

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

49(6): 831–837; 4 June 2009

ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

零背景转座技术高效构建重组家蚕杆状病毒表达系统

姚伦广¹, 张红玲^{1,2}, 冯娟^{1,3}, 张二辉¹, 文祯中^{1,2}

(¹ 中英南阳洛桑昆虫生物学联合实验室, 河南省伏牛山昆虫生物学重点实验室, 南阳师范学院生物科学与技术学院, 南阳 473061)

(² 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007)

(³ 河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002)

摘要:【目的】获得零转座背景的基于家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus, BmNPV) Bac-to-Bac 系统, 为高效经济构建重组 BmNPV 在家蚕体内表达目标蛋白提供新系统。【方法】利用 R6K γ 作为复制子构建新的条件复制型杆状病毒转移载体 pRADM, 同时封闭 BmNPV-Bacmid(BmBacmid)宿主菌(*Escherichia coli* BmDH10Bac)的 Tn7 转座受体位点 attTn7, 获得新的封闭型宿主菌 *E. coli* BmDH10Bac Δ Tn7。【结果】由于 pRADM 无法在宿主菌 *E. coli* BmDH10Bac 中复制, 封闭了 attTn7 位点的宿主菌也不能再和 BmBacmid 竞争与转移载体的重组, 显著提高了转座效率。封闭宿主菌的 attTn7 位点, 能使转座效率提高近 4 倍, 使用条件复制型转座载体 pRADM 时, 转座效率提高近 10 倍。而用 pRADM 转座 *E. coli* BmDH10Bac Δ Tn7 时, 转座阳性率为 100%。避免了获得重组病毒 DNA 的鉴定程序, 缩短了获得重组蛋白所需时间。用携带红色荧光蛋白基因 DsRed 的重组质粒 pRADM-Red 转座 *E. coli* BmDH10Bac Δ Tn7, 获得重组 BmBacmid 转染 BmN 细胞, 红色荧光蛋白在细胞中得到高效表达。【结论】结果表明 pRADM 和 *E. coli* BmDH10Bac Δ Tn7 是一种零背景高效构建重组 BmNPV 的新系统。

关键词: 条件复制子; 零背景转座; 重组家蚕核型多角体病毒

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 06-0831-07

自 Smith 等(1983)利用杆状病毒表达系统高效表达人 β -干扰素^[1], 特别是 Luckow 等(1993)发展了基于大肠杆菌转座原理构建重组杆状病毒的 Bac-to-Bac 系统后^[2], 杆状病毒-昆虫细胞表达系统作为一种高效的真核表达体系得到广泛应用。其范围涉及蛋白质结构和功能、蛋白质与蛋白质之间相互作用和疫苗生产、疾病诊断以及病毒杀虫剂的改良等^[3]。目前主要使用两种杆状病毒表达系统, 一种为 AcNPV (苜宿银纹夜蛾核型多角体病毒, *Autographa californica* Nucleopolyhedrovirus)-Sf9 (草地夜蛾细胞系)商品化系统, 其利用重组 AcNPV 在 Sf9

细胞中进行外源基因表达。另一种就是 BmNPV (*Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus, 家蚕核型多角体病毒)-BmN 细胞或家蚕幼虫表达系统, 该系统利用重组 BmNPV 在家蚕活体内进行蛋白表达。家蚕饲养在我国历史悠久、饲养方式简单、成本低廉、仅为细胞培养的 1/10, 而蛋白表达量则为其 10 倍, 因此杆状病毒-家蚕表达系统在经济高效表达外源蛋白方面具有产业化应用前景和优势。一直以来, 构建重组 BmNPV 的方式以复杂繁琐的昆虫细胞内同源重组为主, 几乎不合适大规模构建重组病毒, 也不合适构建多基因表达重组病毒。基于 BmNPV 的 Bac-

基金项目: 国家自然科学基金(30700750); 南阳市重大科技攻关项目(2007sy001); 河南省教育厅科技攻关项目(2008A180020)

作者简介: 姚伦广(1974-), 男, 博士, 副教授, 从事昆虫资源与生物技术领域研究。Tel: +86-377-63525085; E-mail: lunguangyao@163.com

