

甜菜夜蛾核多角体病毒 BAC-TO-BAC 外源基因表达系统的建立

杨 凯* 庞 义

(中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510275)

摘 要 用直接克隆法将 miniF-lacZ-attTn7-kan 片段插入甜菜夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus, SeMNPV) 美国分离株 (SeUS1) 基因组的多角体蛋白基因框内, miniF 是大肠杆菌 F 因子复制子, 携带 miniF 的重组病毒能够在大肠杆菌中低拷贝稳定复制, 称为 bacmid。由于 SeUS1 由不同的 SeMNPV 基因型组成, 每个 bacmid 携带了一种病毒基因型, 所有 bacmid 构成了 SeUS1 分离株的 BAC 文库。REN 对 111 个 bacmid 分析表明, SeUS1 分离株中除了包含具有完整 SeMNPV 遗传信息的基因型外, 还包括不同类型的缺失基因型。将具有完整 SeMNPV 基因型的基因型 SeBAC10 转染昆虫细胞, 可产生子代病毒, 故 SeBAC10 是一种在真核细胞和原核细胞中均能复制的穿梭质粒。因为 SeBAC10 中多角体蛋白基因 (*Seph*) 被插入失活, 将 *Seph* 作为报告基因通过位点特异性重组方式插入位于 *LacZ* 框内转座子 Tn7 的附着靶位点 attTn7, 得到重组 SeBAC10 (即 SeBAC10ph) 转染甜菜夜蛾培养细胞 Se301 后, 细胞出现典型的病理变化, 核中出现多角体, 证明 SeMNPV BAC-TO-BAC 外源基因表达载体系统构建成功。

关键词 甜菜夜蛾核多角体病毒, BAC 文库, BAC-TO-BAC 外源基因表达系统, 位点特异性重组, 多角体蛋白基因
中图分类号 Q784 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0412-07

甜菜夜蛾食性杂, 以前是次要害虫, 随着广谱杀虫剂的大量施用和滥用, 其天敌数量逐渐减少, 甜菜夜蛾对许多农药产生了抗性, 其种群规模逐渐扩大, 危害加重, 已成为一种重要的农业害虫^[1]。甜菜夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus, SeMNPV) 能够在甜菜夜蛾种群中引起病毒性流行病, 是调节甜菜夜蛾种群密度的重要因子, 现已开发成一种非常有效的生物杀虫剂, 在美国和荷兰注册^[2]。

SeMNPV 属于杆状病毒科。杆状病毒是一类有囊膜的节肢动物病毒, 基因组为一个 80 ~ 180 kb 的双链、环状、超螺旋的 DNA 分子^[3]。杆状病毒在应用上的缺点是杀虫所需时间较长, 一般需要 5d 左右, 且杀虫谱较窄。人们希望通过遗传改造, 提高杀虫效力, 扩大杀虫范围。1999 年, SeMNPV 基因组的全序列分析完成^[4], 其功能基因组研究需要一个方便的操作平台, BAC-TO-BAC 外源基因表达系统是一个很好的选择。

Luckow 等 (1993) 报道了杆状病毒原型病毒-苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica*

mucopolysaccharide nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) BAC-TO-BAC 外源基因表达系统的构建^[5]。本文介绍通过简单的直接克隆法, 取代繁琐的同源重组方式成功构建 SeMNPV 的 BAC-TO-BAC 外源基因表达系统的过程。在 SeMNPV 基因组中引入大肠杆菌 F 因子复制子 (miniF), 使病毒成为一个类似细菌人工染色体 (Bacteria Artificial Chromosome, BAC) 的质粒 bacmid, 它携带了 SeMNPV 基因组, 可感染宿主细胞并产生子代病毒, 又可在 *E. coli* 中低拷贝数稳定复制, 所以是一个穿梭质粒。同时, 还将卡那霉素抗性基因 (Kanamycin, *kan*) 和 *LacZ* 插入病毒基因组, 在 *LacZ* 读码框内又插入 Tn7 转座子靶位点 attTn7, 在转座酶的辅助下, 外源基因可通过位点特异性重组方式插入 attTn7, 并导致 *LacZ* 的插入失活, 以利于重组子的筛选。重组 bacmid 转染昆虫细胞后可产生子代病毒粒子, 并且外源基因也能够表达。该系统称为 BAC-TO-BAC 外源基因表达系统, 意思是从细菌 (Bacterium) 到杆状病毒 (Baculovirus) 的外源基因表达系统。利用该系统既可在真核细胞中表达外源基因, 又可在原核细菌中利用 ET 重组技术^[6], 在 SeM-

