

AcNPV转移质粒与家蚕NPV杂交重组并在家蚕幼虫和蛹中表达及表达产物稳定性的研究

巫爱珍 王平 毛昌群 钱元骏* 孙玉昆

(中国科学院上海生物工程中心, 上海)

本文报道了含 β -半乳糖苷酶基因的AcNPV转移质粒与家蚕NPV杂交重组并在家蚕幼虫及蛹体中进行表达的结果。在家蚕幼虫、蛹体中表达产物的量比在BmN细胞中高100倍以上, 每毫升血淋巴液中表达产物可达4mg。同时还研究了表达产物在血淋巴液中的稳定性以及体液中的蛋白酶抑制剂随NPV的复制而增加的特性, 获得了具有指导生产意义的结果, 并扩大了AcNPV转移质粒的应用范围。

关键词 重组多角体病毒(NPV); 蛋白酶抑制剂

家蚕核多角体病毒(NPV)^[1]是杆状病毒组的一种, 基因组由超螺旋环状双股DNA组成, 长度为128kb。NPV复制过程中产生两种形式的病毒颗粒, 一是分泌在细胞外的病毒颗粒, 另一种是包涵体病毒(称为多角体)。多角体蛋白分子量3万, 在NPV感染后期表达, 将病毒颗粒包装起来形成多角体, 多角体蛋白对于NPV的感染与复制都是非必需的。多角体蛋白基因是一个强启动子, 所以近年来利用杆状病毒NPV作为载体, 在昆虫细胞或昆虫个体中表达外源基因^[2-7]。昆虫细胞表达系统的特点是表达效率比哺乳动物细胞高, 表达产物可以被修饰加工以及蛋白侧链的糖基化, 呈现天然空间结构, 不论哺乳动物细胞或昆虫细胞大量培养均需要特定的技术设备、价格昂贵、周期长。但昆虫个体如家蚕幼虫、蛹作为表达系统, 培育方便、价格低廉。家蚕幼虫20多天生长期, 食蚕叶约20g, 体重可达5g, 每条蚕可得毫克水平表达产物, 是一个有发展前途的基因工程表达系统。本文研究

了外源基因的体内重组, 在家蚕幼虫、蛹体内的表达, 以及表达产物在淋巴液中的稳定性等, 以期指导生产实际。

材料和方法

(一)材料

1. 病毒NPV和细胞: 家蚕细胞株为BmN细胞, 培养液为BML/TC-10。家蚕NPV通过感染五龄家蚕幼虫增殖, 用蔗糖密度梯度超离心法提纯^[8]。

2. 质粒: pAc360- β -gal由Summers, M.D.教授惠赠。

(二)方法

1. 病毒DNA的制备: 纯化后的病毒NPV多角体经0.25mol/L NaCl和重蒸水洗涤后用碱性Na₂CO₃缓冲液(含0.1mol/L Na₂CO₃、0.1mmol/L NaCl、0.1%SDS、1mg/ml蛋白酶K, pH 10.8)

本文于1989年8月22日收到。

* 中国农业科学院蚕业研究所。

本项目由中科院生物技术局资助。

37℃保温2h,15000rpm离心除去不溶物,上清液用重蒸酚抽提、离心,水相再用氯仿抽提,最后将水相对重蒸水透析过夜。此法制备的 NPV DNA 保持较高的转染活性。

2. 细胞内重组及重组病毒的筛选^[9]: 将1μg质粒及家蚕NPV DNA 2μg悬浮于950μl转染缓冲液(20mmol/L HEPES、0.7 mmol/L Na₂HPO₄、37 mmol/L NaCl、6mmol/L葡萄糖、5 mmol/L KCl、0.5μg/ml小牛胸腺DNA, pH7.05)中,加50μl 2.5mol/L CaCl₂溶液,室温放置30min,使之形成细微沉淀,将其加到单层BmN细胞中,28℃培养7—8h后吸弃转染液,换培养液在28℃继续培养3—4天,直至有病毒多角体形成。将转染细胞培养液稀释后取2ml加在6cm培养皿的BmN单层细胞上,在28℃培养2h后吸弃感染液,再用培养液轻轻漂洗单层细胞,在单层细胞上覆盖1.5%琼脂糖凝胶(Sea plaque,用BML/TC-10溶解,含200μg/ml X-gal),在28℃培养4—6天,至蓝色空斑形成,挑取蓝色空斑。按上述同样方法重复做空斑测定,分离重组NPV。