收稿日期: 2008-12-16; 修回日期: 2009-03-11

to-Bac 系统的出现,为利用各种方式在细菌内构建重组 BmNPV-Bacmid(BmBacmid) 提供可能^[4-5]。

传统 Bac-to-Bac 系统依靠转座酶的协助将目标基因从供体载体转座到受体 Bacmid 中,结合抗性和蓝白斑筛选获得重组 Bacmid,然其转座效率并不高,通常不超过 10%^[2]。其主要原因有二,一是宿主菌 *Escherichia coli* DH10B 基因组内存在有 Tn7 转座受体位点 (attTn7),这些受体位点会与 Bacmid 中的 attTn7 竞争,造成目标转座效率下降,表现为蓝斑数量增多,白斑数量减少。另一方面原因是以 pUC 为基本骨架的转移载体和具有 F 因子复制子的 Bacmid 在宿主菌中可以共存,使得庆大霉素(Gm)抗性筛选背景非常高。因此所筛选出的白斑需要进一步划线培养筛选以及 PCR 鉴定。Kari J. Airenne 等在原有的 Bac-to-Bac 基础上,通过封闭宿主菌基因组内部的转座受体位点以及转移载体 SacB 负向筛选系统,将 Bac-to-Bac 转座背景减少到可以忽略的程度。在实际应用中,发现 SacB 负向筛选系统依然有背景存在,主要是因为蔗糖浓度和抗生素种类以及浓度对 SacB 基因表达有一定影响,造成少数供体载体没有被彻底淘汰^[6]。

R6K γ 复制子的复制依赖于宿主菌 *pir* 基因的表达产物 Rep 蛋白 π ^[7-8],而 Bacmid 宿主菌 *E. coli* DH10B 不表达 *pir* 基因,因此使用 R6K γ 作为复制子的转移载体无法在普通大肠杆菌中存活。一旦宿主菌基因组中 attTn7 位点被封闭,转移载体只能和受体病毒 Bacmid 发生重组,既可以提高转座效率,又避免了抗性筛选背景的产生。本研究通过构建含有

R6K γ 条件型复制子供体载体以及封闭 BmBacmid 宿主菌 *E. coli* DH10B 基因组中转座受体位点,获得零转座背景的基于 BmNPV 的高效 Bac-to-Bac 系统,为高效经济与大规模构建重组 BmNPV,在家蚕体内表达目标蛋白提供了新系统。在本研究中,我们同时改造转移载体和受体菌,减少转座后重组病毒的鉴定,缩短获得目的蛋白需要的工作时间,进一步完善了家蚕杆状病毒表达系统。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BmDH10Bac(含来源于 BmNPV 的 Bacmid 穿梭载体和转座助手质粒 pMon7124)由 Enoch Y. Park 惠赠^[4-5];pUltraBac(携带 pBasic 启动子驱动的 *gfp* 转座载体,由 pFastDual 改造而来)由 Michael Forstner 惠赠^[9];含两个强启动子 (Pp10 and Ppolh)的质粒 pFBDM 及菌株 Bw23474(*pir*⁺)由 T. J. Richmond 惠赠^[10];pMAGIC1(R6K γ 复制子)和表达 FLP 重组酶的温度敏感型质粒 pcp20 由 Mamie Z. Li 惠赠^[11]。菌株 *E. coli* DH10B 由本实验室保存;质粒 pDsRed2-1 购自 Clonetech 公司。

1.1.2 血清、培养基、细胞:胎牛血清 (fetal Bovine serum, FBS)和 Tc-100 昆虫细胞培养基购自 GIBCO 公司;家蚕细胞 BmN 由华南农业大学孙京臣博士赠送,本实验室传代保存。

1.1.3 引物:由北京奥科生物技术有限公司合成,引物名称以及序列见表 1。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Names and sequences of primers

