

杆状病毒表达载体的应用现状

唐琦 邱立鹏 李东 吴鹏 李国辉*

(江苏大学生命科学研究院 江苏 镇江 212013)

摘要: 杆状病毒是一类具有囊膜的双链环状 DNA 病毒, 主要感染无脊椎动物, 在病毒生活周期中会产生两种不同形态的病毒粒子: 出芽型病毒粒子(BV), 主要负责细胞之间的感染; 包埋型病毒粒子(ODV), 主要负责虫体之间的感染。随着对杆状病毒研究的不断深入, 人们对杆状病毒的应用也越来越广泛, 通过对病毒基因组的改造使其成为一种新颖的真核表达载体, 现已被广泛应用于蛋白生产中; 其次, 由于杆状病毒特有的形态, 可将靶蛋白展示在病毒粒子表面, 进而被应用于诸如医药、临床和生物等多个研究领域中; 此外, 杆状病毒不能在哺乳动物细胞中进行复制, 也不会在这类细胞中增殖和扩散。因此, 杆状病毒不会刺激哺乳动物产生强烈的免疫应答, 也不会对它们造成功能性的损伤, 这些特性使其成为一种极具应用前景的基因治疗载体, 给肿瘤治疗、组织再生和靶向给药等民生领域带来福音。本文就杆状病毒在蛋白表达、表面展示和基因治疗方面的研究进行综述, 为杆状病毒的分子改造和临床应用提供依据。

关键词: 杆状病毒, 表面展示, 蛋白固定, 基因治疗

Current application status of baculovirus expression vector system

TANG Qi QIU Li-Peng LI Dong WU Peng LI Guo-Hui*

(Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract: Baculoviruses are enveloped viruses with double stranded DNA, and specifically infect invertebrates. It produces two types of virions during the life cycle: budded viruses (BVs) and occlusion-derived viruses (ODVs). Baculovirus has been used as an efficient eukaryotic expression vector to produce recombinant viruses for the expression of heterologous proteins in insect cells. Furthermore, heterologous proteins displayed on the surface of BVs have been widely used to screen specific targets in the fields of medicine, clinical treatment, biology and so on. Moreover, Baculovirus is unable to proliferate in mammalian cells, so it won't trigger strong immune response in mammals and won't cause function and tissue damage. Due to these unique advantages, Baculovirus has been developed as a gene therapy vector with a bright prospect in the concerned

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31402016, 81402840); Start-Up Research Funds of Jiangsu University (14JDG026); China Postdoctoral Science Foundation (2015M571675)

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

Received: February 22, 2017; **Accepted:** May 25, 2017; **Published online** (www.cnki.net): August 15, 2017

基金项目: 国家自然科学基金(31402016, 81402840); 江苏大学高级人才启动基金(14JDG026); 中国博士后科学基金(2015M571675)

*通信作者: Tel: 86-511-88791702; E-mail: ghli@ujs.edu.cn

收稿日期: 2017-02-22; **接受日期:** 2017-05-25; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2017-08-15

fields of oncotherapy, tissue regeneration and targeting drugs delivery. This review summarizes the developments of genetically modified baculoviruses in the fields of protein expression, surface display and gene therapy, which will provide theoretical basis for the improvement and wide application of genetically modified baculoviruses.

Keywords: Baculovirus, Protein expression, Surface display, Gene therapy

杆状病毒是一类囊膜包被的双链环状 DNA 病毒, 主要感染无脊椎动物, 已报道被感染的昆虫种类达 600 多种。迄今为止, 已从鳞翅目昆虫(蝴蝶和飞蛾)、膜翅目昆虫(叶蜂)和双翅目昆虫(蚊子)中分离到 600 多株杆状病毒, 完成近 60 株杆状病毒基因组序列的测定, 其基因组大小范围在 80–180 kb, 编码 90–180 个蛋白, 在已测序的杆状病毒中发现 31 个核心基因^[1-3]。杆状病毒会产生两种完全不同形态的病毒粒子(图 1), 即芽生型病毒粒子(BV)和包埋型病毒粒子(ODV)^[4]。它们具有完全相同的遗传组成, 但具有不同的形态、囊膜结构、组成和功能。杆状病毒多角体蛋白(Polyhedrin, Polh)能将多个 ODV 病毒粒子包裹起来, P10 蛋白能够形成纤维状的结构, 这两种蛋白在杆状病毒所表达的蛋白中占很高的比重, 它们的启动子已被用于杆状病毒表达系统(BEVS), 用来启动外源基因的表达^[5]。2016 年 Martínez-Solís 等^[6]对 SeMNPV *orf46* 基因启动子进行研究, 结果在 Sf21、Se301、Hi5 细胞和幼

虫中, 该启动子诱导的绿色荧光蛋白的表达量都是多角体启动子控制下的 2 倍多, 该启动子的鉴定将为 BEVS 的高效表达性能奠定基础。

杆状病毒 DNA 已被成功改造为外源蛋白的表达载体, 目前市场上商业化的杆状病毒载体有 Ac-Bacmid (来源于苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒基因组)和 Bm-Bacmid (来源于家蚕核型多角体病毒基因组)^[7-8]。它们在实际应用过程中具有表达高效和翻译后修饰等一系列优势, 自 1983 年首次成功表达人干扰素- β (IFN- β)以来, 包括人生长因子、人 2,6-唾液酸转移酶、人粒-巨噬细胞集落刺激因子和人抗白蛋白免疫球蛋白 G1 等蛋白都获得了成功表达^[9-11]。到目前为止, 已有 9 种 BEVS 来源的产品被美国 FDA (食品和药物管理局)授权通过上市, 其中有 4 种疫苗 Cervarix[®]、Provenge[®]、Glybera[®]和 Flublok[®]分别用于预防和治疗宫颈癌、前列腺癌、脂蛋白脂酶缺乏遗传病和流感; 5 种疫苗 Porcilis[®] Pesti、BAYOVAC CSF E2[®]、Circumvent[®] PCV、Ingelvac CircoFLEX[®]和 Porcilis[®] PCV 主要用于预防猪疫疾病^[12]。

