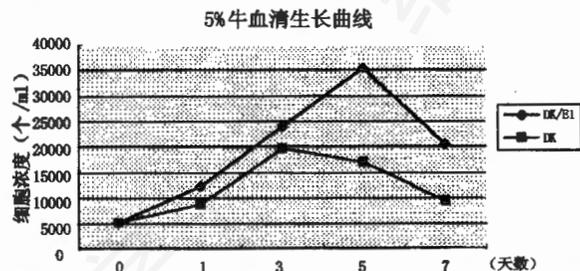


图 2 5% 牛血清培养基中 DK 及 DK/E1 细胞的生长曲线

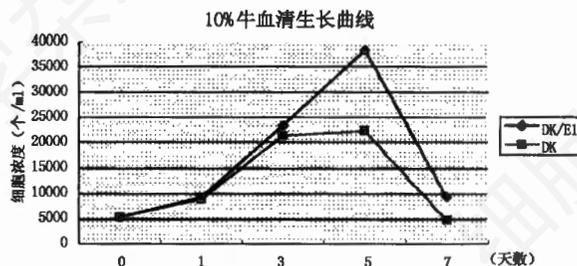


图 3 10% 牛血清培养基中 DK 及 DK/E1 细胞的生长曲线

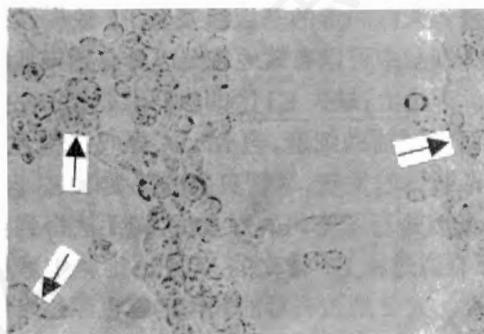


图 4 重组后可见光下的细胞病变

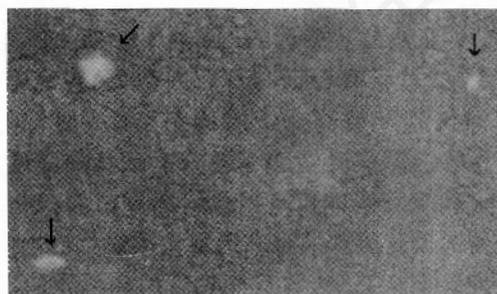


图 5 同一视野下病变细胞中出现的少数带有荧光(箭头处)的细胞

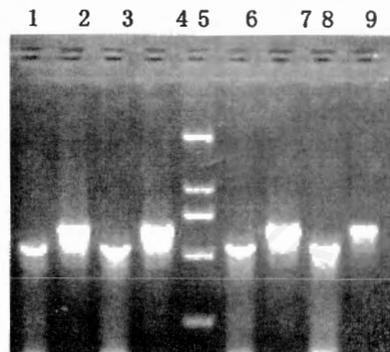


图 6 DK/E1 细胞第 20、40、60、80 代的 PCR 及 RT-PCR 结果

1: DK/E1-V20 RT-PCR 2: DK/E1-V20 PCR 3: DK/E1-V40 RT-PCR 4: DK/E1-V40 PCR 5: DL2000 Marker 6: DK/E1-V60 RT-PCR 7: DK/E1-V60 PCR 8: DK/E1-V80 RT-PCR 9: DK/E1-V80 PCR

E1上细胞产生的蚀斑比在DK细胞上产生的蚀斑大,测得的TCID₅₀分别为 $10^{-7.88}$ 和 $10^{-6.43}$,可见相同条件下DK/E1细胞的产毒量比DK细胞的要高。

3. CAV-2全基因组DNA转染试验

以 $5\mu\text{g}$ 和 $10\mu\text{g}$ 的CAV-2 DNA分别对DK及DK/E1细胞进行转染。在两次传代后即转染后第11天, $10\mu\text{g}$ CAV-2 DNA转染的DK/E1细胞出现了典型的CAV-2细胞病变,而同时转染的DK细胞对照无病变; $5\mu\text{g}$ CAV-2 DNA转染的DK/E1细胞在经过3次传代即转染后的第14天也出现了典型的CAV-2细胞病变,但同时转染的DK细胞未见有细胞病变。

4. 细胞内同源重组构建重组病毒试验

单层DK/E1细胞接种同源重组后的DK/E1细胞冻融上清液,2天即可观察到CAV-2引起的DK/E1细胞病变,细胞变圆、积聚成串并拉网(图4),在变圆聚成串的病变细胞中,有极少数的病变细胞带有荧光,带有荧光的病变细胞即为含重组病毒CAV2-GFP的细胞(图5)。

