

重组昆虫杆状病毒构建和筛选技术进展

曹翠平, 吴小锋*

(浙江大学动物科学学院生物资源与基因工程研究室, 杭州 310029)

摘要: 昆虫杆状病毒作为高效的真核表达载体, 现已广泛应用于各种外源目的基因的表达。但由于重组病毒产生的比例很低(通常只有 0.1% ~ 1%), 成为制约该系统应用的技术瓶颈。本文概括了近年来发展的重组病毒的构建和筛选方法, 主要介绍了杆状病毒的线性化技术和利用大肠杆菌-昆虫细胞穿梭载体构建并筛选重组杆状病毒的技术进展。

关键词: 重组昆虫杆状病毒; 空斑纯化; 线性化技术; Bac-to-Bac

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2004)06-0837-07

Progress in the techniques for construction and screening of recombinant insect baculovirus

CAO Cui-Ping, WU Xiao-Feng* (Laboratory of Bioresource and Gene Engineering, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Using insect baculovirus as expression vector, various proteins have been produced successfully. But the frequency of recombination was very low (0.1% - 1%) and it limited further application of the baculovirus expression vector system (BEVS). Many improved methods for the construction and isolation of recombinant baculovirus have been developed and are introduced here, with emphasis on linearization of baculovirus DNA and a method based on site-specific transposition of an expression cassette into a baculovirus shuttle vector propagated in *E. coli*.

Key words: Recombinant baculovirus; plaque assay; linearization technique; Bac-to-Bac

20 世纪 80 年代以后发展起来的杆状病毒表达系统是高效的真核表达系统之一, 可以在昆虫细胞 (O' Reilly *et al.*, 1994) 和哺乳动物细胞 (Kost and Condreay, 2002; Huser and Hofmann, 2003) 内表达经济价值较高的蛋白质, 因为表达的蛋白质容易折叠, 转录后加工修饰较好, 表达量高及安全性好, 重组杆状病毒表达系统近年来倍受重视。自 Dulbecco 建立空斑技术纯化西方马脑炎病毒以来, 就一直采用常规的空斑技术纯化动物病毒。继 Smith 等 (1983) 首次将空斑技术用于筛选重组昆虫杆状病毒之后, 空斑技术在昆虫病毒基因工程中得到广泛应用。由于重组病毒产生的比例很低(通常只有 0.1% ~ 1%), 利用空斑技术筛选重组病毒费时费力, 即使技术熟练的研究者也需 1 ~ 2 个月才能完成 (Luckow, 1993; Davies, 1994; Shuler *et al.*, 1994; 王福山等, 1995)。近年来, 在空斑分析技术的基础上发展了一些新技

术, 大大简化了重组病毒构建和筛选的过程 (程家安等, 2001)。

1 构建重组杆状病毒的传统方法

苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV) 是杆状病毒表达系统最初使用也是目前应用最广泛的杆状病毒。由于 AcMNPV 基因组太大 (134 kb) (Ayres *et al.*, 1994), 很难对它直接进行操作。最初构建重组杆状病毒是利用同源重组的原理分两步完成的: 首先, 外源基因插入杆状病毒转移载体病毒启动子下游的多克隆位点, 启动子的两侧是杆状病毒 DNA 序列, 通常是多角体蛋白基因 (*PH*) 或者是 *p10* 基因的侧翼非必须序列, 转移载体带有能够在大肠杆菌中繁殖的复制起点却不能够在昆虫细胞中

基金项目: 农业部(2003-Z50)和浙江省科技厅国际合作项目(2002C24003)

作者简介: 曹翠平, 女, 1980 年 11 月生, 山东平阴人, 硕士, 从事重组昆虫杆状病毒与基因工程研究

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: wuxiaofeng@zju.edu.cn; Tel.: 86-571-86971658; Fax: 86-571-86971670

收稿日期 Received: 2004-05-11; 接受日期 Accepted: 2004-07-07

复制; 然后, 杆状病毒转移载体和病毒 DNA 共转入昆虫细胞, 在昆虫细胞内发生同源重组, 外源目的基因转移到杆状病毒基因组而产生重组病毒。由于外源目的基因替换多角体蛋白基因, 重组病毒不能形成多角体, 从而易与野生型病毒区分开来, 可以通过空斑分析来鉴定和纯化重组病毒。

