

应用脂质体介导技术改变重组杆状病毒感染方法

吴小锋^{1*}, 曹翠平¹, 崔为正²

(1. 浙江大学动物科学学院特种经济动物科学系, 杭州 310029;

2. 山东农业大学蚕学系, 山东泰安 271018)

摘要: 昆虫-重组杆状病毒表达系统是有效的真核表达系统之一, 广泛应用于重组蛋白的生产。目前常采用将重组病毒直接注射入家蚕体内的方法进行感染表达, 在实际操作过程中很容易造成病毒对环境的污染, 具有潜在的危险性。为了严格控制作业环境重组病毒的扩散和潜在污染, 开发安全、有效的感染方法显得非常必要。本研究直接将病毒基因组 DNA 导入家蚕体内取得同样的感染效果, 探讨了利用阳离子脂质体介导下的避免病毒污染和提高感染效果的感染方法。

关键词: 重组杆状病毒; 家蚕; 感染技术; 脂质体

中图分类号: S881.2 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)01-0143-04

An improved inoculation technique for inoculating recombinant baculovirus into silkworm, *Bombyx mori*, using lipofectin

WU Xiao-Feng^{1*}, CAO Cui-Ping¹, CUI Wei-Zheng² (1. College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Department of Sericulture, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: Insect-Baculovirus Expression System is one of the most effective eukaryotic expression systems, which has been widely used to produce a lot of recombinant proteins. The current inoculation method is to inject recombinant virus directly into silkworm larvae, resulting in possibly biological danger due to virus contamination to environment during the practical operation. Therefore, it is necessary to develop safe infection methods in order to control the diffusion of recombinant virus. In this experiment, we tried to introduce directly the genome DNA of baculovirus, instead of virus itself, into silkworm *Bombyx mori* larvae and got the same infection result. By using cationic lipofectin reagent, a new safe and effective infection technique without virus contamination was developed.

Key words: Recombinant baculoviruses; silkworm; inoculation technique; lipofectin

昆虫杆状病毒表达载体系统 (Baculovirus Expression Vector System, BEVS) 是利用携带有外源目的基因的重组昆虫杆状病毒作载体在昆虫体内或昆虫培养细胞进行表达生产的一个重组蛋白生产系统。由于该系统具有可以利用昆虫个体或其培养细胞进行大规模的高效表达生产等优点而成为目前最有效的真核表达系统之一。目前昆虫杆状病毒表达载体系统主要包括欧美国家正在广泛应用的苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcNPV) 和在中国、日本应用较多的家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV) 两类表达系统 (Smith *et al.*, 1983; Maeda *et al.*, 1985)。BmNPV 表达系统由于可以利用我国饲养量最大的经济昆虫家蚕作为

表达载体, 从而具有成本低、适合规模化生产的优点, 非常具有我国特色 (吕鸿声, 1998)。然而, 目前的感染技术都是采用将重组病毒直接注射入家蚕体内的方法进行感染表达, 在实际操作过程中很容易造成病毒的扩散, 从而造成对环境的污染。因此, 为了严格控制作业环境重组病毒的扩散和污染, 提高该系统的生物安全性, 开发安全的感染方法显得非常必要。

家蚕杆状病毒具有 130 kb 大小的环状双链 DNA, 在重组病毒构建过程中使用阳离子脂质体介导的方法能有效地将其共转导入昆虫培养细胞, 我们考虑此技术也适合于活体昆虫, 这样就改变了直接使用病毒的方法, 可以将重组病毒基因组 DNA 导入家蚕幼虫, 并通过优化接种条件提高感染效率,

以达到与野生型病毒同样的感染效果。

1 材料和方法

1.1 材料

家蚕品种为菁松 × 皓月, 23 ~ 25℃ 条件下普通桑叶饲养。阳离子脂质体 Cellfectin 为美国 Invitrogen 公司产品 (Cat. No: 10362-010), 质量浓度 1.0 mg/mL。

