

创建可视化的家蚕杆状病毒表达系统表达家蚕二分浓核病毒非结构蛋白 NS1

李国辉, 王鹏, 李芒芒, 徐五, 胡朝阳, 姚勤

江苏大学生命科学研究院, 江苏 镇江 212013

李国辉, 王鹏, 李芒芒, 等. 创建可视化的家蚕杆状病毒表达系统表达家蚕二分浓核病毒非结构蛋白 NS1. 生物工程学报, 2014, 30(4): 625-635.

Li GH, Wang P, Li MM, et al. Expression of *ns1* gene from *Bombyx mori* bidensovirus by a novel Baculovirus expression system. Chin J Biotech, 2014, 30(4): 625-635.

摘 要: 重组杆状病毒感染昆虫细胞是表达外源蛋白常用的一种方法。为有效鉴定转染的细胞中是否产生了重组病毒粒子, 对质粒 pFastBacI 进行改造, 构建了极早期基因 *ie1* 启动子控制的绿色荧光蛋白 *egfp* 基因表达盒, 以及多角体基因启动子控制的外源 DNA 的一个通用型双表达载体; 通过酶切、连接的方式, 将家蚕二分浓核病毒 *ns1* 基因连接到多角体启动子下游; 在转座酶的介导下, 该供体质粒上部分序列可转座到穿梭载体 Bm-Bacmid 上, 进而构建可同时表达 *egfp* 和 *ns1* 基因的重组杆粒。将构建的该重组杆粒 DNA 转染 BmN 细胞, 通过观察可视化的绿色荧光信号, 可迅速判定转染后的细胞中重组病毒粒子产生的情况, 收集转染后的细胞培养上清, 将其感染 BmN 细胞, 对感染 4 d 后的细胞总蛋白进行 Western blotting 分析, 结果表明能杂交到一条 36 kDa 大小的特异蛋白, 表明 NS1 蛋白成功获得了表达, 进而为深入研究 *ns1* 基因的功能奠定了基础。

关键词: 杆状病毒, 基因表达, 家蚕二分浓核病毒, 非结构蛋白 NS1

Received: August 26, 2013; **Accepted:** December 18, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31000080, 31270192), Startup Scientific Research Fund from Jiangsu University (No. 09JDG057).

Corresponding author: Guohui Li. Tel: +86-511-88797021; E-mail: 1000003593@mail.ujs.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31000080, 31270192), 江苏大学高级人才基金 (No. 09JDG057) 资助。

Expression of *ns1* gene from *Bombyx mori bidensovirus* by a novel Baculovirus expression system

Guohui Li, Peng Wang, Mangmang Li, Wu Xu, Zhaoyang Hu, and Qin Yao

Institute of Life Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

Abstract: Baculovirus gene expression is the most popular method to make target protein in cultured insect cells. To fast determine the generation of recombinant virus in cultured cells, donor plasmid of pFastBacI was modified by introducing *egfp* cassette. In the modified vector, *egfp* cassette was under the control of *ie1* promoter, and target gene cassette was under the control of polyhedron promoter. To evaluate the convenience of the genetically modified donor plasmid used in eukaryotic expression, *ns1* gene from *Bombyx mori bidensovirus* was ligated into the donor plasmid to generate recombinant plasmid pFastBacI- $\text{P}_{ie1}\text{-egfp-sv40-P}_{polh}\text{-ns1-sv40}$. Then the plasmid was transformed into DH10B competent cells containing Bm-Bacmid vector to produce the final recombinant Bm-Bacmid with the help of transposase. The resulting recombinant Bm-Bacmid was transfected into BmN cells to generate recombinant virus, which was easily and rapidly judged by green fluorescent signal observed in BmN cells. After infection for 96 h, the BmN cells were harvested and the total protein extracted from the infected BmN cells was subjected to Western blotting analysis. The result showed that a specific protein band about 36 kDa was detected, indicating that NS1 protein was successfully expressed in the BmN cells. In conclusion, the expression of NS1 protein with the modified expression system is useful for further research on the function of NS1 protein.

Keywords: Baculovirus, gene expression, *Bombyx mori bidensovirus*, non-structural protein NS1

杆状病毒-昆虫细胞表达系统 (BEVS) 是四大真核表达系统之一, 与其他表达系统相比, BEVS 具有一些独特的优越性, 具体表现在: 第一, 外源基因在多角体强启动子的控制下, 其表达产量较高; 第二, BEVS 具有能同时表达多个基因以及大片段 DNA 的能力; 第三, 表达产物具有正确的折叠以及翻译后加工、修饰等特性; 第四, 由于杆状病毒不感染脊椎动物, 是一个相对安全的生物表达系统^[1-4]。苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒(AcNPV)或家蚕核型多角体病毒(BmNPV) 是 BEVS 中常利用的杆状病毒表达载体, 所表达出来的蛋白产物与其对应的天然产物具有相近的生物活性、抗原性和免疫原性, 是一种非常理想的外源蛋白表达系统^[5-6]。自

1985 年利用该系统首次成功表达人干扰素- β (IFN- β) 以来, 现已包括白介素 1-3 (IL-1、IL-2、IL-3) 以及病毒来源的蛋白都获得表达, 并对其进行了后续的功能研究, 进而为蛋白药物以及高效价基因工程疫苗的研发和生产奠定了基础^[7-10]。