传统的空斑纯化重组病毒的技术是将共转染后的含有重组病毒和野生型病毒的溶液作梯度稀释后, 用不同浓度的病毒感染单层昆虫培养细胞, 温育 1 h 后用低熔点琼脂糖凝胶覆盖, 27℃ 培养 4 ~ 6 天后进行空斑鉴定。重组病毒产生的空斑借助光学显微镜检查加以筛选, 并用消毒玻璃毛细管挑取吸出。吸出的含有重组病毒的琼脂块置于少量细胞培养液溶解稀释并用于下次空斑筛选。如此反复 3 ~ 5 轮筛选, 即可得到纯化的重组病毒。从共转染样本中分离重组病毒也可以在 96 孔塑料板上进行, 但是无论哪种方法, 由于重组病毒产生的比例很低, 往往是重组病毒和野生型病毒混合在一起, 区分野生型有包涵体表型和重组病毒无包涵体表型非常困难, 需要训练有素的观察能力和实际经验(吕鸿声, 1998)。

在空斑测定基础上发展的蓝白筛选技术显得简便易行。蓝白筛选即 β -半乳糖苷酶筛选, 通过插入失活 *lacZ* 基因, 破坏重组子与宿主之间的 α -互补作用, 是携带 *lacZ* 基因的许多载体的筛选优势。载体上携带一段细菌的基因 *lacZ*, 它编码 β -半乳糖苷酶的一段 146 个氨基酸的 α -肽(N 端), 载体转化的宿主细胞可编码 β -半乳糖苷酶 C 端部分的序列, 虽然宿主和质粒编码的片段各自都没有酶活性, 但是二者可互补形成具有酶活性的蛋白质。由 α -互补产生的半乳糖苷酶分解 X-gal 而形成蓝色菌落; 而外源 DNA 片段插入到质粒中的多克隆位点(在 *lacZ* 中)后, 几乎不可避免的导致无 α -互补能力的氨基酸片段, 因此, 带重组质粒的细菌形成白色菌落(孙树汉等, 2001)。这一简单的颜色实验大大简化了这种质粒载体中鉴定重组体的工作。这一蓝白现象后来也用到了重组病毒的筛选中, 并成为了一种很重要的方法。如目前美国 Invitrogen 公司开发成功的 pBlueBacHisA, B, C 系列转移载体。pBlueBacHis 带有 2 个启动子, 一个来自 ETL, 另一个来自 AcNPV 多角体蛋白基因。ETL 启动子指导合成 β -半乳糖苷酶, 多角体蛋白基因启动子控制合成外源目的基因产物。插入外源基因的重组转移载体与野生型病毒 DNA 重组产生重组体, 从而表达产生了 β -半乳糖苷酶, 因此在进行空斑分析时若在覆盖的琼脂糖中加

入底物半乳糖苷 X-gal 或者它的衍生物就能够形成蓝色空斑, 肉眼即可观察, 从而使重组病毒的筛选变得准确且简便易行。

2 线性化技术

在酵母细胞和哺乳动物细胞中, 含有双链切断点的 DNA 比一般环状分子更易发生重组(Orr-Weaver *et al.*, 1981; Bollag *et al.*, 1989)。这一现象在昆虫细胞内同样存在。虽然线性化的杆状病毒基因组 DNA 对昆虫细胞的感染力比环状病毒 DNA 要低 5 ~ 150 倍, 却仍能够引入细胞并与细胞内的同源序列进行重组。如果同源序列位于线性化杆状病毒的两端, 则基因组就可以通过同源重组环化而恢复感染性(吕鸿声, 1998; 程家安等, 2001)。

DNA 序列分析表明, AcMNPV 上没有 *Bsu36* I 切点。Kitts 等(1990)将一个 *Bsu36* I 位点插入野生型 AcMNPV 的多角体蛋白基因位点, 得到含有 *Bsu36* I 单一切点的重组病毒 AcRP6-SC, 用 *Bsu36* I 酶切线性化后和含 *lacZ* 的转移载体 pAcRP23-*lacZ* 共转染昆虫细胞, 子代病毒在 X-gal 存在下进行空斑测定, 发现 6% ~ 32% 的空斑呈蓝色, 阳性重组率大大提高。后来, Kitts 和 Possee(1993)及 Kitts(1995)进一步构建了一种修饰病毒 BacPAK6, 有效地将肉眼选择(*LacZ*-based)及复制选择(replication-based)2 种方法相结合。用 *polh* 基因启动子驱动 *lacZ* 基因, *lacZ* 基因内部插入一个 *Bsu36* I 位点, 再分别将 2 个 *Bsu36* I 位点引入原 *polh* 基因的上游和下游(ORF1629 基因)两侧区域。ORF1629 的编码产物参与核衣壳的装配或病毒 RNA 聚合酶的加工修饰, 是病毒复制的必需基因。用 *Bsu36* I 酶切修饰后的病毒 BacPAK6 DNA, 可产生 2 个小片段和一个大片段, 这个大片段就是缺失了部分 ORF1629 的线性化病毒 DNA, 该大片段若是自我连接, 会因为必需基因 ORF1629 不完整而不能产生活的病毒。将线性化病毒 DNA 与转移载体 DNA 共转染 Sf 培养细胞, 只有经同源重组后修复了 ORF1629 才能形成活病毒(复制选择), 重组效率大大提高, 重组病毒在总病毒中的比例高达 85% ~ 99%, 而且重组病毒无 *lacZ* 基因, 在 X-gal 存在时形成无色空斑(肉眼选择), 但线性化不完全的少量 BacPAK6 形成蓝色空斑, 占总病毒比例很小, 重组病毒极易筛选。在借鉴国外技术的基础上, 胡建新(1994)也构建了适用于我国特色昆虫家蚕的 BmNPV 修饰的可线性化病毒 Bm-

