

杆状病毒 AcMNPV *p48* 基因在昆虫细胞中的表达

袁美姝, 黄振球, 胡朝阳, 杨凯*, 庞义

(中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广州 510275)

摘要:【目的】*p48* (*ac103*) 基因在昆虫杆状病毒中高度保守, 暗示其具有重要的生物学功能。为了研究该基因的功能, 我们首先对该基因的表达特征进行描述。【方法】以杆状病毒代表种——苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV) 的 *p48* 基因为研究对象, 利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达载体系统分别构建了在 P48 蛋白 N-端和 C-端融合 HA-标签, 并且携带绿色荧光蛋白基因和多角体蛋白基因的重组 Bacmid。将重组 Bacmid 转染 Sf9 细胞, 收集含病毒的上清去感染 Sf9 细胞, 在感染后不同时间点收集细胞进行 SDS-PAGE 电泳, 利用商业化的 HA 抗体进行 Western blot 分析以检测融合蛋白在昆虫细胞中的表达情况。【结果】用 C-端融合 HA-标签的重组病毒感染细胞后 12 h 即可检测到一条 43 kDa 左右、能与 HA 抗体发生特异性结合的蛋白条带, 该特异性蛋白的表达一直持续到病毒感染后 96 h。从感染后 48 h 起一直到 96 h, 均能检测到另外一条约 26 kDa 的蛋白条带也能与 HA 抗体发生特异性结合。在 N-端融合 HA-标签的重组病毒感染的细胞中没有检测到与 HA 抗体特异结合的蛋白。【结论】结果表明, *p48* 基因是个晚期基因, 在病毒感染的晚期表达, 并且该蛋白在昆虫细胞中表达时 N-端可能被剪切。

关键词: AcMNPV; *p48* 基因; 表达; 剪切

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0465-07

杆状病毒是昆虫专一性的病原体, 是发现最早、研究得最多且最为深入的昆虫病毒^[1-2]。杆状病毒在农业、基础分子生物学以及医学领域都具有重要的价值。首先, 杆状病毒是控制昆虫种群的重要生物因子, 可开发成生物杀虫剂加以利用^[3-5]; 其次, 杆状病毒还可作为外源基因表达载体系统表达外源基因, 在药物研发、疫苗生产等方面有广泛的应用, 现已成为基因工程四大表达载体系统之一^[6]; 此外, 杆状病毒作为基因转移载体可用于基因治疗, 是一种很有应用前景的基因转移载体^[7]。目前杆状病毒的研究已经引起人们的高度重视。随着对杆状病毒基因组的深入研究, 人们正在从分子水平上揭示杆状病毒的作用机制。

杆状病毒基因组为双链闭环 DNA, 长度为 80 -

180 kb, 可编码 90 - 180 个基因。从 1994 年杆状病毒代表种——苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV) 的全基因组序列公布^[8], 至今已有 50 株杆状病毒的全基因组序列被测定。其中, 46 株病毒的宿主是鳞翅目昆虫, 膜翅目昆虫病毒 3 株, 双翅目昆虫病毒 1 株^[9]。比较这些病毒基因组的序列, 发现有 32 个基因在所有杆状病毒中均存在, 称为核心基因 (core gene)^[10-11]; 11 个基因存在于所有的鳞翅目和膜翅目昆虫杆状病毒基因组中; 17 个基因存在于所有鳞翅目昆虫杆状病毒基因组中^[9]。这种高度保守性表明这些基因可能在杆状病毒的生活周期中起重要作用^[12]。*p48* (AcMNPV ORF103, *ac103*) 基因在除了双翅目昆虫杆状病毒 *Culex nigri-*

基金项目: 国家“973 项目”(2009CB118903); 国家自然科学基金项目(30900941)

* 通信作者。Tel: +86-20-84113009; Fax: +86-20-84037472; E-mail: yangkai@mail.sysu.edu.cn

作者简介: 袁美姝(1974-), 女, 福建柘荣人, 博士, 讲师, 主要从事杆状病毒功能基因组学研究。E-mail: lssymj@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2009-10-14; **修回日期:** 2010-01-06

palpus NPV 外的所有杆状病毒中均存在,意味着该基因可能具备重要功能。

目前,关于 *p48* 基因的研究报道很少。我们之前通过 ET 重组技术从 AcMNPV bacmid (简称 AcBac) 中敲除该基因,构建成缺失 *p48* 基因的重组 AcMNPV^[13]。通过对该重组病毒的研究发现,*p48* 基因是病毒复制的必需基因:在该病毒转染的细胞中不能产生子代病毒,包括芽生型病毒 (budded virus, BV) 和包埋型病毒 (occlusion-derived virus, ODV)^[13]。由于缺乏合适的抗体,目前国内外尚未完成对该基因的表达特征的研究。Li 等^[14] 曾经尝试在大肠杆菌中表达柞色卷蛾核型多角体病毒 (*Choristoneura fumiferana* MNPV, CfMNPV) 的 *p48* 蛋白,之后免疫新西兰大白兔制备抗体,得到的抗体虽然能与原核表达的融合蛋白特异性结合,但在 CfMNPV 感染的细胞样品中却检测不到信号。推测可能是 P48 蛋白根本不表达;或者表达量太低,常规的蛋白免疫印迹检测不到。

