

基于对虾白斑综合症病毒极早期启动子的新型杆状病毒表达载体的构建与分析

吕利群¹, 徐鸿绪², 王浩¹

(¹ 上海海洋大学省部共建种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

(² 中山大学第一附属医院检验医学部, 广州 510080)

摘要 【目的】构建携带有受杆状病毒多角体启动子控制的疱疹性口腔炎病毒糖蛋白(vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSV G)和受白斑综合症病毒极早期基因(immediately-early gene 1, *ie1*)启动子控制的绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)两个表达阅读框的新型重组病毒 vAc-G-EGFP, 分析其在无脊椎动物和脊椎动物细胞系中表达报道基因的能力。【方法】利用 Bac-To-Bac 系统构建重组杆状病毒, 利用病毒感染或转导实验介导报道基因在待测细胞系中的表达, 用荧光显微镜和免疫印迹技术分析报道基因在待测细胞系中的实时表达情况。【结果】成功构建了分别含 VSV G 和 *ie1* 启动子两个阅读框的重组杆状病毒 vAc-G-EGFP, 发现 vAc-G-EGFP 可以在无脊椎和脊椎动物细胞系中有效表达报道基因 EGFP, 免疫印迹实验显示, 在不同时间点 EGFP 于这两类细胞中的表达存在差异。【结论】基于白斑综合症病毒 *ie1* 启动子并携带有 VSV G 表达框的单一杆状病毒载体可以实现同时在不同种类细胞系中有效表达外源基因。本文构建的新型杆状病毒表达载体有望普遍应用于基础和应用生物学研究。

关键词: 白斑综合症病毒 *ie1* 启动子; 杆状病毒; 疱疹性口腔炎病毒糖蛋白

中图分类号: S917 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)09-1253-06

用基于昆虫细胞的杆状病毒表达系统表达外源基因有很多优点: 表达量高, 可以表达高分子量的蛋白质, 可以同时表达多个基因等等。然而昆虫细胞和哺乳动物细胞的蛋白合成后修饰加工存在差异, 许多在昆虫细胞中表达的哺乳动物细胞蛋白质没有足够的活性^[1]。自 1995 年起, 重组杆状病毒被发现可以携带外源基因进入多种哺乳动物细胞^[1-4]。不管是体内还是体外, 疱疹性口腔炎病毒糖蛋白(vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSV G)被发现都可以增强杆状病毒转导外源基因在很多哺乳动物细胞中表达的水平^[5-8]。由于杆状病毒具有低毒性和在哺乳动物细胞中不复制的特点, 携带 VSV G 的

杆状病毒作为基因导入载体的研究已成为基因工程领域的一个研究热点。在已有的杆状病毒载体的研究工作中, 外源基因都是被哺乳动物特异性的启动子介导表达的, 目标蛋白质在繁殖病毒的昆虫细胞中并不表达^[9-11]。选取一个能在无脊椎动物和脊椎动物细胞中都有活性的启动子构建重组杆状病毒, 则会使在昆虫细胞中和哺乳动物细胞中同时表达与分析外源蛋白成为可能。

已有的研究结果表明, 对虾白斑综合症病毒极早期基因 *ie1*(immediately-early gene 1)的启动子在无脊椎动物对虾和昆虫细胞中有表达活性^[12-13]。本文试图构建携带受杆状病毒多角体启动子控制的

基金项目: 上海海洋大学科研启动基金(B-8201-08-0284)