BacPak,大大提高了家蚕系统中重组病毒的筛选效率。

利用病毒线性化技术,世界几个著名的基因公司分别开发了有自己特色的杆状病毒表达系统。美国的 Clontech 公司在 1999 年利用 BacPAK 系列载体构建了 BacPAK 杆状病毒表达系统(Clontech, 1999)。在 AcMNPV DNA 的多角体蛋白基因表达位点两侧分别引进了一个 Bsu36 I 位点,构建了修饰病毒 BacPAK6,用 Bsu36 I 酶切 BacPAK6 成一大一小 2 个片段,导致线性化后的病毒 DNA(大片段)缺少病毒复制必需的 ORF1629 基因的一部分,自身连接后病毒不能成活。另一方面,转移载体含有病毒缺少的 ORF1629 片段,病毒基因组的大片段只有和转移载体重组才能够复制。双重组修复了病毒的必需基因并把目的基因转移到了病毒基因组。利用 Bsu36 I 线性化的 BacPAK6 病毒 DNA 和重组转移载体共感染,重组比例接近 100%。德国的 Novagen 公司也利用昆虫杆状病毒线性化技术构建了 BacVector 杆状病毒表达系统(Novagen, 2003)。其中表达载体中引

入了 3 个酶切位点,分别位于必需基因 ORF1629 内、*polh* 启动子上游以及 *lacZ* 基因内部。限制性酶切后,不仅切去了与目的蛋白质竞争表达的一些非必需基因、*v-cath* 和几丁质酶基因,重要的是降低了重组背景,重组空斑比例接近 100%。其中几丁质酶基因的删除又增加了初裂解液中蛋白表达的稳定性。最近,Invitrogen 公司又开发了 Bac-N-Blue 线性化 AcNPV DNA 系统(图 1)。其在转移载体中引入 ETL 启动子控制 *lacZ* 基因,*polh* 启动子控制外源目的基因的表达。将其与 Bsu36 I 酶切线性化的 AcNPV DNA 同源重组,通过筛选蓝斑来纯化重组病毒,不仅使重组效率大大提高,而且使纯化更为方便(Invitrogen, 2003)。该公司开发的 BaculoDirect 表达系统是现有的产生重组杆状病毒最快、最容易的系统,线性化的 BaculoDirect DNA 含有 att R 位点,采用 Gateway entry 克隆技术在一小时内完成目的基因的重组克隆,重组 DNA 的反应混合液直接用于感染昆虫细胞,省去了细菌转化、抽提杆状病毒 DNA 和共感染步骤,大大节省了时间,在一个星期内就可以得到纯化的重组病毒(Invitrogen, 2003)。

3 大肠杆菌-昆虫细胞穿梭载体(Bac-to-Bac 系统)技术

近年来,美国的孟山都(MONSANTO)公司成功开发了一种快速、高效产生重组 AcNPV 病毒的技术(Luckow *et al.*, 1993),利用细菌转座子原理,在大肠杆菌内就能完成重组病毒的构建,取名为 Bac-to-Bac 表达系统,意即从细菌(bacterium)到杆状病毒(baculovirus),革命性地改变了重组昆虫杆状病毒的构建方法。其基本原理为:将一个改造后的 AcNPV 基因组转化入大肠杆菌,使它像普通质粒一样能在细菌内复制(由于太大,只限单拷贝),将其称之为杆状病毒穿梭载体(baculovirus shuttle vector, 又称病毒质粒 baculovirus plasmid, 将其首尾合写而成为 Bacmid),通过位点特异性转座,在大肠杆菌内完成病毒基因组的重组。杆状病毒穿梭载体 Bacmid 含有细菌单拷贝数 mini-F 复制子、卡那霉素抗性选择标记基因及编码 β -半乳糖苷酶 α 肽的部分 DNA 片段(图 2)。在 *lacZ* α 基因的 N 氨基末端插入一小段含有细菌转座子 Tn7 整合所需的靶位点(mini-att Tn7),但它的插入不影响 *lacZ* α 基因的表达阅读框。将杆状病毒穿梭载体(130 kb)转化入大肠杆菌 DH103,获得转化子将其命名为 DH10Bac。因此杆状

