

杆状病毒用于哺乳动物细胞快速高效表达外源基因的研究

程 通 许辰煜 王颖彬 陈 敏 吴 婷 谢小燕 张 军 夏宁邵*

(厦门大学生命科学院, 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘 要 现已发现杆状病毒可进入某些培养的哺乳动物细胞, 这提示可将杆状病毒作为一种对哺乳动物细胞的新型基因转移载体。对杆状病毒转移载体的改造及对哺乳动物细胞的基因转移方式进行了进一步的研究。以绿色荧光蛋白基因为报告基因, 利用 Bac-to-Bac 系统构建了分别含有正向和反向 CMV 启动子表达盒的两种重组杆状病毒。可观察到 CMV 启动子在 Sf9 细胞中可启动报告基因的表达, 但表达效率较低。用重组杆状病毒感染后 Sf9 细胞的培养上清直接与 HepG2 细胞作用, 以流式细胞术检测基因转移效率及荧光表达强度, 发现这两种病毒在相同的感染复数下对 HepG2 细胞具有相似的基因转移及表达效率。同时, 利用流式细胞术进一步研究了直接使用重组杆状病毒感染 4d 后 Sf9 细胞的培养上清对哺乳动物细胞进行基因转移的方法。通过对 HepG2 细胞的实验结果显示, 将带毒 Sf9 细胞培养上清(1.2×10^7 PFU/mL)用哺乳动物细胞培养基 1 倍稀释后, 37°C 下孵育靶细胞 12h (moi = 50), 可达到较高的基因转移及表达效率, 同时不会对细胞造成明显损伤。将重组杆状病毒与脂质体和逆转录病毒这两种系统对 HepG2 及 CV1 细胞的基因转移效率进行了比较, 结果发现在同样未经浓缩等特殊处理的条件下重组杆状病毒对这两种细胞的基因转移效率是最高的。因此可以认为, 经过适当改造后的 Bac-to-Bac 重组杆状病毒系统可作为一种对哺乳动物细胞简便高效的基因转移表达载体。

关键词 Bac-to-Bac 昆虫细胞-杆状病毒表达系统 绿色荧光蛋白 哺乳动物细胞 脂质体 重组逆转录病毒
中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)05-0581-07

昆虫细胞-杆状病毒表达系统是一种发展成熟的蛋白表达系统。过去认为, 杆状病毒有严格的宿主限制范围, 不能感染脊椎动物细胞。近年来的研究发现, 杆状病毒可进入某些哺乳动物细胞^[1,2], 但其进入细胞后并不发生复制和基因转录^[3]。在杆状病毒载体中引入可在哺乳动物细胞中作用的启动子, 如 RSV、CMV 启动子等, 则可通过杆状病毒将外源基因转移入哺乳动物细胞中进行表达^[4-8]。这使得在对哺乳动物细胞进行基因转移时, 除了使用脂质体、重组逆转录病毒、腺病毒等传统方法外, 又增加了一个可供选择的途径。目前, 在使用重组杆状病毒对哺乳动物细胞进行基因转移时, 多使用经超速离心纯化后的病毒, 这种方式尽管可以大大提高病毒滴度, 但这需要培养较多的细胞生产大量的病毒, 操作起来也较为复杂和繁琐, 不利于进行日常探索性的实验。

Bac-to-Bac 系统是目前最常用的杆状病毒表达系统。本研究利用增强型绿色荧光蛋白(eGFP)基

因作为报告基因, 探讨直接使用昆虫细胞分泌的杆状病毒上清对哺乳动物细胞进行外源基因转移的可行性, 并与脂质体和逆转录病毒基因转移系统进行了比较, 发现杆状病毒上清直接用于基因转移的转移效率和表达效率均较理想, 并远远优于常规的脂质体和逆转录病毒基因转移系统。由于直接使用病毒上清可大大简化 Bac-to-Bac 系统对哺乳动物细胞进行外源基因转移的操作过程, 因此可作为一种常规操作工具用于日常实验。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞株和质粒 *E. coli* DH5 α 由本实验室保存, *E. coli* DH10Bac、pFastBac1、Sf9 昆虫细胞株购自 Invitrogen 公司。pCDNA3.1(+)为 Invitrogen 公司产品, pEGFP 购自 Clontech 公司。HepG2、CV1 细胞株购自 ATCC。pMD18-EF1A、pT67-EGFP 细胞为本实验室构建。

