

能产生多角体的可线性化杆状病毒的构建

于峰¹, 朱姗颖¹, 李兵², 沈卫德², 王文兵¹

(¹江苏大学生命科学研究院, 江苏镇江 212013; ²苏州大学生命科学学院, 江苏苏州 215123)

摘要:【目的】改进用于同源重组研究的制备杆状病毒 DNA 的方法。【方法】采用 PCR 方法从 BmNPV 中扩增出多角体基因, 并在其两端引入 Bsu36 I 酶切位点。将此片段克隆入转移载体 pBacPAK8 中, 与线性化的杆状病毒 DNA 共转染昆虫细胞, 获得重组病毒。该病毒能形成多角体, 便于纯化, 同时可以被 Bsu36 I 酶切。该重组病毒的多角体纯化后被裂解, 并提取病毒 DNA。病毒 DNA 经 Bsu36 I 酶切后, 与含 gfp 基因的转移质粒共转染家蚕 BmN 细胞, 在荧光显微镜下观察重组病毒的转染效率。【结果】BmNPV 多角体基因克隆入转移载体 pBacPAK8 中后, 与线性化的 AcPak6 及 BmPak6 DNA 共转染 Sf 细胞及 BmN 细胞, 均能产生大量的多角体。获得的重组病毒 DNA 经酶切后, 进一步与含 gfp 基因的转移质粒共转染的实验表明, 这种改造后的重组病毒仍具有较高的转染重组率。【结论】本实验成功地对用于同源重组的杆状病毒 DNA 进行了改进, 简化了病毒 DNA 的纯化方法, 并且重组效率较高。

关键词: 昆虫-杆状病毒; 表达; BmNPV; DNA 提取

Improvement of Baculoviral DNA Extraction in Insect-Baculovirus Expression System

YU Feng¹, ZHU Shan-ying¹, LI Bing², SHEN Wei-de², WANG Wen-bing¹

(¹ Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu; ² College of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215123, Jiangsu)

Abstract: 【Objective】 The aim of this research is to improve the method of baculovirus DNA preparation used for homologous recombination. 【Method】 Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the polyhedrin fragment with two Bsu 36 I sites added. The fragment, which was cloned into transfer vector pBacPAK8, was cotransfected with linear baculoviral DNA into insect cells and the recombination virus was gained. The harvested virus could form polyhedra and easy to be purified. To extract the viral DNA, the recombinant baculoviral polyhedron particles were purified and lysed. The viral DNA, linearized by Bsu36 I restriction enzyme, was cotransfected into BmN or Sf cells with transfer vector with the gfp gene. The transfection efficiency was measured by the fluorescence. 【Result】 BmNPV polyhedrin fragment cloned into transfer vector pBacPAK8 was cotransfected into Sf cell or BmN cells with AcPak6 and BmPak6, respectively. BmN cells and Sf cells both could produce lots of polyhedron. Cotransfection with transfer vector with gfp fragment showed that it has high transfection efficiency. 【Conclusion】 The results indicate that this method succeeded to improve the baculovirus DNA used for homologous recombination.

Key words: Insect-Baculovirus; Expression; BmNPV; Extraction of DNA

0 引言

【研究意义】近年来, 昆虫杆状病毒表达系统因其具有表达量高、安全无害并且能对表达产物进行糖基化、蛋白折叠磷酸化等修饰等优点而被广泛的应用生产新型药物的研究和蛋白、多肽的生物制备^[1-3]。目

前, 已有近千种外源基因在该系统中进行了表达。【前人研究进展】外源基因通过两种途径插入到杆状病毒, 即同源重组和转座。一般通过同源重组的方法来筛选重组病毒, 即观察病毒形成的空斑是否含多角体以分辨。这种方式获得重组病毒的概率相当低, 约为 0.1%~1%^[4]。后来发展了用 lac Z 基因取代原始的多

收稿日期: 2007-05-18; 接受日期: 2007-08-13

基金项目: 江苏大学青年基金 (1283000066); 江苏省农林厅“六大人才高峰”基金项目

作者简介: 于峰 (1977-), 男, 江苏连云港人, 助理研究员, 博士研究生, 研究方向为分子生物学。Tel: 15921059358; 13775544437; E-mail: yufeng@ujs.edu.cn。通讯作者王文兵 (1966-), 男, 江苏镇江人, 副研究员, 研究方向为病毒分子生物学。Tel: 0511-8790629; E-mail: wenbingwang@ujs.edu.cn

