

## 一种新型家蚕核多角体病毒 Bac to Bac 系统的构建\*

邓小昭 朱 应<sup>1</sup> 刁振宇 齐义鹏<sup>1</sup> 周宗安

(南京军区军事医学研究所分子生物学实验室 南京 210002)

(<sup>1</sup>武汉大学病毒研究所 武汉 430073)

**提 要:**用家蚕核型多角体病毒的全基因组 DNA 与 Ac-Bacmid DNA 共转染家蚕 BmN 细胞,构建转座-穿梭载体 Bm-Bacmid。另一供体质粒以转座方式将乙肝病毒 e 抗原基因 HBeAg 整合到 Bm-Bacmid 的 att Tn 7 位点上成为重组 rBmHBe。结果表明 Bm-Bacmid 既能在大肠杆菌中以质粒的形式复制,又能在家蚕 BmN 细胞和草地夜蛾 Sf9 细胞中复制,形成感染性病毒粒子。Southern blotting 证实重组病毒的构建是正确的。BmN 细胞能正确识别与切割 HBeAg 信号肽序列,SDS-PAGE 表明 HBeAg 基因在家蚕细胞中高效表达,ELISA 测定培养上清中 HBeAg 效价达 1:32000,细胞内 HBeAg 效价为 1:2000,培养液及细胞内的 HBeAg 含量极低( $<1:160$ )。

**关键词:**BmNPV, AcNPV 昆虫病毒穿梭载体(Ac-Bacmid), 转座子 Tn7, 乙肝病毒 e 抗原, 基因表达

**中图分类号:**S884.5    **文献标识码:**A    **文章编号:**0001-6209(2000)02-0155-60

自 1983 年 Smith<sup>[1]</sup>用苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(AcNPV)作载体在昆虫细胞中表达  $\beta$ -干扰素以来,掀起了一个昆虫病毒表达系统表达外源基因的热潮。10 多年来,Smith 的经典克隆策略得到广泛应用。但该策略重组率极低(0.1%~1.0%),程序繁琐。1990 年,Hartig<sup>[2]</sup>等首次提出单线型化策略,1993 年改进成双线型化策略,提高了重组效率,但仍需采用空斑技术。1993 年 Luckow 等<sup>[3]</sup>采用噬菌体下的复制子构建 AcNPV 穿梭载体,取 Baculovirus 和 plasmid 的字头字尾命名为 Bacmid,即杆状病毒质粒之意。这一重大创新打破了 100 多年来必需用活细胞复制病毒基因组的老概念。Bacmid 在细菌细胞中是一个质粒,可以低拷贝复制,在昆虫细胞中是一个病毒,可以复制、表达、装配子代病毒。从细菌(Bacteria)到杆状病毒(Baculovirus)的全部操作都在细菌中进行,因此这一策略又称 Bao to Bac 策略。重组率达到 100%,操作简单,只需 10~15d 即可构建成重组病毒,然而,这一策略只能用于 AcNPV 的 Bacmid 和草地夜蛾细胞(Sf9)。本文用 Ac-Bacmid 作基础,通过共转染同源重组得到双穿梭的 Bm-Bacmid,既可用家蚕细胞和家蚕作受体,也可用 Sf9 作为宿主细胞表达外源基因。HBeAg 由 HBcAg 氨基端的 149 个氨基酸组成,C 基因编码的 HBcAg 有 183 个氨基酸,在 C 基因上游有一个 89bp 的前 C 序列,它与 C 基因的共同表达产物(前 C 蛋白)在内质网膜经白水解酶的作用,去掉 N 端的信号肽及 C 端强碱

\* 江苏省自然科学基金课题(BK95140306)