Primer name	Sequence(5' → 3')	Size/nt	Restriction site
1, R6k γ -Forward	AGGCGCGCCAGAGAGACGTTGGCCCAA	29	Asc I
2, R6k γ -Reverse	AGGCGCGCC TTCGAAACGCGCTACTATAAT	30	Asc I BstB I
3, Zeo-Forward	AGGCGCGCCACGTTTAAACTGGCTGCAGCACGTGTTGACAAT	42	Asc I
4, Zeo-Reverse	AGGCGCGCCACGTTTAAACTGGCTGCAGGTGACCCCCCT CGG	43	Asc I
5, Amp-F	CTTCGAAATTTCAGGTGGCACTTTTCGG	27	BstB I
6, Amp-R	CTTCGAAATTTCACGGGTCTGACGCT	27	BstB I
7, Tn7L-F	ACCTAA GGCGCGCCGAAGATGACGGTTTGT	30	Asc I
8, Tn7L-R	AGCATGC GGATCCTAGGAGATCCGAACCAG	30	Sph I BamH I
9, Tn7R-F	ACCTTA GGCGCGCCCTGCGTAAGCGGGTGT	30	Asc I
10, Tn7R-R	AGCATGC CGCGGAGTTGTTCGGTAAATTTGT	30	Sph I, Sac II
11, ZeoFRT-F	AGCATGC GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGA ACTTTCGTTTAAACTGCAGCACGTTGTAC	65	Sph I, FRT
12, ZeoFRT-R	AGGATCC GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGA ACTTTCGATATCGAGGTGACCCCCCTC	63	BamH I, FRT

1.1.4 主要试剂和仪器: *Taq* DNA 聚合酶、pMD18simple-T 载体购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶购自 New England Biolabs 公司; Lipofectin 2000, zeocin 抗生素和质粒 pVgRxR 购自 invitrogen 公司; 常规生化及分子生物学试剂购自郑州久是生物技术有限公司。PCR 仪, 凝胶成相系统, DNA 电泳仪购自为 BIO-RAD 公司, 离心机与电转化仪购自 Eppendorf 公司, 倒置荧光显微镜购自 Nikon 公司。

1.2 载体构建

常规连接、转化及酶切分析按分子克隆实验指南进行^[12]。常规质粒于 DH10B 中克隆与繁殖, R6K γ 复制子型质粒于 Bw23474 中克隆与繁殖。条件复制型转座载体 pRADM 由 R6K γ 复制子, Gm 抗性基因, Amp 抗性基因, Tn7 左右转座臂, 双启动子 p10 和 Ppolh 等元件组成(图 1-B)。用引物 R6k γ -Forward 与 R6k γ -Reverse 从 pMAGIC1 模板中扩增出 R6K γ 复制子。使用引物 Zeo-Forward 和 Zeo-Reverse 从 pVgRxR 模板扩增 Zeocin 基因。R6k γ 和 Zeocin 抗性基因 PCR 产物分别用 *Asc* I 酶切, 胶回收后连接获得质粒 R6K-ZeoT。以 pFBDM 为模板, 使用引物 Amp-F 和 Amp-R 扩增抗性基因 Amp。PCR 产物经 *Bst*BI 酶切后连接到质粒 R6K-ZeoT 的 *Bst*BI 位点获得重组质粒 R6K-Amp-ZeoT。

转座左臂 Tn7L 和右臂 Tn7R 都以 pFBDM 为模板扩增, 扩增左臂的引物分别为 Tn7L-F: 和 Tn7L-R, 扩增右臂引物分别为 Tn7R-F 与 Tn7R-R。左右臂 PCR 产物分别克隆到 pMD18Simple-T 载体, 获得载体 Ts-Tn7L 和 Ts-Tn7R。根据 FRT 位点序列, 设计引物从 pVgRxR 扩增两侧带 FRT 序列的 zeocin 抗性基因, 引物分别为 ZeoFRT-F 和 ZeoFRT-R。该 PCR 产物 ZeoFRT 经 *Sph* I 和 *Bam*H I 双酶切后克隆到 Ts-Tn7L 中, 获得质粒 Ts-Tn7L-ZeoFRT。

质粒 pR6K-Amp-ZeoT 用 *Asc* I 酶切后回收载体片段, 质粒 Ts-Tn7L-ZeoFRT 和 Ts-Tn7R 分别用 *Asc* I 和 *sph* I 双酶切后回收 Tn7L-ZeoFRT 和 Tn7R 片段。pR6K-Amp 载体, ZeoFRT-Tn7L 和 Tn7R 3 个片段连接获得质粒 R6K-Amp-Tn7L-ZeoFRT-Tn7R, 该质粒用于封闭宿主大肠杆菌基因组 attTn7 位点, 命名为 pBlockA (图 1-A)。

Sac II 和 *Avr* II 双酶切 pFBDM 获得带有庆大霉素抗性基因(Gm)和 2 个启动子以及多克隆位点片段, 胶回收后定向克隆到 pBlockA 质粒中, 获条件复制型转座供体质粒 pRADM(图 1-B)。pDsRed2-1 经