角体基因,并在 lacZ 基因内部引入了病毒基因组中没有的酶切位点,对病毒 DNA 进行酶切,与转移质粒同源重组,提高重组效率^[5,6]。但在该体系中,由于杆状病毒的多角体基因被 lacZ 取代,不能形成多角体。因此,必须通过收集大量的病毒粒子经超速离心后才能酶解纯化。【本研究切入点】目前,中国主要以家蚕细胞和幼虫为表达对象,应用家蚕杆状病毒表达外源蛋白具有很大的实际应用价值。【拟解决的关键问题】通过同源重组的原理,在多角体基因的翻译区上游和 3'终止区引入 *Bsu*36I 位点,通过置换 lacZ 基因而形成一种具多角体的亲本病毒,这样可以通过收集多角体获得大量的病毒 DNA,该方法不需超速离心设备,且简化了提取过程。对目前的昆虫杆状病毒表达系统进行改造,更方便于家蚕病毒的重组。

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

家蚕 BmN 细胞, BmPak6 亲本病毒, Sf 细胞, AcPak6 亲本病毒, 转移质粒 pBacPAK8 由中国科学院上海生物化学与细胞研究所吴祥甫研究员馈赠。

1.2 菌株和质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli*. DH5 α 由本课题组保存。pMD18-T Vector 购自 TaRaKa 公司。

1.3 试剂

*Bam*H I、*Eco*R I、T₄ DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、 λ -*Hind* III digest DNA marker 购自 TaRaKa 公司; Lipofectin 购自 Invitrogen 公司; *Bsu* 36 I 为 MBI 公司产品; PCR 产物回收试剂盒、胶回收试剂盒均为上海华舜生物有限公司产品。

1.4 试验方法

1.4.1 杆状病毒 BmNPV DNA 的提取 当细胞长至 60% 时接病毒液,感染 72 h 后收集细胞。用 PBS 洗涤 1 次,加 250 μ l TE 悬浮细胞,充分打匀。加 250 μ l 裂解液(1 mol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0 10 μ l; 0.5 mol·L⁻¹ EDTA 4 μ l, β -巯基乙醇 10 μ l; 10% SDS 0.8 μ l,定容至 1 ml), 16 μ l Protein K (10 mg·ml⁻¹), 50 $^{\circ}$ C 水浴 5 h,充分裂解细胞,然后加入 4 μ l RNase A (10 mg·ml⁻¹), 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,去除 RNA 污染。酚、氯仿抽提去除蛋白,最后乙醇沉淀病毒 DNA, TE 溶解过夜, 4 $^{\circ}$ C 保存待用^[7]。

1.4.2 PCR 扩增多角体基因片段 根据 NCBI 数据库中杆状病毒(BmNPV)多角体基因序列设计一对引物,引物中方框内序列为在多角体基因两端引入的 *Bsu* 36 I

酶切位点,引物中阴影部分序列为便于多角体基因体外亚克隆操作而引入的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点。引物由上海基因公司合成,上游引物为: Primer1, 5'-GGCGGATCCTTAGGATGCCGAATTATTCATAC A-3',下游引物为 Primer2, 5'-GACGAATTCCCTCAGGTTAATACGCCGACCAGT-3'; 以提取的 BmNPV DNA 为模板,通过 PCR 扩增多角体基因片段,程序为: 94 $^{\circ}$ C, 变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C, 50 s, 50 $^{\circ}$ C, 40 s, 72 $^{\circ}$ C, 1 min 共 3 个循环; 94 $^{\circ}$ C, 50 s; 64 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 共 25 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.4.3 基因的纯化、克隆及鉴定 将纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,操作步骤参照 T 载体说明书进行。取 3 μ l 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 在含氨苄青霉素(100 mg·L⁻¹)的 LB 平板上挑取白色单个菌落,经扩大培养后,抽提质粒 DNA^[8]。以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切质粒筛选重组 DNA,并将重组质粒测序(由上海基因公司完成)。

1.4.4 重组转移质粒的构建 以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切 pMD18 重组质粒,回收 BmNPV 多角体基因,并以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切杆状病毒表达系统的转移质粒 pBacPAK8,用 T4 DNA 连接酶将两者 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接液转化感受态细菌 DH5 α ,挑取阳性克隆进行酶切鉴定并命名为 pBacPAK8-polh。

1.4.5 与杆状病毒共转染 BmN 细胞和 Sf 细胞 BmN 和 Sf 细胞在含有 10%胎牛血清的 1 \times TC2100 培养基中 27 $^{\circ}$ C 培养。

