

# 杆状病毒表达系统的改进及 IL-6 在昆虫细胞内的表达和纯化 Improvement of Baculovirus Expression System and Purification of IL-6 Protein Expressed in Insect Cells

姚 宁<sup>1</sup> 姚伦广<sup>2\*</sup> 阚云超<sup>2</sup> 周文科<sup>3</sup> 齐义鹏<sup>3</sup>

YAO Ning<sup>1</sup>, YAO Lun-Guang<sup>2\*</sup>, KAN Yun-Chao<sup>2</sup>, ZHOU Wen-Ke<sup>3</sup> and QI Yi-Peng<sup>3</sup>

1 西南交通大学药学院, 峨眉山市 614202

2 中英南阳洛桑昆虫生物学联合实验室, 南阳师范学院, 南阳 473061

3 武汉大学生命科学院病毒学国家重点实验室, 武汉 430072

1 Southwest Jiaotong University Pharmacy College, 614202, China

2 China-UK NYNU-RRes Joint Lab of Insect Biology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China

3 State Key Lab of Virology, College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China

**摘 要** 使用同源重组方法, 在昆虫细胞内将多角体启动子驱动的 EGFP 表达盒插入杆状病毒穿梭载体 Bacmid 的 *p74* 位相, 经 5 轮空斑纯化获得重组穿梭载体 Bacmid-egfp。然后将 Bacmid-egfp 转化含转座助手质粒的 *E. coli* DH10B, 获得受体菌 *E. coli* DH10Bac-egfp, 由于 Bacmid-egfp 保留了完整的转座结构和  $\alpha$  互补功能, 因此该菌株和原始 *E. coli* DH10Bac 一样能有效的利用各种 pFastBac 系列的载体进行转座并构建出能指示病毒繁殖和目的基因表达的重组病毒。使用红色荧光蛋白 DsRed 对系统进行了验证, 结果表明重组病毒 Bac-egfp-DsRed 感染的细胞中绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白均得到了高效表达。进一步使用该系统在昆虫细胞中高效表达并纯化了 IL-6 蛋白, 为研究和应用该细胞因子提供物质基础, 同时也进一步证明所改造的杆状病毒表达系统的可靠性和实用性。

**关键词** Bac-to-Bac 系统, 位点特异性重组, 绿色荧光蛋白示踪, 白介素-6

中图分类号 Q782 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)04-0572-09

**Abstract** Based on site-specific transposition of an expression cassette into a baculovirus shuttle vector (Bacmid) which propagated in *Escherichia coli*, the Bac-to-Bac System provides a rapid and efficient method to generate recombinant baculoviruses and is widely used for high level expression of heterologous proteins. And the efficiency of recombinant baculovirus infecting cells plays an important role on the protein expression. In this study, we introduced an EGFP expression cassette driven by polyhedrin promoter into the *p74* locus of Bacmid by homologous recombination. The target Bacmid-egfp was then transformed into *E. coli* DH10B containing the transposition helper plasmid to gain a new transposition receipt strain *E. coli* DH10Bac-egfp. Because of the intact attTn7 sites and lacZ', target gene cloned in a pFastBac vector can be transposed into the Bacmid-egfp shutter vector to construct recombinant baculovirus, which would allow the tracing of the target protein expression and the recombinant Bacmid transfection or recombinant baculoviral infection under fluorescence microscopes. Recombinant virus Bac-egfp-DsRed was constructed by transposing DsRed into the Bacmid-egfp in *E. coli* DH10Bac-egfp, and the Sf9 cells infected with the recombinant virus expressed DsRed and EGFP efficiently. Another protein IL-6 fused with 6 × his tag was expressed and purified successfully from Sf9 cells infected with recombinant virus Bac-egfp-6 × his-IL6 constructed by the improved Bac-to-Bac system.

**Key words** Bac-to-Bac system, site-specific transposition, EGFP tracing, IL-6

Smith 等(1983)用苜蓿银纹夜蛾多粒包埋型核型多角体病毒(AcMNPV, *Autographa californica* multiple nucleocapsid nucleopolyhedrovirus)作载体在草地夜蛾细胞 Sf-21 中高效表达人  $\beta$ -干扰素的研究成果开拓了杆状病毒作为载体表达外源基因的新领域<sup>[1]</sup>。构建重组杆状病毒传统方法主要通过将携带外源基因的转移载体与野生型病毒 DNA 在昆虫细胞内同源重组与多轮空斑纯化筛选获得<sup>[2]</sup>。为了避免费时费力的重组病毒空斑纯化过程, Luckow 等(1993)发展了一种全新的杆状病毒表达系统即 Bac-to-Bac 系统,其本质上是 将 AcMNPV 基因组 DNA 改造成可在细菌内复制并能与供体质粒在细菌内发生转座且同时对昆虫细胞保留感染性的大型穿梭载体。其转座原理基于 Tn7 转座子的专一位点转座系统,它通过将杆状病毒 DNA 改造成可在大肠杆菌菌株中复制的 Bacmid 载体,即在杆状病毒基因组中含有可在大肠杆菌复制的 F 因子复制子,卡那霉素抗性基因, Tn7 转座接触位点以及 *lacZ'* 盒式结构,由于杆状病毒基因组为环状闭合双链 DNA 分子,因此这种 Bacmid 可以像质粒一样在大肠杆菌中以低拷贝形式复制。而在转移载体中外源基因位于多角体启动子的驱动下,两端分别为 Tn7 转座子的左、右端转座序列,当将重组转移载体转化到含有 Bacmid 的大肠杆菌中后,在辅助质粒提供的转座酶的介导下进行转座,将重组转移载体上含外源基因的表达盒式结构转座到 Bacmid 的 *lacZ'* 盒式结构中,破坏  $\alpha$  互补,因此重组病毒可以通过简单的蓝白斑方法筛选,从白色菌落中分离的重组病毒 DNA 直接转染昆虫细胞即可以获得有感染性的重组病毒。这种专一位点转座方法只需一步分离纯化和扩增重组病毒 DNA,病毒滴度就可达到  $10^7$  pfu/mL,全过程只需 7~10d,十分简单、迅速<sup>[3]</sup>。

