

## 昆虫病毒多角体蛋白基因的克隆及其 在大肠杆菌中的表达\*

齐义鹏 黄永秀 沈英\*\* 尹义忠

(武汉大学病毒学及分子生物学系, 武汉)

将含有大尺蠖核型多角体病毒 (BsNPV) 多角体蛋白基因 (*ocu*) 的 *Bam*HI-H 片段克隆到表达载体 pDR 540 的 *Bam*HI 位点, 得到能抗高浓度氨基青霉素 (200  $\mu$ g/ml) 的两个阳性重组体, 其胞外总蛋白比亲本质粒高 1.1—1.4 倍。在大肠杆菌细胞中, BsNPV *ocu* 基因在原核杂合启动子 *tac* 驱动下能高水平的表达, 表达量达到 0.8 和 4.7 mg/ml。免疫沉淀反应证明, 表达蛋白为 BsNPV 的包涵体蛋白, 凝胶过滤法测定的平均分子量为  $32.1 \times 10^3$  道尔顿。

**关键词** 大尺蠖核型多角体病毒 (BsNPV); 多角体蛋白基因; 表达蛋白

昆虫杆状病毒的多角体蛋白基因 (*ocu*) 有一个强启动子<sup>[1]</sup>, 因此, 许多学者<sup>[2-4]</sup>利用苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV) 作模型系统构建了一系列 *ocu* 基因转移载体, 在昆虫细胞中表达了人的  $\beta$ -干扰素<sup>[5]</sup>等几十种基因<sup>[6]</sup>。然而, 到目前为止, 尚未见到 *ocu* 基因本身在原核细胞中表达的报道。

昆虫杆状病毒的包涵体蛋白在病毒感染昆虫的晚期大量产生, 其量约占细胞总蛋白的四分之一, 分子量 (MW) 一般在  $28-32 \times 10^3$  道尔顿之间<sup>[7]</sup>, 它是构建病毒多角体外壳 Matrix 的最小亚基。包涵体蛋白的研究对于阐明 *ocu* 基因启动子的调控机理、包涵体蛋白的结构、蛋白质的缔合、自我组装成 Matrix 有重大理论意义, 特别是有人<sup>[8]</sup>提及, 昆虫杆状病毒的包涵体蛋白具有抗肿瘤活性, 因此, 克隆 *ocu* 基因并高效表达包涵体蛋白具有十分诱人的应用前景。

大尺蠖核型多角体病毒 (Buzura suppressura nuclear polyhedrosis virus, 简

称 BsNPV) 是感染茶树害虫的昆虫杆状病毒, 基因组 DNA 长约 92 kb<sup>[9]</sup>, 包涵体蛋白 MW  $28 \times 10^3$  道尔顿<sup>[9]</sup>, *ocu* 基因定位在 2.3 kb 的 *Bam*HI-H 片段上<sup>[10]</sup>。我们通过本项研究, 希望获得高效表达, 为开发包涵体蛋白的抗肿瘤活性打下基础。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 病毒与细菌

大尺蠖核型多角体病毒是我们于 1984 年分离的<sup>[11]</sup>, 通过感染茶树害虫大尺蠖, 收集虫尸, 用差速离心法分离多角体<sup>[12,13]</sup>。

表达载体 pDR 540 DNA 长 4.0 kb, 具有杂合启动子 *tac* 和抗氨基青霉素酶基因 (*Ap<sup>r</sup>*)。含有此质粒的大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株由中国预防医学科学院病毒研究所赠送, 保存在 LB 斜面上。

#### (二) DNA 的提取与回收

本文于 1989 年 2 月 15 日收到。

\* 国家科学基金和国家教委基金资助课题。

\*\* 现在同济医科大学微生物教研室工作。

按文献[12, 13] 碱解 BsNPV 多角体, 纯化病毒粒子并提取 DNA, 将其溶解在适量  $1 \times \text{TE}$  (Tris-HCl 10 mmol/L, EDTA 1mmol/L, pH 7.6) 缓冲液中。

