

# 绿色荧光蛋白基因在昆虫细胞中的克隆与表达\*

朱反修 齐义鹏\*\* 黄永秀 胡建红

(武汉大学病毒研究所 武昌 430072)

**摘要** 将绿色荧光蛋白(GFP)基因亚克隆到转移载体 pVLneo 的多角体蛋白基因(ocu)启动子下游, 与杆状病毒 AcNPV DNA 共转染昆虫细胞, 通过同源重组和 G418 筛选, 构建了整合有 GFP 基因的重组病毒。在昆虫细胞中表达的 GFP, MW 为 30kDa, 在荧光显微镜下呈现美丽的绿色, 荧光光谱表明其激发波长 395nm, 发射波长 509nm。Southern blot 杂交证明, 重组病毒的 1kb EcoRI 片段与 GFP cDNA 探针有很强的杂交信号, 这是 GFP 基因在杆状病毒基因组中整合的直接证据。

**关键词** 绿色荧光蛋白基因, AcNPV, 转移载体, 昆虫细胞, 表达

分子生物学中常用的报道基因有 LacZ、CAT 和几种抗菌素基因。由于 LacZ 和 CAT 的酶促反应程序复杂, 抗菌素抗性基因比较粗放和易污染, 给研究工作带来不便, 细菌和萤火虫的荧光素酶(luciferase)基因也可作报道基因, 但需底物和辅因子的存在, 程序也很繁琐。1994 年 Chalfie<sup>[1]</sup>首次报道了海洋动物水母的绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, 简称 GFP)在大肠杆菌中的表达, 用蓝光照射产生强烈的绿光。将它转入线虫体内, 可观察到某些神经节细胞的荧光反应而定位了  $\beta$ - 维管素(Tubulin)基因, 因此用 GFP 基因比上述几种报道基因有着显著优点, 它不需外源性底物和辅因子, 无毒、稳定, 可以在 UV 或蓝光照射下直接观察。因此 GFP 基因将会发展成为一个极理想的分子生物学报道基因。另外, 还有一些关于 GFP 基因序列<sup>[2]</sup>、表达产物特性及发光机制的研究<sup>[3]</sup>。为了将 GFP 基因发展成一个新的报道基因, 特别是真核表达系统的报道基因, 我们将质粒 pGFP10.1 上的 GFP 基因亚克隆到杆状病毒表达载体上, 在昆虫细胞中实现了 GFP 的表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、载体和细胞

大肠杆菌重组质粒 pGFP10.1 DNA 由美国哥伦比亚大学 Chalfie 教授赠送, 上面含有 1.0kb GFP 基因 cDNA; 昆虫杆状病毒转移载体 pVL1393 由苜蓿尺蠖核型多角体病毒(Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus, 简称 AcNPV)的多角体蛋白基因启动子构建, 由美国 Texas A & M 大学 Summers 教授赠送; 转移载体 pAcI Enco 由美国

\* 国家自然科学基金资助的课题。

\*\* 联系与负责作者。

本文于 1995 年 10 月 24 日收到。

Jarvis 和 Guarino 教授赠送, 上面有 AcNPV 的极早期基因启动子(IE-pt)和新霉素抗性基因(neo<sup>r</sup>)组成的表达盒; 草地夜蛾细胞 Sf9 由本室保存并用 Grace's 培养基加 10% 胎牛血清培养传代; 抗菌素 G418 从 GIBCO 公司购买; 随机引物标记药盒、限制性内切酶和其它修饰酶为 Promega 公司产品。

## 1.2 DNA 的提取、回收和连接转化

按常规方法从细菌细胞提取质粒 DNA 和转移载体 DNA, 用适当的限制性内切酶消化, Gene Clean 法回收 DNA 片段, 如为相同的粘性末端, 则直接用 T4 DNA 连接酶连接; 如为不相同末端, 则先用 Klenow 酶填平, 再进行平头末端连接。制备 *E. coli* JM109 感受态细胞, 用重组 DNA 转化, 筛选出阳性重组子。