*Bam*HI 和 *Not*I 酶切, 回收红色荧光蛋白基因 DsRed 片段, 克隆到载体 pRADM, 得到重组质粒 pRADM-Red。

1.3 封闭受体菌 *E. coli* BmDH10Bac

为封闭受体菌 BmDH10Bac 基因组中的 attTn7 位点, 首先将 pBlockA 转化到 BmDH10Bac 感受态细胞中, 在 kan/zeocin/IPTG/X-gal 低盐(LS)平板上挑取蓝色菌落进行培养。次日, 在 Amp 平板上划线培养该菌落以验证是否存在供体质粒 pBlockA。挑选对 Amp 敏感的蓝色菌落, 使用 M13 引物进行菌落 PCR, 以验证 BmBacmid 的完整性。挑选仅仅扩增出 325bp 目的带的蓝色菌落培养并保存于 -70℃, 该菌株命名为 *E. coli* BmDH10Bac Δ Tn7-ZeoFrt。为进一步去掉基因组中的 zeocin 抗性基因, 将能表达 FLP 重组酶的温度敏感型质粒 pcp20(Amp 抗性, 30℃ 时复制, 37℃ 以上不复制)转化到 *E. coli* BmDH10Bac Δ Tn7-ZeoFrt 中。含 pcp20 的受体菌于 kan/Tet/IPTG/X-gal 平板上于 42℃ 过夜培养。随机挑取数个蓝色菌落分别在 zeocin (20 μ g/ml) 平板上进行培养, 挑选不能在该抗性平板上生长的菌落, 进一步筛选其对 Amp 的敏感性, 以确定是否淘汰掉 pcp20。对 zeocin 敏感说明受体菌基因组中的 zeocin 抗性基因已经被 FLP 酶重组掉, 所获得的菌株命名为 *E. coli* BmDH10Bac Δ Tn7。

1.4 转座以及重组病毒产生

为验证新构建的转移载体和受体 BmBacmid 的转座效率以及外源基因的表达情况, 用 pUltraBac、pRADM-Red 分别转座 BmDH10Bac、BmDH10Bac Δ Tn7。按照 Bac-to-Bac 手册方法, 将 0.1ng 转移载体转化到受体菌感受态中, 取转化液的 1/10(50 μ L) 涂布于 Kan/Gm/Tet/X-gal/IPTG LB 固体平板上, 48h 后待平板完全显色后, 分别统计每个平板上的白色菌斑和蓝色菌斑的数量, 计算转座效率^[13]。同时每个平板上分别挑取白色单菌落数个, 将这些白色菌落于 Kan/Gm/Tet/X-gal/IPTG LB 固体平板上划线再培养, 48h 后挑选出完全纯白的培养物在含上述 3 种抗生素的液体培养基中进行扩大培养。最后提取重组 BmBacmid DNA, 用 pUC M13 通用引物进行 PCR 鉴定后保存备用。

按照 Lipofectin 2000 说明, 将验证正确的重组 BmBacmid DNA 转染 BmN 细胞。4 天后将被转染的 BmN 细胞直接置于倒置荧光显微镜 Nikon TE2000 下观察, G 激发(558nm)观察 DsRed 表达。

2 结果

2.1 pBlockA 和 pRADM 构建

pBlockA 用于封闭受体大肠杆菌基因组中 attTn7 位点, 该质粒由 R6K γ 条件型复制子, 转座左臂 Tn7R, 侧翼带 FRT 序列的 zeocinR 抗性基因, 转座右臂, 抗性筛选标记 AmpR 组成(图 1-A)。该质粒只能在表达 π 因子的细菌如 Bw23474 (*pir*⁺ 菌株) 而无法在普通大肠杆菌如 DH10B 中繁殖。Amp 抗性

基因可以方便地使用敏感性测验来提示供体是否被淘汰。Zeocin 抗性基因用于筛选 attTn7 受体位点被封闭的宿主菌, 一旦封闭成功, 可以利用其两侧的 FRT 序列去掉该抗性基因。转座供体载体 pRADM 来源于 pBlockA, 用双启动子(p10 与 polh)和 Gm 抗性基因取代了 zeocin 抗性基因及 FRT 序列(图 1-B)。2 个外源基因可以同时克隆到启动子下游或者同时克隆一个报道基因和目标基因。

