

# 具全期启动子盒的杆状病毒高效 表达载体的组建与应用\*

吴文言 王珣章 龙蔡新 曲士芮 庞 义

(中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

**摘 要** 通过 PCR 扩增, 得到苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, AcNPV) 具早晚期启动子元件的  $p35$  基因启动子, 将其插入到杆状病毒转移载体质粒  $pSXIVV\uparrow X3$  多克隆位点上游, 使之与  $pSXIVV\uparrow X3$  质粒中的人工合成后期启动子 ( $P_{syn}$ )、多角体  $XIV$  启动子 ( $P_{XIV}$ ) 串联构成早期、晚期、极晚期能持续启动外源基因表达的转移载体质粒  $pSX35$ . 将  $pSX35$  用于组建含 HBsAg 基因并形成多角体的重组 TnNPV, HBsAg 基因的表达量显著提高, 表达时间亦明显提前, 从而实现了外源基因在杆状病毒表达系统的全期、高效表达. mRN A 引物延伸试验结果显示,  $Pp35$  在重组病毒中可产生 2 套转录本, 分别于病毒感染的早期和晚期起始 HBsAg 基因的表达.

**关键词** 杆状病毒载体, 全期启动子盒,  $p35$  启动子, HBsAg, mRN A 引物延伸

**分类号** Q 78

杆状病毒表达载体系统是一个具有独特优势和巨大发展潜力的真核细胞表达系统, 近年已成功用于高水平表达各种有重要价值的外源目的基因, 美国、荷兰等国已成功应用这个表达载体系统生产出多种蛋白药物<sup>[1]</sup>.

在以往杆状病毒表达系统的研究中, 对于利用晚期、极晚期启动子表达外源基因的研究已有大量报道<sup>[2, 3]</sup>, 但能全期表达外源基因的则未见报道. 本研究在原有的晚期、极晚期启动子的基础上, 加上一个早、晚期均能启动表达的 AcNPV  $p35$  基因启动子构建成全期启动子盒, 探讨由该启动子盒驱动的外源基因在感染细胞中持续、高效表达的效果. 现将研究结果报道如下.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由广州华生基因工程有限公司涂桂洪教授惠赠, 杆状病毒转移载体质粒  $pSXIVV\uparrow X3$  由本室王珣章教授<sup>[4]</sup> 组建.

1.1.2 细胞与病毒 所用昆虫细胞及病毒见文献 [5].

1.1.3 酶与主要试剂 限制酶、T<sub>4</sub> DN A 连接酶购自华美生物技术公司及美国 Promega 公

\* 国家自然科学基金 (39570033) 和广东省自然科学基金 (950036) 资助项目

收稿日期: 1997-03-27 吴文言, 女, 34 岁, 博士, 现在第一军医大学工作

司,  $^{125}\text{I}$ -HBsAg 固相放免定量测定药盒购自中国原子能科学研究院, mRNA 提纯及引物延伸试剂盒分别购自 Pharmacia Promega 公司, 其它均为市售分析纯。

## 1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 AcNPV *p35* 启动子片段 以野生型 AcNPV 基因组 DNA 作 PCR 模板, P<sub>p35</sub> 引物为: 5'-CCTGAATTCTCTGGCAGCGCATAG-3 和 5'-GGTCTGCAGTTTGCTATGGTAGCTC-3; PCR 反应条件: 94℃× 25 s, 62℃× 35 s, 30 个循环。

1.2.2 含 HBsAg 基因的转移载体质粒的构建 参见文献 [6] 方法。

1.2.3 重组病毒的组建与鉴定 参见文献 [6] 方法。

1.2.4 离体细胞表达的 HBsAg 蛋白的测定 用重组病毒 TnNPV-SX35-HBs, TnNPV-HBs 及野生型病毒 AcNPV DNA 分别感染草地夜蛾 Sf-9 细胞, 感染剂量为  $10^7$  pfu/细胞, 27℃ 下培养, 定时取样, 冻融破碎细胞, 5 000 r/min 离心取上清, 进行放射免疫测定: 采用  $^{125}\text{I}$ -HBsAg 固相放免定量测定药盒进行测定。方法依说明书所述, 使用仪器为 PAKARD 公司的 COBRA II 型  $\gamma$  计数仪。