重组转移质粒 pBacPAK8-polh 分别与线性化 BmPak6 和 AcPak6 病毒共转染 BmN 细胞和 Sf 细胞^[9]。转染 4~6 d 后,收集、纯化显微镜下观察到的多角体,并将纯化后的多角体病毒再次感染 BmN 细胞和 Sf 细胞,4 d 后加入 X-gal,观察其能否分解 X-gal。

2 结果与分析

2.1 BmNPV 多角体基因克隆和重组转移质粒的获得

根据 BmNPV 多角体基因的序列,在起始密码子 ATG 前添加了 *Bsu*36 I 的酶切位点,再加上 *Bam*H I 位点与转移质粒 pBacPAK8 相匹配,在 3'端也同样引入 *Bsu*36 I 的酶切位点和用于连接的 *Eco*R I 位点。阳性克隆经 PCR 鉴定(图 1)和 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切鉴定后(图 2),为了证实已引入了 *Bsu*36 I 位点,用 *Bsu* 36 I 酶切,结果也出现了约 730 bp 的 DNA 片段,序列分析结果表明整个片段的碱基没有发生突变,可以用作同源重组。

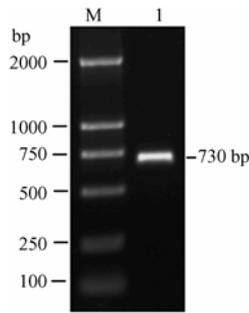


图 1 多角体基因的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification of polyhedron fragment

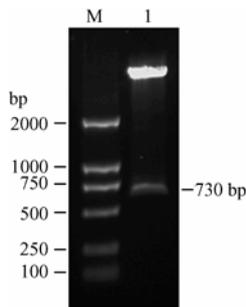


图 2 多角体基因的酶切鉴定

Fig. 2 The restriction enzyme digestion of recombinant plasmid

2.2 重组杆状病毒的获得

重组转移质粒分别与 BmNPV 和 AcNPV 的线性化亲本病毒共同转染 BmN 细胞和 Sf 细胞。转染的 BmN 和 Sf 细胞中均观察到多角体的产生 (图 3、图 4)。为了进一步鉴定是否有含 lac Z 基因的病毒被包装入多角体, BmN 和 Sf 细胞中观察到的多角体经分

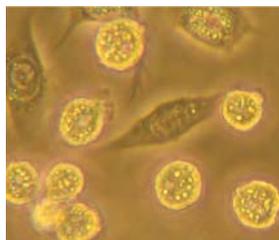


图 3 重组转移质粒 pBacPAK8-polh 与 BmNPV 线性化亲本病毒共转染 BmN 细胞, 观察到的多角体 (转染后 48 h, ×200)

Fig. 3 The recombinant transfer vector pBacPAK8-polh and linearized BmNPV cotransfected BmN cells

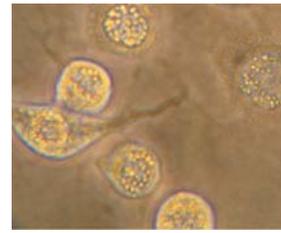


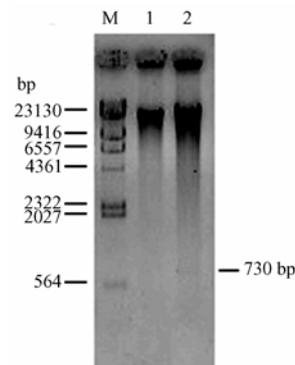
图 4 重组转移质粒 pBacPAK8-polh 与 AcNPV 的线性化亲本病毒共转染 sf 细胞, 观察到的多角体 (转染后 48 h, ×200)

Fig. 4 The recombinant transfer vector pBacPAK8-polh and linearized AcNPV cotransfected Sf cells

离纯化, 经再感染后加入 X-gal, 发现细胞不能分解 X-gal, 表明已获得了纯化的重组多角体病毒。

2.3 含重组多角体基因的杆状病毒转染效果检测

获得的重组病毒经扩大繁殖后, 分离、纯化多角体, 并提取多角体 DNA。DNA 以 *Bsu* 36I 酶切后电泳检测, 有一条与多角体基因片段大小相当的条带 (图 5), 表明引入该酶切位点的病毒 DNA 能够线性化。重组病毒 DNA 与含 *gfp* 基因的转移质粒共转染 BmN 细胞 48 h 后, 在荧光显微镜下可以观察到荧光的产生, 但无多角体的出现 (图 6), 计数视野中 *gfp* 表达阳性的细胞数和视野中总细胞数, 计算转染率 (图 7), 数据表明这种经改造的多角体病毒的具有较高的转染效率。AcNPV 也是如此。

