

利用 Red 系统快速敲除家蚕核型多角体病毒 *orf60* 基因 Rapid Disruption of *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus *orf60* by Red Recombination System

王 强 郭忠建 姚 勤 王海燕 陈克平*

WANG Qiang, GUO Zhong-Jian, YAO Qin, WANG Hai-Yan and CHEN Ke-Ping*

江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013

Institute of Life Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

摘 要 用 Red 重组系统和最近构建的家蚕核型多角体病毒 (BmNPV) bacmid 在大肠杆菌 BW25113 中快速地敲除 BmNPV *orf60* 基因。从大肠杆菌 BmDH10Bac 中提取 BmNPV bacmid, 将其电转化到含有质粒 pKD46 (能表达 Red 重组酶) 的大肠杆菌菌株 BW25113 中, 获得了可用于 BmNPV 基因打靶的菌株 BW25113-Bac。设计一对长 63bp 的引物 (5' 端为 *orf60* 基因的左右同源臂, 长 45bp, 3' 端长 18bp, 为氯霉素抗性基因 (*cat*) 的首尾序列), 以 pKD3 质粒 (含 *cat*) 为模板, PCR 扩增携带 *orf60* 左右同源臂的 *cat* 即打靶线性化片段。将该线性化片段电转入 BW25113-Bac 菌株, 在 Red 重组酶的作用下, 线性化片段与 BmNPV bacmid 中的 *orf60* 基因发生同源重组。设计 3 对特异引物, 用 PCR 方法证明 *cat* 成功地替换了 BmNPV *orf60* 基因。重组 bacmid DNA 转染 BmN 细胞后, Western blot 分析未检测到 *orf60* 基因的表达。

关键词 Red 重组系统, *orf60*, 基因敲除

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0801-05

Abstract BmNPV bacmid constructed recently and Red recombinant system were used to rapidly disrupted *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) *orf60* in *Escherichia coli* (*E. coli*) BW25113. BmNPV bacmid isolated from *E. coli* BmDH10Bac was electroporated into *E. coli* BW25113, which harbors plasmid pKD46 encoding λ Red recombinase, to produce *E. coli* BW25113-Bac, which could be used for gene deletion of BmNPV. A linear fragment was amplified by PCR from plasmid pKD3 (containing a chloramphenicol acetyltransferase gene *cat*) using a pair of primers with length of 63bp, which had 45 bp homologous to the *orf60* gene and 18bp homologous to *cat* sequences. The linear fragment was electroporated into *E. coli* BW25113-Bac and homologous recombination occurred between the linear fragment and *orf60* with the help of λ Red recombinase. Three specific primer pairs were used to confirm the replacement of *orf60* by *cat* gene. Western blot analysis showed that *orf60* was not expressed in BmN cells infected with knockout bacmid.

Key words λ Red recombination system, *orf60*, gene disruption

杆状病毒 (baculovirus) 是已知昆虫病毒中的类群最大、发现最早、研究最多且实用意义很大的昆虫

病毒。截止 2006 年 1 月, 已有 29 种昆虫杆状病毒的基因组被完全测序^[1]。随着测序的完成, 对基因

Received: January 10 2007; Accepted: January 29 2007.

This work was supported by the grants from the High Talent Fund of Jiangsu University (No. 1283000169) and the National Basic Research Program of China (No. 2005CB121000).

* Corresponding author. Tel: +86-511-8791923; Fax: +86-511-8791923; E-mail: kpcchen@ujs.edu.cn

江苏大学高级人才基金 (No. 1283000169), 国家重点基础研究发展计划 (973 项目) (No. 2005CB121000) 联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

的功能研究正成为当前的一个热点。基因敲除技术是研究基因功能的一种常用手段。传统的构建重组杆状病毒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,但该方法不仅重组效率低,而且耗时耗材^[2]。近年来发展的基于 Red 重组酶的新型体内重组系统可以在大肠杆菌内对 DNA 序列进行精确修饰^[3]。Red 重组系统属于 λ 噬菌体的重组系统,其编码基因 *exo*、*bet* 和 *gam* 置于 L-阿拉伯糖启动子的控制之下,在 L-阿拉伯糖的诱导下表达重组酶,介导线性化片段与染色体(或载体)的特定靶序列进行同源重组,从而将外源基因替换靶基因。目前已经有利用该系统对苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)^[4-6]、棉铃虫单核衣壳核型多角体病毒(*Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, HaSNPV)^[7,8]等杆状病毒的基因进行定点敲除的报道。但在家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)中还一直未见有关的研究。最近 Motohashi 等构建的 BmNPV bacmid^[9]使利用 Red 重组系统对 BmNPV 的基因进行敲除成为可能。