由于表达外源蛋白的需要,杆状病毒基因组均缺失了多角体蛋白基因,使该系统失去天然的筛选标记,只能依靠病毒感染细胞后的病变来判断。无论是哪种方式构建的重组杆状病毒,在具体应用当中有一个缺陷就是病毒 DNA 转染细胞以及病毒感染昆虫细胞后的病变及空斑难以识别,无法正确判断感染的效率和蛋白表达情况,尤其对不熟悉病毒操作的研究者而言。因此在实际应用中如能让病毒带上一个容易识别且不影响外源基因表达的标记,则可以解决这一问题。

绿色荧光蛋白基因 *egfp* 是一个广泛使用的报告基因,它能在昆虫细胞中正常表达,并具有产生绿

色荧光的能力,因此它也被应用到杆状病毒表达系统中<sup>[4,5]</sup>。但以前的研究多是预先将 EGFP 表达盒构建到转移载体中,再通过转座与外源基因一起转座到穿梭载体,从而指示病毒的侵染及蛋白质的表达<sup>[7-9]</sup>,当使用携带不同标签转移载体时,需要重新改造,其使用范围具有局限性。本研究拟直接从穿梭载体 Bacmid 入手,将报告基因 *egfp* 通过同源重组策略整合到 Bacmid 的基因组中,再转化 *E. coli* 细胞成为一个完整的新型 Bac to Bac 系统,从而更加有效地指示重组 Bacmid 的转染效率、重组病毒的侵染及蛋白质的表达,适于各种通用转座载体。

白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6),又称  $\beta$ -干扰素 2,是一种具有多种生物活性的细胞因子,包括刺激细胞生长、促进细胞分化、加速肝细胞急性期蛋白的合成、抑制 M1 髓样白血病细胞系的生长,促进其成熟和分化以及抑制黑色素瘤、乳腺癌细胞生长<sup>[10,11]</sup>。现有临床研究表明,IL-6 在炎症发生中起重要作用,出现在炎症反应的全过程,被称为炎症活动的标记物<sup>[12,13]</sup>。人 IL-6 分子由 212 个氨基酸残基组成,包括 28 个氨基酸残基的信号序列,成熟 IL-6 为 184 氨基酸残基,分子量 26kD,具有 2 个潜在的 N-糖基化位点和 3 种潜在的磷酸化位点<sup>[14]</sup>。目前 IL-6 多集中于原核表达,未见在昆虫细胞内表达报道,鉴于 IL-6 的重要生理功能以及杆状病毒表达系统的高效表达与正确后加工能力,我们拟使用改进的 Bac-to-Bac 系统表达和纯化 IL-6,在验证本系统效率的同时,为进一步研究和应用该蛋白提供物质基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株、酶、试剂

大肠杆菌 *E. coli* DH10Bac(含 Bacmid 穿梭载体和转座助手质粒 pMon7124)及转座质粒 pFastBac I 和 pFastBACHTa 购自 GIBCO 公司,质粒 pGEM-egfp  $\Delta$ Ac74(AcMNPV 多角体启动子( $p^{polh}$ )驱动的 EGFP 表达盒插入导致载体中的 AcMNPV *p74* 基因失活)由姚伦广博士构建<sup>[15,16]</sup>,*E. coli* 菌株 DH10B、DH5 $\alpha$ 、TG1 由本室保存;质粒 pDsRed2-1 购自 Clontech 公司,pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。T4 DNA 连接酶、Taq 酶、限制性内切酶、RNase A 购自 Promega 公司;Lipofectin2000、Trizol RNA 抽提试剂、one-step RT-PCR kit 购自 Invitrogen 公司;其他的常规生化及分子生物学试剂均购自华美生物工程公司。

### 1.2 血清、培养基、细胞和病毒

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 Grace 培养

基购自 GIBCO 公司;其他常规生化及分子生物学试剂均购自华美生物工程公司。草地贪夜蛾昆虫细胞 Sf9 细胞由本室传代保存。用于提取 IL-6 mRNA 的正常人白细胞由西南交通大学医院血液化验中心提供。

### 1.3 引物设计和 PCR 以及 RT-PCR 扩增

为验证 Bacmid 中 *p74* 基因是否插入 EGFP 表达盒,设计扩增 AcMNPV *p74* 引物,PCR 产物大小约 1.9kb。上游引物序列( $F_{p74}$ ):5' ATGCGGTTTT AACAGCC 3';下游引物序列( $R_{p74}$ ):5' TCC AAGTAAATGATGAATCG 3'。PCR 程序按常规方法进行:95℃ 预变性 3min;然后进入循环:95℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min;共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。

根据已发表的人 IL-6 cDNA 序列(GI:15930148),使用 RT-PCR 方法,以正常人白细胞总 RNA 为模板扩增成熟肽对应的 IL-6 cDNA,PCR 产物约 570bp。白细胞总 RNA 提取采用 Trizol 抽提,一步法 RT-PCR 方法参考 Invitrogen 公司的 one-step RT-PCR 操作说明进行。

上游引物:AAggtatccGATGCCAGTACCCCCAGGA (下划线为 *Bam*HI 粗体为起始密码);

下游引物:AAgagggccgcCTACATTTGCCGAAGAGC (下划线为 *Not*I 粗体为终止密码)。一步法 RT-PCR 程序:45℃,反转录 15min,95℃,1min 预变性,接着进入 PCR 循环:95℃ 变性 30s,56℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min;共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10min。

### 1.4 重组质粒的构建

常规连接、转化及酶切分析按分子克隆实验指南进行<sup>[7]</sup>。将 RT-PCR 产物首先克隆到 pMD-18T 载体中,然后用 *Bam*HI 和 *Not*I 从重组 T 载体上切下该片段,克隆到 pFastBacHTa,使 IL-6 cDNA 与载体上的 6 × his 标签序列同框,获得重组转座载体 pFastBacHTa-IL6。pDsRed2-1 经 *Bam*HI 和 *Not*I 酶切,回收约 0.7kb 的红色荧光蛋白基因 *DsRed* 片段,克隆到转座载体 pFastBacI,得重组载体 pFastBacI-DsRed。

### 1.5 共转染与同源重组

LB 培养基振荡培养菌株 *E. coli* DH10Bac,从中提取约 135kb 的穿梭载体 Bacmid,将 Bacmid 与质粒 pGEM-egfp $\Delta$ Ac74 DNA 用 Lipofectin2000 共转染单层贴壁的 Sf9 细胞。二种质粒在 Sf9 细胞内利用 *p74* 基因序列进行同源重组,可获得在 *p74* 位相插入 EGFP 表达盒的重组穿梭载体 Bacmid-egfp(图 1)。4