1.1.2 实验试剂:限制酶、连接酶均购于大连宝生物工程公司。Grace 培养基、乳白蛋白水解物、DMEM、MEM 培养基购于 Invitrogen 公司,酵母粉购于 OXOID 公司。抗生素购于华北制药厂。IPTG、X-gal 购于 Sigma 公司。Cellfectin 购于 Invitrogen 公司。细胞培养用胎牛血清购于 HyClone 公司。其它试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 构建 pFB-EGFP、pFB-CMV-EGFPA、pFB-CMV-EGFPB pEGFP 以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切得到带 EGFP 基因的 760bp 的片段,用华舜公司的胶回收 Kit 回收,与 pFastBac1 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后回收获得的载体相连接。连接物用常规质粒转化大肠杆菌的方法转化 CaCl_2 致敏的 *E. coli* DH5 α ,经

酶切鉴定后获得 pFB-EGFP。

pEGFP 以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后回收的片段,与 pCDNA3.1(+)经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后获得的载体相连接,经酶切鉴定后获得 pN31-EGFP。pN31-EGFP 以 *Bgl* II 和 *Eco*R I 双酶切后获得的片段,与 pFastBac1 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切回收获得的载体相连接,连接物以酶切方法进行鉴定,获得 pFB-CMV-EGFPA。以 *Bgl* II 和 *Bam*H I 双酶切 pMD18-EF1A 后回收的片段,与 pFastBac1 经 *Bam*H I 酶切回收获得的载体相连接,经酶切鉴定后获得 pFB-EF1A。pN31-EGFP 以 *Sal* I 和 *Eco*R I 双酶切回收片段,与 pFB-EF1A 经 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切回收获得的载体相连接,连接物以酶切方法进行鉴定,获得 pFB-CMV-EGFPB(图 1)。

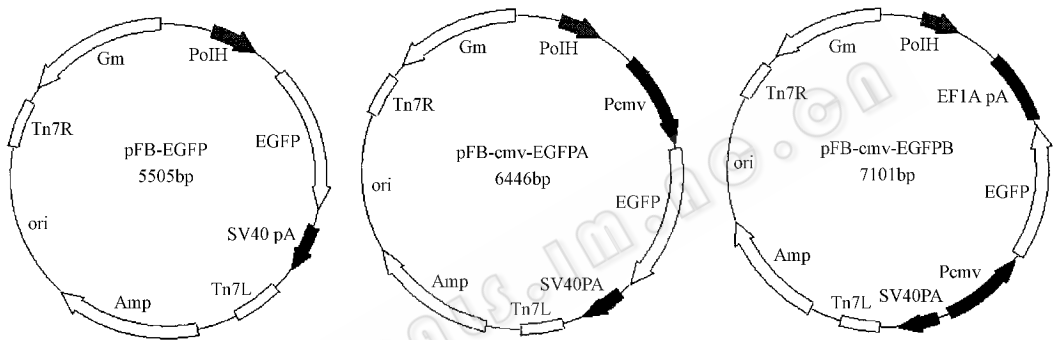


图 1 pFB-EGFP、pFB-CMV-EGFPA、pFB-CMV-EGFPB 的构建

Fig. 1 Construction of pFB-EGFP, pFB-CMV-EGFPA and pFB-CMV-EGFPB

1.2.2 构建重组 bacmid^[9]:获得 pFB-EGFP、pFB-CMV-EGFPA、pFB-CMV-EGFPB 后,将转移质粒转化 CaCl_2 致敏的 *E. coli* DH10Bac 感受态细胞。该细胞含有穿梭质粒 bacmid 和辅助质粒。37℃ 震荡培养 4h 后,转移质粒在辅助质粒提供的转座酶的作用下发生转座,目的基因区段被插入 bacmid 的 *LacZ* 编码区,并使 DH10Bac 获得庆大霉素抗性。通过涂布含 X-gal、IPTG、庆大霉素、卡那霉素和四环素的 LB 平板筛选白色菌落,挑入含 3 种同样抗生素的液体 LB 培养基,37℃ 震荡培养过夜,碱法小量提取 bacmid。

