

# 含合成启动子的重组杆状病毒研究

邓日强 王珣章 蒲螫龙

(昆虫学研究所)

## 摘 要

以含大肠杆菌 $\beta$ -半乳糖苷酶基因,及人工合成启动子的三种转移载体质粒:pSVI<sup>+</sup>G, pSVI<sup>-</sup>G和pSWVI<sup>-</sup>G,重组了三株带人工合成启动子、驱动 $\beta$ -半乳糖苷酶基因的粉纹夜蛾核型多角体病毒TnNPV-SVI<sup>-</sup>G, TnNPV-SVI<sup>+</sup>G及TnNPV-SWVI<sup>-</sup>G.其中TnNPV-SVI<sup>+</sup>G形成多角体, TnNPV-SWVI<sup>-</sup>G保留了多角体启动子.它们为遗传上稳定、均一的病毒,接种感染草地夜蛾细胞后,25小时可测到 $\beta$ -半乳糖苷酶的活性,50小时达最高,80小时后开始下降.实验表明:保留野生型多角体启动子,对合成启动子表达外源基因有增强作用,但保留启动子与保留多角体基因,则有抑制人工合成启动子表达外源基因的作用.

**关键词** 杆状病毒,合成启动子,半乳糖苷酶基因

杆状病毒作为外源基因的载体,外源基因在昆虫细胞或虫体中的表达通常达不到正常多角体基因的表达水平<sup>[1]</sup>.为了提高外源基因的表达,越来越多研究者的兴趣被吸引到对杆状病毒后期基因启动子调控机理的研究.

杆状病毒后期表达的基因,通常都能有较高的表达水平,它们包括多角体、p10、衣壳和核心碱性蛋白,其中多角体基因表达最强烈.前人的研究发现,这些后期表达基因的启动子都有一个特异的转录起始序列“ $\Delta$ ATAAG”,后期mRNA都起始于其中或附近的某个碱基,除去或改变此保守序列或其下游的碱基序列,都将导致带多角体启动子的外源基因失去转录活性或降低表达量<sup>[2~8]</sup>.

本实验室参照苜蓿尺蠖核型多角体病毒(*Autographa californica* NPV)多角体, p10,病毒粒子衣壳和核心碱性蛋白基因启动子的保守序列,设计合成了含92和96碱基的互补寡核苷酸,作为杆状病毒后期启动子,并以此构建了含多角体基因的转移载体质粒PSVI<sup>+</sup>,对PSVI<sup>+</sup>含氯霉素乙酰基转移酶(CAT)基因的系列质粒作了瞬变检测(transient assay),结果表明,CAT酶基因在人工合成启动子控制下,在昆虫细胞中的表达,比在常规杆状病毒载体系统中,利用野生型多角体启动子的表达高60%(王珣章等,1989).本研究在此基础上,通过构建带人工合成启动子及大肠杆菌半乳糖苷酶(简称 $\beta$ -gal)基因的转移载体质粒,重组出带合成启动子 $\beta$ -gal基因的粉纹夜蛾核型多角体病毒系列,检验这些重组病毒在昆虫细胞中的表达水平,进而研究野生型多角体启动子和多角体基因,对人工合成启动子外源基因表达的影响.

本文1989年12月15日收到

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒和细胞

粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)核型多角体病毒(TnNPV),用草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞增殖。细胞培养基为TC-100加10%胎牛血清<sup>[10]</sup>。

### 1.2 质粒构建

含 $\beta$ -半乳糖苷酶基因(LacZ)的质粒pSKS105,由Lois K. Miller 教授提供。质粒pSVI<sup>+</sup>、pSVI<sup>-</sup>与pSWVI<sup>-</sup>,含有AcNPV的Pvu II片段,片段中间插有人工合成启动子。pSVI<sup>+</sup>在人工合成启动子的反方向有完整的野生型TnNPV的多角体基因及其启动子。pSWVI<sup>-</sup>则在合成启动子的反方向有野生型多角体基因的启动子(王珣章等,1989)。

### 1.3 病毒的重组及筛选

参考文献[11, 12]关于DNA转染细胞的方法,将转移载体质粒DNA和病毒DNA共转染细胞以实现重组,并筛选出含外源基因的病毒。

### 1.4 外源基因专化活性测定

蛋白质含量的确定,参照文[13]的方法,并以牛血清白蛋白作标准。重组病毒在培养细胞中表达的 $\beta$ -半乳糖苷酶是通过其分解ONPG(邻硝基苯- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷)的能力来确定它们的表达水平的<sup>[14, 15]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 含 $\beta$ -半乳糖苷酶基因带人工合成启动子质粒的构建

