



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 117431216 B

(45) 授权公告日 2024. 03. 08

(21) 申请号 202311733555.2

(22) 申请日 2023.12.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117431216 A

(43) 申请公布日 2024.01.23

(83) 生物保藏信息
CGMCC NO.45727 2023.10.07

(73) 专利权人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所(中国动物卫生与流行病学中心哈尔滨分中心)

地址 150069 黑龙江省哈尔滨市南岗区马端街427号

(72) 发明人 尹鑫 汪孟航 刘杏

(74) 专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211

专利代理人 王志新

(51) Int.Cl.

C12N 5/09 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 110982795 A, 2020.04.10

CN 107574152 A, 2018.01.12

CN 109913424 A, 2019.06.21

US 2015204855 A1, 2015.07.23

WO 2014072526 A1, 2014.05.15

Florian Full et al..Centrosomal protein TRIM43 restricts herpesvirus infection by regulating nuclear lamina integrity.《NATURE MICROBIOLOGY》.2019,第4卷第164-176页.

审查员 梁韶

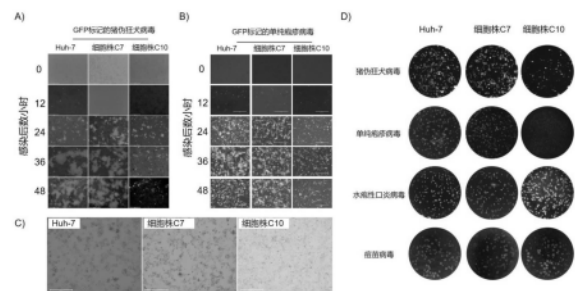
权利要求书1页 说明书7页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种 α 疱疹病毒钝感单克隆细胞株及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明公开一种 α 疱疹病毒钝感单克隆细胞株及其制备方法与应用,属于生物医学技术领域。本发明为了提供一种能针对性地靶向研究 α 疱疹病毒细胞间传播及其作用机制的细胞株和方法。本发明公开一种 α 疱疹病毒钝感单克隆细胞株,所述细胞株命名为人源肝癌传代细胞系 Huh7-C10,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为CGMCC NO.45727,保藏时间为2023年10月7日。应用于开发新一代增强型溶瘤疱疹病毒以及单轮感染减毒活疫苗的潜力。



1. 一种 α 疱疹病毒 (*Alphaherpesviruses*) 钝感单克隆细胞株, 其特征在于, 所述细胞株命名为人源肝癌传代细胞系Huh7-C10, 保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号为CGMCC NO.45727, 保藏时间为2023年10月7日。

2. 根据权利要求1所述的 α 疱疹病毒钝感单克隆细胞株, 其特征在于, 所述人源肝癌传代细胞系Huh7-C10感染 α 疱疹病毒显现为钝感。

3. 根据权利要求2所述的 α 疱疹病毒钝感单克隆细胞株, 其特征在于, 所述钝感是指 α 疱疹病毒在人源肝癌传代细胞系Huh7-C10之间无法细胞间扩散。

4. 权利要求1-3任一项所述的 α 疱疹病毒单克隆细胞株, 其特征在于, 所述 α 疱疹病毒为单纯疱疹病毒1型、牛疱疹病毒-1型和猪伪狂犬病病毒。

5. 权利要求1-3任一项所述的人源肝癌传代细胞系Huh7-C10在建立 α 疱疹病毒细胞间传播机制的模型中的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用, 其特征在于, 所述应用是以非诊断和治疗为目的的。

7. 一种 α 疱疹病毒细胞间传播机制模型的构建方法, 其特征在于, 所述方法的具体步骤如下: 基于权利要求1所述的人源肝癌传代细胞系Huh7-C10与商品化细胞Huh-7的差异, 利用基因组学或蛋白质组学, 获得调控 α 疱疹病毒细胞间传播的宿主因子的信息。

一种 α 疱疹病毒钝感单克隆细胞株及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,具体涉及一种 α 疱疹病毒钝感单克隆细胞株及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] α 疱疹病毒(Alphaherpesviruses)是一种具有神经嗜性的人兽共患性病毒。人类 α 疱疹病毒包括单纯疱疹病毒1型(Herpes simplex virus type 1,HSV-1)和单纯疱疹病毒2型(Herpes simplex virus type 2,HSV-2)及水痘-带状疱疹病毒(Varicella-zoster virus,VZV)。除此之外,还包括动物 α 疱疹病毒如伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus,PRV)、马疱疹病毒I型(Equine herpesviruses type 1,EHV-1)、牛疱疹病毒1型(Bovine herpesviruses type 1,BHV-1)、禽传染性喉气管炎病毒(Avian infectious laryngotracheitis virus,AILT)和马立克氏病病毒(Marek's disease virus,MDV)等。目前已对多数具有神经嗜性的 α 疱疹病毒进行了深入的研究,包括HSV-1、HSV-2、VZV、PRV、BHV-1,但常作为模式病毒来研究的主要是HSV-1和PRV。