在 bacmid 的 *LacZ* 基因上下游有 M13 引物互补序列,以 M13 引物对提取的 bacmid 进行 PCR 扩增(94℃ 50s, 55℃ 50s, 72℃ 2min, 30 个循环, 72℃ 10min)根据所得片段的大小可用于确证转座的成功与否。未发生重组的 bacmid,用 M13 引物扩增可以得到约 300bp 的片段,经重组的 bacmid,相应的 PCR 扩增可得到包含转座子内侧序列(约 2300bp)和外源基因的片段。其中重组 bacmid-EGFP 的 PCR 扩

增产物大小为 3060bp,重组 bacmid-CMV-EGFPA 为 3978bp,重组 bacmid-CMV-EGFPB 为 4633bp。

1.2.3 昆虫细胞的培养、转染及感染:在无菌的 Grace 培养基中加入 10% 经 56℃ 灭活的胎牛血清,成为完全培养基。用 50mL 细胞培养瓶培养 Sf9 细胞,当细胞生长至瓶底覆盖率为 80% 左右,用弯头滴管吹下 Sf9 细胞,按 1:3 的比例接种到 3 个培养瓶中,28℃ 培养 3d 后再按同样的方法继续传代。提取好的 bacmid 用转染试剂 Cellfectin 按其标准操作规则转染对数生长前期的 Sf9 细胞,4d 后收集培养上清,再以 1:20 的体积比进行二次感染,以获得病毒滴度更高的培养上清。

1.2.4 病毒的收集及效价的检测:Sf9 细胞以 80% 覆盖率铺于 6 孔板中,置 28℃ 培养 1d,将收集的重组杆状病毒以 10 倍梯度稀释后接种 Sf9 细胞,感染 1h 后加入 2mL 用 Grace 配制的低熔点琼脂糖(0.8g/mL),置 28℃ 培养 5d,用中性红染色后计算空斑数量。本实验在转染后第 4 天收集含病毒培养上清,再经二次感染扩增后收集细胞培养上清,用空斑实

鉴定病毒的滴度,此时其病毒效价约为 1.2×10^7 PFU/mL (plaque forming unit, PFU, 空斑形成单位)。

1.2.5 重组杆状病毒对哺乳动物细胞的基因转移: 哺乳动物细胞用胰酶消化吹散后铺 24 孔培养板,每孔细胞数量约为 5×10^4 。37℃ 培养 12h 后弃去原培养基,加入 500 μ L 已收集的含重组杆状病毒的 S β 9 细胞培养上清或其稀释液,置 37℃ 一定时间后更换为原培养基。继续培养 48h 后进行观察和检测。

1.2.6 绿色荧光的观察: 表达绿色荧光蛋白的细胞置于 Nikon TE200 倒置荧光显微镜下采用蓝光激发观察,用数码相机 Nikon coolpix990 采集荧光图像。

1.2.7 流式细胞仪检测基因转移效率及阳性细胞平均荧光强度: 待检测的细胞经胰酶消化并吹散为单细胞悬液,1500r/min 离心 5min,用含 5% 胎牛血清的 PBS 重新悬浮。细胞悬浮液经 200 目的尼龙网过滤后使用流式细胞仪(Beckman Coulter EPICS XL)检测,激发波长为 488nm,检测波长为 525nm,用 EX-PO32 软件对采集的数据进行分析。每个细胞样品收集大约 2×10^4 个细胞,以未加病毒处理的细胞作为阴性对照,设定 eGFP 阳性细胞区(B 区),使阴性对照细胞样品在 B 区中的细胞数不超过 2%。基因转移效率为细胞样品在 B 区中的细胞数量百分率减去阴性对照细胞样品在 B 区中的数量百分率;阳性细胞平均荧光强度为细胞样品在 B 区中细胞荧光强度的平均值。

1.2.8 脂质体 LipofectAMINE 转染哺乳动物细胞: 哺乳动物细胞以 70% 的贴壁率铺于 24 孔培养板,37℃ 培养 12h。取待转染质粒 1 μ g 溶于 100 μ L 无血清培养基中(Solution A),取 LipofectAMINE 2 μ L 溶于 100 μ L 无血清培养基中(Solution B),再将 solution A、B 温和混匀,在室温下放置 45min。吸去 24 孔培养板中的培养基,以 1mL 无血清培养基洗涤细胞 3 次,加入 500 μ L 无血清培养基,再将 solution A、B 混合液中加于孔中,37℃ 孵育 6h。吸去 24 孔板中的混合液,再加入 500 μ L 完全培养基进行培养。48h 后进行观察和检测。

