生物工程学报13 (2)：149～153，1997
Chinese Journal of Biotechnology

利用杆状病毒表达系统表达金鱼生长激素 I 基因

林广云[1] 王珣章[1] Anderson Wong[2] 龙繁新[1] 庞 义[1] 余奇理[2]
（中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510275)[1]
（香港大学动物系)[2]

摘 要 以不含起始密码 ATG 的质粒 pSXIVVI$^+$X3 为转移载体，将编码金鱼生长激素 I 的 cDNA 插入粉纹夜蛾核型多角体病毒（TnNPV）基因组中，构建了形成多角体的重组病毒株 TnNPV-SX$^+$gfGHI2la。该毒株能利用合成多角体 XIV 串联启动子，在重组病毒感染的草地贪夜蛾（*Spodoptera frugiperda*，Sf）昆虫细胞及银纹夜蛾幼虫中表达金鱼生长激素 I 基因。感染离体细胞及虫体后的蛋白 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳表明，所表达的蛋白分子量为 22.5kDa，与理论计算值相符。Western 印迹证实，金鱼生长激素特异蛋白得到表达。

关键词 金鱼生长激素，杆状病毒，表达，分泌

以昆虫杆状病毒为载体、昆虫细胞或虫体为受体的基因工程由于具有独特的优点和巨大的发展潜力，至 1991 年底已有 300 种外源基因通过此系统得到表达[1]，其中与内分泌有关的有人的 B 神经生长因子[2]及哺乳动物 β-肾上腺素功能受体[3]等数十种基因。而用来表达金鱼生长激素基因仍未见报道。

生长激素是一个由脑下垂体产生的单链多肽激素，在鱼类中除用来促进体细胞的生长外，还承担着调节渗透压，电离平衡等与新陈代谢有关的功能。生长激素基因及其基因产物为研究蛋白质结构—功能之间的关系，进化以及基因的表达提供了一个重要的模型[4]；此外，由于鱼的生长激素与哺乳动物的生长激素在结构及生物化学上具同源性[5]，故克隆及表达金鱼生长激素基因无论在基础理论研究或生产实践上均有着重要的意义。

本实验利用杆状病毒系统能高效表达外源基因及对基因产物能翻译后加工等优点[1]，将编码金鱼生长激素 I 的 cDNA 插入到杆状病毒基因组中，利用虫体及昆虫离体培养细胞进行高效表达。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和病毒

含编码金鱼生长激素 I cDNA 质粒（gf Growth Hormone I）由香港大学动物系余奇理博士实验室提供[6]。大肠杆菌 DH5α 为转化受体菌。不含起始密码 ATG 的转移载体质粒 pSXIVVI$^+$X3 由本室构建[7]。粉纹夜蛾核型多角体病毒（TnNPV）[Faulkner and

香港 RGC 资助项目。
本文于 1996 年 3 月 28 日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

Henderson, 1972] 属多粒包埋型，引自英国自然环境研究委员会病毒研究所（NERC, Institute of Virology, Oxford, England)。亲本毒株为含合成启动子和β-半乳糖苷酶基因的无包含体粉纹夜蛾重组株 TnNPV-SVI⁻G 由本室构建[7]。草地贪夜蛾（*S. frngiperda*，简称 Sf）昆虫细胞引自英国自然环境研究委员会病毒研究所。细胞培养基为 Tc-100 培养基补加 10% 小牛血清。

限制酶及其它工具酶均为 Promega 产品。

1.2 重组质粒的构建及病毒 DNA 的提取

质粒的构建按 Sambrook 等 1992 年的方法[8]。病毒 DNA 的提取、共转染，病毒纯化均按 Summers 等 1987 年的方法[9]进行。

1.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）及 Western 印迹

1.3.1 样品制备：将 2×10^6 个草地贪夜蛾细胞移入直径为 30mm 的细胞培养皿，待细胞贴壁后，换以 100μl 2×10^6pfu 病毒液，26℃吸附 1h。弃去接种物，每皿加入 1ml 的 Tc-100 培养基，待病毒感染后 24h、48h、72h、96h 分别收集细胞样品及培养液上清样品，收集细胞样品之前用 PBS 轻洗两次；收集的上清 10 000r/min 离心 5min。

虫体样品制备：于人工饲料上涂加重组病毒多角体并喂食粉纹夜蛾四龄幼虫，4d 后收集被感染的六龄幼虫，剪腹足收集血淋巴，离心，过滤后收集上清，供 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析用。