我们曾成功构建了一种介于 BmNPV 和 AcNPV 间的杂交型杆状病毒 (hybrid baculovirus of BmNPV and AcNPV, HyNPV) (吴小锋等, 2004), 使用该载体获得了含有外源目的基因的重组杆状病毒, 在家蚕 5 龄幼虫中成功表达生产了具有很高生物活性的重组人酸性和碱性成纤维细胞生长因子 (aFGF, bFGF)、人内皮血管生长因子等 (Wu *et al.*, 2001, 2004)。本实验使用上述业已构建的 HyNPV 和重组病毒 HyNPV-bFGF 作为实验材料。

1.2 病毒基因组 DNA 的提取制备

用 HyNPV 或 HyNPV-bFGF 重组病毒感染昆虫培养细胞 Sf21, 96 h 后低速离心收集细胞, 加入 PBS 缓冲液悬浮后再离心 1 次。用 STRATAGENE 公司 DNA Extraction Kit 抽提病毒基因组, 对 RNA 消化后用 A260/280 测定 DNA 纯度和浓度。

1.3 脂质体 Cellfectin 与病毒 DNA 混合

根据以前的经验将病毒 DNA 最终质量浓度设为 5 ng/μL; Cellfectin 的浓度分别设为 0.01、0.1 和 1.0 μg/μL; 并设只含病毒 DNA 的处理为对照。将脂质体 Cellfectin 与病毒 DNA 按一定的比例混合, 加入灭菌纯水后混匀, 使用前室温放置 30 min。每头家蚕经皮注射, 注射量为 20 μL; 每处理 30 头家蚕, 重复 2 组。

家蚕被 BmNPV 感染后最显著的病理特征是在感染细胞的核或质中产生包含和保护病毒粒子的一种蛋白质结晶, 称为包涵体 (inclusion body, IB) 或多角体 (polyhedron), 一般呈多面体, 具有棱角 (浙江大学, 2001), 在显微镜下能明显地观察到。因此, 我们通过镜检以是否出现多角体及其多少来判断家蚕是否受到感染及感染的程度。

1.4 病毒经皮和经口感染

经皮感染方法: 将 5 龄幼虫放置冰上数分钟, 然后将含有病毒液或其 DNA 的混合液从幼虫腹部节间膜处注射接种, 注射时针头平行插入且轻推针筒, 注意不伤其内部器官。每头幼虫注射量为 20 μL。接种后 30 min 用桑叶饲养。

经口感染方法: 将一定量的病毒 DNA 的混合液均匀涂布于桑叶后直接喂食家蚕。

1.5 多角体的鉴别

取幼虫少量血液置于载玻片上, 在显微镜下观察是否有多角体。

2 结果

2.1 不同浓度的 Cellfectin 与病毒 DNA 混合后对家蚕的感染效果

不同浓度的 Cellfectin 与病毒 DNA (终浓度为 5 ng/μL) 混合液经皮注射后对家蚕幼虫的感染效果见表 1。没有混合 Cellfectin 仅有病毒 DNA 的对照组即使在 96 h 后也检测不到多角体, 说明将病毒 DNA 单独注射入家蚕幼虫体内不能引起感染; 而在 Cellfectin 的混合组, 即使非常低的浓度, 如 0.01 μg/μL, 在 96 h 也能检出较多的多角体, 在 0.1 ~ 1.0 μg/μL 范围内, 在 48 h 都能观察到大量的多角体 (图 1), 说明阳离子的 Cellfectin 确实具有非常强的介导能力, 病毒基因组与其混合后注射入家蚕产生很好的感染效果。这样处理的家蚕能观察到与典型 BmNPV 感染相同的外表病症, 即蚕体体色乳白, 体躯肿胀, 狂躁爬行, 100% 幼虫出现典型的高节病症, 最后死亡。通过本实验, 我们初步将 Cellfectin 的最佳质量浓度确定在 0.1 μg/μL 左右的水平。

表 1 不同浓度 Cellfectin 与病毒 DNA (终浓度 5 ng/μL) 混合液对家蚕的感染效果

Table 1 Infection with various Cellfectin concentrations and virus DNA (at a concentration 5 ng/μL) in *Bombyx mori*

Cellfectin 浓度 (μg/μL) Cellfectin concentration	多角体检出 Polyhedron check	
	48 h	96 h
1	+++	+++
0.1	+++	+++
0.01	+	++
0 (仅病毒 DNA only virus DNA)	-	-

+, ++, +, +, +: 依次表示多角体的多少 Means the amount of polyhedron checked; -: 表示没有检测到多角体 Means no polyhedron; 表 2 同 The same for Table 2.

