

利用优化改造的家蚕杆状病毒表达系统提高 NS1 表达产量

李国辉, 李芒芒, 周倩, 胡朝阳, 唐琦, 姚勤

江苏大学生命科学研究院, 江苏 镇江 212013

李国辉, 李芒芒, 周倩, 等. 利用优化改造的家蚕杆状病毒表达系统提高 NS1 表达产量. 生物工程学报, 2015, 31(4): 591-602.

Li GH, Li MM, Zhou Q, et al. Modified baculovirus system for high expression of *Bombyx mori* bidensovirus NS1 in silkworm. Chin J Biotech, 2015, 31(4): 591-602.

摘要: 为优化家蚕杆状病毒表达系统, 提高外源基因的表达产量。文中通过同源重组技术, 用串联的氯霉素基因 (Cm) 表达盒和绿色荧光蛋白基因 (*egfp*) 表达盒将其替换, 从而获得 *Chitinase* 和 *Cystein Protease* 两个基因缺失的家蚕杆状病毒载体。通过转座, 将多角体启动子控制的家蚕二分浓核病毒 (*BmBDV*) *ns1* 基因表达盒, 定点插入到改造后的该分子载体中。将重组载体转染 BmN 细胞, 获得能表达家蚕二分浓核病毒 (*BmBDV*) NS1 的缺失型重组病毒; 另外, 将多角体启动子控制的 *ns1* 基因转座到野生型 Bm-bacmid 中, 获得能表达 *BmBDV* NS1 的野生型重组病毒。将这两种病毒分别皮下注射家蚕, 对感染后的家蚕血液中 NS1 表达水平进行比较, 发现缺失 *Chitinase* 和 *Cystein Protease* 重组病毒感染家蚕血液中, NS1 的表达量是对照组的 3 倍, 从而建立了一种高效表达可溶性 NS1 蛋白的方法, 为靶蛋白的结构与功能研究奠定基础。

关键词: 家蚕杆状病毒载体, 家蚕二分浓核病毒, NS1

Received: August 4, 2014; **Accepted:** September 29, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31270192, 31272507, 31402016), Startup Scientific Research Fund from Jiangsu University (No. 09JDG057).

Corresponding author: Guohui Li. Tel: +86-511-88791702; E-mail: ghli@ujs.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31270192, 31272507, 31402016), 江苏大学高级人才基金 (No. 09JDG057) 资助。

Modified baculovirus system for high expression of *Bombyx mori* bidensovirus NS1 in silkworm

Guohui Li, Mangmang Li, Qian Zhou, Zhaoyang Hu, Qi Tang, and Qin Yao

Institute of Life Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

Abstract: To improve the expression of heterologous genes using baculovirus expression system, we constructed a novel shuttle vector based on the Bm-Bacmid. In the Bm-Bacmid, partial sequences of *Chitinase* and *Cystein Protease* were replaced with a tandem cassette of Cm and *egfp* through homologous recombination. *Bombyx mori* bidensovirus (*BmBDV*) *ns1* under the control of polyhedrin promoter was inserted into the modified Bm-bacmid by transposition. For comparison, *BmBDV ns1* under the control of polyhedrin promoter was also cloned in the wild type Bm-bacmid. The resulting Bm-bacmids were transfected into the cultured BmN cells to prepare recombinant virus to infect silkworms for expression of *BmBDV ns1*. Total proteins of hemocyte from infected silkworms were subjected to Western blotting and ELISA analysis. The yield of *BmBDV* NS1 with the modified vector was three times as much as that with the unmodified vector. The method to improve the yield of *BmBDV* NS1 in silkworms will facilitate the function and three-dimensional structure study of *BmBDV* NS1.

Keywords: Bm-bacmid, *Bombyx mori* bidensovirus, NS1

杆状病毒-昆虫细胞表达系统 (BEVS) 是通过制备携带有外源基因的重组杆状病毒, 感染昆虫或昆虫细胞进行外源蛋白的表达, 表达产物具有正确的空间折叠和糖基化等修饰, 其生物活性接近其对应的天然产物。在 BEVS 中, 常用苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (*AcNPV*) 或者家蚕核型多角体病毒 (*BmNPV*) 用作重组病毒构建的载体, 而在表达外源蛋白时, 我们倾向选择家蚕杆状病毒-昆虫细胞表达系统, 这与我国的家蚕资源丰富及大规模养殖密切相关^[1], 容易获得大量的靶蛋白。家蚕杆状病毒具有容纳外源大片段 DNA 或同时表达多个外源基因的能力; 另外, 家蚕杆状病毒不感染人、畜等脊椎动物, 表达外源蛋白所需时间周期也远短于动物或植物系统, 可通过昆虫或细胞培养对外源蛋白进行大规模生产, 这些特性使 BEVS 成为目前最有效、应用最广泛的一种真核表达

系统^[2]。

尽管 BEVS 系统有诸多优势以及技术上的不断改进, 但在实践中还是面临着一些挑战, 比如在培养的昆虫细胞中表达外源蛋白, 其生产成本较为昂贵^[3]; BEVS 系统中缺乏有效的荧光信号, 难以对转染的细胞中是否产生感染性的重组病毒粒子进行快速判定, 影响外源蛋白表达的进程; 另外, 与原核表达系统相比, 利用 BEVS 系统表达的外源蛋白, 其产量相对较低, 尤其是感染后的细胞最终会裂解, 致使靶蛋白的表达水平及其修饰还未达到最佳状态^[4], 而外源蛋白的表达量和翻译后修饰水平较低, 会在很大程度上限制 BEVS 的应用。研究表明: 通过增强启动子的活性、胞内共表达分子伴侣 Hsp70 等其他蛋白、抑制胞内一些蛋白酶的活性以及延迟细胞裂解等策略, 都可提高 BEVS 中外源基因的表达产量^[5-7]。