BEVS 在生产实践中已有近 30 年的应用历程, 如今, BEVS 已被广泛应用于外源蛋白的表达、疫苗生产、生物杀虫剂和基因治疗等研究领域^[11-14]。利用 BEVS 表达外源蛋白, 需要将重组杆粒 DNA 转染昆虫细胞制备具有感染性的重组病毒粒子^[15-17], 因此有效地判断转染的细胞中是否成功地产生了重组病毒粒子, 是后续实验中靶蛋白获得表达的一个重要前提。通

过比较转染前后的细胞形态变化, 经验丰富的研究人员能够判定感染性病毒粒子产生的情况, 而初学者难免不会作出误判, 不利于重组病毒粒子的鉴定及后续研究的进行。为此, 本研究在 BEVS 中引入绿色荧光基因, 构建了 *BmNPV* 来源的极早期基因 *ie1* 启动子控制 *egfp* 基因表达盒和多角体启动子控制外源基因双表达载体, 通过转座将这两个启动子控制下的双表达盒插入到家蚕穿梭载体 *Bm-Bacmid* 中, 创建一个整合型表达 *egfp* 和靶基因的重组 *Bm-Bacmid*, 进而利用可视化的绿色荧光信号, 来快速判定重组杆粒 DNA 在转染后的家蚕 BmN 细胞中病毒粒子的产生。

家蚕二分浓核病毒编码一个非结构蛋白 NS1, 研究表明该蛋白是一个多功能蛋白, 在病毒复制和增殖过程中起着重要的作用^[18-20]。生物信息预测结果表明 NS1 蛋白序列上有多个磷酸化修饰位点, 预示该蛋白在病毒增殖过程中很可能发生磷酸化修饰, 这些修饰对 NS1 蛋白的多功能调控起着重要的作用。因此, 为进一步揭示不同位点磷酸化修饰的 NS1 蛋白与功能之间的关系, 我们将 *ns1* 基因克隆入上述构建的重组供体质粒, 产生重组供体质粒 pFastBacI- $\boxed{P_{ie1-egfp-sv40}}$ - $\boxed{P_{pol-ns1-sv40}}$, 通过转座进而构建整合表达 *egfp* 和 *ns1* 的整合型重组杆粒, 将该重组杆粒 DNA 转染家蚕 BmN 细胞, 通过表达的绿色荧光信号可快速判定昆虫 BmN 细胞中重组病毒粒子的产生, 收集转染后的细胞培养上清感染细胞, 对感染 4 d 后的 BmN 细胞总蛋白进行 Western blotting 分析, 结果表明在 36 kDa 的位置出现一条特异的蛋白条带, 该研究为进一步阐明 NS1 蛋白功能及其机制奠定坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞和试剂

用于质粒克隆的大肠埃希菌 *Escherichia coli* TG1 及含有家蚕穿梭质粒 *Bm-Bacmid* 的 DH10B 宿主菌在 LB 培养基中进行培养, 含有 pFastBacI 质粒的大肠杆菌 DH5 α 以及含有 pFastHTB 质粒的大肠杆菌 DH5 α 保存于本实验室。家蚕 BmN 细胞培养于添加 10% 胎牛血清的 TC-100 昆虫细胞培养基中, 在 27 °C 的恒温培养箱中进行培养, 培养的家蚕 BmN 细胞用于转染及病毒感染实验。pMD18T-*egfp* 和 pMD18T-*ns1* 载体由本实验室保存。卡那霉素、氨卞青霉素和四环素购自 Sigma 公司。*Sna*B I、*Bam*H I、*Kpn* I、*Eco*R I、*Spe* I、*Xba* I、*Nhe* I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶和 pMD18-T 载体购自宝生物工程 (大连) 有限公司。IPTG 和 X-gal 购自上海朝瑞生物公司。引物合成和序列测定由上海生工生物工程公司完成。

1.2 重组质粒 pFastBacI- $\boxed{P_{ie1-egfp-sv40}}$ - $\boxed{P_{pol}}$ 的构建

为扩增杆状病毒 *BmNPV* 基因组中的极早期基因 *ie1* 启动子, 通过 Primer Premier 5.0 软件设计两条特异性引物 *ie1*-F 和 *ie1*-R (表 1), 通过 PCR 从 *BmNPV* 基因组中扩增 560 bp 长的 DNA 片段, 对扩增后的 DNA 片段分别进行 *Sna*B I 和 *Bam*H I 单酶切, 将酶切后的目的 DNA 进行切胶纯化, 并将纯化后的 DNA 克隆到 pFastHTB 载体上产生重组质粒 pFastHTB- $\boxed{P_{ie1}}$; 为扩增 *egfp* 基因序列全长, 通过 Primer Premier 5.0 软件设计两条特异性引物 *egfp*-F 和 *egfp*-R, 通过 PCR 扩增得到 720 bp 的 *egfp* 基因全长序列, 对扩增得到的目的 DNA 片段进行

表 1 本研究所需引物列表

Table 1 Primers used in the study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Enzyme digestion sites
<i>ie1</i> -F	<u>TACGTA</u> GTAAGTTATTAATAAAATGCACTGACACG	<i>Sna</i> B I
<i>ie1</i> -R	<u>GGATCC</u> ATCGTGTGCGCCGCCA	<i>Bam</i> H I
<i>egfp</i> -F	<u>GGATCC</u> ATGGTGAGCAAGGGC	<i>Bam</i> H I
<i>egfp</i> -R	<u>GGTACCT</u> TACTTGTACAGCTCGTCCATG	<i>Kpn</i> I
P _{ie1} -egfp-sv40-F	GCGAATTCGTAGGTTATTGATAAAATGAAC	<i>Eco</i> R I
P _{ie1} -egfp-sv40-R	GCTACGTA <u>GATCC</u> AGACATGATAAGATACATTG	<i>Sna</i> B I
P _{ph} -F	GCACTAGTATCATGGAGATAATTAATAATGATAA	<i>Spe</i> I
P _{ph} -R	TATCTAGAGCCCTGAAAATACAGGTTTTC	<i>Xha</i> I
<i>ns1</i> -F	ATGCTAGCATGGAATCGAAGTCAAATTT	<i>Nde</i> I
<i>ns1</i> -R	TACTCGAGCTACCCATAATATTATTATATACG	<i>Xho</i> I

Note: underlined letters indicate restriction enzyme digestion sites.