5. DK/E1细胞的遗传稳定性研究

DK/E1细胞系经传80代以上,仍能从中检测到E1A的DNA及mRNA(图6),表明E1A仍有转录,且细胞形态及其他特性不变。表明该DK/E1细胞系能稳定遗传,本研究称其为CAV-2 E1转化细胞系。

讨 论

本研究所获得的DK/E1细胞,具有部分转化细胞的特性,如形态异常,部分“接触性抑制”的丧失,转化细胞互相接触时不呈现停止分裂现象,新分裂的细胞可在其他细胞的上面生长而形成细胞重叠,细胞内出现CAV-2 E1A mRNA及E1B蛋白,对血清的要求降低等。由此可见,DK/E1细胞为一株转化细胞。转化细胞植入同源动物体内,有时能致发肿瘤,但某些腺病毒极少诱发宿主机体的肿瘤形成,只在将其注入新生啮齿类动物时,才有致瘤作用。本研究获得的转化细胞,为用CAV-2 E1基因转化的细胞系,其生长速度虽然比正常的DK细胞快,但其恶性化程度不如文献中所述,这可能与E1基因的单纯转化有关。至于其是否具有致瘤性,还有待于进一步试验。

Tsukiyama等^[5]对CAV-2与转化有关的基因进行了定位和功能研究。他们用CAV-2全基因组、BamH I A片段、Xba I D片段以及EcoR I C片段对

小鼠肾细胞分别进行了转化,结果发现CAV2全基因组和BamH I A片段转染的细胞完全失去了接触抑制,无贴壁依赖性且不依赖于血清并可在新生小鼠上致瘤。而用Xba I D和EcoR I C片段转化的所有细胞尽管有形态学变化,但均需贴壁生长并依赖于血清,在新生小鼠体内不致瘤等特点。说明参与细胞转化的因素,不但有E1基因,还与其他因素有关。本研究用克隆有CAV-2 SY株E1区的质粒转染DK细胞,得到的转化细胞系(DK/E1),该细胞系在形态上与DK细胞有明显区别,细胞变长,形成细胞聚合团,需贴壁生长并依赖于血清,但在无血清的DMEM培养基中可维持1个月以上,仍有存活的细胞。DK/E1细胞生长速度快,在低血清的培养基中也能良好生长,且产生的病毒滴度高,如用于疫苗生产,可降低成本。由于该细胞为转化的细胞系,尽管有文献报道CAV-2 EcoR I C片段转化的在新生小鼠体内不致瘤,但其在其他动物体内的安全性还有待于进一步研究。

腺病毒DNA复制、转录和病毒RNA的加工在细胞核内进行。在病毒感染周期中,病毒基因的转录分为早期(E)和晚期(L),分别在DNA复制前或后发生。早期转录基因包括E1A、E1B、E2A、E2B、E3和E4,分别位于腺病毒基因组1.3-4.5mu、4.6-11.2mu、67.9-61.5mu、29-14.2mu、76-86.2mu和96.8-91.4mu。晚期转录基因为L1、L2、L3、L4、L5,在人和动物腺病毒中晚期转录蛋白是恒定的,但早期转录区因血清型不同和动物来源不同而有较大差异。早期表达蛋白主要是基因调节蛋白和DNA复制所必需的酶类,晚期蛋白主要是病毒粒子的结构蛋白和病毒包装蛋白。腺病毒在感染宿主细胞1h后,即可见到E1A基因转录产生一种13S mRNA,所以E1A又称为即时早期基因(immediate early gene),其编码的蛋白产物由289个氨基酸组成,分子量为51kD。E1A蛋白除了可以诱导细胞DNA合成、细胞增殖和转化外,还含有反式激活细胞基因以及其他病毒基因表达的活性区域,它可以反式激活E1B、E2A、E2B、E3和E4基因的表达。由于E1A蛋白与病毒的复制起始有关,在表达E1A的细胞中,病毒的复制起始也可能会加快,试验证明,用等量的CAV-2感染相同数量的DK/E1和DK细胞,DK/E1细胞产生的病毒滴度明显高于DK细胞。可能是因为DK/E1细胞内表达的E1蛋白加快了病毒DNA的复制和包装,也可能是DK/E1细胞本身生长比DK细胞快,因此产生的病毒滴度比