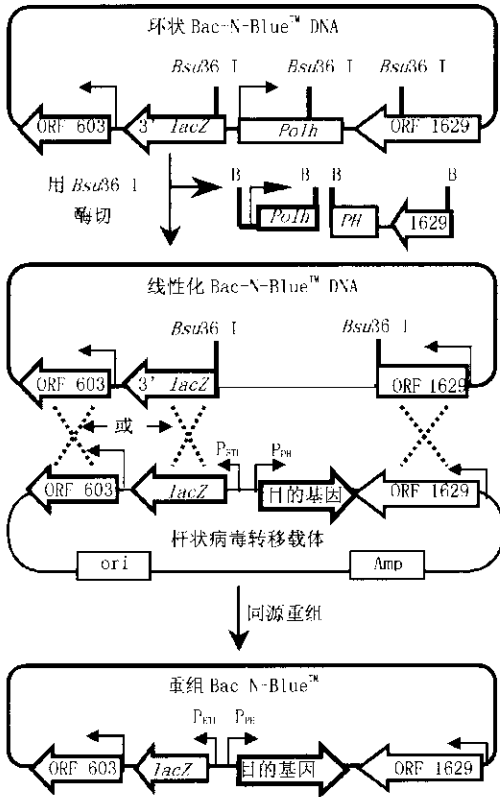


图 1 线性化 Bac-N-Blue 同源重组产生重组病毒 (仿程家安等, 2001)

Fig.1 Generation of recombinant baculovirus through homologous recombination with linear Bac-N-Blue DNA (from Cheng *et al.*, 2001)

病毒穿梭载体像一个大质粒一样,可以在大肠杆菌中增殖并使细菌细胞获得卡那霉素抗性,且与存在于受体菌染色体上的 *lacZα* 缺失产生互补,在 IPTG 诱导和 X-gal 或 Blue-gal 生色底物存在下转化体产生蓝斑(*lacZ⁺*)。

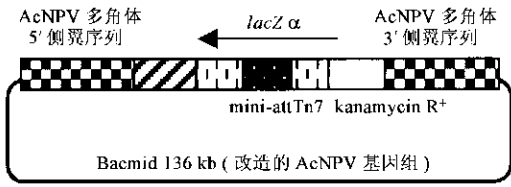


图2 Bacmid 结构图

Fig. 2 Structure of Bacmid

重组 Bacmid 通过 pFASTBAC 供体质粒 (donor plasmid) 上的 mini-Tn7 转座子,在另一个辅助质粒 (helper plasmid, 13.2 kb) 的功能作用下将外源目的基因插入到 Bacmid 中来完成。Helper plasmid 表达转座酶并含有四环素 (tetracycline) 抗性基因。pFASTBAC 系列供体质粒具有共同的特征: 每个质粒都含有杆状病毒启动子 (*polh* 或 *p10* 启动子),在 mini-Tn7 左右臂间含有一个完整的表达框,包括庆大霉素 (gentamicin) 抗性基因、杆状病毒启动子、多克隆位点及 SV40 poly(A)。外源基因插入到杆状病毒

启动子下游的多克隆位点,将此重组的供体质粒转化入含有 helper plasmid 和 Bacmid 的 DH10Bac 中,由 mini-Tn7 转座子将供体质粒上的表达框插入到 Bacmid 的靶位点,破坏 *lacZα* 基因的表达。在含有卡那霉素、庆大霉素、四环素和 X-gal 的培养板进行筛选,重组的 Bacmid (即重组病毒基因组) 转化体菌落呈白色。而非重组 Bacmid 转化菌落依然为蓝色。因此,可以通过菌落的颜色进行重组病毒的筛选。通过单菌斑的培养,抽提得到重组 Bacmid 基因,随后转入昆虫培养细胞获得重组病毒,即可进行重组蛋白的表达生产 (图 3)。

利用位点特异性转座作用将外源基因插入到能在大肠杆菌增殖的穿梭载体 Bacmid,实现重组病毒的构建,该方法的优点在于:(1)由于重组病毒的分离是通过蓝白斑筛选,不存在野生型和非重组型病毒污染的问题,因此不需要传统繁琐的空斑分析来纯化重组病毒;(2)大大地缩短了重组病毒构建所需要的时间,可以由原来的 4~6 周或更长减少到仅 7~10 天。因此,该技术可以快速、同时分离多种重组病毒。这是一种目前最快速简捷地生产重组病毒的方法。目前,Invitrogen 公司已有 AcNPV 表达系统的 Bac-to-Bac 系列产品。我们目前已经开发成功了