[0003] α 疱疹病毒具有广泛的组织嗜性和神经侵袭力,病毒一旦进入外周或中枢神经系统,就会在神经元间进行跨突触传播,并对神经系统造成损伤,或在感觉神经元胞体中建立终身潜伏感染。潜伏感染再激活引发疾病过程中,细胞与细胞间传播是 α 疱疹病毒进行有效传播的主要途径,病毒的细胞间传播使其避免了中和抗体和先天性免疫系统抗病毒反应,同时为感染提供更高效、更快速的途径。然而,已被报道调控 α 疱疹病毒细胞间传播的宿主因子寥寥无几,原因在于:第一,目前研究多是以病毒重要糖蛋白gD、gH、gL、gB、gE和gI为主,仅筛选与以上少量糖蛋白互作的靶蛋白,将会遗漏与其他结构蛋白或非结构蛋白互作的重要宿主因子。第二,利用基因组学或蛋白质组学,直接搜寻调控 α 疱疹病毒细胞间传播的宿主因子,但候选基因众多导致筛选难度大,且无法针对性地靶向 α 疱疹病毒细胞间传播阶段。因此,宿主因子如何调控 α 疱疹病毒细胞间传播及其作用机制,这一科学问题仍亟待解决。

[0004] 总之,关于 α 疱疹病毒的细胞间传播机制,尤其是其如何挟持宿主细胞机器完成其生命周期的分子机制尚不明确,阻碍了新型诊疗制剂的开发及应用。因此, α 疱疹病毒的细胞间传播相关基础研究亟待开展。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了提供一种能针对性地靶向研究 α 疱疹病毒细胞间传播及其作用机制的细胞株和方法。

[0006] 本发明提供一种 α 疱疹病毒(Alphaherpesviruses)钝感单克隆细胞株,所述细胞株命名为人源肝癌传代细胞系Huh7-C10,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为CGMCC NO.45727,保藏时间为2023年10月7日。

[0007] 进一步地限定,其特征在于,所述人源肝癌传代细胞系Huh7-C10感染 α 疱疹病毒显

现为钝感。

[0008] 进一步地限定,所述钝感是指人源肝癌传代细胞系Huh7-C10之间无法细胞间扩散。

[0009] 本发明提供一种上述的 α 疱疹病毒单克隆细胞株,所述 α 疱疹病毒为单纯疱疹病毒1型、牛疱疹病毒-1型和猪伪狂犬病病毒。

[0010] 本发明提供一种上述的 α 疱疹病毒单克隆细胞株的制备方法,所述制备方法的具体步骤如下:培养商品化细胞Huh-7,使用流式细胞术分选单细胞克隆至96孔板中,以MOI=0.1的绿色荧光蛋白标记 α 疱疹病毒(HSV-1-GFP)感染单细胞克隆,通过荧光强度筛选 α 疱疹病毒感染能力差的单细胞株。

[0011] 本发明提供一种上述的人源肝癌传代细胞系Huh7-C10在建立 α 疱疹病毒细胞间传播机制的模型中的应用。

[0012] 进一步地限定,所述应用是以非诊断和治疗为目的的。

[0013] 本发明提供一种 α 疱疹病毒细胞间传播机制模型的构建方法,所述方法的具体步骤如下:基于人源肝癌传代细胞系Huh7-C10与商品化细胞Huh-7的差异,利用基因组学或蛋白质组学,获得调控 α 疱疹病毒细胞间传播的宿主因子的信息。

[0014] 有益效果:本发明从宿主细胞的角度出发,培养并筛选商品化细胞Huh-7,制备单细胞克隆,利用绿色荧光蛋白标记的 α 疱疹病毒(HSV-1-GFP)感染单细胞克隆细胞,通过荧光强度筛选到 α 疱疹病毒钝感细胞株Huh7-C10。通过一系列试验解析钝感Huh7-C10细胞不支持 α 疱疹病毒感染的哪一特定阶段,发现Huh7-C10细胞仅特异性影响 α 疱疹病毒的细胞间传播,说明钝感细胞株Huh7-C10可作为研究 α 疱疹病毒细胞间扩散的独特的细胞模型。

[0015] 转录组学分析显示人源肝癌传代细胞系Huh7-C10与商品化细胞Huh-7的差异基因仅有210种,其中下调基因198种,上调基因12种,使用生物信息学工具进行富集分析锚定调控 α 疱疹病毒细胞间传播的关键靶基因,探索 α 疱疹病毒挟持宿主机器实现快速传播的分子机制,不仅可更新 α 疱疹病毒的感染传播机制,且具有应用于开发新一代增强型溶瘤疱疹病毒以及单轮感染减毒活疫苗的潜力。

[0016] 【生物保藏信息】:人源肝癌传代细胞系Huh7-C10,保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为CGMCC NO.45727,保藏时间为2023年10月7日,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

附图说明

[0017] 图1为人源肝癌传代细胞系Huh7-C10影响PRV、HSV-1和BHV-1的感染结果图;A: α 疱疹病毒PRV-GFP感染商品化细胞Huh-7(Huh-7)、人源肝癌传代细胞系Huh7-C10(细胞株C10)和易感单克隆细胞C7(细胞株C10)的荧光图;B:HSV-1-GFP感染商品化细胞Huh-7(Huh-7)与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10(细胞株C10)和易感单克隆细胞C7(细胞株C10)的荧光图;C:BHV-1感染商品化细胞Huh-7(Huh-7)与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10(细胞株C10)和易感单克隆细胞C7(细胞株C10)的细胞病变结果图;D:病毒蚀斑实验分析商品化细胞Huh-7(Huh-7)与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10(细胞株C10)和易感单克隆细胞C7(细胞株C10)对PRV、HSV-1、VSV、VACV的易感性结果图;