1.3.2 SDS-PAGE 和 Western 印迹：SDS-PAGE 的分离胶的浓度为 10%，浓缩胶的浓度为 4%。Western 印迹按 Sambrook 等 1992 的方法[8]。第一抗体为抗兔金鱼生长激素抗体（由香港大学动物系 Anderson Wong 博士提供），工作浓度为 1：100 000；第二抗体及底物购自 Sigma 公司，按其说明使用。

2 结果

2.1 含 gfGHI cDNA 的转移载体的构建

将含 gfGHI 的质粒用 PstI/XhoI 双酶切，并将切出的 gfGHI cDNA 片段插入到转移载体质粒 pSXIVVI⁺X3 的 PstI/SalI 双酶切窗口中，遂构建成重组质粒 pCAGHI21，构建过程如图 1 所示。经用 PstI/SacI 双酶切，结果证实 gfGHI cDNA 已正确插入 pSX-IVVI⁺X3 中（图未显示）。

2.2 含 gfGHI cDNA 的粉纹夜蛾核型多角体病毒的重组及酶切鉴定

将重组质粒 pCAGHI21DNA 与不形成多角体的粉纹夜蛾重组病毒

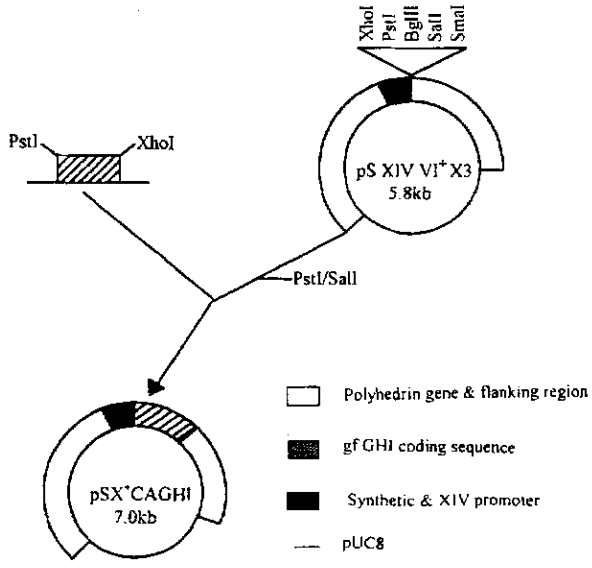

图 1 重组质粒 pCAGHI21 构建示意图

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pCAGHI21

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

TnNPV-SVI⁻G DNA 共转染 Sf9 细胞，经过空斑技术挑选从而纯化得到五株遗传稳定的含 gfGHI cDNA 又形成多角体的重组毒株 TnNPV-SX⁺gfGHI21a.b.c.d.e。

随意选取重组毒株 TnNPV-SX⁺gfGHI21a（简称 VGHI21a）用 SacI 进行酶解分析，由于亲本毒株基因组中，大小约 13.2kb 的 β-半乳糖苷酶基因（gal）及其侧翼[7]，因与转移载体质粒等位基因交换而失去了其中的 gal 基因，换为含双启动子、包括 SacI 酶切点的多接头及内含 SacI 酶切点的 gfGHI cDNA 片段，故重组毒株 SacI 酶切图谱较野生型病毒 SacI 酶切图谱多出一为外源基因一部分的约 850bp 片段，从而证实了 VGHI21a 为重组毒株（图未显示）。重组过程如图 2 所示。

