

以 neo 作选择标记富集和筛选阳性重组杆状病毒*

朱反修 黄永秀 齐义鹏**

(武汉大学病毒学研究所 武汉 430072)

摘 要 将苜蓿银纹夜蛾 (AcNPV) 极早期基因 IE1 启动子控制的 neo 基因表达盒插入 p10 型转载体 pAcEP106 中得到 pAcPIneo, 将它和野生型 AcNPV DNA 共转染 Sf 细胞得到 neo⁺ 重组病毒。因为 neo 基因的表达使得 neo⁺ 基因的重组病毒可以在 G418 的存在下复制, 而野生型则不能。将共转染得到的上清液以很低的感染复数连续传代, 通过 G418 的选择作用, 使重组病毒得到富集, 三代以后重组病毒比例可达 90% 以上, 如此之高的重组比例使得重组病毒的筛选不须经空斑纯化只须有限稀释即可得到。利用杆状病毒早期基因启动子表达 neo 基因因为用早期基因表达外源毒素基因作重组病毒杀虫剂打下了基础, 同时也建立了一种简便有效的筛选、富集阳性重组病毒的方法。

关键词 杆状病毒, 早期基因, 新霉素抗性基因, 筛选方法

由于用杆状病毒的某些基因构建真核表达载体其表达量大, 表达产物具有完整的生物活性而得到广泛应用^[1-3]。其原理是用高效表达的极晚期多角体蛋白基因 (ocu) 启动子和外源基因融合, 通过体内同源重组, 取代病毒基因组上 ocu 基因编码序列得到 ocu⁻ 的重组病毒。ocu⁻ 子代病毒不产生多角体, 和 ocu⁺ 的亲代病毒有形态差异, 可通过空斑测定进行鉴别, 以筛选出重组病毒。由于 ocu 基因对病毒的复制是非必需的, 用重组病毒再感染昆虫细胞即可在感染的极晚期得到大量的表达产物。

尽管这个系统非常有效, 但由于同源重组的比例很低 (0.1%—1%), ocu⁺/ocu⁻ 表型差异不大, 筛选重组病毒有较大困难, 费时费力且需一定的经验。目前已有不少人在这方面做了改进^[4]。我们用 AcNPV 的极早期反式调控基因 (IE1) 启动子控制新霉素抗性基因 (neo) 的表达作显性选择标记, 筛选重组病毒具有简单、快速、高效等特点。

1 材料和方法

1.1 材料

草地夜蛾 Sf9 细胞和野生型苜蓿尺蠖核型多角体病毒 (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus, AcNPV) 由美国加州大学 (Riverside) 昆虫学系 Federici 教授赠送。质粒 pAcIEneo 由美国 Texas A&M 大学昆虫学系 Jarvis 和 Guarino 教授^[5]惠

* 国家自然科学基金和国家教委、教委资助项目。

** 联系作者。

本文于 1994 年 2 月 22 日收到。

赠。pAcEP106 由我们自己构建^[6]。所用限制性内切酶、T4 连接酶、Klenow 酶等购自 Progenia 公司。(G418) Geneticin 购于 GIBCO 公司。

1.2 方法

Sf 细胞用昆虫细胞常规培养基 TNM-FH 在 27℃ 下传代。以芽生病毒 (BV) 作为毒种, 以 10 感染复数 (MOI) 接种单层细胞, 27℃ 吸附 1h 后吸出接种物, 替换新鲜培养基。根据实验要求, 培养基中加 1mg/ml G418。按 Summers^[1] 方式从 BV 型病毒粒子中提取病毒 DNA。按照文献^[7] 常规 DNA 操作构建杆状病毒转移载体。转染按 Summers^[1] 的磷酸钙共沉淀法进行。以 1μg 野生型 AcNPV DNA 和 10μg 载体 DNA 混合, 加入转染缓冲液, 逐滴加到单层细胞的中央。27℃ 静置 4h 后, 倾出上清, 加入新鲜培养基, 27℃ 培养 4—7d。每天观察, 当多角体形成时收获上清液。