DK 细胞高。

腺病毒基因组的线状双链 DNA 分子两端各含有 40-200bp 的末端反向重复,5'端连接有末端蛋白。它与腺病毒 DNA(Ad-DNA)的复制起始有关。DNA 合成是不同步的,从线状 DNA 的两个 5'端开始的,并且向两个方向延伸直到分子的另一端,其起始引物是病毒编码的末端蛋白和与之结合的 dCMP。但经过蛋白酶处理,提纯的腺病毒基因组在丢失末端蛋白的同时其感染性也明显降低,使基因组在转染细胞后难以产生感染性的病毒粒子。另外,Kremer 等^[4]认为 CAV-2 DNA 转染 DK 细胞很困难,于是他们在进行细胞内同源重组构建 CAV-2 重组病毒时,用 CAV-2 病毒粒子感染 DK/E1 细胞,以提供重组所需的全基因组 DNA,但这种方法得到的重组病毒中,野生型病毒粒子的干扰极为严重。用 Manhattan 株构建重组病毒时,产生的重组病毒与野生型病毒比小于 1/10 000,无法进一步纯化。经 CAV-2 全基因组转染试验证明,我们构建的 DK/E1 细胞有助于病毒 DNA 的包装和感染性病毒粒子的产生,在进行细胞内重组构建重组病毒时,可用纯化的 CAV-2 全基因组 DNA 代替 CAV-2 病毒粒子与质粒 pBE3LCGFP 进行共转染,这样可在一定程度上降低野生型病毒对重组病毒的污染。

腺病毒 E1 区的表达产物是腺病毒 DNA 在细胞中复制所必需的,建立 E1 辅助细胞株可反式互

补缺失 E1 区的腺病毒,使其能在辅助细胞中繁殖。理论上,缺失 E3 区的腺病毒能在 DK 细胞上增殖而无需辅助细胞,但 Mittal 等^[3]在构建牛 3 型腺病毒载体时发现,尽管只部分缺失了 E3 区,用 MDBK 细胞进行细胞内同源重组,却无法得到重组病毒,只有通过 E1 转化的 MDBK 细胞中才获得重组病毒。犬 2 型腺病毒的载体构建也经过多年的研究,但均未见成功报道。Kremer 等^[4]用 CAV-2 强毒株 Toronto A 26/61 株构建了缺失 E1 区并表达 LacZ 的重组病毒,而用 CAV-2 疫苗株 Manhattan 株构建重组病毒则未能成功,至今仍未见报道 E3 区缺失或插入外源基因的 CAV-2 重组病毒。本实验以绿色荧光蛋白基因为报告基因,在 DK/E1 细胞中进行细胞内同源重组,构建 E3 区插入 GFP 的 CAV2-GFP 重组病毒的探索性试验,发现有重组病毒表达的零星荧光细胞,但由于同源重组效率太低等因素,重组病毒的纯化及扩大手段仍需进一步探索。

参 考 文 献

- [1] 徐耀先等主编,2000,分子病毒学,P.341-346.
- [2] Graham FL, et al, 1977, *J. Gen. Virol.*, **36**:59-72.
- [3] Mittal K, et al, 1995, *J. Gen. Virol.*, **76**:93-102.
- [4] Kremer EJ, et al, 2000, *J. Virol.*, **74**(1):505-512.
- [5] Tsukiyama T, et al., 1988, *J Gen. Virol.*, **69**:2471-2482.
- [6] Morikazu S, 1983, *Microbiol Immunol.*, **27**(9):817-822.

THE STUDIES ON CAV-2 SY STRAIN E1 TRANSFORMED CELL LINE

QIU Wei* XIA Xian Zhu** FAN Quan Shui* HU Rong Liang** WANG Lei**

GAO Yu Wei** SUN Yang* YIN Hui Qiong* LI Gang Shan*

(* The Military Medical Institute of Cheng-Du Military Area, Kunming 650032 China

** The Veterinary Institute, University of Agriculture and Animal Science, Changchun 130062)

ABSTRACT Parts of the properties of the CAV-2 E1 transformed cell line (DK/E1) were studied in this paper. Compare with the normal DK cell line, the DK/E1 cell line has parts of the properties of transformed cell, such as cell becomes longer, grows faster, nutrient require decreases, et al. Our experiments also found that the virus titer produced on DK/E1 cell is higher than that on DK cell. The DK/E1 cell can promote the replication of the CAV-2 DNA and the package of the virus particle, even the production of recombinant virus. The properties of transformed cell of the DK/E1 can subculture for more than 80 generations.

Key words: CAV-2 E1 Transformed cell line Transfection Recombination