收稿日期 2003-01-13, 修回日期 2003-04-28。

基金项目 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (No. G2000016209), 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (No. 2001AA214031-2)。

* 通讯作者。 Tel: 86-20-84113948; Fax: 86-20-84037472; E-mail: yk67717@hotmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

NPV 基因组中任意插入或缺失目的基因。

1 材料和方法

1.1 材料

甜菜夜蛾核多角体病毒 US1 株(SeUS1)^[7]由美国 California University, Riverside 分校的 Dr. Federici B A 惠赠。甜菜夜蛾细胞系 Se301^[8]由日本的 Dr. Kawarabata 惠赠。细胞维持于添加了 10% 胎牛血清的 Grace's 培养基中,培养温度为 28℃,每 3~4d 传代 1 次。大肠杆菌 DH10B 购自 Gibco 公司。

除了 *SanD I* 购自 Stratagene 公司,各种限制酶为 Gibco BRL 公司产品;T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品;耐高温磷酸酯酶 HK Thermolabile Phosphatase 购自 Epicentre 公司;脂质体 cellfectin 购自 Gibco BRL。质粒纯化试剂盒 JETSTAR Plasmid Mini-prep Kit 为 GENOMED 公司产品。Oligo 引物由 Gibco BRL 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细菌、质粒和病毒 大肠杆菌的培养、感受态细胞的制备、质粒的电激转化、扩增、DNA 碱法小量提取、检测、重组质粒的筛选、菌种的保存参照 Sambrook 等^[9]。目的 DNA 片段的回收,小量质粒纯化和中量质粒纯化按试剂盒提供的操作说明书完成。SeUS1 在 4 龄的甜菜夜蛾幼虫中增殖,病毒纯化和 DNA 的抽提按 Muñoz 等^[10]的描述。

1.2.2 直接克隆法构建 SeMNPV bacmid 含有 mini-F-lacZ-attTn7-Kan 片段的 Bacmid 克隆载体 BAC-Bsu361 的构建见 Pijlman 等^[11]。计算机分析 SeMNPV 基因组序列^[4]发现在其多角体基因框内有一个单酶切位点 *SanD I*。将 SeUS1 DNA 和 BAC-Bsu361 用 *SanD I* 酶切后,按 Sambrook 等^[9]的描述常规方法将两者连接,电激转化 DH10B 感受态细胞,复苏,kan 筛选(图 1)。

1.2.3 小量制备 Bacmid DNA 将含有 bacmid 的单菌落接种于含合适抗生素的 10 mL 液体培养基中,250 r/min,37℃ 振荡培养 24 h。离心收集细菌,加入 300 μL 预冷的 GTE 溶液(15 mmol/L Tris-HCl, pH8.0;10mmol/L EDTA;100 μg/mL RNase A),并悬浮菌体,室温 10 min;加 600 μL 溶液 II(0.2 mol/L NaOH;1% SDS)剧烈振荡后室温静置 5 min,缓慢滴加 450 μL 溶液 III(3 mol/L KAc, pH5.5),倒转离心管几次,冰浴 5 min。12000 r/min 离心 10 min,取上清,加入 0.6 倍的冰异丙醇,混匀后冰浴 10 min。12000 r/min 离心 15 min,70% 乙醇洗涤 1 次,离心,室温干