重组病毒的富集是以转染上清约 0.05MOI 感染单层细胞, 培养基中加 1mg/ml G418, 2—4d 后取上清液以同样低的感染复数在 1mg/ml G418 存在下感染单层细胞, 连续三次。接着, 按 Summers 方法测定病毒滴度 (TCID₅₀), 用转染上清液及各代上清液, 以 10 倍稀释 (10⁻¹—10⁻⁸) 感染 96 孔培养细胞, 分别测定在 G418 存在和不存在下的滴度。按 King 等介绍的方法^[2] 提取感染细胞总 DNA, 进行限制性消化和琼脂糖凝胶电泳。

2 实验结果

2.1 带 neo 基因的转移载体的构建

pAcIEneo 由质粒 pUC8、AcNPV IE1 基因以及取代 IE1 编码区的 neo 基因等三部分组成, 以 IE1 基因启动子控制 neo 的表达, 构成一个表达盒。用 EcoRI 和 Hind III 双酶切, 回收此表达盒, Klenow 补平后插入 pAcEP106 的 p10 基因编码区中的 Hinc I 位点。由于 neo 基因上游保留有原核启动区, 故能在有卡那霉素的平板上生长。以 Kan+Amp 双抗平板可以方便的筛选重组子, 得到 12 个菌落, 经小量提取质粒 DNA, 酶切后电泳证明都含有约 3.7kb 的 IE1+neo 插入片段, 包括两种插入方向。分别命名为 pAcPIneoR 和 pAcPIneoL, 前者 IE1 启动子方向和 p10 的一致 (图 1)。

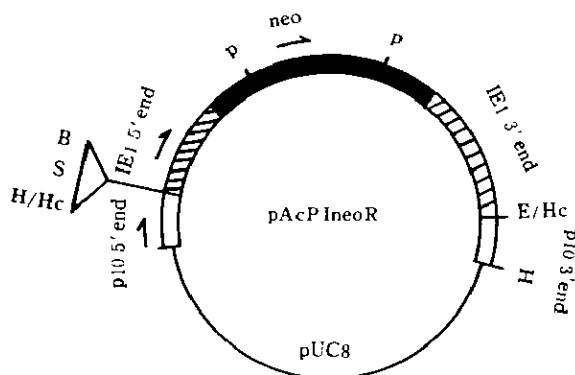


图 1 载体 pAcPIneoR 示意图

Fig. 1 Diagram of plasmid pAcPIneoR, neo, neomycin resistance gene;

IE1, AcNPV IE1 gene; p10, AcNPV; p10 gene; E, EcoRI; H, HindIII; Hc, HincI; P, PstI; S, SmaI.

2.2 G418 对野生型 AcNPV 复制的抑制

Jarvis 的工作^[5]表明 G418 的对 Sf 细胞的生长有抑制作用, 并且 Sf 细胞对 G418 的抗性比哺乳动物细胞的略高。为了检查 G418 是否可以抑制 AcNPV 病毒的复制, 用野生型 AcNPV 按 10 MOI 接种单层细胞, 吸附 1h 后, 吸去接种物, 加入含 1mg/ml G418 的新鲜培养基, 并设不加 G418 的对照。48—72h 后用光学显微镜观察, 发现加有 G418 的培养细胞中始终见不到多角体形成, 而不加 G418 的对照细胞约 48h 后就可见有大量的多角体形成, 说明 1mg/ml 的 G418 可抑制病毒的复制(图 2)。