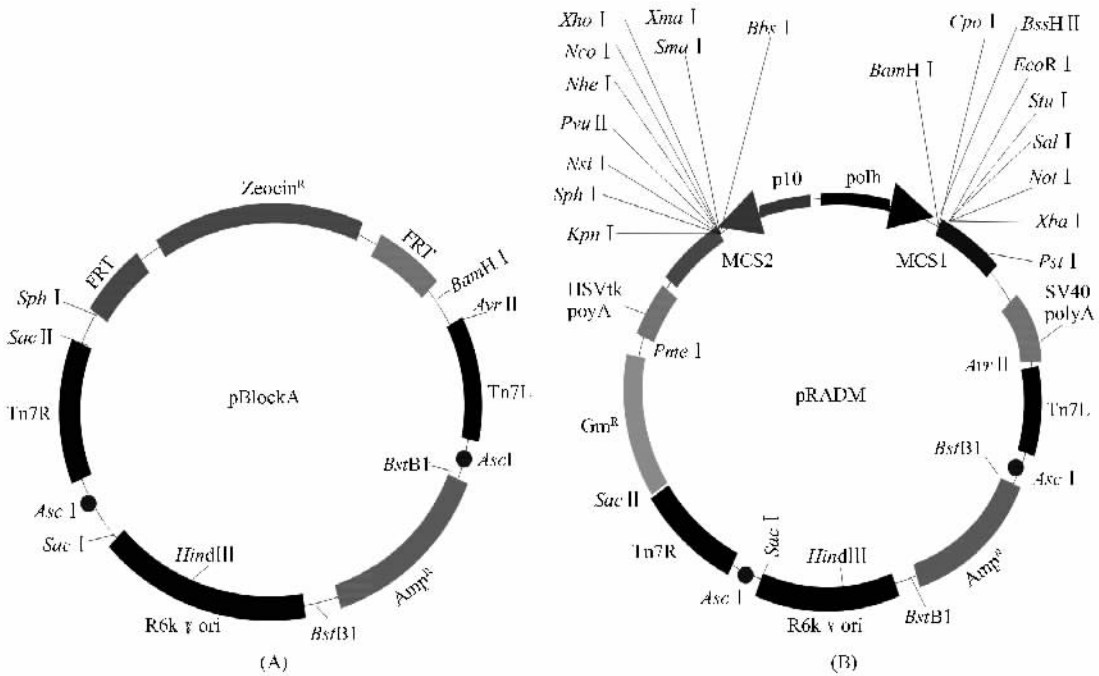


图 1 质粒 pBlockA 和条件型转座供体质粒 pRADM 示意图

Fig. 1 The maps of plasmid pBlockA and donor transposon vector pRADM. (A) The circle map shows the inverted repeat for site-recombination FRT-L-FRT-R-Tn7-L-Tn7-R and two antibiotic resistance marker (Zeocin and chloramphenicol). (B) The circle map of pRADM shows two strong promoters (polh and p10), multiple cloning sites (MCS1 and MCS2), transposon elements (Tn7L and Tn7R) and antibiotic resistance markers (ampicillin and gentamicin). Genes of interest are cloned into MCS1 or MCS2 using unique restriction sites; R6k γ ori is a conditional origin of replication, which requires the factor π encoded by the *pir* gene.

2.2 转座位点封闭型菌株 *E. coli* BmDH10Bac Δ Tn7 的构建

挑选转化 pBlockA 后的表现出 zeocin 抗性的蓝色 BmDH10Bac 菌落, 并用 ZeoFRT 引物进行 PCR, 和原始对照菌落相比, 扩增出 600 bp 目的带 (FRT-zeocin-FRT 片段), 证明有 zeocin 抗性基因整合到基因组中。进一步用 M13 通用引物进行 PCR 扩增, 得到 300bp 目的带(图 2 B), 证明宿主菌中含有完整的 Bacmid (*lacZ'* 没有破坏), 命名为 BmDH10Bac-ZeoFRT。为缺失掉转座进受体菌基因组中的 Zeocin 抗性基因, 将 pcp20 转化入 BmDH10Bac-ZeoFRT 菌株, 筛选出无 zeocin 抗性的蓝色菌落, 用 ZeoFRT 引物进行 PCR 没有扩增出 600 bp 左右的片段, 证明