作者简介: 吕利群(1971-), 男, 湖北武穴人, 博士, 教授, 研究方向为水生动物医学。Tel: +86-21-61900453; Fax: +86-2154422366; E-mail:

lqlv@shou.edu.cn

收稿日期: 2009-03-10; 修回日期: 2009-05-30

VSV G 和受白斑综合症病毒 *ie1* 启动子控制的绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)两个表达阅读框的新型重组病毒,分析其在代表性无脊椎动物和脊椎动物细胞中的表达特点,为该载体在生物工程中的推广应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: *pfu* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *SnaB* I、*Sal* I、*Sma* I、*Stu* I、*BamH* I、*Not* I、*Hind* III、T4 DNA 连接酶均购自 Promega Corporation; 小鼠抗 EGFP 单克隆抗体为 Sigma-Aldrich 产品,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自 Vector Laboratories Ltd; 预染蛋白分子量 Marker 为 Bio-Rad Laboratories 产品;胎牛血清为 Hyclone 产品;DMEM 和 EMEM 培养基为 Gibco BRL Life Technologies 产品;昆虫无血清培养基 SF-900II 为 Invitrogen 产品。二氧化碳培养箱为 Sanyo 产品;梯度 PCR 仪为 Eppendorf 产品;小型垂直板电泳槽、电泳仪、凝胶自动成像系统均为 Bio-Rad 产品;倒置荧光显微镜为 Olympus 产品;透射电镜 H-700 为 Hitachi 产品。

1.1.2 细胞:猪胚胎肾细胞 Pk15 培养在添加 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 度二氧化碳培

养箱中培养。亚洲鲑鱼上皮细胞系 SB 培养在含 5% 胎牛血清的 EMEM 培养基中,于 28 摄氏度二氧化碳培养箱中培养。无脊椎动物 Sf9 细胞系培养在 27 摄氏度的无血清培养基 SF-900II 中。

1.2 病毒的感染、滴度测定和转导实验

用杆状病毒感染 Sf9 细胞及杆状病毒的滴度测定按照以前报道的方法进行^[14]。为了增强空斑在照片中的分辨率,实验中先用甲醛固定形成空斑的单层细胞,然后小心去掉覆盖琼脂层,用结晶紫进行染色拍照。细胞上清液中的病毒通过超速离心进行浓缩,病毒悬液的浓度用 PBS 调整到每毫升 10^{10} 空斑形成单位(PFU/ml)。杆状病毒转导脊椎动物细胞系根据已报道的办法进行^[15-16],并略有改动:病毒转导过程中用 D-PBS(Invitrogen)作缓冲液,转导在 25 度培养箱中持续 4 小时,然后去掉上清,添加完全 DMEM 培养基,将细胞置于二氧化碳培养箱继续正常培养。

1.3 质粒构建

1.3.1 引物:本研究所用引物是根据 GeneBank 中所收录的各载体的全核苷酸序列或病毒基因组序列所设计的(表 1)。

表 1 引物列表

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequences (5'→3')	Restriction site
VSVG-5'	CGCGGATCCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGC	<i>BamH</i> I
VSVG-3'	CCCAAGCTTCCAACACACTATTGCAATGAA	<i>Hind</i> III
Pol5'	TCCCCGGGGGATGGTTGGCTACGTATACTCCG	<i>Sma</i> I
Pol3'	CGCGGATCCGGTTTCGGACCGAGATCCGC	<i>BamH</i> I
Ie5'	TCCCTACGTATCAATTTTATGTGGCTAATGGAGA	<i>SnaB</i> I
Ie3'	ACGCGTCGACCTTGAGTGGAGAGAGAGCTAGTTATAA-3'	<i>Sal</i> I

1.3.2 重组病毒中 VSV G 阅读框的克隆:依据 Bac-To-Bac 系统使用手册(Invitrogen), AcMNPV 多角体启动子控制的 VSV G 表达阅读框和白斑病毒 *ie1* 启动子控制的 EGFP 表达阅读框同时用基因克隆的办法插入 pFastBac1 穿梭载体中,这两个阅读框通过在宿主菌 DH10BAC™中定点转座的办法整合进杆状病毒基因组得到重组病毒 vAc-G-EGFP。为了便于插入两个相反方向的基因阅读框,在插入两个阅读框前, pFastBac1 中的多角体启动子首先用 *SnaB* I 和 *Sal* I 切除。依据 pFastBac1(Invitrogen)的序列图谱,多角体启动子是用 PCR 的方法从该载体中扩增而来,两条引物分别是 pol5'和 pol3',在克隆载体