作者简介:邓小昭(1956-),女,南京军区军事医学研究所副研究员,博士,现从事分子生物学研究

收稿日期:1998-12-15,修回日期:1999-04-23

性区域,形成可分泌的 HBeAg<sup>[4]</sup>。其中值得重视的是前 C 区编码的信号肽序列指导了 HBeAg 的加工和分泌。原核表达系统由于不能识别并正确切割信号肽序列,所表达的产物大部分是细胞内的 C 抗原。这一结论提示,要获得高活性高纯度的 HBeAg,必需借助真核表达系统。为此,我们用 PCR 法扩增含有 Pre-C 信号肽序列及与 HBeAg N 端同源的 149 个氨基酸编码序列,在 5' 端和 3' 端加上合适的酶切位点,定向克隆至转座质粒 pfastBacI 的多角体启动子下游的 MCS 上,构成完整的表达盒。经与我们构建的双穿梭载体 Bm-Bacmid 转座、转染 BmN 细胞等过程,获得了高表达 HBeAg 基因的重组病毒。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、病毒

AcNPV 的 Bac to Bac 系统购于 Gibco BRL 公司。这一系统包括三部分<sup>[2]</sup>,其一是转座质粒 pFastBacI,其中有一个大的克隆盒,由 AcNPV 的多角体基因(ocu)强启动子/MCS/SV40 poly A 转录终止信号/庆大霉素抗性基因(Gm)组成,在其两侧是细菌转座子 Tn7 的左右端(Tn7L 和 Tn7R),外源基因插在 MCS 中。其二是 Ac-Bacmid(穿梭载体),保存在 *E. coli* DH10Bac 中。它含有完整的 133kb AcNPV 基因组 DNA,卡那霉素抗性基因(ka),报道基因 *LacZ* 和 Tn7 识别位点 att 序列,上面有噬菌体 F 的复制子(miniF),允许 Bacmid 在 *E. coli* 中低拷贝复制。其三是助手质粒 pMON7124,上面有四环素抗性基因(Tc)和转座酶基因,与 Ac-Bacmid 共存于 *E. coli* DH10Bac 中。当重组 pFastBacI 转化 *E. coli* DH10Bac 时,由助手质粒提供反式因子,通过 Tn7R 和 Tn7L 将含有外源基因的表达盒转座到 Ac-Bacmid 的 Tn7 att 上,并使 *LacZ* 失活,用三抗平板(Gm/ka/Tc)在 X-gal 存在下筛选无色阳性菌落。含信号肽序列的 HBeAg 基因的 PCR 扩增、鉴定及克隆至 pfastBacI 见参考文献[5]。

### 1.2 细胞

草地夜蛾细胞由美国加州大学 Federici 教授惠赠,BmNPV DNA 和家蚕细胞 BmN 由我们自己保存。昆虫细胞用含有 10% 胎牛血清的 Grace 培养基,27℃ 培养。含有助手质粒的受体菌 DH5α 由武汉大学病毒所提供。

### 1.3 主要试剂

限制性内切酶、T4DNA 连接酶购自 Promega 公司,Lipfectin, IPTG 和 X-gal 购自 GIBCO BRL 公司,HBe 抗原检测盒为我们自己生产的上市产品。

### 1.4 两种杆状病毒 DNA 的共转染

Ac-Bacmid DNA 和野生型(wt)BmNPV DNA 以 1:1 克分子比用 Lipfectin 程序共转染 BmN 细胞,吸附 1h,倾出转染液,加 Grace 培养液,27℃ 培养 7d<sup>[6]</sup>,观察细胞 CPE,当细胞全部死亡,离心,收集含有病毒粒子的上清,并感染 Sf9 细胞,在两种昆虫细胞间来回穿梭感染 4 次,以同样方式培养并收获病毒粒子。

### 1.5 重组病毒 DNA 转化大肠杆菌

将收获的病毒粒子离心,提取 DNA,以 0.5ng/μL 浓度用常规方法转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞(其中有助手质粒),在三抗和 X-gal 平板上,挑选兰色重组菌落<sup>[7]</sup>,提取 Bm-Bacmid DNA,再转化至 DH5α 中保存。

