

## 基于 RD-BmBacmid 载体构建表达 GFP 蛋白的重组杆状病毒的方法

梅文枫<sup>a,b</sup>, 钱月忠<sup>a,b</sup>, 史翠萍<sup>a,b</sup>, 陈健<sup>a,b</sup>

(浙江理工大学 a. 生物化学研究所; b. 浙江省家蚕生物反应器和生物医药重点实验室, 杭州 310018)

**摘要:** 研究构建一种快速表达 GFP 蛋白的重组杆状病毒的方法。在复制缺陷型的家蚕杆状病毒(BmNPV)穿梭载体 RD-BmBacmid 基础上,利用 PCR 方法合成两端分别含有 50 bp 左右同源臂的绿色荧光蛋白基因(AcGFP)片段和线性化的 RD-BmBacmid 共转染 BmN 细胞或家蚕幼虫,可以一步获得重组病毒,表达绿色荧光蛋白。实验结果表明,含有 AcGFP 基因的重组杆状病毒构建成功,在 BmN 细胞和家蚕幼虫中分别表达了绿色荧光蛋白。因而,本研究成功建立了一种快速构建重组杆状病毒并能够表达 GFP 蛋白的新方法。

**关键词:** 杆状病毒; RD-BmBacmid; PCR; 共转染; 绿色荧光蛋白

**中图分类号:** Q812

**文献标志码:** A

### 0 引言

昆虫杆状病毒表达载体系统(baculovirus expression vector system)是一种真核表达系统,它是利用昆虫杆状病毒作为载体在虫体内或者宿主昆虫细胞中表达外源蛋白的<sup>[1]</sup>。1985 年 Maeda 等<sup>[2]</sup>利用家蚕杆状病毒成功地表达了人  $\alpha$ -干扰素,使得杆状病毒表达系统逐渐发展起来。由于昆虫杆状病毒表达载体系统具有表达量高、翻译后修饰、成本低廉等优点,已被广泛应用<sup>[3]</sup>,成为与三大蛋白表达系统一样重要的外源蛋白质表达系统<sup>[4]</sup>。目前基于昆虫杆状病毒载体的表达系统主要有两个<sup>[5]</sup>:一个是应用最为广泛的 AcNPV 表达载体系统,它是以 Tn (Trichoplusia ni) 和 Sf (Spodoptera frugiperda) 细胞系或苜蓿银纹夜蛾为宿主;另一个是家蚕杆状病毒 BmNPV 表达载体系统,它是以 BmN 细胞或家蚕幼虫为宿主。

传统的重组杆状病毒构建方法是利用转移载体与野生型病毒 DNA 共转染昆虫细胞,通过同源交

换和空斑纯化获得重组病毒,该方法不仅重组效率低,而且十分耗时<sup>[6]</sup>。1998 年 Wu 等<sup>[7]</sup>构建了类似 BacPAK6 的 BmBacPAK 病毒载体,该病毒载体具有与 BacPAK6 相同的 *Bsu*36 I 位点修饰区域,利用线性化的该载体与外源基因的转移载体共转染可获得效率接近 100%的重组病毒,从而构建了 BmNPV 线性化载体重组系统。Motohashi 等<sup>[8]</sup>主要是利用 AcBacmid 相似的方法来构建 BmBacmid,构建了一个含有 Tn7 转座位点、Kan 抗性基因、mimi-F 复制子、lacZ $\alpha$  基因的转移载体 pBKblue/miniF-Kan,其基因组即为 BmBacmid。

BmNPV 表达载体系统可以通过 Bac-to-Bac 系统或利用线性化技术构建重组病毒,但采用这些方法构建重组病毒通常需要多步克隆和筛选重组子,比较耗时费力。2013 年费伟强等<sup>[9]</sup>构建一种复制缺陷型 BmNPV 载体,通过 Red 重组技术敲除 BmBacmid 上复制必需基因 *orf1629* 部分序列,构建了 RD-BmBacmid 载体。本研究在复制缺陷型 RD-BmBacmid 载体基础上,利用 PCR 方法合成两端分

收稿日期: 2014-01-08

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863”项目(2011AA100603)

