

昆虫杆状病毒表达 egfp 载体构建及鉴定

赵清霞¹, 王春红², 钱其军^{1,2}

(1. 浙江理工大学新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;

2. 上海第二军医大学东方肝胆外科医院基因病毒实验室, 上海 200438)

摘要: 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 将目的基因片段 6His-11R-eGFP 从载体 pDC316-6His-11R-eGFP 上酶切下来, 并将该目的基因片段与供体载体 pFastBac1 连接构建供体质粒 pFastBac1-6His-11R-eGFP; 将其转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10Bac 感受态细胞, 经卡那霉素、四环素、庆大霉素及蓝白斑筛选得到重组杆状病毒载体 pBac-6His-11R-eGFP, PCR 鉴定得到单一目的基因条带。将该病毒载体转染 Sf9 细胞, 进行病毒包装, 在倒置荧光显微镜下观察蛋白表达, 并以荧光定量 PCR 方法测定病毒滴度。

关键词: *egfp*; 杆状病毒; Sf9 细胞

中图分类号: Q789

文献标识码: A

0 引言

杆状病毒是一类在自然界中专一性感染节肢动物的 DNA 病毒, 病毒粒子呈杆状, 基因组为双链环状 DNA 分子, DNA 以超螺旋形式压缩包装在杆状衣壳内, 大小在 90~180 kb 之间^[1]。目前杆状病毒作为高效、安全的无公害生物杀虫剂广泛应用于害虫防治。随着分子生物学技术和方法的发展及应用, 杆状病毒在分子水平的基础研究迅猛发展, 自 20 世纪 80 年代开发了杆状病毒作为外源基因的表达载体系统以来, 该技术不断完善并得到了广泛应用, 该系统已在蛋白药物研发、工程疫苗生产和应用于生物杀虫剂上进行了大量的研究。增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, *eGFP*) 作为一种新型的荧光探针^[2], 以其独有的生物学特性为进行活细胞内生物大分子相互作用的实时可视化研究提供了可能。本文构建了增强型绿色荧光蛋白 (*egfp*) 基因的杆状病毒表达载体, 可用荧光显微镜对病毒转染效果进行直观观察, 并且所构建的杆状病毒表达载体中含有纯化标签和穿膜肽表达基因, 为以后细胞实验中蛋白的定位直观观察奠定基础, 从而为后续研究作准备。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种及细胞

E. coli DH5 α 感受态细胞、*egfp* 基因 (本实验室保存); pFastBac1 载体, *E. coli* DH10Bac 感受态细胞, Sf9 细胞均购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 工具酶及试剂

酶 (*EcoR* I、*Sal* I) 购自 NEB 公司; 连接酶 solution I, 细胞转染试剂 (cellfectin reagent) 购自 Invitro-

gen 公司;抗生素(卡那、四环、庆大霉素)购自 Sigma 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 供体质粒 pFastBac1-6His-11R-eGFP 的构建

将目的基因片段 6His-11R-eGFP 用 *EcoR* I、*Sal* I 从载体 pDC316-6His-11R-eGFP 上酶切下来,琼脂糖凝胶电泳后,切胶用 Invitrogen 胶回收试剂盒回收。用 solution I 将目的基因片段与供体载体 pFastBac1 连接构成供体质粒 pFastBac1-6His-11R-eGFP。酶切鉴定正确后待用。

1.2.2 杆状病毒穿梭载体的构建和鉴定

将鉴定正确的 10 μ L 供体质粒载体 pFastBac1-6His-11R-eGFP 加到 100 μ L 大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞中,冰浴 30 min,42℃ 热休克 45 s,再冰浴 1~2min,加入 200 μ L LB(无抗生素),37℃、225 r/min 振荡培养 4 h,用 100 μ L 涂布 LB 平板(含卡那霉素、庆大霉素、四环素、IPTG、X-gal),37℃ 培养 48 h;利用细菌的 *Tn7* 转座子使供体质粒载体同 Bacmid DNA 同源重组,构建重组 *bacmids*,命名为 pBac-6His-11R-eGFP。挑选白色克隆,用含上述 3 种抗生素(卡那霉素、庆大霉素、四环素)的 LB 培养基扩增,提质粒经 PCR 鉴定。鉴定重组片段,引物为 Bac-to-Bac 表达系统说明书上引物,上游引物:5'GTTTTCCTCCAGTCACGAC 3';下游引物:5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'。并鉴定基因片段。

