

形成多角体家蚕重组病毒通用转移载体构建^{*}

王运湘¹⁾ 鲍时来²⁾ 鲁润龙²⁾ 龙紫新¹⁾ 王珣章¹⁾

(1) 中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275; 2) 中国科学技术大学生物系)

摘 要 从家蚕核型多角体病毒 (BmNPV) 通用转称载体 pBK283 和粉纹夜蛾核型多角体病毒 (TnNPV) 转移载体 pSXIVV $\uparrow$ X₃ 系列出发, 构建了一个 7.2 kb 能形成多角体且可以用于克隆含不同读码框外源基因的 BmNPV 通用转移载体系列 pBMX₃. pBMX₃ 系列以 BmNPV 多角体结构基因上游的 1.9 kb 和下游 1.3 kb 的片段作为与 BmNPV 基因组进行体内同源重组的同源序列; pSXIVV $\uparrow$ X₃ 系列的 SXIV 双启动子用于外源基因的表达; AcNPV 的多角体基因作为重组病毒形成多角体的基因. 以 BmNPV-LacZ(occ⁻gal⁺) 为出发株病毒, pBMX₃ 系列的重组病毒筛选有 occ⁺ 和 gal⁻ 两个遗传标记.

关键词 家蚕, 核型多角体病毒, 通用转移载体

分类号 Q 782

家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV) 的基因组很大, 不能直接利用基因工程手段在体外构建重组病毒, 所以需要首先构建含有外源基因的转移质粒, 然后通过同源重组将外源基因插入病毒基因组中. 自 1985 年首次构建 BmNPV 转移载体 p89B310 以来, 国内外已成功地构建了多种 BmNPV 转移载体并得到很好地应用^[1-3], 但利用这些载体构建的重组病毒由于多角体基因的缺失而不能形成多角体, 因此只能通过注射感染家蚕, 注射手续繁琐且产生的创口极易感染其他病原体, 成为家蚕杆状病毒表达系统产业化的障碍.

本研究以形成多角体的粉纹夜蛾多角体病毒 (*Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus, TnNPV) 表达系统的通用载体质粒 pSXIVV $\uparrow$ X₃ 系列为基础, 构建一套能形成多角体的 BmNPV 通用载体, 该表达系列可用于不同读码框的外源基因的插入. 以带 β -半乳糖苷酶基因且不形成多角体的家蚕重组病毒 BmNPV occ⁻gal⁺ 作为含外源基因的重组病毒筛选的出发株, 可以用形成多角体 (occ⁺) 和白斑 (gal⁻) 2 个遗传标记筛选重组病毒, 使操作更为简便.

1 材料和方法

TnNPV 转移载体质粒 pSXIVV $\uparrow$ X₃, X_{3/2}, X_{3/3}, X_{3/4} 系列为本实验室保存质粒^[1,2]. Bm-

* 国家教委“跨世纪优秀人才计划”基金资助项目

收稿日期: 1996-07-18 王运湘, 男, 32 岁, 博士

NPV 转移载体质粒 pBK283 由华中师范大学昆虫研究所提供. DNA 操作所用载体和酶分别购自 GIBCO BRL 和华美生物工程公司, 其它为 AR. 质粒 DNA 的酶切, 片段回收, 连接, 转化及其他分子生物学方法均参照 Maniatis 方法进行.

2 结 果

pBMX₃ 系列的构建过程见图 1.

