

非转座子载体介导的稳定转化家蚕 BmN 细胞表达人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子

陈慧梅, 曹广力, 薛仁宇, 贡成良

苏州大学基础医学与生物科学学院, 苏州 215123

摘要: 为了建立非转座子载体介导的持续表达外源基因的转化家蚕 BmN 细胞系, 将家蚕核型多角体病毒极早期基因 (*ie-1*) 启动子控制的人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (hGM-CSF) 基因的表达盒克隆至 pIZT/V5-His, 获得重组载体 pIZT-IE-hGM-CSF, 该载体转染家蚕 BmN 细胞后, 通过博来霉素 (Zeocin) 筛选获得了稳定转化细胞系 IE-hGM-CSF。转基因细胞基因组经 PCR 鉴定, 成功检测到 *ie-hGM-CSF*, Western blotting 分析结果显示转化细胞表达的重组 hGM-CSF 的大小为 22 kDa, ELISA 检测结果显示 hGM-CSF 在转化细胞系里的表达水平大约为 $2\ 814.7\ \text{pg}/10^6$ 个细胞。

关键词: 转化, pIZT/V5-His, hGM-CSF, BmN 细胞

Expression of hGM-CSF in transformed silkworm BmN cells mediated by non-transposon vector

Huimei Chen, Guangli Cao, Renyu Xue, and Chengliang Gong

College of Pre-clinical Medical and Biological Science, Soochow University, Suzhou 215123, China

Abstract: To develop the stable transformants of the silkworm (*Bombyx mori*) BmN cells that could continuously express the exogenous gene based on a non-transposon vector, an expression cassette containing human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) gene driven by *ie-1* promoter from *B. mori* nucleopolyhedrovirus was inserted into pIZT-V5-His to form a recombinant vector pIZT-IE-hGM-CSF, followed by transfecting the constructant into BmN cells, the stable *ie-hGM-CSF* cell lines were obtained after being selected with Zeocin. PCR result using the genomic DNA of the transformed BmN cells as template illustrated a specific fragment of *ie-hGM-CSF*, and Western blotting analysis using an antibody against hGM-CSF demonstrated a specific band with a molecular weight of 22 kDa in the transformed cells, meanwhile, the expression level of hGM-CSF determined by ELISA was about $2\ 814.7\ \text{pg}$ in 10^6 transformed BmN cells.

Keywords: transformation, pIZT/V5-His, hGM-CSF, BmN cells

目前主要通过大肠杆菌、酵母、昆虫细胞以及哺乳动物细胞 4 种系统来表达外源蛋白^[1], 这 4 大表达系统在科学研究、新药研发等方面发挥了巨大的作用。大肠杆菌表达系统属于原核表达系统, 具

Received: January 5, 2010; **Accepted:** April 9, 2010

Supported by: National Key Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2005CB121000), Key Fostering Project for Application Research of Soochow University (No. Q3134991).

Corresponding author: Chengliang Gong. Tel/Fax: +86-512-65880183; E-mail: gongcl@suda.edu.cn

国家重点基础研究发展计划项目 (973 计划) (No. 2005CB121000), 苏州大学重大应用研究培育项目 (No. Q3134991) 资助。

有良好的操作性、成本低等优点,但重组蛋白不能进行翻译后修饰加工,难以获得高活性的目的蛋白;酵母表达系统属于低级的真核表达系统,可以进行翻译后加工修饰,但发生错误修饰的机率较高;哺乳动物细胞表达系统经过加工修饰表达的外源蛋白与天然蛋白结构最为接近,但表达量不高,并且培养哺乳动物细胞成本高、操作复杂。昆虫细胞表达系统操作简单,易培养,成本相对较低,并且可以进行糖基化等修饰,可以生产得到高活性的外源蛋白。昆虫表达一般采用杆状病毒表达载体系统 (BEVS) 和稳定转化表达系统。BEVS 是一种瞬时表达系统,昆虫细胞会因为病毒感染而死亡,外源基因不能实现连续、传代表达,另外尽管杆状病毒进入哺乳动物细胞不能产生有效感染,但目前仍未排除杆状病毒对宿主潜在的危害^[2-3],而通过昆虫转化细胞表达外源基因其表达水平较低,约为 BEVS 的 1%^[4],但是通过转化昆虫细胞克服了 BEVS 的一些缺点,它是一种永久性的表达系统,形成的稳定转化细胞可以持续、传代培养,并且昆虫细胞的安全性比 BEVS 的要高许多。目前已有一些获得稳定昆虫细胞系的报道^[5-7],但有关家蚕稳定转化细胞报道却不多见^[7]。Jarvis 等^[4]利用苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) *ie-1* 启动子控制 β -半乳糖苷酶基因表达元件的转基因载体转染 Sf-9 细胞,通过抗生素 G418 筛选,获得了稳定转化细胞系,并且经过多次传代后,外源基因仍能稳定表达;Cherbas 等^[5]通过相似的方法同样获得了稳定转化果蝇 *Drosophila melanogaster* 细胞系;赵越等^[8]用携带 *neo*、绿色荧光蛋白 (*gfp*) 及家蚕丝胶基因启动子 (P_{ser-}) 驱动人胰岛素样生长因子 (hIGF-I) 表达的基于 *piggyBac* 转座子的转基因载体转染家蚕 BmN 细胞,经过 G418 的筛选,获得了可以稳定表达 hIGF-I 的转化细胞系。