1.2.3 杆状病毒包装

将鉴定正确的重组杆粒 pBac-6His-11R-eGFP 按照 Invitrogen 公司的 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统试剂盒的说明转染 Sf9 细胞,获得重组杆状病毒。简要方法为:将 1~2 μ g 重组 pBac-6His-11R-eGFP 质粒 DNA、6 μ L cellfectin reagent、200 μ L 无添加剂的 Grace's 培养液混匀,室温孵育 15~45 min 后加入 800 μ L 无添加剂的 Grace's 培养液,混匀后加到已培养 Sf9 细胞的六孔板中,27℃ 转染 5 h,换液,将培养液换为 2 mL Sf-900 II SFM 培养液,37℃ 培养 96 h,当细胞出现病毒感染特征(胞体增大、胞质中出现病毒颗粒、细胞脱离孔底面而悬浮)时,取上清至离心管中,2 500 r/min 离 10 min,以去除细胞和大的碎片,此为重组杆状病毒 P1,命名为 Bac-6His-11R-eGFP。以相同的方法将病毒 P1 再次感染 Sf9 细胞,以获得病毒 P2。

1.2.4 定量 PCR 检测病毒滴度

以重组杆状病毒基因组的 *egfp* 基因序列设计 PCR 引物,引物由上海生工公司合成。上游引物 F 为:5' GCAGAAGAACGGCATCAAGG 3';下游引物 R 为:5' CGGACTGGGTGCTCAGGTAG 3'。采用 TOYOBO 公司的 SYBR Green Realtime PCR Master Mix-Plus 试剂盒测定杆状病毒滴度。以 10^{-1} ~ 10^{-5} 系列稀释度的含有 *egfp* 的质粒作为标准模板,用于方法学评价及提供标准曲线。各荧光曲线与基线的交叉点对应的横坐标即为 C_T 值(cycle of threshold),根据标准曲线上浓度与 C_T 值对应的对应关系,可得到所收获的杆状病毒滴度。

2 结果与分析

2.1 重组供体质粒 pFastBac-6His-11R-eGFP 的构建及酶切鉴定

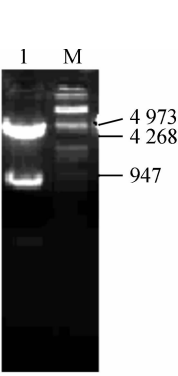
重组后的质粒 pFastBac-6His-11R-eGFP 为 5 561 bp,经 *EcoR* I、*Sal* I 酶切后得到两条条带,分别为 4 760 bp 和 801 bp 的片段,与预期大小一致。琼脂糖凝胶电泳如图 1 所示,结果表明构建正确。

2.2 杆状病毒穿梭载体的鉴定

PCR 扩增重组片段和目的基因片段,分别为片段 3 100 bp 和 750 bp,与预期大小一致。琼脂糖凝胶电泳如图 2 所示,结果表明构建正确。

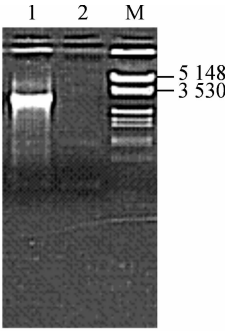
2.3 杆状病毒包装

用构建成功的重组杆粒 pBac-6His-11R-eGFP 转染昆虫细胞 Sf9,包装含有 *egfp* 的杆状病毒 Bac-6His-11R-eGFP。转染 48 h 后胞体增大、胞质中出现病毒颗粒、细胞贴壁不良,在倒置荧光显微镜下观测到绿色荧光,图 3A 为转染 48 h,B 为转染 72 h 荧光图片。收集病毒 P1 再次转染 Sf9 细胞,于 72 h 在倒置荧光显微镜下观察并拍照,如图 3C、D 所示。图 3C、D 为同一视野下的 Sf9 细胞,转染效率较高。