本研究选择了只含 9 个氨基酸的红血球凝集素 HA 为标签,分别构建了在 P48 蛋白 N-端和 C-端融合 HA 的重组病毒,并利用 HA-标签的抗体成功分析了 P48 蛋白在重组病毒感染昆虫细胞中的表达时相。这也为进一步研究 P48 蛋白在病毒粒子结构中的定位,以及 P48 蛋白与其他蛋白间的相互作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、病毒和菌株:质粒载体 pMD18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司;带 AcMNPV 多角体蛋白基因 (*polyhedrin*, *polh*) 和绿色荧光蛋白基因

(*enhanced green fluorescence protein gene*, *egfp*, 在文中简称为 *gfp*) 双标记的质粒 pFB1-PH-GFP 为本室构建^[15];转移载体质粒 pFB1-P48-PH-GFP、缺失 *p48* 基因的重组病毒 vAc^{P48-KO} 以及带 *polh* 和 *gfp* 双标记的 *p48* 基因缺失型重组病毒 vAc^{P48-KO-PH-GFP} 由 Yuan 等构建^[13];大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10B 购自 Invitrogen Corporation, TG1 为本室保存。

1.1.2 昆虫细胞和血清、培养基:草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞 Sf9 引自英国自然环境研究委员会病毒研究所 (NERC/Institute of Virology, Oxford, UK); Grace's 培养基和胎牛血清 (fetal bovine serum) 购自 Invitrogen Corporation, 使用时在 Grace's 培养基中添加 10% 胎牛血清、终浓度为 100 μg/mL 的青霉素和 30 μg/mL 的链霉素, 双无培养基即为无血清无抗生素的 Grace's 培养基; LB 培养基参照文献[16]。

1.1.3 主要试剂和仪器:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Premix Ex Taq Hot Start Version PCR 试剂盒等常用试剂购自宝生物工程(大连)有限公司; Cellfectin 脂质体购自 Invitrogen Corporation; 质粒提取试剂盒 (E. Z. N. A. TM Plasmid Mini Kit I) 及胶回收试剂盒 (E. Z. N. A. TM Gel Extraction Kit) 购自 Omega Bio-Tek 公司; HA 抗体购自 Convance 公司; ECL 显色试剂盒购自 Amersham Biosciences 公司; goat-anti-mouse-HRP 第二抗体购自华美生物工程公司。电泳装置购自 Bio-Rad 公司, 凝胶成像系统购自 Kodak 公司, PCR 仪购自 MJ Research Inc., 倒置荧光显微镜购自 Nikon 公司。

1.1.4 引物:本研究所用 PCR 引物是根据 AcMNPV 基因组全序列, 运用 DNASTAR 软件设计, 由 Invitrogen Corporation 合成。引物序列及酶切位点见表 1。

表 1 PCR 扩增所用引物

Table 1 PCR primers used for amplification

Primer	Position in AcMNPV genome	Sequence (5'→3')	Restriction endonuclease
P48CHAP1	89580 - 89600	<u>GAATTC</u> CCAAACGGTAATCAACAGAG'	<i>EcoRI</i>
P48CHAP2	89808 - 89827	<u>GTCGAC</u> TCAGGCGTAATCTGGGACGTCGTATGGTATTATTGAA GCAATCATGG	<i>SalI</i>
P48CHAP3	N/A	<u>GTCGAC</u> GATCATAATCAGCCATACCA'	<i>SalI</i>
P48HAP4	N/A	<u>TCTAGAG</u> ATCCAGACATGATAAGATA	<i>XbaI</i>
P48NHAP1	89539 - 89556	<u>GAATTC</u> ACGCAACACGTTGTATCGCA	<i>EcoRI</i>
P48NHAP2	89519 - 89538	<u>GTCGAC</u> GGTGCATTCGATATAACC	<i>SalI</i>
P48NHAP3	88375 - 88396	<u>GTCGAC</u> ATGTACCCATACGACGTCGCCAGATTACGCCTGCGC TTACAGATTACA	<i>SalI</i>

Restriction endonuclease sites are underlined.