家蚕杆状病毒基因组大小为 128 kb, 理论预计有 143 个开放阅读框^[8], 其中几丁质酶和半胱氨酸蛋白酶基因紧挨排列在一起, 其间隔序列有 48 bp。序列分析表明: 几丁质酶基因全长 1 659 bp, 编码一个由 552 个氨基酸组成的蛋白质; 半胱氨酸蛋白酶基因全长 972 bp, 编码一个由 323 个氨基酸组成的蛋白质, 研究表明几丁质酶能水解家蚕内外表皮、中肠及围食膜组织中的几丁质, 促进虫体液化, 而半胱氨酸蛋白酶与细胞裂解直接相关, 能降解宿主体内蛋白^[9-11]。因此, 本文通过同源重组技术, 对家蚕杆状病毒穿梭载体中 *Chitinase* 和 *Cystein Protease* 基因进行缺失, 以缺失后的 Bm-bacmid 为分子载体, 构建能表达家蚕二分浓核病毒 NS1 蛋白的重组病毒, 从而延迟细胞裂解及虫体液化的时间, 以期提高家蚕血液中 NS1 蛋白的表达产量。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、病毒和试剂

家蚕杆状病毒穿梭载体 Bm-bacmid、

pUC119、pFastHTB-P_{ie1}-egfp-SV40 和 pFastHTB 质粒保存于本实验室。pKOV-Cm 质粒由中山大学科院杨凯教授惠赠。大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 和 DH10B 宿主菌在 LB 培养基中增殖培养。vBm-bacmid-*ns1* 病毒、vBm-bacmid 病毒和家蚕二分浓核病毒保存于本实验室。氨苄青霉素 (Amp)、卡那霉素 (Kana)、四环素 (Tet)、IPTG、L-(+) 阿拉伯糖、X-gal 和 OPD 均购自上海朝瑞生物公司。NS1 单克隆抗体由上海 Abmart 公司定制。羊抗小鼠 IgG-HRP 和胎牛血清白蛋白 (BSA) 购自武汉博士德生物公司。*Hind* III、*Pst* I、*Xba* I、*Spe* I、*Sac* I、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶和 pMD18-T 载体购自宝生物工程 (大连) 有限公司。引物 (表 1) 合成和序列测定由上海捷瑞生物公司完成。

1.2 重组质粒 pUC119-US-Cm-P_{ie1}-egfp-SV40-DS 的构建

通过软件 Primer Premier 5.0 设计 4 对特异性引物, 首先通过 US-F 和 US-R 从 Bm-bacmid 中扩增长度为 551 bp 的 US 片段, 对 US 片段与 pUC119 质粒分别进行 *Hind* III 和 *Pst* I 双酶切,

表 1 本研究所需引物列表

Table 1 Primers used in the study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Enzyme digestion site
US-F	GCA <u>AAGCTT</u> CGTATGCGTTTTGCTCGT	<i>Hind</i> III
US-R	AACTGCAGCGCGCCAAGTTGGAAGT	<i>Pst</i> I
Cm-F	AACTGCAGCTTCGAATAAATACCTGTGA	<i>Pst</i> I
Cm-R	AATCTAGAAACCAGCAATAGACATAAGC	<i>Xba</i> I
P _{ie1} -egfp-SV40-F	GCTCTAGAGTAGGTTATTGATAAAAATGAAC	<i>Xba</i> I
P _{ie1} -egfp-SV40-R	CGAGCTCGATCCAGACATGATAAGATACATTG	<i>Sac</i> I
DS-F	GCGAGCTCGGAATTGATTAATCTGTCTG	<i>Sac</i> I
DS-R	AGAGCTCAGCAGTAGACGCAAGTTTCG	<i>Sac</i> I
<i>ns1</i> -F	ATACTAGTATGGAATCGAAGTCAAATTT	<i>Spe</i> I
<i>ns1</i> -R	TACTCGAGCTACCCATAATATTTATATATACG	<i>Xho</i> I

Underlined letters indicate restriction enzyme digestion sites.

将酶切后的产物进行连接,获得 pUC119-US 重组质粒;其次通过 Cm-F 和 Cm-R,从 pKOV-Cm 质粒中扩增长度为 1 039 bp 的 Cm 表达盒,对其进行 *Pst* I 和 *Xba* I 双酶切,将酶切后的 Cm 表达盒与 pUC119-US 进行连接,获得 pUC119-US-Cm;通过 *P_{ie1}-egfp-SV40-F* 和 *P_{ie1}-egfp-SV40-R* 从 pFastHTB-P_{ie1}-egfp-SV40 质粒中扩增长度为 1 544 bp 的 *egfp* 表达盒,对其进行 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切,将酶切的 *egfp* 表达盒与经过同样双酶切的 pUC119-US-Cm 进行连接,获得重组质粒 pUC119-US-Cm-P_{ie1}-egfp-SV40;最后通过 DS-F 和 DS-R 引物对,从 Bm-bacmid 中扩增长度为 519 bp 的 DS 片段,对其进行 *Sac* I 酶切,将其与 *Sac* I 单酶切的 pUC119-US-Cm-P_{ie1}-egfp-SV40 载体进行连接,由于 DS 片段两端都为 *Sac* I 酶切位点,不能与载体进行定向连接,因此,需要对平板上的克隆进行反复鉴定,将序列测定正确的重组质粒命名为 pUC119-US-Cm-P_{ie1}-egfp-SV40-DS。

1.3 构建 *Chitinase* 和 *Cystein Protease* 缺失型重组 Bm-bacmid

通过 US-F 和 DS-R 引物对,从 pUC119-US-Cm-P_{ie1}-egfp-SV40-DS 质粒中扩增长度为 3 653 bp 的 US-Cm-P_{ie1}-egfp-SV40-DS 片段,对扩增的目的 DNA 片段进行切胶回收,将回收的 DNA 片段浓度定为 200 ng/μL。将 pBAD-gbaA 质粒转化含有家蚕杆状病毒穿梭载体 Ba-bacmid 的 DH10B 细胞中,在 200 μL 的 DH10B 感受态细胞中添加 5 μg 纯化的 US-Cm-P_{ie1}-egfp-SV40-DS 片段,将其放置在冰上冷浴 30 min,转移至预冷的 0.2 cm 电激杯中,在电压 2.3 kV、电阻 200 Ω 和电容 25 μF 的参数条件下进行电激转化,往电击后的溶液中加入 800 μL SOC 培养基,37 °C 振