1.2.5 mRNA 引物延伸 收集经 TnNPV-SX35-HBs, TnNPV-HBs 及 AcNPV 感染的 Sf-9 细胞, 进行 mRNA 分离提纯: 参照 Pharmacia 公司 *Quick Prep Micro mRNA Purification Kit* 说明书进行。mRNA 引物延伸试验参照 Promega 公司的 *AMV Reverse Transcriptase Primer Extension System* 说明书进行。反应结束后, 与测序样品同时上样、电泳。所用引物均为 (与 HBsAg 基因前导序列互补的寡核苷酸片断): 5'-ATTCGGAGCAGGTTTACTGTCTGAACTGGAGC-3'。

1.2.6 核苷酸序列测定 采用 Sanger 的链末端终止法和双链测序系统, 用  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  标记法在 Pharmacia 公司的 DNA/RNA 测序仪上测定克隆片段的核苷酸序列。

## 2 结果与讨论

### 2.1 含 *p35* 基因启动子和 HBsAg 基因的转移载体质粒的构建

含 *p35* 基因启动子和 HBsAg 基因的转移载体质粒的构建详见图 1。首先用 PCR 方法扩增出 AcNPV *p35* 启动子中含早晚期调控元件的区域 (-92+26) 约 120 bp, 然后将此片段插入到 pSXIV $\Delta$ X3 的 *Eco*R I 与 *Pst*I 酶切位点之间, 遂构建含 *p35* 启动子的转移载体质粒 pSX35 (图 1)。然后参照文献 [6], 用 *Bam*H I 酶从 puc8/HBV 质粒切下 HBsAg 基因片断, 并插入 pSX35 质粒的 *Bgl*II 位点, 得到由早晚期启动子启动 HBsAg 基因表达的重组质粒 pSX35-HBs。酶切鉴定及 DNA 序列测定证实 pSX35-HBs 含有正确方向的 P<sub>p35</sub> 和 HBsAg 基因。

### 2.2 含全期启动子盒的重组病毒的构建及 HBsAg 基因的表达

pSX35-HBs 质粒 DNA 与无包含体并带  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的亲本株病毒 TnNPV-SV I G<sup>[4]</sup> DNA 共转染草地夜蛾细胞, 以形成多角体的白斑作为标记, 通过空斑技术反复挑纯, 得到由全期启动子盒驱动 HBsAg 基因表达的重组毒株 TnNPV-SX35-HBs。不含 P<sub>p35</sub> 的对照毒株 TnNPV-HBs 由同样方法获得。

对重组病毒 TnNPV-SX35-HBs 的 *Eco*R I 酶切分析证实已将 HBsAg 基因及启动子区域 (1 500 bp) 反方向插入野生型多角体基因 5 端 (使原 *Eco*R I -I 片断由 7 500 bp 变成 9 000 bp), 由于同时还将载体质粒上的 *Eco*R I 酶切位点引入原 *Eco*R I -I 片断, 因此重组毒株中的 *Eco*R I -I 片断消失, 而代之以 3 700 bp 和 5 300 bp 的 2 条带, 后者与原 *Eco*R I -