1.2 转移载体质粒 pFB1-P48CHA-PH-GFP 和 pFB1-P48NHA-PH-GFP 的构建

PCR 扩增、连接、转化及酶切分析等常规实验参照分子克隆实验指南^[16]进行。由于不确定 P48 蛋白在昆虫细胞中表达是否会发生翻译后加工,以及可能会在哪一端发生翻译后加工,所以本研究分别构建了在 P48 蛋白 C-端和 N-端融合 HA-标签的重组病毒。

以转移载体质粒 pFB1-P48-PH-GFP 为模板,用引物对 P48CHAP1/P48CHAP2 扩增出 3'-端带 HA 编码基因并包含 *p48* 基因启动子及开放阅读框的片段 P48CHA1,用引物对 P48CHAP3/P48HAP4 扩增出 SV40 poly(A) 信号片段 P48CHA2,测序正确后,依次连接到 pFB1-PH-GFP 载体上,得到重组质粒 pFB1-P48CHA-PH-GFP。

同样地,以 AcMNPV 基因组 DNA 为模板,用引物对 P48NHAP1/P48NHAP2 扩增出 *p48* 基因的启动子片段 P48NHA1;以转移载体质粒 pFB1-P48-PH-GFP 为模板,用引物对 P48NHAP3/P48HAP4 扩增出 5'-端带 HA 编码基因,包含 *p48* 开放阅读框和 SV40 poly(A) 信号的片段 P48NHA2。两个片段测序正确后,依次连接到 pFB1-PH-GFP 载体上,得到重组质粒 pFB1-P48NHA-PH-GFP。

1.3 转座

参照参考文献 [13, 15] 的方法,将重组质粒 pFB1-P48CHA-PH-GFP 和 pFB1-P48NHA-PH-GFP 分别转化含 vAc^{P48-KO} 的大肠杆菌感受态细胞,在转座后的平板上挑取较大的典型的白色单菌落接种到含三抗(kanamycin 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, gentamicin 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 tetracycline 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 剧烈振荡培养至少 24 h,保存菌种后,提取 Bacmid DNA 进行 PCR 鉴定。

1.4 转染

参照参考文献 [13, 15] 的方法,用 1 μg Bacmid DNA 转染 Sf9 细胞单层,于转染后 24、36、48、72、96 h 等不同时间点,在荧光倒置显微镜下观察细胞中 GFP 荧光的扩散和多角体的形成,并拍照记录。收集含重组病毒的上清液,用半数细胞感染剂量(TCID₅₀)法测定 BV 的滴度,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 P48 蛋白在 Sf9 细胞中的表达时相分析

参照 Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen, 2004) 操作手册,将收集的重组病毒上清以侵染复数为 5 TCID₅₀ 感染 Sf9 细胞,于感染后 0、6、12、24、48、72、96 h 收集细胞样品,参照分子克

隆实验指南^[16], SDS-PAGE 分离样品中的蛋白。然后以 1:1000 比例稀释的 anti-HA 抗体为一抗,以 1:5000 比例稀释的 HRP 标记的 goat-anti-mouse-HRP 为二抗,进行 Western blot 分析。参照 Amersham Biosciences 公司说明书进行 ECL 显色、拍照。

2 结果和分析

2.1 转移载体质粒 pFB1-P48CHA-PH-GFP 和 pFB1-P48NHA-PH-GFP 的构建

考虑到表达的 P48 蛋白可能存在剪切等翻译后加工,我们分别构建了在 P48 蛋白 C-端和 N-端融合 HA-标签的转移载体质粒 pFB1-P48CHA-PH-GFP 和 pFB1-P48NHA-PH-GFP。为了方便观察感染的扩散以及多角体的形成,在这两个重组质粒中,同时还带有 *gfp* 和 *polh*。限制性内切酶分析结果表明两个质粒的构建完全正确。

2.2 带 HA-标签的补回型重组病毒的获得和验证

为了检测 *p48* 基因是否正确表达,我们利用之前构建的 *p48* 基因缺失型重组病毒 vAc^{P48-KO} 构建带 HA-标签的 *p48* 基因补回型重组病毒。将转移载体质粒 pFB1-P48CHA-PH-GFP 和 pFB1-P48NHA-PH-GFP 分别转化含 vAc^{P48-KO} 的大肠杆菌感受态细胞,带^HA-标签的 *p48* 基因通过位点特异性重组插入 vAc^{P48-KO} 的 *polh* 位点,分别得到重组 bacmid $vAc^{P48-CHA-PH-GFP}$ 和 $vAc^{P48-NHA-PH-GFP}$ 。图 1 为转座示意图。