2.2 不同浓度病毒 DNA 与 Cellfectin 混合后对家蚕的感染效果

根据表 1 的结果, 我们将 Cellfectin 的浓度设定为 0.1 μg/μL, 使用不同浓度的病毒 DNA 来确定产生良好感染所需的病毒 DNA 浓度。实验结果 (表 2) 表明, 病毒 DNA 浓度在 5 ~ 100 ng/μL 范围内, 在 48 h 都能镜检到大量的多角体, 1 ng/μL 在 96 h 也观察到

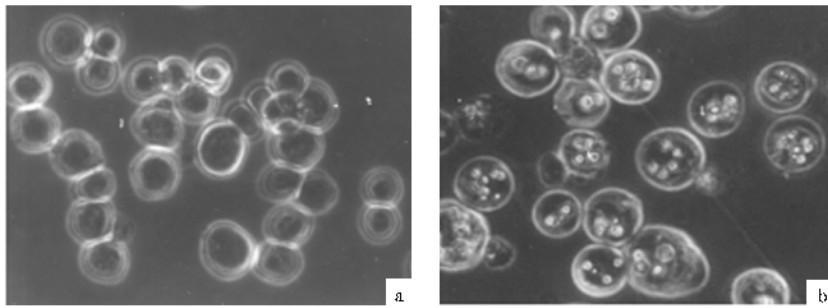


图 1 不同浓度 Cellfectin 与病毒 DNA 混合后对家蚕的感染效果

Fig.1 Inoculation of the mixture solution of virus DNA and Cellfectin to silkworm *Bombyx mori* larva

a: 对照 CK, Cellfectin 浓度为 0 (仅病毒 DNA) Cellfectin concentration is 0 (only virus DNA);

b: Cellfectin 浓度为 0.1 μg/μL Cellfectin concentration is 0.1 μg/μL.

较多的多角体, 0.1 ng/μL 时由于 DNA 量太少, 感染时间延长。这样, 我们将 5 ng/μL 的病毒 DNA 浓度确定为比较合理的使用剂量。

表 2 不同浓度病毒 DNA 与 Cellfectin (终浓度 0.1 μg/μL) 混合后对家蚕的感染效果

Table 2 Infection with various virus DNA concentrations and Cellfectin (at a concentration 0.1 μg/μL) in *Bombyx mori*

病毒 DNA 浓度 (ng/μL) Virus DNA concentration	多角体检出 Polyhedron check	
	48 h	96 h
100	+++	+++
10	+++	+++
5	+++	+++
1	++	+++
0.1	+	++
0 (仅 Cellfectin) (only Cellfectin)	-	-

2.3 不同浓度 Cellfectin 与重组病毒 DNA 混合后对家蚕的感染效果

为了探讨更具有实际应用意义的重组杆状病毒接种感染效果, 我们以上述得到的病毒 DNA 和脂质体混合感染数据为基础进行比较合理的组合, 在使用病毒 HyNPV DNA 的同时, 也对含外源目的基因重组病毒 HyNPV-bFGF DNA 进行实验比较。详细调查了接种后家蚕的化蛹、羽化发育过程及死亡情况。结果(表 3)表明, 无论是病毒 DNA, 还是重组病毒 DNA, 单独接种都不能感染家蚕, 家蚕发育照常; 在与脂质体混合后, 重组病毒 DNA 组与野生型病毒 DNA 组一样, 能 100% 感染家蚕, 使其在化蛹前全部死亡。这说明重组病毒 DNA 在脂质体介导下, 能达到与野生型病毒 DNA 完全相同的感染效果, 这为应用重组病毒感染家蚕这一新技术提供了重要的依据。