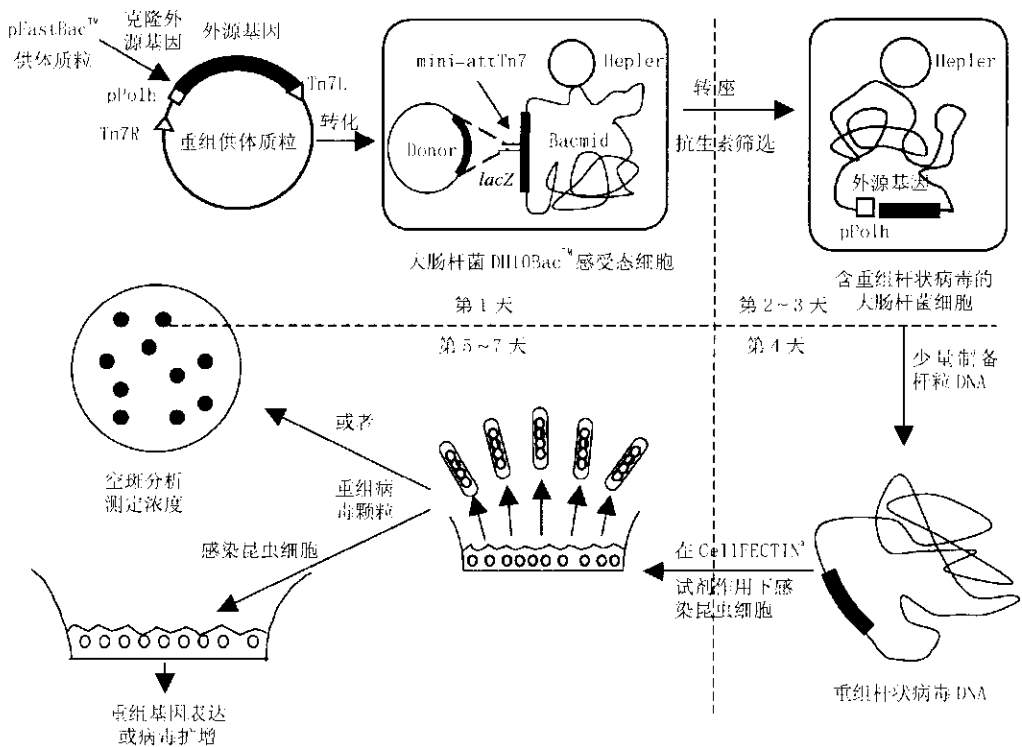


图3 Bac-to-Bac 系统产生重组杆状病毒和基因表达(仿 Invitrogen, 2003)

Fig. 3 Generation of recombinant baculovirus and gene expression with the Bac-to-Bac expression system (from Invitrogen, 2003)

适用于家蚕的 Bac-to-Bac 快速基因表达系统。

Luckow(1993)的方法能够产生单个的重组病毒,然而,菌落的扇形变异及形态多样性现象却不利于重组子的鉴别,挑选单个重组子及筛选 *lacZ* 表型仍需要保证其中仅含有重组杆状病毒 DNA 而无供体质粒。因此该系统的筛选机制难以满足需要大量重组子等领域中的应用,如文库的构建。Leusch 等(1995)对供体质粒和大肠杆菌菌株 DH10 β 进行了改进,他们在供体质粒的 mini-Tn7 转座子中引入了 *ts ori*,使带有供体质粒的菌株能够在 30 $^{\circ}$ C 稳定生长,在 44 $^{\circ}$ C 却不能。阻断 DH10 β 基因组中的转座位点后可以在 44 $^{\circ}$ C 直接筛选重组病毒,大大提高了转座效率,蓝白颜色筛选进一步确认外源基因正确插入到杆状病毒基因组。Airenne 等(2003)也对最初的 Bac-to-Bac 系统进行了改善,他们将原来供体质粒的氨苄青霉素抗性基因替换成枯草芽孢杆菌果聚糖蔗糖酶基因 (*Bacillus subtilis* levansucrase gene, *SacB*) 的定点突变基因 *SacB* #, 构建成载体 pBVboost。阻断 DH10 β 基因组中的转座位点,转座效率提高了 6 倍,彻底去掉了非转座背景。pBVboost 系统不仅增强了构建单个重组病毒的能力,还能够用于表达文库筛选等需要大量重组子的应用。

