

杆状病毒转移载体的构建及绿色荧光蛋白在斜纹夜蛾幼虫中的表达 Construction of a Baculovirus Transfer Vector and Expression of Baculovirus-mediated *gfp* Gene in Larvae of *Spodoptera litura*

胡兆丽¹ 王文兵² 朱 江^{1*} 李新平¹ 沈颂东¹

HU Zhao-Li¹, WANG Wen-Bing², ZHU Jiang^{1*}, LI Xin-Ping and SHEN Song-Dong¹

1. 苏州大学生命科学学院, 苏州 215006

2. 江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013

1. Life Sciences School, Suzhou University, Suzhou 215006, China

2. Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

摘 要 为构建斜纹夜蛾核型多角体病毒 (SpltMNPV) 的重组病毒, 以该病毒日本 C3 株基因组 DNA 为 PCR 扩增模板, 根据 GenBank SpltMNPV 中国 G2 株基因序列, 设计了两对引物分别扩增多角体蛋白基因的 5' 端侧翼序列 (含启动子) 和 3' 端侧翼序列 (含终止子) 将这两个片段依次克隆于 pUC18 质粒载体后, 再将绿色荧光蛋白 (GFP) 基因亚克隆到上述载体的多角体蛋白基因启动子和终止子之间, 获得转移载体 pSplt-*gfp*。将 pSplt-*gfp* 与野生型 SpltMNPV 基因组 DNA 共转染 Spli 细胞, 通过同源重组和有限稀释法筛选, 获得了以 *gfp* 基因替代多角体蛋白基因的重组病毒 SpltMNPV-*gfp*。SpltMNPV-*gfp* 感染 Spli 细胞和斜纹夜蛾幼虫, 分别在感染 24h 和 48h 后可发现绿色荧光蛋白的表达。该重组病毒的获得, 为建立斜纹夜蛾核型多角体病毒表达体系奠定了基础。

关键词 杆状病毒转移载体, 绿色荧光蛋白, 斜纹夜蛾, 真核表达

中图分类号 Q784; Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0530-04

Abstract To construct a novel baculovirus expression system of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus, the 5' end and 3' end-flanking fragments of ph gene were amplified from the genome DNA of SpltMNPV Japan-C3 strain using two pairs of primers synthesized according to SpltMNPV China-G2 strain genome DNA sequence published in GenBank. To obtain the transfer vector pSplt-*gfp*, the fragment of *gfp* gene was inserted into this vector between two fragments tandem linked into pUC18. The spli cells were cotransfected with pSplt-*gfp* and the wild SpltMNPV genome DNA. The recombinant virus containing *gfp* was selected with the limited dilution method. The fluorescence can be observed in the spli cells and the 3rd instar larvae after 24 and 48 hours by infection of the recombinant virus, respectively. The result showed that the recombinant virus was obtained successfully. It will be helpful to establish *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus expression system and more effective pesticide for *Spodoptera litura*.

Key words baculovirus transfer vector, green fluorescent protein, *Spodoptera litura*, eukaryotic expression

Received: February 4, 2005; Accepted: April 13, 2005.

This work was supported by "211 Project" of Suzhou University (No. XB 114060).

* Corresponding author. Tel: 86-512-67604682; E-mail: zhujiangyz@126.com

苏州大学 "211 工程" 基金项目 (No. XB114060)

自从 1983 年 Smith 等首次使用杆状病毒表达系统表达 β -干扰素以来^[1], 杆状病毒表达系统被广泛应用, 到目前为止已表达了数以千计的各种生物活性分子。因为其表达量大, 后加工系统完备, 使用安全等特点而备受人们的青睐^[2]。迄今为止, 杆状病毒转移载体仅限于 AcNPV 和 BmNPV^[3]。

斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura* Spli) 是一种杂食性的重要农业害虫, 应用斜纹夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus, SpltMNPV) 防治斜纹夜蛾是一种有效的生物防治方法, 而通过基因工程手段构建新的高效杀虫病毒是改良病毒杀虫剂的途径^[6,7]。gfp 作为一种极具潜力的标记物已被广泛应用于从原核到真核生物的细胞生物学和分子生物学研究。杆状病毒表达系统的研究领域, 也已有构建 GFP 为标记基因的转移载体和重组病毒的报道^[4,5]。为了从分子水平深入地阐明 SpltMNPV 在体内的侵染、增殖规律, 通过基因工程手段构建新的高效斜纹夜蛾杀虫病毒, 本研究进行了构建以 GFP 为标记基因的斜纹夜蛾核型多角体病毒载体系统的尝试, 获得了以 GFP 基因替代多角体蛋白基因的重组病毒 SpltMNPV-gfp。SpltMNPV-gfp 感染 Spli 细胞和斜纹夜蛾幼虫表明, 绿色荧光蛋白在细胞和整体水平得到了表达。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所用的病毒株为 SpltMNPV 日本 C3 株, 由日本岐阜县生物产业技术研究所 Katsumi Kamiya 博士馈赠, 斜纹夜蛾 TUAT-Spli221 细胞由日本名古屋大学资源昆虫研究室 Michihiro Kobayashi 教授提供。Spli 细胞用含 10% 胎牛血清 (Invitrogen 公司) 的 TC-100 培养基 (Invitrogen 公司) 28℃ 培养。

载体质粒 pUC18、转化用宿主菌 *E. coli* DH-5 α 由本实验室保存。

Ex-Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *EcoR* I, *Bam*H I, *Hind*III, *Kpn* I, T4 DNA 连接酶, 质粒纯化 Kit 等均购自 TaKaRa 公司, 脂质体 (Lipofectine) 为 Invitrogen 公司产品。

1.2 病毒感染及病毒 DNA 的提取

实验使用 80 cm² (Corning 公司) 培养瓶培养的单层贴壁细胞 (1×10^6 /mL 个细胞), 除去培养液后接种 1500 μ L 病毒液, 感染复数 (MOI: multiplicity of infection) 为 1。室温下用振荡器慢摇 1h, 使病毒吸附

细胞, 然后除去病毒接种液, 加入 13mL TC-100 培养基 (含 10% 胎牛血清), 28℃ 培养 96h 后收获病毒感染的培养细胞。从培养细胞提取病毒 DNA 的方法根据吴福泉等^[8]的方法进行。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

以 GenBank SpltMNPV 中国株 (G2) 基因组全序列 (NC003102) *ph* 基因两端侧翼序列设计两对引物 P1、P2 和 P3、P4; 另外依据质粒 pCDNA3.1-gfp 设计引物 P5、P6, 序列如下:

5'侧翼序列 P1 5' CCG AAG CTT GCG TTT TCT CAA TGA 3'

P2 5' CGC GGA TCC TAT GGG ATA TTT GAT TTT 3'

3'侧翼序列 P3 5' AGA GGT ACC TAA ATT TGC GAA GAG GAC A 3'

P4 5' GCG GAA TTC TCG ACA ATC GAA CCA 3'

GFP 引物 P5 5' ACA GGA TCC ACC ATG GTC AGC AAG GGC CA 3'

P6 5' AGA GGT ACC CTT GTA CAG CTC GTC CAT 3'

在 P1-P6 的 5' 端依次引入了 *Hind*III, *Bam*H I, *Kpn* I, *Eco*R I, *Bam*H I 和 *Kpn* I 酶切位点, 以上引物由上海捷倍斯基因技术有限公司合成。PCR 扩增按常规操作。

DNA 片段分离、连接转化、质粒制备与纯化、限制酶酶切均按 Sambrook 等方法进行^[9]。依次将 *ph* 基因的侧翼序列及 *gfp* 基因克隆于 pUC18 上获得重组转移载体命名为 pSplt-gfp。序列测定委托上海博亚生物技术有限公司使用 3730 测序仪进行。