首先将带人工合成启动子的质粒pSVI<sup>+</sup>、pSVI<sup>-</sup>、pSWVI<sup>-</sup>,分别用EcoRV与Sac II酶解,电泳分离提纯大片段;而含LacZ基因的质粒pSKS105,则用Pst I酶解,Mung bean 核酸酶处理使其变平端,而后用Sac II酶解,电泳分离提纯大片段。将两个大片段分别连接后转化大肠杆菌JM109,在含氨苄青霉素(100 $\mu$ g/ml)及x-gal(120 $\mu$ g/ml)的平板上挑选蓝色菌落,从中选出pSVI<sup>+</sup>G、pSWVI<sup>-</sup>G和pSVI<sup>-</sup>G 3种质粒,它们的DNA,经酶切证实均含有LacZ基因。3种质粒的构建如图1和图2所示。

### 2.2 含 $\beta$ -半乳糖苷酶基因的重组病毒的组建

将质粒pSVI<sup>-</sup>G、pSWVI<sup>-</sup>G DNA分别与野生型TnNPV DNA共转染草地夜蛾细胞,在含x-gal的半固体琼脂糖培养基上,挑选并经反复空斑纯化,得2株形成蓝色病毒噬斑,而不形成多角体重组病毒毒株,定名为TnNPV-SVI<sup>-</sup>G和TnNPV-SWVI<sup>-</sup>G,病毒DNA酶解分析表明,在TnNPV基因组中插进了外源基因;质粒pSVI<sup>+</sup>G DNA则与含乙型肝炎表面抗原基因的粉纹夜蛾重组病毒TnNPV-HBs D<sub>4</sub> DNA(不形成多角体)(龙繁新等,1989)共转染Sf细胞,挑选蓝色并形成多角体重组病毒株,定名为TnNPV-SVI<sup>+</sup>G。其DNA经酶解电泳分析,表明TnNPV-HBsD<sub>4</sub>中的HBs Ag基因



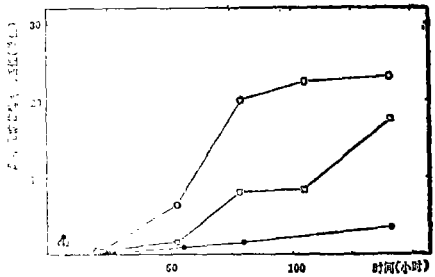


图3 重组病毒 TnNPV-SWVI<sup>-</sup>G(○—○)、TnNPV-SVI<sup>-</sup>G(□—□)以及TnNPV-SVI<sup>+</sup>G(●—●)感染的草地夜蛾细胞经不同时间测定的β-半乳糖苷酶专化活性(纵座标的单位是每毫克蛋白每分钟分解ONPG的毫微克分子(nmol)数)

Fig. 3 Kinetics of β-galactosidase activity in *Spodoptera frugiperda* cells infected with recombinant baculoviruses TnNPV-SWVI<sup>-</sup>G (○—○), TnNPV-SVI<sup>-</sup>G (□—□), and TnNPV-SVI<sup>+</sup>G (●—●) respectively. (Specific activity is reported as nanomoles of ONPG cleaved per minute per milligram of protein)

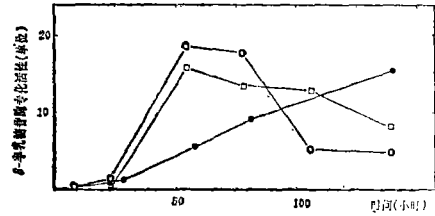


图4 重组病毒 TnNPV-SWVI<sup>-</sup>G(○—○)、TnNPV-SVI<sup>-</sup>G(□—□)以及TnNPV-SVI<sup>+</sup>G(●—●)感染草地夜蛾细胞后,其上清培养基经不同时间测定的β-半乳糖苷酶专化活性(纵座标的单位是每毫升培养基每分钟分解ONPG的毫微克分子(nmol)数)

Fig. 4 Kinetics of β-galactosidase activity in cell-free tissue culture media obtained from *S. frugiperda* cell cultures infected with recombinant baculoviruses TnNPV-SWVI<sup>-</sup>G (○—○), TnNPV-SVI<sup>-</sup>G (□—□), and TnNPV-SVI<sup>+</sup>G (●—●) respectively. (Specific activity is reported as nanomoles of ONPG cleaved per minute per milliliter of tissue culture fluid)

将大量纯化的重组病毒TnNPV-SVI<sup>+</sup>G、TnNPV-SWVI<sup>-</sup>G、TnNPV-SVI<sup>-</sup>G与带野生型启动子的含β-半乳糖苷酶的重组病毒TnNPV-gal F<sub>7</sub>,分别感染草地夜蛾细胞,比较β-半乳糖苷酶活性结果显示,用人工合成启动子驱动的β-半乳糖苷酶基因表达效率仍较低,与瞬变检测结果不一致,未能达到预期的效果。

