

# A $\alpha$ MNPV-1A 在转 P<sup>35</sup> 基因细胞系中 连续传代的研究\*

李守信<sup>1,2</sup>, 李长友<sup>2</sup>, 郑桂玲<sup>2</sup>, 吴文君<sup>1</sup>, 李国勋<sup>2</sup>

(1 西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨凌 712100; 2 山东莱阳农学院 害虫生防实验室, 山东 青岛 266109)

[摘要] 报道了1株粉纹夜蛾转 P<sup>35</sup> 基因工程细胞系, 命名为 Tn5B-35。苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒(A *utographa californica* nuclear polyhedrosis virus, A $\alpha$ MNPV) 在该细胞系中连续传代至25代, 与原始细胞系 Tn5B1-4 相比较, 其感染率、多角体产量、滴度以及杀虫毒力的变化趋势均比较平稳, 并未出现“传代效应”。

[关键词] 核型多角体病毒; 昆虫细胞系; 粉纹夜蛾; 传代效应

[中图分类号] S476<sup>+</sup>. 13

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)06-0096-05

昆虫病毒在昆虫细胞系中连续传代后, 其感染力和多角体产量呈现明显下降趋势, 称之为“传代效应”(Passage effect)<sup>[1]</sup>。在培养细胞时, 不良营养条件和过度理化压力都有可能诱导细胞凋亡, 而由病毒感染而引起的细胞凋亡(PDV)是造成传代效应的一个重要原因。许多研究<sup>[2-6]</sup>认为, 来自于苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒(A *utographa californica* nuclear polyhedrosis virus, A $\alpha$ MNPV) 的 P<sup>35</sup> 基因, 能有效抑制病毒感染而引起的细胞凋亡, 调控病毒早期基因转录, 从而使病毒顺利复制, 完成其最大生长周期。本研究利用构建转 P<sup>35</sup> 基因工程细胞系来克服传代效应, A $\alpha$ MNPV 在转 P<sup>35</sup> 基因细胞系 Tn5B-35 中连续多次传代, 表现出良好的性状, 展示了广阔的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

培养基 Grace 培养基(美国 Invitrogen 公司生产)添加体积分数 10% 的胎牛血清。

甜菜夜蛾幼虫 田间采集, 在室内人工饲料饲养。

病毒 野生型 A $\alpha$ MNPV-1A, 美国康乃尔大学 Granados R R 教授惠赠。

细胞系 转 P<sup>35</sup> 基因细胞系 Tn5B-35(李国勋教授构建)和对照细胞系 Tn5B1-4(Granados R R 教

授惠赠)。

### 1.2 方法

1.2.1 病毒 A $\alpha$ MNPV-1A 在细胞系 Tn5B-35 和 Tn5B1-4 中的离体传代 用 Granados 等<sup>[7]</sup>的方法, 将 2.5 mL 含 5 × 10<sup>5</sup> 个细胞的细胞液移入培养瓶中, 培养 24 h 后弃去培养基, 接种 1 mL 毒源 A $\alpha$ MNPV-1A, 在 28 ℃ 吸附 3 h, 弃去病毒液, 重新加入 2.5 mL 培养基培养 120 h, 将培养物离心, 上清即为第 1 代病毒, 按上述方法接种 Tn5B-35 和 Tn5B1-4, 依次得到第 2 代, 第 3 代, ..., 第 25 代病毒。传代病毒 A $\alpha$ MNPV-1A 均保存在 4 ℃ 冰箱中待用。

1.2.2 感染率的测定 将 2.5 mL 含 5 × 10<sup>5</sup> 个对数期细胞的 Tn5B-35 和 Tn5B1-4 分别移入 25 mL 培养瓶中, 培养 3 h, 待细胞贴壁后, 弃去培养基, 接种 1 mL 毒源 A $\alpha$ MNPV-1A, 在 28 ℃ 吸附 3 h 后弃去病毒液, 重新加入 2.5 mL 培养基培养。每天用显微镜观察细胞被感染情况。在接毒 48 h 后, 视细胞内出现多角体为感染特征, 用血球计数板计数细胞被感染率。