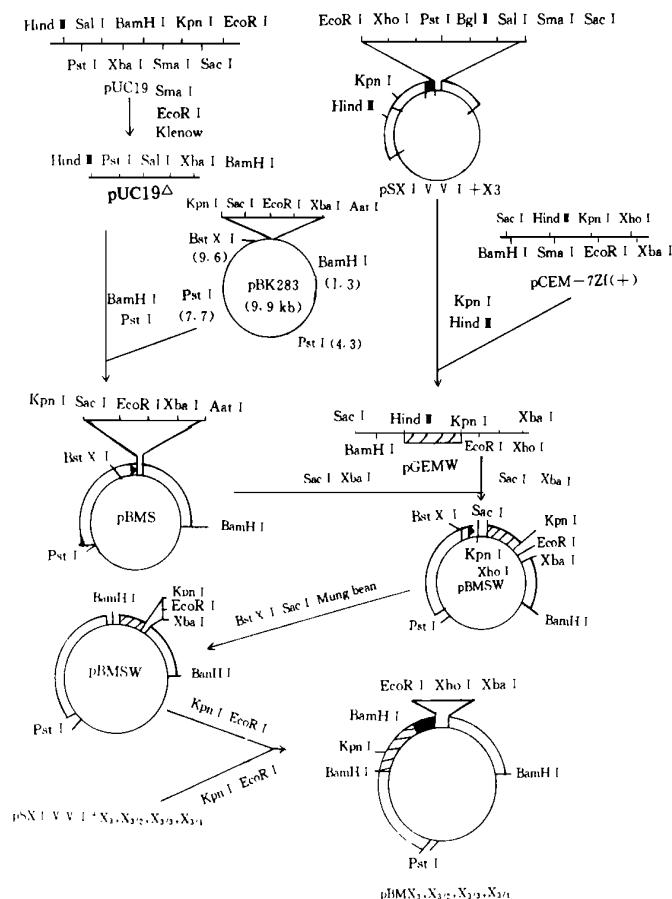


图 1 pBMX₃ 系列的构建过程示意图

Fig. 1 Schematic outline for the construction of pBMX₃

名为 pBMW.④ pBMW 中 pBmNPV polh 启动子序列的切除: 为防止与 AcNPV polh 基因反向的 BmNPV polh 启动子的反义抑制并消除克隆过程产生的冗余位点, 以 SacI 和 BstXI 酶切 pBMW, 回收 6.2 kb 大片段, Mung bean 酶消除 SacI 和 BstXI 酶切的 3' 突出端, 平端连接得到去除 BmNPV polh 启动子序列及部分 BmNPV polh 5' 端序列的质粒, 命名为 pBMW^Δ.⑤ pBMX₃ 系列的构建. 分别以 KpnI 和 EcoRI 酶切 pSXIVV1 + X₃, X_{3/2}, X_{3/3}, X_{3/4}; 回收含 AcNPV 多角体基因启动子和 5' 端编码序列及反向串联的合成启动子和 XIV 启动子 (SXIV) 的 1.0 kb 片段, 与同样酶切的 pBMW^Δ 连接, 即分别得到 pBMX₃, pBMX_{3/2},

① pBK283 的改造: 以 pUC19 为出发质粒, pUC19 以 SmaI, EcoRI 双酶切, Klenow 补平 EcoRI 酶切出的 5' 突出端, 连接得到消除 SmaI, KpnI 和 EcoRI 的过渡质粒, 命名为 pUC19^Δ. pBK283 以 PstI, BamHI 酶切, 回收 3.5 kb 片段, 插入 pUC19^Δ 的多克隆位点, 该质粒含有 2.2 kb 的 BmNPV 多角体基因 (polh) 5' 端区段, (包括 BmNPV polh 启动子序列) 和 BmNPV polh 3' 端下游 1.3 kb 的区段, 命名为 pBMS.② AcNPV 多角体基因 3' 端 poly(A) 信号段的克隆: 以 HindIII 和 KpnI 酶切 X₃ 质粒, 回收含 AcNPV polh 3' 端部分编码序列和终止信号的 550 bp 片段, 插入 pGEM-7Zf (+); 命名为 pGEMW.③ AcNPV 多角体基因 3' 端部分序列及 poly(A) 信号区段与 pBMS 的连接: 以 SacI 和 XbaI 酶切 pGEMW, 回收 560 bp 的片段, 插入 pBMS 同样酶切开的窗口, 命名

pBMX_{3/3}和 pBMX_{3/4},图 2 为 pBMX₃ 的酶切鉴定结果。

3 讨论

目前普遍应用的重组杆状病毒表达系统消除了多角体结构基因而无多角体的形成,不能口服感染宿主昆虫。为此,本研究室将模拟晚期基因(多角体, p10,衣壳蛋白及核心碱性蛋白基因)人工合成的启动子(synthetic promoter, syn)和含 HindIII接头的多角体蛋白启动子(XIV)串联,反方向插入多角体基因前导序列翻译起始密码子-92处,构建了既能高效表达外源基因又能形成多角体的 TnNPV 表达载体 pSXIVVI X₃ 系统^[4,5]。但由于 NPV 对于宿主昆虫的专一性很强,不能用 TnNPV 表达系统在家蚕体内表达外源基因。为利用家蚕宿主的优势,在 pSXIVVI X₃ 转移载体的 AcNPV 多角体基因 poly(A)信号和多克隆位点之外,分别置换 TnNPV 多角体基因上,下游序列为 BmNPV 多角体基因上,下游序列,以便于在体内与 BmNPV 进行完全同源重组。

BmNPV 表达系统的通用转移载体最先由国外有关的实验室构建,在载体设计上都是利用 80 年代初期对杆状病毒基因表达调控的研究成果;近年来随着杆状病毒分子生物学研究的发展,发现多角体基因的互补链反方向表达 2 个晚期基因:位于多角体基因上游的 ORF603 和位于多角体基因下游的 ORF1629[△]。ORF1629 为病毒复制所必需,而 ORF603 对病毒复制为非必需^[6,7]。为消除 pBK283 的 BmNPV polh 启动子对 AcNPV polh 的反义抑制作用,切除了 300 bp 的小片段而破坏 ORF603,对病毒的复制和繁殖不会产生影响。而由于 AcNPV 和 BmNPV 的启动子及结构基因的序列有很高的同源性,AcNPV 多角体基因在家蚕体内可以正确地表达,并包装 BmNPV 病毒粒子。

pBMX₃ 系列的同源重组区段为 1.9 kb,与其他表达载体相近,而 3' 同源重组区段只有 1.3 kb。实验证明较短的同源重组区段对重组并无影响,李亦平等^[8]构建的 AcNPV 通用载体 pUAc5 的 3' 区段只有 0.9 kb 而重组率可达 5%;储瑞银等^[4]构建的 BmNPV 转移载体 pBM1 的 3' 端也只有 1.3 kb。切除过长的同源区段可使载体质粒变小, pBMX₃ 系列只有 7.2 kb 从而有较大的容量插入外源基因并便于克隆操作。