Zeocin 基因已经成功缺失, 通过 42 $^{\circ}$ C 培养淘汰掉 pcp20 后, 将此含有完整 BmBacmid 且基因组 attnTn7 被封闭的菌株命名为 *E. coli* BmDH10Bac Δ Tn7。

2.3 转座效率比较和分析

用 pUC 来源的 pUltraBac 与条件性复制载体 pRADM 分别转化原始受体菌株或者封闭型受体菌, 分别计算每个平板上面的蓝白斑数量, 统计后计算转座效率并分析。其结果表明(表 2): pUltraBac 转座 BmDH10Bac, 共得菌落 300 个, 其中白斑 17 个, 转座效率为 5.7%; pUltraBac 转座 BmDH10Bac Δ Tn7, 共得菌落数目 260, 其中白斑 63, 其转座效率为 24%; pRADM-Red 转座 BmDH10Bac, 共得菌落 230 个, 其中白斑 152 个, 效率达 66%; pRADM-Red 转座

BmDH10Bac Δ Tn7, 共得到菌落共 97 个, 全部是白斑, 转座效率为 100%。随机挑取 12 个菌落用 M13 引物进行菌落 PCR 验证, 均能扩出约 3 kb 的转座目的带。

结果表明, 使用条件型复制型转座载体进行转座时, 其转化效率会下降, 表现为在抗性平板上的总体菌落数目减少。这是因为该载体不能在 DH10B 中复制, 所以被 Gm 抗性完全淘汰, 必须整合到 BmBacmid 或者 DH10B 基因组中才能表现出 Gm 抗性, 所以 pRADM-Red 转座 BmDH10Bac Δ Tn7 的转化

效率最低, 但是依然有 10^5 左右, 足够获得相当数目的转化子。当使用 pUltraBac 转座 BmDH10Bac Δ Tn7, 阳性转座率(白斑率)从 5.7% 增加到 24%, 增加了近 4 倍。当使用条件复制型载体 pRADM-Red 转座 BmDH10Bac 时, 白斑率可到达 66%, 超过 6 成以上为阳性菌落, 转座效率增加 10 倍左右, 说明降低选择背景能显著提高阳性转座比例。而当 pRADM-Red 转座 BmDH10Bac 时, 白斑率为 100%, 说明同时结合条件型复制和封闭 attTn7 位点, 阳性转座率为 100%, 零背景构建重组 BmBacmid 成功。

表 2 原始载体 pUltraBac 与新载体 pRADM 转座不同受体菌转座效率分析

Table 2 Typical transposition efficacy by the original and new donor transposition vectors

Vector	Receipt strain					
	BmDH10Bac			BmDH10Bac Δ Tn7		
	Total colonies	White colonies	Transposition percent/%	Total colonies	White colonies	Transposition percent/%
pUltraBac	300	17	5.7%	230	152	66%
pRADM	260	63	24%	97	97	100%

2.5 重组病毒在 BmN 细胞中的表达

从转座成功的 *E. coli* BmDH10Bac Δ Tn7-Red(由 pRADM-red 转座而来)中提取重组 Bacmid DNA, 转染 BmN 细胞后 4 天后, 在荧光显微镜下观察到被转染 BmN 细胞发出红色荧光(图 2), 表明利用本系统构建的重组 BmBacmid DNA 仍然保持着对 BmN 细胞的感染性, 同时也进一步证明了 *E. coli* BmDH10Bac Δ Tn7 菌株和转移载体 pRADM 构建正确。

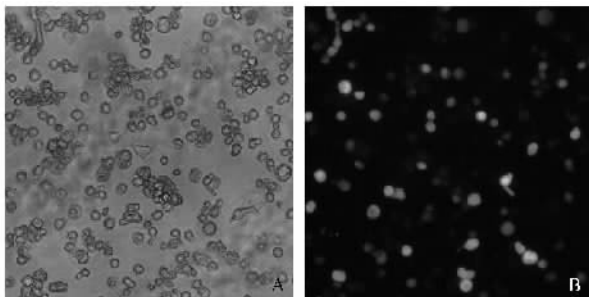


图 2 携带红色荧光蛋白基因的重组 BmNPV 在家蚕细胞 BmN 中表达

Fig.2 Observation of Fluorescent protein expression in BmN cells by microscope. 4 days post transfection, BmN cells transfection with the recombinant BmNPV-Bacmid prepared from the BmDH10Bac Δ Tn7 transposed by pRADM-Red under light field (A) and dark field using 543 nm excitation (B).