## 1.3 共转染和重组病毒的纯化

将嵌合载体 pAcNF953 DNA 与野生型 AcNPV DNA 按 10:1 共转染草地夜蛾培养细胞 Sf9<sup>[4]</sup>, 27 °C 培养 6d, 待细胞出现明显病变后, 离心收集上清作为毒种供纯化之用。按我们以前报道的方法<sup>[5]</sup>在 25ml 细胞培养瓶中加入  $2.0 \times 10^6$  细胞, 室温静置 1h 使细胞完全贴壁, 按  $10^{-3}$  接种病毒, 室温吸附 1h, 移去旧培养液, 加 4ml 新鲜的 Grace's 液和 10% 胎牛血清, 并加 G418 至终浓度 1mg/ml, 27 °C 培养 96h, 按  $10^{-3}$  进行传代连续 6 轮次, 即可筛选到重组病毒的纯培养。

## 1.4 Southern blot 和 SDS-PAGE 电泳

用 Southern blot 鉴别重组病毒, 即按 Promega 公司随机引物标记药盒说明书制备 GFP cDNA <sup>32</sup>PdCTP 探针, 与重组病毒 DNA 的酶切片段杂交, 放射自显影观察杂交结果。

按常规方法用 SDS-PAGE 检测昆虫细胞中表达的绿色荧光蛋白。

## 1.5 荧光显微观察和荧光光谱分析

取重组病毒感染的 48h 培养细胞制片, 在荧光显微镜下观察, 同时用 Shimadzu RF-5000 荧光仪测定其激发光谱和发射光谱。

# 2 实验结果

## 2.1 转移载体 pVLneo、嵌合载体 pAcNF953 的构建

为了便于重组病毒的筛选, 我们用 neo<sup>r</sup> 基因构建了一个具有筛选标记的转移载体 pVLneo。首先用 BamHI /SmaI 双酶消化, 从 pAcIEnco DNA 上切下 IE1 基因启动子控制的 neo<sup>r</sup> 基因, Klenow 酶填平后, 插入转移载体 pVL1393 *ocu* 基因 5' 调控区上游的 EcoRV 位点, 得到新的转移载体 pVLneo (图 1)。由于 *ocu* 基因 5' 端 EcoRV 位点含有 IE1 基因启动子和 neo<sup>r</sup> 基因编码序列, 在培养细胞中加入抗菌素 G418, 野生型非重组病毒复制被抑制, 重组病毒由于 neo<sup>r</sup> 基因表达产生磷酸转移酶使 G418 失活而得以生存。因此重组病毒得到富集, 在 G418 筛选压力下几个轮次连续传代就可以纯化, 大大减化了空斑纯化的复杂过程, 同时载体本身的 *ocu* 基因并未造成插入失活。

从质粒 pGFP10.1 DNA 切下 1.0kb 的 GFPcDNA EcoRI 片段待用。在上述 pVLneo 的 *ocu* 基因启动子下游有一 EcoRI 位点, 正好适用于 GFP EcoRI 片段的插入。因而构建成一个双表达的嵌合载体 pAcNF953 (图 1)。在 *ocu* 基因 5' 端上游有 IE1 启动子趋