1.6 重组 Bm-Bacmid 的构建及鉴定

取重组转座质粒 pFHBe DNA 0.5μg 转化含有 Bm-Bacmid 和助手质粒的 *E. coli* 感受态细胞 DH5a, 37℃ 摇床培养 4h, 通过 Tn7 对 Bm-Bacmid att 位点的识别, 将 pFHBe 上的 Pocu/HBeAg/SV40 poly A/Gm 表达盒转座到 Bm-Bacmid 的 Lac Z 编码区, 取转座混合物 10~100μL 涂 LB 平板, 在三抗和 Xgal 存在下筛选白色菌落。

*Bgl*II/*Xba*I 双酶切质粒 pFHBe DNA, 回收 0.45kb HBeAg 基因 cDNA, 以随机引物标记法制备<sup>32</sup>P 放射性探针备用。以 *Bam*HI/*Bgl*II + *Sma*I 消化重组 Bacmid DNA, SDS-PAGE 电泳, 转膜, 与 HBeAg 基因探针进行 southern blot 杂交, 对重组 Bacmid 进行鉴定。

1.7 HBeAg 的表达与检测

用重组病毒感染 BmN 细胞, 27℃ 培养 4d, 离收收获细胞和上清, 按常规方法<sup>[10]</sup> 进行 5% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, 观察蛋白质的表达。细胞用盐酸胍破壁, 收获裂解液, 离心取上清, 同时取培养细胞上清, 用南京军区医学研究所的 HBeAg、HBcAg 试剂盒分别进行 ELISA 检测, 以乙肝患者 HBeAg 阳性血清及工程菌生产的 HBcAg 作为阳性对照, 分别以正常受体 BmN 细胞裂解液及培养上清作为阴性对照。根据 OD 值计算出 P、N 值, 以 P/N ≥ 2 判为阳性。

2 结果

2.1 双穿梭 Bm-Bacmid 的构建及筛选

以 Ac-Bacmid DNA 和 wt-BmNPV DNA 共转染 BmN 细胞, 筛选 Bm-Bacmid 构建过程见图 1。

在两种病毒 DNA 共转染时, 由于 BmN 细胞是 BmNPV 而不是 Ac-Bacmid 的天然宿主, 只允许 BmNPV 复制; Sf9 细胞是 Ac-Bacmid 而不是 BmNPV 的天然宿主, 因而不允许 BmNPV 复制。但是从 BmNPV 细胞提取的 DNA 可以转染非允许细胞 Sf-9, 说明两种病毒 DNA 之间发生了同源重组, AcNPV DNA 上某个与宿主范围有关的片段插入新 BmNPV 基因组中。经过 4 次重复转染得到能在两种细胞中复制的重组 BmNPV。用这种 BmNPV DNA 转化大肠杆