[0018] 图2为人源肝癌传代细胞系Huh7-C10的细胞特性结果图;A:显微镜观测商品化细

胞Huh-7 (Huh-7) 与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10 (细胞株C10) 和易感单克隆细胞C7 (细胞株C10) 的形态特征;B:CCK-8检测商品化细胞Huh-7 (Huh-7) 与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10 (细胞株C10) 和易感单克隆细胞C7 (细胞株C10) 的细胞活性与增殖结果图;C:PCA分析商品化细胞Huh-7 (Huh-7)、易感单克隆细胞C7和人源肝癌传代细胞系Huh7-C10的相似性结果图;

[0019] 图3为 α 疱疹病毒在人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中的单轮生命周期不受影响结果图;A是WB检测 α 疱疹病毒细胞受体Nectin-1结果图;B是内吞作用的4种重要信号转导蛋白的蛋白含量结果图;C:倒置荧光显微镜检测有无DNA复制抑制剂药物作用下HSV-1-GFP在三种不同细胞的感染结果图;D:酶标仪检测MOI=5的rPRVTJ-Nluc感染商品化细胞Huh-7与亚克隆株的Luc荧光信号结果图;E是MOI=5的HSV-1-GFP感染后8 h细胞上清中的病毒基因拷贝数结果图;F是MOI=5的HSV-1-GFP感染后8 h细胞上清中的病毒的TCID₅₀结果图;

[0020] 图4为 α 疱疹病毒在人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中的细胞间扩散受限结果图;A:酶标仪检测MOI=0.01的rPRVTJ-Nluc感染商品化细胞Huh-7与亚克隆细胞株的Luc荧光信号结果图;B:激光共聚焦显微镜观测HSV-1-GFP感染商品化细胞Huh-7与亚克隆细胞株形成的合胞体结果图;C:HSV-1-GFP感染商品化细胞Huh-7与亚克隆细胞株的蚀斑荧光结果图;

[0021] 图5为调控 α 疱疹病毒细胞间传播的宿主差异候选基因结果图;A:人源肝癌传代细胞系Huh7-C10与商品化细胞Huh-7差异基因的火山图;B:GO富集分析差异基因描述的细胞组分结果图;C:GO富集分析差异基因描述的生物学过程结果图。

具体实施方式

[0022] 商品化细胞Huh-7 (人肝癌细胞) 是本发明提及的人源肝癌传代细胞系Huh7-C10的来源细胞, 购买于武汉益普生物科技有限公司, 货号:CL-0120。

[0023] rPRVTJ-Nluc记载在Wang Y, Wu H, Wang B, Qi H, Jin Z, Qiu HJ, Sun Y. A NanoLuc Luciferase Reporter Pseudorabies Virus for Live Imaging and Quantification of Viral Infection. *Front Vet Sci.* 2020 Sep 22;7:566446. doi: 10.3389/fvets.2020.566446. PMID: 33195544; PMCID: PMC7537659中。

[0024] HSV-1-GFP记载在已发表文章:Wang Y, Wu H, Wang B, Qi H, Jin Z, Qiu HJ, Sun Y. A NanoLuc Luciferase Reporter Pseudorabies Virus for Live Imaging and Quantification of Viral Infection. *Front Vet Sci.* 2020 Sep 22;7:566446. doi: 10.3389/fvets.2020.566446. PMID: 33195544; PMCID: PMC7537659中。

[0025] PRV-GFP为绿色荧光蛋白标记的HSV-1, 标记在PRV病毒基因组UL24中。

[0026] 实施例1. 获得人源肝癌传代细胞系Huh7-C10的方法

[0027] 1. 实验方法: 购买商品化细胞Huh-7, 将Huh-7在37°C, 5% CO₂细胞培养箱中生长, 随后采用0.25%胰蛋白酶溶液将细胞离散成单个细胞, 取该细胞悬液, 透过滤网, 加入流式细胞专用管中, 混匀后在流式细胞分选系统 SONY-MA900中上机, 将商品化细胞Huh-7单细胞株分选至96孔板中培养。待商品化细胞Huh-7单细胞株生长至单层后, 以MOI=0.1的绿色荧光蛋白标记 α 疱疹病毒 (PRV-GFP) 感染商品化细胞Huh-7单细胞株, 通过荧光强度筛选单细胞株。

[0028] 2. 实验结果: Huh-7经过流式细胞分选后的绝大部分单细胞株均是 α 疱疹病毒的易

感细胞,易感细胞株C7是其中选出的代表性单细胞株;出现极少量单细胞株是 α 疱疹病毒的钝感细胞,人源肝癌传代细胞系Huh7-C10是其中选出的代表性单细胞株。

[0029] 实施例2.人源肝癌传代细胞系Huh7-C10不支持 α 疱疹病毒感染的研究

[0030] 1.实验方法:将商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10培养至96孔板中,使用感染剂量MOI=0.1的带有绿色荧光蛋白的单纯疱疹报告病毒(HSV-1-GFP),或感染剂量MOI=0.01的绿色荧光蛋白标签的伪狂犬报告病毒(PRV-GFP)感染三种不同细胞,在倒置荧光显微镜下,观测病毒感染后0、12、24、36、48 h等时间点的荧光强度并拍照;

[0031] 2.同样将商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7与钝感单克隆细胞株Huh7-C10培养至96孔板中,使用感染剂量MOI=0.1的野生型牛疱疹病毒一型(BHV-1)感染三种不同细胞,感染48 h后,倒置显微镜检测病毒引起的细胞病变现象(CPE);