1.2.3 多角体产量的测定 病毒 A $\alpha$ MNPV-1A 接毒 7 d 后, 破碎细胞, 使多角体释放到细胞外, 检查多角体产量。将病毒感染后的细胞悬液用超声波解器 80% 振幅处理 2 次, 每次 30 s, 使细胞裂解破碎, 完全释放出多角体, 用血球计数板计数, 重复 3

\* [收稿日期] 2005-01-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30370963)

[作者简介] 李守信(1979-), 男, 陕西咸阳人, 在读硕士, 主要从事农药毒理学研究。

[通讯作者] 李国勋(1942-), 男, 吉林榆树人, 教授, 博士生导师, 主要从事害虫生防研究。E-mail: gxli@lyac.edu.cn

次, 根据每毫升多角体 (OBs) 个数与感染细胞个数的比值, 求出每个感染细胞中多角体的平均数量。

#### 1.2.4 病毒 50% 组织培养感染剂量 (TCID<sub>50</sub>) 测定

采用终点稀释法将病毒作系列稀释到  $10^{-8}$  mL<sup>-1</sup>, 在 96 孔细胞培养板的每孔中加入  $2 \times 10^4$  个细胞, 培养 24 h 后加入各级病毒 0.1 mL, 培养 7 d 后以产生多角体为感染, 按照 Reed 等<sup>[8]</sup> 的方法, 计算病毒液的 TCID<sub>50</sub>。

1.2.5 多角体的生物测定 收集 A $\alpha$ MNPV-1A 在细胞系中连续传代产生的多角体, 将来自 1, 3, 5, ..., 25 代的病毒多角体的浓度稀释至  $1 \times 10^7$  mL<sup>-1</sup>, 饲喂饥饿处理 12 h 的甜菜夜蛾 3 龄幼虫, 参照 Hughe P R 等<sup>[9]</sup> 的方法测定传代后病毒多角体的毒

力变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 病毒感染率

试验观察发现, 细胞接毒 A $\alpha$ MNPV-1A 24 h 后表现发病症状, 细胞核增大, 核内染色质凝聚成块, 细胞膨胀至原来的 1.5 倍左右。48 h 后核内明显充满多角体直至破裂, 大量多角体释放到细胞外。A $\alpha$ MNPV-1A 在转  $P^{35}$  基因细胞系 Tn5B-35 中连续传代 25 次, 不同代数病毒 A $\alpha$ MNPV-1A 对 Tn5B-35 和 Tn5B1-4 细胞系的感染率与传代次数的关系如图 1 所示。

