

·研究简报·

重组杆状病毒的研究

I. 含大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因的
粉纹夜蛾核型多角体病毒庞义 谢伟东 龙紫新 陈其津 王均章 蒲蛰龙
(昆虫学研究所)**关键词** DNA重组, 杆状病毒, 粉纹夜蛾, β -半乳糖苷酶基因

以昆虫杆状病毒(*Baculovirus*)为载体、昆虫虫体和昆虫细胞为受体的基因工程, 是目前正在开拓的富有前途的新领域之一^[1]。杆状病毒载体系统的优点在于: 对外源基因的容量大; 病毒基因组能提供一个可插入外源基因而对病毒复制本身不受影响的非必需区(多角体基因), 同时提供一个极强的启动子, 使植入的外源基因能高效表达; 能大规模低成本地饲养寄主昆虫, 从而有可能大量获得具有重要经济价值的外源基因表达产物; 杆状病毒对人、畜、植物安全, 无致病作用。目前已在实验室中研究成功人的有 β -干扰素基因^[2]、 α -干扰素基因^[3]和流感病毒血球凝集素基因^[4]在此系统中的高效表达。

杆状病毒中的A亚组, 即核型多角体病毒(NPV), 其基因组为单一分子的双股环状DNA, 大小约130kb。病毒在昆虫细胞核中复制增殖, 形成一种直径为0.5—5 μ m的蛋白质包涵体—多角体, 每个多角体包埋多个病毒粒子。多角体蛋白多肽的分子量约为30000道尔顿, 这种蛋白多肽在细胞感染后期占细胞总蛋白量的25%以上。

粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)核型多角体病毒(Tn NPV)是一种已有详细研究的病毒, 这种病毒的分子生物学特性与首蓓尺蠖(*Autographa californica*)核型多角体病毒(Ac NPV)颇为接近, 极易在离体培养的草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中复制^[5]。

我们以含AcNPV DNA Hind III—F, V, T片段的质粒DNA pGP-B6874/Sal^[6]为转移载体, 与粉纹夜蛾NPV DNA对草地贪夜蛾细胞的共转染, 重组出含大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因的粉纹夜蛾核多角体病毒Tn NPV-gal F7, 其重组频率约为1/15~ 20×10^3 。该重组病毒在含有X-gal(5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷)的琼脂糖半固体细胞培养基中形成清晰的蓝斑。以蓝斑和不形成包涵体为标志, 通过类似空斑测定程序^[7]进行反复挑选便可纯化所需的重组病毒。经过连续多次传代证明, 重组病毒Tn NPV-gal F7在遗传上是稳定的。

本文于1987年1月收到

重组病毒TnNPV-galF7的DNA经限制性内切酶Bam HI酶解分析表明,在其基因组内插入了一个大小约9.2kb的外源DNA片段(图1)。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明:Tn NPV-gal F7感染的细胞不再合成分子量为33000道尔顿的多角体蛋白,而大量合成分子量约为120000道尔顿的蛋白质(图2)。用质粒DNA pGP-B6874/Sal重组Ac NPV的研究^[6]以及本实验结果的分析,120k蛋白为多角体-半乳糖苷酶融合蛋白。由于我们是应用Ac NPV DNA片段组建的转移载体来重组Tn NPV-galF7,故融合蛋白的N-末端,即多角体蛋白部分,是由Ac NPV还是由Tn NPV多角体基因编码,目前还无法确定。此外,多角体-半乳糖苷酶融合蛋白基因起始密码子上游区(包括启动子)是来自Ac NPV或Tn NPV,也尚未清楚。

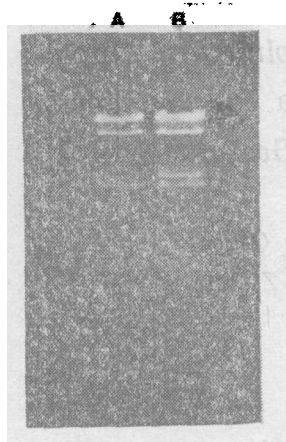


图1 病毒DNA的限制性内切酶Bam HI酶解图谱
A为野生型TnNPV;
B为重组病毒 Tn NPV-gal F7.
箭头所指为插入的外源DNA片段(9.2kb)