~5d 后,在荧光显微镜下观察细胞是否有绿色荧光来判断转染及同源重组的发生,收集有绿色荧光的细胞上清,4℃ 保存备用。

### 1.6 空斑纯化

取上述转染上清液系列稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$  五个浓度梯度,重新感染六孔板中的 Sf9 单层贴壁细胞,病毒吸附 1~2h 后,吸去感染液,用 Grace 培养基洗 2 次,洗去游离的病毒粒子,用 42℃ 含 0.75% 琼脂糖的完全培养基覆盖,放 27℃ 培养,每天在荧光倒置显微镜下观察,待空斑形成后(产生彼此隔离的有绿色荧光的细胞团),用无菌牙签挑取几个分离完好的空斑至新鲜培养 Sf9 细胞中培养 4~5d 后收集细胞上清用于下一轮空斑纯化,如此重复进行五轮空斑纯化,在第三轮时,提取感染细胞总 DNA,用 AcMNPV *p74* 基因特异性引物进行 PCR 检测其纯化效果,将纯化的空斑再进行两轮空斑纯化,提取第五轮空斑感染细胞的总 DNA,保存备用。

### 1.7 转化 *E. coli* DH10B 感受态细胞

用电转化法将从上述第 5 轮感染细胞中提取的总 DNA(其中含 Bacmid-egfp DNA)转化 *E. coli* DH10B 感受态细胞,在含 Kan<sup>r</sup>/X-gal/IPTG 的 LB 固体平板上挑取蓝色单菌落,将菌种保存备用,再将回收的助手质粒 pMon7124 转化含重组质粒 Bacmid-egfp 的 *E. coli* DH10B 感受态细胞,在含 Kan<sup>r</sup>/Tet<sup>r</sup>/X-gal/IPTG 的 LB 固体平板上挑取蓝色单菌落,提取其质粒,用 AcMNPV *p74* 基因引物进行 PCR 检测后,将阳性菌株命名为 *E. coli* DH10Bac-egfp。

### 1.8 转座与转染

为检验 Bacmid-egfp DNA 对 Sf9 细胞的感染性,将 Bacmid-egfp DNA 用 Lipofectin2000 转染 Sf9 细胞,观察细胞中的绿色荧光产生情况来判断 Bacmid-egfp 的改造是否正确。

同时,为检验 *E. coli* DH10Bac-egfp 菌株的转座效率和外源基因表达情况,将另一荧光报道基因 *DsRed* 克隆到转座质粒 pFastBacI 中,构建得到重组质粒 pFastBacI-DsRed。然后按 Bac-to-Bac 操作手册构建和 PCR 鉴定重组病毒。其过程简述如下:首先将重组转座质粒 pFastBacI-DsRed 转化至受体菌 *E. coli* DH10Bac-egfp 感受态细胞中,将转化子涂布于 Kan<sup>r</sup>/Gm<sup>r</sup>/Tet<sup>r</sup>/X-gal/IPTG LB 固体平板上,48h 后待平板完全显色后挑取白色单菌落数个,将这些白色菌落于 Kan<sup>r</sup>/Gm<sup>r</sup>/Tet<sup>r</sup>/X-gal/IPTG LB 固体平板上划线再培养,48h 后挑选出完全纯白的培养物在含

上述 3 种抗生素的液体培养基中进行扩大培养。由于重组 Bacmid 基因组达 135kb,难以使用限制性酶切分析,因此用 M13 通用引物进行 PCR 鉴定,因为 Bacmid 包含 M13(-40)正向引物位点和 M13 反向引物(47)位点,它们位于 mini-attTn7 位点两侧。最后提取重组 Bacmid-egfp-DsRed DNA,用 pUC M13 通用引物进行 PCR 鉴定后,再转染 Sf9 细胞即可获得重组病毒 Bacmid-egfp-DsRed。采取相同方式将重组质粒 pFastBacHTA-IL6 进行转座和筛选,可获得表达 N 端融合 6×his 标签的 IL-6 蛋白的重组病毒 Bac-egfp-6×his-IL6。

### 1.9 荧光观察与流式细胞仪分析

重组病毒感染后的 Sf9 细胞直接置于倒置荧光显微镜 OLYMPUS IX-70 下观察,紫外激发(488nm)观察 EGFP,红外激发(558nm)观察 DsRed。使用 Calibur 流式细胞仪(FACS)分析所感染细胞中红色细胞和绿色细胞的比例,将重组病毒 Bac-gfp-DsRed 感染 72h 后的 Sf9 细胞用流式细胞仪进行荧光分析,其中 EGFP 的激发波长 488nm,发射波长 507nm, DsRed 激发波长 558nm,发射波长为 583nm。

### 1.10 SDS-PAGE、Western blot 和 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和树脂纯化靶蛋白

以 moi(感染复数)为 1 的剂量用重组病毒 Bac-egfp-6×his-IL6 感染 Sf9 细胞,感染 48~72h 后,用倒置荧光显微镜观察细胞发光情况,待 90% 以上细胞变成绿色细胞时,即可以收获细胞。1000r/min 离心收集细胞并用悬浮液悬浮细胞,加等体积上样缓冲液混匀,沸水煮 5min,取 10 $\mu$ L 上清作 12% SDS-PAGE。电转移法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,使用辣根过氧化物酶偶联的抗组氨酸标签单克隆鼠抗和 TMB 显色进行 Western blot 检测。

克隆到表达载体 pFastBac HT 的靶蛋白 N 端会融合 6 个组氨酸亲和标签,该组氨酸标签对镍离子具有很高的亲和力,使得所表达的蛋白容易被 Ni<sup>2+</sup>-NTA 亲和树脂纯化。感染重组病毒合适时间后,收集 Sf9 细胞,每克细胞沉淀用 5 倍预冷的裂解缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH 8.5, 5mmol/L 2-巯基乙醇, 100mmol/L KCl, 1mmol/L PMSF, 1% NP-40, 4 $^{\circ}$ C)重悬,颠倒试管数分钟或者超声波破碎让细胞。10000 g, 10min, 去细胞碎片,上清转移到另一个新离心管,此后的 Ni<sup>2+</sup>-NTA 树脂纯化目的蛋白的过程请参考厂家提供的 Ni<sup>2+</sup>-NTA 树脂纯化试剂盒说明进行。