pBluescript 中的克隆位点是 *Sma* I 和 *BamH* I。为了增强杆状病毒转导外源基因进入脊椎动物细胞的能力,在杆状病毒载体中插入了多角体启动子控制下的 VSV G 表达阅读框,VSV G 将会被展示在病毒粒子的外膜上^[8]。VSV G cDNA 及其末端的 β -globin 终止子是用 PCR 的方法从 pVSV-G(Clontech)载体中扩增而来,两条引物分别是 VSVG-5'和 VSVG-3',在克隆载体 pBluescript(Clontech)中的克隆位点是 *BamH* I 和 *Hind* III。在克隆载体 pBluescript 中 VSV G cDNA 被置于多角体启动子下游,然后整个基因阅读框插入到 pFastBac1 载体的 *SnaB* I 和 *Sal* I 位点中。

1.3.3 重组病毒中 EGFP 阅读框的克隆 *ie1* 启动子扩增自对虾白斑综合症病毒基因组 *ie1* 基因的启动子区(-1 到 -512),两条引物分别为 *ie5'* 和 *ie3'*,两端设计了限制性内切酶位点 *SnaB I* 和 *Sal I*,可插入到 pFastBac1 质粒的 *Stu I* 和 *Sal I* 位点中。EGFP cDNA 用 *Sal I* 和 *Not I* 双酶切自 pEGFP 载体(Clontech),然后插入到含有 *ie1* 启动子序列的 pFastBac1 载体中。

1.3.4 对照病毒:作为对照,通过定点转座 pFastBac1 空载体得到病毒 vAc-Bacmid。

1.4 电子显微镜和荧光显微镜观察

本实验中用倒置荧光显微镜观察细胞中的荧光信号,图像用数码影像系统(Nikon)俘获和储存。实验中用透射电镜观察病毒粒子。病毒粒子从感染细胞的上清液中用超速离心(80 000 g 75 分钟)的办法浓缩而来,纯化的病毒粒子置于 400 目的铜网,并用 2% 醋酸铀负染后进行电镜(50 000 倍)观察。

1.5 免疫印迹反应

蛋白电泳,蛋白质转膜及抗体结合与显色反应都依据报道过的标准方法进行^[14]。相当于 1×10^6 的细胞总蛋白样品被用于本实验的蛋白质分析。

2 结果

2.1 重组杆状病毒的构建

为了研究白斑病毒 *ie1* 启动子介导报道基因表达的能力,一个由 *ie1* 启动子控制的 EGFP 表达阅读框被同时整合到含有 VSV G 表达框的病毒基因组中得到重组病毒 vAc-G-EGFP(图 1-A)。

用 vAc-G-EGFP 和对照病毒 vAc-Bacmid 分别感染昆虫 Sf9 细胞发现 vAc-G-EGFP 能引起明显的细胞融合效应(图 1-B)这是 VSV G 蛋白质作用的结果。用电镜观察经纯化的杆状病毒粒子发现 vAc-Bacmid 是经典的杆状结构(图 1-C),vAc-G-EGFP 外膜结构则呈卵圆形(图 1D)。