[0032] 3.准备商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10,以及猪伪狂犬病毒(PRV)、单纯疱疹病毒(HSV-1)、水疱性口炎病毒(VSV)和痘苗病毒(VACV)的病毒液,使用感染剂量MOI= 10^{-4} 的病毒液分别接种上述的三种细胞2 h后,加入含有1%低熔点琼脂糖(碧云天,ST105)的细胞维持液,4℃冰箱冷却30分钟,凝固成覆盖层。培养2-3天后,在显微镜下观察噬斑明显时,每孔加入1%结晶紫溶液,覆盖细胞面,室温静置染色30分钟。自来水缓慢冲洗干净后,待晾干后观察结果。利用病毒蚀斑实验,比较三种病毒感染不同细胞形成的蚀斑大小。

[0033] 4.实验结果:利用PRV-GFP感染商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7、钝感单克隆细胞株Huh7-C10易感细胞株C7,病毒接种24 h后,人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中 α 疱疹病毒的感染比例低,且呈单细胞样分布,而在商品化细胞Huh-7细胞及易感细胞株C7中,病毒感染形成大的合胞体(图1中的A)。利用HSV-1-GFP和BHV-1感染三种不同细胞发现,人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中 α 疱疹病毒HSV-1-GFP和BHV-1的感染同样受限(图1中的B和C)。随后,采用病毒蚀斑实验进一步验证发现,PRV、HSV-1在人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中的蚀斑相对小且少。更为值得关注的是,在RNA对照病毒VSV、DNA对照病毒VACV的感染过程中,人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中的感染能力强于商品化细胞Huh-7及易感细胞株C7,因此,人源肝癌传代细胞系Huh7-C10仅特异性限制 α 疱疹病毒感染(图1中的D)。

[0034] 实施例3.人源肝癌传代细胞系Huh7-C10的特性研究

[0035] 1.实验方法:将商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10培养至6孔板中,通过倒置显微镜观测细胞的大小、形状、生长状态等;将商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10接种于96孔板中,培养至6、12、24、36、48、72 h时间点时,向各孔中加入100 μ l的CCK-8检测溶液,37℃下孵育2 h,酶标仪在450 nm波长处检测每孔的吸光度,检测细胞增殖;分别提取商品化细胞Huh-7、商品化肝癌对照细胞(HepG2, ATCC, HB-8065)、易感细胞株C7与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10的总RNA,送至华大科技有限公司,在高通量Illumina平台进行RNA-seq测序,测序数据利用华大科技有限公司中的Dr. Tom分析软件,进行多元数据分析中的主成分分析(PCA),可以代表所有基因的整体表达格局,进而据此描述样本差异。

[0036] 2.实验结果:通过倒置显微镜观测商品化细胞Huh-7与亚克隆细胞株(易感细胞株C7和人源肝癌传代细胞系Huh7-C10)的大小、形状、生长状态等,发现三种细胞并无明显差

异(图2中的A)。采用CCK-8分析检测商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7和人源肝癌传代细胞系Huh7-C10细胞的细胞活性与增殖情况,发现三种细胞的增殖无明显差异(图2中的B)。为了进一步明确人源肝癌传代细胞系Huh7-C10为商品化细胞Huh-7的亚克隆株,我们通过RNA-seq分析商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7、人源肝癌传代细胞系Huh7-C10、其他肝癌对照细胞(HepG2)在基因转录水平上的差异,主成分分析(PCA)显示:人源肝癌传代细胞系Huh7-C10与商品化细胞Huh-7相似度极高,与对照肝癌细胞HepG2相似度低(图2中的C),研究结果证实人源肝癌传代细胞系Huh7-C10来源于商品化Huh-7细胞系。

[0037] 实施例4. α 疱疹病毒在人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中的感染特性分析

[0038] 1. 实验方法:将商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10培养至6孔板中,过夜培养,待其生长至单层,每孔使用200 μ l的IP细胞裂解液(碧云天, P0013),收集细胞蛋白样本。WB检测三种不同细胞中内源性表达的 α 疱疹病毒主要受体蛋白Nectin-1(Nectin-1抗体的品牌为Santa Cruz Biotechnology, 货号为sc-21722。);同样的方法, WB检测三种不同细胞巨胞饮信号通路的重要信号转导接头蛋白PAK1、RHOA、RAC1和CDC42(PAK1、RHOA、RAC1和CDC42抗体的品牌为Cell Signaling Technology, 货号为2602S、2117S、2465S和2462S)分析三种不同细胞中相关于 α 疱疹病毒吸附和入侵过程的关键蛋白表达量;

[0039] 2. 将商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10培养至24孔板中,过夜培养,待其生长至单层,分为DNA抑制剂药物处理组和对照组两组,该DNA抑制剂药物为阿糖胞苷(Sigma-Aldrich, PHR1787),使用终浓度为300 ng/ml。随后使用MOI=0.1的HSV-1-GFP感染三种不同细胞2 h后, DNA抑制剂药物处理组加入含有300 ng/ml阿糖胞苷的细胞培养液,对照组仅换为细胞培养液,感染24 h后,在倒置荧光显微镜下观察感染情况并拍照;

[0040] 3. 使用高剂量MOI=5的rPRVTJ-Nluc感染商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10。高剂量感染下,多功能酶标仪(PerkinElmer公司)检测感染后6 h和12 h两个时间点的荧光素酶活性,分析人源肝癌传代细胞系Huh7-C10是否影响 α 疱疹病毒感染的基因组复制阶段;