3. 重组 NPV 感染家蚕幼虫或蛹及其体液的采集: 将重组 NPV 接种于五龄家蚕幼虫或蛹,在接种后1—6天内每天取2区(每区100头)采集体液,离心除去不溶物,定量取出体液测定表达产物的活力。

4. 家蚕幼虫或蛹体中表达的β-半乳糖苷酶活力测定^[10,11]: 取幼虫体液或蛹体液经离心,上清液用缓冲液(0.006mol/L Na₂HPO₄, 0.004 mol/L NaH₂PO₄, 0.1mol/L KCl, 0.001mol/L MgSO₄·7H₂O, 0.05mol/L β-巯基乙醇, pH7.0)稀释后进行酶活力测定。活力测定系统含

缓冲液1.6ml,加0.4ml邻位硝基苯酚-β-半乳糖苷溶液(4mg/ml)及10μl稀释的淋巴液,28℃反应数分钟后加1ml 1mol/L Na₂CO₃停止反应,测定420nm光密度值,每分钟反应产生1毫微克分子邻硝基苯酚为1单位。同时以健康家蚕幼虫及感染野生株 NPV的家蚕幼虫淋巴液作对照。

5. 感染重组 NPV 的家蚕幼虫或蛹的体液中的蛋白酶活力测定: 以2%酪蛋白溶液或2%血红蛋白为底物, pH8.0条件下加入适量淋巴液,28℃保温不同时间,加三氯乙酸至终浓度为2%,离心去除沉淀,取上清液测280nm光密度值。

6. 感染重组 NPV 的家蚕幼虫或蛹的淋巴液中蛋白酶抑制剂的活力测定^[12]: 测定系统1.5 ml,其中含50 mmol/L pH7.5 Tris-HCl缓冲液,5μl苯甲酰基-L-酪氨酰乙酯(BTEE, 51mg/ml DMSO)于28℃保温,加20μl牛胰凝乳蛋白酶(0.1mg/ml)开始反应,用 Beckman DU-7分光光度计自动记录256nm的光密度差值ΔOD。测定抑制剂活力时,取20μl胰凝乳蛋白酶与20μl淋巴液混合,于28℃预保温5min后加到上述测定酶活力系统中测定酶活力,与同样条件下不加淋巴液的胰凝乳蛋白酶活力进行比较。胰蛋白酶活力测定是以苯甲酰-L-精氨酰乙酯(BA-EE)为底物进行测定(方法同上,测定253 nm的ΔOD值)。

7. 家蚕幼虫淋巴液中蛋白酶抑制剂的亲和层析: 10ml Sepharose 4B(Pharmacia)加1g CNBr在搅拌条件下滴加5 mol/L NaOH维持pH10—11使之活化。用0.1mol/L pH9.0 NaHCO₃洗涤除去CNBr。将活化的Sepharose 4B浸在15 ml 0.1mol/L pH9.0 NaHCO₃溶液中,另将15mg胰凝乳蛋白酶溶于0.1mol/L pH9.0 NaHCO₃溶液中,将15mg胰凝乳

蛋白酶溶于 0.1mol/L NaHCO_3 pH 9.0 溶液中, 加到含 2g 干重活化的 Sepharose 4B 溶液中, 在 4 °C 搅拌过夜。然后装柱, 以 5 倍柱体积的 0.1mol/L NaHCO_3 pH 9.0 溶液洗涤, 再用 5 倍体积 1mol/L pH 8.0 乙醇胺封闭残余的活化基团; 再依次用 1mol/L NaCl 、0.1mol/L pH 5.0 乙酸钠缓冲液(含 0.1mol/L NaCl)、含 1mol/L NaCl 的 0.1mol/L pH 8.0 硼酸缓冲液, 以及 0.1mol/L pH 5.0 乙酸钠溶液洗涤。取 10ml 感染重组 NPV 或健康家蚕幼虫的淋巴液, 经 10000rpm 离心, 将上清液通过上述固定化胰凝乳蛋白酶的 Sepharose 4B 亲和层析柱, 以 pH 6.0 磷酸-硼酸缓冲液洗涤层析柱, 最后以 0.1mol/L 磷酸, pH 6.0 磷酸-硼酸缓冲液(含 4mol/L 尿素)洗脱, 分管收集, 测定 280nm 光密度值, 然后将洗脱高峰对 0.1mol/L pH 6.0 磷酸-硼酸缓冲液透析, 除去尿素, 测定其对胰凝乳蛋白酶的抑制。按常规方法用 SDS-PAGE 测定抑制剂的蛋白组份, 浓缩胶为 4%, 分离胶为 10%。

