

· 研究简报 ·

重组杆状病毒的研究*

Ⅱ. 带标记的多角体转移载体质粒的构建

王珣章 谢伟东 龙蔡新

(昆虫学研究所、生物工程研究中心)

摘 要

用大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因, 杆状病毒ETL启动子和含多角体基因的病毒DNA片段构建了多角体转移载体质粒pEZGL, 还对其特点进行了讨论。

关键词 杆状病毒, 苜蓿尺蠖, 转移载体质粒, 启动子

昆虫杆状病毒载体系统由于具有许多独特优点^(1,2)已成为生物工程少数几个重要的外源基因表达载体之一。据统计, 目前国际上已超过150家实验室从事这方面研究⁽³⁾。几十种外源基因也已在昆虫体系中获得了表达^(1,2)。其中, 昆虫杆状病毒载体体系表达生产的人免疫缺陷型病毒(HIV)囊膜抗原作为第一个拟用于预防艾滋病的基因工程疫苗, 于去年得到了美国食品和药物管理局(FDA)批准上人体试验⁽²⁾。

我们曾重组能表达多角体——半乳糖苷酶融合蛋白基因的粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)核型多角体病毒(NPV) TnNPV—gal F7⁽⁴⁾。本文报道多带一个启动子及标记基因的非融合蛋白基因转移载体的构建。我们以含苜蓿尺蠖(*Autographa californica*)核型多角体病毒(AcNPV)多角体基因的质粒pATPIB5⁽¹⁾、含AcNPV ETL早期启动子和 β -半乳糖苷酶(β -gal)基因的质粒pQWGI/ β gal⁽⁵⁾以及常用的克隆载体pUC8为材料, 组建了AcNPV非融合蛋白基因转移载体质粒pEZ38, 还构建了在多角体启动子下游区插入带AcNPV ETL启动子 β -gal标记基因的转移载体质粒pEZGL。

两种质粒的构建如图1所示。pUC8先用BamHI和EcoRI酶切、Klenow聚合酶处理并连接以消除BamHI、EcoRI切点得pUC8/BE, pEZ38的接头来自美国Stratagene公司的多用途克隆质粒pBLUESCRIPT SK(+). DNA序列分析结果表明, 接头与多角体翻译起始密码子ATG中的A相接。用该质粒作转移载体重组的病毒, 就可应用多角体启动子高效表达外源非融合蛋白基因。pQWGI/ β gal中ETL编码区的消除采用PstI完全酶解及Asu II部分酶切的方法, 琼脂糖凝胶电泳回收目的片

本文1988年9月2日收到

*王珣章在美国佐治亚大学遗传和昆虫系完成DNA序列分析。庞义、彭丽燕参加部分实验工作
1)庞义, 博士论文, 1988

段后，Mung-bean 核酸酶处理使其成平端再连接，这使 pQWAP/ β gal 中 ETL 的 ATG 和 β -gal 基因的阅读框一致。为使插入的 β -gal 不至于过大，pQWAP/ β gal 用 NruI 完全酶解和 MluI 部分酶切 (lacZ 还有 MluI 切点)，回收所需片段，Klenow 聚合酶处理变平端再连接，除去约 1.2Kb 的 LacA 部分，得 pQWAPe/ β gal。因 pQWGI/ β gal 中 267bp 的 MluI/EcoRI 片段含有两个方向相反的 “AAT AAA” 多聚(A) 信号^[9]，我们将该片段保留并接到 pEZGL 上。

利用多带一个启动子的标记基因重组、筛选昆虫杆状病毒的工作，国内外未见报导。带 β -gal 标记基因的多角体转移载体质粒 pEZGL 的构建，使重组的病毒多了一个遗传标记，筛选工作更趋于简单、稳定，尤其是应用异源病毒 DNA 片段组建的转移载体，重组频率比较低^[4]或在昆虫原代细胞上挑选重组病毒，病毒斑不很明显的情况下，应用这种转移质粒，预计更具有优越性。采用这些转移载体质粒，我们已重组并筛选出利用多角体启动子表达乙型肝炎病毒表面抗原基因的重组杆状病毒(另文发表)。本系统的建立的意义还在于为昆虫杆状病毒载体体系同时表达两种不同外源基因的工作探索一条新的途径。