作者简介: 梅文枫(1988-),女,江西南昌人,硕士研究生,研究方向为生物反应器与蛋白质组学。

通信作者: 陈健,电子邮箱: chj1999@126.com

别含有 50 bp 左右同源臂的绿色荧光蛋白基因片段和线性化的 RD-BmBacmid 共转染 BmN 细胞,一步快速得到重组杆状病毒,无需筛选。同时也可直接共转染家蚕幼虫,产生重组病毒,表达 GFP 蛋白。左重组臂 RA-L 共有 159 bp,由 *lef-2* polyA 和多角体启动子及前 10 个氨基酸残基编码序列构成,碱基序列为:ACAATAAAACAATTATAAATGTCA AATTTGTTTTTTATTAACGATACAAATGG AAATAATAACCATCTCGCAAATAAATAAG TATTTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTGTAA TAAAAAACCTATAAATATTCCGAATTAT TCATACACCCCCACCATC。右重组臂 RA-R 共 155 bp,由多角体 polyA 和 *orf1629* 序列构成,碱基序列为:AACACTATACATTGTTATTAG TACATTTATTAAGCGTTAGATTCTGTGCGT TGTGATTTACAGACAATTGTTGTACGTAT TTTAATAATTCATTAAATTTGTAATCTTT AGGGTGGTATGTTAGAGCGAAAATCAAAT GATTTTCAGCGTCTTT。RA-R 片段能够补全 RD-BmBacmid 上 *orf1629* 缺失的部分,形成能够复制有感染能力的 BmBacmid。即目的基因 PCR 产物(含重组臂)和线性化的 RD-BmBacmid 共转染可直接产生重组病毒(图 1)。

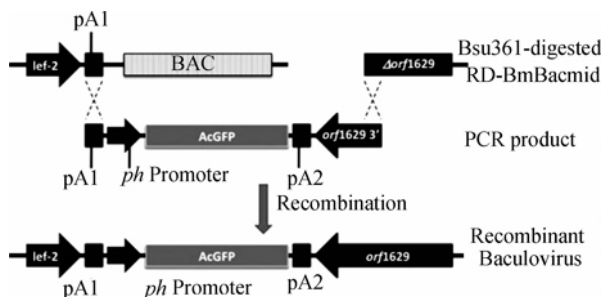


图 1 PCR 产物快速构建重组杆状病毒的原理

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及主要试剂

BmBacmid 和 RD-BmBacmid 由本实验室通过 ZJ-Cubic BmNPV 野生型病毒改造而成。

pAcGFP1-N1 质粒和家蚕卵巢上皮细胞系 BmN 均为本实验室保存;菁松×皓月蚕品种由浙江中奇生物药业股份有限公司提供;一次性注射器购自常州悦康医疗器械有限公司。

PCR 试剂购自 TOYOBO 公司;SF-900 II SFM (1×)无血清培养基、Insect Grace Medium 和胎牛血清(FBS)均购自 Invitrogen 公司;二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司;各种核酸制备试剂盒、

PVDF 膜和转染试剂 X-tremeGENE HP 均购自 Roche 公司;标准核酸 Marker 购自 TaKaRa;Bsu36 I 酶购自 NEB 公司;Western Bright ECL 溶液购自美国 Advanta 公司;蛋白 Marker 购自 Thermo Scientific 公司;抗 GFP 标签兔多克隆抗体和 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体均购自康为世纪生物科技有限公司。引物合成和 DNA 测序分别由苏州金唯智生物技术有限公司和上海桑尼生物有限公司承担。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 线性化 RD-BmBacmid

取 RD-BmBacmid/DH10B 菌株接种 LB 液体培养基(50  $\mu$ g/mL Kan, 25  $\mu$ g/mL Cm) 37℃ 摇床 220 r/min 培养 24 h。试剂盒(Roche 公司 Genopure Plasmid Midi Kit)抽提 RD-BmBacmid 基因组,Bsu36 I (NEB)酶切使之线性化。

#### 1.2.2 PCR 合成 RA-L 和 RA-R 重组臂

根据 BmNPV 基因组序列,设计两对引物,扩增左重组臂 RA-L 的上游引物 RA-LF(ACAATA AAACAATTATAAATGTC)和下游引物 RA-LR (GATGGTGGGGGTGTATGAATAATTC)。扩增右重组臂 RA-R 的上游引物 RA-RF(AACACTA TACATTGTTATTAG)和下游引物 RA-RR (GATGGTGGGGGTGTATGAATAATTCGGAA TATTTATAGG)。以 BmNPV 基因组为模板进行 PCR 扩增。扩增产物经凝胶电泳检测,并回收目的片段。纯化好的 RA-L、RA-R 分别构建到 pUC19 载体上,构建好的重组菌交由上海桑尼生物有限公司进行测序。