荡培养 1 h,在 L-(+)阿拉伯糖的诱导下,pBAD-gbaA 质粒能表达同源重组酶,从而可介导 US-Cm-P_{ie1}-egfp-SV40-DS 与 Bm-bacmid 进行同源重组,进而可将串联的 US-Cm-P_{ie1}-egfp-SV40 替换 Bm-bacmid 中 *Chitinase* 和 *Cystein Protease* 中的部分片段,因此,发生同源重组的 Bm-bacmid 可在抗性平板 (20 μg/mL Cm 和 50 μg/mL Kana) 上生长。挑取抗性平板上的克隆在 LB 液体培养基中培养,抽提培养后菌体中的重组 Bm-bacmid,通过不同的引物对其进行多轮 PCR 验证,将缺失 *Chitinase* 和 *Cystein Protease* 两个基因的 Bm-bacmid 命名为 Bm-bacmid (ChiA⁻/CP⁻)。

1.4 表达家蚕二分浓核病毒 NS1 蛋白的重组 Bm-bacmid 的构建

通过转座,将多角体启动子控制的 *ns1* 表达盒定点插入到改造后的 Bm-bacmid (ChiA⁻/CP⁻) 中,具体实施流程如下:通过 *ns1-F* 和 *ns1-R* 从家蚕二分浓核病毒基因组中扩增 *ns1* 基因,对扩增片段进行 *Spe* I 和 *Xho* I 双酶切,将酶切后的纯化片段与经同样双酶切的 pFastHTB 质粒进行连接,产生重组质粒 pFastHTB-*ns1*。

采用氯化钙方法^[12],制备含有 Bm-bacmid 及辅助质粒的大肠埃希菌 DH10B 感受态细胞,将 5 ng 的重组质粒 pFastHTB-*ns1* 添加到 DH10B 感受态细胞中,42 °C 热激 45 s 后,将 800 μL SOC 培养基加入到转化后的溶液中,在 37 °C、225 r/min 振荡培养 2 h,取 100 μL 培养液与 40 μg/mL IPTG 和 20 mg/mL X-gal 混合,分别涂布于含三抗 K⁺T⁺G⁺ (50 μg/mL 卡那霉素,5 μg/mL 四环素,7 μg/mL 庆大霉素) LB 平板上,37 °C 培养 36-48 h,对平板上较大的白色单菌落进行 PCR 鉴定。理论上,在转座酶的作用下,重组质粒

pFastHTB-*ns1* 中 Tn7L-Tn7R 之间的序列,可定点插入到 Bm-bacmid (ChiA⁻/CP⁻) 中,从而获得可表达 BmBDV NS1 蛋白的重组 Bm-bacmid-*ns1* (ChiA⁻/CP⁻)。

1.5 制备重组病毒上清

从 DH10B 大肠杆菌细胞中抽提重组 Bm-bacmid-*ns1* (ChiA⁻/CP⁻), 在 Cellfectin® (Invitrogen) 的介导下,将这重组杆状病毒载体转染 BmN 细胞,对转染后的细胞进行荧光显微观察,转染 96 h 后,对能观察到荧光的转染孔中,收集其孔中的细胞转染上清,将收集的转染上清感染 BmN 细胞,对感染后的 BmN 细胞进行荧光显微观察,收集感染 96 h 后的病毒上清,从而获得表达 BmBDV NS1 的病毒 vBm-bacmid-*ns1* (ChiA⁻/CP⁻);另外,将本实验室保存的 vBm-bacmid-*ns1* (不缺失 *Chitinase* 和 *Cystein Protease* 基因) 病毒感染 BmN 细胞,收集感染 96 h 后的 vBm-bacmid-*ns1* 上清溶液。

1.6 Western blotting 分析和 ELISA 测定

从皮下注射 5 μL vBm-bacmid-*ns1* (ChiA⁻/CP⁻) 病毒液到 4 龄家蚕 (306 品系,易感品种) 体内,共注射 30 头易感品系家蚕;另外,从皮下分别注射 5 μL vBm-bacmid-*ns1* 病毒液到 30 头 4 龄同品系的家蚕中,每天给它们添饲新鲜的桑叶,于 27 °C 的室温条件下自然生长,通过体式荧光显微镜对感染病毒的家蚕进行荧光观察,可对病毒在家蚕体内的增殖动态过程进行实时了解,收集两种病毒感染后的家蚕血液,并对家蚕血液中表达的 NS1 蛋白进行 Western blotting 检测。通过 ELISA 实验对两种家蚕血液中的 NS1 蛋白浓度进行测定,将待检测的抗原固定于酶标孔中,每孔 100 μL 于 4 °C 孵育 12 h,加入 5%脱脂奶粉于 37 °C 封闭 2 h,倾

去孔中的溶液并用 PBS-T 洗涤 3 次,每次 3 min,加入 NS1 单克隆抗体于 37 °C 孵育 1 h,接着加入羊抗小鼠 IgG-HRP 于 37 °C 孵育 0.5 h,倾去孔中溶液并洗涤 3 次,加入 OPD 底物显色,37 °C 湿盒温育 30 min,通过 2 mol/L H₂SO₄ 终止显色反应,利用酶标仪测定其在 492 nm 波段处的吸光值,以系列浓度的 BSA 与其对应的 OD 值做标准曲线用作参考。