4 其他重组昆虫杆状病毒筛选技术

4.1 酵母-昆虫细胞穿梭载体

Patel 等(1991)构建了含有酵母的自我复制序列 (ARS)、着丝粒 (CEN) 和选择标记基因 URA3 的穿梭 AcNPV,修饰后的病毒能够在酵母中稳定扩增并保留了对昆虫细胞的感染性。为了便于在酵母中筛选重组病毒,又将 *SUP4-o* 基因插入穿梭载体。*SUP4-o* 是 tRNA^{Phe} 基因赭石突变型的校正等位基因,它编码 tRNA^{Phe} 的赭石抑制 tRNA,用于在 *ADE2* 和 *CAN1* 基因中含有赭石突变的酵母株中的筛选。*ADE2* 中的突变使酵母集落成粉红色,*CAN* 突变则使细胞有刀豆氨酸抗性。在带有赭石突变的宿主中,*SUP4-o* 基因的表达抑制这两种突变,集落为白色且无刀豆氨酸抗性,当 *SUP4-o* 中因插入外源基因而失活时,宿主的赭石突变不被抑制,菌落成红色且具有刀豆氨酸抗性。将该穿梭载体 DNA 与携带外源目的基因的质粒载体 DNA 共同转化酵母的原生质体,同源重组后导致缺失 *SUP4-o*,直接选择刀豆氨酸抗性的粉红色集落即获得重组病毒 DNA。用重组病毒 DNA 转染昆虫细胞,即可获得重组病

毒。

4.2 tk 基因标记技术

单纯疱疹病毒 I 型 (HSV1) 的 *tk* 基因产物胸苷激酶 (HSV1-TK),能催化核苷酸类似物 9-(1,3-二羟基-2-丙氧甲基)鸟嘌呤 (ganciclovir, GCV) 转变为抑制病毒 DNA 复制的物质 (程家安等,2001)。另外,研究表明 GCV 浓度到 100 μ mol/L 时,对 Sf-9 细胞活力、野生型 AcMNPV 复制以及重组 AcMNPV 中 β -半乳糖苷酶表达没有明显的影响。Godeau 等(1992)利用 *tk* 基因的上述特征,开发出一种新的重组病毒构建和筛选方法。他们将 HSV1-TK 基因置于转移载体中 AcMNPV 极早期基因 *ie-1(0)* 启动子控制之下,再同源重组到 AcMNPV 的 *polh* 基因位点上,构建成重组病毒 AcMNPV IE-1-TK,该重组病毒在感染极早期即表达 HSV1-TK,抑制病毒 DNA 复制;将连接有外源目的基因的转移载体 DNA 和 AcMNPV IE-1-TK 病毒 DNA 共转染昆虫细胞,子代病毒在 50 μ mol/L GCV 条件下感染昆虫细胞,筛选 *tk* 基因已经被目的基因替换的重组病毒,重组率在 85% 以上。

4.3 利用基因敲除技术

Zhao 等(2003)将基因敲除技术应用到重组病毒的构建中来。他们将含有细菌单拷贝复制子的 AcNPV 载体 BAC10 转入具有卡那霉素抗性的 ET 宿主菌 HS996 (*Kan*^R),将转化子命名为 HS996: BAC10。随后将 pBAD α β γ (*Ap*^R) 转化进 HS996: BAC10,得到能进行 ET 克隆的感受态菌株 HS996: BAC10: pBAD α β γ 。他们将氯霉素乙酰转移酶 (chloramphenicol acetyl transferase, CAT) 基因作为基因敲除的标记基因。在 ORF1629 内两个邻近但不相连的位点,分别由 CAT 基因 5' 端开始扩增了约 50 bp 的与 AcNPV 同源的序列,并在其中一个序列中引入一个 *Bsu*36 I 酶切位点。随后,利用 ET 克隆技术将扩增片段克隆进 HS996: BAC10: pBAD α β γ 。利用 ORF1629 插入失活和氯霉素抗性筛选出 HS996: BAC10 (*Cm*^R *Kan*^R) d 的菌株将其命名为 BAC10: KO1629。大量抽提杆状病毒 DNA,用 *Bsu*36 I 酶切后用于共转染。这个方法利用了必需基因 ORF1629 的插入失活原理和 ET 克隆技术,减少了重组病毒的构建时间,而且重组比例达到 100%,省去了筛选的过程,是真正的一步到位的重组技术。