2.4 病毒 DNA 经口添食对家蚕的感染效果

除了经皮穿刺接种外, 经口添食更为便捷、快

速。由于重组病毒不象野生型病毒外层有多角体的保护, 所以通常经口添食重组病毒容易失活, 感染效果

表 3 病毒 DNA 及其与 Cellfectin 混合后对家蚕的感染效果
Table 3 Infection with virus DNA and Cellfectin in *Bombyx mori*

处理 Treatment	接种幼虫数 Inoculated larva number	化蛹数 Pupation number	羽化数 Moth number	死亡数 Death number
无处理 Control	10	10	10	0
灭菌水 H ₂ O only	10	10	10	0
病毒 DNA HyNPV DNA only	30	30	30	0
重组病毒 HyNPV-bFGF DNA only	30	30	30	0
脂质体 Cellfectin only	10	10	10	0
病毒 DNA/脂质体混合液 HyNPV DNA + Cellfectin	30	0	0	30
重组病毒 DNA/脂质体混合液 HyNPV-bFGF DNA + Cellfectin	30	0	0	30

注: DNA 最终浓度为 5 ng/μL, Cellfectin 最终浓度为 0.1 μg/μL (表 4 同); 每头家蚕注射量为 20 μL; 每区 30 头家蚕, 对照组 10 头, 重复 2 组。

Notes: The final DNA concentration was 5 ng/μL and Cellfectin 0.1 μg/μL (The same in Table 4). The injection volume was 20 μL per larva; 30 larvae were used for one tested group and 10 for control group, 2 repeats.

表 4 病毒 DNA 经口添食对家蚕的感染效果

Table 4 Infection through oral administration of virus DNA in *Bombyx mori*

处理 Treatment	处理幼虫数 Treated larva number	存活数 Survival larva number	死亡数 Dead larva number
无处理 Control	10	10	0
灭菌水 H ₂ O only	10	10	0
病毒 DNA HyNPV DNA only	30	30	0
重组病毒 DNA HyNPV-bFGF DNA only	30	30	0
脂质体 Cellfectin only	10	10	0
病毒 DNA/脂质体混合液 HyNPV DNA + Cellfectin	30	30	0
重组病毒 DNA/脂质体混合液 HyNPV-bFGF DNA + Cellfectin	30	30	0

注: 涂布桑叶后直接添食。

Notes: The mixture solution of DNA and lipofection was smeared to mulberry leaves, which were taken to feed larva directly.

果很差。为了探讨重组病毒 DNA 经口添食是否也具有感染效果,我们用上述相似的方法,将重组病毒 DNA 与 Cellfectin 混合液涂布桑叶后直接添食 5 龄起蚕。结果(表 4)表明,经口添食没有任何感染效果,不能引起家蚕感染。

3 讨论

研究表明,无论是产生多角体的病毒还是重组病毒基因组,其 DNA 和阳离子脂质体按一定比例混合后经皮接种家蚕均产生典型的杆状病毒感染症状,说明这种新的接种感染方法具有与病毒直接接种相同的感染效果。其优点在于:改变了传统的直接使用病毒的接种方式,避免了病毒可能扩散后引起作业环境污染的潜在危险性,提高了昆虫杆状病毒表达系统的生物安全性。

脂质体是通过阳离子的脂质 N-[1-(2, 3-dioleoyloxy)propyl]-N, N, N-trimethylammonium chloride (DOTMA)和 dioleoyl phosphatidylethanolamine (DOPE)按 1:1 的质量比混合而成。它非常适合并常用于 DNA 转染入培养细胞,与 DNA 混合后形成 lipid-DNA 复合物,此复合物与培养细胞融合后导致 DNA 的有效转入。与其他的转染方法,如磷酸钙、DEAE-dextran 等转染法相比,脂质体转染法效率提高 5 ~ 100 倍,已被成功用于 DNA (Felgner *et al.*, 1987), RNA (Malone *et al.*, 1989) 及寡聚核苷酸转染入不同类型的细胞,还能使 DNA 转染入原生质体 (Sporlein and Koop, 1991)。转染能否成功取决于转染的条件最优化,如脂质体的用量、DNA 浓度及脂质体-DNA 混合孵育时间。