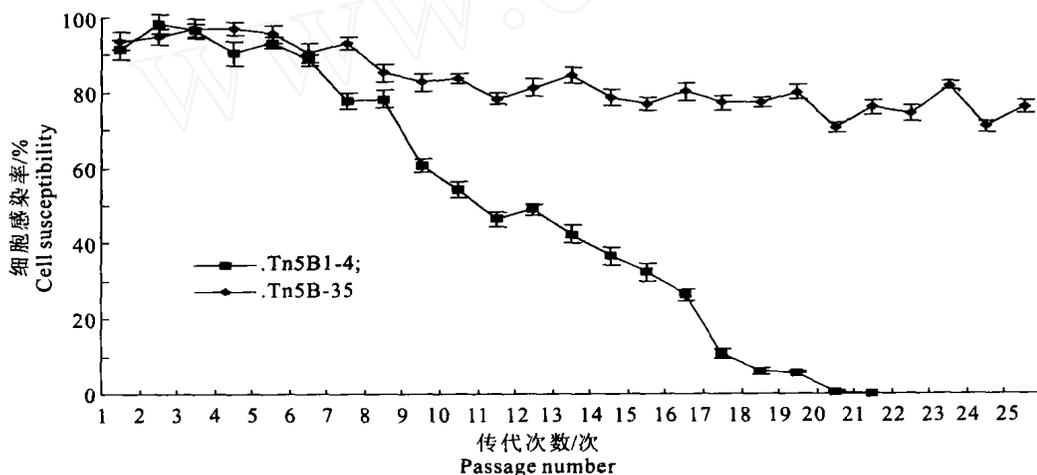


图 1 连续传代后细胞感染率的变化

Fig 1 Relation between the cell susceptibility and virus passage numbers

由图 1 可见, A $\alpha$ MNPV-1A 在转  $P^{35}$  基因细胞系 Tn5B-35 连续 25 次传代过程中, 细胞感染率最高可达到第 3 代的 97%, 最低是第 20 代的 7.06%; 而在 Tn5B1-4 细胞系中, 细胞感染率最高的是第 2 代的 98.2%, 最低是第 21 代的 0%。1~5 代病毒在 Tn5B-35 细胞系中的感染率变化趋势比较平稳, 5~25 代缓慢下降。而在 Tn5B1-4 细胞系中, 1~5 代的感染率趋于平稳, 5~21 代感染率急剧下降, 直至第 21 代无感染率。表现出明显的“传代效应”。

### 2.2 多角体产量

在显微镜下观察, 接毒细胞一般 48 h 后有明显的多角体出现, 64 h 后有大量的多角体释放到细胞外; 多角体形状一般为圆形或椭圆形, 也有少量的大四方体出现 (图 2-a, b)。A $\alpha$ MNPV-1A 在 Tn5B-35 中连续 25 次传代过程中, 15~25 代产生的多角体形态不如 1~8 代明显, 数量有所减少, 个体也较前

几代小 (图 2-c)。而在 Tn5B1-4 中, 15~25 代只有很少的多角体产生, 且个体小、不完整, 细胞大量凋亡, 直至最后无多角体 (图 2-d)。

不同病毒代数的多角体产量与病毒代数的关系如图 3 所示。由图 3 可以看出, A $\alpha$ MNPV-1A 在转  $P^{35}$  基因细胞系 Tn5B-35 中连续 25 次传代过程中, 多角体产量最高的为第 4 代 (93.5 OBs/cell), 最低为第 18 代 (59.8 OBs/cell); 而在 Tn5B1-4 细胞系中, 多角体产量最高的为第 4 代 (88.7 OBs/cell), 到第 21 代无多角体产生。在转  $P^{35}$  基因细胞系 Tn5B-35 中, 多角体产量 1~4 代缓慢上升, 4~13 代缓慢下降, 13~25 代趋于平稳; 而在 Tn5B1-4 细胞系中, 1~4 代也呈现缓慢上升趋势, 但 4~25 代多角体产量呈急剧下降趋势, 直至第 21 代无多角体产生, 表现出明显的“传代效应”。