质粒 DNA 的提取是在 LB 液体培养基中培养细菌, 用煮沸法提取<sup>[13]</sup>, DNA 片段的回收参考文献[13, 15]。

### (三) DNA 的重组与转化

按文献[13—15] 进行 DNA 的限制性消化, 根据文献[15]进行连接反应, 即取插入片段 50ng ( $48 \mu\text{l}$ ), 同一酶消化的载体 DNA 40 ng ( $30 \mu\text{l}$ ), 加 10 倍连接缓冲液 (500 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 100 mmol/L DTT, pH 7.6)  $10 \mu\text{l}$ , 4mmol/L ATP  $10 \mu\text{l}$ , T<sub>4</sub> DNA 连接酶 2.0 单位, 总体积 100  $\mu\text{l}$ 。12—16℃ 反应过夜。

按 Maniatis 等<sup>[15]</sup>提出的方法制备感受态细胞 *E. coli* HB 101 按文献[13]进行转化。取 0.2 ml 涂布在含氨苄青霉素 (Ap) 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 LB 平板, 37℃ 培养过夜, 筛选转化菌落, 提取其质粒 DNA, 用电泳法根据 DNA 的大小确定阳性重组体。

### (四) 表达蛋白的分离纯化

在培养上清液中加入 80% 饱和度的硫酸铵, 沉淀总蛋白, 透析 48 小时脱盐, 聚乙二醇浓缩, 用岛津紫外分光光度计测定蛋白含量。

用 Sephadex G-100 柱 ( $60 \times 2 \text{ cm}$ ) 层析<sup>[16]</sup>, 分离纯化蛋白质。标准蛋白为碱性磷酸化酶 (APase, MW 9 万), 牛血清白蛋白 (BSA, MW 6.7 万) 卵清蛋白 (OB, MW 4.3 万)、胃蛋白酶 (PPase, MW 3.5 万)、胰蛋白酶 (TPase, MW 2.3 万) 和细胞色素 C (cyt C, 1.2 万), 测出它们的洗脱体积 ( $V_e$ ), 根据柱参数外水体积 ( $V_o$ ) 和内水体积 ( $V_i$ ), 用公式:  $K_d = \frac{V_o - V_e}{V_i - V_e}$ , 求标准蛋白和样品的分配系

数 ( $K_d$ ), 按文献[16] 绘制标准曲线并查出表达蛋白的分子量。

### (五) 抗血清的制备及免疫反应\*

选体重 3kg 的健康雄性家兔, 用 BsNPV 包涵体蛋白 (10 mg/ml) 多点肌肉和皮下注射, 分别于 7 天和 14 天后进行第二次和第三次静脉注射, 共注射 3mg。第三次注射后 10 天从颈动脉采血, 37℃ 放置 1 小时, 转存于 4℃ 过夜, 取上层透明血清, -4℃ 保存备用。

进行表达抗原和抗血清的免疫沉淀反应, 37℃ 保温 24 小时观察。

### (六) 电泳

DNA 用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 蛋白质用不连续 SDS-PAGE 电泳, 实验方法参考文献[13—15]。

## 结 果

### (一) 阳性重组体的筛选和克隆位点

从 AP-LB 平板中得到转化菌落 135 个, 挑出 90 个菌落接种培养, 提取其质粒 DNA, 经电泳发现, 其中 6 个菌落的质粒 DNA 中有外源片段插入 (图 1)。

用 BamHI 对其中的两个重组质粒 pBs 7d 和 pBs 31d 进行重消化, 在琼脂糖凝胶上看到两个片段, 分别相当于质粒 pDR 540 和插入片段的位置, 说明 BsNPV DNA 的 BamHI-H 片段克隆到了载体 DNA 中 (图 2)。

根据 *ocu* 基因表达结果证明, BamHI-H 片段是以负链 5' 端插在载体杂合启动子下游的 BamHI 位点, 基于我们已发表的序列分析资料<sup>[11]</sup>, 将重组质粒的结构、BamHI-H 片段的酶切位点和 *ocu* 基因启动区域的特征序列绘于图 3。