人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (hGM-CSF) 是第 1 个被克隆和利用重组 DNA 技术生产的一种造血生长因子,能够刺激 T 细胞和巨噬细胞增殖、成熟和分化,具有极其重要的免疫调节功能,在造血调控和免疫调节中发挥着重要作用,因此具有十分重要的临床应用价值^[9]。目前市场上销售的

hGM-CSF 多是通过大肠杆菌表达系统生产的重组蛋白,探讨 hGM-CSF 的新表达方法对重组 hGM-CSF 的生产有重要经济意义。

pIZT/V5-His 是 Invitrogen 公司开发的一种能用于昆虫 Sf9 细胞稳定表达外源基因的载体,该载体可随机多拷贝整合至昆虫细胞的基因组内,并且载体含有博莱霉素 (Zeocin) 抗性基因和绿色荧光蛋白 (*gfp*) 基因融合表达盒。利用该载体通过稳定转化 Sf9 细胞表达外源基因已有一些研究^[10-12],但用于家蚕 BmN 细胞的研究还不多见。目前 BmN 细胞广泛用于家蚕基因功能的鉴定、重组蛋白的表达、家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV) 的分子生物学研究等。它属于真核表达系统,具有细胞易培养、重组蛋白的后加工比较完善等优点。为了检测 pIZT/V5-His 载体介导的转化家蚕细胞表达外源基因的能力,本研究将 *ie-1* 启动子控制的 hGM-CSF 表达盒克隆至 pIZT/V5-His 载体,获得了重组转基因载体 pIZT-IE-hGM-CSF,家蚕 BmN 细胞转染该载体后,通过 Zeocin 筛选获得了稳定表达 hGM-CSF 的稳定转化细胞系,为利用家蚕细胞表达外源基因提供了新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

载体 pIZT/V5-His 购自 Invitrogen 公司。带有杆状病毒极早期启动子 *ie-1* 控制的 hGM-CSF 表达盒的重组质粒 pSK-IE-hGM-CSF^[13]、宿主菌 *E. coli* TG1、家蚕卵巢来源的 BmN 细胞系均由苏州大学基础医学与生物科学学院生物化学与分子生物学实验室保存。限制性内切酶、PCR 相关试剂、T4 DNA 连接酶等购自 Fermentas 公司。X-gal、IPTG、20× PBS 等购自上海生物工程技术服务有限公司。凝胶回收试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司。hGM-CSF ELISA kit 购自 USCN Life Science & Technology Company。兔抗 hGM-CSF 抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自北京博奥森公司。TC-100 昆虫细胞培养基、胎牛血清 (FBS)、Lipofectin、博莱霉素均购自 Invitrogen 公司。

1.2 引物

参照 GenBank 中的 BmNPV-T3 株基因组全序列 (Accession No. L33180) 的 *ie-1* 基因启动子区域序列和 *hGM-CSF* 基因序列, 设计引物 p1 (5'-CGGGTACCGATTTGCAGTTCGGGAC-3', 下划线表示 *EcoR* I 酶切位点)、p2 (5'-CGGAATTCCACTCCTGGACTGGCTCCC-3', 下划线表示 *Kpn* I 酶切位点), 以及 *hGM-CSF-1* (5'-TGGATATCATGTGGCTGCAGAGCCTGC-3', 下划线表示 *EcoR* V 酶切位点)、*hGM-CSF-2* (5'-ATCTCGAGAAGCTTATCACTCCTGGACTGGCTCCC-3', 下划线表示 *Xho* I、*Hind* III 酶切位点), 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 转基因载体 pIZT-IE-hGM-CSF 的构建