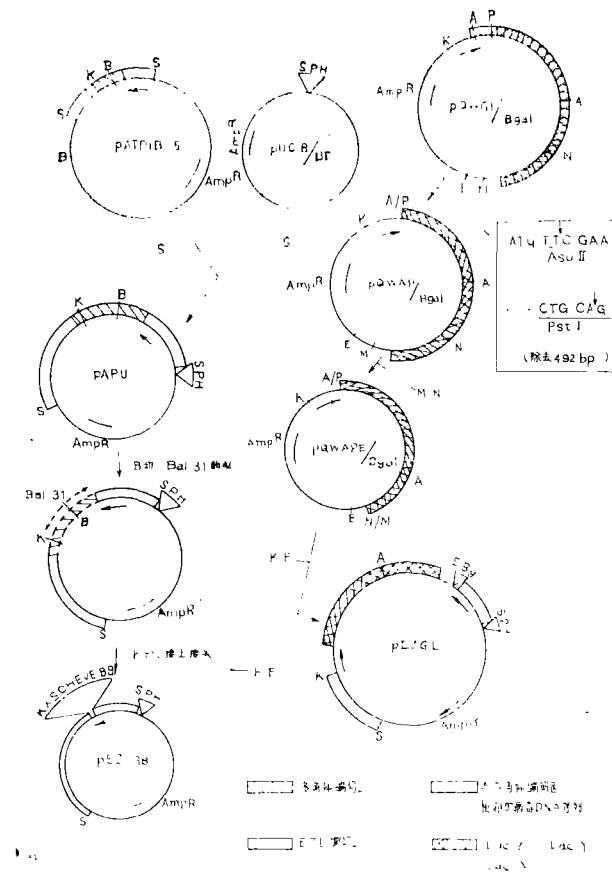


图1 转移载体质粒 pEZ38(5.2kb) 和 pEZGL (10.2kb) 的构建，限制性内切酶用字母表示：
 A-Asu I B-BamH I Bg-Bg I
 C-Cla I E-EcoR I
 Ev-EcoR V H-Hind I K-Kpn I
 M-Mlu I N-Nru I P-Pst I
 S-Sal I X-Xho I.
 多角体启动子方向如图逆时针实箭头所示，ETL 启动子方向为顺时针实箭头所示

Fig. 1 Construction of transfer vector plasmids pEZ 38 (5.2 kb) and pEZGL (10.2 kb). Abbreviations of restriction endonucleases as listed below: A- Asu I B- BamH I Bg-Bg I C- Cla I E- EcoR I Ev- EcoR V H- Hind I K- Kpn I M- Mlu I N- Nru I P- Pst I S- Sal I X- Xho I. The anticlockwise arrow indicate the direction of polyhedrin promoter and the clockwise arrow shows ETL promoter

参 考 文 献

- [1] Lois K Miller, *Annual Review of Microbiology*, 1988
- [2] Verne A Luckow et al., *Bio/Technology*, 6(1988), 47~55
- [3] Barbara R Jasny, *Science*, 238(1987), 1653
- [4] 庞义等, 中山大学学报(自然科学版), 1987, 2, 104~106
- [5] Allan M Crawford et al., *J. Virol.*, 1988

Recombinant Baculovirus

II. Construction of a Baculovirus Transfer Vector Plasmid Carrying a Marker Gene

Wang Xunzhang* Xie Weidong Long Qingxing

Abstract

An *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) polyhedrin substitution vector plasmid pEZGL has been constructed, which contains an *E.coli* β -galactosidase gene under the control of AcNPV ETL promoter. pEZGL has an advantage over conventional transfer plasmids in selecting recombinant baculovirus for high-level expression of desired foreign gene, since the recombinant forms blue-plaque on *Spodoptera frugiperda* cell monolayers in the presence of X-gal.

Keywords Baculovirus, *Autographa californica*, transfer vector plasmid, promoter

* Research Institute of Entomology