此外, 杆状病毒基因组能被转导进入哺乳动物细胞中, 但不能在哺乳动物细胞中进行复制, 不具有病毒增殖和细胞间扩散的特性, 也不会刺激哺乳动物产生强烈的免疫应答和对它们造成功能性的损伤, 但有能力将外源的遗传物质转移到哺乳动物细胞内^[13-14]。因此, 杆状病毒载体被视为一种极有应用前景的基因治疗载体, 给肿瘤治疗、再生医学、靶向给药和 RNAi 干扰载体等民生领域中带来福音。本文就杆状病毒载体在蛋白表达、生物医药和临床中的应用情况进行综述, 为杆状病毒载体的研究与分子改造及其应用提供参考。

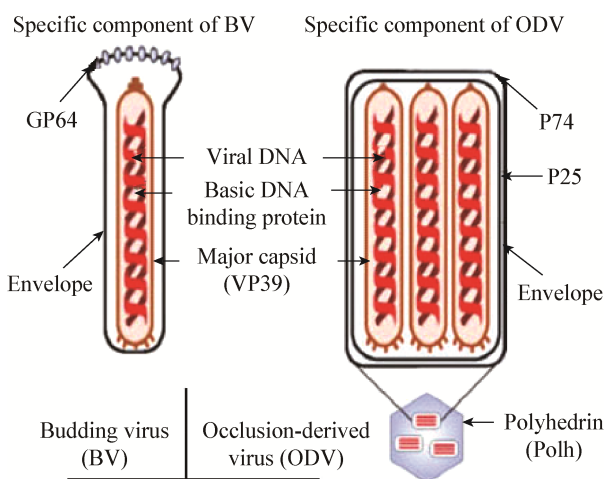


图 1 两种典型的杆状病毒粒子模型示意图

Figure 1 Schematic diagram of two typical baculovirus virions

1 高效的真核表达系统

1.1 杆状病毒表达外源蛋白的技术流程

利用杆状病毒在昆虫细胞中表达外源蛋白, 首先得制备具有感染性的重组病毒, 而用传统的方法制备重组病毒需要经过多轮空斑筛选, 其技术操作繁琐, 仅鉴定与纯化重组病毒粒子就需要耗费一个多月的时间, 还容易得到假阳性重组病毒。自 1993 年 Luckow 等^[7]对杆状病毒基因组进行改造, 使其成为一种可在大肠杆菌细胞中进行增殖的穿梭表达载体。按照 Invitrogen 公司的实验流程^[15]: 将构建好的重组供体质粒转化大肠杆菌 DH10Bac 细胞, 在位点特异性转座酶的帮助下, 供体质粒上 Tn7R-Tn7L 间的 DNA 片段就可以特异性地转座到穿梭表达载体上, 通过蓝白斑筛选和 PCR 鉴定就可获得重组的穿梭表达载体。将鉴定后的穿梭表达载体转染昆虫细胞, 收集转染 72 h 后的细胞培养上清并将其感染昆虫细胞, 对感染后的细胞总蛋白进行 Western blot 分析, 就可确定靶蛋白在昆虫细胞中的表达情况, 整个实验流程大概需一周来完成, 由此可以看出, 重组病毒的构建流程和靶蛋白的表达(图 2)得到了很大的简化。

利用杆状病毒表达系统对外源基因进行表达时, 总体而言有 3 种表达策略^[16]: (1) 构建外源基

因在真核生物或病毒启动子如多角体启动子和 P10 启动子控制下的重组杆状病毒, 将其感染昆虫细胞获得靶蛋白的表达; (2) 将外源基因与杆状病毒囊膜蛋白 GP64 基因进行融合表达, 从而将靶蛋白展示在病毒囊膜表面; (3) 将外源基因与多角体定位序列进行融合表达, 进而将靶蛋白固定在一个特定的区域。为简化靶蛋白的纯化程序^[17], 通过制备的重组杆状病毒感染悬浮的昆虫细胞, 在 27 °C 下恒温培养 72 h, 对悬浮细胞液进行低速离心, 收集含表达有靶蛋白的昆虫细胞, 对收集的细胞进行超声破碎处理, 通过亲和层析就可以从破碎后的细胞悬液中纯化到靶蛋白, 进而用于蛋白结构与功能研究及临床治疗之中。2015 年 Maertens 等^[18]开发了一种 Strep 标签融合蛋白的纯化方法, 该方法可以从任何表达系统中纯化到靶蛋白, 其与靶蛋白最佳结合能力是 9 mg/mL, 并且整个过程都是机器自动化操作, 简化并改进了靶蛋白的纯化工序。由此可见, 通过对杆状病毒载体和昆虫细胞系进行遗传改造, 不断地改善与优化杆状病毒表达系统, 使其不仅能表达人源化的糖蛋白, 也降低了其工业化大规模生产成本, 越来越受到科研人员和企业的青睐。