1.2.9 重组逆转录病毒感染哺乳动物细胞: pT67-EGFP 为本实验室构建的可分泌重组 Retro-EGFP 的细胞株。待感染哺乳动物细胞以 80% 的贴壁率铺 24 孔板,37℃ 培养 12h,弃去原培养基,加入 500 μ L 带重组逆转录病毒的 pT67-EGFP 细胞培养上清,37℃ 感染 12h 后更换为原培养基。继续培养 48h 后观察和检测。

2 结果

2.1 不同启动子引导的 EGFP 在 S β 9 细胞中的表达

感染了重组杆状病毒 BacV-EGFP、BacV-CMV-EGFP、BacV-CMV-EGFPB 的 S β 9 细胞,在 27℃ 培养 72h 后置于倒置荧光显微镜下用蓝光激发,可观察到感染了 BacV-EGFP 的 S β 9 细胞可高效表达 eGFP,感染了 BacV-CMV-EGFP、BacV-CMV-EGFPB 的 S β 9 细胞也可表达 eGFP,但表达水平较低(图版 I-A)。

2.2 不同构建方式的重组杆状病毒在 HepG2 细胞中的表达效果

以 500 μ L 经重组杆状病毒 BacV-EGFP、BacV-CMV-EGFP、BacV-CMV-EGFPB 感染 4d 后的 S β 9 细胞培养上清(其病毒滴度均经正常 S β 9 细胞培养上清稀释调整为 1.0×10^7 PFU/mL)分别取代在 24 孔板中培养的 HepG2 细胞的 DMEM 完全培养基(moi = 100),37℃ 孵育 8h 后再更换为原 DMEM 完全培养基,继续培养 24h 后用倒置荧光显微镜观察,并用流式细胞仪检测基因转移效率及荧光强度(图版 I-B)。我们发现 BacV-CMV-EGFP、BacV-CMV-EGFPB 均可有效进入 HepG2 细胞,并高效表达 eGFP,其基因转移和荧光表达效率基本相似,而 BacV-EGFP 孵育后的 HepG2 细胞未观察到 eGFP 的表达。实验过程中,HepG2 细胞的形态及生长未见明显异常。

2.3 带毒 S β 9 细胞培养上清的不同稀释比例及孵育时间对基因转移及表达效率的影响

将重组杆状病毒 BacV-CMV-EGFP 感染 4d 后的 S β 9 细胞的培养上清(1.2×10^7 PFU/mL)用 DMEM 完全培养基以不同比例稀释,取 500 μ L 在 37℃ 下以不同的时间分别孵育 HepG2 细胞,再全部更换为 DMEM 完全培养基。37℃ 培养 24h 后将细胞吹散,使用流式细胞仪检测基因转移效率及发光细胞的平均荧光强度,结果如图 2 所示。从结果可看出,孵育时间及病毒感染复数(病毒细胞比,moi)越高,病毒对细胞的基因转移效率及报告基因的表达强度就越高。

2.4 重组杆状病毒在 HepG2 细胞中的持续表达

以 500 μ L 经 1 倍稀释后的含有重组杆状病毒 BacV-CMV-EGFP 的 S β 9 细胞培养上清孵育 HepG2 细胞(moi = 50),37℃ 12h 后更换为原培养基,37℃ 继续培养,并以 2d 为间隔换 1 次培养液。每隔一定的时间采集细胞样品用流式细胞仪检测,结果如图 3 所示。结果显示,重组杆状病毒在 HepG2 细胞中可