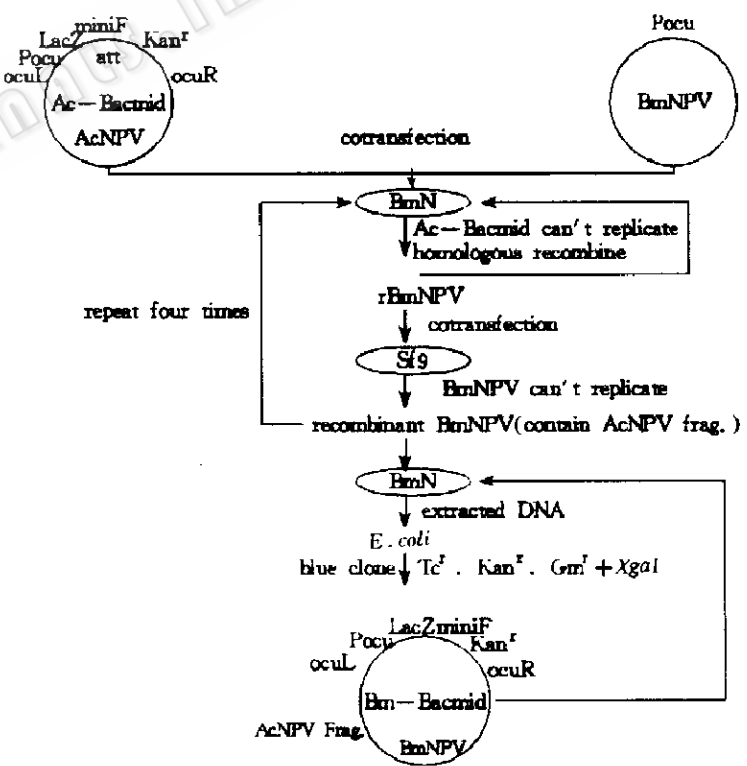


图 1 双穿梭 Bm-Bacmid 的构建和筛选

Fig.1 Scheme for the construction of the Bi-Shuttle vector Bm-Bacmid

菌,从大量的菌落中得到 1 个蓝色菌落,转化率<1%。

从蓝色菌落提取的 DNA 能成功转染 BmN 和 Sf9 细胞,即能在细菌和昆虫细胞间穿梭,说明在共转染时,Ac-Bacmid 上的 LacZ/Tn7 att/miniF/kan 表达盒通过两侧的 *ocu* 基因序列与 BmNPV *ocu* 基因的高度同源性,等位交换到 BmNPV 基因组上,最终得到双穿梭的 Bm-Bacmid。

2.2 重组 Bm-Bacmid 的构建和鉴定

重组转座质粒 pFHBe 上携带有 HBeAg 融合基因,将它转化含 Bm-Bacmid 双穿梭质粒的 *E. coli* DH5αBac,在助手质粒提供的反式因子作用下发生转座,将 pFHBe 的 *Pocu*/HBeAg/SV40 polyA/Gm 表达盒通过 Tn7L 和 R 转到 Bm-Bacmid 的 att 位点,同时使 *LacZ* 插入失活,在三抗和 X-gal 平板上出现大量的白色菌落。

用 *Bam*HI/*Bgl*II + *Sma*I 消化白色菌落的 DNA,可看到典型的 BmNPV DNA 酶切图谱,转膜后与 HBeAg 基因的放射性探针杂交,在 0.45kb 位置有很强的杂交信号,Wt-Bm-NPV DNA 无此杂交带,证明转座作用是成功的,将此重组 Bm-Bacmid 命名为 rBmHBe。

2.3 HBeAg 蛋白的表达及检测

以重组病毒 rBmHBe 感染家蚕细胞,培养 72h 后,收获细胞和上清进行 SDS-PAGE。从结果看出,Wt-BmNPV 能产生 32kD 的多角体蛋白,而重组病毒 rBmHBe 由于 *plh* 基因被置换,所以没有多角体蛋白产生,代之以 HBeAg 基因在昆虫细胞中表达,产生约 18kD 的 e 抗原。用培养上清液作样品同样观察到 HBeAg 的表达,但分子量较小,可见表达的大部分 HBeAg 在 N 端信号肽引导下跨膜分泌到细胞外(图 2)。

我们对细胞裂解液和培养上清进行了 ELISA 试验(表 1),检测表达 HBeAg 的抗原活性。发现当稀释细胞裂解液 1:2000 时亦可见阳性反应,上清中 HBeAg 抗原活性