以质粒 pSK-IE-hGM-CSF 为模板, 以 p1/p2 为引物, 通过 PCR 扩增 *ie-hGM-CSF* 片段 (约 1 kb)。扩增条件为: 94℃ 预变性 5 min; 95℃ 50 s, 52℃ 50 s, 72℃ 1.5 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物电泳、割胶回收后, 用 *EcoR* I、*Kpn* I 双酶切, 与经同样酶切的 pIZT/V5-His 载体连接, 连接产物转化 *E. coli* TG1 的感受态细胞中, 在含有博莱霉素的 LB 培养基上培养, 挑选单菌落, 快抽质粒进行 PCR 鉴定, 鉴定正确的质粒命名为 pIZT-IE-hGM-CSF。该载体的结构如图 1 所示。

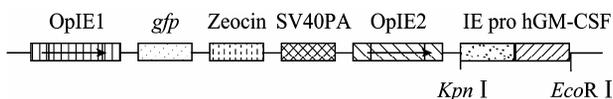


图 1 转基因载体 pIZT-IE-hGM-CSF 的结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of transgenic vector pIZT-IE-hGM-CSF. OpIE1: IE1 promoter of OpNPV; *gfp*: green fluorescent protein gene; Zeocin: Zeocin resistance gene; SV40pA: polyA signal of SV40; OpIE2: IE2 promoter of OpNPV; IEpro: IE1 promoter.

1.3.2 家蚕 BmN 细胞的转染与转化细胞的筛选

家蚕 BmN 细胞用含 10% 胎牛血清的 TC-100 在 26℃ 培养, 转染方法参考文献[14]中的方法进行。转染 24 h 后, 在荧光显微镜下可观察到绿色荧光细胞, 4 d 后, 更换细胞培养基, 同时添加博莱霉素至终浓度 30 mg/L, 连续筛选 1 个月, 期间观察绿色荧光细

胞的比例。当绿色荧光细胞达 80% 以上时, 收集细胞, 抽提基因组进行鉴定。

1.3.3 hGM-CSF 表达的检测

当绿色荧光细胞比例达 70% 以上时, 弃细胞培养液, 加 1 mL 1× PBS 反复吹打细胞, 吸取细胞悬浮液, 并用血球计数板计数, -20℃ 反复冻融 3 次后, 10 000 r/min、4℃ 离心 10 min, 取上清, 稀释 5 倍, 按照 ELISA 试剂盒的使用说明测定 *hGM-CSF* 的表达水平, 重复 2 次。剩余的上清加 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 冷冻 1 h, 12 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 弃上清, 加 30 μL 的 1× PBS 溶解, 与上样缓冲液混合后, 100℃ 水浴 5 min, 离心后取上清进行 SDS-PAGE (浓缩胶为 5%, 分离胶为 15%) 和 Western blotting 分析, Western blotting 用兔抗 *hGM-CSF* 为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗。

2 结果与分析

2.1 转基因载体 pIZT-IE-hGM-CSF 的鉴定

构建的质粒 pIZT-IE-hGM-CSF 用 *EcoR* I、*Kpn* I 进行双酶切, 可检测到约 1 kb 的特异性条带; 以 pIZT-IE-hGM-CSF 为模板, p1/p2 为引物, 进行 PCR 鉴定, 可扩增出约 1 kb 的特异性条带, 另外对载体进行测序, 各种结果均表明转基因载体 pIZT-IE-hGM-CSF 已构建成功。

2.2 pIZT-IE-hGM-CSF 介导的转化细胞筛选与鉴定

pIZT-IE-hGM-CSF 转染 BmN 细胞 24 h 后, 在荧光显微镜下可以明显观察到部分细胞呈绿色荧光 (图 2A), 表明质粒 DNA 已进入细胞内, *gfp* 基因已正确表达; 转染 4 d 后开始用博莱霉素筛选, 随着筛选时间的延长, 荧光细胞比例逐渐增加。1 个月, 荧光细胞比例可达 70% 以上 (图 2B), 表明 Zeocin 抗性基因以及 GFP 基因已正确表达。并可在维持这一荧光比例的情况下稳定传代大约 10 次 (图 2C), 所获的转化细胞系命名为 IE-hGM-CSF。为了鉴定外源 DNA 是否已整合至细胞基因组, 以抗生素筛选 2 个月的荧光细胞基因组为模板, 分别以 p1/p2



图2 转染 pIZT-IE-hGM-CSF 后经 zeocin 筛选的转化 BmN 细胞

Fig. 2 Transformed cells screened from BmN cells transfected with pIZT-IE-hGM-CSF by using Zeocin. (A) 24 hours after transfection. (B) One month after transfection. (C) Two months after transfection.