2 结果

2.1 重组质粒 pUC119-US-Cm-P_{ie1}-egfp-SV40-DS 的构建流程

为获得同源四联体片段 US-Cm-P_{ie1}-egfp-SV40-DS,通过酶切、连接的方式,将扩增的几丁质酶基因上游片段 US、Cm 表达盒、*ie1* 启动子控制的 *egfp* 基因表达盒以及半胱氨酸蛋白酶基因下游片段 DS,依次与 pUC119 载体及载体中间产物进行连接,从而获得重组质粒 pUC119-US-Cm-P_{ie1}-egfp-SV40-DS,具体构建流程如图 1 所示。

鉴于该重组质粒中酶切位点的复杂性,通过多轮 PCR 对该质粒进行反复鉴定,通过 US-F/US-R 引物对扩增长度为 551 bp 的 US 片段 (图 2,泳道 1);通过 Cm-F/Cm-R 引物对扩增长度为 1 079 bp 的 Cm 表达盒 (图 2,泳道 2);通过 P_{ie1}-egfp-SV40-F/P_{ie1}-egfp-SV40-R 引物对扩增长度为 1 544 bp 的 *egfp* 表达盒 (图 2,泳道 3);通过 DS-F/DS-R 引物对扩增长度为 514 bp 的 DS 片段 (图 2,泳道 4);通过 US-F/Cm-R 引物对扩增长度为 1 630 bp 的 US+Cm 表达盒 (图 2,泳道 5);通过 US-F/P_{ie1}-egfp-SV40-R 引物对扩增长度为 3 174 bp 的 US+Cm 表达盒+*egfp* 表达盒 (图 2,泳道 6);通过 US-F/DS-R 引物对扩

增长长度为 3 688 bp 的 US+Cm 表达盒+*egfp* 表达盒+DS 片段 (图 2, 泳道 7); 通过 Cm-F/*P_{iel}-egfp-SV40-R* 引物对扩增长度为 2 623 bp 的 Cm 表达盒+*egfp* 表达盒 (图 2, 泳道 8) 通过 Cm-F/DS-R 引物对扩增长度为 3 137 bp 的 Cm 表达盒+*egfp* 表达盒+DS 片段 (图 2, 泳

道 9); 通过 *P_{iel}-egfp-SV40-F/DS-R* 引物对扩增长度为 2 058 bp 的 *egfp* 表达盒+DS 片段 (图 2, 泳道 10), 对扩增产物进行 DNA 凝胶电泳, 结果与理论预计一致, 将 PCR 鉴定的重组质粒进行序列测定, 结果表明测定序列与理论序列完全一致。

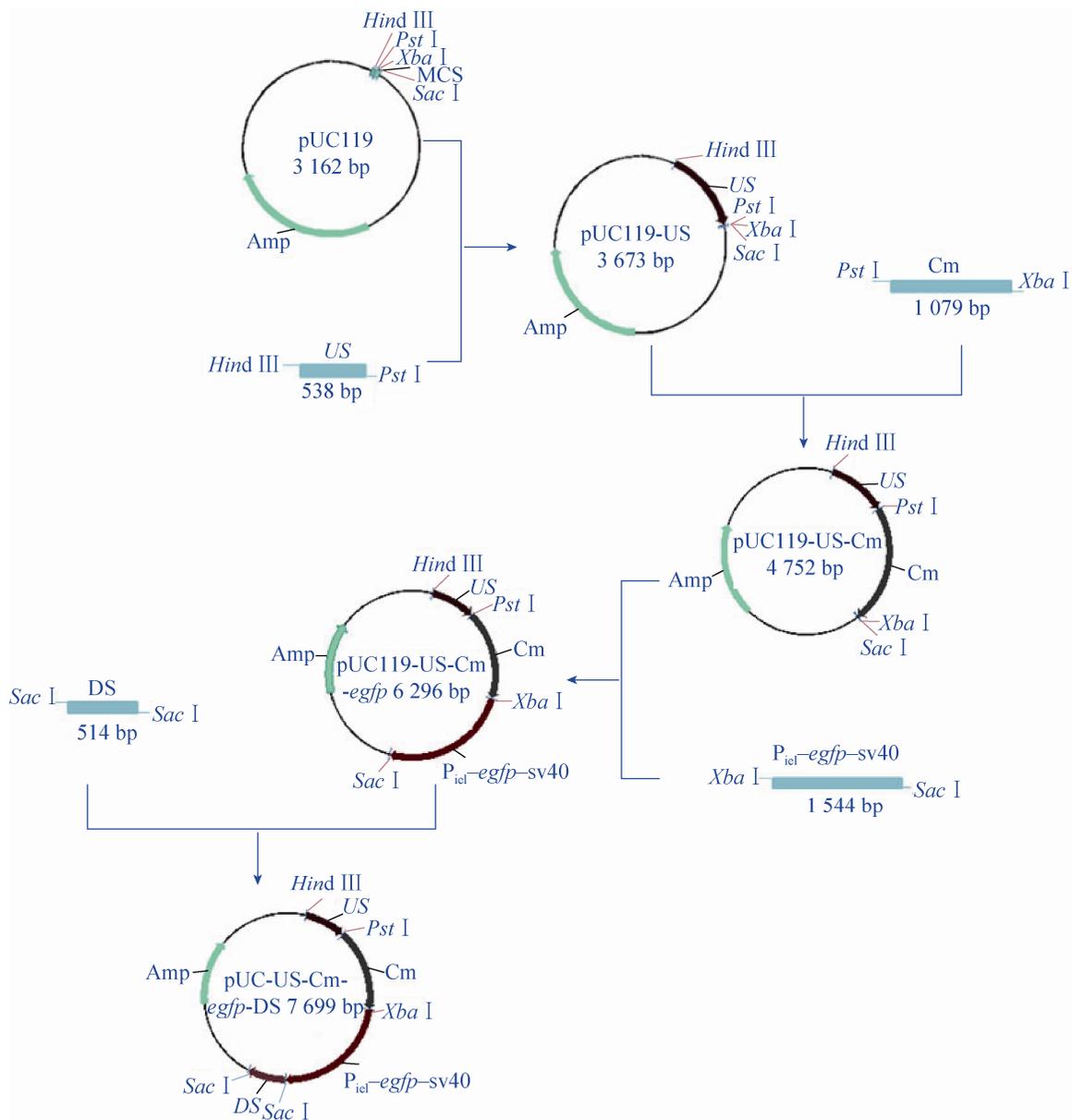


图 1 重组质粒 pUC119-US-Cm-P_{iel}-egfp-SV40-DS 的构建流程示意图

Fig. 1 Strategy for construction of the recombinant plasmid pUC119-US-Cm-P_{iel}-egfp-SV40-DS.