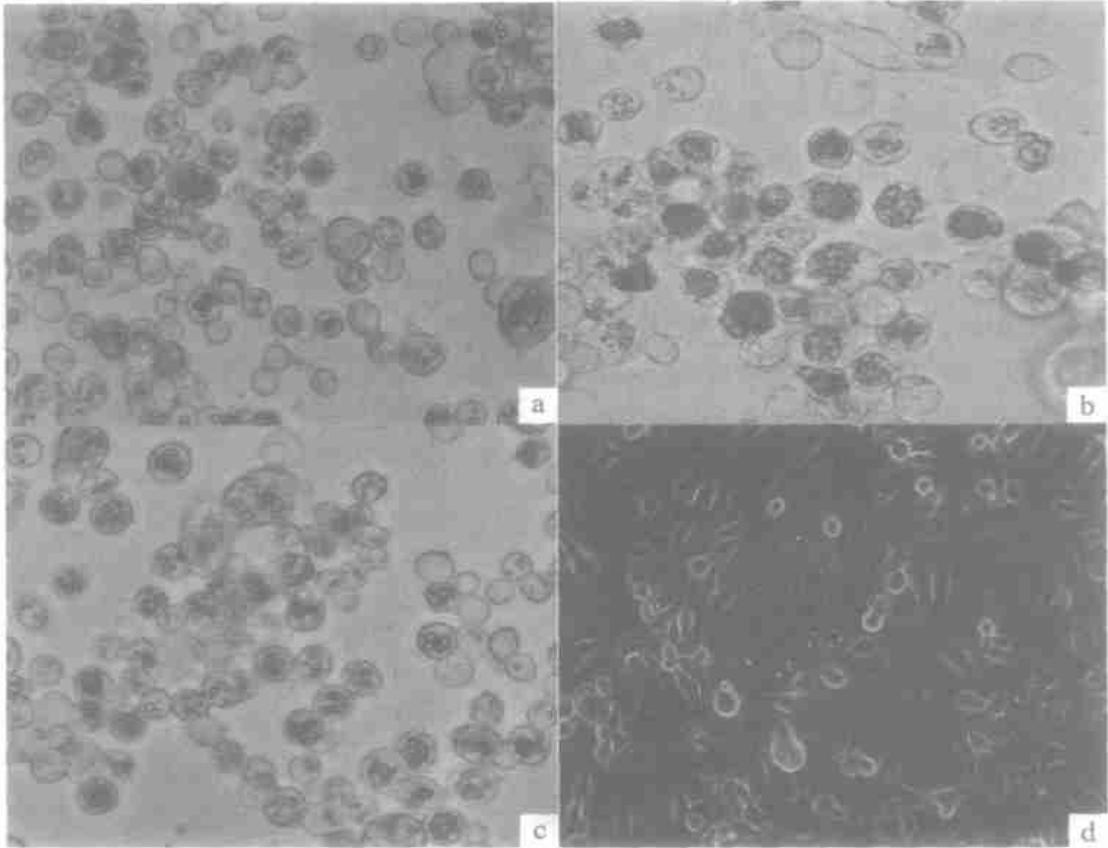


图 2 A dMNPV-1A 在细胞系 Tn5B-35 和 Tn5B1-4 中的病理变化(300 ×)

a 第 1 代病毒感染 Tn5B-35 细胞系 48 h 后, 细胞内产生的多角体为圆形, 且数量较多, 形态特征比较明显; b 第 1 代病毒感染 Tn5B1-4 细胞系 48 h 后, 细胞内产生的多角体为圆形, 且数量较多, 形态特征比较明显; c 第 20 代病毒感染 Tn5B-35 细胞系 48 h 后, 细胞内产生的多角体形状不规则, 形态特征也不明显; d 第 20 代病毒感染 Tn5B1-4 细胞系 48 h 后, 细胞内产生明亮的凋亡小体, 看不到多角体产生, 细胞大量凋亡

Fig. 2 Pathologic characterization of A dMNPV-1A replication in Tn5B-35 and Tn5B1-4 cell lines (300 ×)

a The first occlusion bodies are more and round in shape in Tn5B-35 after 48 h; b The first occlusion bodies are more and round in shape in Tn5B1-4 after 48 h; c The twentieth occlusion bodies are anomalous in shape in Tn5B-35 after 48 h; d The twentieth occlusion bodies aren't seen after 48 h, but there are bright apoptotic bodies in Tn5B1-4