用这 2 种构建好的重组 bacmid DNA 分别转染 Sf9 细胞,在转染后不同时间点进行荧光显微镜观察。以缺失 *p48* 基因,但带有绿色荧光和多角体标记的重组病毒 $vAc^{P48-KO-PH-GFP}$ 作为对照,结果如图 2 所示。在转染后 24 h,3 种重组病毒所转染的 Sf9 细胞中均出现分散的荧光,荧光的分布及数量无明显差异,出现荧光的细胞数大约占总细胞总数的 10%,说明 3 种重组病毒的转染效率是相当的。但是,到转染后 48 h,在 *p48* 缺失型病毒 $vAc^{P48-KO-PH-GFP}$ 所转染的细胞中,出现荧光的细胞数量与转染后 24 h 无明显差异,这是因为 *p48* 缺失型重组病毒不能产生感染性的 BV,因此荧光不能在细胞间扩散^[13];相反地,在补回型病毒 $vAc^{P48-CHA-PH-GFP}$ 和 $vAc^{P48-NHA-PH-GFP}$ 所转染的细胞中,几乎所有的细胞均产生荧光,说明这 2 种补回型重组病毒均能产生感染性的病毒粒子 BV,*p48* 基因缺失所引起的功能缺陷已经被补回,也暗示 P48 蛋白在被感染细胞中得到了表达。

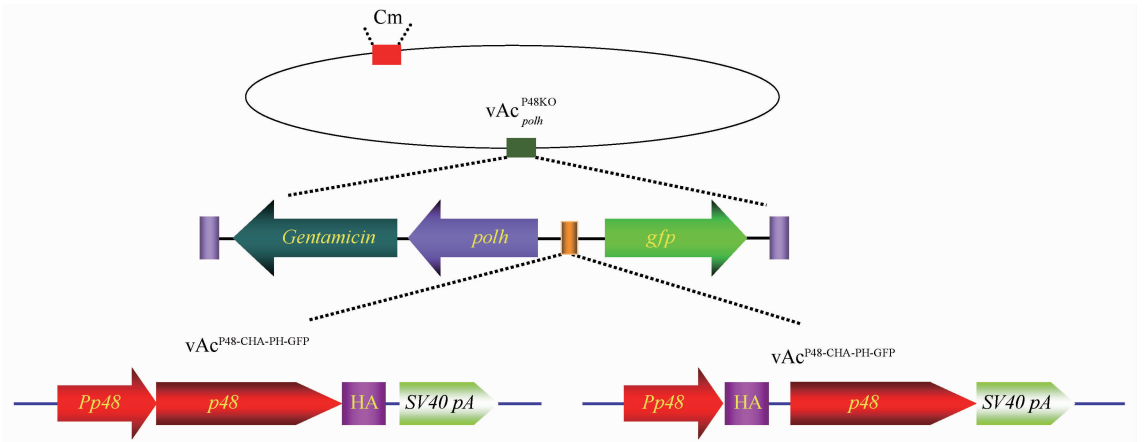


图 1 通过转座作用获得带 HA-标签的 *p48* 基因补回型重组 Bacmid $vAc^{P48-CHA-PH-GFP}$ 和 $vAc^{P48-NHA-PH-GFP}$

Fig. 1 Schematic diagram of the recombinant bacmid $vAc^{P48-CHA-PH-GFP}$ and $vAc^{P48-NHA-PH-GFP}$. Fragment containing *polh*, *gfp* and *p48-ha* (or *ha-p48*) was inserted into the *polh* locus of vAc^{P48-KO} via Tn7-mediated transposition.

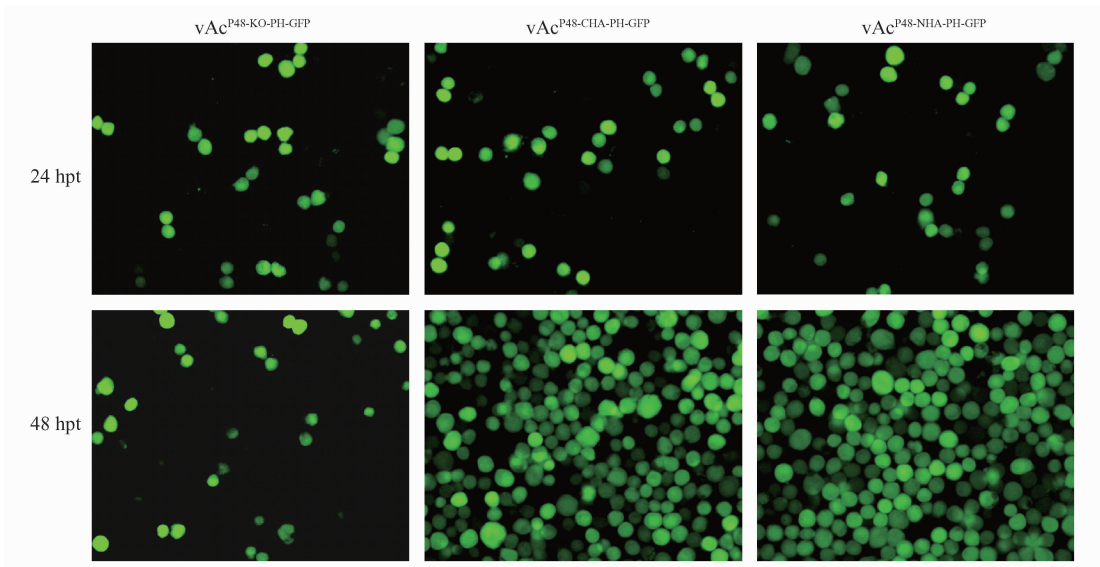


图 2 $vAc^{P48-KO-PH-GFP}$ 、 $vAc^{P48-CHA-PH-GFP}$ 和 $vAc^{P48-NHA-PH-GFP}$ 转染 Sf9 细胞后不同时间的荧光显微镜观察