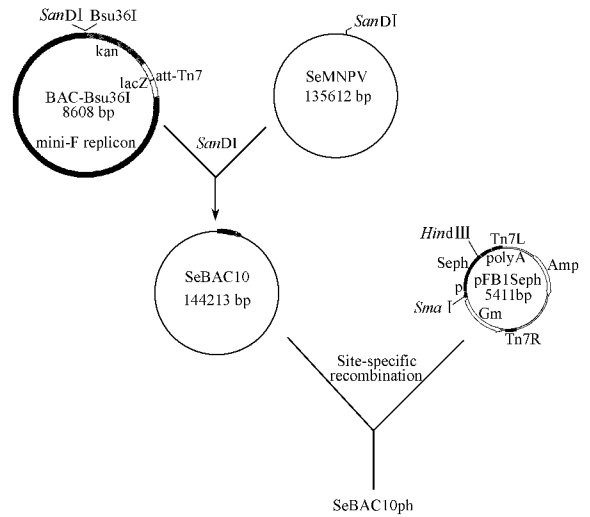


图 1 SeMNPV BAC-TO-BAC 表达系统构建流程图

Fig.1 Flow chart for construction of SeMNPV BAC-TO-BAC expression system

燥 DNA 沉淀,溶于 20 μL TE, -20℃ 冻存。

1.2.4 位点特异性重组 将 SeMNPV 多角体蛋白基因重新插入 SeMNPV:可为 SeMNPV BAC-TO-BAC 外源基因表达系统提供 SeMNPV *ph* 基因的供体质粒 pFB1Seph 的构建见文献[11]。参照 AcMNPV BAC-TO-BAC 外源基因表达系统操作手册,制备 DH10β (包含可提供转座酶的辅助质粒 pMON7124)感受态细胞。1 ng 的重组质粒 pFB1Seph(在 5 μL TE 中)热激转化 DH10β 感受态细胞,加 900 μL SOC 培养基,37℃ 剧烈振荡(225 r/min) 4 h。用 SOC 培养基 10 倍系列稀释培养物。并分别取 100 μL 与 IPTG 和 X-gal 等混合,涂布于含三抗 LB 平板筛选(50 mg/L 卡那霉素,7 mg/L 庆大霉素,10 mg/L 四环素),24 h 后挑取白色菌落。PCR 法鉴定质粒是否插入(图 1)。

1.2.5 Bacmid DNA 转染培养细胞 将 2×10^6 个 Se301 细胞接种于 35 mm 的细胞培养皿中,27℃ 贴壁 1 h。制备溶液 A 和 B:溶液 A,5 μL Bacmid DNA 加入 100 μL 无血清培养基中,溶液 B,6 μL cellfectin 加入 100 μL 无血清培养基中。混合溶液 A 和 B,室温静置 30 min。细胞用不含血清及抗生素的 Grace's 培养基洗 2 次。混合液加 800 μL 不含血清及抗生素的 Grace's 培养基后,逐滴缓慢加入细胞中。27℃ 培养 5 h 后,吸去培养基,加 2 mL 含血清和抗生素的 Grace's 培养基,27℃ 培养 72 h。收集病毒的上清液,4℃ 保存备用。

2 结果

点

DNAS^{tar} 软件分析已测序的 SeMNPV 全基因组^[4] 发现在 SeMNPV nt 187 存在一个 *SanD* I 的单酶切位点。该位点位于 SeMNPV *Bgl* II C 片段的多角体蛋白基因读码框内。将 SeMNPV 的基因组用 *Bgl* II 和 *SanD* I 双酶切, 19 kb 的 SeMNPV *Bgl* II C 片段被分为 12.5 kb 和 6.5 kb 两个片段, 而其它的 SeMNPV *Bgl* II 片段没有变化。该实验证明了 SeMNPV 基因组中 *SanD* I 的单酶切位点的存在(图 2)。

2.2 SeUS1 BAC 文库的建立及具全长 SeMNPV 基因组的 SeBAC 的筛选

直接克隆法将 mini-F-lacZ-attTn7-Kan 片段连接入 SeMNPV 基因组中, 电转化 DH10B 细胞, kan 筛选得到 111 个克隆子。Pst I 对这些克隆子的初步鉴定, 它们的遗传成分有很大的差异, 说明 SeUS1 是由不同基因型组成的混合体。根据 SeUS1 DNA 经 Pst I 酶切后片段缺失的程度不同, 选择了 10 株克隆子, 其中基本没有缺失的 3 株, 缺失 1~2 个片段的 2 株, 缺失 3~5 个片段的 2 株, 缺失 5 个以上片段的 3 株, 用不同的限制酶对它们进行更为细致的 REN 分析(图 3)。