和 hGM-CSF-1/hGM-CSF-2 为引物, 可分别检测到约 1 kb 和 430 bp 的特异性产物, 表明 *ie-1* 启动子控制的 *hGM-CSF* 基因已整合进细胞基因组 (图 3)。

2.3 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测

为了分析 hGM-CSF 在转化细胞内的表达情况, 收集博莱霉素筛选 2 个月的转化细胞进行 SDS-PAGE 分析, 未检测到 Zeocin-GFP 和 hGM-CSF 特异性条带, 而 Western blotting 检测结果显示, 在 22 kDa 处有明显的特异性条带出现 (图 4), 表明 hGM-CSF 已在转化细胞中正确表达。

2.4 ELISA 检测转基因细胞中 hGM-CSF 的表达水平

根据 hGM-CSF 标准品的 ELISA 检测数据制作标准曲线 (图 5), 取转化细胞用 ELISA 试剂盒检测 hGM-CSF 的表达, 由标准曲线计算结果: hGM-CSF 在转基因 BmN 细胞中的表达水平为 2 814.7 pg/ 10^6 个细胞, 而正常 BmN 细胞中基本未检测到。

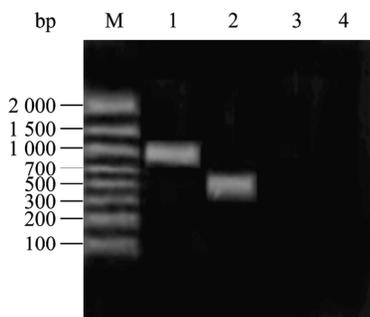


图3 转化 BmN 细胞基因组的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of transformed BmN cells. M: DNA marker; 1: detection of IE-hGM-CSF from the genome of transformed cells; 2: detection of hGM-CSF from the genome of transformed cells; 3,4: detection of hGM-CSF and IE-hGM-CSF from the genome of normal cells.

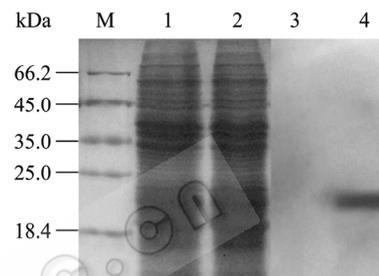


图4 转化细胞的 SDS-PAGE 及 Western blotting 分析

Fig. 4 SDS-PAGE and Western blotting analysis of transformed cells. M: protein marker; 1,2: SDS-PAGE detection of normal BmN cells and transformed cells respectively; 3,4: Western blotting detection of normal BmN cells and transformed cells, respectively; the concentrations of the stacking gel and the separating gel were 5% and 15%, respectively; the primary antibody was rabbit anti-hGM-CSF and the secondary antibody was HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG.

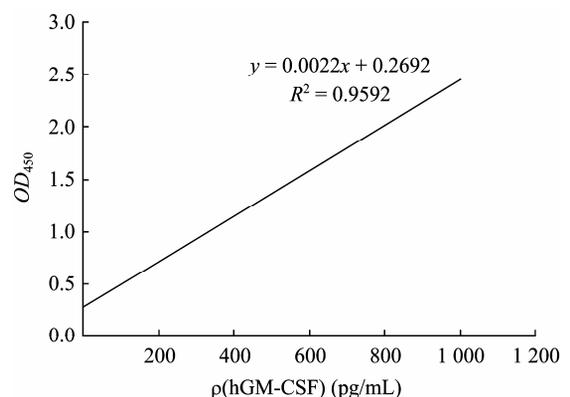


图5 ELISA 检测 hGM-CSF 标准曲线

Fig. 5 Calibration curve of hGM-CSF tested by ELISA.