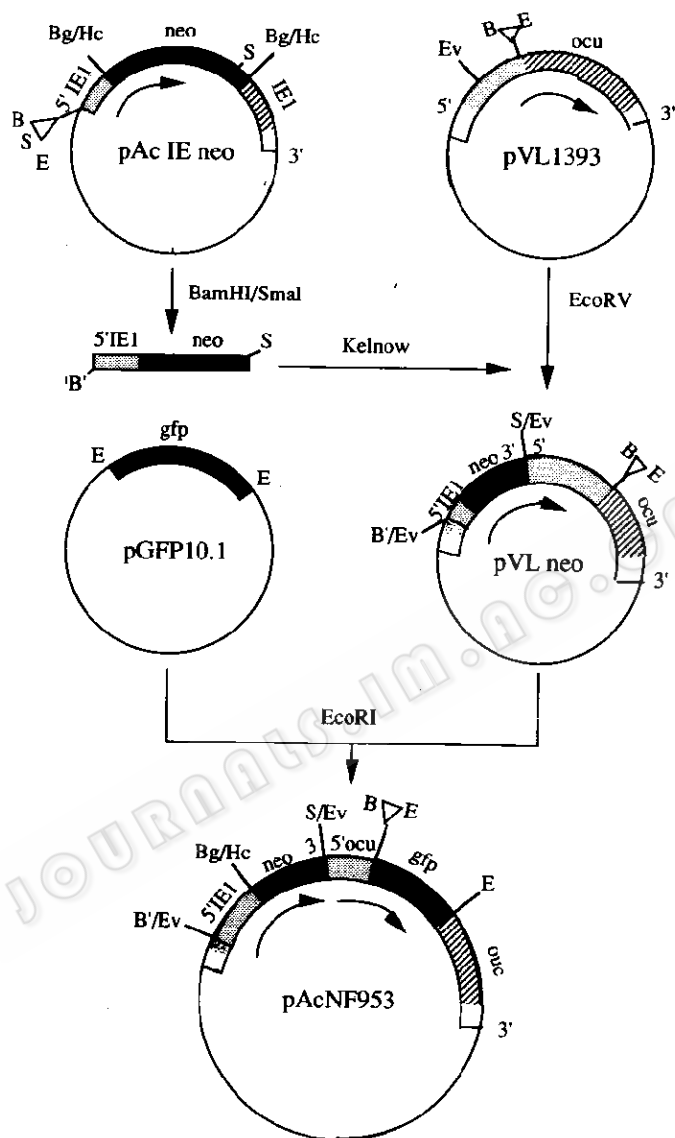


图1 转移载体 pVLneo 和嵌合载体 pAcNF953 的构建

Fig.1 Constructions of transfer vector pVLneo and chimeric vector pAcNF953

B, BamHI; S, SmaI; E, EcoRI; EV, EcoRV; Bg, BglII; Hc, HindIII.

■ and ▨, Encoding sequences; ▤, Promoters; →, Transcriptional orient;

B' were filled in by klenow.

动 neo<sup>r</sup> 表达, ocu 基因启动子本身趋向 GFP 基因表达, ocu 基因由于 GFP 基因的插入而失活。

## 2.2 体内同源重组和重组病毒的筛选与纯化

将 pAcNF953 DNA 与野生型 AcNPV DNA 共转染昆虫细胞 Sf9, 由于二者含 *ocu* 基因的 *EcoRI*-I 片段的 3'、5' 两侧而发生同源重组, 导致 *IE1-pt/neo<sup>r</sup>/ocu-pt/gfp* 整合到病毒基因组的 *ocu* 位相, 得到重组病毒 vAcNF953, 继续使用 G418, 在 96 孔板上, 经 6 代即得到重组病毒的纯培养。在 G418 的压力下富集并筛选, GFP 基因在 *ocu* 启动子控制下可以表达绿色荧光蛋白(图 1)。

## 2.3 重组病毒的鉴定

为了证明 GFP 基因在杆状病毒基因组中的整合, 提取重组病毒 DNA, 分别用 *EcoRI*

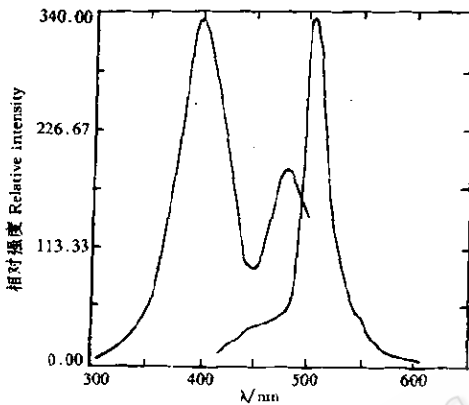


图2 昆虫细胞表达的绿色荧光蛋白的荧光光谱  
激发波长 395nm; 发射波长 509nm

Fig.2 Fluorescent diagram of green fluorescent protein expressed in insect cells

Absorption wave: 395nm; Emission wave: 509nm.