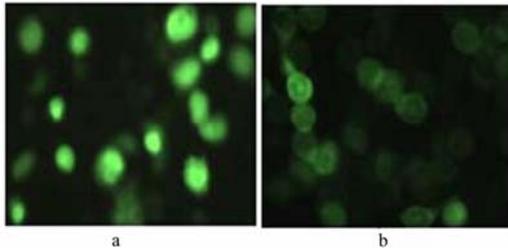


M: Lambda DNA/*Hind* III Marker; 1: 从昆虫 Sf 细胞中抽提的 BmNPV; 2: BmNPV 经 *Bsu* 36 I 酶切

M: Lambda DNA/*Hind* III Marker; 1: BmNPV prepared from insect Sf cells; 2: BmNPV digested by *Bsu*36 I

图 5 酶切鉴定在杆状病毒 BmNPV 中插入的多角体基因

Fig. 5 The restriction enzyme digestion of BmNPV recombinant baculoviral DNA



a、b 分别为重组病毒 DNA 与含 *gfp* 基因的转移质粒共转染 BmN 细胞及 Sf 细胞的荧光图

a and b figures represent the cotransfection of the recombination virus DNA with *gfp* fragment into BmN cells or Sf cells, respectively

图 6 重组病毒 DNA 与含 *gfp* 基因的转移质粒共转染昆虫细胞 (转染后 48 h, $\times 100$)

Fig. 6 The recombinant viral DNA and transfer vectors containing *gfp* fragment cotransfected insect cells

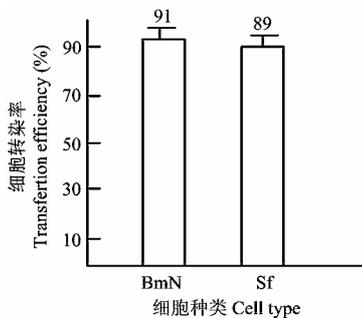


图 7 含 *gfp* 的转移质粒和重组亲本病毒共转染 BmN 细胞和 Sf 细胞转染率

Fig. 7 Transfection efficiency of transfer vector containing *gfp* and recombinant baculoviral virus cotransfected BmN cells or Sf cells, respectively

3 讨论

自 20 世纪 80 年代 Smith 等^[10]和 Maeda 等^[11]建立早期杆状病毒表达体系 (BES) 以来, 因其具有外源蛋白表达量高、易于纯化, 并能对表达的外源蛋白进行翻译后修饰的优点而被广泛使用^[12-14]。AcNPV 和 BmNPV 是使用最为广泛的两种杆状病毒表达体系, 但两者均具有严格的宿主特异性, AcNPV 只能感染草地贪夜蛾和粉纹夜蛾, 不能感染家蚕, 而 BmNPV 仅能感染家蚕。AcNPV 体系中通过重组和转座两种方式获得携带外源基因的重组病毒, 而 BmNPV 体系主要通过同源重组的方式。基于高效的位点特异性转座原理, AcNPV 体系已经成功地开发出能够高表达外源蛋

白的 Bac-to-Bac 系统^[15-17]。但由于其严格的宿主特异性, 产生的重组病毒不能感染家蚕及 BmN 细胞。Motohashi T. 等虽然构建了能够表达 *gfp* 且能够感染家蚕及家蚕细胞的 Bacmid 杆粒, 但未能得到广泛应用^[18]。

目前的家蚕-杆状病毒表达系统仍然使用亲本病毒 BmPak6 DNA 和携带外源基因的转移质粒 pBacPAK8 在细胞内同源重组来表达外源蛋白。此体系主要存在两个缺陷: 一是病毒 DNA 难以获得。主要通过感染 BmN 细胞后收获病毒粒子, 再进行超速离心纯化, 这种方式获取的病毒 DNA 较少, 另外, 病毒粒子需经过蛋白酶水解等比较复杂的过程。另一个缺点是在作空斑分析时, 有时加入的 X-gal 不能很清晰地显现蓝白斑, 难以分辨, 而且加入 X-gal 后也影响细胞的生长状态^[6,19]。本试验中, 作者将多角体基因重新引入家蚕-杆状病毒表达体系中, 弥补了家蚕-杆状病毒表达系统存在的缺陷。