BmNPV 是家蚕的一种重要致病病毒,其全基因组序列已被测定,含 136 个潜在的编码蛋白的开放阅读框(ORF)^[10]。BmNPV 大多数基因的信息都是从 AcMNPV 的同源基因推断而来,至今确定功能的基因只有少数。BmNPV *orf60* 长 804bp,位于 BmNPV 基因组 T3 株的 56675~67479bp 处,表达产物的预测分子量为 31.0kD。RT-PCR 和 Western 都显示它是一个晚期表达基因^[11],但该基因功能的研究还一直未见报道。本文首次利用 Red 重组系统在大肠杆菌中成功地对 BmNPV 的 *orf60* 基因进行了定点敲除。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株和试剂

含有 BmNPV bacmid 的大肠杆菌菌株 BmDH10Bac 由日本 Shizuoka 大学 Park 教授惠赠^[9]。含有能表达 Red 重组酶的质粒 pKD46 的大肠杆菌 BW25113 菌株、含有氯霉素抗性基因(*cat*)的质粒 pKD3 由美国 Yale 大学 Mary Berlyn 博士惠赠^[12]。高保真 DNA Taq 聚合酶、pMD18-T Simple Vector、蛋白质 Marker 均购自 TaKaRa 公司。各种抗生素和 L-阿拉伯糖均自 Sigma 公司,PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 大肠杆菌菌株 BW25113-Bac 的制备

从大肠杆菌 BmDH10Bac 中提取 BmNPV bacmid,按文献 6 介绍的方法制备 BW25113 的电转化感受态细胞,将 BmNPV bacmid 电转化大肠杆菌 BW25113(含 pKD46 质粒)涂布培养于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)、卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 固体平板上。随机挑取单菌落并提取 bacmid,用 PCR 方法验证获得的大肠杆菌 BW25113-Bac 中是否含有 BmNPV bacmid。

1.3 *orf60* 基因打靶线性化片段的制备

用于 *orf60* 基因打靶线性化片段 PCR 扩增的引物设计如下:F-C1(5'-ATAGTAAGATAAAATAAAAAATGAAAATAAATTTGTGCAATATACAA taa GTGTAGGCTGGAGCTGCT-3');R-C2(5'-TTTCGTGTTCAAGAAATTGCTGATGATATCTTTGAACGTGCACGTCATATGAATATCCTCCTT-3')。该引物分别由 45bp *orf60* 基因的同源臂(下划线标注)和 18bp *cat* 的同源区组成,方框为人为引入的终止密码子。以 pKD3 为模板,PCR 扩增打靶线性化片段(图 2A)。反应体系为 50 μ L,扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,接着 35 个循环,变性、退火和延伸温度与时间分别为 94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 90s,最后是 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。为了避免模板自身对后续实验的污染、减小假阳性提高打靶效率,用 PCR 产物为模板进行二次 PCR 反应。最后 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳分离并用胶回收试剂盒对线性化片段 DNA 进行纯化,溶于 30 μ L 的超纯水中,置于 -20 $^{\circ}$ C 待用。

1.4 *orf60* 基因的缺失

挑取 BW25113-Bac 单菌落,培养至 OD_{600} 为 0.15~0.2,加入 L-阿拉伯糖至终浓度 1mmol/L 后继续培养 1h,按文献 6 制作电转化感受态细胞。将 5 μ L 胶回收的线性化片段和 BW25113-Bac 感受态细胞混合后,转入 0.2cm 的电击杯中,用 Bio-Rad 电击仪进行电转化。电击参数设置为 2.5kV 电压,200 Ω 电阻,25 μ F 电容。电击后立刻加入 1mL 的无抗生素的 SOC 培养基 37 $^{\circ}$ C 复苏培养 1h,然后涂布培养于含氯霉素(34 μ g/mL)和卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 固体平板上。