4.4 以 PCR 产物直接构建重组杆状病毒

近来,侯松旺等(2003)发展了一种在不构建转移载体的前提下,以 PCR 产物直接构建同源重组杆状病毒的方法。依据 λ 噬菌体 Red 重组系统能介导

36 bp 以上的同源片段产生同源重组的原理,他们成功地用氯霉素抗性基因(Cm^R)置换了棉铃虫单粒包埋型核多角体病毒(HaSNPV)基因组中的 ORF135。首先人工合成一对长 60 bp 左右的引物,其中 40 bp 与 HaSNPV ORF135 的头部和尾部序列同源,另外 20 bp 分别为氯霉素抗性基因的尾部和头部序列,以含有 Cm^R 的质粒 pKD3 为模板,利用这对引物 PCR 合成了两侧各有 40 bp ORF135 同源臂的 Cm^R 基因,将此线性片段转化含有 HaSNPV 人工染色体(Bacmid)且能表达 λ 噬菌体 Red 重组酶的菌株中,获得了缺失 ORF135 并对氯霉素具有抗性的重组转化子。由于整个过程无需构建转移载体,重组过程在大肠杆菌中完成,大大缩短了重组病毒的构建过程。该方法可以广泛适用于其他具有较大基因组的病毒的基因置换和基因缺失。

5 结语

目前,昆虫杆状病毒表达系统主要包括两大类:欧美国家广泛使用的苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)表达系统和以中国、日本为代表的家蚕核型多角体病毒(BmNPV)表达系统(Smith *et al.*, 1983; Maeda *et al.*, 1985; Wu *et al.*, 2004)。构建重组杆状病毒,即将外源目的基因插入到杆状病毒中有 3 种基本策略:在昆虫细胞内重组,在大肠杆菌或酵母中重组及体外连接。目前重组杆状病毒构建和筛选的新方法层出不穷,空斑纯化技术仍是最经典的筛选纯化重组病毒的技术,但目前应用最广泛、最有效的是线性化技术和 Bac-to-Bac 技术。利用线性化技术,Invitrogen 公司开发了 Bac-N-Blue 和 BaculoDirect 杆状病毒表达系统,Novagen 公司开发了 BacVector 杆状病毒表达系统,Clontech 公司开发了 BacPAK 杆状病毒表达系统,这些表达系统都具有非重组背景少,重组比例高(90%以上)的特点,一般不再需要空斑分析,大大节省了重组病毒构建的时间。但是不能保证所得到的病毒全部为重组病毒。Invitrogen 公司利用 Bac-to-Bac 技术开发了适用于 AcNPV 的 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统,该系统革命性地改变了以往重组病毒构建的方法,能够得到遗传上绝对均一的重组病毒。但是,目前该领域国外开发的相关基因工程产品(包括质粒载体等)大都是面向 AcNPV 的表达系统,AcNPV 表达系统主要使用昆虫培养细胞进行表达,虽然可以无血清悬浮培养大规模生产重组蛋白(O'Reilly *et al.*, 1994;

Patterson *et al.*, 1995; Ikonou *et al.*, 2003),但是成本相对较高。而家蚕 BmNPV 表达系统由于可以利用家蚕作为表达载体,具有成本低、适合产业规模化生产的特点,非常具有我国特色(Wu *et al.*, 2001, 2004)。AcNPV 和 BmNPV 两者相似,均具有 130 kb 大小的双链环状 DNA 基因组,且高度同源(大于 90%),但寄主范围有各自的专一性,两者不能交叉感染(Griffiths *et al.*, 1999)。我们对 Invitrogen 公司的 Bac-to-Bac 系列产品进行适当改造,构建了适用于家蚕的 Bac-to-Bac 表达系统,这可以成为拥有我国自主知识产权的基因工程产品。

参考文献 (References)

- Airenne KJ, Peltomaa E, Hytonen VP, Laitinen OH, Yla-Herttuala S, 2003. Improved generation of recombinant baculovirus genomes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 31(17): 101.
- Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee RD, 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 202(2): 586-605.
- Bollag RJ, Waldman AS, Liskay RM, 1989. Homologous recombination in mammalian cells. *Annu. Rev. Genet.*, 23: 199-225.
- Cheng JA, Tang ZH, Zhang CX, 2001. *Molecular Biology of Insect*. Beijing: Science Press. 249-292. [程家安,唐振华,张传溪,2001. 昆虫分子生物学. 北京: 科学出版社. 249-292]
- Clontech, 1999. BacPAK™ Baculovirus Expression System. User Manual.
- Davies AH, 1994. Current methods for manipulating baculoviruses. *Biotechnology (NY)*, 12(1): 47-50.
- Godeau F, Saucier C, Kourilsky P, 1992. *tk* gene screening used in baculovirus expression system. *Nucleic Acids Res.*, 20(23): 6239-6246.
- Griffiths CM, Barnett AL, Ayres MD, Windass J, King LA, Possee RD, 1999. *In vitro* host range of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus recombinants lacking functional. *J. Gen. Virol.*, 80: 1055-1066.
- Hou SW, Chen XW, Wang HZ, Hu ZH, 2003. An efficient method of constructing homologous recombinant baculovirus with PCR-amplified fragments. *Science in China (Ser. C Life Sciences)*, 33(2): 169-174. [侯松旺,陈新文,王汉中,胡志红,2003. 一种以 PCR 产物直接构建同源重组杆状病毒的方法. 中国科学(C辑), 33(2): 169-174]
- Hu JX, 1994. Construction of Bm-BacPak Based on *Bombyx mori* L. Doctoral Thesis. Shanghai Institute of Biochemistry of Academia Sinica. [胡建新, 1994. Bm-BacPAK 病毒的构建. 中国科学院上海生物化学研究所博士论文]
- Huser A, Hofmann C, 2003. Baculovirus vectors: novel mammalian cell gene-delivery vehicles and their applications. *Am. J. Pharmacogenomics*, 3(1): 53-63.
- Ikonou LY, Schneider JS, Agathos N, 2003. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62: 1-20.
- Invitrogen, 2003. 2003 Catalog. 217-244.