用 DNAS^{tar} EditSeq 软件将 SeMNPV 全基因组和 8.6 kb mini-F-lacZ-attTn7-Kan 片段的核苷酸序列结合, 得到 SeMNPV bacmid(SeBAC)的核苷酸序列。然后用 MapDraw 软件分析 SeMNPV 和 SeBAC 的不同限制酶的酶切位点, 得到不同的酶切片段, 比较结果如表 1:

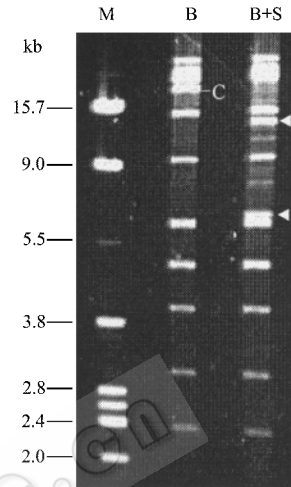


图 2 SeUS1 DNA 用 *Bgl* II, *Bgl* II 加 *SanD* I 酶切产物电泳图
Fig. 2 Restriction profile of SeUS1 DNA digested with *Bgl* II (B) (*Bgl* II and *SanD* I (S) lane 3). Digested λ DNA (M, lane 1) served as size standard. The genomic *Bgl* II C fragment digested into two fragment (arrows) by *SanD* I

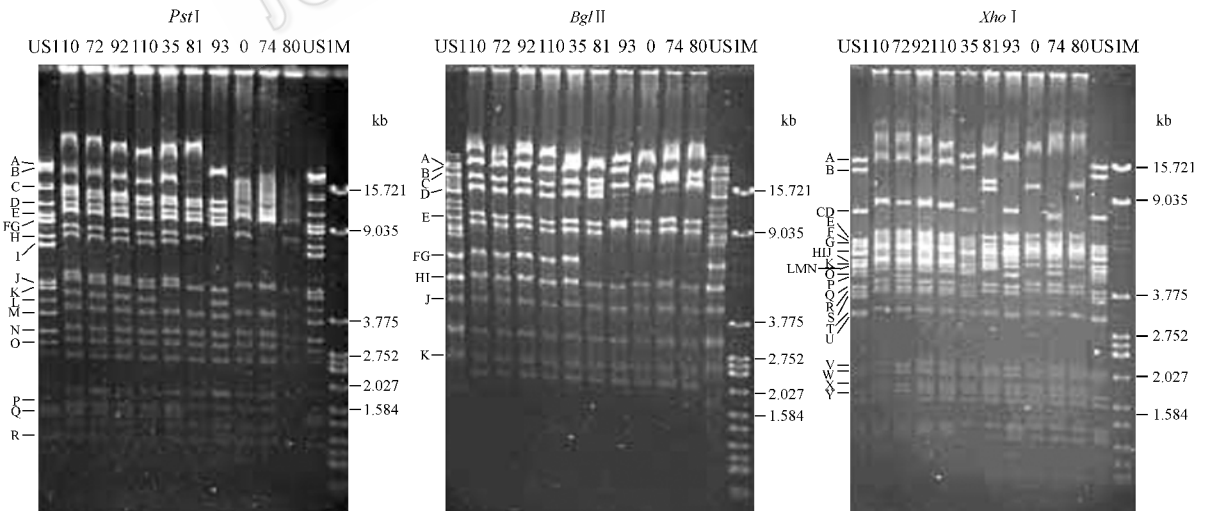


图 3 10 株 SeBac 克隆子的 Pst I, Bgl II 和 Xho I 的酶切电泳图

Fig. 3 Pst I, Bgl II and Xho I restriction profiles of 10 SeBAC clones

Lane M is a λ DNA size marker (digested with *Bam*H I, *Eco*R I and *Hind* III). Letters at the left indicate the corresponding restriction endonuclease fragments of SeUS1. The sizes of some fragments are shown at the right