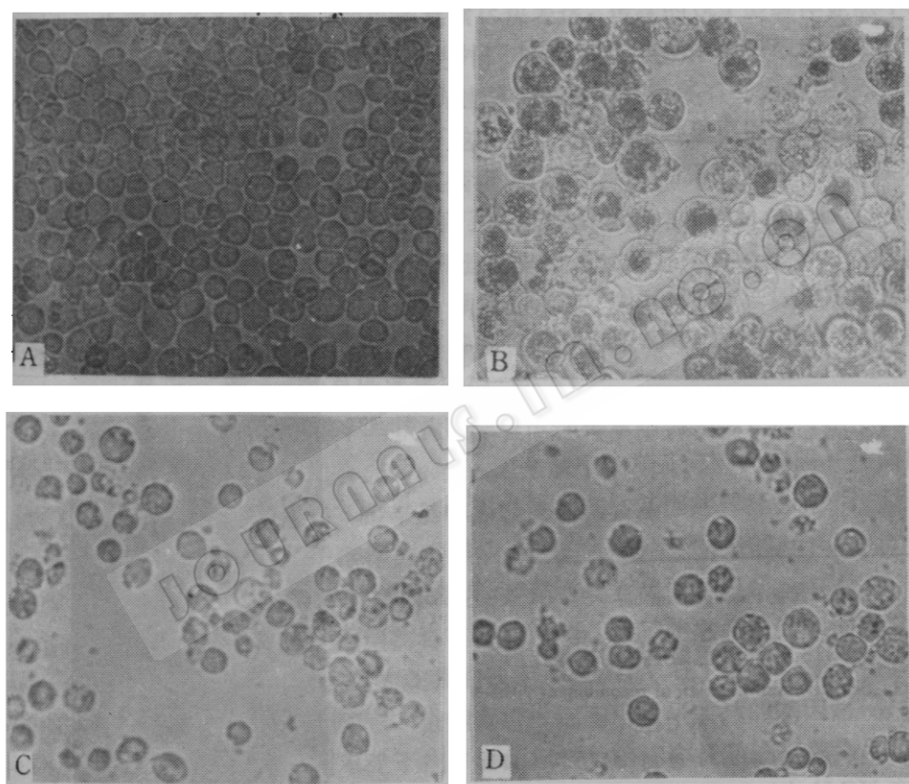


图 2 G418 对 Sf 细胞和 AcNPV 的抑制 ($\times 400$)

Fig. 2 Inhibition of AcNPV replication in Sf cells by G418 ($\times 400$)

A. Sf 细胞, 未加 G418; B. 接种 AcNPV 的 Sf 细胞, 未加 G418;

C. Sf 细胞, 加 G418; D. 接种 AcNPV 的 Sf 细胞, 加 G418.

A. Sf cells, no G418; B. Sf cell infected with AcNPV, no G418;

C: Sf cells, with G418; D. Sf cell infected with AcNPV, with G418.

2.3 neo 基因的表达及 G418 对 neo⁺ 重组病毒的富集作用

因为野生型 AcNPV 的复制可被 G418 抑制, 如重组病毒含有 neo 基因并能表达, 则在 G418 存在下连续传代, 重组病毒必定会被相对富集。实验中取 0.1ml 转染上清接种 2×10^6 细胞, 吸附 1h 后, 吸去接种物, 加入含 1mg/ml G418 的新鲜培养基, 并设不加

G418 的作为对照, 由于接种物是重组病毒和野生型病毒的混合物, 因此培养 3d 后加 G418 的只有少量细胞有多角体出现, 而不加 G418 的对照多数细胞可见多角体。再取这种培养物的 0.1ml 上清 (总体积 1/30) 接种 2×10^5 细胞进行连续传代, 接种 3d 后光镜下观察, 发现在加 G418 的情况下, 感染重组病毒并能形成多角体的细胞数目逐代增多, 说明含 neo 的重组病毒滴度逐渐增高, 同时也表明 IE1 基因启动子可以驱动 neo 基因在昆虫细胞中的表达。取每次传代上清, 分别在有 G418 和没有 G418 存在的情况下进行 TCID₅₀ 测定, 结果见图 3。在有 G418 作为选择压力时, 经 3 次连续传代, 抗 G418 的病毒滴度和总病毒滴度已基本接近一致。

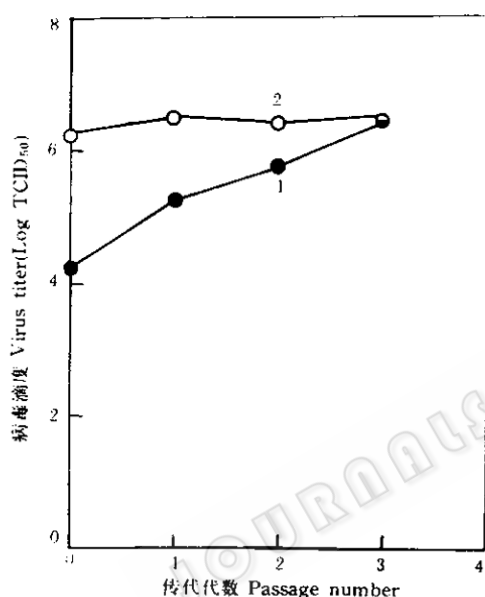


图 3 G418 对 neo⁺重组病毒的富集作用

Fig. 3 Selective multiplication of recombinant viruses by G418

1. 加 G418 With G418; 2. 不加 G418 No G418.