*Bam*H I / *Kpn* I 双酶切, 对双酶切后的产物进行切胶回收, 并将回收后的产物与载体 pFastHTB-P_{ie1} 进行连接, 结果产生重组质粒 pFastHTB-P_{ie1}-*egfp*。

为扩增包括聚尾信号 sv40 序列在内的 *egfp* 基因表达盒, 通过 Primer Premier 5.0 软件设计两条特异性引物 P_{ie1}-*egfp*-sv40-F 和 P_{ie1}-*egfp*-sv40-R, 通过 PCR 从重组质粒 pFastHTB-P_{ie1}-*egfp* 中扩增整个 *egfp* 表达盒: P_{ie1}-*egfp*-sv40, 将扩增的 P_{ie1}-*egfp*-sv40 连接到质粒 pFastBac I, 产生 pFastBac I -P_{ie1}-*egfp*-sv40 重组质粒。另外, 通过 Primer Premier 5.0 软件设计两条特异性引物 P_{ph}-F 和 P_{ph}-R, 以 pFastHTB 质粒为模板, 通过 PCR 特异性地扩增 P_{polh}-6×His-TEV 序列 (该序列中包含有多角体启动子序列、6 个组氨酸的标签序列以及 TEV 酶切序列)。将酶切回收后的 P_{polh}-6×His-TEV DNA 片段与载体 pFastBacI-P_{ie1}-*egfp*-sv40 进行连接, 对产生的重组质粒命名为 pFastBacI-P_{ie1}-*egfp*-sv40-P_{polh}。

1.3 重组质粒 pFastBacI-P_{ie1}-*egfp*-sv40-P_{polh}-*ns1*-sv40 的构建

通过 Primer Premier 5.0 软件设计两条特异性引物 *ns1*-F 和 *ns1*-R, 以抽提的 pMD18T-*ns1* 质粒为模板, 通过 PCR 特异性地扩增 *ns1* 基因。对扩增后的目的 DNA 片段进行 *Nhe* I / *Xho* I 双酶切, 将回收后的酶切产物与上述构建的重组质粒 pFastBac I -P_{ie1}-*egfp*-sv40-P_{polh} 进行连接, 产生 pFastBac I -P_{ie1}-*egfp*-sv40-P_{polh}-*ns1* 重组质粒, 由于该载体在连接的 *ns1* 序列后有 sv40 序列, 所以该载体又被命名为 pFastBacI-P_{ie1}-*egfp*-sv40-P_{polh}-*ns1*-sv40。

1.4 重组杆粒 Bm-Bacmid 的构建

采用氯化钙的方法^[21]制备含有 Bm-Bacmid 及表达转座酶的辅助质粒的大肠杆菌 DH10B 感受态细胞, 将 5 ng pFastBac I -P_{ie1}-*egfp*-sv40-P_{polh}-*ns1*-sv40 供体质粒加入到该感受态细胞中, 轻轻混匀后置于冰上 30 min, 42 °C 热击 45 s 于冰上放置 5 min, 加入 900 μL 的 SOC 培养基,

37 °C 剧烈振荡 (225 r/min) 4 h, 取 100 μ L 悬液涂布于含三抗 $K^+T^+G^+$ (50 μ g/mL 卡那霉素, 10 μ g/mL 四环素, 7 μ g/mL 庆大霉素) 以及 40 μ g/mL IPTG 和 20 mg/mL X-gal 的 LB 平板上, 37 °C 培养 36–48 h, 选取较大的白色单菌落进行培养, 抽提菌体中的重组 Bm-Bacmid, 并通过引物对其进行多轮 PCR 鉴定。

1.5 重组病毒粒子的制备

将经 PCR 鉴定正确的重组克隆接种在含有 3 种抗生素 $K^+G^+T^+$ (50 μ g/mL 卡那霉素、7 μ g/mL 庆大霉素、10 μ g/mL 四环素) 的 LB 液体培养基中, 在 37 °C、225–320 r/min 的条件下培养 48 h 后; 取 1.5 mL 培养的菌液离心, 对离心后的菌体抽提重组杆粒。在脂质体 Cellfectin® II (Cat.no.10362-100) 的介导下, 将上述抽提的重组杆粒 DNA 转染 BmN 细胞, 通过荧光显微镜对转染后的细胞进行荧光观察; 为进一步证实产生的重组病毒粒子是否具有感染性, 收集转染后的细胞培养上清, 将其与 BmN 细胞孵育 1 h 后, 弃上清, 添加完全培养基继续培养, 通过荧光显微镜对感染后的细胞在不同时间点进行连续观察。

1.6 Western blotting 分析

对重组杆粒 DNA 转染后的 BmN 细胞进行荧光显微观察, 收集能观察到绿色荧光的转染孔中的细胞培养上清, 将收集的转染上清感染 BmN 细胞, 进而收集感染 4 d 后的 BmN 细胞, 对感染后的细胞总蛋白进行 Western blotting 分析, 由于表达的 NS1 蛋白 N 端融合有 6 \times His 的序列标签, 用抗 6 \times His Tag 单克隆抗体 (Earthox) 为一抗, 碱性磷酸酶标记的马抗小鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司) 为二抗, 显色底物