长时间持续表达,其外源蛋白的表达峰出现在感染

后 24~48h 之间。

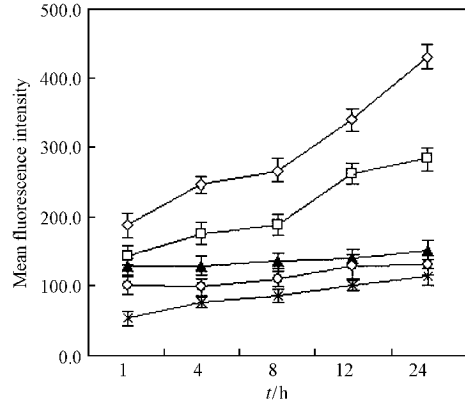
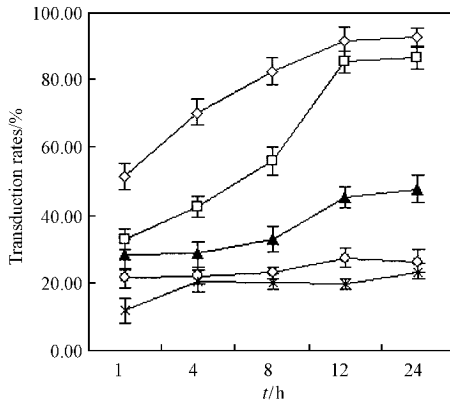


图 2 BacV-CMV-EGFP 的不同感染复数及孵育时间对其在 HepG2 中基因转移及表达效率的影响

Fig.2 Effect of different moi and incubation times on gene-transfer and expression efficiencies in HepG2 cells transduced with BacV-CMV-EGFP

moi : ◆—100 ; □—50 ; ▲—20 ; ○—10 ; ☆—5

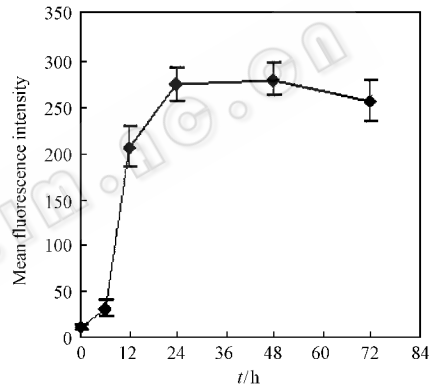
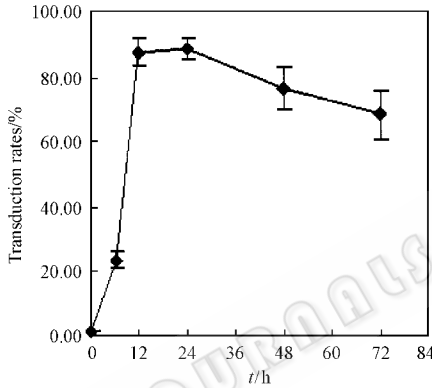


图 3 BacV-CMV-EGFP 转染 HepG2 细胞后在不同时间点的基因转移效率及 eGFP 的平均表达强度

Fig.3 Transduction rate and eGFP expression at different times in HepG2 cells transduced with BacV-CMV-EGFP

2.5 重组杆状病毒与脂质体和重组逆转录病毒的比较

pN31-EGFP 为在 CMV 启动子后带 EGFP 基因的哺乳动物细胞表达质粒。通过脂质体 LipofectAMINE 将 pN31-EGFP 分别转染入 HepG2、CV1 转染 48h 后用流式细胞仪检测转染效率和 eGFP 荧光强度。pT67-EGFP 细胞株为本实验室构建,可产生带 EGFP 基因表达盒的重组逆转录病毒,在传代培养 4d 后取其培养上清 500 μ L 直接感染 HepG2 细胞和 CV1 细胞,37 $^{\circ}$ C 感染 12h 感染后再全部更换为原培养基,继续培养 48h 后用流式细胞仪进行检测。在 HepG2 及 CV1 细胞中加入用 500 μ L 经哺乳动物细胞完全培养基 1 倍稀释后的含病毒 S ϕ 9 细胞培养上清(BacV-CMV-EGFPA, moi = 50),37 $^{\circ}$ C 12h 后更换为原培养基,继续培养 48h 后用流式细胞仪进行检测。检测结果如表 1 所示。从结果可看出重组杆状病毒 BacV-CMV-EGFPA 对 HepG2 及 CV1 细胞的基

因转移及表达效率远远优于脂质体 LipofectAMINE 及重组逆转录病毒系统。

表 1 不同基因转移系统对 HepG2、CV1 细胞的基因转移及表达效率的比较

Table 1 Comparison of the gene-transfer and expression efficiency in HepG2 and CV1 cells among different gene-transfer systems