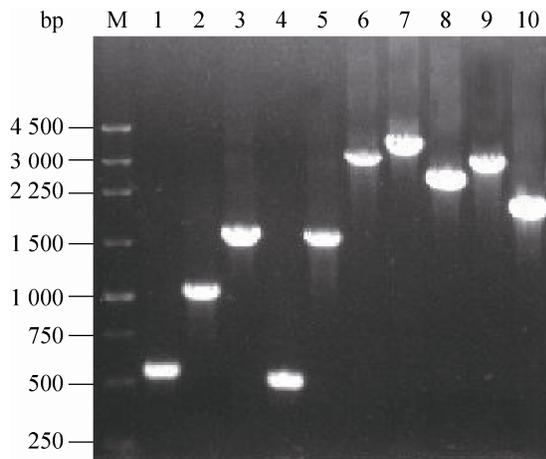


图 2 重组质粒 pUC119-US-Cm-Pie1-egfp-SV40-DS 的鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pUC119-US-Cm-Pie1-egfp-SV40-DS. M: DNA marker; 1-10: the PCR product amplified from pUC119-US-Cm-Pie1-egfp-SV40-DS with different primer pairs.

2.2 重组 Bm-bacmid (ChiA⁻/CP⁻) 的鉴定

重组 Bm-bacmid (ChiA⁻/CP⁻) 和野生型 Bm-bacmid 如图 3 A 所示, 通过同源重组, 使串联的 *Cm* 和 *egfp* 表达盒替换串联的 *Chitinase* 和 *Cystein Protease* 基因中的部分 DNA 片段。利用不同的引物对在重组 Bm-bacmid (ChiA⁻/CP⁻) 和野生型 Bm-bacmid 上所处的位置 (图 3B) 不同, 分别从野生型和缺失型 Bm-bacmid 中进行 PCR 扩增, 对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析 (图 3C)。泳道 1、3、5、7、9: 以缺失型 Bm-bacmid (ChiA⁻/CP⁻) 为模板, 分别通过 Cm-F/Cm-R 扩增 Cm 基因表达盒、Pie1-egfp-SV40-F/Pie1-egfp-SV40-R 扩增 *egfp* 基因表达盒、Cm-F/Pie1-egfp-SV40-R 扩增 Cm 与 *egfp* 基因表达盒、US-F/Cm-R 扩增 US 与 Cm 表达盒, 以及 US-F/DS-R 扩增包括 US、Cm 表达盒、*egfp* 基因表达盒与 DS 4 个 DNA 片段; 泳道 2、4、

6、8、10: 以野生型 Bm-bacmid 为模板, 以 Cm-F/Cm-R、Pie1-egfp-SV40-F/Pie1-egfp-SV40-R、Cm-F/Pie1-egfp-SV40-R、US-F/Cm-R 及 US-F/DS-R 为引物对进行扩增, 扩增产物用作阴性对照, 电泳结果与理论预计相一致, 表明已成功获得重组 Bm-bacmid (ChiA⁻/CP⁻), 可用作表达外源基因的分子载体。

2.3 荧光显微观察

为鉴定缺失的 Bm-bacmid (ChiA⁻/CP⁻) 能否产生具有感染性的病毒粒子, 对重组 Bm-bacmid (ChiA⁻/CP⁻) 转染的细胞进行荧光显微观察, 结果如图 4 A 所示: 转染 24 h 后, 在细胞之中能观察到一些零星的绿色荧光, 转染 48 h 后, 发现在视野中能观察到的绿色荧光信号越来越多, 到转染 96 h 后, 80% 的视野中都布满了绿色荧光。为鉴定转染上清中是否产生了感染性的病毒粒子, 将转染 96 h 后的细胞上清与培养的 BmN 细胞孵育 1 h, 弃上清并添加含 10% 胎牛血清的细胞培养基, 对感染后的 BmN 细胞进行荧光显微观察, 结果如图 4 B 所示: 在感染 24-96 h 时间段, 发现细胞中能观察到的绿色荧光越来越多, 说明转染后的上清中能产生具有感染性的病毒粒子, 具有启动下一轮感染的能力。该结果表明: 缺失 *Chitinase* 和 *Cystein Protease* 的重组 Bm-bacmid (ChiA⁻/CP⁻), 不会影响感染性病毒粒子的产生, 以该缺失型杆粒作分子载体, 可用作高效表达外源基因的重组病毒载体。

2.4 重组病毒 vBm-Bacmid-ns1 (ChiA⁻/CP⁻) 的制备

利用鉴定的 Bm-bacmid (ChiA⁻/CP⁻) 为分子载体, 通过转座, 将多角体启动子控制的 *ns1* 基因表达盒定点插入到该载体的转座位点, 利用 M13-F/M13-R 引物对, 对发生转座后的白色

克隆进行 PCR 鉴定, 未发生转座的 Bm-bacmid 中扩增产物为 280 bp 左右, 而发生转座的 Bm-bacmid 中扩增产物为 3 200 bp 左右, 电泳

结果如图 5 所示, 其结果与理论预计相一致, 表明 *nsI* 基因表达盒已成功地插入到 Bm-bacmid ($\text{ChiA}^-/\text{CP}^-$) 转座位点。