Fig. 2 Fluorescence microscopy of Sf9 cells transfected with $vAc^{P48-KO-PH-GFP}$, $vAc^{P48-CHA-PH-GFP}$ or $vAc^{P48-NHA-PH-GFP}$ at 24 and 48 h posttransfection (hpt).

从普通显微镜观察的结果可发现,3种重组病毒转染的 Sf9 细胞均能产生多角体(图3)。在转染后 48 h,3种病毒所转染的细胞中出现多角体的数量相当。但是,到转染后 96 h,在 *p48* 缺失型病毒 $vAc^{P48-KO-PH-GFP}$ 所转染的细胞中,出现多角体的细胞数量与 48 h 相比并没有增加;而在补回型病毒 $vAc^{P48-CHA-PH-GFP}$ 和 $vAc^{P48-NHA-PH-GFP}$ 所转染的细胞中,几乎每一个细胞都产生了多角体。这个结果同样说明这 2 种补回型重组病毒均能产生感染性的病毒粒子,因此感染能在细胞间扩散,导致绝大多数细胞都被病毒感染产生多角体。这也再次说明 P48 蛋白在被感染细胞中得到了正确表达,因此能补回 *p48* 基因缺失所引起的功能缺陷。

2.3 P48 蛋白在 Sf9 细胞中的表达时相分析

将收集的重组病毒 $vAc^{P48-CHA-PH-GFP}$ 和 $vAc^{P48-NHA-PH-GFP}$ 的上清分别以感染复数为 5 TCID₅₀ 感染 Sf9 细胞,于感染后 0,6,12,24,48,72,96 h 收集细胞,以 anti-HA 抗体为一抗,以 goat-anti-mouse-HRP 为二抗进行 Western blot 分析。从图 4 可见,在 C-端融合 HA-标签的 $vAc^{P48-CHA-PH-GFP}$ 感染的 Sf9 细胞中,从病毒感染后 12 h 起可检测到 1 条 43 kDa 左右的蛋白条带能与 HA 抗体发生特异性结合,该特异性蛋白的表达一直持续到感染后 96 h。此外,从感染后 48 h 起一直到 96 h,均能检测到另外 1 条约 26 kDa 的蛋白条带也能与 HA 抗体发生特异性结合。而在 N-端融合 HA-标签的 $vAc^{P48-NHA-PH-GFP}$ 感染

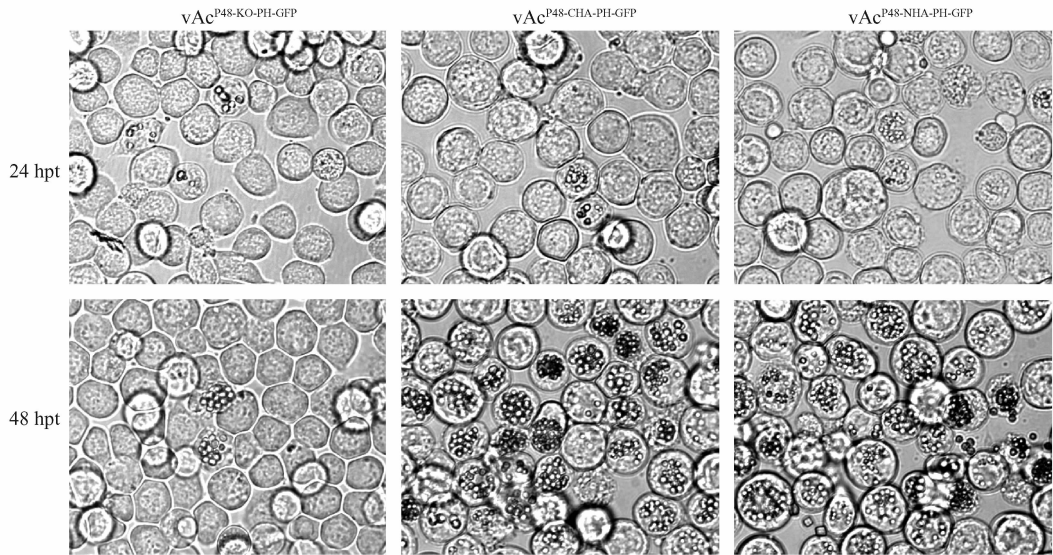


图3 vAc^{P48-KO-PH-GFP}、vAc^{P48-CHA-PH-GFP}和vAc^{P48-NHA-PH-GFP}转染Sf9细胞后不同时间的光学显微镜观察

Fig. 3 Light microscopy of Sf9 cells transfected with vAc^{P48-KO-PH-GFP}, vAc^{P48-CHA-PH-GFP} or vAc^{P48-NHA-PH-GFP} at 48 and 96 hpt.