### (二) *ocu* 基因在 *E. coli* 细胞中表达

\* 抗血清由研究生周晓峰制备。

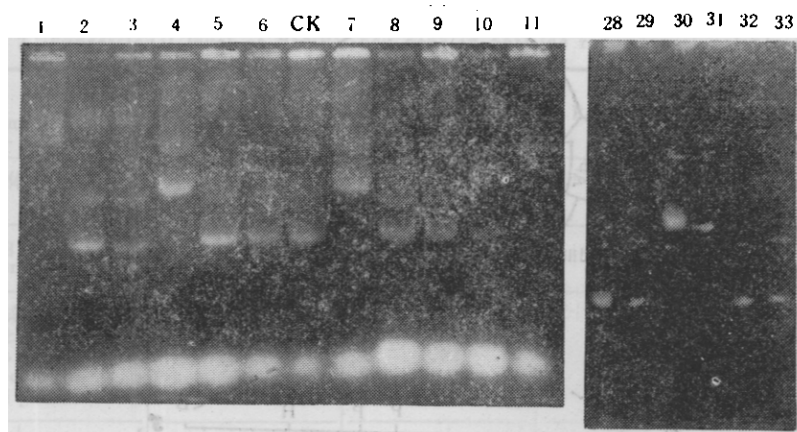


图 1 阳性重组体的筛选

CK: pDR 540 DNA 作对照; 1, 4, 7, 11, 30, 31: 阳性重组质粒; 2, 3, 5, 6, 8—10, 28, 29, 32, 33: pDR 540 DNA 自我连接并转化的阴性转化子

Fig. 1 Selection of positive recombinants

CK: pDR 540 DNA; 1, 4, 7, 11, 30, 31: positive recombinant plasmids; 2, 3, 5, 6, 8—10, 28, 29, 32, 33: negative transformants transformed with pDR 540 DNA after self-ligation

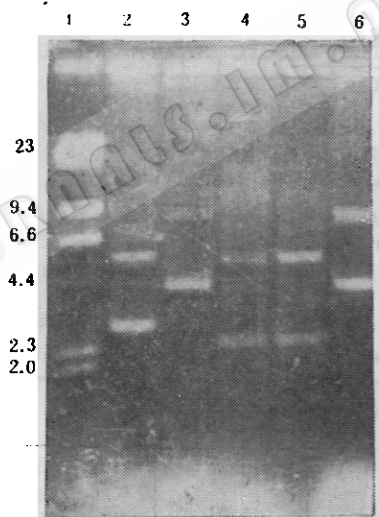


图 2 阳性重组质粒 DNA 的 BamHI 重消化

1. Hind III 消化的  $\lambda$ -DNA 作标准; 2. 未消化的亲本质粒 pDR 540 DNA; 3, 6. 未消化的重组质粒 pBs 7d 和 pBs 31d DNA; 4, 5. 消化的重组质粒 pBs 7d 和 pBs 31d DNA. 未消化的质粒 DNA 有 ccc 和 oc 两种构型, 消化的重组质粒, 显示插入片段 BamHI-H 被重新切下, 剩下一条线型质粒 DNA 带。

Fig. 2 Re-digestion of positive recombinant plasmid DNA by BamHI

1.  $\lambda$ -DNA digested by Hind III as markers; 2. Un-digested parent plasmid pDR 540 DNA; 3, 6. Un-digested recombinant plasmids pBs 7d and pBs 31d DNA; 4, 5. Digested recombinant plasmids pBs 7d and pBs 31d DNA. Two configurations (ccc and oc) of the un-digested plasmids are shown. The inserting fragments (BamHI-H) are re-cut out from recombinant plasmids.