## 2 结果

### 2.1 IL-6 的扩增及重组质粒的构建

以正常人白细胞总 RNA 为模板,RT-PCR 产物经电泳检测大小为 0.6kb,将该片段回收后直接克隆到 pMD18-T 载体中,经测序验证正确。然后用 BamHI 和 NotI 从重组 T 载体上切下该片段,克隆到 pFastBacHTA,使 IL-6 cDNA 与载体上的 6×his 标签同框,获得重组转座载体 pFastBacHTA-IL6,经 BamHI 和 NotI 双酶切酶切分析该重组载体构建正确。

用 BamHI 和 NotI 酶切 pDsRed2-1,回收约 0.7kb 的红色荧光基因 DsRed 片段,克隆到转座载体 pFastBacI,获得重组转座载体 pFastBacI-DsRed(图略)。

### 2.2 携带 EGFP 表达单元的 Bacmid-egfp 的构建与鉴定

pGEM-egfp $\Delta$ Ac74 在 AcMNPV p74 ORF 的 ATG 下游 +68 核苷酸位点插入由多角体启动子(p<sup>polh</sup>)驱动的 EGFP 表达盒使 p74 基因插入失活。将 pGEM-egfp $\Delta$ Ac74 和 Bacmid 共转染 Sf9 细胞后,在 p74 位相发生同源重组,将整个 EGFP 表达单元重组到 Bacmid 基因组中,即可得到表达绿色荧光蛋白的重组穿梭质粒 Bacmid-egfp(图 1-A)。而 Bacmid-egfp 在敏感宿主细胞中进一步包装成具有感染性的病毒粒子,由于可以挑取绿色空斑进行纯化,使得纯化重组 Bacmid-egfp 病毒变得相对简单。

通过同源重组产生的重组 Bacmid-egfp 在 3 轮空斑纯化后,已经能得到非常纯净和明显的绿色空斑(图 1-B、C、D)。为了排除野生型 Bacmid 的干扰,从第 3 轮空斑纯化的 Sf9 细胞提取总 DNA,以 AcMNPV p74 特异性引物进行 PCR,结果表明,3 轮空斑纯化后的样品只扩增出一条 2.8kb(1.9kb p74 + 0.2kb p<sup>polh</sup> + 0.7kb egfp)的片段(图 1-E, lane 3),表明样品中只有重组 Bacmid-egfp 病毒,已没有亲本 Bacmid,而第一轮 PCR 产物除 2.8kb 的目的带,还额外有一条从亲本 Bacmid 扩增出来的 1.9kb 片段(图 1-E, lane 2),这表明携带 EGFP 表达单元已经成功插入 Bacmid 中并在第 3 轮空斑纯化后淘汰掉亲本病毒,从而证明重组 Bacmid-egfp 构建成功,该重组病毒能有效指示病毒的繁殖和多角体启动子的活性。为了保证获得基因型完全一致的重组 Bacmid-egfp,重组病毒经 5 轮空斑纯化后再提取绿色细胞总 DNA 转化 *E. coli* DH10B,以获得新型的穿梭载体。

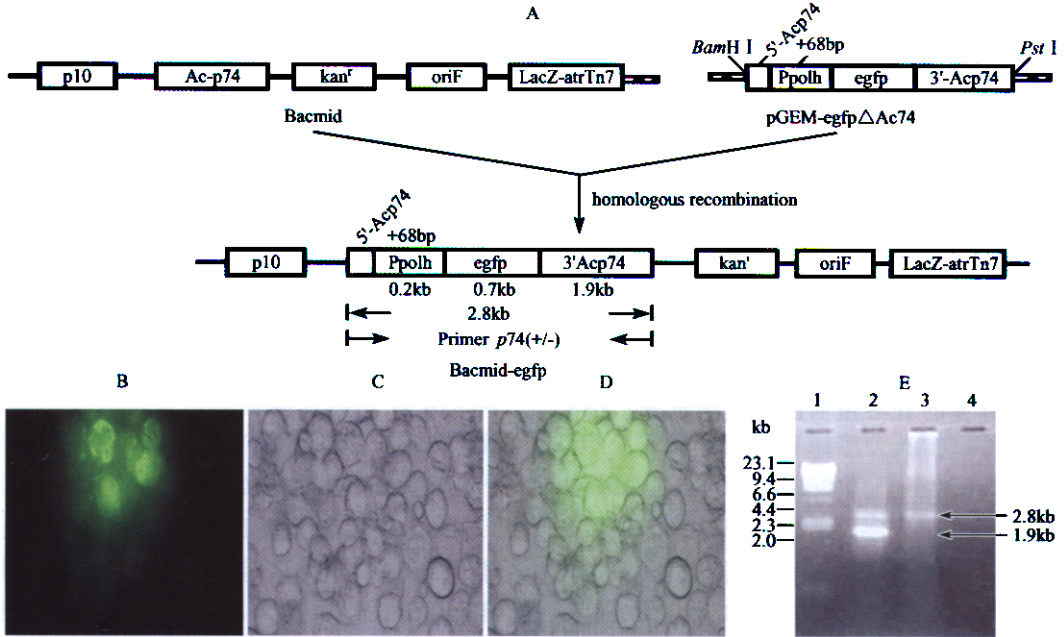


图1 Bacmid-egfp 的构建、空斑纯化与 PCR 鉴定

Fig.1 Construction, plaque purification and PCR identification of Bacmid-egfp

A: the scheme of the construction of bacmid-egfp; B, C, D: A green plaque formed by Bacmid-egfp infecting Sf9 cells at the third round of plaque purification. B, green Sf9 cells in dark-field; C, the same Sf9 cells in bright-field; D, Merge of the two fields; E: Identification of Bacmid-egfp by PCR using the *p74* specific primers. 1: λDNA/*Hind* III marker; 2: PCR fragments from Sf9 cells DNA templates of the first round of green plaque; 3: PCR fragments from Sf9 cells DNA templates of the third round of green plaque; 4: PCR fragments from normal Sf9 cells DNA templates.