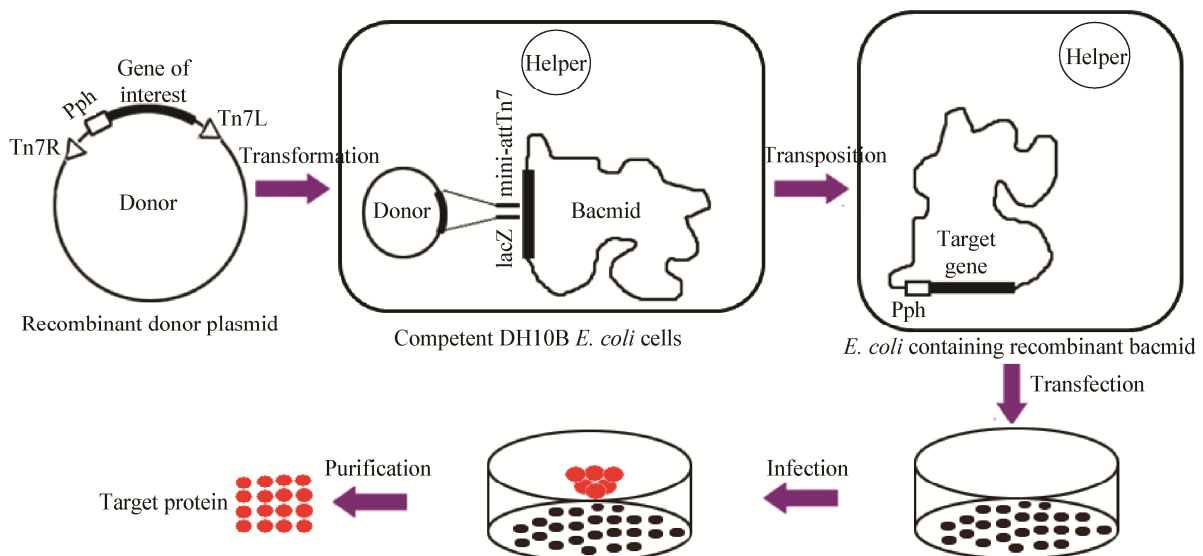


图 2 利用杆状病毒表达外源基因流程示意图

Figure 2 Schematic diagram of baculovirus expressing foreign gene

1.2 杆状病毒表达系统的优势

杆状病毒表达系统(BEVS)是一种真核表达系统, 现已广泛用于外源靶基因的表达和高效价疫苗的生产中, 实践表明该表达系统在外源蛋白的生产过程中具有以下优势^[19]: (1) 表达产物具有正确的折叠构象和糖基化、磷酸化、酰基化和酰胺化等翻译后修饰; (2) 可以同时表达多个外源基因或大片段的外源 DNA; (3) 只特异性地感染无脊椎动物, 该表达系统生物安全性好; (4) 来源于鳞翅目昆虫的细胞培养无需 CO₂ 培养箱, 培养条件相对简单; (5) 外源基因在多角体或 P10 强启动子的驱动下, 其表达产量较高。自 1983 年利用杆状病毒成功表达人干扰素以来, 至今已成功表达数千个蛋白, 包括一些人体疫苗和兽用疫苗(表 1)^[9-10,20-30], 其表达的靶蛋白不尽详叙。

在当今基因工程领域四大表达系统(杆状病毒、大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞表达系统)中, 它们都有各自的优缺点^[31-32]。原核表达系统中外源基因的表达产量相对较高, 因此在表达外源基因时往往首选原核表达系统, 但鉴于其表达产物是以包涵体

形式存在, 产物没有生物活性且缺乏翻译后修饰, 从而限制了该系统的进一步应用。酵母表达系统是一种真核表达系统, 其操作简单、成本低廉, 可大规模进行发酵, 但其只能够对表达产物进行一些简单的糖基化修饰, 表达产物具有一定的生物活性。哺乳动物细胞是一种理想中的真核表达系统, 具有对翻译后的产物进行加工和翻译, 所产生的蛋白在活性方面远胜于其它真核表达系统, 更接近于天然蛋白质, 但由于该系统中的外源蛋白表达量偏低, 并且培养细胞所需要的成本很高, 目前还难以满足大规模的实际应用。

与上述这三种表达系统相比, BEVS 中所表达的产物不仅具有正确的蛋白折叠, 也具有翻译后加工、糖基化和磷酸化修饰等生物学特性, 所表达的产物在生物活性、抗原性和免疫原性都接近于其对应的天然产物, 同时 BEVS 还能表达和组装蛋白复合物, 尤其是在昆虫细胞中组装成病毒样颗粒(VLP), 在疫苗生产中具有重要的应用前景^[33-35], 这些特性使 BEVS 成为一种应用广泛的真核表达系统。