1.5 *orf60* 基因缺失 bacmid 的 PCR 鉴定

随机挑取抗氯霉素和卡那霉素的单菌落进行液体培养,按照碱裂解法抽提重组 bacmid。用不同的引物组合进行 PCR 扩增,以验证 *orf60* 基因的缺失与否。所用的验证引物分别为:*orf60* 基因的上下游引物 60-F:5'-ATGAAAATAAATTTGTGCAAT-3'和 60-R:5'-TCATGTTTCTTTTTGAAAAC-3'(图 2B),*cat* 基因内部的一对引物为 *cat*-F:5'-TCACCGTCTT

TCATTGCCAT-3' 和 *cat*-R : 5'-TTGTTACACCGTTTTTCATGAGC-3' (图 2C)。不同组合分别为 :60-F/60-R、60-F/*cat*-R 和 60-R/*cat*-F。所有的 PCR 反应中都用亲本病毒 bacmid 作对照。随机挑重组 bacmid 用引物 60-F/60-R 进行 PCR 扩增后,克隆到 pMD18-T Simple Vector 载体中,用 M13 引物进行测序验证。

1.6 重组 bacmid 转染家蚕 BmN 细胞和 Western blot 分析

提取重组 bacmid DNA,按照 Invitrogen 公司脂质体转染说明书转染 BmN 细胞,27 °C 培养 72h 后,收集病变细胞,处理后进行 SDS-PAGE 电泳。以亲本病毒 bacmid 转染的 BmN 细胞为对照。将 SDS-PAGE 电泳的蛋白电转至硝酸纤维素膜,分别以兔抗 GST-ORF60 多克隆抗体为一抗^[11],山羊抗兔 IgG-HRP 为二抗进行反应,在 DAB 和 H₂O₂ 的显色液中显色。置于水中终止显色反应,晾干后拍照。

2 结果

2.1 大肠杆菌菌株 BW25113-Bac 的获得

含 pKD46 质粒的大肠杆菌 BW25113 能在含氨苄青霉素的平板上生长,转化 BmNPV bacmid 后,能在含氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 固体平板上生长。为了进一步证明 BmNPV bacmid 转化到 BW25113 中,可用 BmNPV 任意基因的引物进行 PCR 验证,用 *orf60* 的引物 PCR 得到长约 810bp 的条带(图 3,泳道 7)。证明得到的大肠杆菌 BW25113 含有 pKD46 和 BmNPV bacmid,将该菌命名为 BW25113-Bac。

2.2 *orf60* 基因打靶线性化片段的鉴定

用 63bp 长的 F-C1 和 R-C2 为引物,以 pKD3 质粒为模板进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳后得到大小约为 1.1kb 的片段,如图 1 所示。该片段即为所需的线性化片段。

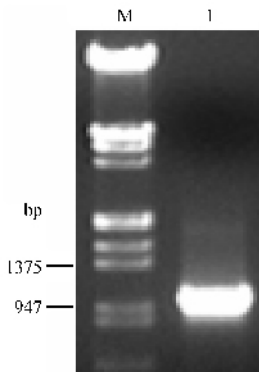


图 1 氯霉素抗性基因的 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR product of *cat* gene

M :DNA marker ; 1 :1.1kb PCR product of *cat* gene amplified using primers F-C1 and R-C2.

2.3 *orf60* 缺失重组子的构建

将回收的线性化片段电转化 L-阿拉伯糖诱导后的 BW25113-Bac 菌,在 λ Red 重组酶作用下,线性化片段与 *orf60* 基因发生同源重组(图 2),在含氯霉素和卡那霉素的固体平板上获得了多个重组转化子。

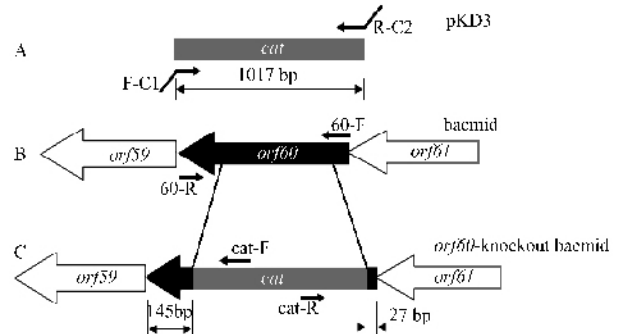


图 2 *orf60* 基因缺失型病毒的构建策略

Fig.2 Construction of *orf60*-knockout bacmid

(A) *cat* gene amplified by PCR from plasmid pKD3 with primers F-C1 and R-C2 ; (B) BmNPV gene organization of *orf60* and the relative positions of primers 60-F and 60-R used for PCR verification for the deletion of *orf60* ; (C) Diagram indicating the replacement of *orf60* with *cat* gene and the relative positions of primers *cat*-F and *cat*-R used to confirm the correct insertion of *cat* gene into *orf60* locus.