3 讨论

杆状病毒为一种出芽型病毒粒子, 在细胞裂解

前能够迅速在细胞间水平扩散感染而最大量地表达外源蛋白并保护蛋白不被降解, 且昆虫细胞培养简单且能滚瓶悬浮发酵培养, 相对费用较低, 因此几乎是真核表达的首选系统。近年来利用杆状病毒同时表达多个基因进行蛋白复合物的重构以及表达多个衣壳亚基进行病毒粒子重构显示了杆状病毒在研究蛋白互作以及全价安全疫苗方面重要地位。由于家蚕培养技术成熟、生产成本低廉、利用家蚕核型多角体病毒在家蚕幼虫高效表达外源基因一直相当具有吸引力。经过长期努力, 除可以在家蚕培养细胞中通过同源重组构建重组病毒外, 目前已经建立了基于 BmNPV 的 Bac-to-Bac 表达系统, 在此基础上本实验室已经成功建立了利用细菌间结合转移快速构建重组 BmNPV 方法。鉴于传统 Bac-to-Bac 系统构建重组 BmNPV 转座效率低, 转座后产生大量的背景菌落, 通过蓝白斑进行的重组病毒鉴定工作耗时费力。一般需要在 Kan^r/Gm^r/Tet^r/X-gal/IPTG LB 固体平板上重新划线鉴定, 挑取单克隆在液体培养基中振荡培养后提取重组病毒进行 PCR 验证^[14]。因此我们构建了新的转座供体载体 pRADM 和封闭 attTn7 位点的受体菌株 BmDH10Bac Δ Tn7, 使转座效率达到了 100%, 减少了后续重组病毒的鉴定工作, 且不需要使用不太稳定的 SacB-蔗糖负向筛选系统, 构建重组病毒变得简单迅速。

本研究构建的转座供体 pRADM 以 R6K γ 为复制子, 它的生长依赖于宿主菌 pir 基因的表达。在无

pir 基因表达的 *E. coli* BmDH10Bac 中无法复制。也就是说除非转移载体 pRADM 或者宿主菌 *E. coli* BmDH10Bac 发生了重组, 否则宿主菌无法获得转移载体所提供的庆大霉素抗性, 从而显著降低转座背景。另一方面, 由于 BmDH10Bac 宿主菌 DH10B 基因组上也含有潜在的 Tn7 转座受体位点 attTn7, 它就和病毒 Bacmid 中的转座受体位点形成了竞争关系。DH10B 基因组上的 attTn7 位点不但竞争性地和转移载体发生重组, 降低病毒 Bacmid 受体的转座效率, 同时还因为转移载体和 DH10B 基因组 attTn7 位点发生重组后菌株也具有了庆大霉素抗性, 使抗性筛选阳性菌落失去应有的效果, 同一平板上菌落数目大量增加, 增加了蓝白斑筛选背景。在本实验中, 我们用 pBlockA 转化 BmDH10Bac 封闭基因组 attTn7 位点非常方便, 由于没有质粒自身产生的背景, 所有蓝斑菌落的 attTn7 位点被封闭, 而 BmBacmid 保持完整。同时由于封闭 attTn7 位点时重组在基因组上的 Zeocin 基因两侧添加了 FRT 位点, 方便对 Zeocin 基因进行缺失, 这样就避免了 Zeocin 基因有可能对宿主菌产生影响, 有利于对宿主菌进行下一步改造, 如引入 loxP 位点以引入更多外源基因。

本研究构建的 pRADM 含有 2 个启动子, 可以使用一个启动子驱动 GFP 或者 DsRed 等报道基因, 另外一个启动子驱动目的基因, 这样报道基因可以方便地指示病毒繁殖个感染情况, 提示重组蛋白表达状况^[14]。该载体还非常适合于表达多个基因, 借助于两个表达单元之间的可调序列, 能够一次同时克隆 4-8 个基因或者克隆同一个基因多个拷贝, 结合家蚕幼虫或者蛹进行表达, 将会极大提高本系统应用价值。