表 1 利用杆状病毒表达的重组蛋白

Table 1 The production of recombinant proteins using BEVS

Recombinant proteins	Expression vector	Expression level	References
IFN- β	AcMNPV	10 $\mu\text{g}/10^6$ Sf9 cells	[9]
IFN- α	BmNPV	50 mg in hemolymph	[20]
Firefly luciferase	BmNPV	13 mg/larva	[21]
Human growth factor	BmNPV	160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hemolymph	[10]
Lipoprotein lipase	AcMNPV	2-3 μg LPL/ 10^6 cells	[22]
HLA-DR4 tetramers	AcMNPV	50-70 mg/L culture	[23]
Human LKB1	AcMNPV	5 mg/L culture	[24]
Human GM-CSF	BmNPV	100 $\mu\text{g}/\text{pupa}$	[11]
Human IL-7	AcMNPV	1.765 mg/mL crude extract	[25]
Protein phosphatase 2A	AcMNPV	250 $\mu\text{g}/\text{g}$ infected larvae	[26]
BmBDV NS1	AcMNPV	12.6 $\mu\text{g}/10$ μL loading sample	[27]
Mouse IFN- β	AcMNPV	40 mg/200 mL culture	[28]
VEGF121	AcMNPV	500 $\mu\text{g}/\text{L}$ Sf9 cells	[29]
Human α -fetoprotein	AcMNPV	1.5 mg/L medium	[30]

1.3 杆状病毒表达系统的不足和改进措施

利用杆状病毒表达系统表达的靶蛋白,其生物活性与野生型蛋白的活性相当。尽管这样,仍有一些因素制约了 BEVS 在实践中的大规模应用。诸如市场上细胞培养基和血清价格非常昂贵,而表达靶蛋白需要大量的昆虫细胞培养基和血清,从而导致靶蛋白的生产成本较高;重组病毒感染昆虫细胞,诱导病毒或细胞 Caspase 等基因的表达,从而引发细胞凋亡,导致细胞生存时间较短,影响靶蛋白的表达产量;昆虫细胞与哺乳动物细胞中的 N-糖基化修饰存在明显差异,导致昆虫细胞中表达的人源化糖蛋白结构与功能发生改变,靶蛋白容易被昆虫细胞中的蛋白酶降解^[36-38]。

为克服这些不利因素,提高靶蛋白在昆虫细胞中的表达量和完善靶蛋白翻译后的修饰程度,研究者对杆状病毒载体、宿主细胞和培养基进行了一系列的改造和优化,显著改善杆状病毒表达系统的各项性状。2009年 Fath-Goodin 等^[39]对昆虫细胞进行改造,使其可持续表达 Vankyrin 蛋白,该蛋白能显著抑制细胞凋亡,延缓了遗传改造后的昆虫细胞裂解,从而延长了重组杆状病毒在昆虫细胞中的靶蛋白表达时间,提高了靶蛋白的产量。2014年 Gómez-Sebastián 等^[40]对 BEVS 进行改造,将一种新颖的表达盒插入到病毒载体中,获得的重组病毒与未改造的病毒相比,发现其能够保持细胞完整性的时间更长,同时能提高蛋白的完整性和重组蛋白的产量 4 倍以上。为快速判断重组杆状病毒载体在转染的昆虫细胞中是否产生了重组杆状病毒,同时延迟重组病毒感染后的细胞裂解,2015年李国辉等^[41]通过同源重组技术,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 Chitinase (几丁质酶基因)和 Cystein Protease (半胱氨酸蛋白酶基因)进行替换,从而获得这两个基因发生缺失的家蚕杆状病毒载体。利用该优化的病毒载体表达家蚕二分核病毒(BmBDV) NS1,结果发现:其 NS1 的表达量是未缺失 Chitinase 和 Cystein Protease 表

达载体的数倍,显著提高了靶基因的表达产量,为靶蛋白的结构与功能研究奠定了基础。Wang 等^[42]通过 shRNA 抑制 BmN 细胞内 Caspase (半胱天冬酶基因)的表达,能够提高靶基因的表达水平。

为获得哺乳动物细胞来源的糖基化修饰,2012年 Palmberger 等^[43]将 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶 II 和小牛 β -1,4-半乳糖基转移酶 I 基因表达盒插入到杆状病毒基因组中,构建的 SweetBac 重组载体在昆虫细胞具有类似哺乳动物细胞的糖基化修饰能力,产生的靶蛋白具有正确的翻译后修饰和功能。昆虫细胞不能合成磷酸胞苷唾液酸或者它的前体分子——唾液酸,因此,杆状病毒表达出来的目标蛋白缺少对应的修饰,为此,2015年 Viswanathan 等^[44]对昆虫细胞 Sf-9 细胞系进行遗传改造,使其能够对昆虫细胞中表达的糖蛋白进行唾液酸修饰。由此可见,通过基因工程方法对杆状病毒表达系统进行遗传改造,使其各方面的性能得到提高,能够满足各种不同来源蛋白的需求。

通过杆状病毒表达系统过表达外源蛋白时,经常伴随着过表达的靶蛋白凝聚体的形成,导致部分产物没有生物活性,制约了该系统的进一步应用。为提高 BEVS 所表达的外源蛋白的可溶性,克服或减少蛋白凝聚体的形成,研究者利用杆状病毒共表达 Hsp70、Hsdj 和 Hsp40 蛋白^[45],可显著提高靶蛋白的可溶性,从而对难表达或易形成蛋白凝聚体的外源蛋白提供了一个新的表达方案。为降低细胞培养成本,Chan 和 Reid^[46]创建了无血清培养基进行培养的昆虫细胞系,该细胞系可用来表达靶蛋白。由此可见,尽管 BEVS 在实践中存在一些不足,但这些改进措施明显优化了 BEVS 的性能,使其能满足各类蛋白包括膜蛋白和蛋白复合物表达的需求,从而为它们的结构和功能研究奠定坚实的基础。