3 讨论

利用转化昆虫细胞表达外源基因虽然没有 BEVS 的表达水平高^[2], 但是转化昆虫细胞表达系统具有它自身的优势。例如, BEVS 系统中外源基因

的表达多数在病毒感染细胞的晚期,这时的细胞状态已经异常,往往致使表达产物不能得到有效的翻译后加工,从而导致表达产物的活性不高^[15]。而通过昆虫转化细胞表达,整个过程没有病毒 DNA 的污染和病毒蛋白的表达,得到的稳定转化细胞系可以稳定传代培养,并且整个表达过程都是在细胞状态良好的情况下进行的,这样不仅使得产物的安全性大大提高,而且还可以使产物得到更加有效的加工,提高了产物的活性,如果借助无血清细胞培养和分泌表达技术,表达产物极易纯化,并且可以满足工业上的大规模培养要求。

目前转化昆虫细胞载体多是转座子载体和非转座子载体,其中包含有 P 转座子、mariner 转座子、*piggyBac* 等转座子,其中在昆虫个体及昆虫细胞中 *piggyBac* 转座子应用较为成熟。*piggybac* 属于 II 类可移动元件,首次从粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* TN-368 细胞系中分离^[16],它已被广泛应用于转化昆虫细胞及转基因家蚕研究。李曦等^[17]构建了 *pigA3GFP-IE-neo-FH-hGM-CSF-polyA-fib-L-intron1*,然后转化家蚕 BmN 细胞,并通过 G418 筛选获得了稳定传代的转化 BmN 细胞系,不过外源基因表达水平不高;赵越等^[8]构建了基于 *piggyBac* 转座子的载体,成功获得转基因家蚕并表达外源基因人胰岛素样生长因子 (hIGF- I);薛仁宇等^[18]同样构建了 *piggyBac* 转座子的载体,包含有新霉素抗性基因 (*neo*)、*gfp*、hIGF- I。

pIZT/V5-His 是 Invitrogen 公司开发的一种能在昆虫 Sf9 细胞中稳定表达外源基因的非转座子载体,该载体利用黄杉毒蛾核型多角体病毒 (*Orgyia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus, OpNPV) 的 *ie-1* 和 *ie-2* 启动子分别控制 Zeocin-GFP 的融合表达与外源基因的表达,当构建好的重组质粒转染细胞后,通过一定浓度的博来霉素筛选可获得稳定表达外源基因的细胞系。目前该载体已经广泛应用于各种外源基因的表达, Wang 等^[10]将蜚蠊属的 C 因子的基因克隆至载体 pIZT/V5-His 然后转染 Sf9 细胞,实现了该基因的稳定表达;孙延波等^[11]构建重组载体 pIZT/V5-His-mlL-4,转染 Sf9 细胞,获得了稳定表

达的细胞系;韩凤丽等^[9]把对虾的酚氧化酶原基因克隆进入载体 pIZT/V5-His,然后诱导大肠杆菌 BL21,使得酚氧化酶原基因成功表达。由此可以看出该载体可以在多种不同种类细胞中表达不同种类的蛋白。本研究中, hGM-CSF 在 BmN 细胞中稳定表达表明 OpNPV 的 *ie-1* 启动子在家蚕 BmN 细胞中也具有活性, pIZT/V5-His 可以用于在家蚕 BmN 细胞中表达外源基因,进一步可以推测该载体也有可能用于昆虫种系转化研究。

该载体转染时与 *piggybac* 不同,转化过程不需要辅助质粒,直接将重组的载体加脂质体配成转染液即可进行转染,并且随机插入宿主基因组,转染效率高,24 h 之内即可看到绿色荧光细胞。*Piggybac* 转座子一般在宿主基因组的 TTAA 处插入^[13,18,20-22],迄今为止还没有关于载体 pIZT/V5-His 插入具有偏爱性的报道,该方面还需要进一步研究。从转染细胞荧光观察结果显示,不同转化细胞所表现的绿色荧光强度存在明显差异,这可能是 *gfp* 表达元件在不同细胞中的拷贝数不同或由于整合在细胞基因组的位置不同从而表达水平不同。由此可以推测,通过对外源 DNA 插入区域的基因序列分析,有可能会获得新的增强子或者沉默子。