将 5 个阳性重组菌落在含 Ap 浓度递增的 LB 液体中培养 12 小时发现, 含 pBs

7d 和 pBs 31d 的两个重组菌落在高浓度 Ap 的培养基中生长旺盛, 其总蛋白比含亲

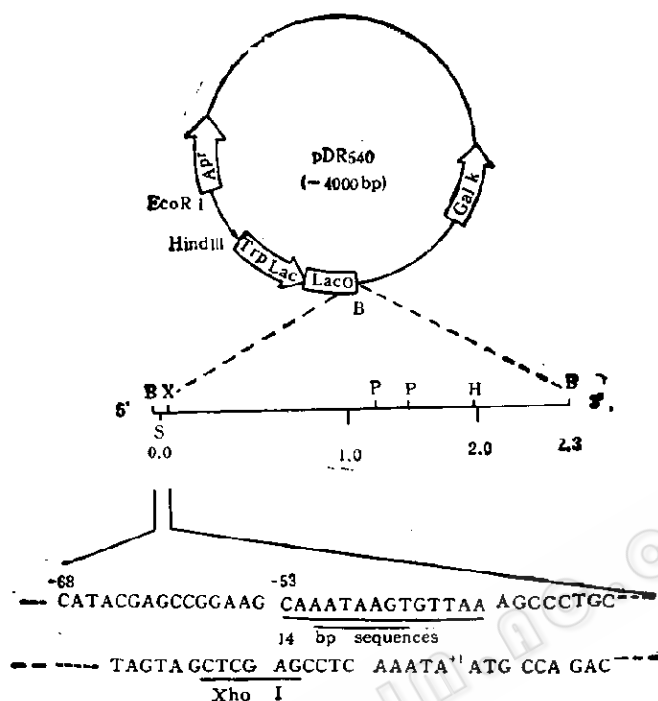


图3 阳性重组质粒 pBs 7d 的基因组结构  
显示插入片段的克隆位点、限制性图谱及 *ocu* 基因 5' 端的结构特征  
B: BamHI; S: SmaI; X: XhoI; P: PstI; H: Hind III

Fig. 3 Genomic structure of positive recombinant plasmid pBs 7d  
Cloning site of inserting fragment, restriction map and specific sequences of *ocu* gene 5' end are shown. B: BamHI; S: SmaI; X: XhoI; P: PstI; H: Hind III

表1 重组菌株在不同浓度 Ap 中的生长

Table 1 Growth of recombinational strains in LB with different concentration of Ap

Ap ( $\mu\text{g/ml}$ )	10	50	100	150	200
<i>E. coli</i> HB 101	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> (pDR 540)	1.20	1.02	0.97	0.97	0.90
<i>E. coli</i> (pBs 4d)	0.57	0.52	0.59	0.50	0.50
<i>E. coli</i> (pBs 7d)	1.02	1.07	0.96	0.96	0.92
<i>E. coli</i> (pBs 11d)	0.02	0.01	0	0	0
<i>E. coli</i> (pBs 30d)	0.04	0.04	0.01	0	0
<i>E. coli</i> (pBs 31d)	0.84	0.82	0.79	0.77	0.75

本质粒的出发菌株分别高 1.1 和 1.4 倍;其他三个重组菌落在高浓度 Ap 中生长较差或不能生长(表 1)。

阳性重组质粒 pBs 7d 和 pBs 31d 产

生的总蛋白分别比亲本质粒高 1.1 和 1.4 倍,包涵体蛋白的表达水平分别达到 0.8 和 0.47mg/ml (表 2)。

表 2 阳性重组质粒 *ocu* 基因的表达水平Table 2 Expressional level of *BsNPV ocu* gene in positive recombinational plasmids

质 粒 Plasmids		亲本质粒 Parent (pDR 540)	重组质粒 Recombinant (pBs 4d)	重组质粒 Recombinant (pBs 7d)	重组质粒 Recombinant (pBs 31d)
培养体积 Volume (ml)		198	203	200	198
总蛋白 (mg) Total proteins		128.0	219.5	306.0	273.6
重组质粒和亲本质粒 总蛋白之比 Rate of total proteins between recombination and parent		—	1.72	2.39	2.14
<i>ocu</i> 基因 表达蛋白 <i>ocu</i> gene express proteins	(mg) (mg/ml)	0 0	2.7 0.037	51.2 0.80	30.6 0.47

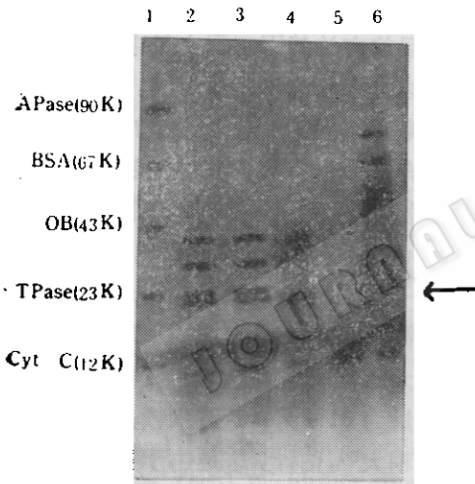


图 4 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳  
1. 标准蛋白; 2, 3, 5. 分别代表阳性重组体 pBs 7d, pBs 31d 和 pBs 4d 的表达蛋白; 4. 亲本质粒 pDR 540 的表达蛋白; 6. *BsNPV* 的包涵体蛋白(箭头)

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis of expression proteins

1. Marker proteins; 2, 3, 5. Expression proteins produced by pBs 7d, pBs 31d and pBs 4d respectively; 4. Expression proteins produced by parent plasmid pDR 540; 6. Polyhedral protein from *BsNPV* (arrow)