2 杆状病毒表面展示异源蛋白

蛋白表面展示技术是将多肽或蛋白质的编码基因序列克隆入噬菌体外壳蛋白结构基因或杆状

病毒囊膜蛋白基因的适当位置,在不影响阅读框编码正确的融合蛋白情况下,使靶蛋白与标签进行融合表达,融合蛋白随着子代病毒粒子的重新组装就能展示在噬菌体表面或杆状病毒囊膜表面^[47-48]。被展示的多肽或蛋白可以保持相对独立的空间结构和生物活性,以利于靶分子的识别和结合,该技术已应用于蛋白与蛋白间相互作用、抗肿瘤和抗病毒研究、生物传感器的设计、靶向药物传递、纳米科技材料和疫苗开发等研究领域^[49-52]。

到目前为止,人们已开发出杆状病毒囊膜、枯草芽胞、噬菌体和酵母表面展示系统,它们展示外源蛋白的技术原理相似,但一些多肽疏水性过强、或影响外膜蛋白的折叠及蛋白翻译后修饰等问题而不能展示在原核展示系统,从而开发了杆状病毒表面展示系统。该系统主要通过对病毒囊膜蛋白 GP64 基因进行改造,将外源基因与 GP64 蛋白 N 端序列进行融合表达,融合表达后的外源蛋白能在病毒粒子表面多个位点展示出来(图 3),所呈现的抗原免疫原性也更强,在动物体内更能诱导产生高滴度的疫苗。到目前为止, GFP、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶和 HIV-1 gp120 等^[53-54]外源蛋白已成功地展示在杆状病毒粒子表面,从而广泛应用于疫苗制备、靶向作用和提高病毒载体进入哺乳动物细胞的效率等方面。

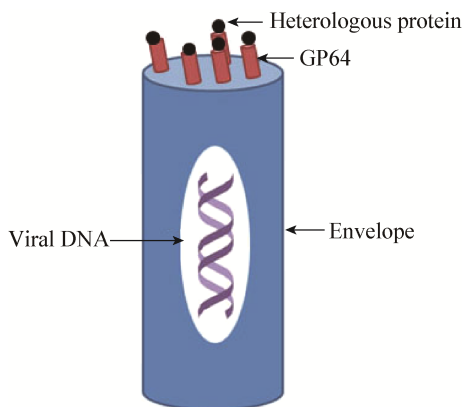


图 3 杆状病毒表面展示外源蛋白模型示意图
Figure 3 Schematic representations of heterologous protein displayed on the baculovirus surface

Sim 等^[55]将全长流感血凝素展示在杆状病毒囊膜表面,对不同亚型的流感病毒都有预防和保护作用; Rätty 等^[56]利用生物素与抗生物素蛋白之间的高亲和力特性,将抗生物素蛋白展示在杆状病毒表面,这种遗传改造后的 Baavi 杆状病毒比野生型杆状病毒具有更高的转导效率; Lu 等^[57]将疱疹性口腔炎病毒糖蛋白(Vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSVG)展示在杆状病毒粒子囊膜表面,能显著提高杆状病毒介导的靶基因进入肝细胞中的转导效率。叶酸受体特异性地表达在肿瘤细胞表面,利用叶酸与其受体作用的特异性,对杆状病毒系统进行一些遗传改造,将聚乙二醇(PEG)-叶酸展示在病毒粒子表面,PEG 可增强转导效率,叶酸可特异性地将病毒作用于靶向细胞,从而成功地实现杆状病毒对特定细胞的靶向作用^[58]。将抗体可结晶区域片段(Fc)展示在病毒粒子表面,可特定性地与具有 Fc 受体的细胞发生作用,从而介导细胞对病毒的吞噬,放大疫苗的作用效果^[59]。

杆状病毒用作疫苗传递载体受到广泛关注,其不仅能激发宿主体内的先天性免疫反应,也能通过表面展示的抗原诱导机体产生保护性的免疫反应。杆状病毒表面展示还可将抗原特异性地呈递给靶标,与噬菌体等原核表面展示系统相比较,杆状病毒表面展示的靶蛋白与其对应的天然蛋白具有相似或相同的生物活性,这使筛选实验更能真实地反映蛋白间的互作关系。尽管这样,表面展示作为一种新兴的技术在具体应用中也存在一些问题,但这些缺点并不能掩盖其巨大的应用潜力。

3 基因治疗的有效载体

基因治疗是指将正常基因或具有治疗作用的基因通过某种载体导入生物体靶细胞,纠正基因缺陷或者发挥治疗作用的生物医学术语。常用的载体介质有逆转录病毒、慢病毒、腺病毒和腺相关病毒载体,主要针对一些对人类健康造成严重威胁的疾病,包括癌症、遗传病和感染性疾病^[60]。将病毒载体导入神经元细胞、肝细胞、心肌细胞、肿瘤细胞、

内皮细胞、干细胞中,从而使靶基因可以获得瞬时或长时间稳定的表达,达到预期的基因治疗效果。1990年美国首次利用基因治疗成功地治愈了一位ADA基因缺陷的4岁女孩,由此掀起世界各国对基因治疗的研究热潮,也让肿瘤患者重塑对未来生活的憧憬^[61]。然而,这些病毒载体在靶向传递时还存在某些缺陷,如逆转录病毒的随机整合、基因组的重新排列、免疫应答、复制型腺病毒的产生和细胞病变等潜在的风险问题^[62-63],因此开发一种新型安全的哺乳动物细胞传递系统刻不容缓。