### 2.3 *E. coli* DH10Bac-egfp 菌株的构建与鉴定

从第5轮空斑纯化的 Sf9 细胞提取总 DNA, 用电转化法转化 *E. coli* DH10B 感受态细胞, 在含 Kan'/X-gal/IPTG 的 LB 固体平板上挑取蓝色单菌落, 即得到含重组 Bacmid-egfp 的菌株; 再将回收的助手质粒 pMon7124 转化含重组质粒 Bacmid-egfp 的 *E. coli* DH10B 感受态细胞, 在含 Kan'/Tet'/X-gal/IPTG 的 LB 固体平板上挑取蓝色单菌落, 从中提取质粒 DNA, 用 AcMNPV *p74* 特异性引物进行 PCR 检测, 结果只扩增出一条 2.8kb 的目标带 (图 2, lane 4), 而以亲本 Bacmid 为模板则只扩增出 1.9kb 的 *p74* ORF 片段 (图 2, lane 3), 以助手质粒 pMon7124 为模板则没有产物 (图 2, lane 2); 综合上述的抗性选择及报告基因标记, 表明 *E. coli* DH10Bac-egfp 菌株构建正确。

### 2.4 Bacmid-egfp 对 Sf9 细胞感染性的检测

从 *E. coli* DH10Bac-egfp 中提取 Bacmid-egfp DNA, 用 Lipofectin 2000 转染 Sf9 细胞后 72h, 在荧光显微镜下可以观察到 70% 细胞都发出绿色荧光。病毒滴度分析表明 Bacmid-egfp 毒力达到  $10^7$  pfu/mL, 和野生型 Bacmid 基本一致。表明从 *E. coli* 来源的 Bacmid-egfp DNA 仍然保持着对 Sf9 细胞的感染性, 同时也进一步证明了 *E. coli* DH10Bac-egfp 菌株构

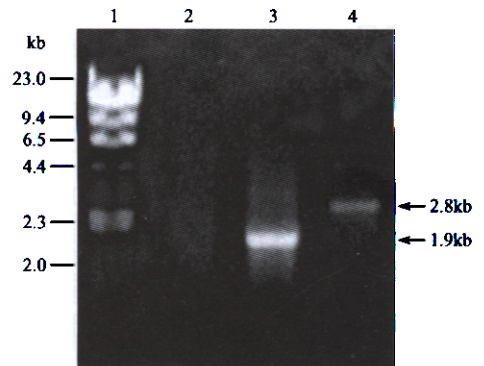


图2 *E. coli* DH10Bac-egfp 鉴定

Fig. 2 Identification of *E. coli* DH10Bac-egfp by PCR using the *p74* specific primers

1: λDNA/*Hind* III marker; 2: PCR products from pMON7124 DNA templates; 3: PCR products from Bacmid-egfp DNA templates; 4: PCR products from Bacmid DNA templates.

建正确。

### 2.5 重组病毒 Bac-egfp-DsRed 的构建与红色荧光蛋白在昆虫细胞中的表达

为了验证 *E. coli* DH10Bac-egfp 菌株的转座效率和外源基因表达情况, 除了受体菌使用 *E. coli* DH10Bac-egfp 菌株外, 均按照 Bac-to-Bac 标准操作构建重组病毒 Bac-egfp-DsRed (图 3-A)。用该重组病毒感染 Sf9 细胞, 荧光显微镜观察表明, 当 moi = 1 时, 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

感染 72h 后,所有的细胞在紫外激发下均为绿色,而同一视野细胞在红外激发下均为红色,明视野中该细胞出现明显病变,部分细胞开始裂解(图 3-B、C、D)。而流式细胞仪分析结果表明,感染后 72h,被检测细胞中有 93.2% 为绿色细胞,而同一样品细胞中有 92.4% 为红色细胞,这说明被感染细胞中绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白均得到了高效表达。流式细胞分析图中出现 2 种主峰是因为感染病毒 72h 后的细胞形态大小出现变化而变得不均一所导致的结果。两种荧光蛋白的同时高效表达也说明了在 Bacmid *p74* 位相中引入多角体启动子驱动的 EGFP 表达盒不仅能指示病毒的繁殖,还能指示外源蛋白

的表达情况,由于使用的是同一启动子,在理论上 EGFP 的表达情况能够反应目的蛋白的表达情况。由于 *p74* 基因距离多角体基因(即转座位置)有 18kb 距离,事实上这两个多角体启动子不会相互干扰。

以上的实验充分证明新型 Bacmid-egfp 有效地通过位点特异性转座构建重组穿梭表达载体,以此系统构建的重组表达载体能够在 Sf9 细胞中成功地表达外源蛋白,并且表达的外源蛋白具有其特有的生物功能;同时也表明新型 Bacmid-egfp 能通过其自身的绿色荧光标记有效直观地指示病毒对细胞的感染及目的基因表达的指示作用,克服了传统 Bacmid 的不足。