参考文献

- [1] Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular Cell Biology*, 1983, 3 (12): 2156 - 2165.
- [2] Luckow VA, Lee SC, Barry GF, et al. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 1993, 67 (8): 4566 - 4579.
- [3] Thomas A Kost, J Patrick Condeary, Donald L Jarvis, Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 2005, 23: 567 - 575.
- [4] Motohashi T, Shimojima T, Fukagawa T, et al. Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by Bombyx mori nuclear polyhedrosis Virus bacmid system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 326: 564 - 569.
- [5] Yao L, Liu Z, Zhang X, et al. A high efficient method for generation of recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis Virus Bacmid and large-scale expression of foreign proteins in silkworm larvae. *Biotechnology and Application Biochemistry*, 2007, 48: 45 - 53.
- [6] Kari J. Airenne¹, Erik Peltomaa¹, Vesa P, et al. Improved generation of recombinant baculovirus genomes in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(17): e101.
- [7] Germino J, Bastia D. The replication initiator protein of plasmid R6K tagged with β -galactosidase shows sequence-specific DNA-binding. *Cell*, 1983, 32: 131 - 140.
- [8] Helinski DR, Toukdarian AE, Novick RP. Replication control and other stable maintenance mechanisms of plasmids // *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, Washington DC, American society for microbiology, 1996: 2295 - 2342.
- [9] Philipps B, Rotmann D, Wicki M, et al. Time reduction and process optimization of the baculovirus expression system for more efficient recombinant protein production in insect cells. *Protein Expression and Purification*, 2005, 42: 211 - 218.
- [10] Berger I, Fitzgerald DJ, Richmond TJ. Baculovirus Expression System for heterologous multiprotein Complexes. *Nature Biotechnology*, 2004, 12: 1583 - 1587.
- [11] Li MZ, Elledge SJ. MAGIC, an in vivo genetics method for the rapid construction of recombinant DNA molecules. *Nature genetics*, 2005, 37: 311 - 319.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- [13] Invitrogen. Bac-to-Bac Baculovirus Expression System, Version C, December 19, 2002.
- [14] 姚宁, 姚伦广, 阚云超, 等. 杆状病毒表达系统的改进及 IL-6 在昆虫细胞内表达与纯化. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2006, 22 (4): 572 - 580.

Construction of recombinant *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus by zero background Tn7 transposition

Lunguang Yao^{1*}, Hongling Zhang^{1,2}, Juan Feng^{1,3}, Erhui Zhang¹, Zhenzhong Wen^{1,2}

(¹China-United Kingdom Nanyang Normal University-Rothamsted Research Joint Laboratory of Insect Biology, Henan Provincial Key Laboratory of Funiu Mountain Insect Biology, Nanyang Normal University, Nanyang 473064, China)

(²College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

(³College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: [Objective] In order to construct a recombinant *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus by Tn7-mediated transposition in *Escherichia coli* efficiently, a new zero background transposition system was developed. [Method] The new system consisted of a conditional replication donor vector pRADM and an *attTn7* site blocked *E. coli* containing BmNPV-Bacmid. The donor transposon vector pRADM with the replication origin derived from R6K γ required the factor π encoded by the *pir* gene to propagate in host cells. Another conditional replication plasmid pBlockA was constructed to block the *attTn7* site in host *E. coli* genome. [Results] Compared with the original vector with ColE1 origin, the transposition efficiency increased from 5.7% to 66% when using conditional replication vector pRADM transposition into original BmDH10Bac. The *attTn7* site blocked strain BmDH10Bac Δ Tn7 resulted in a significant increase from 5.7% to 23% in the efficacy of generating recombinant BmNPV Bacmid by transposition. Furthermore, the transposition of BmDH10Bac Δ Tn7 with pRADM resulted in 100% white colonies. [Conclusion] This highly efficient and zero background transposition system provides a simple and rapid way of construction of recombinant BmNPV to express target genes or produce gene-delivery virus particles in silkworm.

Keywords: conditional replication origin; zero background transposition; recombinant *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30700750)

* Corresponding author. Tel: +86-377-63525085; E-mail: lunguangyao@163.com

Received: 16 December 2008/ Revised: 11 March 2009

《微生物学报》答作者问——关于署名

问:我想问一下作者及单位署名顺序的修改问题。投稿后经过专家审查通过后即将发表,如果想在作者和单位方面增、减新的内容,并且修改作者及单位署名顺序是否可以?是否需要提供什么证明或者相关的材料?

答:可以变更,但需要作者再提供以下材料。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。