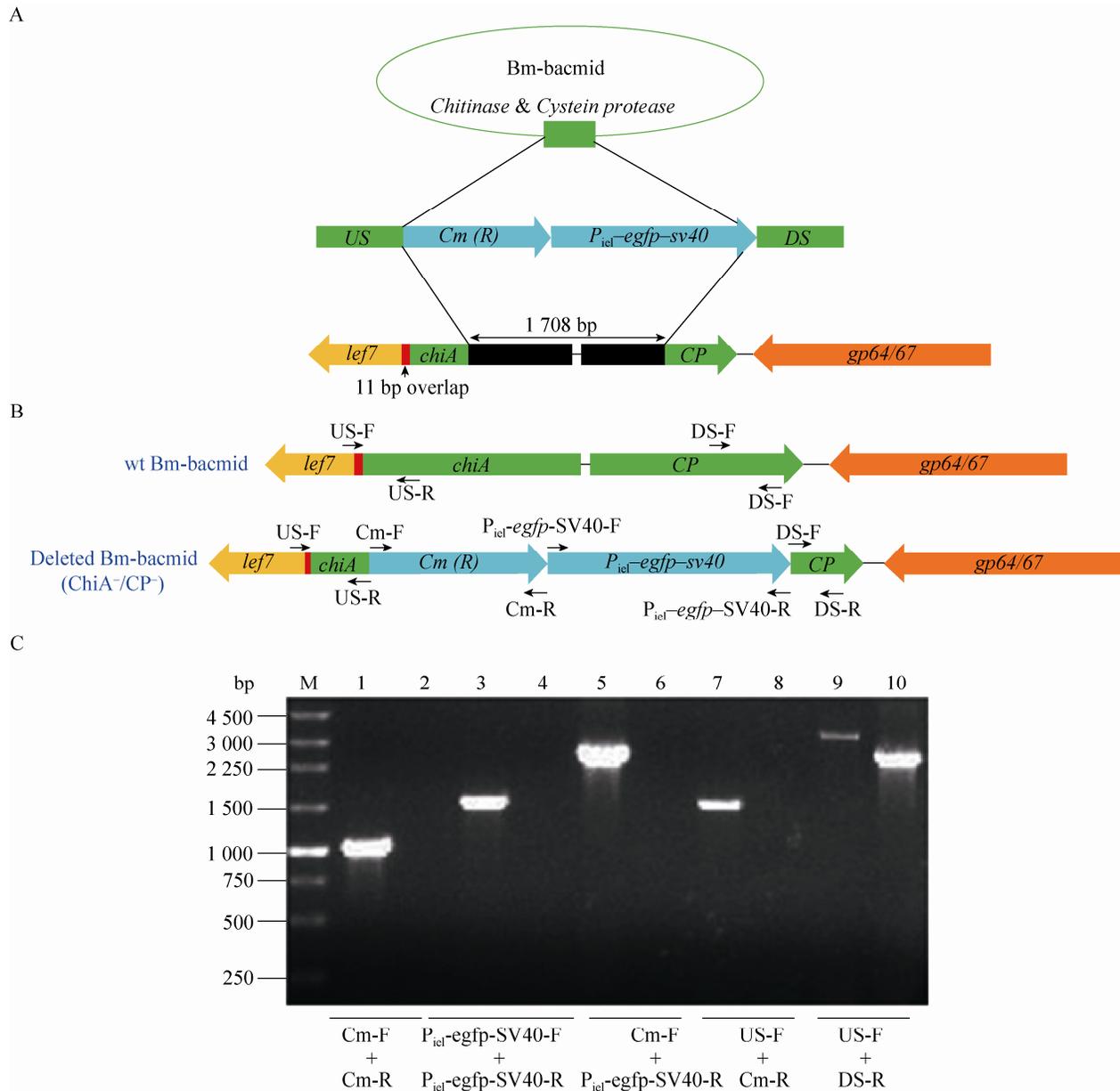


图 3 缺失型重组 Bm-bacmid ($\text{ChiA}^-/\text{CP}^-$) 的构建流程示意图和 PCR 鉴定

Fig. 3 Strategy for construction of Bm-bacmid ($\text{ChiA}^-/\text{CP}^-$) and confirmation by PCR analysis. M: DNA marker; 1, 3, 5, 7, 9: deleted Bm-bacmid; 2, 4, 6, 8, 10: wt Bm-bacmid.

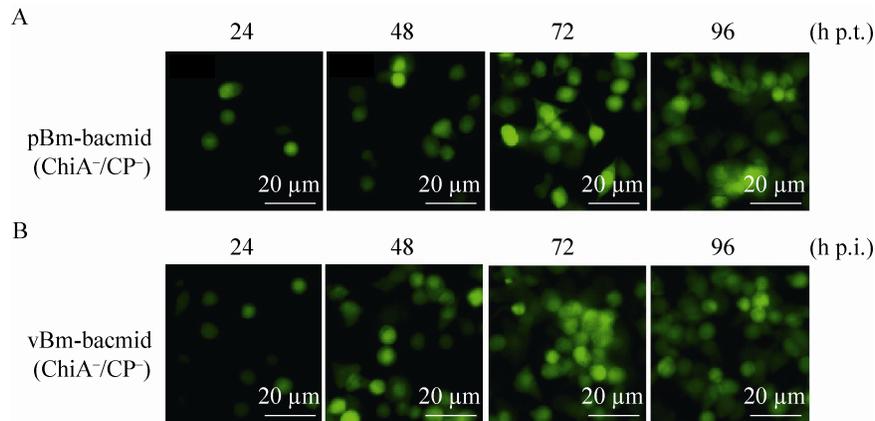


图 4 转染或感染的 BmN 细胞中不同时间点的荧光显微观察

Fig. 4 Fluorescence micrographs of BmN cells transfected with bacmids or infected with virus at different time points.