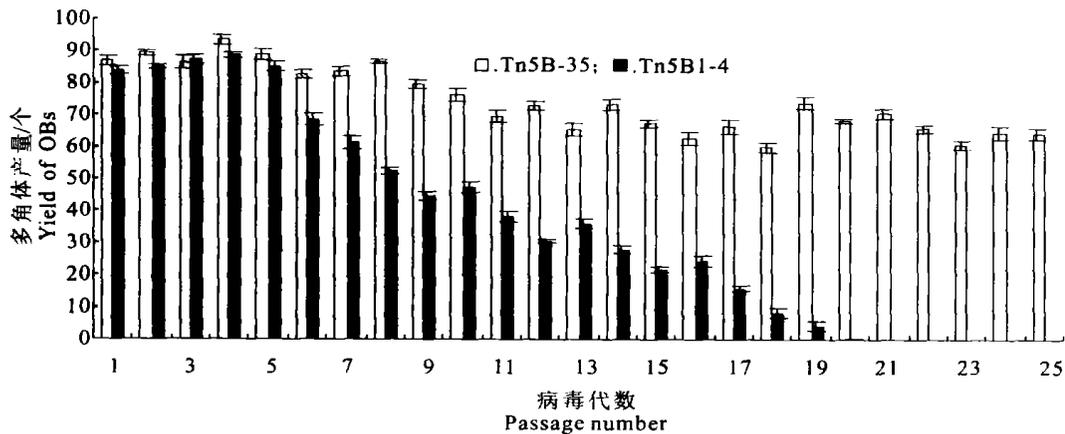


图 3 病毒在细胞系中连续传代后的多角体产量的变化

Fig. 3 OB yields at successive passage for serially passaged A dMNPV in cell lines

### 2.3 病毒 50% 组织培养感染剂量(TC D<sub>50</sub>)

按 Reed 等<sup>[8]</sup>的方法计算出各代病毒的滴度值(TC D<sub>50</sub>/mL)及其对数值(log TC D<sub>50</sub>/mL), 各代病毒的 log TC D<sub>50</sub>/mL 与病毒代数的关系见如图 4 所示。由图 4 可以看出, A $\alpha$ MNPV-1A 在转 P<sup>35</sup> 基因细胞系 Tn5B-35 中连续 25 次传代过程中, 第 23 代病毒的 TC D<sub>50</sub>值最高, 为  $8.39 \times 10^7$  PFU /mL, 第 1 代病毒的 TC D<sub>50</sub>/mL 值最低, 为  $5 \times 10^6$  PFU /mL;

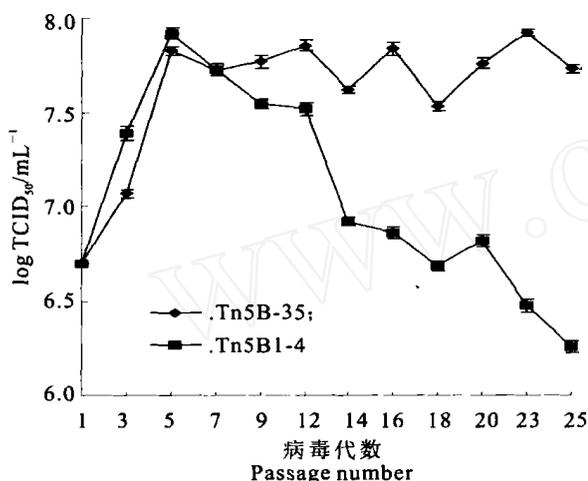


图 4 病毒在细胞系连续传代后病毒滴度的变化

Fig. 4 Budded virus titers at successive passage intervals or serially passaged A $\alpha$ MNPV in cell lines

### 2.4 不同代数病毒多角体对甜菜夜蛾幼虫的毒力测定

试验观察发现, 试虫发病后行动迟缓, 食欲减退或停止取食, 虫体肿胀, 体色发白或变淡, 后期腐烂, 有脓状白色或黄色液体流出。从第 4 天开始发病, 以第 4~5 天发病数量最多, 第 6 天发病减少, 第 7 天不再发病。第 8 天检查, 不同代数病毒多角体对甜菜夜蛾幼虫的校正死亡率与多角体代数的关系, 结果如图 5 所示。由图 5 可以看出, 在 Tn5B-35 细胞系中离体复制不同代数的 A $\alpha$ MNPV-1A 病毒多角体对甜菜夜蛾的校正死亡率, 以第 5 代最高(81.9%), 第 25 代最低(61.9%); 但在 Tn5B1-4 细胞系中, 病毒多角体对甜菜夜蛾的校正死亡率以第 1 代最高(78.4%), 第 25 代最低(2.6%)。在 Tn5B-35 细胞系中的病毒多角体对甜菜夜蛾的校正死亡率除第 5~14 代缓慢下降以外, 其他各代多角体对甜菜夜蛾幼虫的毒力相差不大, 变化趋势比较平稳, 但在 Tn5B1-4 中, 获得的多角体对甜菜夜蛾的毒力, 随传代次数增加呈现直线下降趋势。