家蚕具有开放的血液循环系统,几乎所有的器官,包括卵巢,都浸润在血液中。已有报道表明,即使在血清存在的情况下脂质体也能进行成功的转染 (Brunette *et al.*, 1992)。这样我们考虑家蚕幼虫体内的情况与体外细胞培养在血清存在下情形是相似的。研究表明脂质体介导下确实能成功地将较大的杆状病毒 DNA 有效地转染入家蚕幼虫体内。

家蚕-杆状病毒表达系统有可能成为我国生物技术产业化中具有自主知识产权的一个有力工具,开发安全、快速的接种技术已成为解决产业规模化中的一个关键技术。本研究结果提供了一个安全的技术,但离快速的要求还有距离。本实验病毒 DNA 经口添食没有感染效果,原因可能是家蚕幼虫中肠内的强碱性 (pH 9.2 ~ 9.8) 破坏了脂质体和大分子 DNA 形成的复合物。这为我们今后的研究提出了新的课题。

另外,家蚕 BmNPV 为核型多角体病毒,阳离子脂质体能非常有效地将其 DNA 转染入家蚕细胞并引起感染,说明病毒 DNA 能进入细胞核,暗示在转基因家蚕或其他转基因昆虫研究领域中该技术可能发展成为一个有效的方法。Yamao 等 (1999) 使用对家蚕非感染性的重组苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV) 作为载体,绿色荧光蛋白 GFP 基因为标记,通过向家蚕卵注射该病毒,获得能发绿色荧光的转基因家蚕,证明了使用该技术能定向地向家蚕基因组中导入外源目的基因。

参考文献 (References)

- Brunette E, Stribling R, Debs R, 1992. Lipofectin does not require the removal of serum. *Nucleic Acids Research*, 20: 1 151.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, 1987. A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7 413.
- Lu HS, 1998. *Molecular Biology of Insect Viruses*. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press. 547 - 599. [吕鸿声, 1998. 昆虫病毒分子生物学. 北京: 中国农业科技出版社. 547 - 599]
- Maeda S, Kawai T, Obinata M, Fujiwara H, Horiuchi T, Saeki Y, Sato Y, Funusawa M, 1985. Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 315: 592 - 594.
- Malone RW, Felgner PL, Verma IM, 1989. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6 077.
- Smith GE, Summers MD, Fraser MJ, 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell Biol.*, 3(12): 2 156 - 2 165.
- Sporlein B, Koop HU, 1991. Lipofectin: direct gene transfer to highly plants using cationic liposomes. *Theor. Appl. Genet.*, 83: 1.
- Wu XF, Cao CP, Xu YX, Lu XM, 2004. Construction of a host range-expanded hybrid baculovirus of BmNPV and AcNPV, and knockout of cysteinase gene for more efficient expression. *Sci. China C. Life Sci.*, 34(2): 156 - 164. [吴小锋, 曹翠平, 许雅香, 鲁兴萌, 2004. BmNPV 和 AcNPV 融合型杂交重组病毒表达载体的构建和改进. 中国科学 C 辑, 34(2): 156 - 164]
- Wu XF, Kamei K, Takano R, Hara S, 2001. High-level expression of human acidic and basic fibroblast growth factors in the silkworm, *Bombyx mori* L. using recombinant baculovirus. *Protein Expression and Purification (USA)*, 21(1): 192 - 200.
- Wu XF, Yin ZZ, Cao CP, Huang L, Lu XM, 2004. Expression of human VEGF165 in silkworm (*Bombyx mori* L.) by using a recombinant baculovirus and its bioactivity assay. *Journal of Biotechnology*, 111 (3): 253 - 261.
- Yamao M, Katayama N, Nakazawa H, Yamakawa M, Hayashi Y, Hara S, Kamei K, Mori H, 1999. Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus. *Gene Development*, 13: 511 - 516.
- Zhejiang University, 2001. *Silkworm Pathology*. Beijing: China Agricultural Press. 44 - 58. [浙江大学, 2001. 家蚕病理学. 北京: 中国农业出版社. 44 - 58]