结 果

(一) pAc360- β -gal 质粒与家蚕 NPV 体内重组及表达

pAc360- β -gal 质粒含有 β -半乳糖苷酶基因与家蚕 NPV DNA 共同感染 BmN 细胞, 进行体内重组, 经过筛选得到含有 β -半乳糖苷酶基因的重组家蚕 NPV 病毒, 于 BmN 细胞中表达, 图版 I 表示 SDS-PAGE 分析结果。 β -半乳糖苷酶的表达量经凝胶染色、600nm 扫描约占细胞总蛋白的 20% 左右。

(二) β -半乳糖苷酶在家蚕幼虫及蛹中的表达

当重组家蚕 NPV 病毒感染五龄家蚕

幼虫后, 幼虫在第 5—6 天表现症状, 淋巴液中含有 β -半乳糖苷酶, 表达量与在 BmN 细胞中表达相比高 100 倍以上, 达每毫升 4mg 水平(图 1)。图 2 表明 β -半乳糖苷酶在家蚕蛹中的表达也获得了同样的表达水平。

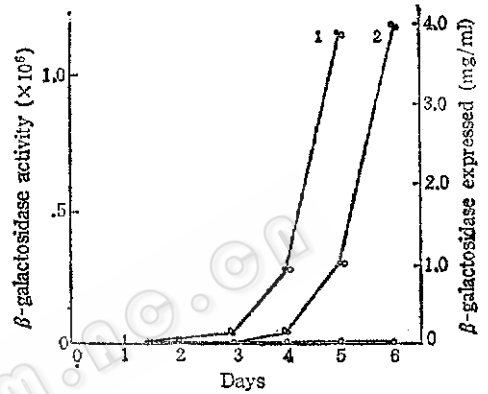


图 1 β -半乳糖苷酶基因在家蚕幼虫体内的表达
Fig.1 Expression of β -galactosidase gene in the silkworm larvae
1. In the silkworm larvae
2. In the BmN cell

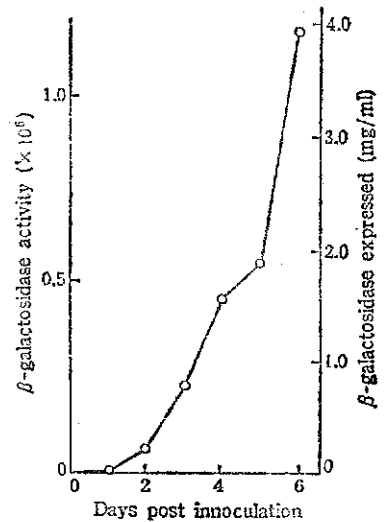


图 2 β -半乳糖苷酶基因在家蚕蛹中的表达
Fig.2 Expression of β -galactosidase gene in the pupae of silkworm

(三)家蚕幼虫淋巴液中的蛋白水解酶及蛋白酶抑制剂

为了研究家蚕幼虫体液及蛹中表达产物的稳定性,以酪蛋白或血红蛋白为底物测定了感染NPV及重组 NPV 家蚕幼虫体液及蛹中的蛋白水解酶活力。结果表明,家蚕幼虫体液及蛹中的蛋白水解酶活力微弱,但幼虫体液中含有强的蛋白酶抑制剂活力(图 3),此蛋白酶抑制剂专一地抑制胰凝乳蛋白酶而对胰蛋白酶抑制能力很微弱。感染NPV和重组NPV的家蚕幼虫体液中抑制剂的含量在感染第五天后与第一天相比提高200倍(表1),而健康家蚕幼虫的体液中蛋白酶抑制剂含量只提高20倍。说明体液中的蛋白酶抑制剂随着重组 NPV的增殖而增加,有利于表达产物的稳定。进一步用固定化的胰凝乳蛋白酶 Sepharose 4B亲和层析柱纯化家蚕幼虫体液中的蛋白酶抑制剂,测定其抑制活力。用SDS-PAGE分析其蛋白组分主要为 61 kd和 28kd 两种,此外还有些微量组分。

表 1 NPV感染的家蚕幼虫体液中蛋白酶抑制剂的合成

Table 1 Synthesis of the proteinase inhibitors in the hemolymph of silkworm during the replication of NPV

| 感染天数 After infecting days | 健康蚕 Healthy silkworm | NPV感染 Infecting NPV | 重组NPV感染 Infecting recombinant NPV |
|------------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 2 | 20 | 20 |
| 3 | 20 | 50 | 60 |
| 4 | 20 | 140 | 140 |
| 5 | 20 | 200 | 200 |