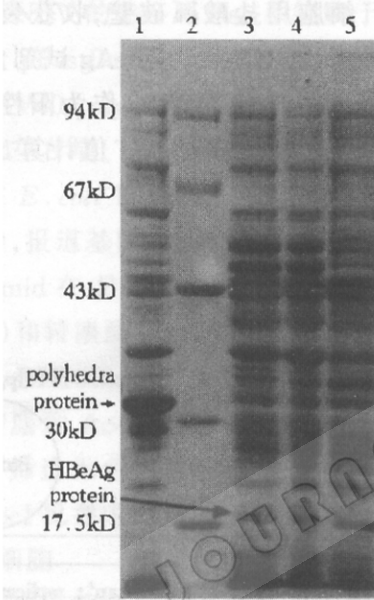


图 2 12% SDS-PAGE 分析 BmN 细胞表达的 HBeAg 蛋白

Fig.2 12% SDS-PAGE analysis of the HBeAg protein  
1. BmN cells infected with wt-BmNPV polyhedra protein high expressed;2. Standard protein molecular weight marker;3,4. BmN cells infected with BmHBe, the arrow shows HBeAg protein(~18kD) high expressed and polyhedra proteins disappeared;5. Culture medium. HBeAg protein high expressed.

表 1 HBeAg 抗原性 ELISA 检测

Table 1 HBeAg antigenicity detection with ELISA

| Sample               | Dilution |         |         |         |          |          |          |
|----------------------|----------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|
|                      | 1:1 000  | 1:2 000 | 1:4 000 | 1:8 000 | 1:16 000 | 1:32 000 | 1:64 000 |
| Cell culture medium  | +        | +       | +       | +       | +        | +        | -        |
| Cell broken material | +        | +       | -       | -       | -        | -        | -        |

+ :Positive; - :Negative

较高,稀释度可达到 1:32000。检测结果还表明,培养液上清中未测出 HBcAg,细胞裂解液中 HBcAg 滴度  $<1:160$ 。

以上试验结果清楚说明我们在家蚕细胞中表达了具有抗原活性的 HBeAg 蛋白。

### 3 讨论

由于多角体基因(ocu)是 NPV 的一个最保守基因,同源程度很高,BmNPV 和 AcNPV ocu 基因的核苷酸同源性高达 86%<sup>[9]</sup>,因此,我们直接用 Ac-Bacmid 与 BmNPV 共转染,在 BmN 细胞中同源重组,导致 LacZ/att/miniF 表达盒的转座,得到了既能在细菌中低拷贝复制又能感染昆虫细胞的穿梭载体。在共转染过程中,我们意外地发现,Bm-Bacmid 也能感染 Sf9 细胞,即在两种昆虫细胞之间穿梭,这是迄今为止得到的第一个双穿梭 Bacmid,据 Maeda 等<sup>[10]</sup>报道,他们利用 AcNPV 与 BmNPV 共转染 Sf9 细胞,得到了可以感染 BmN 细胞的重组 AcNPV,扩大了宿主范围。据分析这是由于 BmNPV 的宿主范围决定基因 P143 同源重组到 AcNPV 基因组上的缘故。因此,我们的结果也可能是 AcNPV 与宿主范围有关的片段插入到 BmNPV DNA 中的结果。

Bac to Bac 策略的特异性在于 Bacmid 上的 NPV 基因组。然而由于 ocu 基因的高度同源性,而转座质粒 pFastBacI 是没有特异性的,可以通用。我们的研究结果证明了这一点。

在家蚕细胞中表达 HBeAg 时,信号肽在粗面内质网膜被切割,去除 19 个氨基酸,e 抗原跨膜分泌至培养液中<sup>[11]</sup>。实验结果表明也还有部分未分泌的抗原存在于细胞内。根据我们测得的 HBeAg 基因序列,发现在信号肽 5'端有一个 ATG,3'端亦有一个 ATG,而且第二个 ATG 完全符合 Kozak 规则。因此,当核糖体 40S 亚基在扫描到第一个 AUG 时,部分 40S 亚基与 60S 亚基装配成核糖体而起始翻译,得到具有信号肽的蛋白,并被加工分泌到细胞外,成为可溶性 HBeAg。另一部分 40S 亚基继续扫描,直到第二个 AUG 并与 60S 亚基结合而起始翻译,得到的表达产物由于不含有信号肽序列而被留在细胞内。这一结果与 mRNA 翻译起始调控的基础理论是一致的<sup>[4]</sup>。根据 C 基因的序列分析,胞内的表达产物应该是 HBcAg,而 ELISA 检测结果却表明,其中大部分为 HBeAg(1:2000),小部分为 HBcAg( $<1:160$ )。这一现象证明在 HBc 基因羧基末端富含精氨酸的区域对于 HBeAg 的表达是非常重要的,该区参与 HBc 抗原蛋白自我装配成核心颗粒。我们所扩增的 e 基因片段不包括这一精氨酸丰富区,因此所得到的表达产物中的 HBcAg 含量很低。