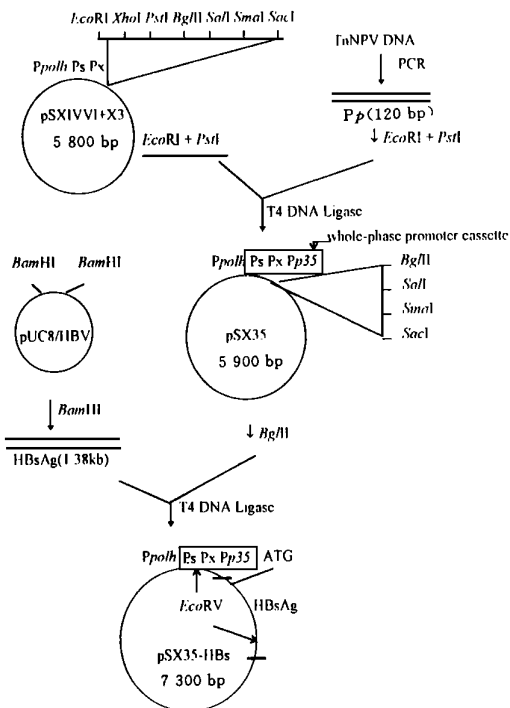


图 1 重组质粒 pSX35-HBs 的构建

Fig. 1 Construction of pSX35-HBs

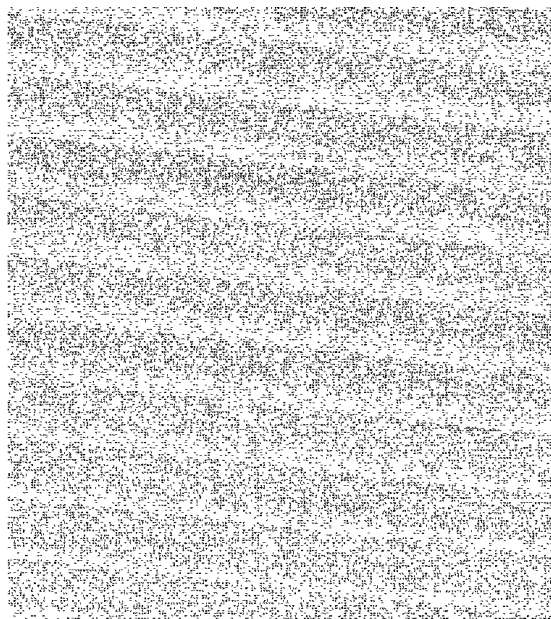


图 2 病毒 DNA 的 *EcoRI* 酶切图谱

Fig. 2 *EcoRI* digestion pattern of viruses  
a  $\lambda$  DNA / *EcoRI* + *HindIII*; b TnNPV-SX35-HBs;  
c TnNPV-HBs; d wild-type AcNPV

K 片段重合在一起 (图 2)。

重组毒株 TnNPV-SX35-HBs 感染 Sf 细胞后的固相放免定量分析结果显示, 表达 HBsAg 的时间提前, 而且产量显著提高. TnNPV-SX35-HBs 感染细胞 4 h (4 hours postinfection, 4 hpi) 即能检测到 HBsAg 基因的表达; 24 hpi 的表达量可达  $15 \times 10^3$  IU/mL, 比对照 (TnNPV-HBs) 的 24 hpi 的表达量提高了 1.8 倍; 96 hpi 的表达量为  $199.8 \times 10^3$  IU/mL, 亦高于对照的 96 hpi 峰值 (图 3)。