1.4 脂质体介导的共转染及重组病毒的筛选

按 Lipofectine 试剂说明, 将 1×10^4 个 spli 细胞接种于 35mm 培养皿中, 培养 16~20h, 待细胞生长至 50% 丰度, 用无血清 TC-100 培养基洗细胞 2 次待用。准备质粒 DNA/脂质体复合物, 即溶液 A (质粒 pSplt-gfp DNA 2 μ g, 野生病毒 WtSpltMNPV DNA 0.5~1 μ g 加入无血清 TC-100 培养基补充体积至 100 μ L) 与溶液 B (脂质体 5 μ L, 加入 95 μ L 无血清 TC-100 培养基)。

将溶液 A 和溶液 B 混匀, 室温静置 15min 后, 加入 800 μ L 的无血清 TC-100 培养基轻轻混匀。吸尽 35mm 培养皿中的培养基, 然后逐滴加入质粒 DNA/脂质体复合物, 37℃ 培养 2h, 加含有 20% 胎牛血

清 TC-100 培养基 1mL, 继续培养 48h 后, 采用倒置荧光显微镜观察细胞。经有限稀释法三轮筛选后得到纯的重组病毒, 命名为 SpltMNPV-*gfp*。

1.5 重组病毒感染斜纹夜蛾幼虫

实验用斜纹夜蛾幼虫由苏州大学农业科学与技术院提供。选取健康 3 龄斜纹夜蛾幼虫, 4℃ 冰箱放置 30min, 用接种针蘸取重组病毒穿刺幼虫的第一腹足。接种后的幼虫投喂人工饲料, 于 27℃ 培养箱中培养, 倒置荧光显微镜下观察 GFP 表达情况。

2 结果与分析

2.1 转移载体 pSpL_t-*gfp* 的构建与鉴定

以 SpltMNPV 日本 C3 株基因组 DNA 为 PCR 扩增的模板, 根据 GenBank SpltMNPV 中国 G2 株基因序列, 设计了两对引物分别扩增多角体基因的 5' 和 3' 侧翼序列, 将这两个片段依次克隆于 pUC18 质粒载体后, 再将 GFP 基因亚克隆到多角体蛋白基因启动子下游, 获得转移载体 pSplt-*gfp* (图 1)。SpltMNPV *ph* 5'、3' 侧翼序列及 *gfp* 的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 3 条片段与预期大小一致 (图 2)。

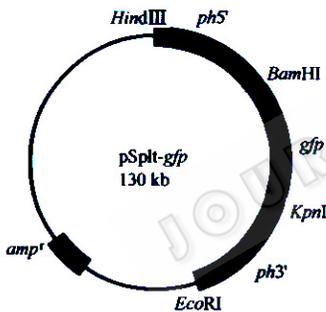


图 1 转移载体 pSplt-*gfp* 图谱

Fig. 1 Map of the transfer vector pSplt-*gfp*

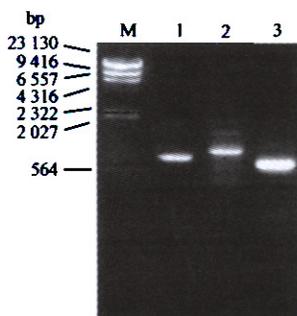


图 2 SpltMNPV *ph* 5'、3' 侧翼序列及 *gfp* 的 PCR 结果

Fig. 2 PCR result of SpltMNPV *ph* 5'、3' flanking sequences and *gfp*

M: λ -HindIII; 1: *ph* 5'; 2: *ph* 3'; 3: *gfp*.

经酶切鉴定初步证明, 已成功地将 3 个目的片段依次克隆至转移载体中。对 pSplt-*gfp* 的 PCR 扩

增产物的测序结果也表明, 该转移载体包含了预期的 3 个 DNA 片段, 而且克隆方向正确。上述结果证明转移载体 pSplt-*gfp* 构建成功。

2.2 重组病毒 SpltMNPV-*gfp* 的筛选与鉴定

转移载体 pSplt-*gfp* 与 WtSpltMNPV DNA 共感染直径为 35mm 培养皿中的 Spli 细胞后, 定时用倒置荧光显微镜镜检, 24h 后即可见细胞内有微弱荧光, 以后荧光渐渐增强。由于同源重组的几率只有 0.1% ~ 1%, 所以须经有限稀释法逐步筛选出单个重组病毒株系, 用 96 孔培养板, 经三轮筛选后获得阳性重组病毒, 图 3 为阳性重组病毒 pSplt-*gfp* 感染的 Spli 细胞。