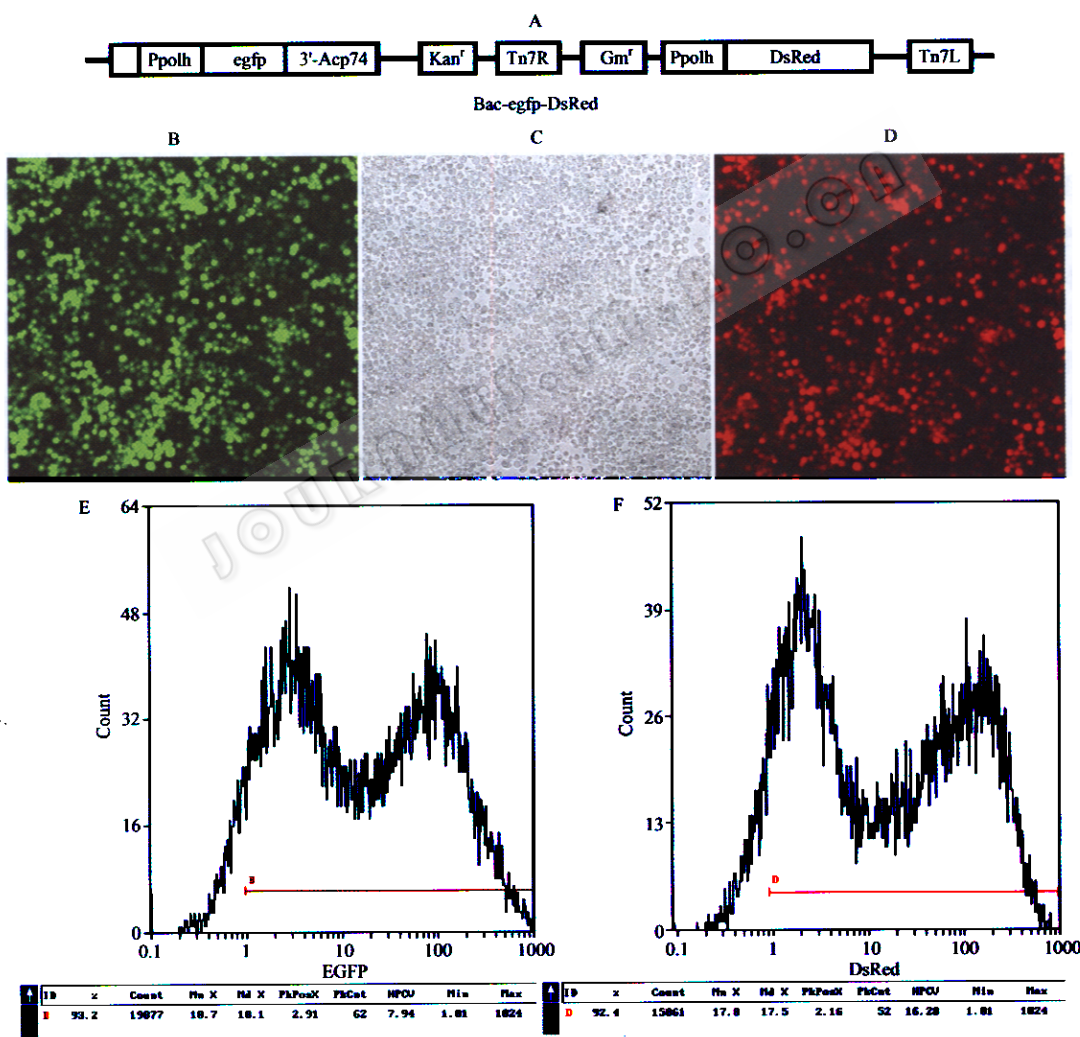


图 3 重组病毒 Bac-egfp-DsRed 感染 Sf9 细胞 72h 后的荧光观察与 FACS 分析

Fig. 3 Fluorescence analysis of Sf9 cells infected with recombinant virus Bac-egfp-DsRed (72h. p. i.) using fluoresce microscopy and FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter)

A: Structure of recombinant virus Bac-egfp-DsRed; B, C, D: Observation of fluorescence expression of Sf9 cells 72h p. i.; B, green Sf9 cells in dark-field; C: the same Sf9 cells in bright-field; D: Red Sf9 cells in dark-field; E: Proportion of EGFP-expressing Sf9 cells analyzed by FACS; F: Proportion of DsRed-expressing Sf9 cells analyzed by FACS.

## 2.6 重组病毒 Bac-egfp-6 × his-IL6 的构建及 IL-6 蛋白的表达与纯化

目前表达重组蛋白都会在 N 端或者 C 段融合一段有利于进行纯化的标签,而 Bacmid-egfp 所表达的指示 GFP 不带有任何标签,这样有利于其他目的蛋白利用亲和标签进行纯化。鉴于 IL-6 蛋白的重要功能,也为了进一步验证所构建的系统表达效率,因此构建了能表达融合 6 × his 标签的 IL-6 的重组病毒 Bac-egfp-6 × his-IL6 (图 4-A)。以从转座成功的白斑菌落中抽提的大质粒为模板,经过 IL-6 基因特异性引物进行 PCR 能扩增出 570kb 左右的目的带,与阳性对照一致(图 4-B)。使用 M13 通用引物进行 PCR 时重组 Bacmid 的产物应该为 2.3kb 加上外源片段大小(0.6kb)之和,电泳结果表明能扩增出约 2.9kb 的目的带,而以未转座的 Bacmid-egfp 为模板,PCR 产物大小为 300bp 的片段,电泳结果与预期结果一致(图 4-C)。以 2 种 PCR 结果相互验证,均表明重组 Bac-egfp-6 × his-IL6 构建成功。

48h 与 72h 后均出现特异性 26kD 左右的蛋白带,与预期的 IL-6 分子量大小接近(图 5-A)。而 Western blot 结果表明 6 × his 的单克隆抗体能与该带特异性反应,进一步表明表达的目的蛋白为预期的 IL-6 蛋白。SDS-PAGE 分析 Bac-egfp-6His-IL6 感染 Sf9 细胞 48h 和 72h 后的  $\text{Ni}^{++}$ -NTA 纯化产物均出现单一的 26kD 目的带(图 5-B)。同样 Western blot 结果表明 6 × His 的单克隆抗体能与该 26kD 带进行特异性反应,进一步证明纯化的目的蛋白为预期的 IL-6 蛋白(图 5-C)。

## 3 讨论

除了高效的强启动子驱动外源基因表达和生物安全性外,杆状病毒还是一种出芽型分泌性病毒粒子,在感染细胞后能迅速在培养细胞中水平传播而保持细胞在相当长的时间内不裂解,从而最大限度地保持了外源蛋白的稳定,这是其他动物病毒载体如腺病毒载体所不可相比之处。因此杆状病毒表达

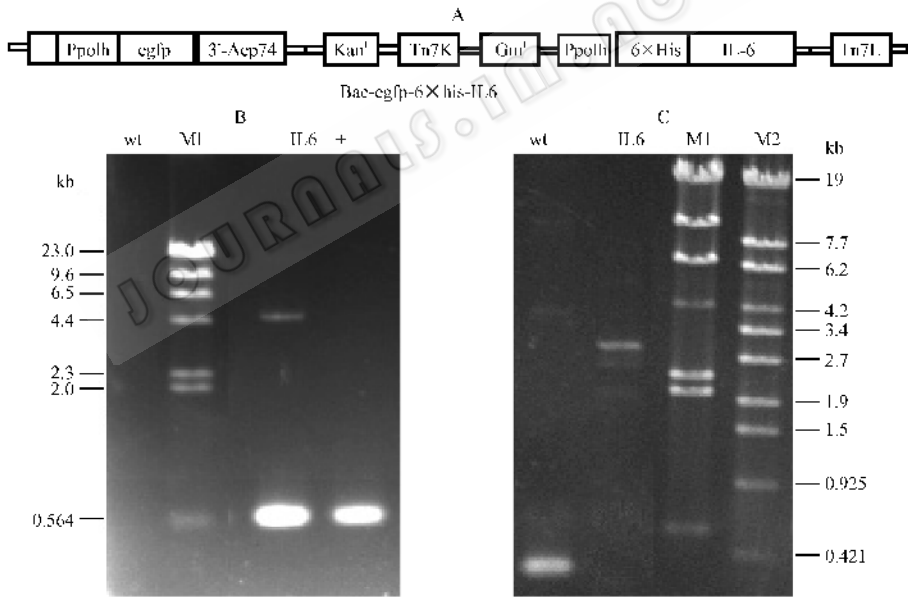


图 4 重组病毒 Bac-egfp-6 × his-IL6 的构建与 PCR 鉴定

Fig. 4 Construction and PCR Identification of recombinant virus Bac-egfp-6 × his-IL6