为 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒 (海门碧云天生物技术有限公司)。

2 结果

2.1 重组质粒 pFastBacI-P_{ie1}-egfp-sv40-P_{polh} 的构建策略

为在 BEVS 中引入可视化绿色荧光信号, 通过将供体质粒 pFastBac I 改造为极早期基因 *ie1* 启动子控制的 *egfp* 表达盒和多角体启动子控制的可用于外源基因插入的多克隆酶切位点, 具体构建流程见图 1。以家蚕杆状病毒 BmNPV 基因组为模板, 对 *ie1*-F/*ie1*-R 扩增得到的 DNA 片段进行 *Sna*B I 和 *Bam*H I 双酶切, 将酶切后的回收产物与经过同样双酶切的质粒 pFastHTB 进行连接, 产生重组质粒 pFastHTB-P_{ie1}; 以 pMD18T-*egfp* 质粒为模板, 对 *egfp*-F 和 *egfp*-R 扩增得到的目的片段进行 *Bam*H I /*Kpn* I 双酶切, 将酶切回收后的 DNA 片段与经同样双酶切的 pFastHTB-P_{ie1} 进行连接, 得到重组质粒 pFastHTB-P_{ie1}-*egfp*; 以 pFastHTB-P_{ie1}-*egfp* 为模板, 对 P_{ie1}-*egfp*-sv40-F 和 P_{ie1}-*egfp*-sv40-R 扩增得到 P_{ie1}-*egfp*-sv40 进行 *Eco*R I /*Sna*B I 双酶切, 将酶切后的回收产物与经过同样双酶切的 pFastBac I 进行连接, 得到 pFastBac I -P_{ie1}-*egfp*-sv40; 以 P_{ph}-F 和 P_{ph}-R 为引物, 对从 pFastHTB 质粒中特异性地扩增得到的 P_{polh}-6 \times His-TEV 序列进行 *Spe* I 和 *Xba* I 双酶切, 将酶切回收产物与经同样双酶切的 pFastBac I -P_{ie1}-*egfp*-sv40 进行连接, 得到 pFastBac I -P_{ie1}-*egfp*-sv40-P_{polo}。

2.2 重组质粒 pFastBacI-P_{ie1}-*egfp*-sv40-P_{polh}-*ns1*-sv40 的鉴定

为利用杆状病毒-昆虫细胞表达系统表达家

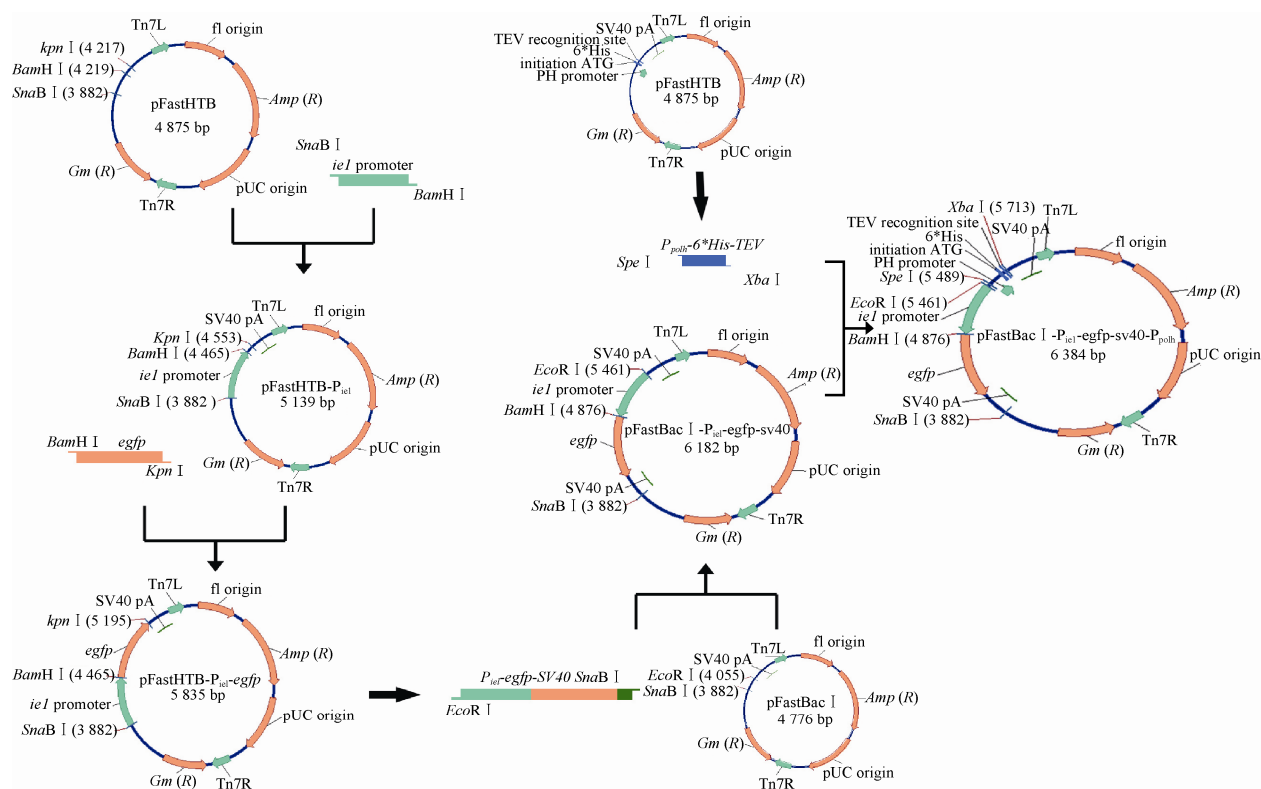


图 1 重组质粒 pFastBacI- P_{ie1} -egfp-sv40- P_{polh} 构建流程

Fig. 1 Strategy for construction of the recombinant plasmid pFastBacI- P_{ie1} -egfp-sv40- P_{polh} .