[0041] 4. 收获MOI=5的HSV-1-GFP在商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10感染8 h后,释放至上清中的病毒液,通过设计重组病毒中GFP标签的特异性引物(GFP-F:AAGACCCAACGAGAAG, SEQ ID NO.1; GFP-R:TCGTCCATGCCGAGAGTGA, SEQ ID NO.2; GFP-probe:ACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCG, SEQ ID NO.3),利用荧光定量PCR方法检测上清中的重组病毒基因拷贝数。同时将收集的病毒上清液作10倍系列稀释,分别接种商品化细胞Huh-7,经2天后观察细胞感染病毒后的绿色荧光,以最高稀释度能感染细胞的孔数为终点,最后用Reed&Muench统计方法计算出50%组织细胞感染量(TCID₅₀),测定上清中的感染性病毒粒子含量,明确不同细胞中感染性病毒粒子的装配与释放是否存在差异。

[0042] 5. 实验结果:为分析 α 疱疹病毒在人源肝癌传代细胞系Huh7-C10感染的哪个阶段受到影响。分别进行了如下研究:

[0043] (1) 细胞受体表达:通过蛋白免疫印迹检测了 α 疱疹病毒主要受体蛋白Nectin-1的表达,发现其在三种细胞中的表达无差异(图3中的A);

[0044] (2) 巨胞饮通路关键蛋白检测: α 疱疹病毒利用巨胞饮进入细胞,通过检测巨胞饮

关键蛋白PAK1、RHOA、RAC1和CDC42的蛋白含量,发现巨胞饮关键接头蛋白在商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7、人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中的表达无差异(图3中的B),表明 α 疱疹病毒在人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中的感染早期不受影响。

[0045] (3) 病毒吸附入侵测定:使用阿糖胞苷作为DNA抑制剂药物处理病毒感染后的细胞,检测病毒DNA复制之前的吸附和入侵过程是否存在差异,结果发现DNA抑制剂药物处理后, α 疱疹病毒在人源肝癌传代细胞系Huh7-C10与商品化细胞Huh-7中的感染能力无明显差异(图3中的C),表明 α 疱疹病毒在人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中DNA复制之前的的吸附和入侵过程均不受限。

[0046] (4) 病毒复制能力测定:以MOI=5的rPRVTJ-N1uc感染三种细胞,酶标仪检测感染后6 h和12 h的荧光素酶信号,结果显示 α 疱疹病毒在商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7、人源肝癌传代细胞系Huh7-C10的病毒基因组复制不受影响(图3中的D)。

[0047] (5) 病毒释放能力测定:收获并检测MOI=5的HSV-1-GFP感染后释放到上清中的病毒粒子含量发现,商品化细胞Huh-7、C7易感细胞、人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中释放的病毒基因组数量相当,且病毒粒子的感染力相似(图3中的E和F),表明 α 疱疹病毒在人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中的释放能力不受限制。

[0048] 实施例5. α 疱疹病毒在人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中的细胞间扩散受限

[0049] 1. 实验方法:将商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10培养至96孔板中,过夜培养,待细胞长至单层,采用低剂量MOI=0.01的rPRVTJ-N1uc感染三种不同细胞,收获感染6、12、24、36、48 h后的细胞样本,采用萤光素酶检测试剂盒(Promega, N1110)检测NanoLuc萤光素酶,多功能酶标仪(PerkinElmer公司)读取不同时间点的荧光素酶活性数据。

[0050] 2. 分别将 10^5 个商品化细胞Huh-7与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10培养至激光共聚焦小皿(NEST, 801001)中,使用MOI=0.1的HSV-1-GFP感染2、6、10、16、24 h后的细胞,加入4%多聚甲醛固定液(碧云天, P0099)固定细胞15分钟,随后使用DAPI染色剂(碧云天, Huh7-C1005)对细胞核进行染色,最后利用高分辨率活细胞共聚焦显微镜(ZEISS, LSM800)拍照;

[0051] 3. 准备商品化细胞Huh-7、易感细胞株C7与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10,将细胞培养至6孔板中,待其长至单层,使用感染剂量MOI= 10^{-4} 的HSV-1-GFP病毒液分别接种上述的三种细胞,2 h后,加入含有1%低熔点琼脂糖(碧云天, ST105)的细胞维持液,4℃冰箱冷却30分钟,凝固成覆盖层。倒放于细胞培养箱中培养6天后,采用倒置荧光显微镜拍照。

[0052] 4. 实验结果:以MOI=0.01的rPRVTJ-N1uc感染三种不同细胞,在不同时间点收集细胞,测定荧光素酶活性发现,与其他细胞相比, α 疱疹病毒在人源肝癌传代细胞系Huh7-C10内的扩增能力弱(图4中的A),提示人源肝癌传代细胞系Huh7-C10不支持 α 疱疹病毒的多轮感染。通过激光共聚焦发现, α 疱疹病毒感染不能在人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中形成合胞体(图4中的B)。同时,相比于商品化细胞Huh-7和易感细胞株C7,HSV-1-GFP感染人源肝癌传代细胞系Huh7-C10产生的荧光病毒蚀斑显著减小,证实 α 疱疹病毒在人源肝癌传代细胞系Huh7-C10中的细胞间扩散受限(图4中的C)。

