

含有昆虫杆状病毒多角体蛋白基因的转运质粒的构建

蒋明浩* 杨冠珍 李敏棠 干科达** 忻纪厚

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

为了利用苜蓿尺蠖核多角体病毒作为表达外源基因的运载体, 我们将含有该病毒多角体蛋白基因的EcoR I I片段克隆在大肠杆菌质粒 pBR325 中。并对这一片段进行改建, 构建两个可以将外源基因置于多角体蛋白基因启动子控制下的表达质粒。

关键词 核多角体病毒; 表达质粒

杆状病毒可以作为外源基因在昆虫细胞内扩增和表达的运载体^[1,2]。昆虫杆状病毒基因组较大, 约100—150kb, 具有很多限制酶切位点, 因而对它们的基因组直接进行DNA重组操作有困难。Mocarski^[3]等人发展了一种将外源DNA引入复杂病毒基因组的方法。其原理是首先克隆一个病毒DNA片段, 然后对这个片段进行所需要的改建。改建后的DNA片段和病毒DNA一起共转化细胞, 通过体内重组将它引入到完整的病毒DNA中。

本文报道克隆含有一种昆虫杆状病毒——苜蓿尺蠖核多角体病毒 (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, 简称AcNPV) 多角体蛋白基因的DNA片段, 将其插入大肠杆菌质粒 pBR325 中, 并将其改建成可以将外源基因置于该基因启动子指导下的表达质粒的结果。

材料和方法

(一) 材料

1. 病毒和细胞株: 实验所用病毒为西德科隆大学遗传研究所 Doerfler W. 教授实验室分离的AcNPV E-2株^[4]。病毒繁殖用秋粘虫细胞株 (*Spodoptera frugi-*

perda) IPLB-SF-21。

2. 质粒和菌株: 质粒 pWR13, 其受体菌 *E. coli* JM83^[5] 由中国科学院上海细胞生物学研究所郭礼和教授惠赠。质粒 pUC9 和其受体菌 *E. coli* JM103^[6] 由BRL公司购得。质粒 pBR325 由 Bolivar^[7] 实验室构建。质粒 pV36 由 Summers 教授赠送^[8]。

3. 培养基: L- 培养基每升含蛋白胨 10g (Daigo 产品), 酵母粉 5g (Difco 产品) 和氯化钠 10g, pH7.5。L- 固体培养基同 L- 培养基, 另加 15g/L 琼脂粉。含抗菌素的筛选用培养基, 同 L- 培养基,

本文于1987年4月18日收到。

中国科学院科学基金资助课题。

* 目前通讯地址: 上海医药工业研究院生化药物研究室。

**目前通讯地址: 中国科学院上海生物工程实验基地。

W. Doerfler 教授、郭礼和教授、李毅平教授和周光宇教授提供部分实验材料; 汪音文同志参加昆虫细胞培养工作, 在此一并致谢。

本文所用缩写符号:

B, BamH I; E, EcoR I; H, Hind III; K, Kpn I; P, Pst I; S, Sal I; Sm, Sma I; X, Xho I; Z, lacZ 大肠杆菌半乳糖苷酶基因 Ap, 氨苄基青霉素抗性基因, Cm, 氯霉素抗性基因, Tc, 四环素抗性基因, Ph, 病毒多角体蛋白基因, N, T, V, ph 基因上 Hind III 酶解所成各片段的符号, LMT Agarose, 低熔点琼脂糖电泳胶, DE-81, DE-81 纤维素纸

再分别另加抗菌素至最终浓度为氨苄青霉素(Amp)100 μ g/ml, 氯霉素 50 μ g/ml和四环素 50 μ g/ml。上述各抗菌素分别为上海第四制药厂, 上海医药公司及上海第三制药厂产品。

4. 酶及化学试剂: DNA 聚合酶 I 及其Klenow大片段为 Boehringer 产品; 牛胰RNase A和DNase I 为Sigma 产品; 限制酶Kpn I 购自BRL公司。其余限制酶和T4 DNA连接酶由本研究所李载平教授实验组提供。 β -半乳糖苷酶底物 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖呋喃型糖苷(X-gal) 和其诱导物异丙基硫代半乳糖苷(IPTG) 为Sigma产品。低熔点琼脂糖为BRL 产品。硝基纤维素膜为 SchleicherD Schill产品。