的Sf9细胞中,一直到感染后96 h都没有检测到与HA抗体特异结合的蛋白(图片未显示)。Western blot分析的结果表明,AcMNPV P48在真核细胞中表达的蛋白只有43 kDa,比预期的46.4 kDa小,而用HA抗体能检测到融合在P48蛋白C-端的HA-标签,却检测不到融合在P48蛋白N-端的HA-标签,说明可能是P48蛋白的N-端被剪切,并且在感染的晚期可能发生进一步剪切。

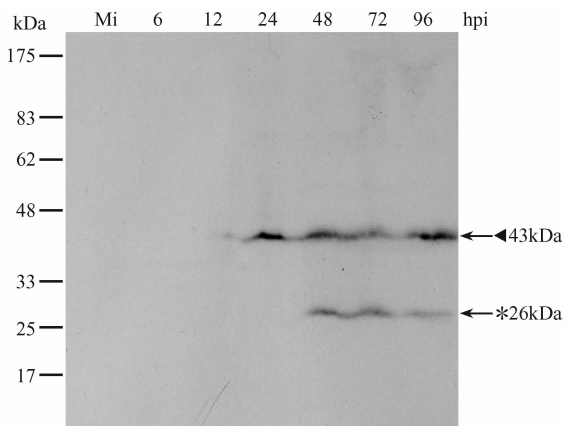


图4 P48蛋白在重组病毒vAc^{P48-CHA-PH-GFP}感染细胞中的表达时相

Fig. 4 Time course of P48 synthesis in vAc^{P48-CHA-PH-GFP}-infected Sf9 cells. Sf9 cells were infected or mock-infected with vAc^{P48-CHA-PH-GFP} at an MOI of 5 TCID₅₀. At different time points postinfection (pi), cells were harvested, and total cellular proteins were resolved on 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting. The blot was probed with HA monoclonal antiserum. The corresponding time points pi are indicated above the lanes. Mi, mock-infected. The numbers at the left indicate the molecular sizes (in kilodaltons) of the prestained protein standards. The arrowhead indicates the expected bands of P48 detectable at 12 hpi, and the asterisk indicates the smaller immunoreactive band from 48 hpi.

3 讨论

*p48*基因在除双翅目昆虫外的其他昆虫杆状病毒中均存在,暗示该基因可能具有重要功能。但是,由于缺乏合适的抗体,目前国内外尚无法对该基因的表达特征进行描述,也无法进一步进行该蛋白的其他相关研究。在杆状病毒的基因功能研究中,抗体扮演十分重要的角色,除了可以用于研究一个基因的表达时相,对该基因的表达特征进行描述外,还可以用于研究该基因编码的蛋白在病毒感染细胞中的定位,在病毒粒子结构中的定位,以及用于示踪该蛋白与其他蛋白的相互作用。传统的制备抗体的方法就是在大肠杆菌中表达该蛋白,纯化后免疫大白兔产生抗体,但这种方法不仅耗时长,而且制备的抗体极可能灵敏度不高或者特异性不强,不能应用于进一步的研究。在*p48*基因的研究中,之前就有报道用原核表达的CfMNPV P48蛋白制备的抗体虽然能与原核表达的融合蛋白特异性结合,但在CfMNPV感染的细胞样品中检测不到信号,由此推测P48蛋白在细胞中可能根本不表达,或者表达量很低,常规的蛋白免疫印迹检测不到^[14]。而目前有许多标签蛋白具备商业化的抗体,并且有些标签蛋白的分子量很小,基本不影响目的蛋白原有的生物学特性,可以将这些标签蛋白与目的蛋白融合表达,通过这些标签蛋白的抗体进行目的蛋白的免疫学分析。国际上也有很多利用这些小标签蛋白进行定位示踪的研究,例如,利用HA-标签成功研究了Ac101, Ac142, Ac144等蛋白在病毒粒子结构上的定位情况^[12,17];利用FLAG-标签成功进行了杆状病

毒表面展示系统的研究^[18]。本研究选择只有 9 个氨基酸的红血球凝集素 HA 作为标签,利用商业化的 HA 单克隆抗体在重组病毒感染的细胞样品中成功检测出 P48-HA 融合蛋白,证实 P48 蛋白在病毒感染的细胞中能够表达,只是表达量不高,而商业化的 HA 单克隆抗体的灵敏度可能更高,因此能检测到信号。此外,我们用 HA 的抗体进行 Western blot 分析的特异性也很强,可以满足进一步实验的需要。