表 1 SeMNPV 和 SeBAC 的不同限制酶酶切结果比较
Table 1 Comparison of SeMNPV and SeBAC with different RE

<i>Pst</i> III			<i>Pst</i> I			<i>Pst</i> II		
SeBac	SeMNPV	Fragment	SeBac	SeMNPV	Fragment	SeBac	SeMNPV	Fragment
21396	21396	A	36785	36785	A	15580	15580	A
	20361	B	22912	22912	B	12891	12891	B
13745	13745	C		19008	C	7447	7447	C
11007	11007	D	17003			7393	7393	D
10396				9419	E	5477	5477	F
9476	9476	E	8539			5307	5307	G
8998	8998	F		6279	F	5121	5121	H
8787	8787	G	6143	6143	G	5019	5019	I
7637	7637	H	5082	5082	H	4998	4998	J
7017	7017	I	4884	4884	I	4924		
4866	4866	J	4094	4094	J	4747	4747	K
4676	4676	K	3070	3070	K	4574	4574	L
4153	4153	L	2389	2389	L	4568	4568	M
3607	3607	M	2067			4523	4523	N
3159	3159	N	439	439	M	4466		
2838	2838	O	366	366	N	4373	4373	O
2477			228	228	O	4224	4224	P
1775			181	181	P	4135	4135	Q
1541			120	120	Q	3699	3699	R
1467	1467	P	100	100	R	3575	3575	S
1389	1389	Q	91	91	S		3163	T
1240			88	88	T	3024	3024	U
1033	1033	R				2077	2077	V
398						1975	1975	W
337						1779		
16						1708	1708	X
						1599	1599	Y
						1293	1293	Z
						1254	1254	
						1215	1215	
						1165	1165	
						984	984	
						803	803	
						794	794	
						719	719	
						595		
						286	286	

The sequences of SeMNPV whole genome and the 8.6 kb mini-F-lacZ-attTn7-Kan fragment are combined by DNASTar EditSeq. RE sites are analyzed by DNASTar MapDraw.

分析 *Pst*I, *Bgl*II和 *Xho*I的酶切图(图3)对照表1不同 SeBAC 中病毒基因组的缺失情况如(图4):

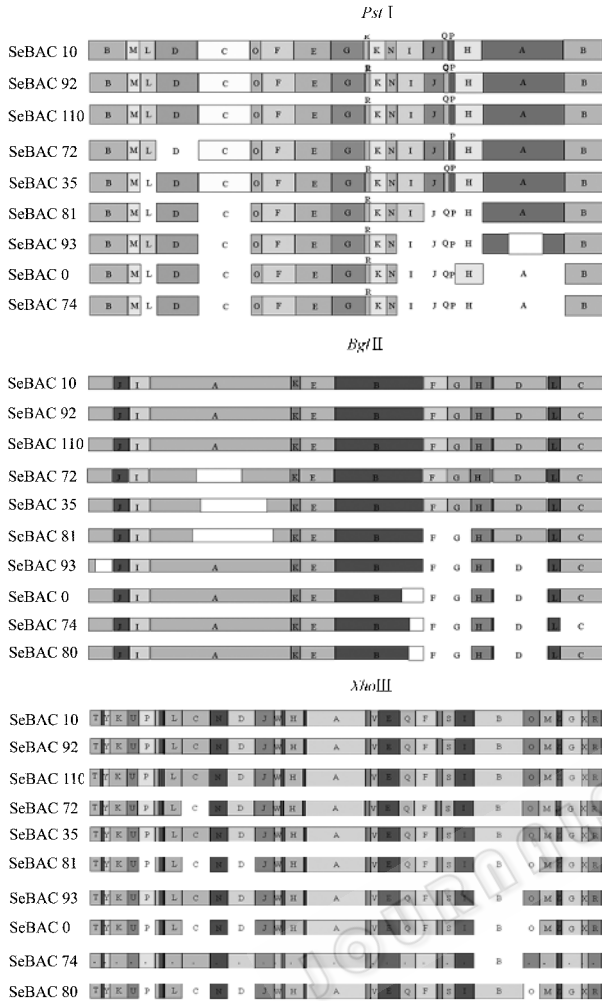


图4 10株 SeBAC 克隆子的基因组结构简图

Fig. 4 Simplified organizational maps of 10 SeBAC clones for *Pst* I, *Bgl* II and *Xho* I.