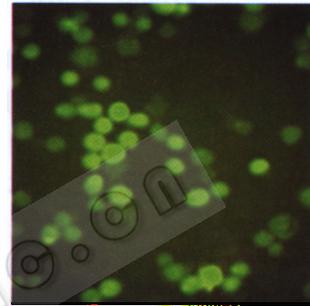


图 3 重组病毒 SpltMNPV-*gfp* 的筛选

Fig. 3 Screening the recombinant virus SpltMNPV-*gfp*

重组病毒 pSplt-*gfp* 感染 Spli 细胞, 5 ~ 6 天后收集细胞, 用常规的方法抽提病毒基因组 DNA。以此 DNA 为模板, 选取 *ph* 基因 5' 侧翼序列引物 P1 及 3' 侧翼序列引物 P4, PCR 扩增片段约 2500bp, 与预期的 3 个 DNA 片段序列之和的大小一致。经不同的核酸内切酶酶切鉴定, 结果与对转移载体 pSpL_t-*gfp* 的酶切鉴定结果相同, 说明重组病毒构建成功。

2.3 重组病毒 SpltMNPV-*gfp* 对斜纹夜蛾幼虫的感染 (图 4A, B)

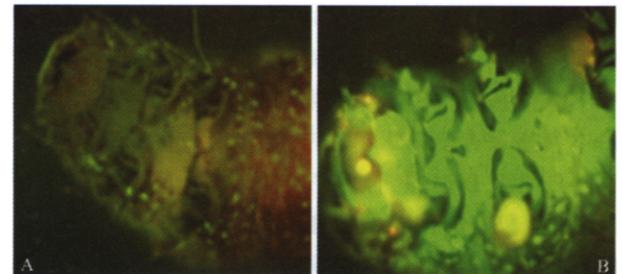


图 4 重组病毒 SpltMNPV-*gfp* 对斜纹夜蛾幼虫的感染

Fig. 4 Larvae of *Spodoptera litura* infected with recombinant virus SpltMNPV-*gfp*

A: normal larvae of *Spodoptera litura* without infection; B: larvae of *Spodoptera litura* infected with SpltMNPV-*gfp*

倒置荧光显微镜下观察穿刺了重组病毒的 3 龄

期斜纹夜蛾幼虫,发现 72h 以后虫体荧光逐渐增强,120~144h 时,倒置荧光显微镜下可观察到绿色荧光。

3 讨论

本研究成功构建了带有绿色荧光蛋白标记的转移载体 pSplT-*gfp* 和重组 SpltMNPV-*gfp*。与传统方法筛选重组病毒相比,通过绿色荧光这种直观的标志进行重组病毒的筛选与纯化,可大大减少筛选的工作量和时间。本研究所构建的 pSplT-*gfp* 的 *gfp* 编码区下游可以插入多克隆位点,或在 pSplT-*gfp* 的基础上,再插入另一启动子控制下的多克隆位点,这将为今后其他外源基因插入 SpltMNPV,构建具有 GFP 标记的、高效的重组病毒,建立 SpltMNPV 杆状病毒表达系统奠定基础。

影响共转染效率的因子包括质粒和病毒 DNA 的完整性、二者的数量及比例、侧翼序列的长度、外源基因的大小、转染方法以及细胞质量等,其中最重要的是昆虫培养细胞的质量以及病毒 DNA 与重组 DNA 的纯度^[3]。本研究中,由于 Spli 培养细胞的质量和 pSplT-*gfp* DNA 与 WtSpltMNPV DNA 的纯度较高,所以获得了理想的同源重组率。尽管侧翼序列的长度影响共转染效率,本研究构建的 *ph* 基因的 5'和 3'侧翼序列分别为 838bp 和 963bp,比普通昆虫杆状病毒转移载体的侧翼序列短,但结果表明并不影响共转染效率。