### 参 考 文 献

- [1] Smith G E, Summers M D, Fraser M J. *Mol Cell Biol*, 1983, 3: 2156~2165.
- [2] Hartig P C, Cardon M C. *J Virol Methods*, 1992, 38: 61~71.
- [3] Luckow V A, Lec S C, Barry G F. *J Virol*, 1993, 67: 4566~4579.
- [4] Gerlich W H, Heermann K H. Function of hepatitis B virus protein and virus assembly. In: Gerlich W H ed. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York: Science Press, 1991. 121~134.
- [5] 邓小昭,刁振宇,何 亮,等. 中国病毒学, 1998, 13(1): 70~75.
- [6] Patel G, Nasmyth K, Jones N. *Nucl Acids Res*, 1992, 20: 97~104.
- [7] 齐义鹏,黄永秀,梁明山. 基因工程原理和方法. 成都: 四川大学出版社, 1988. 229~230.

- [8] 朱 应, 齐义鹏, 刘得立, 等. 武汉大学学报, 1997, 43(6): 819~820.
- [9] 刘子夜, 齐义鹏, 朱 应, 等. 生物多样性, 1997, 5(1): 14~25.
- [10] Maeda S, Kamita S G, Kondo A. *J Virol*, 1993, 67: 6234~6238.
- [11] Standing D J. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988, 85: 8405~8409.

## CONSTRUCTION OF A NOVEL Bm NPV Bac to Bac SYSTEM

Deng Xiaozhao Zhu Ying<sup>1</sup> Diao Zhenyu Qi Yipeng<sup>1</sup> Zhou Zongan

(Nanjing Command Military Medical Institute, Nanjing 210002)

(<sup>1</sup> Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract:** A Bi-Shuttle vector Bm-Bacmid was constructed by co-infecting Bm N cells with wild type genomic DNA from BmNPV and Ac-Bacmid DNA. It could not only replicate in *E. coli* cells as a large plasmid and but also remain infectious when induced into Bm N or Sf9 cells. Recombinant virus rBmHBe was obtained after transposition of a donor plasmid carrying Hapatitis Be antigen gene (HBeAg) into att Tn7, and was demonstrated by Southern blotting. SDS-PAGE analysis showed that HBeAg gene were highly expressed in Bm N cells. By ELISA testing, the highest antigenecity titer of HBeAg protein in cell cultural medium was up to a dilution of 1:32000. Although HBeAg protein also presented in the Bm N cells the titer was only 1:2000. The HBeAg protein was much fewer than HBeAg (<1:160) whatever in culture medium and in cells. The results showed that Bm N cells was able to recognize the signal peptide sequence and cut it correctly for HBeAg protein's excreting production.

**Key words:** Bm NPV, Ac-Bacmid, Transposon Tn7, HBeAg, Gene expression

### 敬 告 读 者

《微生物学报》是中国自然科学核心期刊(名列生物类期刊第4~6位)。据中国科技信息研究所最新出版的《中国科技期刊引证报告》(CJCR)中报道, 1998年我刊的影响因子为0.359,名列生物类期刊第八位。

另据中国科学引文数据库1998年最新数据统计,在被引频次最高的中国科技期刊500名排行表中,本刊名列第68位,并连续五年(1994~1998)入围中国科技期刊《引文频次百名表》。