	Gene-transfer rate		Mean fluorescence intensity	
	HepG2	CV1	HepG2	CV1
LipofectAMINE	29.6%	34.2%	138.1	103.4
Retro-EGFP	13.5%	18.2%	95.8	76.6
BacV-CMV-EGFPA	92.5%	95.6%	294.5	232.1

3 讨论

本实验对直接使用经重组杆状病毒感染 4d 后的 S ϕ 9 细胞培养上清对哺乳动物细胞进行基因转移的方法进行了研究。在对 HepG2 细胞的实验结果

中可看到这样的趋势:当孵育时间相同时,随着稀释倍数的提高即 moi 值的降低,基因转移效率及荧光表达效率逐步下降;当稀释倍数相同即 moi 相同时,随着孵育时间的延长,基因转移和表达效率在逐步提高。这说明,病毒滴度及孵育时间是影响外源基因转移及表达效率的重要因素,其中最主要的因素是病毒滴度。通过对细胞形态的直接观察发现,如果使用的是未经稀释的 Sf9 细胞培养上清,且在孵育时间较长的情况下,靶细胞的生长状况会受到较大影响,部分细胞形态异常,死细胞增多。因此结合对细胞形态及生长状态观察的结果,我们认为将感染 4d 后的 Sf9 细胞培养上清(病毒滴度 $\geq 1.0 \times 10^7$ PFU/mL)经哺乳动物细胞完全培养基 1 倍稀释后,37°C 孵育哺乳动物细胞 12h ($moi = 50$)作为实验条件较为合适,这既可达到较高的基因转移效率及表达效率,又不致对细胞造成损伤。

目前对哺乳动物细胞的基因转移技术中,脂质体和重组逆转录病毒都是较常用的技术。脂质体转染的优点是操作简单、所需时间短,适用细胞范围广,但在一般情况下其转染效率相对较低,难以满足一些对基因表达效率要求较高的实验的需要。重组逆转录病毒可感染多种哺乳动物细胞,并可与宿主细胞基因组发生稳定整合。但逆转录病毒一般只进入分裂细胞,对于分裂不旺盛的细胞其感染效率较低。同时逆转录病毒系统的应用必须要有较高的病毒滴度作为保证,如果直接使用逆转录病毒系统包装细胞系的含病毒培养上清用于感染实验,其病毒滴度往往难以满足实验要求。因此需通过各种方式提高逆转录病毒的滴度,这已成为逆转录病毒系统应用研究中的重要内容,实际上这也是制约其得到广泛应用的一个重要因素。并且要获得可产生高滴度重组病毒的包装细胞系通常需要经过较长的筛选及克隆化过程,痘病毒、腺病毒系统在实际中也存在这一问题,因此对于一些日常探索性的实验来说,应用这些系统所需要的时间和成本都是比较高的。

从本文结果可看出,可直接使用重组杆状病毒感染 4d 后 Sf9 细胞的培养上清对哺乳动物细胞进行外源基因转移实验,其病毒滴度已能够满足实验的需要,因此在无特别要求的情况下可无需再进行

浓缩纯化,这就大大减少了实验的工作量,提高了实验的方便性。通过与脂质体 LipofectAMINE 及逆转录病毒系统的比较表明,在同样未经浓缩纯化等特殊处理的条件下重组杆状病毒对哺乳动物细胞的基因转移及表达效率是最高的。并且杆状病毒在进入哺乳动物细胞后自身不发生复制,对细胞也无明显的毒性,这样有利于排除载体效应的影响,对进行基因功能研究是十分有利的。因此经过适当改造后的 Bac-to-Bac 重组杆状病毒表达系统可作为一种对哺乳动物细胞简便高效的基因转移表达载体,特别是应用于对某些特定基因的功能研究方面。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Shoji I, Aizaki H, Tani H *et al.* Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J Gen Virol*, 1997, **78**: 2657 - 2664
- [2] Kost T A, Condreay J P. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol*, 2002, **20**(4): 173 - 180
- [3] Carbonell L F, Miller L K. Baculovirus interaction with nontarget organisms: a vs-borne repressor gene is not expressed in two mammalian cell lines. *Appl Environ Micro Biol*, 1987, **53**: 1412 - 1417
- [4] Hofmann C, Sandig V, Strauss M *et al.* Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 10099 - 10103
- [5] Boyce F M, Bucher N L R. Baculovirus mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 2348 - 2352
- [6] Condreay J P, Witherspoon S M, Clay W C *et al.* Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(1): 127 - 132
- [7] Duisit G, Saleun S, Douthe S *et al.* Baculovirus vector requires electrostatic interactions including heparan sulfate for efficient gene transfer in mammalian cells. *J Gene Med*, 1999, **1**(2): 93 - 102
- [8] Delaney W E, Isom H C. Hepatitis B virus replication in human HepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant baculovirus. *Hepatology*, 1998, **28**: 1134 - 1146
- [9] Bac-to-Bac baculovirus expression systems instruction manual. Invitrogen life technologies 2002