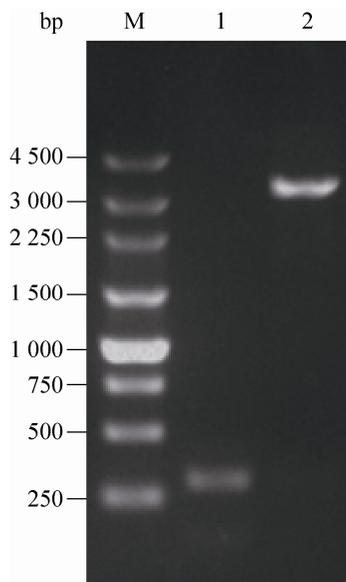


图 5 重组 Bm-bacmid-*ns1* (ChiA⁻/CP⁻) 的 PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of the recombinant Bm-bacmid-*ns1*(ChiA⁻/CP⁻) by PCR.

抽提重组 Bm-bacmid-*ns1* (ChiA⁻/CP⁻), 通过脂质体的介导, 将其转染培养的 BmN 细胞, 对转染后的细胞进行绿色荧光显微观察, 收集有荧光的孔中上清溶液, 将其再次感染培养的 BmN 细胞, 收集感染 96 h 后的细胞上清, 从而

获得重组病毒 vBm-bacmid-*ns1* (ChiA⁻/CP⁻) 溶液, 可用于下一步的家蚕感染实验中。

2.5 两种重组病毒感染的家蚕血液中 NS1 蛋白的鉴定

分别收集 vBm-bacmid-*ns1* (ChiA⁻/CP⁻) 和 vBm-Bacmid-*ns1* 病毒感染的家蚕血液, 以 vBm-Bacmid 病毒感染的家蚕血液为空白对照 (图 6 泳道 1), 对收集的家蚕血液蛋白浓度进行测定, 对等量的家蚕血液蛋白进行 Western blotting 分析, 以 NS1 单克隆抗体为一抗进行孵育, 偶联有碱性磷酸酶的马抗小鼠 IgG 为二抗, 通过 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶试剂盒对其进行显色, 结果表明: 重组病毒 vBm-bacmid-*ns1* (ChiA⁻/CP⁻) 和 vBm-bacmid-*ns1* 病毒感染的家蚕血液中, 都能够鉴定到 NS1 的表达, 但它们的表达量有明显的差异, 在 vBm-bacmid-*ns1* (ChiA⁻/CP⁻) 病毒感染的家蚕血液中, 其靶蛋白 NS1 (图 6 泳道 3) 的表达量明显多于对照组 (图 6 泳道 2)。利用 ELISA 方法对家蚕血液中 NS1 蛋白浓度进行测定, 结果发现 vBm-bacmid-*ns1* (ChiA⁻/CP⁻) 病

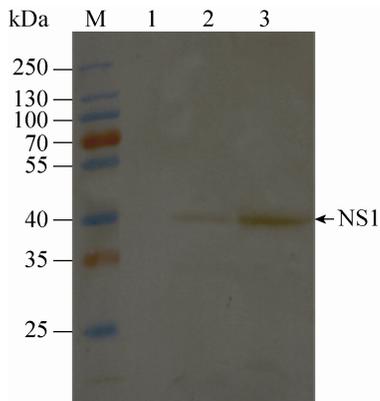


图 6 病毒感染的家蚕血液中 NS1 蛋白鉴定

Fig. 6 Western blotting analysis of *BmBDV* NS1 protein from the hemocyte of silkworms.

毒感染的家蚕血液中，NS1 蛋白浓度大约是对照组的 3 倍，该结果表明：以缺失几丁质酶和半胱氨酸蛋白酶基因的病毒为载体，能有效地提高 *BmBDV* NS1 的表达。

3 讨论

家蚕是我国一种具有重要经济价值的昆虫，主要以桑叶为食，只需要一些简单的设备就可对家蚕进行大规模饲养，其生产的蚕丝是我国农业经济的重要组成部分，在改善民生和可持续发展中起着重要的作用。2009 年已完成家蚕全基因组序列的测定和分析^[13]，其遗传背景清楚，饲养成本低廉，在家蚕体内表达外源蛋白所需时间较短，容易对靶蛋白进行大规模生产，是一种非常优良的生物反应器，也是实现基因工程产业化的理想载体。另外，Luckow 等和 Possee 等^[14-15]建立了一种高效、快速的用来构建重组病毒的筛选体系，剔除了多轮空斑筛选的繁琐程序，提高重组病毒的阳性得率，由此，极大地简化了家蚕重组杆状病毒的构建、分离、鉴定以及定量，由此使家蚕杆状病毒表

达系统的应用得到了推广。自 1985 年利用该系统首次成功表达人干扰素- α 以来^[1]，截止到目前为止，已通过 BEVS 在家蚕体内成功地表达了乙型肝炎表面抗原、人酸性/碱性成细胞生长因子、荧光素酶以及纤维素酶等上千种具有重要功能的重组蛋白^[16-20]。

尽管 BEVS 系统有诸多优势以及技术上的不断改进，但在实践中还是面临着一些挑战，比如在培养的昆虫细胞中表达外源蛋白，其生产成本较为昂贵^[21]；其次，BEVS 系统中缺乏有效的荧光信号，难以对转染的细胞中是否产生感染性的重组病毒粒子作出快速判定，影响外源蛋白表达的进程；最关键的是，与原核表达系统相比，在 BEVS 中所表达的外源蛋白，其产量相对较低，尤其是感染后的细胞最终会裂解，致使靶蛋白的表达水平及其修饰还未达到最佳状态^[22]，这些不足之处在一定程度上都限制了 BEVS 系统的使用。