2.4 *orf60* 缺失重组子的验证

随机挑取六个单菌落,用引物进行 PCR 鉴定。首先用 *orf60* 基因的自身引物 60-F 和 60-R 对重组转化子进行 PCR 鉴定,同时用亲本病毒 bacmid 作为对照。结果显示 6 个阳性重组体 PCR 产物大小约为 1.2kb,将该片段克隆到 pMD18-T Simple Vector 载体中,测序结果显示该序列的上下游分别含有 145bp 和 27bp 长的 *orf60* 基因片段,中间含有 1.1kb 的 *cat* 基因,这与预测的相一致(图 2.C)。而亲本病毒 bacmid 没有发生替换,PCR 产物为 810bp 左右(图 3),表明 1.1kb 的 DNA 线性化片段插入到了 *orf60* 基因中。

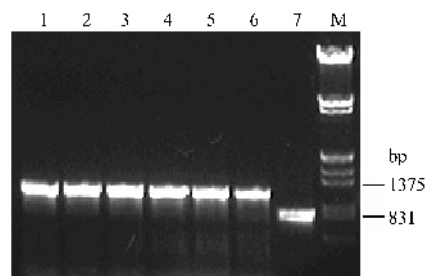


图 3 *orf60* 基因缺失后的 PCR 验证

Fig.3 The results of PCR verification for deletion of *orf60* 1 ~ 6 :1.2kb PCR products of *orf60*-knockout bacmid ; 7 :an 810bp product of wild-type bacmid. M :DNA marker.

为了进一步验证实验结果的可靠性,在氯霉素抗性基因的内部分别设计了一对引物 cat-F 和 cat-R 进一步 PCR 验证。随机挑取上述一个转化子用引物组合 cat-F/60-R, PCR 扩增出约 660bp 的条带(图 4,泳道 1),同样用引物组合 cat-R/60-F 可以扩增出约 500bp 的条带(图 4,泳道 2);而这两对引物组合在亲本病毒 bacmid 中都没有扩增出目的带(图 4,泳道 3、4)。可以说明获得了正确的 *orf60* 基因缺失的重组转化子。

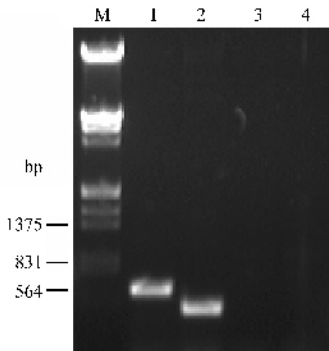


图 4 不同引物组合的进一步 PCR 验证
Fig.4 The result of PCR products obtained by different primer pairs

1,3:PCR products obtained by primer pair cat-R/60-F;2,4:PCR products obtained by primer pair cat-F/60-R;1,2:*orf60*-knockout bacmid as template;3,4:wild-type bacmid as template;M:DNA marker.

2.5 *orf60* 缺失病毒的 Western blot 检测

重组和野生型 bacmid DNA 分别转染 BmN 细胞,以免抗 GST-ORF60 多克隆抗体为一抗进行 Western blot 分析。结果表明野生型 bacmid DNA 在转染 72h 时可以检测到一条 31kD 的目的带^[11],而重组的 bacmid 未检测到目的带(图 5)。说明缺失的病毒中 *orf60* 在表达水平上发生了终止。

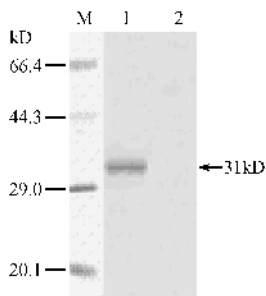


图 5 Western blot 检测结果

Fig.5 The result of Western blot analysis

M:protein molecular marker;1:BmN cells infected wild-type bacmid;2:BmN cells infected *orf60*-knockout bacmid.