考虑到真核表达的蛋白可能发生剪切等翻译后加工,我们分别构建了在 P48 蛋白 N-端和 C-端融合 HA-标签的重组病毒,而利用这 2 个带 HA-标签的互补型重组病毒进行的 P48 蛋白在 Sf9 细胞中的表达时相分析结果发现,在 C-端融合 HA-标签的重组病毒 vAc^{P48-CHA-PH-GFP} 感染的 Sf9 细胞中,从病毒感染后 12 h 即可检测到 1 条 43 kDa 左右的蛋白条带能与 HA 抗体发生特异性结合,该特异性蛋白的表达一直持续到感染后 96 h;而在 N-端融合 HA-标签的重组病毒 vAc^{P48-NHA-PH-GFP} 感染的 Sf9 细胞中,一直到感染后 96 h 都没有检测到与 HA 抗体特异结合的蛋白。由于 N-端融合 HA-标签的重组病毒在感染的细胞中荧光能扩散,说明 *p48* 基因缺失导致的功能缺陷已经被补回,也即 N-端融合 HA-标签的互补型重组病毒中 P48 蛋白得到表达,而用 HA 抗体进行的 Western blot 分析检测不到融合蛋白,暗示 P48 蛋白可能 N-端发生翻译后修饰或者被未知蛋白酶剪切,但由于在 C-端融合 HA-标签的重组病毒感染的 Sf9 细胞中检测到的融合蛋白只有 43 kDa,比预期的 46.4 kDa 小,因此推测 P48 蛋白可能被细胞内的蛋白酶剪切。应用 ExPASy Proteomics Server 网站中的 SignalP 软件^[19] 预测结果显示,在 AcMNPV P48 蛋白的氨基酸序列中不含信号肽,因此可以排除是 N-端信号肽剪切,可能存在其他蛋白酶剪切位点。

从感染后 48 h 起一直到 96 h,在 C-端融合 HA-标签的重组病毒 vAc^{P48-CHA-PH-GFP} 感染的 Sf9 细胞中,均能检测到另外一条约 26 kDa 的蛋白条带也能与 HA 抗体发生特异性结合,由于在 N-端融合 HA-标签的重组病毒中没有检测到这个条带,可以排除是非特异性识别,推测 P48 蛋白可能在病毒感染的晚期 N-端发生了进一步的剪切。在昆虫细胞中表达的其他一些杆状病毒的结构蛋白中,也发现有些蛋白在病毒感染细胞 24 h 之后检测到比目的条带小的其他条带,例如在 AcMNPV 感染 Sf9 细胞 36 h 之后的细胞样中,用 BV/ODV-E26 抗体能同时检测到 18、26 和 34 kDa 的蛋白条带^[20];而在 AcMNPV 感染 Sf9 细胞 48 h 之后的细胞样中,用 38K 抗体能同

时检测到 26、29 和 38 kDa 的蛋白条带^[15]。P48 蛋白在病毒感染后 12 h 开始表达,并且持续到 96 h,符合其晚期基因的特性,与之前对其进行转录研究的结果相符^[4, 14]。

由于在商业化的 AcBac 中,多角体基因被破坏,而我们之前的研究结果证实 *p48* 基因影响病毒粒子的形成,为了方便进一步研究 *p48* 基因对病毒粒子形成的影响,本研究在构建的重组病毒中补回了多角体基因。同时,为了避免 AcBac 中原先存在的 P48 蛋白干扰融合蛋白的功能,同时也为了方便检测 P48 蛋白的正确表达,本研究选择了之前构建的 *p48* 基因缺失型重组 Bacmid 作为出发 Bacmid,构建了带 HA-标签的 *p48* 基因互补型重组病毒,这个重组病毒解决了 P48 蛋白的抗体问题,利用它不仅首次成功地证实 *p48* 基因在真核细胞中有表达,而且研究了 P48 蛋白在昆虫细胞中的表达时相,确定 *p48* 基因是个晚期基因,在病毒感染的晚期表达。该重组病毒也可以用于对 P48 蛋白的进一步研究,包括定位研究以及蛋白相互作用的研究,这也为进一步研究 *p48* 基因的功能奠定了基础。