1995年首次发现杆状病毒能通过转导进入哺乳动物细胞,但不能在这些细胞中进行复制,也没有产生明显的细胞病理效应,加上杆状病毒自身基因组大、可操作性好,可以容纳多个外源DNA片段或者大的DNA片段等优势,从而开启了以杆状病毒为媒介的基因传递系统。在该系统中通过转导使杆状病毒载体进入哺乳动物细胞中,从而使哺乳动物启动子控制的治疗基因表达盒在该细胞中发挥作用,杆状病毒载体在基因治疗中的研究已受到广泛的关注。至今为止,以杆状病毒为载体已成功地在不同物种、不同组织来源的多种细胞系中进行基因传递和表达^[64]。2015年Torres-Vega等^[65]利用杆状病毒载体传递谷氨酰胺合成酶基因,发现该基因在鼠MA104上皮细胞、L6成肌细胞和肌管细胞中都获得表达,该模型实验为将来临床治疗人谷氨酰胺合成酶缺陷病患者奠定基础。尽管杆状病毒传递靶基因系统取得了飞速进步,然而杆状病毒进入哺乳动物细胞的具体途径仍不清楚,目前普遍认为杆状病毒是通过细胞内吞的方式来实现的,而杆状病毒表面展示有VSVG,能显著提高其转移外源DNA的能力^[66]。

4 总结与展望

当今,杆状病毒分子生物学研究已突飞猛进,不仅深入报道了该病毒各个基因的功能、病毒感染和宿主免疫分子机制、病毒复制和组装、病毒与宿主间的博弈及其在哺乳动物细胞中的基因传递等

众多理论研究,从而有力地促进了杆状病毒基因组的分子改造和应用。作者^[67-68]曾对家蚕杆状病毒Bm65和Bm91基因功能进行深入研究,揭示了Bm65是病毒编码的一个早期基因,翻译产物主要定位在细胞核,与病毒DNA损伤修复相关;Bm91是病毒编码的一个囊膜蛋白,是家蚕杆状病毒的一个结构蛋白,与病毒的侵染效率相关。笔者现正对这些基因进行改造,期望扩大其宿主域,扩宽杆状病毒杀虫剂的杀虫谱、增强病毒毒力和提高病毒杀虫速度,从而增强杆状病毒在生物防治方面的应用。

另外,随着杆状病毒表达系统的不断升级和完善,极大地促进了蛋白的结构和功能研究,尤其是人类基因组序列公布之后,需要对大量的真核蛋白及其复杂的蛋白复合物组装进行研究,而杆状病毒表达系统是表达这些蛋白产物的最佳选择,从而为揭示蛋白与人类疾病间的关联奠定基础。除此之外,利用杆状病毒靶向传递特定基因也取得了重要进展,从而使其在疫苗生产、靶向治疗和组织再生等民生领域中都具有广阔的应用前景,尤其是重组杆状病毒用作哺乳动物细胞的新型基因转移载体,为人类一些重大遗传疾病和肿瘤治疗提供了可能,为广大病患者身心健康带来了福音。尽管杆状病毒载体介导的基因治疗存在安全性隐患、疗效时间短、治疗费用昂贵和伦理性等方面的问题,从而限制了其在临床上的应用,但我们深信杆状病毒一定在将来临床上的应用取得巨大成功。随着对杆状病毒分子生物学的深入研究以及分子生物学技术的飞速发展,杆状病毒的改造和应用前景也将变得更加深入与广泛,使其更好地服务于我们的生产与健康。

REFERENCES

- [1] Ferrelli ML, Salvador R, Biedma ME, et al. Genome of *Epinotia aporema* granulovirus (EpapGV), a polyorganotropic fast killing betabaculovirus with a novel thymidylate kinase gene[J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 548
- [2] Jo YH, Patnaik BB, Kang SW, et al. Analysis of the genome of a Korean isolate of the *Pieris rapae* granulovirus enabled by its separation from total host genomic DNA by pulse-field electrophoresis[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e84183
- [3] Herniou EA, Arif BM, Becnel JJ, et al. Family