#### 1.2.3 PCR 合成含重组臂的 AcGFP(AcGFP-DHA) 片段

根据 AcGFP 基因的完整 ORF 框,设计上游引物 AcGFP-F (GAATTATTCATACACCCCCACC ATCATGTCGTACTACCATCAC)和下游引物 AcGFP-R (CTAATAACAATGTATAGTGTGA ATTCTCACTTGTACAGCTCATCCA)。下划线碱基序列对应与 RA-L、RA-R 同源的部分。以 pAcGFP1-N1 质粒为模板,进行 PCR 扩增,并回收目的片段。以 RA-L、RA-R 和 rAcGFP 为模板,用引物 RA-LF、RA-RR 进行重叠 PCR 扩增得到 AcGFP-DHA DNA 片段(含有重组臂的 PCR 产物,命名为 AcGFP-DHA)。

#### 1.2.4 AcGFP-DHA 和线性化 RD-BmBacmid 共转染 BmN 细胞构建重组病毒及鉴定

取 30 ng AcGFP-DHA 和 300 ng 的线性化

RD-BmBacmid 利用转染试剂 X-tremeGENE HP 共转染 BmN 细胞,线性化 RD-BmBacmid 也利用转染试剂单独转染 BmN 细胞。待共转染的 BmN 细胞开始出现病变后,取 10  $\mu$ L 上清加入至预铺的 BmN 细胞中;每天观察细胞病变情况和荧光情况;待细胞完全病变后,重复上述步骤,再进行一次转接。本实验中构建了缺少多角体基因(*ph*)及其启动子、不含目的基因的重组病毒 KO-*ph*,作为阴性对照。

另外,取共转染上清转接后病变的 BmN 细胞作为样品,同时取转接 KO-*ph* 后病变的 BmN 细胞作为阴性对照样品,进行 Western blotting 分析,检测 GFP 蛋白的表达。

### 1.2.5 AcGFP-DHA 和线性化 RD-BmBacmid 共转染五龄家蚕幼虫及鉴定

AcGFP-DHA 和线性化 RD-BmBacmid 共转染五龄家蚕幼虫,每一头家蚕幼虫接种含有 30 ng AcGFP-DHA DNA,300 ng 线性化的 RD-BmBacmid,3  $\mu$ L 的转染试剂,并补加 SF-900II 培养基至总体积为 50  $\mu$ L 的混合均匀的溶液。共接种 100 头正常五龄家蚕幼虫。作为对照组的家蚕幼虫接种同样体积的混合溶液,该混合溶液里面含有 300 ng 的 KO-*ph* 病毒基因组,3  $\mu$ L 的转染试剂和相应体积的 SF-900II 培养基。每天给家蚕喂适量的桑叶,并观察家蚕感染情况。待家蚕感染后,统计家蚕感染率,并收集蚕血和蚕体。收集好的蚕血,通过 12 000 r/min 离心 15 min 去杂质。取收集的蚕血上清,进行 Western blotting 鉴定。

### 1.2.6 病毒基因组的抽提及 PCR 鉴定

使用 1.2.5 节中的共转染感染的蚕体(剔除消化道和丝线)提取病毒基因组。用液氮充分碾磨蚕体,加入 PBS 溶液(pH 7.4)溶解,装入管中。通过以下三步离心,得到病毒粒子:4 $^{\circ}$ C,4 000 r/min,低速离心 10 min,取上清;4 $^{\circ}$ C,15 000 r/min,高速离心 30 min,取上清;4 $^{\circ}$ C,30 000 r/min,超速离心 1 h,弃上清。用 TE 重悬病毒颗粒沉淀,加 20 mg/mL 的蛋白酶 K 消化后用苯酚、氯仿抽提一次,再用氯仿/异戊醇(24:1)抽提一次;取上清,加入 1/10 体积 3 M NaAc(pH 5.2)及 2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA。以提取的病毒基因组为模板,AcGFP-F、AcGFP-R 为引物,进行 PCR 鉴定,鉴定是否得到重组病毒粒子。