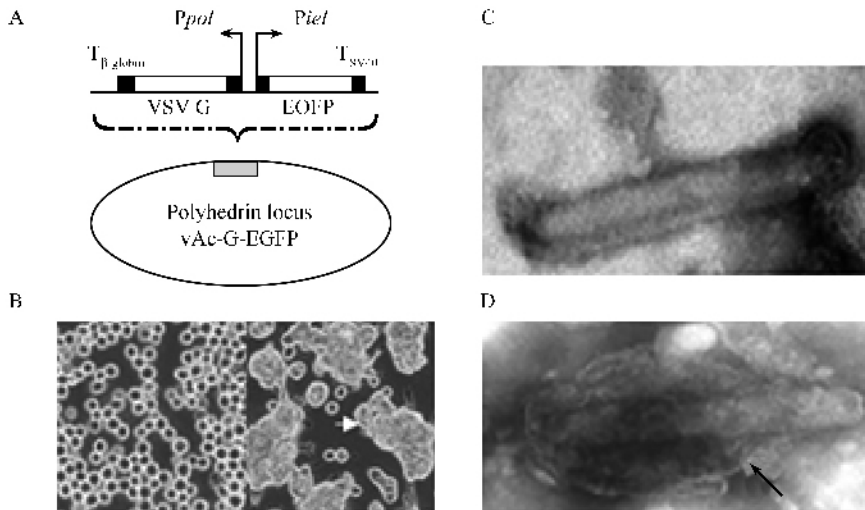


图 1 重组杆状病毒 vAc-G-EGFP 的构建

Fig.1 Construction and production of recombinant baculoviruses. (A) Schematic representation of the genome of vAc-G-EGFP. The desired VSV G and EGFP expression cassettes were inserted into the polyhedrin locus through site-specific transposition employing Bac-to-Bac system. (B) Syncytium formation in Sf9 cells infected with vAc-G-EGFP as indicated by white arrow. The images were captured at 72 h post infection. (C) Electromicroscopy image of vAc-Bacmid virion particle. (D) Electromicroscopy image of vAc-G-EGFP virion particle. Black arrow indicates the oval-shape membrane.

2.2 重组病毒 vAc-G-EGFP 在昆虫 Sf9 细胞中的增殖

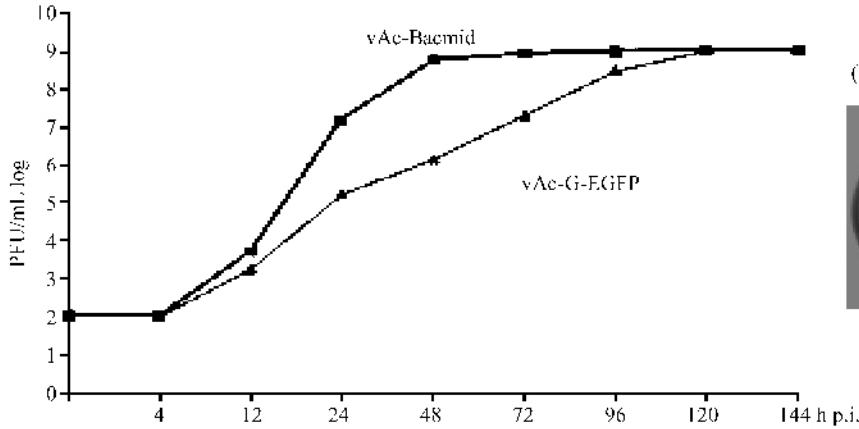
通过绘制病毒的一步生长曲线(one-step growth curve)可以反映 vAc-G-EGFP 感染 Sf9 细胞后的增殖情况(图 2)。病毒感染细胞的上清中的病毒粒子数量用空斑分析的办法确定。尽管对照病毒 vAc-

Bacmid 96 h 后每毫升上清液可产生 10^9 空斑形成单位,较重组病毒 vAc-G-EGFP 快一些达到增殖最高峰;后者在 120 h 后也可产生相同的病毒滴度。

3.3 报道基因在无脊椎和脊椎动物细胞系中的表达

为了检测重组病毒 vAc-G-EGFP 表达报道基因

(A) Budded virus yields



(B)

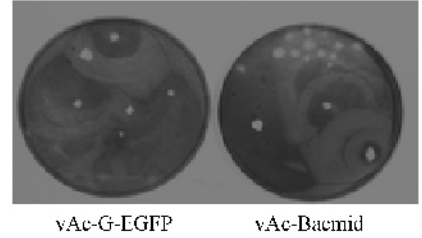


图2 重组病毒的一步生长曲线

Fig. 2 (A) One-step growth curves of vAc-G-EGFP. Each data point represents the mean value of three individual infections. Sf9 cells were infected by vAc-bacmid or vAc-G-EGFP with a MOI of 0.5. (B) Representative plaque formation by vAc-G-EGFP and vAc-Bacmid in Sf9 cells. The virus samples were both from supernatant of infected Sf9 cells at 96 h postinfection, and the plaques were stained for counting at 7 days post infection.