BmN 细胞大约 3 d 传代 1 次。本研究用质粒 pIZT-IE-hGM-CSF 转染 BmN 细胞,24 h 后可观察到一小部分绿色荧光细胞,随着使用 Zeocin 抗生素的筛选,荧光细胞比例逐渐增加,从图 2 可看出,到 1 个月时荧光细胞可达 70% 以上,我们在该基础上继续筛选至 2 个月,绿色荧光细胞可以维持该比例稳定遗传。*gfp* 在细胞传代大约 10 次后不但没有减弱,而且可以比较稳定地遗传。由此可以初步表明外源基因不是游离的,而是成功整合进了细胞的基因组内。

从本研究的 Western blotting 结果可以看出,转化细胞系在大约 22 kDa 处检测到特异性条带,而正常的 BmN 细胞样品则没有检测到,条带大小比大肠杆菌中表达的 hGM-CSF 的分子量 (16.3 kDa) 稍大,而与杆状病毒介导的 hGM-CSF 在 BmN 中表达的分子量是一致的,这可能是 hGM-CSF 产物在家蚕细胞

中经过翻译后修饰的结果。这些结果说明外源基因 hGM-CSF 在转基因细胞中得到了成功表达, 从而推测该载体也可用于转基因家蚕的研究。通过本研究中 SDS-PAGE 及 ELISA 的实验结果看出, hGM-CSF 在 BmN 细胞中的表达水平很低, 提高外源基因的表达水平仍是一个急需解决的问题。我们设想通过提高外源基因拷贝数, 使用增强子增强外源基因的表达水平, 筛选表达水平高的细胞克隆, 并通过分泌表达等方法来提高外源基因的表达水平。

REFERENCES

- [1] Wu D, Qiu HJ, Tong GZ. Comparison of several expression system. *Biotechnol Bull*, 2002, **2**: 30–34.
吴丹, 仇华吉, 童光志. 几种表达系统的比较. *生物技术通报*, 2002, **2**: 30–34.
- [2] Kenoutis C, Efroze RC, Swevers L, *et al.* Baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells does not alter their transcriptional and differentiating potential but is accompanied by early viral gene expression. *J Virol*, 2006, **80**(8): 4135–4146.
- [3] Hoare J, Waddington S, Thomas HC, *et al.* Complement inhibition rescued mice allowing observation of transgene expression following intraportal delivery of baculovirus in mice. *J Gene Med*, 2005, **7**(3): 325–333.
- [4] Jarvis DL, Oker-Blom C, Summers MD. The role of glycosylation in the transport of foreign glycoproteins through the secretory pathway of Lepidopteran insect cells. *J Cell Biochem*, 1990, **42**: 181–191.
- [5] Cherbas L, Moss R, Cherbas P. Transformation techniques for *Drosophila* cell lines. *Methods Cell Biol*, 1994, **44**: 161–179.
- [6] Jarvis DL, Finn EE. Modifying the insect cell N-glycosylation pathway with immediate early baculovirus expression vectors. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**: 1266–1292.
- [7] Tomita S, Kawai Y, Woo SD, *et al.* Ecdysone—inducible foreign gene expression in stably transformed lepidopteran insect cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2001, **37**: 564–571.
- [8] Zhao Y, Li X, Gong CL, *et al.* Expression of hIGF-I transgenic silkworm sliik gland and transformed BmN cells. *Sci China Ser C: Life Sci*, 2009, **39**(7): 677–684.
赵越, 李曦, 贡成良, 等. 转基因家蚕丝腺组织和转化家蚕培养细胞表达 hIGF- I. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2009, **39**(7): 677–684.
- [9] Guo BY. *Genetic Engineering Pharmacy*. Shanghai: Second Military Medical University Press, 2000: 199–209.
郭葆玉. *基因工程药学*. 上海: 第二军医大学出版社, 2000: 199–209.
- [10] Wang J, Bow H, Ding JL. Functional expression of full length Limulus Factor C in stably transformed Sf9 cells. *Biotechnol Lett*, 2001, **23**: 71–76.
- [11] Sun YB, Li JH, Shi HY. Construction and expression of inset expression vector pIZT/V5-His harboring mIL-4. *J Jilin Univ: Med Edu*, 2006, **32**(2): 194–198.
孙延波, 李菁华, 史红艳. mIL-4 昆虫表达载体 pIZT/V5-His 的构建及其高效表达. *吉林大学学报: 医学版*, 2006, **32**(2): 194–198.
- [12] Kempf J, Snook LA, Vonesch JL, *et al.* Expression of the human μ opioid receptor in a stable Sf9 cell line. *J Biotechnol*, 2002, **95**: 181–187.
- [13] Cao GL, Xue RY, He Z, *et al.* Research on hGM-CSF transgenic silkworm with *piggyBac* transposon. *Acta Sericol Sin*, 2006, **32**: 324–327.
曹广力, 薛仁宇, 何泽, 等. 基于 *piggyBac* 转座子转 hGM-CSF 基因家蚕的研究. *蚕业科学*, 2006, **32**: 324–327.
- [14] Sambrook J, Fritsch EF, Arthus TM. *Molecular Cloning Guide*. 2nd. Beijing: Science Press, 1992.
萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼克阿蒂斯 T. *分子克隆实验指南*. 2 版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [15] Sbi XZ, Harrison RL, Hollister JR, *et al.* Construction and characterization of new *piggyBac* vectors for constitutive or inducible expression of heterologous gene pairs and the identification of a previously unrecognized activator sequence in piggyback. *BMC Biotechnol*, 2007, **7**: 5 [2008–11–20]. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed &pubmedid=17233894>.
- [16] Fraser MJ, Brusca JS, Smith GE, *et al.* Transposon-mediated mutagenesis of a baculovirus. *Virology*, 1985, **145**(2): 356–361.
- [17] Li X, Zhao Y, Gong CL, *et al.* Expression of hGM-CSF in stably transformed BmN cells of *Bombyx mori*. *Acta Sericol Sin*, 2009, **35**(2): 302–307.
李曦, 赵越, 贡成良, 等. 稳定转化家蚕 BmN 细胞表达人粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子. *蚕业科学*, 2009, **35**(2): 302–307.
- [18] Xue RY, Li X, Zhao Y, *et al.* Elementary research into the transformation BmN cells mediated by the *piggyBac* transposon vector. *J Biotechnol*, 2009, **5307**: 1–7.
- [19] Han FL, Cao GL, Xue RY, *et al.* Expression and