目前, NPV用于表达外源基因,通常是以多角体基因为插入位点,利用多角体蛋白在病毒复制后期大量表达的特点,依靠多角体启动子驱动外源基因的表达,从而高效生产有较大经济价值的蛋白质。由于这种重组病毒已经不再表达多角体蛋白,因而不再形成多角体。这种重组病毒通常是利用离体培养细胞来表达外源基因的。培养基上清中细胞逸出的感染性病毒粒子,可用于培养细胞的感染。若在虫体中表达,则重组病毒必须通过注射感染。

重组病毒通过感染虫体来表达外源基因产物,目前还较少,但外源基因在虫体内血淋巴的表达量比在离体培养细胞培养液中的量高10倍以上<sup>[16,17]</sup>(龙蔡新等,1989)。用离体培养细胞来生产外源基因产物,由于培养基所需要的血清价格昂贵,增加了成本。用人工饲料大规模饲养昆虫,成本低廉(庞义,1988)。我们以质粒pSVI<sup>+</sup>为基础重组了表达外源β-半乳糖苷酶基因又形成多角体的重组病毒 TnNPV-SVI<sup>+</sup>G,经三次克隆和多次在离体细胞中传代,证实为遗传上稳定的病毒。但重组病毒利用人工合成启动子表达外源基因产物的效率尚较差,因此,今后可考虑改良人工合成启动子,使其能

有更高的表达强度,使重组病毒既大量表达外源基因,又形成适量的多角体,可以作为口服感染下一代幼虫和用于研究基因工程病毒杀虫剂。

### 参 考 文 献

- [1] Luckow V A et al., *Bio/Technology*, 6 (1988), 47~55
- [2] Hooft van Iddekinge et al., *Virology*, 131 (1983), 561~565
- [3] Rohrmann G F, *J. Gen. Virol.*, 67 (1986), 1499~1531
- [4] Blisard G W et al., *Virology*, 169 (1989), 1 78-89
- [5] Kuzio J et al., *Virology*, 139(1984), 414~418
- [6] Wilson M E et al., *J. Virol.*, 61 (1987), 661~666
- [7] Possee R D et al., *Nucleic. Acid. Res.*, 15 (1987) 10233~10248
- [8] Rankin C et al., *Gene*, 70 (1988), 39~49
- [9] Smith G E et al., *Mol. Cell. Biol.*, 3 (1983), 2156~2165
- [10] Gardiner G R et al., *J. Invertebr. Pathol.*, 25 (1975) 303~307
- [11] Kelly D C et al., *Annales de Virologie*, 132E (1981), 247~259
- [12] Smith G E et al., *J. Virol.*, 46 (1983), 584~593
- [13] Lowry O H et al., *J. Biol. Chem.*, 193 (1951), 265~275
- [14] Miller J H *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York, 1972
- [15] Pennock G D et al., *Molecular and Cellular Biology*, 4 (1984), 3, 399~406
- [16] Maeda S et al., *Nature*, 315 (1985), 592~594
- [17] Marumoto Y et al., *J. Gen Virol.*, 68 (1987), 2599~2606

## Recombinant Baculovirus : Foreign Gene Expression under the Control of a Synthetic Promoter

Deng Riqiang Wang Xunzhang Pu Zhelong

### Abstract

Recombinant *Trichoplusia ni* NPV designated TnNPV-SVI<sup>-</sup>G, TnNPV-SWVI<sup>-</sup>G and TnNPV-SVI<sup>+</sup>G respectively were constructed. All these recombinants contain a passenger gene, *Escherichia coli*  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal), under the control of a synthetic promoter based on the conserved sequences of *Autographa californica* NPV late promoters. Additionally, both TnNPV-SWVI<sup>-</sup>G and TnNPV-SVI<sup>+</sup>G contain the polyhedrin promoter, but minus and plus the coding region respectively in opposite orientation to the synthetic promoter and  $\beta$ -gal gene. Results of  $\beta$ -gal activity determinations indicated that the expression of  $\beta$ -gal gene is temporally controlled beginning late in infection (25 h. p. i.). A maximal level of expression

was achieved by 56 h. p. i. and the  $\beta$ -gal activity declined after 80 h. p. i.

Comparison of  $\beta$ -gal expression levels in *S. frugiperda* cells infected with TnNPV-SVI<sup>-</sup>G, TnNPV-SWVI<sup>-</sup>G and TnNPV-SVI<sup>+</sup>G respectively showed that insertion of the polyhedrin promoter alone had positive effects on the synthetic promoter resulting in increased  $\beta$ -gal expression while the polyhedrin promoter plus the coding sequence had negative effects leading to decreased expression.

The advantages of TnNPV-SVI<sup>+</sup>G system in foreign gene expression and its possible use in pest control were discussed.

**Keywords** baculovirus, synthetic promoter,  $\beta$ -galactosidase gene