的能力, 实验中用 vAc-G-EGFP 感染昆虫 Sf9 细胞, 感染复数(multiplicity of infection)为 25; 同时, 用 vAc-G-EGFP 转导猪肾细胞系 Pk15 和亚洲鲈鱼细胞系 SB, 感染复数为 250。24 h 后, 用荧光显微镜直接观察 EGFP 的表达情况(图 3)。在所有细胞系中都可以检测到 EGFP 的表达。

延长而逐步升高的。图 4B 和 4C 显示, 由于病毒不在 Pk15 和 SB 细胞中增殖, EGFP 在这两种细胞系中的表达量相对稳定。病毒感染 2 h 后, EGFP 在 Sf9 细胞中即能被检测出来; 病毒转导脊椎动物细胞后则需要 6 h 才能检测出 EGFP 的表达(图 4)。SB 细胞相对较低的表达水平是由于该细胞系的生长密度低的缘故(图 3)。

3 结论

尽管杆状病毒 AcMNPV 的 ie1 启动子在哺乳动物细胞中也有转录活性, 但由于其相对较低的表达水平, 迄今并没有被用来在异源细胞中表达目的蛋白。而目前应用较多的 CMV 启动子等脊椎动物特异的启动子虽然在脊椎动物细胞中表达活性很强, 但在无脊椎动物细胞中却没有表达活性。本研究显示对虾白斑综合症病毒 ie1 启动子在无脊椎动物和脊椎动物中都有较强的表达外源基因的能力。基于这一特性, 本文构建了外膜上同时展示有 VSV G 糖蛋白的杆状病毒表达载体; 白斑综合症病毒 ie1 启动子在该载体的介导下可以在所有测试的细胞系中高效表达外源基因。由于携带 VSV G 的杆状病毒已被证实可以用作哺乳动物的基因治疗载体^[11], 而白斑综合症病毒 ie1 启动子的应用使在哺乳动物和昆虫细胞中用一个病毒载体同时表达并分析目的蛋白成为可能, 因此本文构建的载体用于基因治疗的可能性将是未来需要探讨的一个课题。

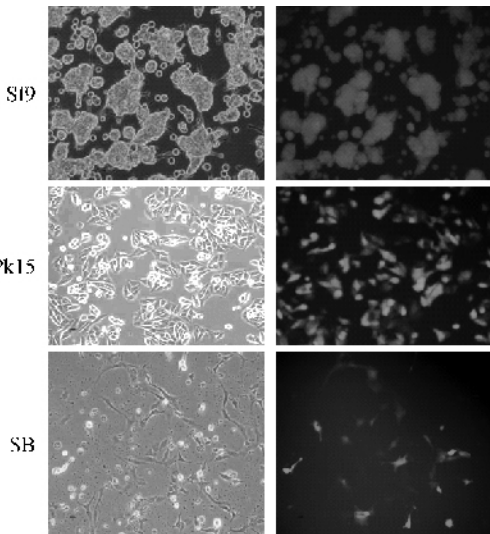
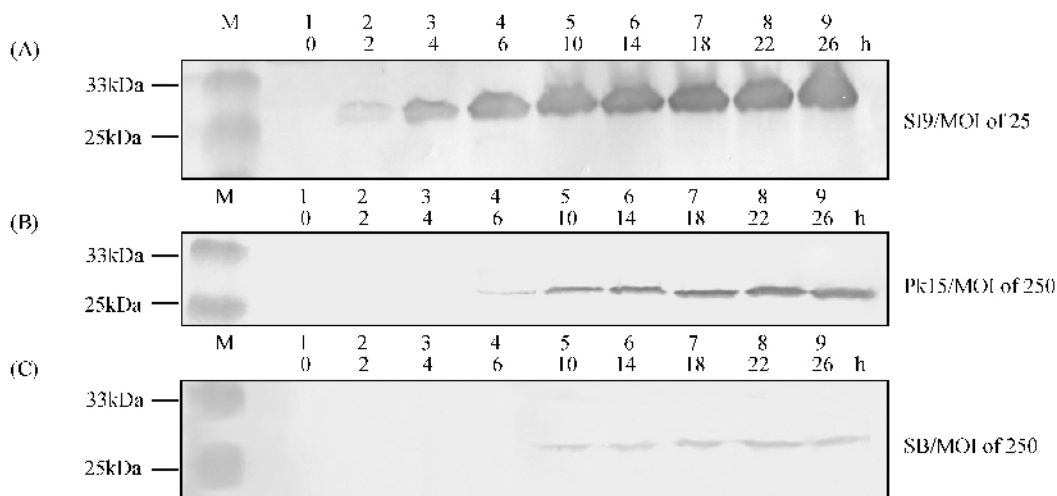