(二) 实验方法

1. DNA 离体重组和质粒转化: 按已发表的方法略加修改^[9]。从所需表型的抗菌素平板上筛选的转化子菌落, 一般用简化法制备质粒DNA样品, 只需5ml质粒菌培养液(37 $^{\circ}$ C培养过夜)。离心取菌体, 将菌体悬浮在 GTE 缓冲液中(50mmol/L glucose-25 mmol/L Tris-HCl-10mmol/L EDTA, pH8.0)。用终浓度为2 μ g/ml的溶菌酶和1%SDS—0.2mol/L NaOH 混合液破碎菌体后, 加入等体积的 3 mol/L KAc (pH4.8) 混匀, 0 $^{\circ}$ C放置 30min。离心取上清, 加等体积异丙醇沉淀。DNA样品悬浮于TE缓冲液(10mmol/L Tris-1 mmol/L EDTA pH7.5)。取一定量作琼脂糖凝胶电泳分析(0.7%), 通过比较质粒 DNA 分子量大小来确定是否有外源 DNA 片段插入。若重组质粒 DNA 需作进一步的限制酶图谱分析, 则按Birnboim和 Doly 方法制备^[10]。限制酶酶解条件及琼脂糖凝胶电泳条件, 按照Maniatis实验手册^[11]。

2. DNA片段回收: 用 DE-81 纸片法^[12]或低熔点琼脂糖凝胶电泳法^[5]。

3. AcNPV的细胞培养及其DNA 的制备: 同前文^[13]。

4. DNA缺口翻译标记: 按Risby等人方法^[18]。反应中用一个 α -³²P-ATP标记物。DNA Southern 转移和杂交分别按Southern 等人^[14]和Gergen^[15]等人的方法进行。

结果与讨论

(一) 完整多角体蛋白基因的分离和克隆

限制性内切酶EcoRI切割 AcNPV E-2 株DNA成24个片段^[14](图版 I-A)。Summers等人的实验证明, 多角体蛋白基因位于 EcoRI I 片段中^[16]。因此, 我们首先将 AcNPV 的 EcoRI I 片段克隆在质粒 pBR325 的 EcoR I 位点上。利用 pBR325 上氯霉素基因的插入失活, 选择 Tc^r Cm^r 的转化子。用前简化方法制备这些转化子质粒DNA, 选择分子量大于pBR 325的重组质粒。用EcoR I 酶解选择出来的质粒, 挑选有DNA片段插入的重组子, 按Southern方法用 ³²P 标记的质粒 pBN 61^[17]作探针(该质粒含家蚕核多角体病毒的多角体蛋白基因, 它和 AcNPV 的核多角体基因的同源程度很高)作DNA 分子杂交分析(图版 I-B, I-C), 筛选到质粒pAcE18(图1)。

为了进一步的重组 DNA 操作, 我们用EcoR I 酶解质粒 pAcE18 DNA 后, 在 0.7% 低熔点琼脂糖凝胶电泳胶中分离插入片段, 将该 7.3kb 插入片段重新克隆到 pUC9 的 EcoR I 位点上, 筛选得到质粒 pAcEU3(图1)。质粒菌落抗氨苄青霉素, 在含X-gal和 IPTG 的 L 平板上呈

白色。作限制性内切酶图谱分析, 能被 BamHI 酶解成 1.1kb, 2.0kb 和 6.9kb 三个片段; Pst I、Sma I 分别切成 10kb 一条带; Xho I 和 Bam H I 双酶解成 1.1kb, 2.0kb、2.3kb 和 4.6kb 4 条带; EcoR I 酶解成 2.7kb 和 7.3kb 两个片段。上述这些结果符合 Smith 等人^[16]对 AcNPV EcoRII 片段限制性内切酶的分析结果, 也确定了 EcoR I I 片段在质粒 pAcEU3 中的插入方向。

根据上述微生物学、DNA 分子杂交以及限制酶酶切位点分析, 证明 pAcEU3 是 AcNPV EcoR I I 片段和质粒 pUC9 的重组子。

(二) 转运质粒 pAP15 的构建

为了便于将外源基因克隆在 AcNPV EcoR I I 片段中, 并且能够在多角体蛋白基因启动子的控制下, 我们用质粒 pAcEU3、pV36 及 pWR13 DNA 作材料, 进一步构建了质粒 pAP15 (图 2)。质粒 pV36 包含 AcNPV HindIII-V 片段 (0.9 kb), 在这片段中包括多角体蛋白基因大部分蛋白质编码顺序和一小段 3' 端的非编码区, 我们先将 HindIII V 片段克隆在质粒 pWR13 的 HindIII 位点上。用 Kpn I 和 Pst I 双酶解分析, 选择一个可以被这两个酶双酶解切出 0.3kb 小片段的 (图版 I-F) 重组子 pWV10 (图 2)。这样 V 片段中多角体蛋白基因转录方向可以和进一步构建中加入的该基因启动子的转录方向相一致。