和 *BamHI* 消化, 并与 GFP cDNA 探针杂交。图版 I-A 表明, *EcoRI* 将整合在病毒基因组中的 1.0kb GFP 基因片段重新切下, 产生强烈的杂交信号(图版 I-A-4); 用 *BamHI* 切下的 3.1kb 片段是 GFP 基因片段与病毒本身的 *BamHI*-F 片段(2.0kb) 共同被切下形成的, 也有较强的杂交信号(图版 I-A-2)。野生型 AcNPV DNA 和  $\lambda$ -DNA 不能与探针杂交, 而亲本嵌合载体 pAcNF953 产生同样的有强杂交信号的 *EcoRI* 片段(图版 I-A-6)。但上面较大的两条杂交带显然是不完全消化和部分消化的结果。

## 2.4 GFP 蛋白在昆虫细胞中的表达

收集重组病毒 vAcNF953 感染的昆虫细胞, 进行 SDS-PAGE 电泳(图版 I-B), 与预期结果相同, 重组病毒 vAcNF953

失去产生多角体蛋白的能力, 代之以 30kDa 的 GFP 在 *ocu* 启动子驱动下的表达(图版 I-B-3)。

## 2.5 昆虫细胞中表达的 GFP 蛋白的荧光特性

收集重组病毒感染细胞, 在日光下可见微弱的绿色, 在 UV 光下呈现明显的绿色, 制片进行荧光显微镜观察, 昆虫细胞发出强烈的绿色荧光(图版 I-C), 对照细胞无色。这是 GFP 基因在 *ocu* 启动子驱动下高效表达的结果, 也是重组病毒筛选纯化的证据。

用荧光光度计测定了绿色荧光蛋白的荧光光谱。图 2 表明, 最大激发波长为 395nm, 在 470nm 处有一个小峰, 最大发射波长为 509nm。和文献[6]报道的提纯的 GFP 及大肠杆菌中表达的 GFP 的荧光光谱完全一致。

## 3 讨论

我们用杆状病毒表达载体在昆虫细胞中表达了水母的绿色荧光蛋白, 从表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳、细胞的荧光显微照片和荧光光谱分析, 表达是成功的。用 Southern

blot 杂交进一步确证了 GFP 基因在杆状病毒基因组中的整合, 所得结果与 Chalfie 等<sup>[1]</sup>在 *E. coli* 中表达的结果完全一致。

GFP 基因编码序列长 962bp, 编码 238 个氨基酸<sup>[1]</sup>, 在重组病毒 vAcNF953 的 *ocu* 基因位相包含有两个外源基因, *neo<sup>r</sup>* 基因受 IE1 启动子控制, GFP 基因受 *ocu* 启动子驱动, 由于是定向克隆, 因此两个外源基因转录的方向是一致的, 无需酶切鉴定。*ocu* 基因启动子是超强启动子, 因此 30kDa 的 GFP 在 SDS-PAGE 图谱上呈现明显的蛋白带。而 IE1 基因是 AcNPV 的一个反式调控基因, 一般这类基因均不具强启动子<sup>[7]</sup>, 因此不会产生可供辨别的 *neo<sup>r</sup>* 基因产物, 但是重组病毒能使 G418 失活, 这是 IE1 基因启动子驱动 *neo<sup>r</sup>* 表达的有力证据<sup>[4]</sup>。