Rapid and Efficient Expression of Foreign Genes in Mammalian Cells by Baculovirus Vectors

CHENG Tong XU Chen-Yu WANG Ying-Bin CHEN Min WU Ting XIE Xiao-Yan ZHANG Jun XIA Ning-Shao*
(Key Laboratory of Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Ministry of Education, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The baculovirus insect cell expression system has been used extensively for the expression of recombinant proteins in insect cells. Recently, reports have described that recombinant baculoviruses can transduce a broad spectrum of primary and established mammalian cells, which shows the baculoviruses could serve as a new gene-transfer vehicle for mammalian cells. In this report, we further research the modification of baculovirus vector and the way to deliver exogenous gene into mammalian cells. On the base of Bac-to-Bac baculovirus insect cell expression system, two recombinant baculoviruses (BacV-CMV-EGFPA, BacV-CMV-EGFPB) were constructed containing different direction of CMV promoters which control the expression of a reporter gene (EGFP). We found that CMV promoter could direct expression of reporter gene in Sf9 cells with relatively low efficiency. The culture supernatant of Sf9 cells which have been infected by the recombinant baculoviruses for four days were collected and the titers of the viruses in culture supernatant were determined by plaque assay on Sf9 cells. The HepG2 cells, an human hepatocellular carcinoma cell line, were directly incubated with the collected culture supernatant which contains the recombinant baculoviruses for 8 hours in 37°C CO₂ incubator (moi = 100). Twenty-four hours post transduction the efficiencies of gene-transfer and expression were analyzed by flow cytometry (FCM) which detect the green fluorescence of individual cells. Results show that these two recombinant baculoviruses have similar gene-transfer and expression efficiency in HepG2 cells, which means the direction of CMV promoters has no effects on reporter gene expression. The optimal transduction conditions of incubating the mammalian cells with the culture supernatant of Sf9 cells infected by recombinant baculoviruses for four days were determined by FCM assay in HepG2 cells. The HepG2 cells inoculated in 24-well plate (5 × 10⁴/well) were incubated with the culture supernatant (BacV-CMV-EGFPA, 1.2 × 10⁷ pfu/mL) serially diluted by DMEM culture medium containing 10% FBS and the transduction times ranged from 1 to 24 hours. Twenty-four hours post transduction the efficiencies of gene-transfer and expression were analyzed by FCM. Results show that incubating the target cells with the 1:1 diluted culture supernatant (moi = 50) for 12 hours in 37°C CO₂ incubator would achieve the highest infection and expression efficiency with the least impairment on cell viability. We compared the gene-transfer and expression efficiency of recombinant baculovirus in HepG2 and CV1 cells with lipofectAMINE and recombinant retrovirus system, results show that under the similar conditions the recombinant baculovirus could achieve the highest gene-transfer and expression efficiency than the other two systems. So we can draw a conclusion that directly incubating the mammalian cells with the culture supernatant of the infected Sf9 cells could serve as a very convenient way for rapid and efficient expression of foreign gene in mammalian cells.

Key words Bac-to-Bac baculovirus/insect cell expression system, green fluorescent protein, mammalian cells, lipofectAMINE, retrovirus

Received: 04-07-2003

This work was supported by Grant from 863 Program (No. 2001AA628120).

* Corresponding author. Tel: 86-592-2184110; Fax: 86-592-2184110; E-mail: nsxia@jijinxian.xmu.edu.cn
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>