然后, 我们再从质粒 pAcEU3 制备得到 EcoR I -BamH I 片段 (4.6kb)。在这个 DNA 片段的 BamH I 一端包含编码多角体蛋白氨基端 57 个氨基酸的核苷酸顺序, 以及该基因 5' 端启动子和其他与基因表达调控有关的顺序。用 EcoR I 和 BamH I 双酶切的 pWV10 和上述 EcoR I -BamH

I 片段重组。通过比较重组子分子量大小及分析限制酶酶切位点: EcoR I、BamH I 和 Xho I 是单切点; EcoR I -BamH I 双酶解得 3.6kb 和 4.2kb 2 个片段; Xho I -BamH I 双酶解是 2.3kb 和 5.5kb 两个片段 (图版 I-D); HindIII 酶解成为 0.9kb 和 6.9kb 二个片段 (图版 I-E), 由此证明我们得到了如图 2 所示的重组子 pAP15。

我们利用质粒 pAP15, 将大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因整合到 AcNPV 基因组中, 并在昆虫细胞中得到表达^[13]。

与 Smith 等人^[11]及 Pennock 等人^[2]构建的类似质粒相比较, 质粒 pAP15 上在多角体蛋白启动子的下游有 BamH I, Xba I, Pst I 和 Kpn I 等多个单酶切点, 可适于插入包含有这些酶切位点的 DNA 片段, 或可用于插入多种外源 DNA 片段, 构成 AcNPV 多基因运载体。另外, 其他类似质粒在外源基因插入位点后带有 AcNPV 的 HindIII V、T 或更长的片段。质粒 pAP15 虽然只装配了较短的 HindIII V 片段, 但它所携带的外源 DNA 片段在昆虫细胞内与 AcNPV 病毒 DNA 的重组效率仍很高^[13]。这表明, 同源重组效率与同源顺序的长短不一定有正比例关系。

(三) 质粒 pAP4 的构建

质粒 pAcEU3 中存在 3 个 BamH I 作用位点。通过一系列 DNA 重组操作 (图 2), 我们消去了多角体蛋白基因外的两个 BamH I 作用点, 构建成只存在单个 BamH I 酶切点的质粒 pAP4。从 AcNPV EcoR I I 片段的限制酶酶切位点图谱 (图 1) 上可以看出, 质粒 pAP4 中多角体蛋白基因 3' 端只剩下 6.1kb 至 7.3kb 的 BamH I -EcoR I 片段, 缺失了 HindIII V 片段和它下游的 HindIII T 片段的大部分。如果在 BamH I 位点中插入可受多角体蛋白