3 讨论

2005 年 Motohashi 等构建了 BmNPV bacmid 系

统^[9]到目前为止,该系统已成功地运用于绿色荧光蛋白^[9]、蜘蛛丝蛋白^[13]、蜘蛛鞭毛样丝蛋白^[14]和家蚕锰型超氧化歧化酶^[15]的表达,但还没有将 BmNPV bacmid 系统和 Red 重组系统结合在一起运用于 BmNPV 基因功能研究的报道。本文首次将以上两个系统结合在一起,成功构建了大肠杆菌菌株 BW25113-Bac,在 L-阿拉伯糖的诱导下,该菌株可用于 BmNPV 任意基因的敲除、替换、点突变等修饰。

研究杆状病毒基因的功能需将目的基因失活。本文所用的 Red 重组系统^[12]只需要很短的同源臂(40~60bp)即可介导外源基因与目的基因的同源重组,而且重组效率高,而这么短的同源臂完全可以将同源臂加在所设计的引物两端通过一步 PCR 反应就扩增出目的片段,这样就可以任意地对大分子 DNA 进行精确修饰,从而避免了构建长的同源臂载体等烦琐的体外酶切连接反应,也不存在碱基突变的危险,是一个简单、快速、高效的敲除系统^[16]。

在线性化片段的引物设计方面,在同源臂和 cat 引物之间引入了一个终止密码子 TAA,避免了 *orf60* 基因自身的启动子介导的 cat 基因表达。为了减少敲除的假阳性,用二次 PCR 产物来用于电转化。Western blot 结果显示重组 bacmid DNA 转染 BmN 细胞后未检测到该基因的表达。本文利用构建的 BW25113-Bac 菌株,设计了 45bp 这么短的同源臂,通过一步 PCR 反应扩增同源臂,首次在大肠杆菌中成功快速地敲除了 BmNPV 的 *orf60* 基因,为其功能的进一步研究奠定基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, et al. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch Virol*, 2006, **151**(7):1257-1266.
- [2] O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. WH Freeman and Company, New York, 1992.
- [3] Yu D, Ellis HM, Lee EC, et al. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**(11):5978-5983.
- [4] Li Y, Wang J, Deng R, et al. vlf-1 deletion brought AcMNPV to defect in nucleocapsid formation. *Virus Genes*, 2005, **31**(3):275-284.
- [5] Lung OY, Cruz-Alvarez M, Blissard GW, et al. Ac23, an envelope fusion protein homolog in the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, is a viral pathogenicity factor. *J Virol* 2003, **77**(1):328-339.
- [6] Vanarsdall AL, Okano K, Rohmann GF, et al. Characterization of a baculovirus with a deletion of *vlf-1*. *Virology* 2004, **326**(1):191-201.

- [7] Wu D ,Deng F ,Sun X , *et al.* Functional analysis of FP25K of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol* 2005 **86**(9) 2439 – 2444.
- [8] Hou SW (侯松旺) ,Chen XW (陈新文) ,Wang HZ (王汉中) , *et al.* An efficient method of constructing homologous recombinant baculovirus with PCR-amplified fragments. *Science in China (Series C)* (中国科学(C 辑)) 2003 **33**(2) :169 – 174.
- [9] Motohashi T ,Shimajima T ,Fukagawa T , *et al.* Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 **326**(3) 564 – 569.
- [10] Gomi S ,Majima K ,Maeda S , *et al.* Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol* ,1999 **80**(5) : 1323 – 1337.
- [11] Du MF ,Yin XM ,Guo ZJ , *et al.* Characterization of a late gene , ORF60 from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J Biochem Mol Biol* 2006 **39**(6) :737 – 742.
- [12] Datsenko KA ,Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 **97**(12) :6640 – 6645.
- [13] Miao YG ,Zhao AC ,Zhang YS , *et al.* Silkworm ,*Bombyx mori* larvae expressed the spider silk protein through a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus. *J Appl Entomol* 2006 **130**(5) 297 – 301.
- [14] Miao Y ,Zhang Y ,Nakagaki K , *et al.* Expression of spider flagelliform silk protein in *Bombyx mori* cell line by a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006 **71**(2) :192 – 199.
- [15] Yue W ,Miao Y ,Li X , *et al.* Cloning and expression of manganese superoxide dismutase of the silkworm ,*Bombyx mori* by Bac-to-Bac/ BmNPV baculovirus expression system. *Appl Microbiol Biotechnol* , 2006 **73**(1) :181 – 186.
- [16] Wang JH (王军平) ,Zhang YM (张友明) . Red/ET recombination and its biomedical applications. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)* 2005 **21**(3) 502 – 506.
- 