2.3 gfGHI cDNA 在昆虫离体培养细胞及粉纹夜蛾幼虫中的表达

将重组病毒 VGHI21a 接种离体培养的 Sf9 细胞，于感染后 24h、48h、72h、96h 收

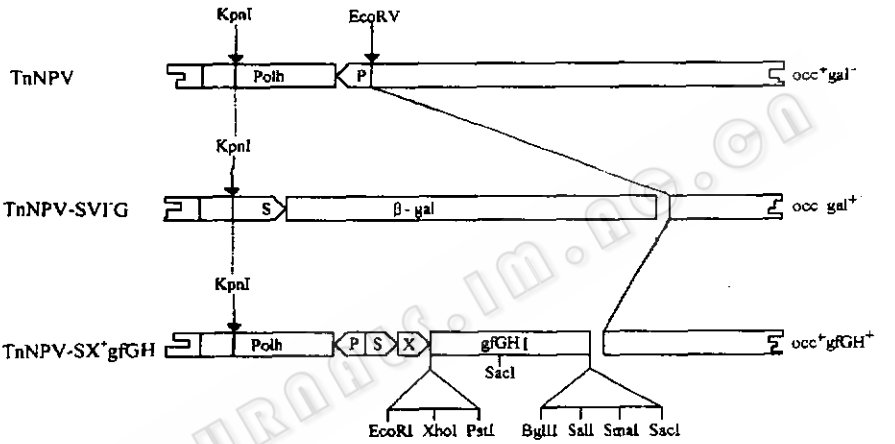

图 2　野生型毒株、亲本毒株及重组毒株基因组中多角体（XIV）启动子、合成启动子、多角体蛋白基因及外源基因组件的构成

Fig.2 The composition of the polyhedrin XIV-Syn promoter, polyhedrin gene and foreign gene of wild type virus, parent virus and recombinant virus

S—Synthesis Promoter　P—Polyhedrin promoter　X—XIV Promoter

集细胞及培养基上清进行 SDS-PAGE 及 Western 印迹分析。结果表明病毒感染后 24h，在 Sf9 细胞内及培养基上清中已可检测到金鱼生长激素 I；感染后 72h 达到最高值并一直持续到 96h（图 3）。

用 VGHI21a 病毒感染粉纹夜蛾六龄幼虫 5 头（重量不同），4d 后采血淋巴、离心、过滤后用上清进行 SDS-PAGE 和 Western 印迹，结果金鱼生长激素 I 基因在虫体中同样得到表达，且表达产物可分泌到血淋巴中（图 4）。

3 讨　论

本论文所采用的杆状病毒载体系统由于具有两个串联的启动子，可大大提高外源基因的表达水平[10]；且重组病毒可形成多角体，便于重组病毒株的挑选及经口服感染虫体；这样，就为外源基因表达产物的大量生产提供了方便。本研究所表达的编码金鱼生

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

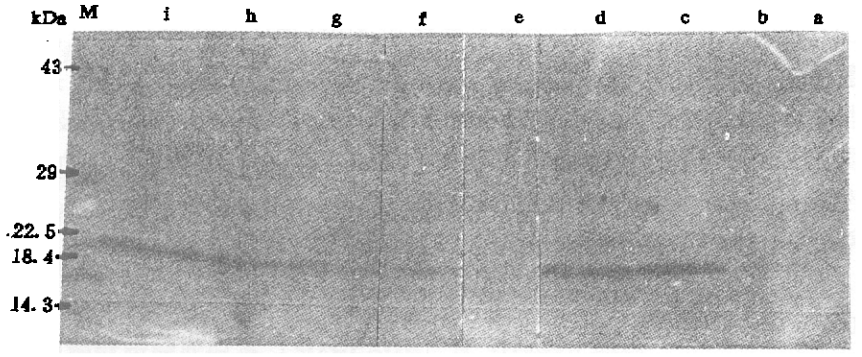

图3 VGHI21a于不同时间间隔在离体培养的Sf9细胞及上清表达的gfGHI的Western印迹照片

Fig.3 Time course of Western blot of VGHI21a expressing gfGHI in Sf9 cells and supernatant

a. Supernatant of culture cells infected with VGHI21a for 24 h. b. Supernatant of culture cells infected with VGHI21a for 48 h. C. Supernatant of culture cells infected with VGHI21a for 72 h. d. Supernatant of culture cells infected with VGHI21a for 96 h. e. Normal Sf9 cells. f. Sf9 cells infected with VGHI21a for 24 h. g. Sf9 cells infected with VGHI21a for 48 h. h Sf9 cells infected with VGHI21a for 72 h. i. Sf9 cells infected with VGHI21a for 96 h. m. Prestain molecular weight markers