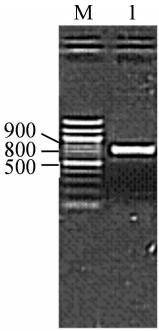


1. 重组质粒,
M. aEcoRI+Hind III Marker

图 1 重组供体质粒的酶切鉴定

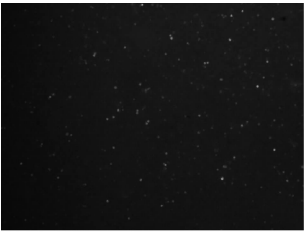


1. 穿梭载体重组片段,
2. 阴性对照,
M. aEcoRI+Hind III Marker

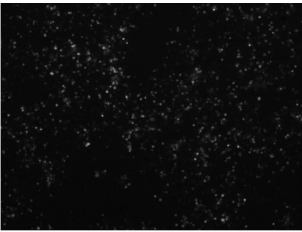


1. 穿梭载体基因片段,
M. loobp DNA Ladder

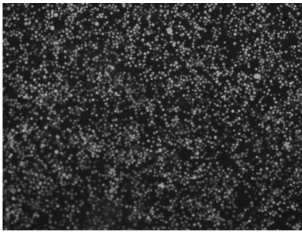
图 2 穿梭载体的 PCR 鉴定



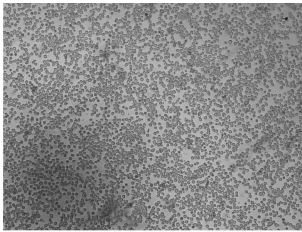
A. 转染Sf9细胞48 h效果



B. 转染Sf9细胞72 h效果



C. 再次转染Sf9细胞72 h效果



D. 再次转染Sf9细胞对照

图 3 杆状病毒转染 Sf9 细胞效果(×40)

2. 4 杆状病毒滴度检测

图 4 为定量 PCR 的标准曲线,其相关系数 R^2 达到 0. 991 3,梯度稀释的标准品的 C_T 值在 10. 83 到 22. 05 之间,Bac-6His-11R-eGFP 的 3 个重复的 C_T 值分别为 18. 29、18. 33 和 18. 26,经计算 P1 杆状病毒实际滴度为 $3. 9 \times 10^6$ vg/mL。

3 讨 论

昆虫杆状病毒作为表达系统与其它表达系统相比具有以下的优越性。

a)安全性:杆状病毒具有高度的种属特异性,不感染哺乳动物^[10,12],其安全性好。b)容量大:杆状病毒呈棒状,可以延伸,故可容纳更大的病毒 DNA 基因组,目前最多的已在同一杆状病毒基因组中插入了 5 个外源基因^[9-11]。c)表达产物活性:昆虫细胞对蛋白质表达后修饰加工的方式与哺乳动物细胞接近,能识别并正确地进行信号肽的切除及磷酸化、糖基化^[1]等反应,表达产物均与天然蛋白相似。d)表达效率高:杆状病毒系统采用极晚期启动子可以高效地表达外源基因,感染后期在细胞中的累积可高达 30%~50%^[12]。正是由于该表达系统所具有的独特优点,目前已有病毒、细菌、真菌、动植物等多种生物基因在昆虫细胞或幼虫体内获得高表达。

GFP 是 Shimomura 于 1962 年首次从多管水母属中分离纯化出的绿色荧光蛋白^[2],在之后的研究中广泛应用^[7-8],使得荧光蛋白技术取得突破性进展,并且 *gfp* 基因的突变得到了不同突变体的蛋白。*gfp* 基因全长 720 bp,编码 238 个氨基酸密码子。*GFP* 分子质量约为 27 kD,能够吸收蓝光(395 nm 处有最大光吸收),发射绿色(或黄绿色)荧光,最大发射波长为 509 nm。*GFP* 荧光特性十分稳定,不易淬灭,对细胞无毒害,不影响细胞的正常生长和功能。*eGFP* 是 *GFP* 经过改造而形成的,是 Leu 取代 *GFP* 中 Phe64, Thr 取代 *GFP* 中 Ser65,使其荧光增强 4~35 倍^[2]。