参考文献

- [1] Ji W, Zhang X, Hu H, et al. Expression and purification of Huwentoxin-I in baculovirus system. *Protein Expression and Purification*, 2005, 41: 454-458.
- [2] Piluso LG, Wei G, Li AG, et al. Purification of acetyl-p53 using p300 co-infection and the baculovirus expression system. *Protein Expression and Purification*, 2005, 40: 370-378.
- [3] 庞义. 昆虫病毒病//蒲蛰龙. 昆虫病理学. 广州: 广东科技出版社, 1994.
- [4] Lu A, Craig A, Casselman R, et al. Nucleotide sequence, insertional mutagenesis, and transcriptional mapping of a conserved region of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (map unit 64.8-66.9). *Canadian Journal of Microbiology*, 1996, 42: 1267-1273.
- [5] Szewczyk B, Hoyos-Carvajal L, Paluszek M, et al. Baculoviruses-- re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances*, 2006, 24: 143-160.
- [6] Possee RD. Baculoviruses as expression vectors. *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, 8: 569-572.
- [7] Ghosh S, Parvez MK, Banerjee K, et al. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy. *Molecular Therapy*, 2002, 6: 5-11.
- [8] Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, et al. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1994, 202: 586-605.
- [9] Hiscock D, Upton C. Viral Genome DataBase: storing and analyzing genes and proteins from complete viral genomes. *Bioinformatics*, 2000, 16: 484-485.

- [10] Herniou EA, Olszewski JA, Cory JS, et al. The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annual Review of Entomology*, 2003, 48: 211-234.
- [11] Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, et al. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of Virology*, 2006, 151: 1257-1266.
- [12] Vanarsdall AL, Pearson MN, Rohrmann GF. Characterization of baculovirus constructs lacking either the *Ac 101*, *Ac 142*, or the *Ac 144* open reading frame. *Virology*, 2007, 367: 187-195.
- [13] Yuan MJ, Wu WB, Liu C, et al. A highly conserved baculovirus gene *p48* (*ac103*) is essential for BV production and ODV envelopment. *Virology*, 2008, 379: 87-96.
- [14] Li X, Lauzon HA, Sohi SS, et al. M. Molecular analysis of the *p48* gene of *Choristoneura fumiferana* multicapsid nucleopolyhedroviruses CfMNPV and CfDEFNPV. *Journal of General Virology*, 1999, 80 (Pt 7): 1833-1840.
- [15] Wu WB, Lin TH, Pan LJ, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus nucleocapsid assembly is interrupted upon deletion of the *38K* gene. *Journal of Virology*, 2006, 80: 11475-11485.
- [16] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [17] McCarthy CB, Dai X, Donly C, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *ac142*, a core gene that is essential for BV production and ODV envelopment. *Virology*, 2007, 372(2): 325-339.
- [18] Matilainen H, Mäkelä AR, Riikonen R, et al. RGD motifs on the surface of baculovirus enhance transduction of human lung carcinoma cells. *Journal of Biotechnology*, 2006, 125(1): 114-126.
- [19] Bendtsen JD, Nielsen H, von HG, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 340(4): 783-795.
- [20] Beniya H, Braunagel SC, Summers MD. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: subcellular localization and protein trafficking of BV/ODV-E26 to intranuclear membranes and viral envelopes. *Virology*, 1998, 240: 64-75.

Expression of baculovirus AcMNPV *p48* gene in insect cell

Meijin Yuan, Zhenqiu Huang, Zhaoyang Hu, Kai Yang*, Yi Pang

(State Key Laboratory of Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: [**Objective**] *p48* (*ac103*) gene is highly conserved in baculovirus, implying that *p48* might play a fundamental role in the life cycle of baculovirus. We studied the expression of *p48* gene of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV)—the type baculovirus species. [**Methods**] With Bac-to-Bac system, we constructed two *p48* repair viruses, in which hemagglutinin (HA)-tag was fused to C-terminus and N-terminus of P48, respectively. To examine the effect on occlusion body morphogenesis and to facilitate examination of virus infection, the *green fluorescence protein* (*gfp*) gene and *polyhedrin* (*polh*) gene were also inserted into the recombinant viruses. Sf9 cells were transfected with each bacmid constructed, and the supernatants containing the budded viruses (BVs) were used to infect Sf9 cells. At the indicated time points, cells were harvested and used for SDS-PAGE and Western blot analysis. The expression of fusion protein was detected with the monoclonal antibody to the HA-epitope. [**Results**] Western blot analysis indicated that a specific 43 kDa protein was detected at 12 hours postinfection (hpi) and remained detectable up to 96 hpi in cells infected with *p48* repair virus with HA-tag fused in C-terminus. Meanwhile, another protein of 26 kDa was also detected from 48 hpi to 96 hpi. However, no signals were detected in cells infected with *p48* repair virus with HA-tag fused in N-terminus even at 96 hpi. [**Conclusion**] *p48* is a late gene and expressed in late infection. P48 might be cleaved in N-terminal when it is expressed in insect cells.

Keywords: AcMNPV; *p48* gene; gene expression; protein cleavage

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2009CB118903) and the National Nature Science Foundation of China (30900941)

* Corresponding author. Tel: +86-20-84113009; Fax: +86-20-84037472; E-mail: yangkai@mail.sysu.edu.cn

Received: 14 October 2009/ Revised: 6 January 2010