purification of prophenoloxidase of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in *E. coli*. *J Changshu Inst Technol*, 2009, **23**(4): 61–64.

韩凤丽, 曹广力, 薛仁宇, 等. 斑节对虾酚氧化酶原在大肠杆菌中的表达基因的表达. 常熟理工学院学报, 2009, **23**(4): 61–64.

[20] Yan HY, Zhong BX, Wang FW. Insect transgenic vector-piggyBac transposon. *Acta Sericol Sin*, 2000, **26**: 98–101.

颜海燕, 钟伯雄, 汪方炜. 昆虫转基因载体-piggyBac

转座子. *蚕业科学*, 2000, **26**: 98–101.

[21] Fraser MJ, Ciszczon T, Elick T, *et al*. Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons *piggybac* (IFP2) and *tagalong* (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect Mol Biol*, 1996, **5**(2): 141–151.

[22] Elick TA, Bauser CA, Fraser MJ. Excision of the *piggyBac* transposable element *in vitro* is a precise event that is enhanced by the expression of its encoded transposase. *Genetica*, 1996, **98**(1): 33–41.



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

蛋白质生物农药

“十一五”国家重点图书出版规划项目

邱德文 主编 (应用生物技术大系)

978-7-03-027524-0 ¥50.00 2010年5月

内容简介

本书内容为现代生物技术前沿之一,是在生物技术快速发展、生物农药备受关注的背景下,在分析了国内外蛋白质生物农药研究进展及其研制经验的基础上编著而成的。全书共分14章,包括蛋白质生物农药的概念及类型, Bt 晶体蛋白的杀虫作用及应用, 细菌源蛋白质生物农药, 真菌源蛋白质生物农药, 蛋白质生物农药对植物的免疫增产功能, 蛋白质生物农药的作用机理, 农药的毒理学评价, 蛋白质生物农药的筛选和评价模型, 蛋白质生物农药的发酵、制备和检测, 蛋白质生物农药的制剂技术和应用, 蛋白质药物的分子生物学研究技术, 蛋白质药物的结构解析与分子设计, 蛋白激酶子转基因植物研究, 蛋白质生物农药的发展前景等。

本书适合于农林院校的农学和植物保护类专业及综合性院校的生命科学相关专业的教师、研究生使用,也可供相关研究领域的科研人员参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文字 (010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目