本文构建了含有纯化标签 His 以及穿膜肽 11R 的融合蛋白杆状病毒表达载体,采用 *egfp* 作为标记基

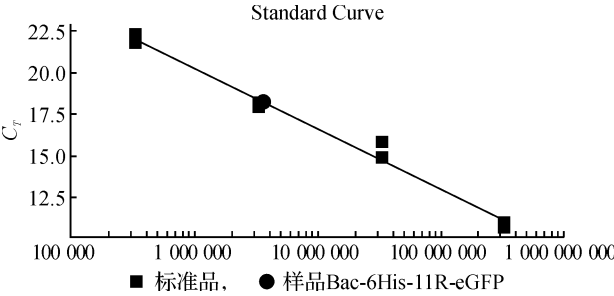


图 4 杆状病毒滴度测定的标准曲线

因,包装病毒感染 Sf9 细胞后在倒置荧光显微镜下观察到明亮的绿色荧光蛋白,离心收集细胞,沉积的细胞呈绿色,表明蛋白已经表达。并采用定量 PCR 方法利用标准品便捷地测定了病毒滴度,为以后蛋白表达中病毒量的确定提供依据。本次试验中的病毒滴度较低,可能与病毒包装及收集时间等因素相关,通过调整病毒包装方法将能提高病毒滴度,以便提高蛋白表达量,从而为后续的实验奠定基础。

参考文献:

[1] 曹传海,任中原. 杆状病毒毒达载体及其应用[J]. 国外医学:病毒学分册, 1995, 2(4): 120-123.

[2] 杨 军,王一理,司履生. 新型 EGFP 标记的杆状病毒转移载体的构建及 EGFP 的制备[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2006, 27(5): 433-436, 459.

[3] 胡兆丽,王文兵,朱 江,等. 杆状病毒转移载体的构建及绿色荧光蛋白在斜纹夜蛾幼虫中的表达[J]. 生物工程学报, 2005, 21(4): 530-533.

[4] 刘高强,章克昌,王晓玲,等. 昆虫杆状病毒表达系统的应用进展[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(7): 40-44.

[5] 朱媛媛,徐慧斌,赵志安,等. 昆虫杆状病毒表达系统表达人载脂蛋白 A-Ⅰ [J]. 生物工程学报, 2003(6): 692-697.

[6] 高琳琳,王晓燕,张颖慧,等. 利用杆状病毒表达载体系统表达重组乙型肝炎病毒核心蛋白[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2007, 36(6): 787-790.

[7] Roessel P V, Brand A H. Imaging into the future-visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins[J]. Nature Cell Biol, 2002(4): 15-20.

[8] Jennifer L S, Patterson G H. Development and use of fluorescent protein markers in living Cells[J]. Science, 2003, 300: 87-91.

[9] Hu Y C. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(4): 405-416.

[10] Huser A, Hofmann C. Baculovirus vectors: novel mammalian cell gene-delivery vehicles and their applications[J]. Am J Pharmacogenomics, 2003, 3(1): 53-63.

[11] 刘小云,杨述华,李康华,等. 杆状病毒作为基因治疗载体的研究进展[J]. 国际病毒学杂志, 2007, 14(4): 111-114.

[12] 谢秋玲,张 玲,洪 岸,等. 杆状病毒表达系统在疫苗研究中的应用[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(3): 367-369.

Construction and Identification of Baculovirus Expression Vector with Enhanced Green Fluorescent Protein (egfp)

ZHAO Qing-xia¹, WANG Chun-hong², QIAN Qi-jun^{1,2}

(1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Laboratory of Gene and Viral Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, The Second Militaty Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract: After 6*His*-11*R-eGFP* gene digested by *Eco*R I/*Sal* I from vector pDC316-6*His*-11*R-eGFP*, it is recombined into donator pFastBac1 with solution I to create a donator plasmid pFastBac1-6*His*-11*R-eGFP*. After *E. coli* DH 10Bac is transformed with the pFastBac1-6*His*-11*R-eGFP* plasmid, a recombinant baculovirus pBac-6*His*-11*R-eGFP* is obtained with the action of *Tn7* transposon and the selection of kanamycin, tetracycline, gentamycin, blue-white selection. Then the 6*His*-11*R-eGFP* gene is amplified by PCR and the result shows it is a single purpose strap. The insect Sf9 cells are infected with the recombinant baculovirus pBac-6*His*-11*R-eGFP* to pack baculovirus, then the authors observe the *eGFP* under inverted fluorescence microscope and assay virus titer using quantitative PCR.

Key words: *egfp*; Baculovirus; Sf9 cells

(责任编辑: 许惠儿)