蚕二分浓核病毒 NS1 蛋白，将 *ns1* 基因克隆到上述构建的 pFastBacI- P_{ie1} -egfp-sv40- P_{pol} 载体中。为此，以设计的特异性引物 *ns1*-F 和 *ns1*-R (表 1)，从 pMD18T-*ns1* 质粒模板中扩增 *ns1* 基因，对 PCR 扩增的目的 DNA 片段进行 *Nhe* I (与 *Xba* I 互为同尾酶) 和 *Xho* I 双酶切，将酶切回收后的 DNA 片段与经过 *Xba* I 和 *Xho* I 酶切的 pFastBacI- P_{ie1} -egfp-sv40- P_{pol} 进行连接，得到 pFastBacI- P_{ie1} -egfp-sv40- P_{pol} -*ns1*，由于该质粒在 *ns1* 基因下游具有一个加尾信号 sv40 序列，故把该质粒命名为 pFastBacI- P_{ie1} -egfp-sv40- P_{pol} -*ns1*-sv40。鉴于该质粒酶切位点的复杂性，通过对 pFastBacI- P_{ie1} -egfp-sv40- P_{pol} -*ns1*-sv40 进行 3 轮 PCR 来鉴定该质粒的正确性。首先，

通过特异性引物对 P_{ie1} -egfp-sv40-F/ P_{ie1} -egfp-sv40-R 扩增 *egfp* 基因表达盒，扩增序列中包含有 *ie1* 早期启动子、*egfp* 基因和加尾信号 sv40 序列，扩增的 DNA 序列总长度理论上为 1 544 bp，电泳结果与理论预计一致 (图 2，泳道 1)；通过 P_{ph} -F/ P_{ie1} -egfp-sv40-R 引物对扩增 *ns1* 基因表达盒，扩增序列包含有多角体启动子、*ns1* 基因和加尾信号 sv40 序列，扩增序列理论上长度为 1 426 bp，电泳结果显示与理论预计相一致 (图 2，泳道 2)；通过 *ns1*-F/*ns1*-R 扩增 *ns1* 基因，理论上扩增的 DNA 序列长度为 967 bp，电泳结果与理论预计相一致 (图 2，泳道 3)，将 PCR 鉴定后的克隆进行序列测定，其结果与理论结果完全一致，可用于下一步的转座实验。

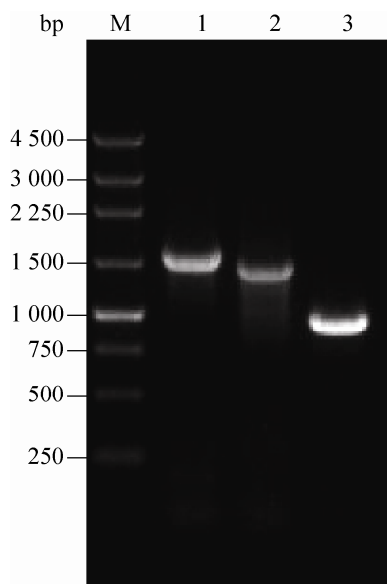


图2 重组质粒 pFastBac I- P_{iel} -*egfp*-sv40- P_{polh} -*nsI*-sv40 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR confirmation of the recombinant plasmid pFastBac I- P_{iel} -*egfp*-sv40- P_{polh} -*nsI*-sv40. M: DNA marker; 1: the PCR product of amplified *egfp* cassette; 2: the PCR product of amplified *nsI* cassette; 3: the PCR product of amplified *nsI* gene.

2.3 重组杆粒 Bm-Bacmid- P_{iel} -*egfp*-sv40- P_{polh} -*nsI*-sv40 的鉴定

将构建的重组供体质粒 pFastBac I- P_{iel} -*egfp*-sv40- P_{polh} -*nsI*-sv40 转化 DH10B 感受态细胞, 该感受态细胞中含有家蚕穿梭载体 Bm-Bacmid 和表达转座酶的辅助质粒, 在转座酶的介导下, 重组供体质粒序列上 Tn7R-Tn7L 之间的 *egfp* 表达盒、*nsI* 基因表达盒、庆大霉素基因表达盒以及载体上其他序列可特异性地转座到 Bm-Bacmid 载体上, 在添加有 K^+G^+ 双抗的平板上筛选出可表达 *egfp* 和 *nsI* 基因的重组真核表达载体, 进而通过 PCR 对重组杆粒 DNA 进行鉴定。通过引物对 M13-F/M13-R 对野生型的 Bm-Bacmid 进行扩增, 理论上扩增序