多角体基因重新引入家蚕-杆状病毒表达体系中解决了以往转移质粒和亲本病毒在细胞内重组难以筛选重组病毒的问题, 用显微镜下可见的多角体 (即为重组质粒) 筛选代替以往的蓝白斑筛选, 从而使筛选工作变得简单易行, 解决了以往蓝白斑筛选可能出现假阳性问题。

用多角体的方式收集病毒, 代替超速离心的方法收集病毒, 从而使亲本病毒的制备变得简单易行; 病毒 DNA 还可以通过用多角体添食家蚕的方式大量获得, 而且在多角体基因两端添加的 *Bsu36 I* 位点, 可以使病毒线性化, 提高重组率^[20]。

转染报道基因 *gfp* 的试验也表明, 改进的重组病毒仍然具有 90% 的重组率, 具有实际应用价值, 此外, 将多角体基因重新引入 AcNPV 系统中, 同样能够简化 AcNPV 体系中通过同源重组方式表达外源蛋白的程序。

4 结论

本试验将多角体基因克隆到转移载体 pBacPAK8 中, 通过同源重组获得含多角体基因的重组病毒。该重组病毒具有较高的转染效率, 简化了以往的试验过程, 对家蚕-杆状病毒表达体系成功地进行了改进。

References

- [1] 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学. 北京: 中国农业科技出版社, 1998. Lu H S. *Molecular Biology of Insect Viruses*. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 1998. (in Chinese)

- [2] Luckow V A, Summers M D. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Biotechnology*, 1988, 6: 47-55.
- [3] Maeda S. Expression of foreign genes in insect cells using baculovirus vectors. *Annual Review of Entomology*, 1989, 34: 351-372.
- [4] Ulrike W, Robert D P. A baculovirus dual expression vector derived from the AcMNPV polyhedron and p10 promoters: coexpression of two influenza virus genes in insect cells. *Journal of General Virology*, 1991, 72: 2967-2974.
- [5] Maeda S. Gene transfer vectors of a baculovirus, *Bombyx mori*, and their use for expression of foreign genes in insect cells. *In Invertebrate Cell System Applications*, 1989: 167-181.
- [6] Ayres M D, Howard S C, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee R D. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1994, 202: 586-605.
- [7] 朱姗姗, 王文兵, 朱 江. 豆天蛾核型多角体病毒 gp41 同源基因的克隆和序列分析. *中国农业科学*, 2006, 39(4): 728-733.
Zhu S Y, Wang W B, Zhu J. Cloning and sequence analysis of gp41 gene of *Clanis bilineata* nuclear polyhedrosis virus. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(4): 728-733. (in Chinese)
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed), New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Summers M D, Smith G E. *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555, 1987.
- [10] Smith G E, Summers M D, Fraser M J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a Baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology*, 1983, 2156-2165.
- [11] Maeda S, Kawai T, Obinata M, Fujiwara H, Horiuchi T, Saeki Y, Sato Y, Furusawa M. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 1985, 315: 392-394.
- [12] Ailor E, Takahashi N, Tsukamoto Y. N-glycan patterns of human transferrin produced in *Trichoplusia ni* insect cells: Effect of mammalian galactosyltransferase. *Glycobiology*, 2000, 10: 837-847.
- [13] Breitbach K, Jarvis D L. Improved glycosylation of a foreign protein by Tn5B 124 cells engineered to express mammalian glycosyltransferase. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 74: 230-239
- [14] Jarvis D L. Developing baculovirus-insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. *Virology*, 2003, 310: 1-7.
- [15] Luckow V A, Lee S C, Barry G F, Olins P O. Efficient generation of insectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *The Journal of Virology*, 1993, 67: 4566-4579.
- [16] Ciccarone V C, Polayes D, Luckow V A. Generation of recombinant baculovirus DNA in *E. coli* using baculovirus shuttle vector. (Reischt U ed). Totowa, NJ: Humana Press, 1997.
- [17] Polayes D, Ciccarone V, Anderson D, Harris R, Donahue R. Rapid generation of recombinant baculoviruses, expression of foreign genes, and protein purification using the bac-to-bac expression systems. *The FASEB Journal*, 1996, 10: 1124-1134.
- [18] Motohashi T, Shimojima T. Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 326: 564-569.
- [19] Blissard G W. Baculovirus-insect cell interactions. *Cytotechnology*, 1996, 20: 73-93.
- [20] Thomas A K, Patrick C, Donald L J. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(5): 567-577