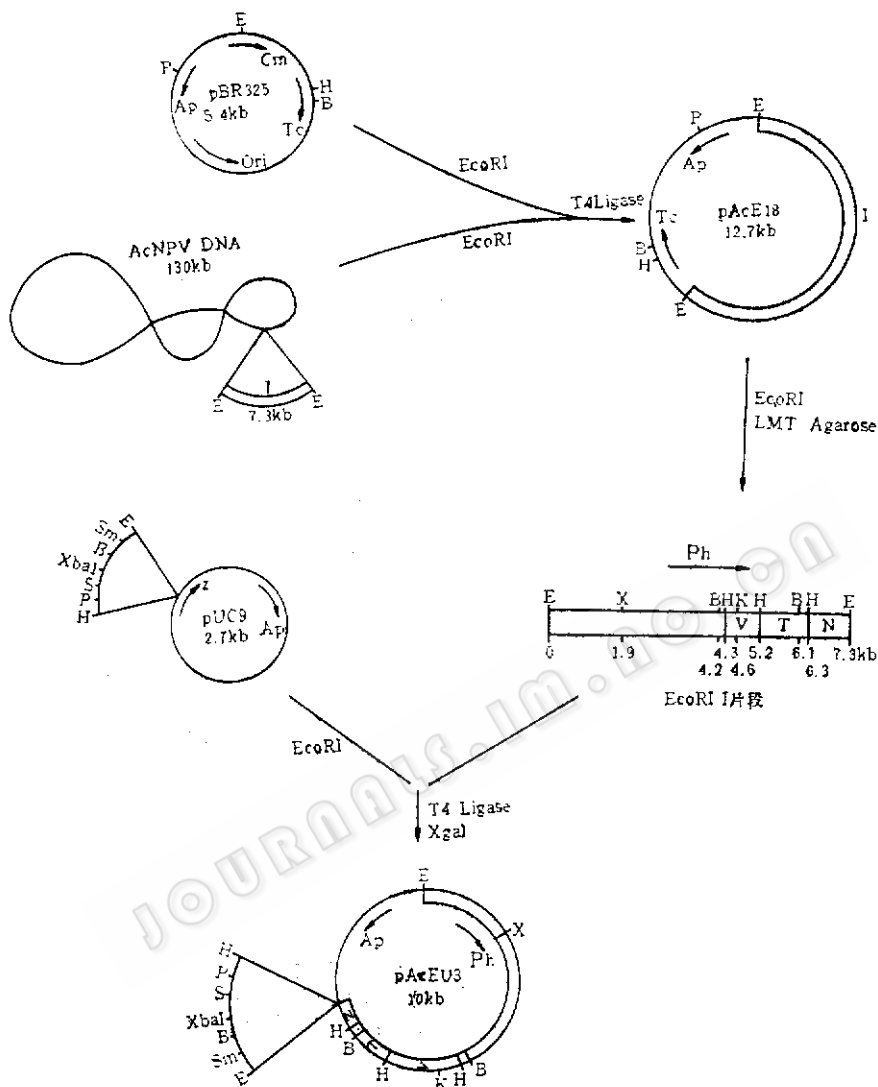


图 1 AcNPV核多角体蛋白基因片段的分离、克隆

Fig. 1 Cloning and isolating of AcNPV nuclear polyhedrin gene

□ 核多角体蛋白基因片段 Polyhedrin gene sequence

→ 箭头方向表示基因转录方向 The arrows indicate the direction of transcription

基因启动子指导的外源基因（例如大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因），并整合到 Ac NPV基因组中进行表达。根据表达的情况，和用质粒pAP15作载体的表达情况相比较，将可以观察3'端缺失顺序的功能。

或者观察外源基因自身的3'端转录终止调控顺序在昆虫细胞中的功能和作用。质粒pAP4为研究真核基因3'端调控顺序的功能提供了一个运载体。

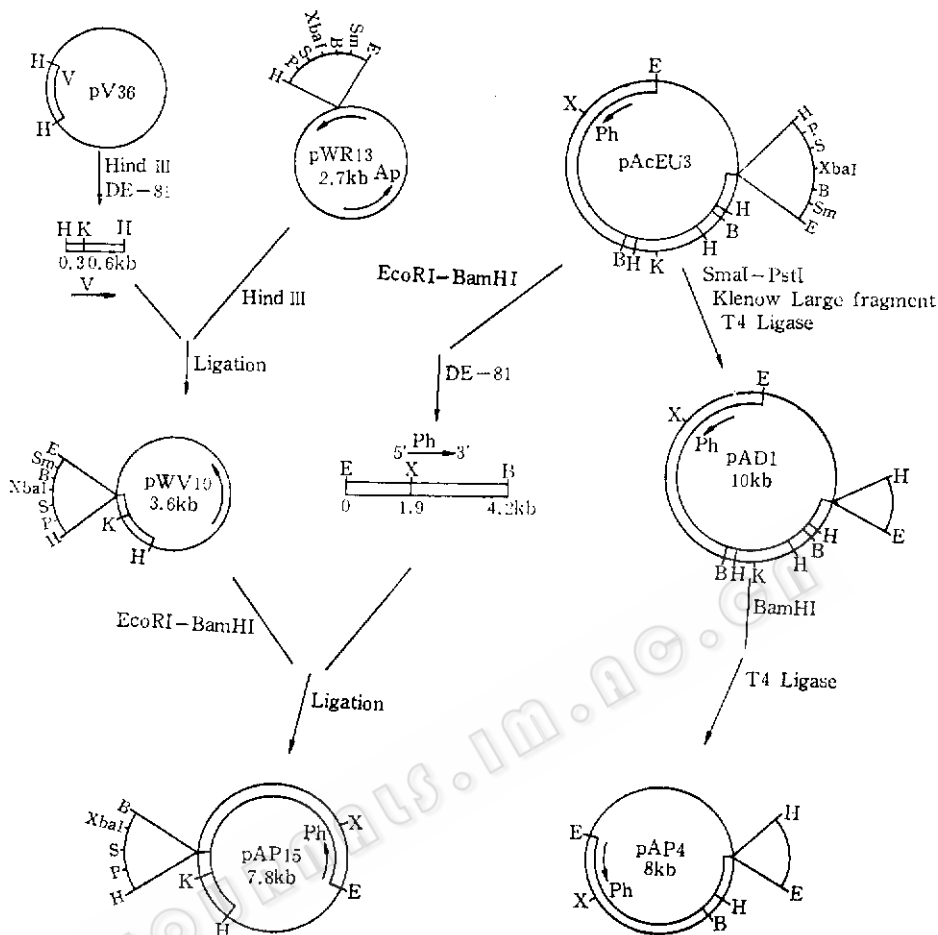


图 2 转运表达质粒pAP4, pAP15的构建图

Fig. 2 Scheme for construction of transfer expression plasmids pAP15 and pAP4
双线区域和箭头符号所表达的含义与图 1 中相同 □、→, Shows the same meaning as figure 1