- baculoviridae[A]/King AMQ, Adams MJ, Carstens EB. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses[M]. San Diego, CA, USA: Elsevier Academic Press, 2012: 163-173
- [4] Blissard GW. Baculovirus-insect cell interactions[J]. Cytotechnology, 1996, 20(1/3): 73-93
- [5] Kelly BJ, King LA, Possee RD. Introduction to baculovirus molecular biology[A]/Murhammer DW. Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols[M]. New York: Springer, 2016: 25-50
- [6] Martínez-Solís M, Gómez-Sebastián S, Escribano JM, et al. A novel baculovirus-derived promoter with high activity in the baculovirus expression system[J]. PeerJ, 2016, 4(11): e2183
- [7] 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]. Journal of Virology, 1993, 67(8): 4566-4579
- [8] Motohashi T, Shimojima T, Fukagawa T, et al. Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 326(3): 564-569
- [9] Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector[J]. Molecular and Cellular Biology, 1983, 3(12): 2156-2165
- [10] Kadonookuda K, Yamamoto M, Higashino Y, et al. Baculovirus-mediated production of the human growth hormone in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995, 213(2): 389-396
- [11] Chen J, Wu XF, Zhang YZ. Expression, purification and characterization of human GM-CSF using silkworm pupae (*Bombyx mori*) as a bioreactor[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 123(2): 236-247
- [12] Felberbaum RS. The baculovirus expression vector system: a commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors[J]. Biotechnology Journal, 2015, 10(5): 702-714
- [13] Murguía-Meca F, Plata-Muñoz JJ, Hitchman RB, et al. Baculovirus as delivery system for gene transfer during hypothermic organ preservation[J]. Transplant International, 2011, 24(8): 820-828
- [14] Airene KJ, Makkonen KE, Mähönen AJ, et al. Baculoviruses mediate efficient gene expression in a wide range of vertebrate cells[A]/Merten OW, Al-Rubeai M. Viral Vectors for Gene Therapy[M]. New York: Humana Press, 2011: 279-301
- [15] Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems Manual[M]. Invitrogen: Life Technologies Inc., 2000
- [16] Airene KJ, Hu YC, Kost TA, et al. Baculovirus: an insect-derived vector for diverse gene transfer applications[J]. Molecular Therapy, 2013, 21(4): 739-749
- [17] Xie QL, Michel PO, Baldi L, et al. TubeSpin bioreactor 50 for the high-density cultivation of Sf-9 insect cells in suspension[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(5): 897-902
- [18] Maertens B, Spriestersbach A, Kubicek J, et al. Strep-tagged protein purification[J]. Methods in Enzymology, 2015, 559: 53-69
- [19] Hu YC. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2005, 26(4): 405-416
- [20] Maeda S, Kawai T, Obinata M, et al. Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector[J]. Nature, 1985, 315(6020): 592-594
- [21] Palhan VB, Sumathy S, Gopinathan KP. Baculovirus mediated high-level expression of luciferase in silkworm cells and larvae[J]. BioTechniques, 1995, 19(1): 97-98,100,102-104
- [22] Zhang LY, Wu GS, Tate CG, et al. Calreticulin promotes folding/dimerization of human lipoprotein lipase expressed in insect cells (sf21)[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(31): 29344-29351
- [23] Fournneau JM, Cohen H, van Endert PM. A chaperone-assisted high yield system for the production of HLA-DR4 tetramers in insect cells[J]. Journal of Immunological Methods, 2004, 285(2): 253-264
- [24] Martínez-Torrecuadrada JL, Romero S, Núñez A, et al. An efficient expression system for the production of functionally active human LKB1[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 115(1): 23-34
- [25] Mirzaei M, Jardin B, Elias CB, et al. Expression and production of human interleukin-7 in insect cells using baculovirus expression vector system (BEVS)[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008, 151(1): 93-103
- [26] Rubiolo JA, López-Alonso H, Alfonso A, et al. Characterization and activity determination of the human protein phosphatase 2A catalytic subunit α expressed in insect larvae[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 167(4): 918-928
- [27] Li GH, Li MM, Wang P, et al. Characterization of recombinant expression of *Bombyx mori* bidensovirus ns1 using a modified vector[J]. Acta Biochimica Polonica, 2014, 61(4): 787-794
- [28] Stifter SA, Gould JA, Mangan NE, et al. Purification and biological characterization of soluble, recombinant mouse IFN β expressed in insect cells[J]. Protein Expression and Purification, 2014, 94: 7-14
- [29] Mohseni N, Jahanian-Najafabadi A, Kazemi-Lomedasht F, et al. Recombinant expression and purification of functional vascular endothelial growth factor-121 in the baculovirus expression system[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2016, 9(12): 1195-1199
- [30] Lin B, Liu K, Wang WY, et al. Expression and bioactivity of human α -fetoprotein in a Bac-to-Bac system[J]. Bioscience Reports, 2017, 37(1): 1-9
- [31] Růčková E, Müller P, Vojtěšek B. Protein expression and purification[J]. Klinická Onkologie, 2014, 27(Suppl 1): S92-S97
- [32] Saccardo P, Corchero JL, Ferrer-Miralles N. Tools to cope with difficult-to-express proteins[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(10): 4347-4355
- [33] Geisler C, Mabashi-Asazuma H, Jarvis DL. An overview and history of glyco-engineering in insect expression systems[A]/Castilho A. Glyco-Engineering[M]. New York: Springer, 2015, 1321: 131-152
- [34] Treanor J. Recombinant proteins produced in insect cells[A]/Compans RW, Orenstein WA. Vaccines for Pandemic Influenza[M]. Berlin: Springer, 2009, 333: 211-225
- [35] Cox MMJ. Recombinant protein vaccines produced in insect cells[J]. Vaccine, 2012, 30(10): 1759-1766
- [36] Tiwari P, Saini S, Upmanyu S, et al. Enhanced expression of recombinant proteins utilizing a modified baculovirus expression vector[J]. Molecular Biotechnology, 2010, 46(1): 80-89
- [37] van Oers MM. Opportunities and challenges for the baculovirus