列为 280 bp 左右, 电泳结果与理论预计一致 (图 3, 泳道 1); 而 M13-F/M13-R 引物对扩增转座后的重组 Bm-Bacmid, 理论扩增序列包括有 *egfp* 表达盒、*nsI* 基因表达盒、庆大霉素基因表达盒等 DNA 序列, 其长度为 4 850 bp 左右, 电泳结果显示与理论预计一致 (图 3, 泳道 2); 通过 *nsI*-F/*nsI*-R 从重组 Bm-Bacmid 中扩增 *nsI*, 理论序列长度为 967 bp, 电泳结果显示与理论预计一致 (图 3, 泳道 3); 通过 M13-F/*nsI*-R 引物对扩增转座后的重组 Bm-Bacmid, 理论序列长度为 4 600 bp 左右, 电泳结果显示与理论预计一致 (图 3, 泳道 4); 通过 *nsI*-F/M13-R 引物

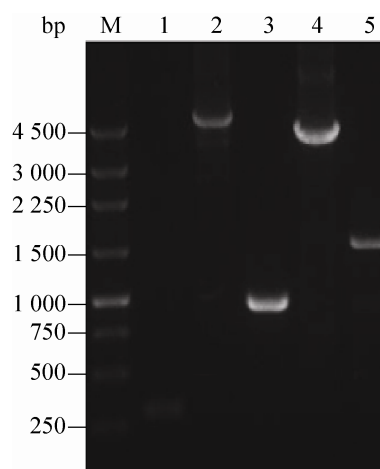


图3 重组杆粒 Bm-Bacmid- P_{iel} -*egfp*-sv40- P_{polh} -*nsI*-sv40 的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of the Bm-Bacmid- P_{iel} -*egfp*-sv40- P_{polh} -*nsI*-sv40 by PCR. M: DNA marker; 1: the PCR product amplified by M13-F/M13-R was used as negative control; 2: the PCR product was amplified from the recombinant Bm-Bacmid by M13-F/M13-R; 3: the PCR product of *nsI* gene; 4: the PCR product was amplified from the recombinant Bm-Bacmid by M13-F/*nsI*-R; 5: the PCR product was amplified from the recombinant Bm-Bacmid by *nsI*-F/M13-R.

对扩增转座后的重组 Bm-Bacmid, 扩增的理论序列为 1 570 bp, 电泳结果显示与理论预计一致 (图 3, 泳道 5)。

2.4 重组杆粒 DNA 转染 BmN 细胞后的荧光显微观察

通过转座将 *ie1* 早期启动子控制下的 *egfp* 表达盒引入到家蚕 Bm-Bacmid 中, 重组杆粒 DNA 在脂质体 Cellfectin 的介导下进入 BmN 细胞中, 对转染后的 BmN 细胞不同的时间点连续进行荧光显微观察, 鉴定重组 Bm-Bacmid 在 BmN 细胞中绿色荧光蛋白的表达情况。荧光显微结果表明: 转染 24 h 后, 在 BmN 细胞中能看到零星的绿色荧光信号, 随着时间的延长, 绿色荧光信号越来越多 (图 4 A); 为验证转染上清中是否产生了重组芽生型病毒粒子以及是否具有感染性, 收集转染 96 h 后的细胞培养上清, 将其与新培养的 BmN 细胞进行孵育, 24 h 后, 荧光显微结果表明: 在转染上清孵育的 BmN 细胞中能观察到绿色荧光, 随着时间的延长, 荧光信号越来越多; 96 h 后, 整个视野中都充满了绿色荧光信号 (图 4 B), 这些结果表明: 转染后的细胞上清中已产生了具有感染性的重组病毒粒子; 由此可见, 可视化绿色荧光信号的介入有助于我们快速判定重组病毒粒子的产生, 以及重组病毒粒子是否能够启动新一轮感染。

2.5 NS1 蛋白的表达和鉴定

将重组 Bm-Bacmid- $P_{ie1}-egfp-sv40$ - $P_{polh}-ns1-sv40$ 转染 BmN 细胞, 通过对转染后的 BmN 细胞进行荧光显微观察, 对能观察到荧光的转染孔进行标记, 收集这些标记孔中转染 96 h 后的细胞培养上清, 将收集后的转染上清继续感染 BmN 细胞, 通过对感染后的 BmN 细胞进行荧光显微观察,

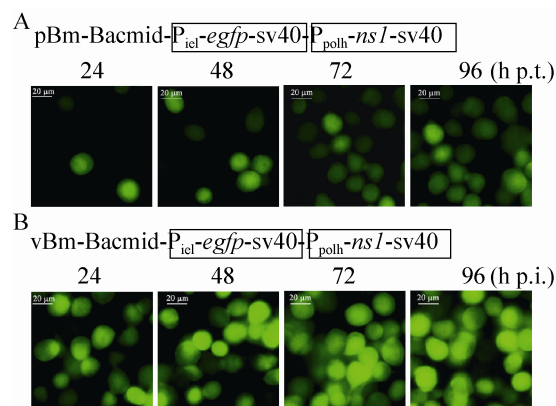


图 4 BmN 细胞中的荧光观察图 (A: 重组杆粒 Bm-Bacmid- $P_{ie1}-egfp-sv40$ - $P_{polh}-ns1-sv40$ 转染 BmN 细胞后的荧光显微观察; B: 转染上清感染 BmN 细胞后不同时间点的荧光显微观察)

Fig. 4 The expression of *egfp* gene in BmN cell. (A) Fluorescence micrographs of BmN cells transfected with recombinant Bacmid; (B) Fluorescence micrographs of BmN cells infected with recombinant virus. The times after transfection or infection were indicated on the right.