图3 报道基因 EGFP 的荧光检测

Fig. 3 Fluorescence micrographs of invertebrate Sf9 cells infected with vAc-G-EGFP or vertebrate (Pk15 and SB) cells transduced with vAc-G-EGFP.

实验中也定时收获 vAc-G-EGFP 感染或转导的细胞, 用抗 EGFP 的单抗通过免疫印迹反应检测 EGFP 的实时表达情况(图 4)。图 4A 显示, 在 Sf9 细胞中由于病毒不断增殖, EGFP 的表达量是随着时间



4 EGFP 在 vAc-G-EGFP 感染或转染细胞系中的实时表达

Fig.4 Steady-state expression level of EGFP in vAc-G-EGFP- infected S19 cells or transduced Pk15 and SB cells. A, Time course expression of EGFP in insect cells. S19 cells were infected with vAc-G-EGFP at a MOI of 25. Total cell lysates were harvested for western blot analysis at different time points post infection; B and C, Time course expression of EGFP in Pk15 and SB cells respectively. Both Pk15 and HeLa cells were transduced with vAc-G-EGFP at a MOI of 250. Total cell lysates were harvested at indicated time points post transduction.

参考文献

- [1] Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 2005, 23 :567 – 575.
- [2] Boyce FM, Bucher NLR. Baculovirus mediated gene transfer into mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1996, 93 :2348 – 2352.
- [3] Pieroni L, Maione D, Monica NL. In vivo gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors. *Human Gene Therapy*, 2001, 12 :871 – 881.
- [4] Sarkis C, Serguera C, Petres S, et al. Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2000, 97 :14638 – 14643.
- [5] Bailey MJ, McLeod DA, Kang CY, et al. Glycosylation is not required for the fusion activity of the G protein of vesicular stomatitis virus in insect cells. *Virology*, 1989, 169 :323 – 331.
- [6] Barsoum J, Brown R, MyKee M, et al. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Human Gene Therapy*, 1997, 8 :2011 – 2018.
- [7] Mangor J. T., Monsma S. A., Johnson M. C., Blissard G. W., 2001. A GP64-null baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus G protein. *Journal of Virology*, 75 :2544 – 2556.
- [8] Tani H, Limn CK, Yap CC, et al. In vitro and in vivo gene delivery by recombinant baculoviruses. *Journal of Virology*, 2003, 77 :9799 – 9808.
- [9] Abe T, Takahashi H, Hamazaki H, et al. Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *Journal of Immunology*, 2003, 171 :1133 – 1139.
- [10] Aoki H, Sakoda Y, Jukuroki K, et al. Induction of antibodies in mice by a recombinant baculovirus expressing pseudorabies virus glycoprotein B in mammalian cells. *Veterinary Microbiology*, 1999, 68 :197 – 207.
- [11] Facciabene A, Aurisicchio L, Monica NL. Baculovirus vectors elicit antigen-specific immune responses in mice. *Journal of Virology*, 2004, 78 :8663 – 8672.
- [12] Liu W, Chang Y, Wang C, et al. Microarray and RT-PCR screening for white spot syndrome virus immediate-early genes in cycloheximide-treated shrimp. *Virology*, 2005, 334 :327 – 341.
- [13] Lu L, Wang H, Manopo I, et al. Baculovirus-mediated promoter assay and transcriptional analysis of white spot syndrome virus orf427 gene. *Virology Journal*, 2005, 2 (71).
- [14] Lu L, Du Q, Chejanovsky N. Reduced expression of the immediate-early protein IE0 enables efficient replication of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in poorly permissive *Spodoptera littoralis* cells. *Journal of Virology*, 2003, 77 :535 – 545.
- [15] Hsu C, Ho Y, Wang K, et al. Investigation of optimal transduction conditions for baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells. *Biotechnology and bioengineering* 2004, 88 :42 – 51.
- [16] Lu L, Ho Y, Kwang J. Suppression of porcine arterivirus replication by baculovirus-delivered shRNA targeting nucleoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 340 :1178 – 1183.