- Kitts PA, 1995. Production of recombinant baculoviruses using linearized viral DNA. *Methods Mol. Biol.*, 39: 129–142.
- Kitts PA, Ayres MD, Possee RD, 1990. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Res.*, 18(19): 5 667–5 672.
- Kitts PA, Possee RD, 1993. A method for producing recombinant transfer vectors at high frequency. *Biotechniques*, 14(5): 810–817.
- Kost TA, Condreay JP, 2002. Recombinant baculovirus as mammalian cell gene-delivery vector. *Trends Biotechnol.*, 20(4): 173–180.
- Leusch MS, Lee SC, Olins PO, 1995. A novel host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. *Gene*, 160: 191–194.
- Lu HS, 1998. *Molecular Biology of Insect Viruses*. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press. 506–508. [吕鸿声, 1998. 昆虫病毒分子生物学. 北京: 中国农业科技出版社. 506–508]
- Luckow VA, 1993. Baculovirus systems for the expression of human gene products. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4(5): 564–572.
- Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO, 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.*, 67(8): 4 566–4 579.
- 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.
- Novagen, 2003. 2002–2003 Catalog. 116–125.
- O' Reilly DR, Miller LK, Luckow VA, 1994. *Baculovirus Expression Vector: A Laboratory Manual*. New York: Oxford University Press.
- Orr-Weaver TL, Szostak JW, Rothstein RJ, 1981. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78(10): 6 354–6 358.
- Patel G, Nasmith K, Jones N, 1991. A new method for the isolation of recombinant baculovirus. *Nucleic Acids Res.*, 20(1): 97–104.
- Patterson RM, Selkirk JK, Merrick BA, 1995. Baculovirus and insect cell gene expression: review of baculovirus biotechnology. *Environ. Health Persp.*, 103(7–8): 756–759.
- Shuler ML, Wood HA, Granados RR, Hammer DA, 1994. *Baculovirus Expression Systems and Biopesticides*. New York: Wiley-Liss, Inc. 1–259.
- 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.
- Sun SH, Zhang PW, Dai JX, 2001. *Gene Engineering Principles and Methods*. Beijing: People's Military Medical Press. 92–100. [孙树汉, 张平武, 戴建新, 2001. 基因工程原理与方法. 北京: 人民军医出版社. 92–100]
- Wang FS, Yang YZ, Qi YP, 1995. Rapid selection of recombinant baculovirus using single cell cloning. *J. Wuhan Univ. (Natural Science Edition)*, 41(2): 229–233. [王福山, 杨远征, 齐义鹏, 1995. 单细胞克隆法快速筛选重组昆虫杆状病毒. 武汉大学学报(自然科学版), 41(2): 229–233]
- Wu XF, Cao CP, Kumar VS, Cui WZ, 2004. An innovative technique for inoculating recombinant baculovirus into the silkworm *Bombyx mori* using lipofectin. *Res. Microbiol.*, 155(6): 462–466.
- Wu XF, Cao CP, Xu YX, Lu XM, 2004. Construction of a host range-expanded hybrid baculovirus of BmNPV and AeNPV, and knockout of cysteinase gene for more efficient expression. *Science in China (Ser. C Life Sciences)*, 47(5): 406–415.
- 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 Express. Purif.*, 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. *J. Biotechnol.*, 111(3): 253–261.
- Zhao YG, David AG, Chapman DA, Jones IM, 2003. Improving baculovirus recombination. *Nucleic Acids Res.*, 31(2): 6.

(责任编辑: 黄玲巧)