## 2 结果与讨论

### 2.1 结果

#### 2.1.1 RD-BmBacmid 的线性化

利用 Roche 公司基因组提取试剂盒提取 RD-

BmBacmid 病毒基因组,*Bsu*36 I 酶切过夜后,通过 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测,在 23 kb 处、564-2027 bp 之间处有两条目的条带(图 2)。RD-BmBacmid 基因组中有两个 *Bsu*36 I 酶切位点,所以酶切出两条带,较小的条带是 CAT 片段。

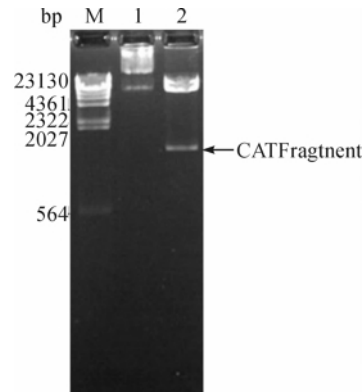
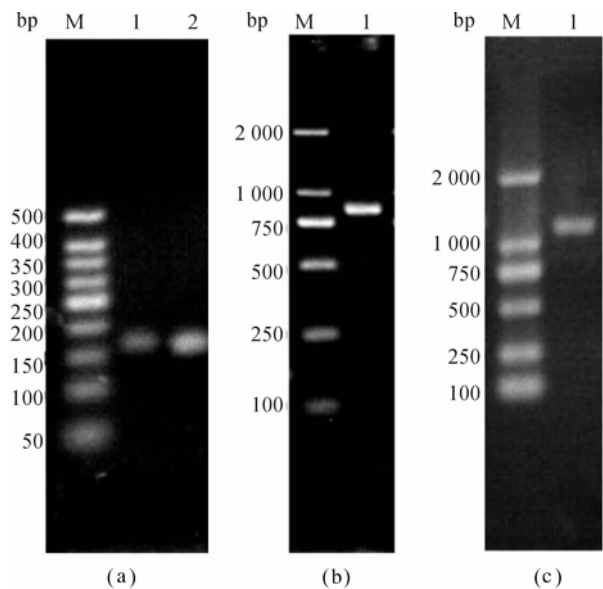


图 2 RD-BmBacmid 的 *Bsu*36 I 酶切鉴定

M:  $\lambda$ -Hind III digest DNA Marker; 1: RD-BmBacmid 基因组;  
2: RD-BmBacmid 的 *Bsu*36 I 酶切

#### 2.1.2 PCR 合成 AcGFP-DHA 片段

以 BmNPV 基因组为模板,PCR 扩增得到 RA-L、RA-R,扩增产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳分离,在 150~200 bp 之间分别有与预期大小(159 bp、155 bp)相符的条带(图 3(a))。同时测序表明 RA-L 和



(a) PCR 扩增 RA-L 和 RA-R DNA 片段

M: AccurateRunTM 50 bp- I DNA Marker;

1: RA-L DNA 片段的 PCR 产物;2: RA-R DNA 片段的 PCR 产物

(b) PCR 扩增 rAcGFP DNA 片段

M: DL2000 DNA Marker; 1: rAcGFP DNA 片段的 PCR 产物

(c) PCR 扩增 AcGFP-DHA DNA 片段

M: DL2000 DNA Marker; 1: AcGFP-DHA DNA 片段的 PCR 产物

图 3 PCR 扩增目的基因

RA-R 与预期序列完全一致。以 pAcGFP1-N1 质粒为模板 PCR 扩增 rAcGFP DNA 片段。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,在 750~1 000 bp 之间处有一条明显的条带,与预期的条带大小相符(图 3(b))。以 RA-L、RA-R、rAcGFP 为模板,用引物 RA-LF、RA-RR 进行重叠 PCR 扩增得到 AcGFP-DHA 片段,经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,在 1 000~2 000 bp 之间处有一条明显的条带,与预期的条带大小相符(图 3(c))。

### 2.1.3 AcGFP-DHA 和线性化 RD-BmBacmid 共转染 BmN 细胞的效果

在转染 BmN 细胞实验结果中,KO-ph 转接感

染 BmN 细胞后,细胞发生病变。线性化 RD-BmBacmid 单独转染没有观察到明显的细胞病变,这是由于复制必需基因 *orf1629* 缺失了部分序列,无法复制产生有感染性的病毒粒子。而 AcGFP-DHA 和线性化 RD-BmBacmid 共转染 BmN 细胞,复制必需基因由于同源重组得到修复,病毒能够复制并感染 BmN 细胞。其共转染上清转接的 BmN 细胞在荧光显微镜下,观察到细胞病变和大量的绿色荧光(图 4),表明产生了重组的杆状病毒,表达了绿色荧光蛋白。

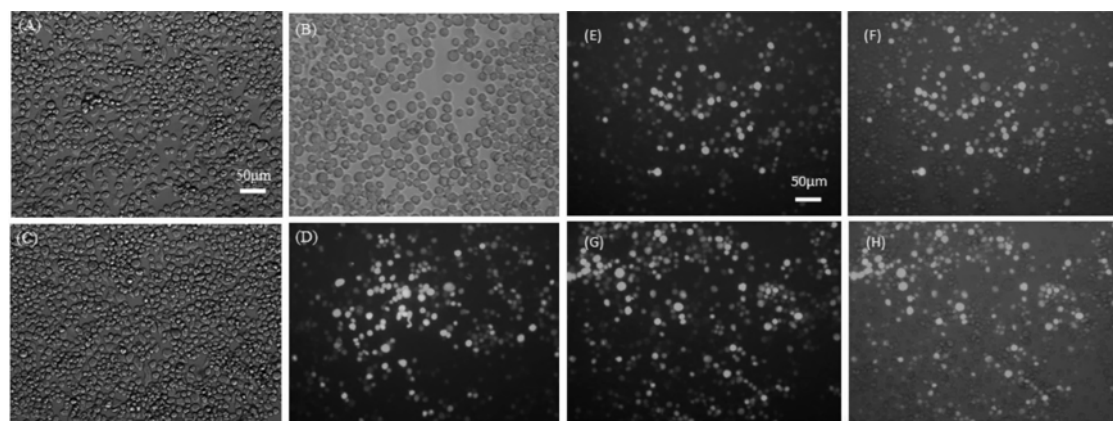


图 4 共转染后的和转接 BmN 细胞显微图

A:正常 BmN 细胞;B:KO-ph 转接 BmN 细胞;C:线性化 RD-BmBacmid 单独转染 BmN 细胞;D:AcGFP-DHA DNA 和线性化 RD-BmBacmid 共转染 BmN 细胞;E、F:AcGFP-DHA DNA 和线性化 RD-BmBacmid 共转染上清转接第一次;G、H:AcGFP-DHA DNA 和线性化 RD-BmBacmid 共转染上清转接第二次;E、G 在暗场视野下拍摄;F、H 半明场视野下拍摄

### 2.1.4 AcGFP-DHA 和线性化的 RD-BmBacmid 共转染家蚕幼虫

将 AcGFP-DHA 和线性化的 RD-BmBacmid 接种家蚕五龄幼虫后,至第 5 d 家蚕开始出现感染迹象,蚕体表开始变绿,直至 6~8 d,家蚕全身都变绿。在转染的 100 头正常家蚕中,感染率达 85%~90%。蚕体呈绿色状态(图 5),表明在家蚕体内表



图 5 感染后的家蚕

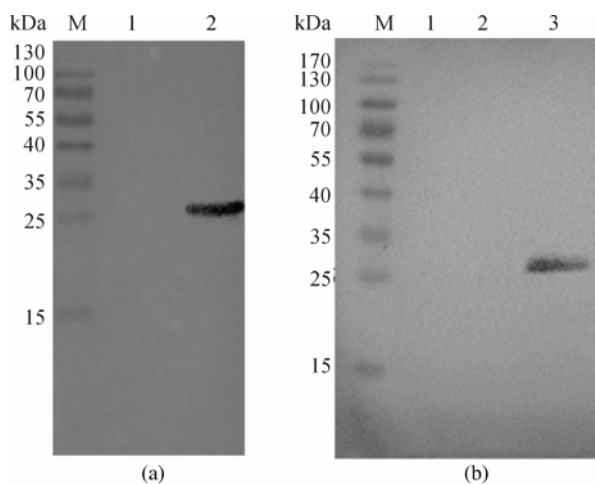
左:未转染家蚕;右:AcGFP-DHA 和线性化的 RD-BmBacmid 转染家蚕(蚕体变绿)

达相应的 GFP 蛋白,同时也证明了 PCR 产物与线性化 RD-BmBacmid 在家蚕幼虫中也能快速复制重组杆状病毒,表达相应蛋白。

### 2.1.5 重组病毒表达 GFP 蛋白的 Western blotting 检测

收集上述共转染的细胞培养上清第 1 轮转接的 BmN 细胞作为样品,以 KO-ph 转接后的细胞作为阴性对样品,利用 GFP 的多克隆抗体通过 Western blotting 来检测重组病毒表达的 GFP。鉴定结果在 PVDF 膜上 25~35 kDa 之间印记出一条特异性条带(图 6(a)),与预期大小相符,表明共转染产生产生了重组病毒,表达相应的 GFP 蛋白。

收集变绿家蚕的蚕血,以正常家蚕和 KO-ph 感染家蚕的蚕血为对照,利用 GFP 的多克隆抗体进行检测,结果在蚕血样品中检测到与重组 GFP 预期大小一致的特异性条带(图 6(b)),表明 AcGFP-DHA 和线性化的 RD-BmBacmid 共转染家蚕五龄幼虫后,重组病毒在其体内复制并表达了绿色荧光蛋白。



(a) 家蚕细胞中重组病毒表达 GFP 蛋白检测  
M: 预染蛋白 Marker; 1: KO-ph 感染 BmN 细胞样品;  
2: 共转染后转接的 BmN 细胞样品。  
(b) 家蚕细胞中重组病毒表达 GFP 蛋白检测  
M: 预染蛋白 Marker; 1: 正常蚕血;  
2: 感染 KO-ph 蚕血; 3: 实验组蚕血

图 6 重组病毒表达 GFP 蛋白检测

## 2.1.6 病毒基因组 PCR 鉴定

以抽提出的病毒基因组为模板, AcGFP-F、AcGFP-R 为引物, 进行 PCR 鉴定, 在 750~1 000 bp 处有与预期大小相符的条带(图 7), 表明经过转染的变绿家蚕体内产生了重组杆状病毒。

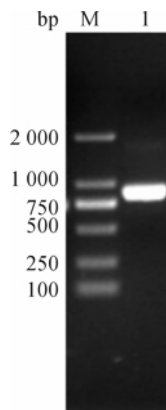


图 7 病毒基因组 PCR 鉴定

## 2.2 讨论

PCR 产物快速构建重组病毒的方法是基于 Red 重组技术和线性化的 BmNPV 基础上来构建的。λ 噬菌体 Red 重组系统能介导同源片段产生同源重组<sup>[10]</sup>, Hou 等<sup>[11-12]</sup> 利用 PCR 扩增片段构建同源重组杆状病毒, PCR 扩增含有 40 bp 同源臂的 Cm 线性化片段, 该线性片段转化含有 HaSNPV 人工染色体(Bacmid)且能表达 λ 噬菌体 Red 重组酶的菌株中, 获得了缺失 *orf135* 并对氯霉素具有抗性的重组转化子。Kitts 等<sup>[13-14]</sup> 在多角体基因座位置

插入一个筛选标记 *lacZ* 基因, 同时引入两个 *Bsu36* I 酶切位点, 分别插入在上游 *orf603* 基因和下游 *orf1629* 基因处。Bsu36 I 酶切病毒基因组之后, 由于 *orf1629* 基因缺失部分序列, 所以无法产生有活力的病毒粒子, 这样能很大程度提高重组病毒的比例, 降低野生型病毒背景, 通过 pBacPAK8 载体和酶切产物共转染的方法, 理论上产生近乎 100% 重组病毒<sup>[13-14]</sup>。基于 Hou<sup>[11-12]</sup> 和 Kitts<sup>[13-14]</sup> 等思路, 提出 PCR 产物快速构建重组杆状病毒的方法。

RD-BmBacmid 单独转染 BmN 细胞时, 由于复制必需基因 *orf1629* 的部分序列的缺失, 转染的细胞无法产生有感染性的病毒, 故细胞结构和形态不会发生明显改变<sup>[8]</sup>。而 AcGFP-DHA 和线性化 RD-BmBacmid 共转染细胞, 由于 RA-R DNA 中有 *orf1629* 部分缺失的片段, 经同源重组得到完整 *orf1629* 基因, 产生有感染性的病毒粒子, 能够使细胞呈现病变状态, 并且在病变细胞中观察到绿色荧光。AcGFP-DHA 和线性化 RD-BmBacmid 共转染五龄家蚕幼虫, 可以观察到蚕体呈绿色状态, 在家蚕体内表达 GFP 蛋白, 同时也证明了 PCR 产物快速构建重组病毒的方法也能应用在家蚕幼虫中。

PCR 产物快速构建重组病毒, 表达外源蛋白, 步骤简单方便, 只需要目的基因 PCR 产物和线性化的 RD-BmBacmid 共转染就可直接产生重组病毒, 该方法方便快捷, 不需要像 Bac-to-Bac 系统构建转移载体和后期筛选鉴定。此方法耗时短, 重组效率高, 无需筛选, 且能快速表达外源蛋白, 为家蚕杆状病毒载体系统应用提供了新的方法。至于该方法的机制有待进一步研究。

## 3 结 论

成功建立了利用 PCR 产物快速构建重组杆状病毒的方法, 该方法只需 PCR 产物与线性化的 RD-BmBacmid 共转染家蚕细胞或幼虫, 即可得到重组杆状病毒。此方法操作简便易行, 耗时短, 重组效率高, 无需筛选, 能够快速表达目的蛋白。

## 参考文献:

- [1] Fernandez J M, Hoeffler J P. Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression[M]. New York: Academic Press, 1998: 331-359.
- [2] Maeda S, Kawai T, Obinata M, et al. Production of human α-interferon in silkworm using a baculovirus vector[J]. Nature, 1985, 315(6020): 592-594.
- [3] Hitchman R B, Possee R D, King L A. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in

- insect cells[J]. Recent Patents on Biotechnology, 2009, 3(1): 46-54.
- [4] 韦永龙, 李轶女, 张志芳, 等. 杆状病毒表达系统及其应用进展[J]. 生物技术通报, 2010, 10: 1-7.
- [5] Wu X, Cao C, Xu Y, et al. Construction of a host range-expanded hybrid baculovirus of BmNPV and AcNPV, and knockout of cysteinase gene for more efficient expression[J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2004, 47(5): 406-415.
- [6] King L A, Possee R D. The Baculovirus Expression System: a Laboratory Guide[M]. London: Chapman & Hall London, 1992: 127-140.
- [7] Wu X, Yang G, Hu J. A recombinant rescue linearizable BmNPV baculovirus BmBacPAK: China, 98110962.2[P]. 1998-07-17.
- [8] 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[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(3): 564-569.
- [9] 费伟强, 陈 琴, 陈 倩, 等. 复制缺陷型 BmNPV 载体的构建及初步应用[J]. 蚕业科学, 2013, 39(3): 0514-0521.
- [10] Costantino N. Enhanced levels of  $\lambda$  Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(26): 15748-15753.
- [11] Hou S, Chen X, Wang H, et al. Efficient method to generate homologous recombinant baculovirus genomes in *E. coli*[J]. Biotechniques, 2002, 32(4): 783-784, 786, 788.
- [12] Hou S, Chen X, Wang H, et al. An efficient method of constructing homologous recombinant baculovirus with PCR-amplified fragments[J]. Sci China C: Life Sci, 2003, 46(4): 431-437.
- [13] Kitts P A, Ayres M D, Possee R D. Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(19): 5667-5672.
- [14] Kitts P A, Possee R. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency[J]. Biotechniques, 1993, 14(5): 810-817.

## A Method of Constructing Recombinant Baculovirus Expressing GFP Protein Based on RD-BmBacmid Carrier

MEI Wen-feng<sup>a,b</sup>, QIAN Yue-zhong<sup>a,b</sup>, SHI Cui-ping<sup>a,b</sup>, CHEN Jian<sup>a,b</sup>

(a. Institute of Biochemistry; b. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Silkworm Bioreactor and Biomedicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** This research intends to establish a method of constructing recombinant baculovirus expressing GFP protein rapidly. Recombinant virus expressing green fluorescent protein can be further obtained by synthesizing green fluorescent protein gene (AcGFP) segment with 50bp homologous arm respectively at both ends and linear RD-BmBacmid co-transfection BmN cell or silkworm larva with PCR method on the basis of copying defective silkworm baculovirus (BmNPV) shuttle vector RD-BmBacmid. The experimental result shows that recombinant baculovirus containing AcGFP gene is established successfully, which respectively expresses green fluorescent protein in BmN cell and silkworm larva. Therefore, this research successfully establishes a new method of rapidly constructing recombinant baculovirus used to express GFP protein.

**Key words:** baculovirus; RD-BmBacmid; PCR; co-transfection; green fluorescent protein (GFP)

(责任编辑: 许惠儿)