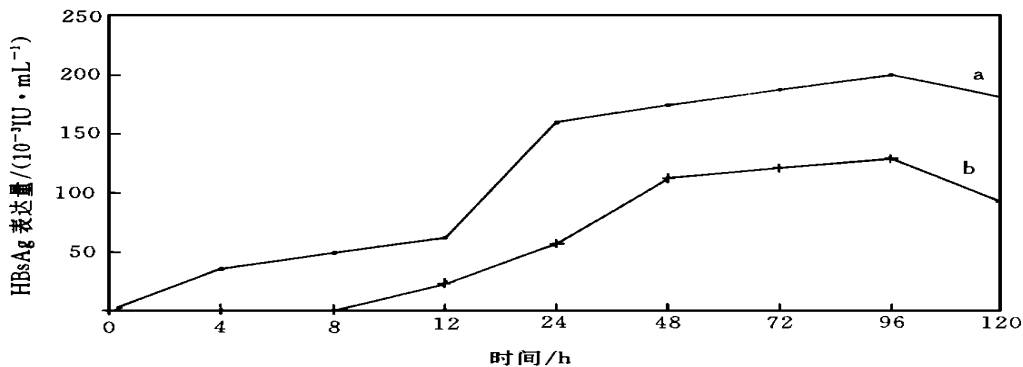


图 3 HBsAg 表达量

Fig. 3 Expression level of HBsAg  
a TnNPV-SX35-HBs; b TnNPV-HBs

## 2.4 具全期启动子盒杆状病毒表达载体的特点

外源基因产物的高效表达, 是基因工程产品得以推广应用的重要条件; 而目的蛋白的提前表达, 不仅为快速高产获得表达产物提供了保证, 而且使产物的翻译后修饰加工具备了充足的时间. 因为表达产物具有正确结构和活性对其应用是至关重要的. 本研究结果表明, 加入  $p35$  启动子后不仅使外源基因的表达时间明显提前, 亦可使其表达量显著提高.  $mRNA$  引物延伸试验结果显示 (图 4): 2 个晚期启动子  $P_{S_{yn}}$  和  $P_{XIV}$  在 2 株重组病毒中的转录起始位点基本一致. 本研究采用的  $AcNPV p35$  启动子序列是从  $-92 \sim +26$ . 该序列包含了  $Pp35$  早晚期转录起始位点 TATA Box 和上游激活区域. 早期激活元件由上游的 GC 和 CGT 基序构成, 分别位于  $-91 \sim -75$ ,  $-57 \sim -30$  区段. 如图 4 所示,  $Pp35$  在重组病毒  $TnNPV-SX35-HBs$  中有 2 套转录本, 其转录起始位点位于 TTAAG(L) 和 CATAGC(E) 区域. 前者的 TAAG 是晚期启动子 (L) 的特征性基序, 杆状病毒强的晚期和极晚期启动子转录起始位点是 ATAAG, 稍弱的起始于 TTAAG, GTAAG<sup>[8]</sup>; 后者位于前人报道的  $Pp35$  早期转录起始位点 (E)<sup>[9]</sup> 区域. 早期的转录本保证了外源基因在早期的有效表达; 晚期的转录本则增强了外源基因的晚期表达水平. 因此, 本研究构建的全期高效表达的杆状病毒载体系统, 除具备传统杆状病毒载体系统的优点<sup>[4]</sup>外, 还由于载体中 3 个串联的早、晚期启动子, 可使外源基因从病毒感染早期开始持续表达, 表达量亦显著提高. 此外, 我们还将此系统应用于高效广谱基因工程病毒杀虫剂的研制, 即将昆虫毒素基因插入该系统, 构建成全期高效表达毒素基因的杆状病毒杀虫剂, 其杀虫效果显著增强 (另文发表).