A : structure of Bac-egfp-6 × his-IL6 ; B : PCR Identification of Bac-egfp-6 × his-IL6 using the *il-6* specific primers ; C : PCR Identification of Bac-egfp-6 × his-IL6 using M13 primers ; wt : PCR products from Bacmid-egfp DNA templates ; IL6 : PCR products from Bac-egfp-6 × his-IL6 DNA templates ; + : PCR products from pFastBacHTa-IL6 ; M1 :  $\lambda$ DNA/*Hind*III marker ; M2 :  $\lambda$ DNA/*Eco*T14 I marker.

重组病毒 Bac-egfp-6 × his-IL6 病毒感染 Sf9 细胞 (moi = 1) 在荧光显微镜下进行观察,48h 后观察到 80% 细胞变绿,到 72h 近 95% 细胞为绿色,收集细胞并用  $\text{Ni}^{++}$  纯化目标蛋白。细胞裂解物总蛋白 SDS-PAGE 结果表明,与野生型 Bacmid-egfp 感染的细胞及正常细胞相比,Bac-egfp-6 × his-IL6 感染 Sf9 细胞

系统成了表达真核基因所首选的病毒表达系统。而 Bac-to-Bac 系统是目前操作最简单、自主、方便和快速的重组杆状病毒构建方法。虽然可以通过观察细胞形态变化来判断病毒 DNA 转染与病毒粒子感染细胞的效率,但是在实际操作过程中判断的准确度和标准往往难以准确把握,因此通过直观的标记来

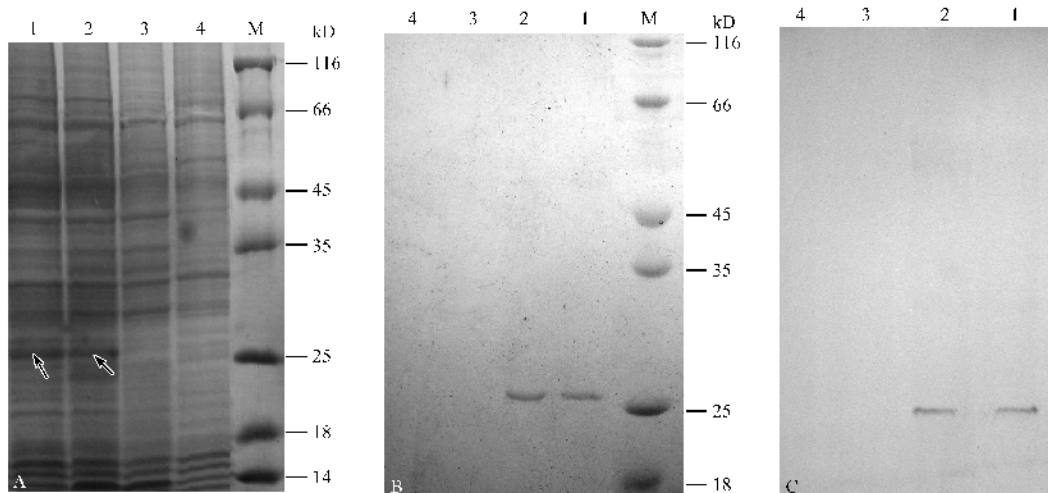


图5 Sf9 细胞中表达与纯化的 IL6 蛋白的 SDS-PAGE、Western blot 分析

Fig.5 SDS-PAGE, western blot analysis of the purification and expression of IL-6 in Sf9 cells infected with Bac-egfp-6 his-IL6

A : SDS-PAGE analysis of total proteins in Sf9 cells 72h. p. i. ; B : SDS-PAGE analysis of purified proteins using  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA chromatography ; C : Western blot analysis of the purified proteins ; 1 : Bac-egfp-6 his-IL6- infected Sf9 cells 48h. p. i. ; 2 : Bac-egfp-6 his-IL6- infected Sf9 cells 72h. p. i. ; 3 : Bacmid-egfp-infected Sf9 cells 72h. p. i. ; 4 : mock-infected Sf9 cells.

检测病毒和蛋白的表达就显得特别重要和实用。目前使用的标记包括 LacZ 和 EGFP 两种,前者需要 X-gal 底物显色,只能定性地判断细胞是否被感染,无法指示单个细胞的感染情况;后者需要借助倒置荧光显微镜,更加直观方便,可以指示单个细胞具体情况并可以进行初步荧光定量。鉴于目前倒置荧光显微镜在国内实验室比较普及,因此多选取 EGFP 作为标记。Bjo'm Philipps 等将由基本启动子(pBasic)驱动的 EGFP 表达盒克隆到转座载体 pFastbac 中,其方向与原有的多角体启动子相反,这样方便克隆目的基因到多克隆位点,再通过转座的方式将 2 个表达单元一起转移到 Bacmid 中,这样重组病毒既能表达荧光蛋白也能表达目的基因,而亲本病毒则没有荧光表达,这样相当于一种正向选择标记<sup>[8]</sup>。而另一研究者 Ying-Ju Chen 则构建出双顺反子转移载体,则将来源于能感染鳞翅目昆虫的细小病毒(Rhopalosiphum padi virus, RhPV)的 IRES(内部核糖体进入位点)片段与 egfp 片段(即 IRES + egfp)一起克隆转移载体的多克隆位点下游,这样克隆的目的基因处于上述结构(IRES + egfp)的上游,受同一个多角体启动子控制。重组病毒感染细胞后,多角体启动子转录出包含目的基因、IRES 以及 egfp 与 polyA 的一个大转录本,由于 IRES 可以吸引核糖体进入同时翻译出 EFGP,因此这种重组病毒可以在昆虫细胞内同时翻译出目的多肽和绿色荧光标记蛋白,而未重组病毒则无荧光指示<sup>[9]</sup>。这 2 种方法都对转移载体进行了巧妙的改造,使得重组病毒和非