The letters in boxes indicate the corresponding fragments of SeMNPV digested with the same RE. Areas where are blank indicated the deletion fragments

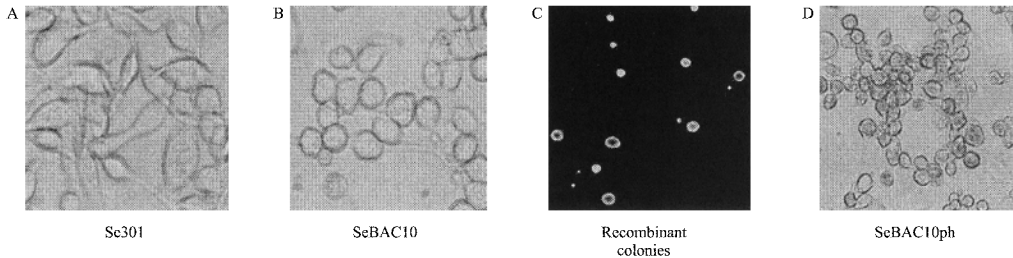


图5 SeMNPV BAC-TO-BAC 表达系统的构建

Fig. 5 Construction of SeMNPV BAC-TO-BAC expression system

(A) Se301 mock cells ;(B) Se301 cells were transfected with SeBAC10 (10 d. p. i.);(C) Transformation of pFB1Seph into DH10β. The white colonies contain recombinant SeBAC10 in which SeMNPV polyhedrin gene has been reintroduced into SeMNPV by site-specific transposon-mediated recombination. (D) Se301 cells were transfected with SeBAC10 (10 d. p. i.) and polyhedra were observed in infected cells

综合不同 SeBAC 的 *Pst* I, *Bgl* II 和 *Xho* I 物理图谱, SeBAC10, SeBAC92, SeBAC110 包含 SeMNPV 完整基因组, SeBAC72, SeBAC35 可能缺少 10% 以下的 SeMNPV 基因组序列, SeBAC81, SeBAC93 可能缺少 10% ~ 20% 的 SeMNPV 基因组序列, SeBAC0, SeBAC74, SeBAC80 可能缺少 20% 以上的 SeMNPV 基因组序列。

2.3 SeMNPV BAC-TO-BAC 外源基因表达系统

为了验证 SeMNPV BAC-TO-BAC 外源基因表达系统是否构建成功,我们拟用该系统表达一种外源基因。由于在 SeMNPV 的多角体蛋白基因(*ph*)的框内插入了 8.6 kb mini-F-lacZ-attTn7-Kan 片段,所以 SeBAC 中的 *ph* 已被插入失活,用 SeBAC DNA 转染 Se301 细胞后病毒不会产生多角体(图 5B)。如果将 SeMNPV *ph* 用 SeMNPV BAC-TO-BAC 外源基因表达系统表达,那么用重组的 SeBAC 转染 Se301 细胞后,感染细胞中就会出现多角体(图 5D)。

制备含 SeBAC10 的 DH10B 的感受态细胞,将可提供转座酶的辅助质粒 pMON7124 转化入细胞中,得到 DH10β 细胞。将 pFB1Seph 转化入 DH10β 细胞, pFB1Seph 中的 SeMNPV *ph* 基因以及 Tn7 的左右臂,在辅助质粒 pMON7124 提供的转座酶的作用下,通过位点特异性重组,整合入 8.6 kb 片段的 mini-attTn7 转座靶位点,同时 SeBAC10 中 *lacZ* 被插入失活,包含重组 SeBAC10 的菌落呈白色(图 5C)。将重组 SeBAC10 命名为 SeBAC10_{ph}。PCR 检测,初步证实 SeMNPV 多角体蛋白基因已插入目标位点(图片未显示)。SeBAC10_{ph} 转染 Se301 细胞,数天后,细胞中可见多角体,证明 SeMNPV BAC-TO-BAC 系统构建成功,而对照是未重组的 SeBAC10,转染 Se301 细胞数天后,虽有典型的细胞病理反应,但未有多角体出现(图 5B)。