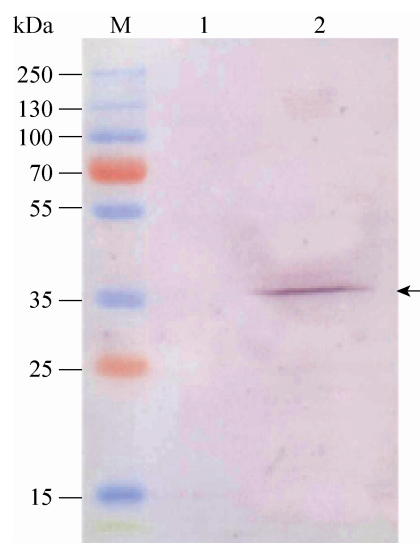


图 5 NS1 蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting analysis of target protein NS1 expressed in BmN cells. M: standard protein marker; 1: negative control; 2: sample of NS1 protein.

借助可视化的绿色荧光信号快速判定 BmN 细胞已被重组病毒感染,进而收集感染 96 h 后的 BmN 细胞,并对收集后的细胞总蛋白进行 Western blotting 分析,结果表明在 36 kDa 的位置处能杂交到一条很特异的蛋白条带,该蛋白大小与靶蛋白 NS1 相一致。

3 讨论

杆状病毒是一种非人源化的病毒,只特异性地感染无脊椎动物,现已被遗传改造为真核表达载体,实践证明改造后的杆状病毒是一种非常有效的蛋白表达载体,已广泛用于外源基因的表达并成功表达上千种功能蛋白^[7,22-24];除此之外,杆状病毒囊膜上还可展示异源蛋白,以及通过 BEVS 在昆虫细胞内表达异源病毒的一些结构蛋白,使其在胞内组装成病毒样颗粒,可用来制备高效价的病毒疫苗;利用杆状病毒在哺乳细胞内不能增殖的特性,将其改造为基因治疗载体,在靶向治疗人类疾病方面拥有巨大的应用前景^[1]。

利用杆状病毒-昆虫细胞表达系统表达外源基因,从重组病毒感染的细胞中纯化表达的靶蛋白,在体外对纯化后的靶蛋白进行活性分析,这是目前对未知基因功能研究常用的一种方法。然而,杆状病毒-昆虫细胞表达系统也有许多不足之处有待于进一步改进,尤为突出的是重组病毒感染细胞后会导致细胞裂解,显著降低靶蛋白的表达产量,从而增加了外源蛋白表达所需的成本和时间^[25];另外,连续多次感染昆虫细胞后产生的重组病毒容易发生目的基因丢失,致使靶蛋白表达产量降低甚至不表达^[26];其次,还有一些具有特殊理化性质的蛋白,比如猪瘟疫病毒(CSFV)E2 蛋白^[27],其在昆虫细胞

中的表达量偏低或者根本不表达,而 Western blotting 往往检测不到这一类蛋白的表达,由此让我们对表达流程中的系列步骤产生质疑,需要对实验过程中产生的中间产物逐一进行验证,尤其需要对转染后的昆虫细胞中是否产生了重组病毒粒子进行鉴定,而反复通过 RT-PCR 和 Western blotting 来对实验中的每个步骤进行验证,耗时、耗力、且浪费试剂,因此快速、有效地鉴定转染后的昆虫细胞中已产生具有感染性的重组病毒粒子,不仅与靶基因能否在 BEVS 中顺利表达直接相关,同时也是用来判定外源基因在 BEVS 中表达或不表达的一个重要参数。

家蚕穿梭表达载体 Bm-Bacmid 的构建,剔除了重组病毒制备过程中需要进行多轮空斑纯化和扩增的繁琐程序,极大地简化和缩短了重组病毒粒子制备所需的复杂技术和所耗费的时间。为进一步快速鉴定重组 Bm-Bacmid 在转染后的昆虫细胞中是否产生了具有感染性的病毒粒子,克服仅对转染前后的细胞形态变化作出转染成功的主观臆断,为此,本文通过在家蚕杆状病毒-昆虫细胞表达系统中介入可视化的绿色荧光信号,创建一种可快速有效地鉴定胞内是否产生具有感染性的重组病毒粒子,为靶基因的表达及其后续研究奠定坚实的基础。基于上述考虑,在不影响蛋白表达及病毒增殖的情况下,对供体质粒 pFastBac I 进行改造,构建家蚕杆状病毒极早期基因启动子控制下的 *egfp* 表达盒和多角体基因启动子控制下的 *ns1* 基因表达盒,即重组 pFastBacI- $\boxed{P_{ie1}-egfp-sv40}$ - $\boxed{P_{pol}-ns1-sv40}$ 供体质粒。将该供体质粒转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞,在转座酶的帮助下,供体质粒 Tn7R-Tn7L 之间的 *egfp* 表达盒和 *ns1* 基因表达

盒可特异性转座到 Bm-Bacmid 载体上,进而构建表达 *egfp* 和 *ns1* 基因的整合型真核表达载体,将其转染 BmN 细胞,观察胞内是否产生了可视化的绿色荧光信号。鉴于早期观察到的绿色荧光有可能是重组杆粒 DNA 中 *egfp* 基因瞬时表达产生的。为此,我们收集转染 96 h 后的细胞培养上清,将其感染 BmN 细胞后,通过观察到 10 余个细胞群落同时产生绿色荧光,以此来判定重组杆粒 DNA 转染 BmN 后产生的感染性重组病毒粒子情况。

本文实验结果表明:通过构建整合性表达 *egfp* 的重组 Bm-Bacmid,是一种可行、有效地且能够快速判定转染后的细胞中是否产生了感染性的重组病毒粒子,利用该整合型表达载体成功地表达了家蚕二分浓核病毒(*BmBDV*)非结构蛋白 NS1。NS1 蛋白的快速表达,为进一步揭示 NS1 蛋白的磷酸化表达模式与功能机制之间的相互关系以及为表达其他外源基因奠定了坚实的科学基础;同时也极大地促进和优化了杆状病毒-昆虫细胞表达系统在外源蛋白表达中的应用。