长激素IcDNA，是从金鱼脑垂体中提纯出来的，具有5个半胱氨酸，与草鱼的生长激素相似；从Western印迹的实验结果来看，gfGHIcDNA所编码的蛋白是有功能的激素，由于其cDNA5'端具有信号肽，因此它所编码的蛋白可分泌到被感染的离体培养Sf细胞培养基及虫体的血淋巴中，这样不但为金鱼生长激素的提纯工作带来了方便；同时，由于重组病毒可形成多角体，昆虫可经口服感染，也为利用虫体来大量生产金鱼生长激素提供了一条廉价而方便的途径。金鱼生长激素已被人们作为一个模型来研究生理学、基因表达的调节、进化以及结构与功能之间的关系，带有相似结构与交叉生物学功能的生激素可形成一个多肽激素的家族[4]。人们已尝试着用原核表达系统（*E. coli*）来表达鱼的生长激素，但原核表达系统表达真核基因时，无论在蛋白的翻译后加工如糖基化、磷酸化、甲基化、信号肽识别及蛋白一级结构向立体结构折叠等方面远远不如真核表达系统如杆状病毒表达系统[1,11]，用昆虫杆状病毒表达系统表达金鱼生长激素的成功亦可

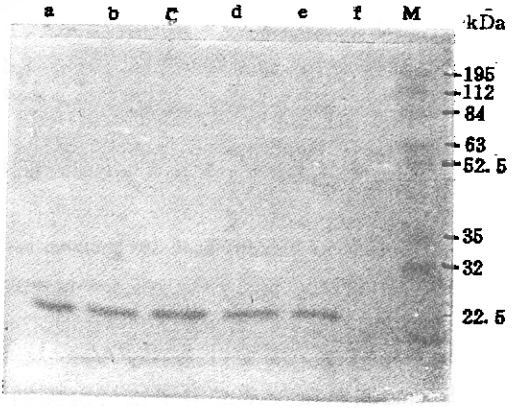

图4 VGHI21a在粉纹夜蛾幼虫中表达的gfGHI的Western印迹鉴定

Fig.4 Western blot of VGHI21a expressed gfGHI in larvae

a.b.c.d.e. Larvae infected with VGHI21a for 96 h of different weight. f. Larvae infected with TnNPV for 96 h. g. Prestain molecular weight markers.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

为生长激素的基础理论研究提供一个方便。本文利用杆状病毒表达系统表达了编码金鱼生长激素 I cDNA，无论是在被感染的离体培养的 Sf 细胞内、离体培养的 Sf 细胞培养基中以及虫体血淋巴中都检测到了特异蛋白，为将来提纯金鱼生长激素 I，以便进行下一步的工作打下了基础。

参 考 文 献

[1] O' Reiily D R, Miller L K, Luckow V A. Baculovirus Expression Vectors. A laboratory Manual, New York, WH Freeman, 1992.

[2] Barnett J, Routledgeward P, Bursztyn-Pettegrew C *et al*. Exp. Neurol. 1990, **110**: 11～24.

[3] George S T, Arbabion M A, Ruoho A E *et al*. Biochem Biophy Res. Commun. 1989, **163**: 1265～1269.

[4] Schreibman M P, Scanes C G, Pang P K L *et al*. Academic Press. 1993.

[5] Nicoll C S, Mayer G L, Russell S M *et al*. Endoc. Rev. 1986, 7: 169～203.

[6] Law M S, Cheng K W, Fung T K *et al*. Archives of Biochemistry and Biophycics. 1996, **330** (1): 19～23.

[7] 王琦章，谢伟东，龙篆新等．病毒学报，1991，7 (3)：253～261.

[8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al*. Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2nd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[9] Summers M D, Smith G E. A Manual of Methods for Baculovirus vectors and insect culture procedures. 1987.

[10] 王琦章，谢伟东，龙篆新等．中国科学（B辑）1992，1：39～46.

[11] Keiko K O, Masanori Y, Yoshiaki H *et al*. Biochemistry and Biophysical Research Communications, 1995, **213** (2): 389～396.

Expression of Goldfish Growth Hormone I Gene Using Baculovirus Expression System

Lin Guangyun[1]　Wang Xunzhang[1]　Anderson Wong[2]　Long Qingxin[1]　Pang Yi[1]　Yu Keili[2]

(*State Key Laboratory for Biological Control of ZhongShan University, GuangZhou*, 510275)[1]

(*Department of Zoology, The University of HongKong, HongKong*)[2]

Abstract　Using pSXIVVI$^+$X3 without an initiation codon as an expressing vector, an occluded recombinant *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus carrying the cDNA encoding goldfish growth hormone I (gf GHI) under the control of the *Syn* XIV promoter, has been constructed. Immunoblot analysis showed that the molecular weight of the expressed protein was 22.5kDa as expected, revealed that the virus-mediated gfGHI was synthesized in the Sf cells, larvae and secreted into the supernatant and hemolymph.

Key words　Goldfish growth hormone, baculovirus, expression, secretion

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn