

柞蚕核型多角体病毒载体表达系统 基因工程研究进展

张春发 刘淑珊 范琦 李广泽

(辽宁省农科院大连生物技术研究国际野蚕研究中心, 大连, 116023)

摘要 柞蚕是一种野外饲养的经济昆虫,它以蛹滞育越冬,主要分布在我国东北部山区。我国柞蚕年产茧量6万t左右,占世界柞蚕茧产量的90%以上。柞蚕核型多角体病毒(ApNPV)属杆状病毒科A亚组,是柞蚕脓病的病原体,对柞蚕蛹十分敏感。建立柞蚕核型多角体病毒载体表达系统,以柞蚕蛹为宿主昆虫进行外源基因的大量表达生产,具有成本低、安全、易管理、可工业化生产等特点。本文概述柞蚕核型多角体病毒载体基因工程研究的进展,其中包括核型多角体蛋白基因的克隆,核苷酸序列分析,mRNA起始点的确定,转移载体的组建及所载外源基因在昆虫细胞和柞蚕体内的表达等。

关键词 柞蚕核型多角体病毒;柞蚕核型多角体蛋白基因;载体;外源基因表达;柞蚕蛹

中图分类号 S884.51

近年来,以昆虫杆状病毒为载体,表达外源基因的研究发展较快。由于杆状病毒载体具有所用的核多角体蛋白基因启动子效率高,外源基因插入容量大、重组病毒对人、畜无害,所表达的外源蛋白的抗原性、免疫源性和生物学功能等均与天然蛋白质相似等特点,所以,有关这一方面的研究日益受到人们的重视。

1 组建柞蚕核型多角体病毒(ApNPV)转移载体的重要意义

1983年,美国科学家G.E.Smith等采用基因工程技术首先建立了苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)载体表达系统,即以AcNPV为载体,用培养的昆虫细胞(如Sf9)为宿主进行外源基因的表达。从那以后,该载体表达系统得到了深入的研究和广泛应用,一系列高效表达载体相继建立,大量来自不同物种的基因在该载体表达系统中得到高效表达(Luckow et al, 1988; Rankin et al, 1988)。由于AcNPV载体表达系统的宿主为昆虫细胞,在目前条件下大量培养昆虫细胞价格高,技术复杂,设备要求严格,影响了实际应用。1985年,日本科学家S.Meada等建立了家蚕核型多角体病毒(BmNPV)载体表达系统,使外源基因在家蚕幼虫活体中得到表达,虽然表达量高,成本低,但幼虫需人工饲养,若大量生产在技术操作上仍有很多不便。为了解决上述这些问题,科学家们进行了大量的研究探索,其中方法之一就是寻找和建立理想的以活体昆虫为宿主的昆虫杆状病毒载体表达系统。

柞蚕(*Antheraea pernyi*)是我国特产,其资源丰富,产量稳定。柞蚕以蛹滞育越冬,蛹期长,自然状态下蛹期可达半年;人工控制可达1年;蛹个体大、易保存管理,更无需饲养,适合工厂化生产的需要;而且其茧皮仍可被加工利用。柞蚕核型多角体病毒是柞蚕脓病的病原体,

1993-12-21 收稿

与 AcNPV 和 BmNPV 同属杆状病毒科 A 亚组,病毒基因组为单一双链环状 DNA 分子,约含 130×10^3 b。ApNPV 的宿主范围比较窄,迄今为止,只发现它与天蚕和蓖麻蚕 NPV 有交叉感染。对人、畜、禽等安全无害。因此,组建 ApNPV 转移载体,在柞蚕蛹活体内进行外源基因的高效表达,从而建立起柞蚕 NPV 载体表达系统,不仅对促进基因工程产业化以及提高柞蚕业的经济和社会效益具有重要的实际意义,而且对进一步开展柞蚕及柞蚕 NPV 的分子生物学研究也有重要的理论意义。

2 组建 ApNPV 转移载体的方法

建立柞蚕 NPV 载体表达系统,首先是组建 ApNPV 转移载体;其次是将外源基因克隆到所组建的载体中,与野生病毒 DNA 一起转染宿主细胞,在细胞内经杂交重组形成载有外源基因的重组病毒。

与 AcNPV 和 BmNPV 相比,有关 ApNPV 病毒分子生物学方面的研究报道较少。1982 年,张春发等从辽宁地区典型的患柞蚕核型多角体病的病蚕体内分离纯化 ApNPV-DNA,进行了感染柞蚕蛹试验及限制性内切酶酶谱分析。1987 年,胡裕文等对 ApNPV 核多角体蛋白基因进行了定位和克隆(胡裕文,1987)。1990 年,张春发等采用人工合成寡核苷酸引导的点突变方法,将 ApNPV 核多角体蛋白基因起始密码 ATG 突变为 ATT,组建了 ApNPV 转移载体。但将外源基因克隆到该载体后,其重组质粒 DNA 与野生 ApNPV-DNA 一起转染柞蚕卵巢原代细胞(刘淑珊等,1988)。一直未获成功。这期间,华南农大的研究人员也对 ApNPV-DNA 进行了研究。

1992 年,张春发等采用双脱氧 DNA 序列分析方法,对含 ApNPV 核多角体蛋白基因的 DNA 片段进行核苷酸序列分析,测得 ApNPV 核多角体蛋白基因全编码序列及其 5' 端和 3' 端侧翼部分非编码序列(1075bp)(张春发等,1992a)。结果表明,ApNPV 核多角体蛋白由 735 个核苷酸序列编码,245 个氨基酸组成,其核苷酸序列与 AcNPV 和 BmNPV 同源性较高,分别为 79.6% 和 81.6%。但其与 5' 端和 3' 端侧翼序列与 AcNPV 和 BmNPV 相比差异显著,特别是控制该基因表达的 5' 启动子调控序列(nt - 2 ~ -61)部分,AcNPV 与 BmNPV 完全相同,而 ApNPV 在此区域却有 20 个核苷酸序列发生变异,在其对基因表达起决定性作用的 8 个高保守核苷酸序列 TAAGTATT(nt - 44 ~ -51)中就有两个核苷酸不相同。采用引物延伸(Primer extension)法,对 ApNPV 核多角体蛋白基因 mRNA 转录起点进行测定查明,该起始点位于该基因调控序列 12 个核苷酸高保守区的 nt - 50 位点,与 AcNPV 相似。

在上述研究的基础上,张春发等开始进行 ApNPV 转移载体的组建。首先组建了 pApM740 转移载体。该载体采用点突变的方法去掉了 ApNPV 核多角体蛋白基因的起始密码(ATG 突变为 ATT),保留了对外源基因高效表达的 RNA 转录起重要作用的 5' 端调控序列和对外源基因的翻译有重要影响的 ATG 后部分(141bp)编码序列。该载体的外源基因克隆位点为 nt + 141、BamHI 切点。

在昆虫杆状病毒 AcNPV 载体表达机制的研究中,发现起始密码(ATG)后一段编码序列对外源基因的高效表达有显著的影响,但究竟保留多少编码序列表达量最佳,尚无定论。为探讨此表达机制,组建 ApNPV 高效表达载体。在转移载体 pApM740 基础上,采用聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction,PCR)方法,分别将 nt + 2 ~ +140, nt + 9 ~ +140 和 nt + 37 ~ +140 切掉,组建了 pApM741、748 和 736 系列转移载体,其外源基因克隆位点分别在 nt + 1、nt + 8、nt + 36 均为 BamHI 切点。

3 外源基因在柞蚕蛹活体中的表达

为了确证所建的 4 个转移载体的表达功能,根据 ApNPV 和 AcNPV 核多角体蛋白基因具有较高的同源序列特点,将 DE 蛋白基因(含 1.5×10^3 b)分别克隆到 pApM740,741,748 和 736 载体中,制备重组质粒 DNA,并分别与 AcNPV 野生 DNA 一起转染对 AcNPV 病毒敏感的 Sf9 细胞。待细胞发病后,以 DE 蛋白特异抗体进行免疫荧光检测。结果表明,供试 4 个载体所载的 DE 蛋白基因均得到表达,证实所组建的 pApM740,741,748 和 736 载体均具有表达功能。将人白细胞介素 4(IL-4)基因分别克隆到 pApM741 和 748 载体中,与柞蚕 NPV-DNA 一起转染柞蚕卵巢原代细胞。十几天后,镜下观察转染细胞出现多角体。收集转染液,抽提 DNA,合成人白细胞介素-4 基因特异引物进行 PCR 检测,结果发现 IL-4 基因条带存在,表明该基因已整合到柞蚕 NPV-DNA 基因组中,重组成功。

根据上述转染实验的结果,将载有 DE 蛋白基因的 pApM748a 重组转移载体 DNA 与 ApNPV-DNA 一起转染柞蚕蛹,并于室温孵育。大约转染 1 周后,蚕蛹体表发生病理变化,呈感染柞蚕脓病症状。大约转染 20 d 后,蚕蛹组织溃烂。取蚕蛹体液镜下观察,有大量多角体病毒存在。收集转染蚕蛹体液,抽提 DNA,以合成的 DE 蛋白特异序列的寡核苷酸为引物进行 PCR 测定,结果发现 DE 基因条带。经酶谱分析和序列测定证实 DE 蛋白基因已重组到 ApNAV 基因组中。为了证实转染蚕蛹形成的病毒的稳定性,将转染发病的蚕蛹体液以 Grace 培养基进行 10 倍稀释,分别稀释成 10^0 、 10^{-2} 、 10^{-4} 和 10^{-6} 浓度,并分别感染柞蚕蛹。半月后,感染的蚕蛹陆续发病,其发病顺序依次是感染高浓度稀释液至低浓度稀释液。发病蚕蛹呈典型的病毒蛹病症和病变。镜下观察有大量柞蚕核角体病毒存在。为了进一步证实 DE 蛋白是否被表达,取病毒蛹体液,用 DE 蛋白特异抗体,进行免疫沉淀和 SDS-PAGE Western blotting 检测,并以 AcNPV-Sf9 载体表达系统表达的 DE 蛋白作对照,结果发现 DE 蛋白基因确以非融合蛋白形式在柞蚕蛹体内表达,初步与 AcNPV 载体表达系统比较其表达量,要高 25 倍以上。至此,以柞蚕 NPV 为载体,以柞蚕蛹活体为宿主表达外源基因的柞蚕 NPV 载体表达系统组建成功。

4 柞蚕 NPV 载体表达系统的特点

与 AcNPV 和 BmNPV 载体表达系统相比,柞蚕 NPV 载体表达系统有以下一些特点:
(1)柞蚕核多角体蛋白基因启动子启动效率高。ApNPV 核多角体比 AcNPV 和 BmNPV 核多角体个体大。核苷酸序列分析证实,柞蚕 NPV 核型多角体蛋白基因的启动序列有近 1/3 与 AcNPV 和 BmNPV 不同。在对表达起决定性作用的 8 个保守核苷酸序列中,柞蚕 NPV 就有 2 处发生替换,而 AcNPV 和 BmNPV 核多角体蛋白基因的启动序列几乎全部相同。
(2)建立了柞蚕 NPV-DNA 和重组质粒 DNA 直接转染柞蚕蛹的技术,使昆虫杆状病毒载体表达技术更加简便,重组率高。
(3)表达量高,成本低。柞蚕蛹体主要组织为脂肪体,对 ApNPV 十分敏感,感染后整个蛹体组织几乎全部溃烂,与杆状病毒感染的培养细胞相比,其感染率要高得多。一个柞蚕蛹的表达量相当于 AcNPV 载体表达系统 300 mL 培养基正常培养的细胞的表达量,其成本大大降低。
(4)表达生产设备简单,技术操作简便,易管理。感染后蚕蛹只要置于室温($18 \sim 20^\circ\text{C}$)下即可,待蛹发病,组织液化,过滤离心除去杂质即可进行蛋白纯化。而 AcNPV 载体表达系统,大量培养细胞需高质量的培养罐,设备价格十分昂贵;培养过程要求条件严格,技术难度大;采用家蚕病毒(BmNPV)载体表达系统时,

由于幼虫做活体宿主,在管理上注射感染重组病毒和防止污染上都有很大困难。(5)综合利用柞蚕资源。由于是用蛹进行外源基因的表达生产,不影响柞蚕幼虫吐丝做茧,柞蚕茧皮剖开后,仍可制成短纤维为人所用,达到综合利用柞蚕资源的目的。

5 今后研究工作的热点

围绕着对柞蚕 NPV 载体表达系统的实际应用,还有许多课题需深入研究,主要是:(1)建立柞蚕 NPV 敏感细胞系,为采用空斑方法纯化重组病毒提供宿主细胞。这项工作难度较大,国内已有几个实验室在开展此项研究工作,但目前为止,还未有突破性进展。(2)利用柞蚕蛹为活体表达宿主,在外源蛋白的分离纯化上与昆虫细胞为宿主不同,需针对性探索建立一套相应的分离纯化方法。(3)对 ApNPV 核多角体蛋白基因调控机制以及与其它基因间关系等方面还需进一步研究,以期建立高效表达载体。

我们建立的柞蚕 NPV 载体表达系统,是目前世界上第 3 个杆状病毒的载体表达系统,为昆虫杆状病毒载体表达系统家族又添一个新的成员。相信用不了多久,人们就可利用这一载体表达系统生产人类需要的稀有的生物活性物质,同时它也将改变传统柞蚕业的产业结构,为人类带来极大经济效益和社会效益。

参 考 文 献

- 刘淑珊,何 龙.1988.柞蚕蛹卵巢细胞原代培养及对柞蚕核型多角体病毒的敏感性.蚕业科学,14(4): 224 ~ 225
- 张春发,范 琦,刘淑珊,等.1992a.柞蚕 NPV 核型多角体蛋白基因核苷酸序列分析及其 mRNA 转录起始点的确定.蚕业科学,18(2): 77 ~ 87
- 张春发,刘淑珊,范 琦,等.1992b.柞蚕 NPV 转移载体的组建及所载外源基因在 Sf9 细胞、柞蚕卵巢原代细胞和柞蚕蛹活体宿主中的表达.蚕业科学,18(3): 164 ~ 172
- 胡裕文,范 琦,张春发,等.1987.柞蚕核型多角体病毒基因的定位和克隆.病毒学报,3(2):156
- Luckow V A,Summers M D.1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors. Biotechnology, 6 : 47 ~ 55
- Rankin C,Ooi B G,Miller L K.1988.Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major for baculovirus polyhedrin gene expression. Gene, 70: 39 ~ 49

ADVANCES IN THE GENETIC ENGINEERING RESEACH ON A NOVEL BACULOVIRUS EXPRESSION VECTOR SYSTEM USING THE NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF *Antheraea pernyi*

Zhang Chunfa Liu Shushan Fan Qi Li Guangze

(Dalian Institute of Biotechnology, Liaoning Academy of Agricultural Sciences
International Research Centre for Wild Silkmoths Dalian, 116023)

Abstract

The Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi* is a economic insect, reared outdoors and which diapause in it's pupa stage for hibernation. It is mainly cultured in the area of Northeast of China which with an annual production of about 60 000 tons, accounts for over 90% of the world's total. Nuclear polyhedrosis virus of *A. pernyi* belonging to the family *Baculoviridae*, group A, is the pathogen of NPV disease of *A. pernyi*. To establish ApNPV vector system, expressing foreign proteins on a large scale using the pupae of *A. pernyi* as host has advantages in low cost, high safety and easy managemnt. This paper describes the development of an ApNPV expression vector system, including cloning and sequencing of the ApNPV polyhedrin gene; determination of mRNA transcriptional start site of the polyhedrin gene; construction of an ApNPV gene transfer and expression of foreign protein products both in insect cells and pupae of *A. pernyi*.

Key words Nuclear polyhedrosis virus of *Antheraea pernyi*; expression of foreign protein; vector; *A. pernyi* pupa; Ap NPV polyhedrin gene