Construction and characterization of a novel baculovirus vector based on the White spot syndrome virus immediately-early promoter

Liqun Lu^{1*}, Hongxu Xu², Hao Wang¹

(¹Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(²Department of Medical Diagnostic, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract [Objective] To construct a universal baculovirus vector for efficient gene expression in both invertebrate and vertebrate cell lines. **[Methods]** Using the Bac-To-Bac system, we genetically engineered the immediately-early 1 gene promoter (ie1 promoter) from White spot syndrome virus into a baculovirus vector that was pseudotyped with Vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV G). We placed the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene under the control of ie1 promoter in the baculovirus vector to get the reporter recombinant baculovirus, vAc-G-EGFP. We tested the reporter EGFP gene expression in tested cell lines through virus infection or transduction experiments using direct fluorescence microscopy and Western blot analysis. **[Results]** Under the control of ie1 promoter, vAc-G-EGFP could efficiently express the EGFP reporter gene in both invertebrate and vertebrate cells. The steady-state expression level of EGFP in vertebrate cell lines were different from that in invertebrate Sf9 cells as reflected by Western blot assays. **[Conclusion]** The ie1 promoter-based and VSV G-pseudotyped baculovirus vector presents a unique and effective tool to express target genes simultaneously in various cell systems; the novel baculovirus-mediated gene expression system developed in this study has the potential to be widely used in both basic and applied research.

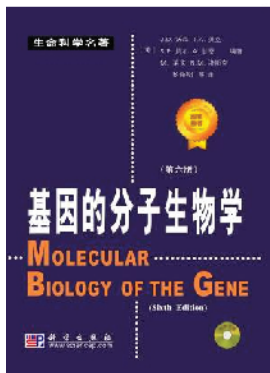
Keywords: White spot syndrome virus; baculovirus; Vesicular stomatitis virus glycoprotein

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Shanghai Ocean University Research Grant (B-8201-08-0284)

* Corresponding author. Tel: +86-21-61900453; Fax: +86-21-54422366; E-mail: lqlv@shou.edu.cn

Received: 10 March 2009/Revised: 30 May 2009



科学出版社新书推介(2009-09)

基因的分子生物学(第六版) [译] 含光盘

[美] J. D. 沃森 T. A. 贝克 S. P. 贝尔 A. 甘恩 M. 莱文 R. M. 洛斯克 编著
杨焕明等 译

978-7-03-025756-8 ¥128.00 2009年7月出版

内容简介: 本书由DNA双螺旋的发现者之一——James D. Watson及其他几位著名学者在第五版的基础上修订完成。本书除了反映分子生物学领域的最新进展之外,还涉及其他诸多方面的内容。此次修订仍保留了上一版中的许多定义和特点,而且新增了调控RNA和基因组分析以及系统生物学的内容。全书共分五篇:化学和遗传学、基因组的维持、基因组的表达、调控以及方法。

本书具有权威性,内容新颖、详尽,堪称此领域的经典之作。为广大的生物爱好者及研究人员提供了分子生物学的知识框架和实验途径,并强调了基因科学对于整个生物领域的重要意义。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:周文宇 联系电话:010-64031535

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目