[0053] 实施例6. 调控 α 疱疹病毒细胞间传播宿主因子的发掘

[0054] 1. 实验方法:分别提取商品化细胞Huh-7、商品化肝癌对照细胞(HepG2, ATCC, HB-8065)、易感细胞株C7与人源肝癌传代细胞系Huh7-C10的总RNA,将总RNA样品送至华大科

技术有限公司,在高通量Illumina平台进行RNA-seq测序,测序数据利用华大科技有限公司中的Dr.Tom分析软件,比较并分析样本之间在全基因表达值的差异,使用的差异阈值为 $\log_2\text{FoldChange}>2$ 或 $\log_2\text{FoldChange}<-2$ 且 $\text{padj}<0.05$,并绘制火山图,随后将差异基因利用Dr.Tom分析软件中的G0富集工具分析数据,分析差异基因描述的细胞组分结果,以及差异基因描述的生物学过程。

[0055] 3.实验结果:通过转录组学测序分析发现,人源肝癌传代细胞系Huh7-C10与商品化细胞Huh-7仅有210个基因表达存在显著差异,其中下调基因198种,上调基因12种。DEseq2差异表达分析并绘制火山图,比较组设置为人源肝癌传代细胞系Huh7-C10vs商品化细胞Huh-7,结果显示(图5中的A):下调基因中,差异倍数大,且差异极显著的基因有:TMSB4X、KRT19、KRT17P8和BRSK2,其功能相关于细胞骨架的形成,和调控肌动蛋白细胞骨架的重组;除此之外,也包含有:GABBR2、NDNF和MDGA1,其功能相关于细胞突触的形成与维持,和促进神经细胞突起形成。随后进一步采用G0富集工具分析数据,结果显示:差异基因位于细胞突触连接相关的细胞组分(图5中的B),与病毒细胞间传播的位置一致;差异基因显著相关于细胞粘附的生物学过程,该功能参与细胞连接的建立与维持(图5中的C,设定差异阈值为 $\log_2\text{FoldChange}<-1.5$ 且 $\text{padj}<0.05$,或者 $\log_2\text{FoldChange}>1.5$ 且 $\text{padj}<0.05$)。根据上述结果, α 疱疹病毒可能通过调配细胞骨架蛋白,诱发上皮细胞相互接触的结构,促进病毒的细胞与细胞间传播。

[0056] 实施例7.利用人源肝癌传代细胞系Huh7-C10构建特异性研究 α 疱疹病毒细胞间传播机制的细胞模型的构建方法

[0057] 基于人源肝癌传代细胞系Huh7-C10与商品化细胞Huh-7在 α 疱疹病毒感染中的差异,利用基因组学或蛋白质组学,获得调控 α 疱疹病毒细胞间传播的宿主因子的信息。