2.4 富集病毒中重组病毒的比例

为了测定第三代病毒中抗 G418 重组病毒所占总病毒的比例, 首先进行空斑测定。随机挑取 24 个空斑, 接种 24 孔培养细胞, 每孔加 1ml 含 1mg/ml G418 的新鲜培养基, 培养 3—5d, 光镜观察可见 23 孔多角体形成, 说明重组病毒的比例在 90% 以上。

2.5 重组病毒的酶切分析

接种 neo⁺重组病毒 (vAcPIneo), 不加 G418 进行扩增后, 以 10 MOI 接种单层细胞, 72h 后收获, 提取细胞总 DNA (病毒 DNA 占 25%), 经 Hind III 酶切, 电泳结果见图 4。从图中可以看出, 野生型和重组病毒的酶切图谱有明显差别, 重组病毒 DNA 中带有 p10 基因的

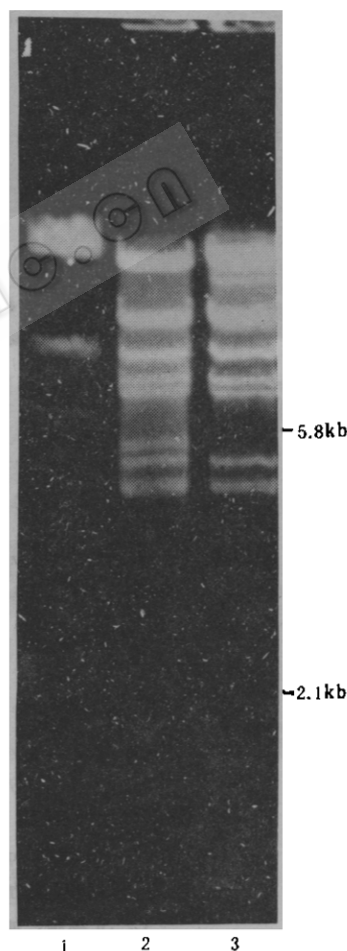


图 4 重组病毒的酶切分析

Fig. 4 RE analysis of recombinant virus

1. λ DNA/Hind III Marker; 2. vAcPIneo/Hind III; 3. AcNPV/Hind III.

2.1kb Hind III-Q 片段消失,并由一条约 5.8kb 的片段所代替,说明重组是发生在预计的 p10 位相的。

3 讨 论

从 Smith 等^[8]用 AcNPV ocu 基因转移载体表达 β -干扰素以来,人们用杆状病毒表达系统已表达了上百种蛋白,一般都是用 ocu 型转移载体,至今尚未有用极早期基因表达外源基因的载体问世。近年来,随着杆状病毒分子生物学的发展,昆虫病毒学家们已把注意力转向用基因工程方法改造杆状病毒,构建杀虫速度快、杀虫谱广的新一代重组病毒杀虫剂上。为了提高杀虫速度,使外源毒素尽快表达,传统的 ocu 型载体显然不能胜任,为此我们探索利用极早期基因启动子表达外源基因。由于早期基因一般都是必需基因,且不象 ocu 基因那样有明显的标记,使得构建早期基因转移载体有一定的困难。我们利用 neo 同时作筛选标记又作报道基因解决了这一难题。从实验结果可以看出,野生型昆虫杆状病毒在 G418 存在下不能复制,而重组病毒可以抗 G418 而得到复制。我们认为这是因为 neo 基因在 IE1 基因启动子控制下得到了表达的结果。

杆状病毒表达系统中阳性重组病毒筛选方法一直比较复杂且需要一定的经验,已有不少人作了大量的努力,目前已有 LacZ 颜色标记法、线性化技术、体外定点重组、酵母体内重组、HSV-tk 基因标记、Bacmid 等等筛选阳性重组病毒方法的报道^[4],但没有一种可以象筛选重组质粒那样具有显性选择标记。