3 讨论

3.1 SeMNPV BAC-TO-BAC 外源基因表达系统

杆状病毒表达载体系统(Baculovirus expression vector system, BEVS)可在真核昆虫细胞中高效表达外源蛋白,已广泛地应用于生命科学不同领域的基础与应用研究中,并在疫苗、治疗制剂和诊断试剂的工业化生产中呈现出诱人的前景^[12]。BEVS 的本质是重组的杆状病毒,一般通过同源重组的方法将外源基因插入到杆状病毒基因组多角体蛋白基因启动子下游。这种方法较为繁琐,特别是重组病毒不易分离纯化。于是人们积极尝试用简单的方法构建重组杆状病毒^[12]。近来,在鉴定与纯化重组杆状病毒的替代方法上,许多研究者进行了探索,取得了一定的进展。如重组病毒表达色原基质的酶类、斑点杂交法、空斑原位杂交、胸腺核苷激酶基因法和 PCR 检测等。构建重组杆状病毒的新策略也层出不穷,如线性化操作^[13,14]、转座子介导^[5]、体外酶促重组^[15]、酵母 YAC 介导的重组^[16]和直接克隆法^[17]等,其中转座子介导法因其简易和快速已广泛地应用于杆状病毒表达载体的构建。

由于没有合适的细胞系,至今还未有构建含全长 SeMNPV 基因组的重组 SeMNPV 的报道。本文采用直接克隆法构建了 SeMNPV BAC-TO-BAC 外源基因表达载体系统,通过位点特异性重组方式将已在构建该系统时插入失活的报告基因 *Seph* 重新引入 SeMNPV 基因组中得到表达,证明该系统构建成功。该系统的本质是一个穿梭质粒,所以细菌学中的很多成熟的技术能够运用于该系统。位点特异性重组方式将外源基因引入系统后,通过蓝白斑筛选,从单菌落中提取的 bacmid 就是基因型均一的重组病毒,使构建 SeMNPV 外源基因表达载体所需时间由常规方法的两个月缩短为 7~10d。另外,通过细菌中的 RecE/RecT 重组蛋白介导的同源重组作用,可以对该系统进行修饰,如任意缺失目的基因,或对目的基因点突变。所以该载体的构建成功对 1999 年 SeMNPV 全基因组序列测定和分析完成后而展开的功能基因组学研究提供了一个基因组操作平台。

3.2 SeMNPV BAC 文库

杆状病毒田间分离株常常是由不同基因型组成,一般以一定比例存在于宿主昆虫体内^[18]。对杆状病毒基因组异质性的研究能够加深我们对病毒的毒力、进化、微生态等方面的认识。SeUS1 田间分离株也是由不同基因型组成的混合株,本文中

miniF-lacZ-attTn7-Kan 片段插入出发病毒 SeUS1 基因组中,具有多角体蛋白基因的各个基因型变为相应的 bacmid,这就构成 SeUS1 的 BAC 文库。REN 分析表明,SeUS1 中不同基因型所拥有的遗传信息差别很大,有些具有完整的序列,而有些基因型的 bacmid,如 SeBAC81, SeBAC93, SeBAC0, SeBAC74, SeBAC80,不能转染 Se301 细胞,这些缺损型病毒存在于田间分离株的生物学意义有待深入研究。