### (三) 表达蛋白的分离纯化

SDS-PAGE 发现, 重组质粒产生的蛋白质比亲本质粒多出了一条低分子量的蛋

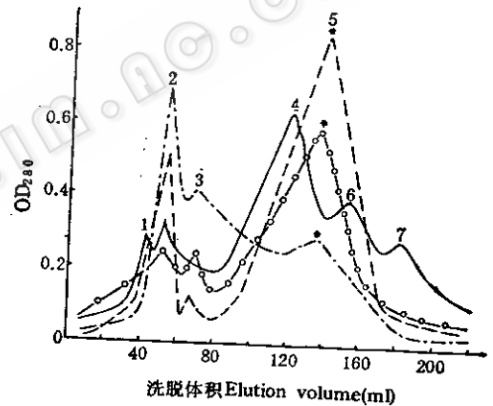


图 5 表达蛋白的 Sephadex G-100 柱层析  
—— pDR 540 表达蛋白; --- pBs 7d 表达蛋白; —○—○— pBs 31d 表达蛋白; —□—□— pBs 4d 表达蛋白; \* 峰 5 为表达包涵体蛋白。

Fig. 5 Chromatograph on sephadex G-100 column for expression proteins (EP)  
—— EP from pDR 540; --- EP from pBs 7d; —○—○— EP from pBs 31d; —□—□— EP from pBs 4d; \* The peak 5 for polyhedral proteins

白带, 相当于包涵体蛋白的位置(图 4)。

Sephadex G-100 柱层析结果表明, 三个重组质粒都能产生三个峰, 其中 pBs 7d 和 pBs 31d 以峰 5 为主峰、pBs 4d 以峰 2 为主峰。亲本质粒产生 5 个峰, 没有特

表 3 表达蛋白的层析行为和分子量 ( $\times 10^3$  道尔顿)Table 3 Chromatograph of expressional proteins and their molecular weights ( $\times 10^3$  dalton)

峰 Peakes	pDR540		pBs 4d		pBs 31d		pBs 7d	
	洗脱体积 Elution volume (ml)	MW	洗脱体积 Elution volume (ml)	MW	洗脱体积 Elution volume (ml)	MW	洗脱体积 Elution volume (ml)	MW
1	54.0	111						
2	56.5	107	56.0	108.1	57.5	106.2	55.0	109.6
3			70.0	88.1	69.0	89.1	71.0	86.7
4	121.0	84.0						
5			140.0	31.6	138	32.0	140	30.7
6	151.0	26.5						
7	191	15.4						

征性的峰 5 (图 5)。将各峰的洗脱体积和分子量列于表 3。

收集洗脱液, 浓缩后进行免疫沉淀反应, 发现 pBs 7d 和 pBs 31d 的峰 5 与抗血清有强阳性反应, pBs 4d 反应微弱, 载体 pDR 540 为阴性反应 (图 6)。免疫双向琼脂扩散试验得到了同样结果。证明峰 5 为 BsNPV ocu 基因表达的包涵体蛋白, 其分子量在  $30.7-32.0 \times 10^3$  道尔顿之间 (表 3), 与电泳结果一致。

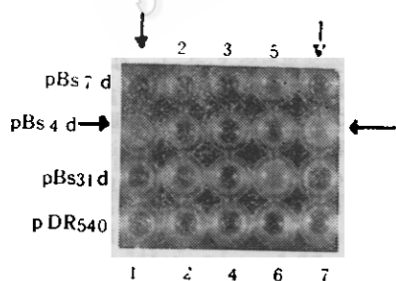


图 6 表达蛋白的免疫沉淀反应  
重组质粒的峰 5 为阳性反应; 亲本质粒 pDR 540 的峰 1, 2, 4, 6, 7 为阴性反应; 箭头所指为 BsNPV 包涵体蛋白的阳性对照

Fig. 6 Immune response of expression proteins

Peak 5 of recombinant plasmids are positive reaction; peaks 1, 2, 4, 6, 7 of parent plasmid are negative reaction; polyhedral proteins of BsNPV for controls are shown by arrows