本实验中,用重组病毒穿刺感染斜纹夜蛾 3 龄期幼虫。在感染 48 h 后置于倒置荧光显微镜下,即可观察到绿色荧光蛋白的表达(图 4)。观察还发现,随着感染时间的推移,荧光产生的部位和荧光强度也发生相应的变化。据此,可以利用这种重组病毒来研究病毒在体内的侵染路线、增殖规律,如将不同的基因置于 *gfp* 之后,可以研究各种基因的表达时相和定位^[10,11]。

利用杆状病毒防治害虫,已成为农作物植物保护的重要手段。然而,由于其潜伏期长,杀虫速度慢,在实际应用中往往达不到预想的效果。因此,必须对杆状病毒进行改造。理论上,杆状病毒侵染昆虫宿主的任何环节都可以作为进行杆状病毒改造以提高其杀虫效果的靶向目标^[12]。实际运用时,为了有效改造杆状病毒,必须弄清其确切的感染机理。本研究即是基于这一现状,构建了携带绿色荧光蛋白标记基因的重组 SpltMNPV,并在斜纹夜蛾幼虫中进行了表达。实验初步结果证明,这一构想在

SpltMNPV 系统中运用是可行的,并且是更有利于实际应用的,这为开发 SpltMNPV 基因工程杀虫剂提供了理论与应用基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cell infected with baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol*, 1983b, **3**: 2156-1265
- [2] Zhu J(朱江), Wu XK(吴祥甫). Research progress and application of insect baculovirus expression system. *Acta Sericologica Sinica* (蚕业科学) 2003, **29**(2): 114-119
- [3] Lu HS(吕鸿声). Molecular Biology of Insect Viruses. Beijing: China Agricultural Sciencetech Press(昆虫病毒分子生物学.北京:中国农业科技出版社), 1998, pp. 547-554
- [4] Yue LI(岳莉莉), Qi YP(齐义鹏), Du QS(杜全胜) et al. Expression of GFP-HBVe fusion protein in insect cells by Bac-to-Bac system. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), 1998, **14**(3): 234-239
- [5] Zhu Y(朱应), Qi YP(齐义鹏), Liu DL(刘德立). Construction of transposon-mediated baculovirus vector and expression of green fluorescent protein in insect cells and larvae. *Chin Sci Bull*(科学通报), 1999, **44**(2): 158-162
- [6] Kamiya K, Zhu J, Murata M et al. Cloning and comparative characterization of three distinct nucleopolyhedroviruses isolated from the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Japan. *Biological Control*, 2004, **31**: 38-48
- [7] Zhu J(朱江), Shen SD(沈颂东), Wang WB(王文兵) et al. Proliferation characteristics of three Japanese strains *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus in cultural cells and Sequences analysis of polyhedrin gene. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报) 2004, **47**(5): 543-550
- [8] Wu F, Lavina B, Ikeda M et al. Cloning and biological characterization of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in nucleopolyhedrovirus isolated from China. *J Seric Sci Jpn*, 2000, **69**(3): 177-189.
- [9] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [10] Zhu FX(朱反修), Qi YP(齐义鹏), Huang YX(黄永秀) et al. Expression of green fluorescent protein with baculovirus vector in insect cells. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 1997, **37**(1): 15-20
- [11] Liu ZQ(刘祖强), Yang FH(杨复华), Qi YP(齐义鹏) et al. Vertical transmission of baculovirus and expression baculovirus-mediated green fluorescent protein gene in successive generations of *Helicoverpa armigera*. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 2001, **44**(1): 2-7
- [12] Lu SY(吕颂雅), Yang FH(杨复华), Liu ZQ(刘祖强) et al. Infections course of recombinant baculovirus marked with green fluorescent protein gene in larvae of Cotton Boll worm. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报) 2000, **17**(6): 743-750