致谢:感谢荷兰 Wageningen 大学及研究中心病毒学实验室 Just M Vlak 教授和 Gorben Pijlman 在研究工作中给予的帮助。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Moscardi F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Ann Rev Entomol*, 1999, **44**: 257-289
- [2] Smits P H, Vlak J M. Biological activity of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrosis virus against *S. exigua* larvae. *J Invertebr Pathol*, 1988, **51**: 107-114
- [3] Van Regenmortel M H V, Fauquet C M, Bishop D H L *et al.* eds. *Virus Taxonomy*, Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses, New York, Academic Press, 2000, pp. 1-1162
- [4] Ijkel W F, van Strien E A, Heldens J G *et al.* Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol*, 1999, **80** (Pt 12): 3289-3304
- [5] Luckow V A, Lee S C, Barry G F, Olins P O. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol*, 1993, **67** (8): 4566-4579
- [6] Muylers J P, Zhang Y, Testa G, Stewart A F. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27** (6): 1555-1557
- [7] Gelernter W D, Federici B A. Isolation, identification, and determination of virulence of a nuclear polyhedrosis virus from the Beet Armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ Entomol*, 1986, **15**: 240-245
- [8] Hara K, Funakoshi M, Kawarabata T. *In vivo* and *in vitro* characterization of several isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Acta. Virol*, 1995, **39**: 215-222
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [10] Muñoz D, Castillejo J I, Caballero P. Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population of *Spodoptera exigua*. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 4372-4377
- [11] PANG Y (庞义), HU Z H (胡志红), YANG K (杨凯). Recombinant Baculovirus. In Huang DF, Lin M eds. *Genetic Engineering of*

- 315
- [12] Kitts P A , Possee R D . A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques* , 1993 , **14** (5) 810 – 817
- [13] Kitts P A , Ayres M D , Possee R D . Linearization of baculovirus DNA enhances the recovery of recombinant virus expression vectors. *Nucleic Acids Res* , 1990 , **18** (19) :5667 – 5672
- [14] Peakman T C , Harris R A , Gewert D R . Highly efficient generation of recombinant baculoviruses by enzymatically mediated site-specific *in vitro* recombination. *Nucleic Acids Res* , 1992 , **20** (3) :495 – 500
- [15] Patel G , Nasmyth K , Jones N . A new method for the isolation of recombinant baculovirus. *Nucleic Acids Res* , 1992 , **20** (1) :97 – 104
- [16] Ernst WJ , Grabherr RM , Katinger HW . Direct cloning into the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus for generation of recombinant baculoviruses. *Nucleic Acids Res* , 1994 , **22** (14) :2855 – 2856
- [17] Weitzman M D , Possee R D , King L A . Characterization of two variants of *Panolis flammea* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol* , 1992 , **73** :1881 – 1886

Establishment of *Spodoptera exigua* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus BAC-TO-BAC Expression System

YANG Kai* PANG Yi

(State Key Laboratory for Biocontrol , Sun Yet-sen University , Guangzhou 510275 , China)

Abstract Present studies describe the successful establishment of *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) BAC-TO-BAC expression system. The mini-F-lacZ-attTn7-kan fragment (Luckow *et al* , 1993) was inserted into SeMNPV US1 isolate (SeUS1) at polyhedrin gene locus by directly cloning. The recombinant virus containing low-copy-number mini-F replication , which named bacmid , can propagate in *Escherichia coli* . Because SeUS1 isolate is make up of several genotypes and one bacmid carries one SeMNPV genotype , the SeUS1 BAC library is established by all SeMNPV bacmids (SeBAC). REN analysis for 111 SeBAC shows that SeUS1 consists of the genotype with whole SeMNPV genetic information and several genotypes with various different deletions. Progeny virus can be produced in insect cell line after transfection with SeBAC10 , which carries the whole SeMNPV genome. So SeBAC10 is a shuttle vector that can replicate in eukaryocyte as well as prokaryocyte. Considering the insert mutation of SeMNPV polyhedrin gene (*Seph*) in SeBAC10 , *Seph* was reintroduced into the bacmid by site-specific transposon-mediated insertion at attTn7 , the target site for the bacterial transposon Tn7. The derived recombinant SeBAC10 was named SeBAC10ph. After SeBAC10ph was transfected into Se301 cells (a susceptible insect cell line to SeMNPV) , cytopathogenic effect was shown and polyhedra appeared , which indicate that the foreign gene (*Seph*) is expressed.

Key words SeMNPV , BAC library , BAC-TO-BAC expression system , site-specific transposon-mediated recombination , polyhedrin

Received : 01-13-2003

This work was supported by Grant from the Special Funds for Major State Basic Research (973 Program) of China (No. G2000016209) , National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2001AA214031-2) .

* Corresponding author. Tel : 86-20-84113948 ; Fax : 86-20-84037472 ; E-mail : yk67747@hotmail.com

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>