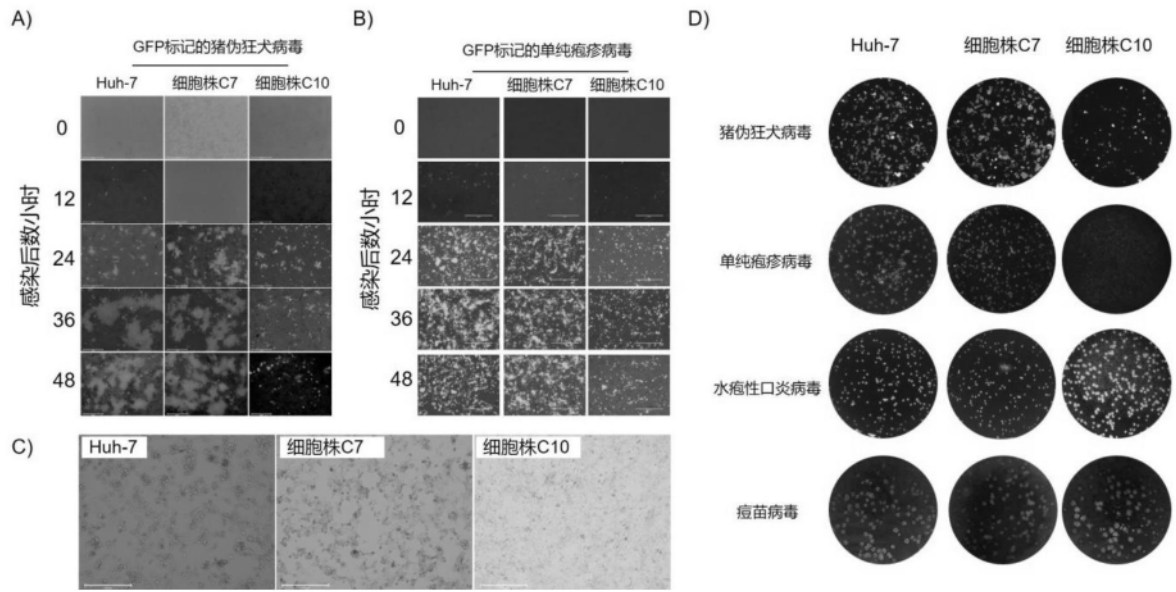


图1

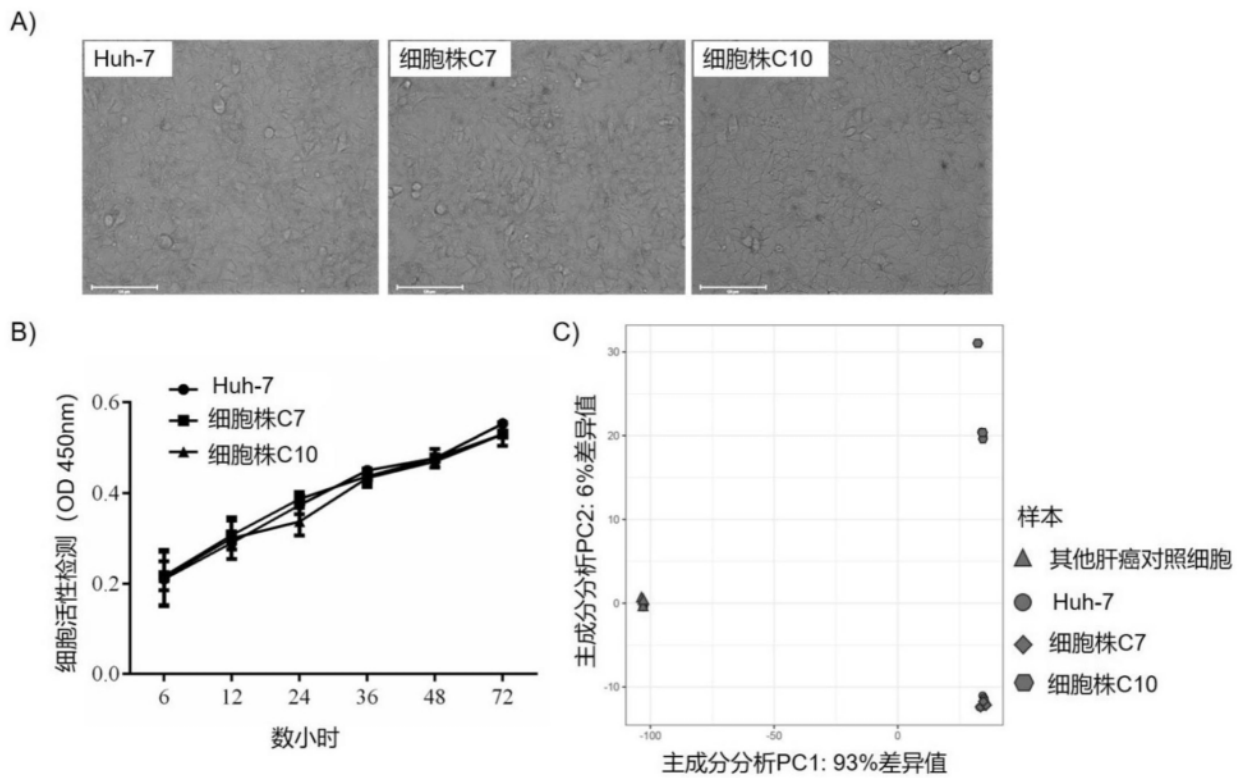


图2

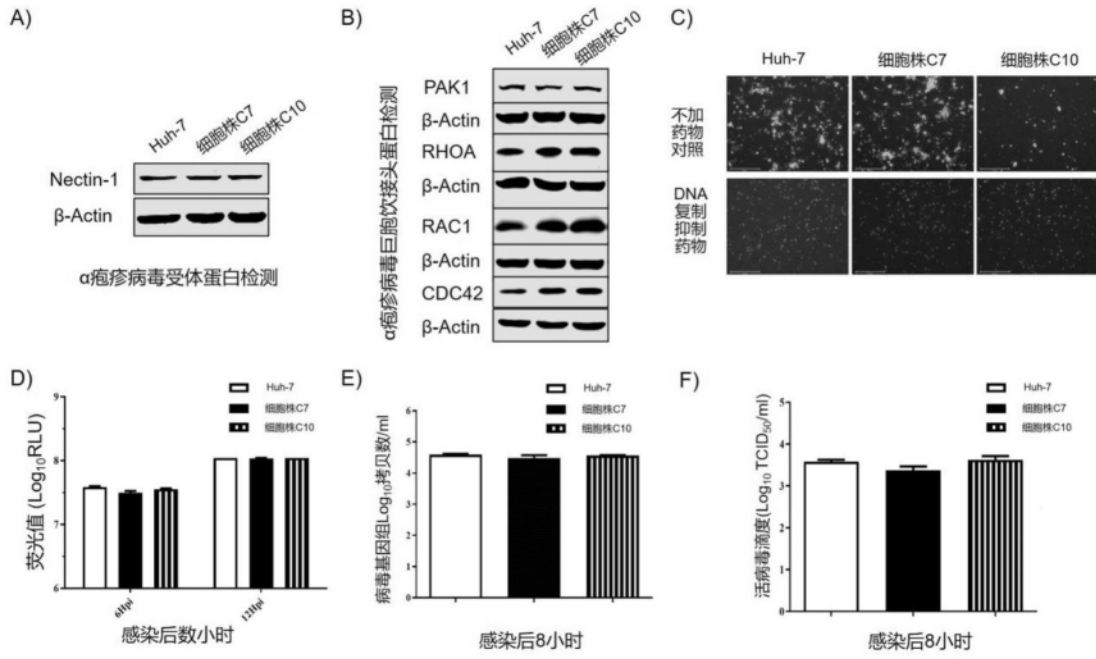