重组病毒能够通过荧光直接进行分辨和检测。由于转移载体是我们克隆目的基因的入门载体,如果我们使用携带不同标签的载体,则每种载体必须进行上述改造,显得麻烦费事。此外由于克隆了多达 1.5kb 左右的表达盒式结构,使得原始载体上的某些酶切位点难以使用,同时进一步增加了载体自身的大小,这样限制了克隆外源片段的容量,难以在同一载体中克隆更多的外源基因。其实杆状病毒还有一个极大的用途就是进行多基因的表达尤其是各种复合体的表达,Imre Berger 等通过对 Bac-Bac 系统的转移载体进行改造,使得一个载体可以同时克隆 4-8 个基因,首次在昆虫细胞内表达 5 个亚基复合物 TF II D,因此在表达复合物时,转移载体的容量变得十分关键<sup>[15]</sup>。因此我们直接改造 Bacmid,在其 p74 位相引入 EGFP 表达盒,而不破坏原有的转座单元,这样可以方便地使用我们原有的通用载体来表达重组蛋白。因为 p74 基因是杆状病毒口服感染宿主幼虫的关键基因,该基因的失活更加有利于生物安全性<sup>[15,16]</sup>。由于引入 p74 位相的多角体启动子与转座位点相距较远,两个多角体启动子不会出现相互干扰,从而 EGFP 的表达既能检测病毒的繁殖也能指示目的蛋白表达情况。而成功表达和纯化 IL-6 蛋白也证明了这一点,绿色荧光标记蛋白的表达没有干扰目的蛋白的表达和纯化。

稍嫌不足的是本研究构建的 Bacmid-egfp 在通过转座后获得的重组病毒和亲本病毒都能使被感染细胞表达绿色荧光蛋白,未能起到类似正向筛选的



效果。然而通过严格的抗性和蓝白斑筛选后,再经过目的基因特异性引物和 M13 通用引物 PCR 验证后,完全可以彻底淘汰掉亲本病毒的污染。此外,在对基因进行亚细胞定位研究中,研究者经常将目标基因与 *egfp* 融合,然后利用激光共聚焦显微镜观察融合蛋白在细胞内表达和分布情况进行定位分析,由于本研究在 Bacmid 中引入了 EGFP,不能使用 EGFP 构建融合蛋白进行目标蛋白的定位。另一红色荧光蛋白 DsRed 在细胞内极易相成四聚体,因此野生型 DsRed 不合适作为基因亚细胞定位的标记。然 Shaner 等近来通过对 DsRed 的不断研究,利用饱和和突变技术,已经得到了橙黄、樱桃红、草莓红等 3 种不同颜色的突变体,这些荧光蛋白在细胞内不形成四聚体而以单体的形式存在<sup>[19]</sup>。因此可以用上述 DsRed 的突变体基因与目的基因融合,再使用本系统构建重组病毒。由于 EGFP 在细胞内呈弥散型分布,这样给整个细胞提供了一个绿色大背景,再观察与融合了目的基因的 DsRed 突变体荧光蛋白的分布将会变得更加方便和直观,也一定会得到许多有意思的结果。鉴于 IL-6 的多生物活性及其在炎症信号通路中的重要功能,在利用本研究系统获得纯化的 IL-6 蛋白后,将进一步使用该蛋白的特异性抗体进行检测与验证其生物活性,以及利用质谱分析该蛋白在昆虫细胞内的糖基化和磷酸化程度,为研究其生物活性和相关功能提供新思路。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol*, 1983, **3**(12): 2156 - 2165
- [ 2 ] Kitts PA, Possee RD. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques*, 1993, **14**(5): 810 - 817
- [ 3 ] Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol*, 1993, **67**(8): 4566 - 4579
- [ 4 ] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, **263**(11): 802 - 805
- [ 5 ] Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence. *Nature*, 1995, **373**(23): 663 - 664
- [ 6 ] Wu C, Liu H, Crossen R, Gruenwald S, Singh S. Novel green fluorescent protein (GFP) baculovirus expression vectors. *Gene*, 1997, **190**(1): 157 - 162
- [ 7 ] Yiftach Finkelstein, Ouriel Faktorb, Orna Elroy-Stein *et al.* The use of bi-cistronic transfer vectors for the baculovirus expression system. *Journal of Biotechnology*, 1999, **75**: 33 - 44
- [ 8 ] Bjo m Philipps, Daniel Rotmann, Micha Wicki *et al.* Time reduction and process optimization of the baculovirus expression system for more efficient recombinant protein production in insect cells. *Protein Expression and Purification*, 2005, **42**: 211 - 218
- [ 9 ] Ying-Ju Chen, Wein-Shue Chen, Tzong-Yuan Wu. Development of a bi-cistronic baculovirus expression vector by the *Rhopalosiphum padi* virus 5' internal ribosome entry site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, **335**(2): 616 - 623
- [ 10 ] Kishimoto T, Hirano T. A new interleukin with pleiotropic activities. *BioEssays*, 1988, **9**: 11 - 15
- [ 11 ] Metcalf D. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science*, 1985, **229**: 16 - 22
- [ 12 ] Danielsson P, Truedsson L, Eriksson KF, Norgren L. Inflammatory markers and IL-6 polymorphism in peripheral arterial disease with and without diabetes mellitus. *Vasc Med*, 2005, **10**(3): 191 - 198
- [ 13 ] Denaro L, Di Rocco F, Gessi M, Lauriola L *et al.* Pyrogenic cytokine interleukin-6 expression by a chordoid meningioma in an adult with a systemic inflammatory syndrome. *J Neurosurg.* 2005, **103**(3): 555 - 558
- [ 14 ] Rechard J, Simpson, Annet Hammacher, Dvid K Smith *et al.* Interleukin-6: Structure-function relationships. *Protein Science*, 1997, **6**: 929 - 955
- [ 15 ] Yao LG, Zhou WK, Xu H *et al.* The heliothis armigera single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus envelope protein P74 is required for infection of the host midgut. *Virus Res*, 2004, **104**(2): 111 - 121
- [ 16 ] Zhou WK, Yao LG, Xu H *et al.* The function of envelope protein P74 from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in primary infection to host. *Virus Genes*, 2005, **30**: 139 - 150
- [ 17 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniates T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998
- [ 18 ] Inre Berger, Daniel J Fitzgerald, Timothy J Richmond. Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nature Biotechnology*, 2004, **12**: 1583 - 1587
- [ 19 ] Shaner NCShaner NC, Campbell RE *et al.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 2004, **22**(12): 1567 - 1572