而在 Tn5B1-4 细胞系中, 第 5 代病毒的 TC D<sub>50</sub>/mL 值最高为  $8.32 \times 10^7$  PFU /mL, 第 25 代病毒的 TC D<sub>50</sub>/mL 值最低为  $1.8 \times 10^6$  PFU /mL。在 Tn5B-35 细胞系中, 病毒 A $\alpha$ MNPV-1A 的滴度表现为 1~5 代快速上升, 5~25 代趋于平稳; 而在 Tn5B1-4 细胞系中, 病毒 A $\alpha$ MNPV-1A 的滴度为 1~5 代快速上升, 5~25 代呈现一直下降的趋势。

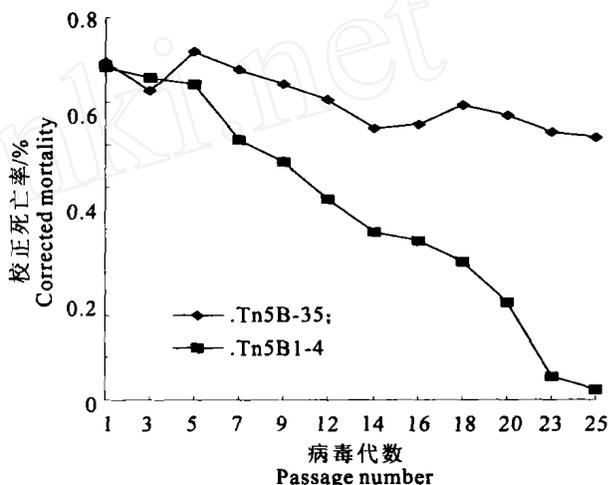


图 5 各代多角体对甜菜夜蛾幼虫校正死亡率的变化

Fig. 5 Relationship between corrected mortality and virus passage number

## 3 讨论

昆虫病毒在细胞系中连续多次传代后, 多角体形态、产量和病毒感染率一般都会有所变化。Potter<sup>[10]</sup>研究发现, 培养细胞传代达 10 次以上的病毒, 其致病性下降。Yamada K I<sup>[11]</sup>报道, HzSNPV 在其同源细胞系内连续传代 20 次, 病毒滴度和多角体产量明显下降。Li Guo-xun 等<sup>[12]</sup>和 Granados 等<sup>[13]</sup>研究发现, 粉纹夜蛾单粒包埋核型多角体病毒(TnSNPV)在同源细胞系中连续传代后, 芽生病毒(BV)对细胞系一直有很强的侵染力, 但随传代数的增加, 多角体产量及对幼虫的侵染力明显下降。但 Sohi S S<sup>[14]</sup>报道, 合毒蛾(*Orgyia leuostigma*)SNPV BV 在其同源细胞系 OL-13 中连续传 60 代以后, 感染性仍未下降。这说明病毒在连续传代后, 毒力发生变化的时间和程度, 由于病毒-离体细胞系统的不同而不同。

由于 Tn5B1-4 细胞系对 A $\alpha$ MNPV-1A 十分敏感, 所以其在杆状病毒研究中具有重要意义。而且, Tn5B1-4 细胞系在表达重组蛋白方面也已被证明具