图3

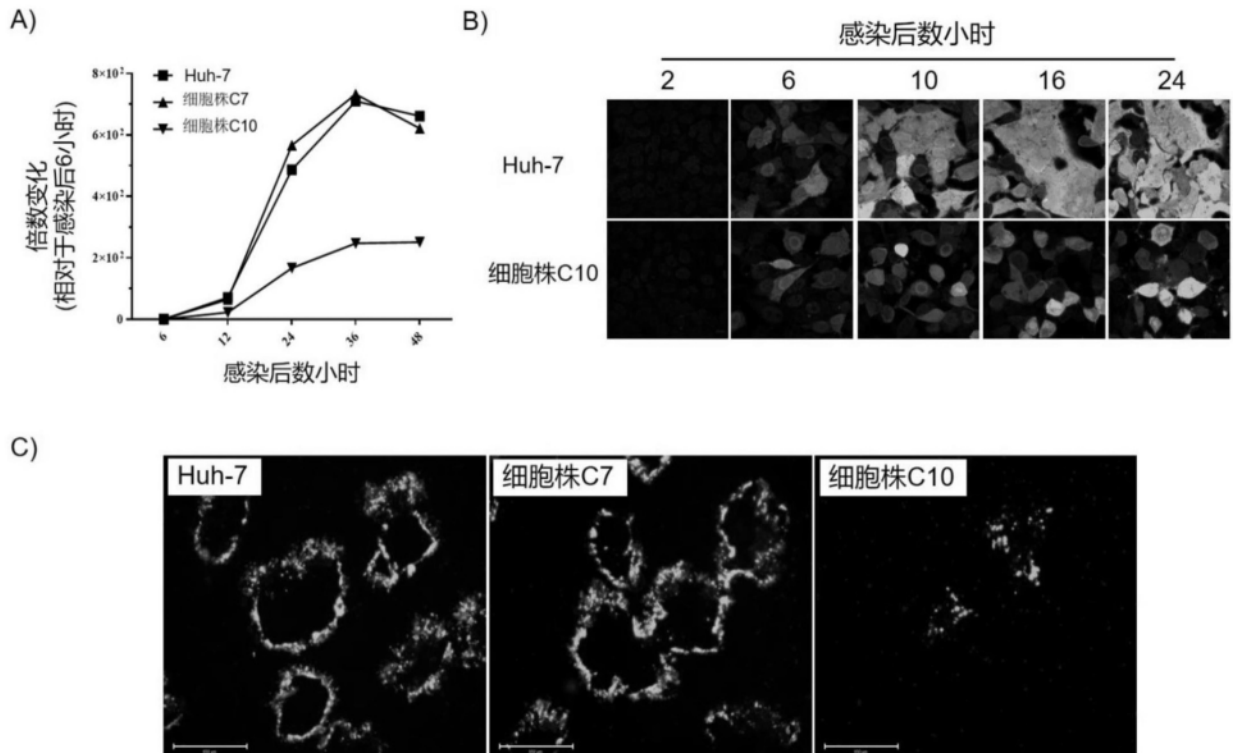


图4

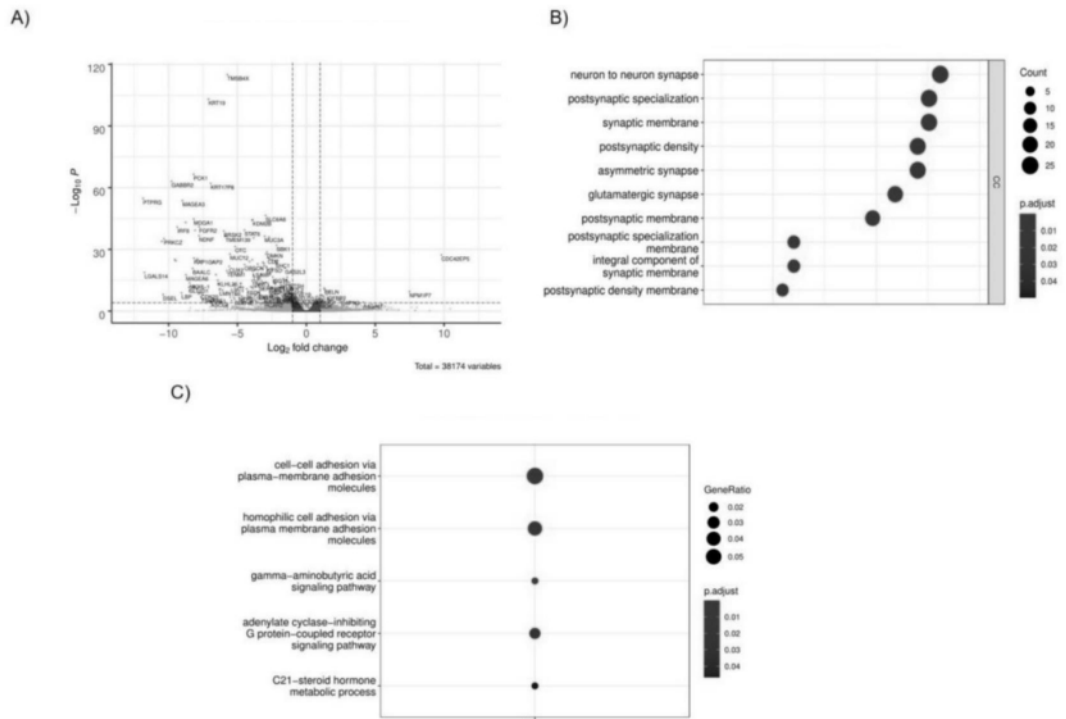


图5