讨 论

NPV病毒对于寄主昆虫的专一性比

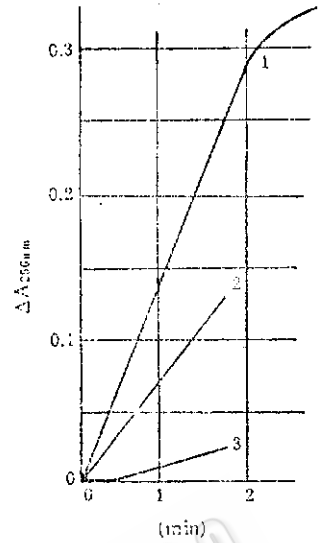


图 3 家蚕幼虫感染重组 NPV 后蛋白酶抑制剂对胰凝乳蛋白酶的抑制作用

Fig.3 Inhibition of chymotrypsin by the inhibitors present in the hemolymph of silkworm larvae infected with recombinant NPV

1. Control 2. 10 fold dilution
3. 5 fold dilution

较强,不能相互交叉感染,但不同的NPV多角体蛋白基因的DNA序列之间表现了很高的同源性,本文利用了AcNPV多角体蛋白基因构建的pAc360-β-gal与家蚕NPV DNA在家蚕细胞BmN中杂交重组获得了高效表达,这样可以扩大NPV病毒作为外源基因的载体在昆虫表达系统中的应用。利用家蚕幼虫或蛹作为表达系统在我国有广阔的应用前景和重要的经济意义。但是应用这个表达系统需要解决一系列的问题,如质粒的构建、重组方式、从细胞表达过渡到虫体、适当的龄期、接种方法要方便有效、表达产物在淋巴液中的稳定性、淋巴液中的蛋白酶和蛋白酶抑制剂等,这些问题本文都已经涉及到,我们的研究结果对于利用这个表达系统具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Luckow, V. A. and Summers, M. D.: *Bio/Technology*, 6:47—55, 1988.
- [2] Marino, M. H.: *Biopharm*, 2:18—33, 1989.
- [3] Daerfler, W.: *The baculovirus Vector System, Current Topics in Microbiology and Immunology*, Daerfler, W. and Bohm, P. (eds), p.131, 1986.
- [4] Granados, R. R. and Federici, B. A.: *The Biology of Baculovirus, Vol. I, I*, CRC. Press, 1986.
- [5] Smith, G. E. and Summers, M. D.: *Virology*, 89:517—527, 1978.
- [6] Smith, G. E. and Summers, M. D.: *J. Virol.*, 30:828—838, 1978.
- [7] Smith, G. E. and Summers, M. D.: *European Patent Office*, 127839 A2, 22 05 84.
- [8] Koftas, T. K. Ito and Halina, W.: *J. Virol.*, 54:436, 1985.
- [9] Summers, M. D. and Smith, G. E.: *A manual of Method for Baculovirus and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin*, p.1555, 1987.
- [10] Pennock, K. D. et al.: *J. Virol.*, 56:153—160, 1984.
- [11] Craven, G. R. et al.: *J. Biochem.*, 240:2468, 1965.
- [12] Awalsh, K. A. and Wolcox, P. E.: *Methods in Enzymology, Vol.19*, pp.38—39, 1970.

HYBRID RECOMBINATION OF AcNPV TRANSFER VECTOR WITH *BOMBYX MORI* NPV AND EXPRESSION IN SILKWORM LARVAE AND PUPAE AND THE STABILITY OF EXPRESSION PRODUCT

Wu Aizhen Wang Ping Mao Changqun

Qian Yuanjun Sun Yukun

(Shanghai Center of Biotechnology of The Chinese Academy of Sciences, Shanghai)

This paper described that the AcNPV transfer vector containing β -galactosidase gene was hybrid recombined with *Bombyx mori* NPV and expressed in the silkworm larvae and pupae. The product was reched 4 mg/ml hemolymph. It will broad the use of AcNPV transfer vectors. The proteinase inhibitors in the hemolymph were synthesized remarkably with the replication of NPV and recombinant NPV. There are no detectable proteinase activity in the hemolymph. It is favorable for the stability of the expression product by using this system.

Key words

Recombinant NPV; proteinase inhibitors