REFERENCES

- [1] Hu YC. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(4): 405–416.
- [2] Tiwari P, Saini S, Upmanyu S, et al. Enhanced expression of recombinant proteins utilizing a modified baculovirus expression vector. *Mol Biotechnol*, 2010, 46(1): 80–89.
- [3] Lee KS, Je YH, Woo SD, et al. Production of a cellulase in silkworm larvae using a recombinant *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus lacking the virus encoded chitinase and cathepsin genes. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(9): 645–650.
- [4] Liu T, Zhang YZ, Wu XF. High level expression of functionally active human lactoferrin in silkworm larvae. *J Biotechnol*, 2005, 118(3): 246–256.
- [5] Lee KS, Kim BY, Je YH, et al. A new technique for producing recombinant baculovirus directly in silkworm larvae. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(1): 175–180.
- [6] Chen J, Wu XF, Zhang YZ. Expression, purification and characterization of human GM-CSF using silkworm pupae (*Bombyx mori*) as a bioreactor. *J Biotechnol*, 2006, 123(2): 236–247.
- [7] Maeda S, Kawai T, Obinata M, et al. Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 1985, 315(6020): 592–594.
- [8] Wang XM, Helaszek CT, Winter LA, et al. Production of active human interleukin-1 beta-converting enzyme in a baculovirus expression system. *Gene*, 1994, 145(2): 273–277.
- [9] Gujar SA, Michalak TI. Characterization of bioactive recombinant woodchuck interleukin-2 amplified by RLM-RACE and produced in eukaryotic expression system. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 112(3/4): 183–198.
- [10] DiFalco MR, Bakopanos E, Patricelli M, et al. The influence of various insect cell lines, p10 and polyhedrin promoters in the production of secreted insulin-like growth factor-interleukin-3 chimeras in the baculovirus expression system. *J Biotechnol*, 1997, 56(1): 49–56.
- [11] Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(5): 567–575.
- [12] Unger T, Peleg Y. Recombinant protein expression in the baculovirus-infected insect cell system. *Methods Mol Biol*, 2012, 800: 187–199.
- [13] Lu HY, Chen YH, Liu HJ. Baculovirus as a vaccine vector. *Bioengineered*, 2012, 3(5): 271–274.
- [14] Koroleva NN, Spirin PV, Timokhova AV, et al. Baculovirus vectors for efficient gene delivery and expression in mammalian cells. *Mol Biol (Mosk)*,

- 2010, 44(3): 541–550.
- [15] Na Z, Huipeng Y, Lipan L, et al. Efficient production of canine interferon-alpha in silkworm *Bombyx mori* by use of a BmNPV/Bac-to-Bac expression system. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(2): 221–226.
- [16] Usami A, Ishiyama S, Enomoto C, et al. Comparison of recombinant protein expression in a baculovirus system in insect cells (Sf9) and silkworm. *J Biochem*, 2011, 149(2): 219–227.
- [17] Sun J, Yao L, Yao N, et al. Production of recombinant *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in silkworm by intrahaemocoelic injection with invasive diaminopimelate auxotrophic *Escherichia coli* containing BmNPV-Bacmid. *Biotechnol Appl Biochem*, 2010, 57(3): 117–125.
- [18] Li GH, Hu ZY, Tang Q, et al. Advance in functional mechanism of parvovirus non-structural protein NS1. *Sci Sericult*, 2012, 38(5): 0919–0923 (in Chinese).
李国辉, 胡朝阳, 唐琦, 等. 细小病毒非结构蛋白 NS1 作用机制的研究进展. *蚕业科学*, 2012, 38(5): 0919–0923.
- [19] Zhang JH, Li GH, Yao Q, et al. Research advances on the function of non-structural protein NS1 of parvovirus. *J Anhui Agri Sci*, 2010, 22(5): 11730–11731 (in Chinese).
张俊红, 李国辉, 姚勤, 等. 细小病毒非结构蛋白 NS1 功能的研究进展. *安徽农业科学*, 2010, 22(5): 11730–11731.
- [20] Li G, Sun C, Zhang J, et al. Characterization of *Bombyx mori* parvo-like virus non-structural protein NS1. *Virus Genes*, 2009, 39(3): 396–402.
- [21] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20–25.
- [22] Zhou L, Wu X, Lan L, et al. Expression of *Trichoderma reesei* endo-beta-glucanase II in silkworm, *Bombyx mori* L. by using BmNPV/Bac-to-Bac expression system and its bioactivity assay. *Biotechnol Lett*, 2009, 32(1): 67–72.
- [23] Kato T, Kajikawa M, Maenaka K, et al. Silkworm expression system as a platform technology in life science. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(3): 459–470.
- [24] Summers MD. Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides. *Adv Virus Res*, 2006, 68: 3–73.
- [25] Ikonomou L, Schneider YJ, Agathos SN. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62(1): 1–20.
- [26] Pijlman GP, de Vrij J, van den End FJ, et al. Evaluation of baculovirus expression vectors with enhanced stability in continuous cascaded insect-cell bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 87(6): 743–753.
- [27] Bae SM, Kim HJ, Lee JB, et al. Hyper-enhanced production of foreign recombinant protein by fusion with the partial polyhedrin of nucleopolyhedrovirus. *PLoS ONE*, 2013, 8(4): e60835.

(本文责编 郝丽芳)