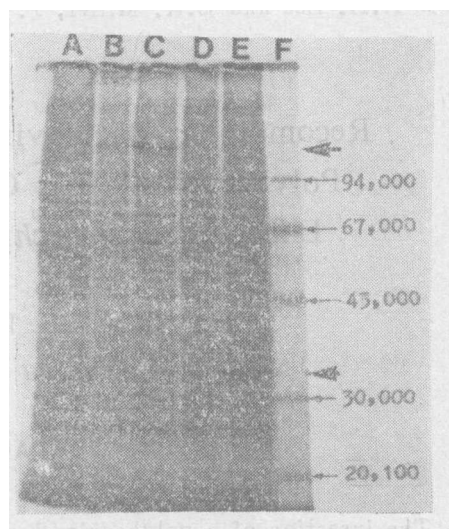


图2 草地贪夜蛾细胞蛋白的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、考马斯亮蓝染色图谱
A为未感染细胞, B和C为重组病毒 TnNPV-gal F7感染细胞, D和E为野生型 Tn NPV感染细胞. B和D为感染后24小时, C和E为48小时, F为标准分子量蛋白. 上粗箭头所指为多角体-半乳糖苷酶融合蛋白区带(120000道尔顿); 下粗箭头所指为多角体蛋白区带(33000道尔顿)

在挑选重组病毒的过程中,我们偶然选到一株具有包涵体、且能在含X-gal培养基中形成蓝斑的病毒Tn NPV-gal A4。此病毒株与无包涵体的Tn NPV-gal F7比较, β -半乳糖苷酶基因的表达水平低,在相同条件下作空斑测定时,前者经5天才出现蓝斑,后者只需要2天。Tn NPV-gal A4在遗传上亦不稳定,估计为半乳糖苷酶基因插入Tn NPV基因组内另一非必需区所致。

本项研究说明,杆状病毒的重组并非必须使用同源病毒的转移载体。本研究工作还为具有重大经济价值的外源基因在以杆状病毒为载体的昆虫细胞受体系统中的高效表达奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] D. W. Miller *et al.*, In J.K. Setlow and A. Hollaender, (eds), "Genetic Engineering", Plenum Publishing Corporation, 8 (1986), PP. 277-298.
- [2] G. Smith *et al.*, *Mol. and Cell. Biol.*, 3 (1983), 2156-2165.
- [3] S. Maeda *et al.*, *Nature*, 315 (1985), 592-594.
- [4] K. Kuroda *et al.*, *EMBO J.*, 5 (1986), 1359-1365.
- [5] X. Wang and D.C. Kelly, *J. Gen. Virol.*, 64 (1983), 2229-2236.
- [6] G.D. Pennock *et al.*, *Mol. and Cell. Biol.*, 4 (1984), 399-406.
- [7] H.H. Lee and L.K. Miller, *J. Virol.*, 27 (1978), 754-767.

Recombinant Baculovirus: *Trichoplusia ni* Nuclear
Polyhedrosis Virus Containing a Fused Gene
Encoding *Escherichia coli* β -Galactosidase

Pang Yi Xie Weidong Long Qingxing
Chen Qijing Wang Xunzhang Pu Zhelong

Abstract

The insertion of a polyhedrin/ β -galactosidase fusion gene into *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus (NPV) genome has been achieved by using an *Autographa californica* NPV polyhedrin substitution vector *E. coli* plasmid pGP-B6874/Sal. A remarkably high level of the fused gene expression has also been obtained.

Keywords DNA recombination. Baculovirus, *Trichoplusia ni*. β -Galactosidase Gene.