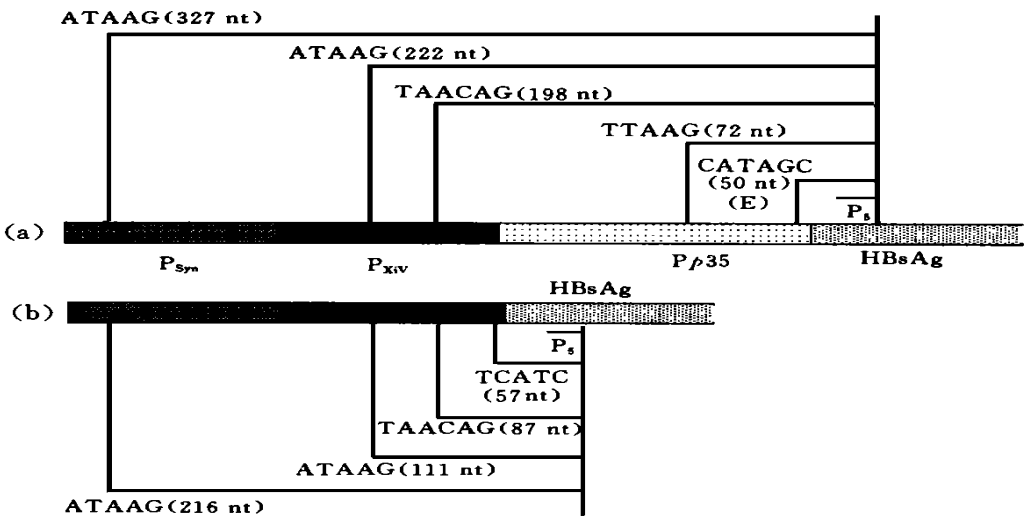


图 4 转录产物示意图

Fig. 4 Diagram of the primer extension products

a  $TnNPV-SX35-HBs$ ; b  $TnNPV-HBs$

## 参 考 文 献

1 Miller L K. Baculoviruses as gene expression vectors. *Ann Rev Microbiol*, 1988, 42: 177~199

2 Kitts P A, Ayers M D, Possee R D. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of

- recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 5667~ 5672
- 3 王珣章, 谢伟东, 龙紫新, 等. 人工合成杆状病毒后期启动子的探讨. *中国科学 (B辑)*, 1992 (1): 39~ 46
  - 4 王珣章, 谢伟东, 龙紫新, 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
  - 5 龙紫新, 王珣章, 谢伟东, 等. 乙型肝炎病毒表面抗原基因在昆虫体系中的表达. *生物工程学报*, 1991, 7 (1): 37~ 46
  - 6 何代芬, 王珣章, 谢伟东, 等. 表达乙型肝炎病毒表面抗原基因又形成多角体的杆状病毒. *中国病毒学*, 1992, 7 (4): 389~ 396
  - 7 Tomalski M D, Eldridge R, Miller L K, et al. A baculovirus homolog of a Cu /Zn superoxide dismutase gene. *Virology*, 1991, 184: 149~ 161
  - 8 Hershberger P A, Dickson J A, Friesen P D. Site-specific mutagenesis of the 35 K protein gene encoded by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: cell line-specific effects on virus replication. *J Virology*, 1992, 66: 5525~ 5533

## Construction and Application of A Baculovirus Transfer Vector with Whole-Phase Promoter Cassette

Wu Wenyan\* Wang Xunzhong Long Qingxin Qu Shirui Pang Yi

**Abstract** The promoter of *p35* gene, which is highly active at early stage of viral replication cycle and possesses both early and late regulatory elements, was fused to the reporter gene encoding hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and inserted into the plasmid pSXIVV1 X3 with late and very late (synthetic and XIV) promoters to yield a new transfer vector plasmid pSX35-HBs with a whole-phase promoter cassette. The recombinant baculovirus designated TnNPV-SX35-HBs with occlusion plus (OCC<sup>+</sup>) was also successfully constructed, which contained the HBsAg gene under the triple control of the *p35*, Syn, and XIV promoters. The expression products of HBsAg gene could be detected at 4 hours postinfection (hpi). And the expression level of HBsAg driven by the whole-phase-promoter cassette was increased by 1.8 and 0.6 folds comparing with that driven by the late/very late promoters at 24 hpi and 96 hpi, respectively. These data suggest that the expression time of foreign gene was moved up, and the expression level was significantly increased by the recombinant baculovirus due to the added *Pp35*. The mRNA was isolated from cells at the indicated times after infection for primer extension. Six extension products of *Pp35* were generated, and their initiate sequences were TTAAG and CATAGC, showing that they were the late and early initiate sites, respectively, for gene transcription.

**Keywords** Baculovirus vector, whole-phase promoter cassette, *p35* promoter, HBsAg, mRNA primer extension

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