参 考 文 献

[1] Smith, G.E. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 3:2156, 1983.
 [2] Pennock, G.D. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 4:399, 1984.
 [3] Mocarski, E.S. et al., *Cell*, 22:243, 1980.
 [4] Lubbert, H. et al., *Gene*, 16:343, 1981.
 [5] 郭礼和等: 生物工程学报, 1(2): 14-33, 1985.
 [6] Messing, J.: *Methods in Enzymol.*, Academic Press, INC, Vol. 101, pp.20-78, 1983.
 [7] Bolivar, F. et al., *Gene*, 4:121, 1978.
 [8] Smith, G.E. et al., *J. Virol.*, 44:199-208, 1982.
 [9] 忻纪厚等: 中国科学(B辑), 9:805, 1984.
 [10] Birnboim, H.C. and Doly, J., *Nucleic Acids Res.*, 7:1513-1523, 1979.
 [11] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning—A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 98-106, 157-161, 1982.
 [12] Dretzen, G. et al., *Anal. Biochem.*, 112:295, 1981.
 [13] 忻纪厚等: 生物物理和生物化学学报, 19(1): 75-77, 1987.
 [14] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 98:503-517, 1975.

- [15] Gergen, J. P. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 7:2115—2136, 1979.
 [16] Smith, G.E. et al.: *J. Virol.*, 46:584, 1983.
 [17] 王珩等, 中国科学, (B辑) 3: 245, 1985.
 [18] Risby, P.W. J. et al., *J. Mol.Biol.*, 113:237—251, 1979.

CONSTRUCTION OF THE EXPRESSION PLASMIDS CONTAINING THE POLYHEDRIN GENE OF INSECT BACULOVIRUS

Jiang Minhao Yang Guanzhen Li Mintang Gan Keda Xin Jihou

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)

In order to pursue the possibility of using *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) as an expression vector for foreign genes, we have cloned the EcoR I fragment of AcNPV DNA into the *E. coli* plasmid pBR325. Using this fragment, two expression plasmids have been constructed, which provided the restriction enzyme sites for insertion of a passenger gene under the control of the polyhedrin gene promoter.

Key words

Nuclear polyhedrosis virus; transfer plasmids

图 版 说 明

A. AcNPV E-2株DNA酶切样品电泳图

Agarose gel electrophoresis of restriction fragments of AcNPV E-2 DNA

1. AcNPV DNA 2. AcNPV DNA + EcoRI

B, C: 转化子12、18 (pAcE18) DNA样品经EcoRI酶解片段的琼脂糖电泳 (B) 以及以 pBN61 为探针对这些片段进行的Southern印迹杂交图谱 (C)

Agarose gel electrophoresis of the EcoR I restriction fragments of plasmids DNA in the transformants 12, 18 (pAcE18) (B) and Southern blot hybridization of pBN61 probe to fragments (C)

1. 18号 (pAcE18) DNA + EcoR I; 2. 12号DNA + EcoR I; 3. pBR325 DNA + EcoR I

D, E, 质粒pAP15 DNA 酶切图谱分析电泳图

Restriction endonuclease mapping of plasmid pAP15 DNA

D, 1. λ DNA + Hind III, pBR322 DNA + Hinf I, 2. pAP15 DNA + Xho I + BamH I, 3. pAP15 DNA + Hind III 部分酶解 pAP15 DNA + Hind III partial digestion, 4. pAP15 DNA + EcoR I + BamH I, 5. pAP15 DNA + EcoR I, 6. pAP15 DNA + BamH I, 7. pAP15 DNA + Xho I, E, 1. λ DNA + Hind III, pBR322 DNA + Hinf I, 2. pAP15 DNA + Hind III

F, 质粒pWV10 DNA酶切样品在1%琼脂糖凝胶上的电泳图

1% agarose gel electrophoresis of restriction fragments of plasmid pWV10 DNA

1. pBR322 DNA + Hinf I, 2. pWV10 DNA + Kpn I + Pst I