- expression system[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2011, 107(S1): S3-S15
- [38] Jarvis DL, Finn EE. Biochemical analysis of the N-glycosylation pathway in baculovirus-infected lepidopteran insect cells[J]. *Virology*, 1995, 212(2): 500-511
- [39] Fath-Goodin A, Kroemer JA, Webb BA. The *Campoletis sonorensis* ichnovirus vankyrin protein P-vank-1 inhibits apoptosis in insect Sf9 cells[J]. *Insect Molecular Biology*, 2009, 18(4): 497-506
- [40] Gómez-Sebastián S, López-Vidal J, Escribano JM. Significant productivity improvement of the baculovirus expression vector system by engineering a novel expression cassette[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96562
- [41] Li GH, Li MM, Zhou Q, et al. Modified baculovirus system for high expression of *Bombyx mori* bidensovirus NS1 in silkworm[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(4): 591-602 (in Chinese)
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[J]. *生物工程学报*, 2015, 31(4): 591-602
- [42] Wang Q, Zhou Y, Chen KP, et al. Suppression of Bm-caspase-1 expression in BmN cells enhances recombinant protein production in a baculovirus expression vector system[J]. *Molecular Biotechnology*, 2016, 58(5): 319-327
- [43] Palmberger D, Wilson IB, Berger I, et al. SweetBac: a new approach for the production of mammalianised glycoproteins in insect cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34226
- [44] Viswanathan K, Narang S, Betenbaugh MJ. Engineering sialic acid synthesis ability in insect cells[A]//Castilho A. *Glyco-Engineering[M]*. New York: Springer, 2015, 1321: 171-178
- [45] Yokoyama N, Hirata M, Ohtsuka K, et al. Co-expression of human chaperone Hsp70 and Hsdj or Hsp40 co-factor increases solubility of overexpressed target proteins in insect cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 2000, 1493(1/2): 119-124
- [46] Chan LC, Reid S. Development of serum-free media for lepidopteran insect cell lines[A]//Murhammer DW. *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols[M]*. New York: Springer, 2016, 1350: 161-196
- [47] Xu XG, Wang ZS, Zhang Q, et al. Baculovirus surface display of E envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus and its immunogenicity of the displayed proteins in mouse and swine models[J]. *Vaccine*, 2011, 29(4): 636-643
- [48] Aghebati-Maleki L, Bakhshinejad B, Baradaran B, et al. Phage display as a promising approach for vaccine development[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2016, 23(1): 66
- [49] Sundell GN, Ivarsson Y. Interaction analysis through proteomic phage display[J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 176172
- [50] Tawil N, Sacher E, Mandeville R, et al. Bacteriophages: biosensing tools for multi-drug resistant pathogens[J]. *Analyst*, 2014, 139(6): 1224-1236
- [51] Bakhshinejad B, Karimi M, Khalaj-Kondori M. Phage display: development of nanocarriers for targeted drug delivery to the brain[J]. *Neural Regeneration Research*, 2015, 10(6): 862-865
- [52] Ebrahimzadeh W, Rajabibazl M. Bacteriophage vehicles for phage display: biology, mechanism, and application[J]. *Current Microbiology*, 2014, 69(2): 109-120
- [53] Mäkelä AR, Ernst W, Grabherr R, et al. Baculovirus-based display and gene delivery systems[J]. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010, 2010(3): pdb. top72
- [54] Oker-Blom C, Airenne KJ, Grabherr R. Baculovirus display strategies: emerging tools for eukaryotic libraries and gene delivery[J]. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 2003, 2(3): 244-253
- [55] Sim SH, Kim JY, Seong BL, et al. Baculovirus displaying hemagglutinin elicits broad cross-protection against influenza in mice[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0152485
- [56] Rättyä JK, Airenne KJ, Marttila AT, et al. Enhanced gene delivery by avidin-displaying baculovirus[J]. *Molecular Therapy*, 2003, 9(2): 282-291
- [57] Lu LQ, Ho Y, Kwang J. Suppression of porcine arterivirus replication by baculovirus-delivered shRNA targeting nucleoprotein[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 340(4): 1178-1183
- [58] Kim YK, Choi JY, Yoo MK, et al. Receptor-mediated gene delivery by folate-PEG-baculovirus *in vitro*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2007, 131(3): 353-361
- [59] Martyn JC, Cardin AJ, Wines BD, et al. Surface display of IgG Fc on baculovirus vectors enhances binding to antigen-presenting cells and cell lines expressing Fc receptors[J]. *Archives of Virology*, 2009, 154(7): 1129-1138
- [60] Min JJ, Nguyen VH, Gambhir SS. Molecular imaging of biological gene delivery vehicles for targeted cancer therapy: beyond viral vectors[J]. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2010, 44(1): 15-24
- [61] Aiuti A. Advances in gene therapy for ADA-deficient SCID[J]. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2002, 4(5): 515-522
- [62] Nienhuis AW, Dunbar CE, Sorrentino BP. Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells[J]. *Molecular Therapy*, 2006, 13(6): 1031-1049
- [63] Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency[J]. *New England Journal of Medicine*, 2003, 348(3): 255-256
- [64] Hofmann C. Generation of envelope-modified baculoviruses for gene delivery into mammalian cells[A]//Murhammer DW. *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols[M]*. New York: Springer 2016, 1350: 491-504
- [65] Torres-Vega MA, Vargas-Jerónimo RY, Montiel-Martínez AG, et al. Delivery of glutamine synthetase gene by baculovirus vectors: a proof of concept for the treatment of acute hyperammonemia[J]. *Gene Therapy*, 2015, 22(1): 58-64
- [66] Tavarone E, Molina GN, Amalfi S, et al. The localization of a heterologous displayed antigen in the baculovirus-budded virion determines the type and strength of induced adaptive immune response[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(10): 4175-4184
- [67] Tang Q, Li GH, Yao Q, et al. Bm91 is an envelope component of ODV but is dispensable for the propagation of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2013, 113(1): 70-77
- [68] Tang Q, Hu ZY, Yang YH, et al. Overexpression of Bm65 correlates with reduced susceptibility to inactivation by UV light[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 127: 87-92