G418 是氨基糖苷类抗生素,与庆大霉素、卡那霉素结构类似,它可以干扰 80S 核糖体功能,抑制真核细胞蛋白质合成。neo 基因来源于细菌 Tn5^[9],编码一种磷酸转移酶 (APH I),可使 G418 失活。neo 最早是作为动物细胞转基因的选择标记^[10],最近被引入动物病毒如 EB 病毒和痘苗病毒作为重组病毒选择标记^[11-13]。1993 年 Lerch^[14]等人用 AcNPV 35S 蛋白启动子控制 neo 基因表达,并用常规方法选择得到 neo⁺病毒,和野生型共感染时,发现 G418 对 neo⁺重组病毒有选择作用。为了使之能作为筛选重组昆虫杆状病毒的标记,neo 必须尽早表达。为此我们选用了 AcNPV IE1 基因启动子控制 neo 基因的表达,IE1 基因是极早期基因^[15],是病毒进入细胞后最早表达的基因之一。

为了使感染细胞彼此之间不受干扰,必须以较低感染复数进行感染,使每个细胞感染的病毒不超过一个。在连续传代时也以低感染复数进行,通过对各代 BV 产量进行测定,发现 G418 对 neo⁺的选择作用非常明显。三代以后,几乎都是重组病毒。

由于 G418 对 neo 的选择作用,可以以此构建新型的带 neo 基因的转移载体。将它和相应的辅助病毒共转染昆虫细胞后,转染上清可在有 G418 存在的条件下以低感染复数连续传代 3—4 次而使 neo⁺重组病毒富集,经有限稀释后便可得到重组病毒的纯培养。由于富集后阳性重组病毒的比例如此之高,可免去费时费力的空斑纯化。

参 考 文 献

- [1] Summers M D, Smith G E. *Texas Agric Exp Station Bull.* 1987, 1555: 1—57.
- [2] King L A, Possee R D. *The Baculovirus Expression System: A Laboratory guide.* London: Chapman & Hall Press. 1992. 1—229.

- [3] O'Reilly DR, Miller L K, Luckow V A, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. . New York; W. H. Freeman and Company Press, 1992. 1: 347.
- [4] 朱反修, 王福山, 齐义鹏. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22 (1): 31—35.
- [5] Jarvis D L, Fleming J O, Kovacs C R *et al.* *Bio/Technology*, 1990, 8 (2): 950—955.
- [6] 黄永秀, 齐义鹏, 李凌云, 等. 微生物学报, 1991, 34 (3): 191—197.
- [7] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T M. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Smith G E, Summers M D, Fraser M J. *Mol Cell Biol*, 1983, 3 (1): 183—192.
- [9] Southern P J, Berg P. *J Mol Appl Gen*, 1982, 1 (1): 327—341.
- [10] Bech E, Ludwig G, Auerswald E A *et al.* *Gene*, 1982, 19 (1): 327—336.
- [11] Franke C A, Rice C M, Strauss J H *et al.* *Mol Cell Biol*, 1985, 5 (3): 1918—1924.
- [12] Lee M A, Yates J L. *J Virol*, 1992, 66 (2): 1899—1906.
- [13] Wang F, Marchini A, Kieff E *et al.* *J Virol*, 1991, 65 (2): 1701.
- [14] Lerch R A, Friesen P D. *Nucl Acids Res*, 1993, 21 (4): 1753—1760.
- [15] Guarino L, Summers M D. *J Virol*, 1987, 61 (3): 2091—2099.

AN EFFICIENT METHOD TO IDENTIFY POSITIVE RECOMBINANT BACULOVIRUS BY USING NEO AS SELECTION MARKER

Zhu Fanxiu Huang Yongxiu Qi Yipeng

(*Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072*)

Abstract A cassette of neomycin resistance gene under the AcNPV IE1 gene promotor was inserted into a p10-based transfer vector pAcEP106. Recombinant plasmid pAcP_{neo} was selected and cotransfected Sf cells with wild type AcNPV DNA. Expression of the neo gene under IE1 promotor enable recombinant virus multiply in the Sf cells treated with antibiotic G418 which inhibit the wild-type virus growth. Passage the cotransfection suspend at low MOI, the proportion of neo-containing viruses increase. After three passages, the recombinants accounted for over 90%. This work lay a foundation for using baculovirus early gene promoter to drive foreign gene expression and also established a simplified procedure for selection of positive recombinant baculoviruses.

Key words Baculovirus, Early gene, Neomycin resistance gene, Selection method