有优良的特性。Lin Guang-yun<sup>[15]</sup>用具有  $P^{35}$  的表达载体转化 Sf9 细胞, 增殖克隆细胞系并研究了营养缺乏以及分泌碱性磷酸酶(SEAP) 和  $\beta$  半乳糖苷酶( $\beta$ gal) 的表达, 同野生型细胞相比, 转化细胞表现出对放线菌素-D (Actinomycin-D) 诱导的凋亡抵抗性增加以及明显的营养缺乏抵抗性增加, 转化细胞的 SEAP 表达超过了亲本 Sf9 1 倍。Tian Jian-xiao 等<sup>[16]</sup>将猴病毒 SV 40 大 T 抗原基因转入 Tn5B1-4 中, 克隆筛选出新株 Tn5B-40, 研究表明, 该克隆株对  $\Delta$ CMNPV-1A 的敏感性和生长特性与原始细胞系无显著差异, 但碱性磷酸酶(SEAP) 和  $\beta$  半乳糖苷酶( $\beta$ gal) 的表达均明显高于野生型细胞系。

本研究结果表明,  $\Delta$ CMNPV-1A 在转  $P^{35}$  基因细胞系 Tn5B-35 中连续传代 25 次, 感染率、多角体

产量、病毒滴度以及杀虫活性差异不是很大, 变化趋势也不明显, 表明来源于  $\Delta$ CMNPV-1A 的  $P^{35}$  基因, 其编码的  $P^{35}$  蛋白可以抑制由病毒感染而引起的细胞凋亡, 使病毒能顺利地复制。而在其原始细胞系 Tn5B1-4 中, 其病毒的感染率、多角体产量、病毒滴度以及杀虫活性呈现明显下降趋势, 出现了所谓的“传代效应”。这可能是病毒在细胞内连续传代后, 病毒发生变异和细胞大量凋亡所致。由此可见, 转  $P^{35}$  基因细胞系 Tn5B-35 在用于生产杆状病毒方面表现出了良好的性状, 展示了广阔的应用前景, 其不仅可以应用于病毒杀虫剂的大量工业化生产, 而且还可应用于基因工程药用蛋白质的大量生产, 具有良好的经济效益和社会效益。

#### [参考文献]

- [1] 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1998
- [2] Clem R J, Marcus F, Miller L K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells[J]. Science, 1991, 254: 1388- 1390
- [3] Shizuo G K, Majumdar M. Identification and characterization of  $P^{35}$  gene of *Banyx mori* nuclear polyhedrosis virus can prevent virus-induced apoptosis[J]. J Virol, 1993, 67(1): 455- 463
- [4] Norman E C, Clem R J, Miller L K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif[J]. J Virol, 1993, 67(4): 2168- 2174
- [5] Binbaum M J. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs[J]. J Virol, 1994, 68: 2521- 2528
- [6] Palli S R, Caputo G F, Sohi S S, et al. CMNPV blocks  $\Delta$ CMNPV induced apoptosis in a continuous midgut cell line[J]. J Virol, 1996, 222: 201- 213
- [7] Granados R R, Li Guoxun. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus[J]. J Invert Pathol, 1994, 64: 260- 266
- [8] Reed L J, Muench H A. A simple method of estimating fifty percent end-points[J]. Am J Hyg, 1938, 27: 493- 497.
- [9] Hughe P R, Wood H A. A modified droplet feeding method for rapid assay of bacillus thuringiensis and baculovirus in noctuid larvae[J]. J Invertebr Pathol, 1986, 48: 187- 192
- [10] Potter K N. Strain selection during serial passage of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus[J]. J Virol, 1976, 18: 1040- 1050
- [11] Yamada K I. Serial passage of *Heliothis zea* singly embedded nuclear polyhedrosis virus in a homologous cell line[J]. J Invert Pathol, 1982, 39: 185- 191.
- [12] Li Guo-xun, Li T, Wang P. Serial passage of *Trichoplusia ni* SNPV [J]. Entomologia Sinica, 2000, 7(2): 147- 154
- [13] Granados R R, G X Li, Anja C G D, et al. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus[J]. J Invertebr Pathol, 1994, 64: 260- 266
- [14] Sohi S S. Replication and serial passage of a single enveloped baculovirus of *Orygia leucostigma* in homologous cell lines[J]. Intervirology, 1984, 21: 50- 60
- [15] Lin Guang-yun. Stable cell lines expressing baculovirus  $P^{35}$ : resistance to apoptosis and nutrient stress, and increased glycoprotein secretion[J]. In Vitro Cell Dev, Biol-A nimal, 2001, 37: 293- 302
- [16] Tian Jian-xiao, Li Chang-you, Zheng Gui-ling, et al. A new cell clone derived from *Trichoplusia ni* Tn5B1-4 cells[J]. Entomologia Sinica, 2004, 11(3): 165- 171.