## 讨 论

在目前有关基因工程文献中, 外源基因的表达量一般达不到毫克级, 但少数也有达到毫克水平的<sup>[17]</sup>。表达量的这种巨大落差与许多因素有关, 其中主要原因是启动子的强弱。由 trp 和 lac 组成的杂合启动子 tac 是迄今大肠杆菌表达质粒的最强启动子<sup>[13]</sup>。我们利用含有 tac 启动子的表达质粒 pDR 540, 实现了 BsNPV ocu 基因在大肠杆菌细胞中的高效表达。其平均分子量为  $31.4 \times 10^3$  道尔顿, 比曾报道的结果稍大<sup>[9]</sup>, 估计, 这是由于在表达载体 tac 启动子控制下, ocu 基因 5' 端的非编码区也与编码序列一起得到转录并表达的缘故。暗示 BsNPV ocu 基因位于 BamHI-H 片段 5' 端。我们对该片段的序列分析结果<sup>[18]</sup>证明了这一点 (图 3)。

本文所有含重组质粒的菌落都是从含 Ap 20  $\mu\text{g/ml}$  的 LB 平板中筛选的。在以后的实验中发现, 两个阳性重组菌落即使在 10  $\mu\text{g/ml}$  的 Ap-LB 液体中也不能生长。加拿大学者梁伟才认为<sup>[19]</sup>, 许多大肠杆菌重组质粒不具遗传稳定性, 在多次传代培养之后, 重组质粒有丢失现象, 基因

工程菌则由含质粒的细胞变成无质粒的细胞,由对抗菌素的抗性变成敏感性,这可能是 pBs 11d 和 pBs 30d 菌株在低浓度 Ap 中不能生长的原因。

## 参 考 文 献

- [1] Smith, G. E. et al.: *J. Virology*, 45: 215, 1983.
- [2] Luckow, V. et al.: *Virology*, 167: 56, 1988.
- [3] Lanford, R. E.: *Virology*, 167: 72, 1988.
- [4] Jeang, K.-T. et al.: *J. Virology*, 62(10), 3874, 1988.
- [5] Smith, G. E. et al.: *Mol. Cell Biology*, 3(12): 2156, 1983.
- [6] 齐义鹏: 病毒学报, 4: 202, 1990.
- [7] Summers, M. et al.: *Virology*, 84: 390, 1978.
- [8] Doerfler, W. et al.: *Molecular Biology of Baculovirus*, Academic Press, New York, p. 58, 1986.
- [9] 黄永秀等, 武汉大学学报, 1: 121, 1988.
- [10] 齐义鹏等, 病毒学报, 5(2): 115, 1989.
- [11] 齐义鹏等, 生物防治通报, 1: 19, 1985.
- [12] McCarthy, W. et al.: *J. Invert. Pathol.*, 28: 57, 1976.
- [13] 齐义鹏等: 基因工程原理和方法, 四川大学出版社, 成都, p. 14, 180, 182, 289, 203, 205, 329, 1989.
- [14] Ausubel, F. M. et al.: *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, p. 31, 316, 1987.
- [15] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p. 458, 104, 150, 1983.
- [16] Qi Yipeng, et al.: *Kexue Tongbao*, 29(3): 399, 1984.
- [17] 邱井生等: 微生物学报, 29(2): 101, 1989.
- [18] Qi, Yipeng et al.: Cloning and expression of  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* by insect baculovirus transfer vector, Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Proceedings and Abstracts, Adelaide, Australia, 20—24, August, p. 263, 1990.
- [19] 梁伟才: 基因工程原理和方法(齐义鹏等编著), 四川大学出版社, 成都, p. 246—248, 1989.

# CLONING AND EXPRESSION OF POLYHEDRIN GENE FROM INSECT VIRUS IN *E. COLI* CELL

Qi Yipeng Huang Yongxiu Shen Ying Yin Yizhong

(Department of Virology, Wuhan University, Wuhan)

The BamHI-H fragment containing polyhedrin gene (ocu) of Buzura suppressoria nuclear polyhedrosis virus (BsNPV) was inserted into BamHI site in plasmid pDR540 and two Ap<sup>r</sup> positive recombinants were obtained. Total proteins produced by clones are more 1.1—1.4 folds than that by parent strain carried plasmid pDR540 in the medium. Expression of ocu protein was 0.8 mg/ml and 0.47 mg/ml. The expression protein was isolated

and purified by PAG electrophoresis and gel chromatograph. The molecular weight is  $32.1 \times 10^3$  dalton.

## Key words

Buzura suppressoria nuclear polyhedrosis virus; Polyhedrin gene; Expression protein