GFP 的克隆表达在分子生物学研究中有重要用途。它不需要底物和辅因子, 在 UV 和蓝光激发下几秒钟之内发射强烈的绿光, 因此, 可用 GFP 基因作为极理想的标记基因和报道基因。GFP 对生活细胞无毒, 发射时间迅速、长而稳定<sup>[1]</sup>, 用它构建启动子检测载体, 可以研究原核和真核基因启动子的活性, 阐明基因的时间和空间表达的调控机制, 探索病毒与宿主的相互关系, 病毒的侵染途径和历程以及细胞分裂周期变化。此外, 以杆状病毒表达系统高水平表达具有完整活性的绿色荧光蛋白, 为研究 GFP 的发光机制提供了材料, 我们推测, GFP 甚至可以发展成为生物工程防伪技术, 借助迅速产生的明确可见的绿光而很快辨别商品的真伪。

## 参 考 文 献

- [1] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G *et al.* *Science*, 1994, 263(11): 802.
- [2] Prasher D C, Eckenrode V K, Ward W W *et al.* *Gene*, 1992, 111: 229.
- [3] Satoshi I, Tsuji F I. *FEBS Letters*, 1994, 341(2~3): 277~280.
- [4] Luckow V L, Summers M D. *Bio / Technology*, 1988, 6: 47~55.
- [5] 朱反修, 黄永秀, 齐义鹏. 微生物学报, 1995, 35(3): 170~176.
- [6] Morise H, Shimomura O, Johnson F H *et al.* *Biochemistry*, 1974, 13: 2656~2662.
- [7] 齐义鹏. 病毒学报, 1990, 6(4): 383.

## EXPRESSION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN WITH BACULOVIRUS VECTOR IN INSECT CELLS

Zhu Fanxiu    Qi Yipeng    Huang Yongxiu    Hu Jianhong

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuchang 430072)

**Abstract** The green fluorescent protein (GFP) gene was subcloned into the transfer vector pVLneo downstream of the polyhedrin gene (*ocu*) promoter. Insect cells were cotransfected with recombinant plasmid and *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (AcNPV) DNA. In the presence of G418, the recombinant virus containing GFP gene was purified. The GFP expressed in insect cells with a Mw of 30kDa is observable by strong green light under a fluorescent microscope. Excitation and emission spectra of the GFP were 395nm and 509nm respectively. Integration of GFP gene on AcNPV genome was identified directly by Southern blot which gave strong hybridization signal between GFP cDNA probe and 1kb EcoRI fragment of recombinant virus.

**Key words** Green fluorescent protein (GFP) gene, AcNPV, Transfer vector, Insect cells, Expression

### 图 版 说 明

#### Explanation of plates

A. 重组病毒 vAcNF953 DNA 限制图谱的 EB 染色(左)和放射自显影(右)

Restriction map(EB stain, left) and autoradiograph(right) of recombinant virus vAcNF953 DNA hybridized with GFP cDNA probe

1.  $\lambda$ DNA /HindIII; 2. vAcNF953 DNA /BamHI; 3. AcNPV DNA /BamHI; 4. vAcNF953 DNA /EcoRI; 5. AcNPV DNA /EcoRI; 6. pAcNF953 /EcoRI; 7.  $\lambda$ -DNA /HidII + EcoRI.

B. 昆虫细胞表达的绿色荧光蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱 1. 正常细胞; 2. wt-AcNPV 感染的细胞, 可见多角体蛋白大量表达; 3. 重组病毒 vAcNF953 感染的细胞, 多角体蛋白消失, 30kDa 的绿色荧光蛋白大量表达; 4. 蛋白质分子量标准。

SDS-PAGE diagram of GFP expressed in insect cells

1. Normal cells 2. Cells infected by wt-AcNPV, showing polyhedrin protein with arrowhead; 3. Cells infected by recombinant virus vAcNF953, no polyhedrin protein but showing GFP with arrowhead; 4. protein marker for MW.

C. 用重组病毒 vAcNF953 感染的昆虫细胞的荧光显微照片

Fluorescence photograph of GFP expressed in insect cells infected by recombinant virus cAcNF953.