(下转第 106 页)

- [18] 代红艳, 张志红, 吴禄平, 等. 甜樱桃茎尖培养及 PNRSV 的 RT-PCR 检测[J]. 园艺学报, 2003, 30(1): 87- 89.
- [19] Marthe Brison. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of two interspecific *Prunus* rootstocks[J]. Plant Science, 1995, 105: 235-242.
- [20] 安建平, 王廷璞, 焦成瑾, 等. 莱阳矮樱桃组培快繁中的激素配比研究[J]. 天水师范学院学报, 2002, 22(5): 30- 33.
- [21] 吴 霞, 上官小霞, 李燕娥. 樱桃组织培养和快速繁殖技术体系的研究[J]. 山西农业科学, 2002, 30(2): 49- 51.

## *In vitro* shoot tip tissue virus-free culture of sweet cherry

FU Hong-qi, Wu Yun-feng, Wang Rui, Hao Xin-an

(College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Buds or tender stem of sweet cherry as the explant, the micropropagation was studied. The culture medium of MS+ 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 5.0-10.0 mg/L + sucrose 30 g/L + agar 7 g/L was screened out and used, its buds were up to more than 6. Meanwhile, the inducing rate on culture medium of 1/2MS+ BA 0.7 mg/L + NAA 0.2 mg/L + sucrose 20 g/L + agar 7 g/L was responsible for root growth up to 75.1% and the survival rate by transplanting up to more than 80.5% were accounted for the optimum one. Using biological technique, apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) and Prunus dwarf virus (PDV) were primary detected in some of sweet cherry plantlets *in vitro*, and the results showed the virus-free rate of ACLSV and PDV were 39.4% and 48.1% respectively on 0.5-0.8 mm shoot tip; the virus-free rate of ACLSV and PDV were 75.8% and 78.6% on less than 0.5 mm shoot tip, which proved that ACLSV and PDV could be eliminated effectively from sweet cherry plantlets *in vitro* by culture of shoot tip less than 0.5 mm.

**Key words:** sweet cherry; shoot tip culture; virus-free culture; virus-free plants

(上接第 100 页)

**Abstract ID:** 1671-9387(2005)06-0096-EA

## Serial passage of AdMPV-1A in a transfected P<sup>35</sup> gene cell line

LI Shou-xin<sup>1,2</sup>, LI Chang-you<sup>2</sup>, ZHENG Gui-ling<sup>2</sup>, WU Wen-jun<sup>1</sup>, LI Guo-xun<sup>2</sup>

(1 Institute of Pesticide, Northwest A & F University, Shaanxi, Yangling 712100, China;

2 Laboratory of Pest Biological Control, Laiyang Agricultural College, Qingdao, Shandong 266109, China)

**Abstract:** A new transfected P<sup>35</sup> gene cell line, Tn5B-35, was derived by *Trichoplusia ni* Tn5B1-4 cell line. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AdMPV) was passaged in Tn5B-35 cells for 25 passages continuously and there was no significant change in morphology of the susceptibility, the changing trends of the occlusion bodies (OBs) yield, virus titer, and the larval corrected mortality after serial passage of the virus were stable, and there was no passage effect.

**Key words:** nuclear polyhedrosis virus; insect cell lines; *Trichoplusia ni*; passage effect