本文构建的 pBMX₃ 系列载体具有以下优点:① SXIV 启动子启动外源基因的表达量提高。SXIV 启动子用于表达荧光素基因的表达量可达 $1.9 \times 10^{-4} \mu\text{g}/10^6$ 细胞。② 外源基因的表达可以从晚期开始,使表达产物的修饰更充分。SXIV 启动的 HBV prec/c 基因可以得到加工后的 e 抗原,而以极晚期的 AcNPV polh 启动子表达 HBV prec/c 则不能获得到正确加工的 e 抗原。③ 既可以表达有 ATG 的外源基因也可以表达不带 ATG 的 3 种不同读码框的外源基因。



图 2 pBMX₃ 系列的酶切鉴定图谱

Fig. 2 Identification of pBMX₃ by agarose gel electrophoresis
M λ DNA 经 EcoRI 和 HindIII 酶切的片段; A KpnI 和 EcoRV 双酶切; B KpnI 和 XbaI 双酶切; C PstI 单酶切; D BamHI 单酶切

为便于 pBMX₃ 系列转移载体形成重组病毒的筛选,已组建了含 β -半乳糖酶基因且不形成多角体的家蚕重组病毒 BmNPV-LacZ($oc\bar{c}^-ga\bar{l}^+$),利用 2 个遗传标记采用与常规空斑筛选相反的技术路线从蓝斑且不形成多角体表形的病毒中筛选出白斑且形成多角体($oc\bar{c}^+ga\bar{l}^-$)的重组病毒,使重组病毒的筛选和纯化更加简便快速。

参 考 文 献

- 1 张颖,吴祥甫.重组家蚕病毒表达系统转移载体的构建和 β -半乳糖苷酶的表达.病毒学报,1994,10:251~256
- 2 储瑞银,林玉莲,潘乃遂,等.家蚕核形多角体病毒转移载体质粒的构建.植物基因工程论文集.北京:北京大学出版社,1994.256~262
- 3 邓继先,王少飞,杨琴,等.用构建的新型 BmNPV 载体在家蚕高效表达人 β 干扰素.生物工程学报,1995,11(2):126~132
- 4 王珣章,谢伟东,龙繁新,等.人工合成杆状病毒后期启动子的探讨.中国科学(B辑),1992,22(1):39~45
- 5 王珣章,谢伟东,龙繁新,等.形成多角体的杆状病毒载体系统的建立.病毒学报,1991,7:253~261
- 6 Pissie R D, Sun T P, Howard S C. Nucleotide sequence of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus 9.4 kbp EcoRI-H and -R polyhedrin gene region. Virology, 1991,185:229~241
- 7 Ooi B G, Miller L K. The influence of antisense RNA on transcriptional mapping of the 5' terminus of a baculovirus RNA. J of Gen Virol, 1991,72:527~534
- 8 李亦平,吴祥甫,李载平.定点突变法构建 AcNPV 通用表达载体 pUAc-5.生物化学与生物物学报,1989,21(4):344~353

Construction of Universal Transfer Vectors with Polyhedra Inclusion Bodies for *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNPV)

Wang Yunxiang* Bao Shilai Lu Renlong Long Qingxing Wang Xunzhang

Abstract For the convenience of recombinant BmNPV to infect the larvae of silkworm, *Bombyx mori*, a series of 7.2 kb occlusion body positive ($oc\bar{c}^+$) universal for foreign genes insertion in all reading frames, have been constructed based on BmNPV transfer vector pBK283 and TnNPV transfer plasmids pSXIVV $\bar{I}$ X₃ series. The upstream homologous region for BmNPV genome recombination is 1.9 kb and the downstream region is 1.3 kb. The foreign genes are promoted by SXIV double promoters derived from SXIVV $\bar{I}$ X₃ series and AcNPV polyhedrin gene serves for the occlusion bodies formation in recombinant viruses. Co-transfected with BmNPV-LacZ($oc\bar{c}^+ga\bar{l}^-$) strain, the recombinant viruses are easily selected by 2 genetic markers occlusion body ($oc\bar{c}^+$) and white plaques($ga\bar{l}^-$).

Keywords *Bombyx mori*, BmNPV, universal transfer vector

* State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275