为优化家蚕杆状病毒-昆虫细胞表达系统，本文对家蚕杆状病毒穿梭载体上的一些序列进行改造，通过同源重组技术，使串联的 *Cm* 基因表达盒和 *egfp* 表达盒成功地替换家蚕杆状病毒载体中的 *Chitinase* 和 *Cystein Protease*，通过荧光显微观察，证实这两个基因的缺失并不影响家蚕杆状病毒的增殖，可用作表达外源基因的分子载体；同时，在家蚕杆状病毒载体中引入绿色荧光信号，也极大地简化了转染或感染细胞中重组病毒粒子的鉴定，缩短了外源蛋白表达所需的时间。Lee 等也曾构建 *Chitinase* 基因缺失的病毒，利用该缺失载体来构建可表达纤维素酶的重组病毒，结果发现在感染的家蚕幼虫中，纤维素酶的表达量提高了 17%^[23]；另外，通过抑制组织蛋白酶的表达，可提高绿色

荧光蛋白 3 倍的表达量^[24]。在本研究中,利用 *Chitinase* 和 *Cystein Protease* 基因同时缺失的 Bm-bacmid 为分子载体,缺失有效地提高了 BmBDV NS1 的表达产量。由此可知,通过缺失 *Chitinase* 和 *Cystein Protease* 基因,延长病毒感染的昆虫细胞存活时间,抑制靶蛋白的降解,确实显著地提高了 *ns1* 的表达量,为 NS1 蛋白的功能与结构研究奠定基础,同时也为大规模表达其他功能蛋白提供参考。

REFERENCES

- [1] Maeda S, Kawai T, Obinata M, et al. Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 1985, 315(6020): 592–594.
- [2] Kato T, Kajikawa M, Maenaka K, et al. Silkworm expression system as a platform technology in life science. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85(3): 459–470.
- [3] Tiwari P, Saini S, Upmanyu S, et al. Enhanced expression of recombinant proteins utilizing a modified baculovirus expression vector. *Mol Biotechnol*, 2010, 46(1): 80–89.
- [4] Ikononou L, Schneider YJ, Agathos SN. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62(1): 1–20.
- [5] Pijlman GP, de Vrij J, van den End FJ, et al. Evaluation of baculovirus expression vectors with enhanced stability in continuous cascaded insect-cell bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 87(6): 743–753.
- [6] Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(5): 567–575.
- [7] Fath-Goodin A, Kroemer J, Martin S, et al. Polydnavirus genes that enhance the baculovirus expression vector system. *Adv Virus Res*, 2006, 68: 75–90.
- [8] Gomi S, Majima K, Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol*, 1999, 80 (Pt 5): 1323–1337.
- [9] Hawtin RE, Zarkowska T, Arnold K, et al. Liquefaction of autographa californica nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology*, 1997, 238(2): 243–253.
- [10] Hodgson JJ, Arif BM, Krell PJ. Interaction of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus cathepsin protease progenitor (proV-CATH) with insect baculovirus chitinase as a mechanism for proV-CATH cellular retention. *J Virol*, 2011, 85(8): 3918–3929.
- [11] Kadono-Okuda K, Yamamoto M, Higashino Y, et al. Baculovirus-mediated production of the human growth hormone in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 213(2): 389–396.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 20–25.
- [13] Xia Q, Guo Y, Zhang Z, et al. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*). *Science*, 2009, 326(5951): 433–436.
- [14] Luckow VA, Lee SC, Barry GF, et al. 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.
- [15] Possee RD, Hitchman RB, Richards KS, et al. Generation of baculovirus vectors for the high-throughput production of proteins in insect cells. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 101(6): 1115–1122.
- [16] Likhordova OA, Bachurina Elu, Azimova ShS. Biosynthesis of recombinant human hepatitis B M-HBsAg in silkworm larvae. *Mol Biol (Mosk)*, 2004, 38(4): 717–722.
- [17] Wu X, Kamei K, Sato H, et al. High-level expression of human acidic fibroblast growth factor

- and basic fibroblast growth factor in silkworm (*Bombyx mori* L.) using recombinant baculovirus. *Protein Expr Purif*, 2001, 21(1): 192–200.
- [18] Palhan VB, Sumathy S, Gopinathan KP. Baculovirus mediated high-level expression of luciferase in silkworm cells and larvae. *Biotechniques*, 1995, 19(1): 97–98.
- [19] Lee KS, Je YH, Woo SD, et al. Production of a cellulase in silkworm larvae using a recombinant *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus lacking the virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(9): 645–650.
- [20] Jarvis DL, Fleming JA, Kovacs GR, et al. Use of early baculovirus promoters for continuous expression and efficient processing of foreign gene products in stably transformed lepidopteran cells. *Biotechnology*, 1990, 8(10): 950–955.
- [21] Tiwari P, Saini S, Upmanyu S, et al. Enhanced expression of recombinant proteins utilizing a modified baculovirus expression vector. *Mol Biotechnol*, 2010, 46(1): 80–89.
- [22] Ikonomou L, Schneider YJ, Agathos SN. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62(1): 1–20.
- [23] Lee KS, Je YH, Woo SD, et al. Production of a cellulase in silkworm larvae using a recombinant *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus lacking the virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(9): 645–650.
- [24] Kim EJ, Kramer SF, Hebert CG, et al. Metabolic engineering of the baculovirus-expression system via inverse "shotgun" genomic analysis and RNA interference (dsRNA) increases product yield and cell longevity. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 98(3): 645–654.

(本文责编 陈宏宇)

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论（不用单列标题书写）。目的 (Purpose)：主要说明作者写此文章的目的，或说明本文主要要解决的问题；方法 (Methods)：重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要，可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results)：本文最后得出的结果（实验数据部分）。结论 (Conclusions)：如系基础研究，应写明本文的创新之处，及文章在讨论部分表述的观点；如系应用性研究，应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望，尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致，但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后，务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的，即使学术上可以达到刊出的水平，本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称，尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊尽量不用，这样可以免好多长句，以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句，避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态，语法正确，句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语，除非是那些人人皆知的（如DNA、ATP等），或者确实是非常长，而且出现多次的短语才允许用缩写语，并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英文摘要中，不要使用任何汉字字符，包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。