

利用杆状病毒载体在棉铃虫血 细胞中表达大肠杆菌 β -半乳糖苷酶

朱国凯 屠益增 周勤 林秀青 宋伟君 顾海华

(中国科学院上海昆虫研究所, 上海)

用携带大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因的杆状病毒转移载体 pAc360- β -gal 与野生型的苜蓿丫纹夜蛾 (AcNPV) DNA 同时转染草地夜蛾细胞, 经 X-gal 筛选和空斑纯化得到重组型杆状病毒 AcNPV- β -gal。该重组病毒能有效地感染棉铃虫血细胞系, 并高效表达出受 AcNPV 多角体蛋白启动子控制的、具有生物活性的外源基因产物—— β -半乳糖苷酶。80% 以上的酶蛋白能分泌到细胞外, 培养液中酶活可达每毫升 50000 单位以上, 约相当于 170 μ g 酶蛋白。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离表达产物和 β -半乳糖苷酶在凝胶上的特异性显色反应分析, 重组病毒在棉铃虫血细胞中表达的 AcNPV 多角体蛋白——大肠杆菌 β -半乳糖苷酶融合蛋白是以 5 种活性的多聚体或复合物形式存在的。

关键词 杆状病毒载体; 棉铃虫血细胞; β -半乳糖苷酶; 基因表达

用杆状病毒作为载体的外源基因表达系统自八十年代初问世以来发展极为迅速。迄今已在昆虫培养细胞或虫体中成功地表达了 50 种以上来源于从病毒到人的外源基因^[1]。同时发展了受苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (AcNPV) 或家蚕核多角体病毒 (BmNPV) 多角体蛋白启动子控制的、表达融合或非融合蛋白的一系列转移载体^[2]。虽然, 目前大多数重组病毒在昆虫细胞中的表达效率没有达到天然病毒多角体蛋白的水平, 但是, 依据这一系统的明显特征^[1], 提高实际表达效率仍具有相当大的潜力。此外, 杆状病毒——昆虫细胞作为较高等的真核表达系统, 在维持外源基因产物的天然生物学功能, 在产物的分泌、转运、装配及多种翻译后加工过程等方面业已展示出诱人的前景^[2]。

我们利用杆状病毒载体和大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因与特异性指示剂能显色的特点^[3], 首先将转移载体 pAc360- β -gal

与 AcNPV DNA 同时转染草地夜蛾细胞得到重组型病毒 AcNPV- β -gal, 再试用我们实验室建立的棉铃虫血细胞系与之组成一个新的昆虫细胞——杆状病毒表达系统。

材料与方 法

(一) 细胞和病毒

原始草地夜蛾细胞系 IPLB-SF-21AE 是 J. L. Vaughn 博士赠送^[4], 已在我们实验室连续培养 300 代以上。棉铃虫幼虫血细胞连续培养细胞系 SIE-HAH-806 为本研究室以前建立^[5], 连续传代也已超过 300 代。上述两种细胞均培养在 IPL-41 培养液 (KC Biol. Co.) 中, 加 10% 小牛血清 (上海畜牧兽医研究所), 必要时加入适量抗菌素。野生型苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (AcNPV) 也是 J. L.

本文于 1990 年 10 月 15 日收到。

本课题为国家七·五攻关项目。

Vaughn 博士赠送, 经感染 IPLB-SF-21AE 细胞 4 至 5 天后增殖得到病毒原液。

(二) 转移载体和病毒 DNA 的制备

含 pAc360- β -gal 转移载体的菌株由胡裕文先生赠送(中国预防医学科学院病毒学研究所), 经氯霉素扩增后用 Triton-溶菌酶法裂解细菌, 酚、氯仿抽提, 再经 Sepharose 4B 柱层析处理和乙醇沉淀得到纯的 pAc360- β -gal。野生型 AcNPV DNA 从感染 3 天后的 IPLB-SF-21AE 细胞培养液中制备。低速离心去细胞后, 上清在 100 000g 超速离心 45min, 沉淀的病毒颗粒悬浮于 TE 缓冲液, 加入终浓度为 50 μ g/ml 的蛋白酶 K(华美公司)和 0.5% 的 SDS(Bio-Rad)。37 $^{\circ}$ C 保温数小时后以酚、氯仿反复抽提, 水相对 0.1 \times TE 透析得到 AcNPV DNA。

(三) 转染

基本上依照 M. D. Summers 等方法^[6], 在 25cm² 塑料培养瓶(Nunc)中接入密度为 2×10^6 的 IPLB-SF-21AE 细胞, 贴壁 1h, 吸尽原培养液并加入 0.75ml 新的 IPL-41 培养液, 滴入溶解在转染缓冲液(25mmol/L HEPES, 140mmol/L NaCl, 125mmol/L CaCl₂, pH7.1)的 pAc360- β -gal 和 AcNPV DNA 的溶液 0.75ml, 两种 DNA 克分子比为 1:100。置于 27 $^{\circ}$ C, 4h 后除去上层液体, 用 IPL-41 培养液漂洗细胞一次, 加入 5ml 含 10% 小牛血清和适量抗菌素的 IPL-41 培养液, 于 27 $^{\circ}$ C 培养 4 至 6 天后观察感染情况。

(四) 空斑分析和纯化

转染细胞的上清液稀释 10 倍后, 取 1ml 加在 60 \times 15mm 塑料培养皿(Nunc)中的 IPLB-SF-21AE 单层细胞上, 室温下间歇摇晃, 1h 后除去上层转染液。在细胞上铺上 4ml 1.5% 的低熔点琼脂糖

(Sea Plaque)。试验前, 琼脂糖先溶于含 10% 小牛血清、适量抗菌素和 50 μ g/ml X-gal(华美公司)IPL-41 培养液内备用。待凝固后置 27 $^{\circ}$ C 培养至出现蓝色空斑(一般为 4 至 6 天)。用移液器吸取蓝斑悬浮于 1ml 培养液中, 按上述方法重复进行空斑分析, 直至培养皿在显微镜下检查不到多角体, 此时的蓝斑才正式作为病毒种感染细胞增殖纯化出的重组型病毒 AcNPV- β -gal。

(五) β -半乳糖苷酶活力分析

在一组有 5ml IPL-41 培养液、 5×10^6 SIE-HAH-806 细胞的培养瓶中加入 0.5ml 重组病毒原液, 27 $^{\circ}$ C 培养一定时间后悬浮细胞并低速离心得到上清液和细胞, 细胞用 0.1mol/L pH7.2 的磷酸缓冲液洗一次, 再悬浮于该缓冲液, 放 -20 $^{\circ}$ C 待一并测定。测定时取一定量的细胞悬浮液加到 1ml 酶反应缓冲液^[7]中, 并加入 1 滴 0.1% SDS 和 2 滴氯仿, 上清液则直接稀释在 1ml 缓冲液中。反应在 28 $^{\circ}$ C 进行, 加入 0.3ml 底物——邻硝基苯- β -D-半乳糖苷(ONPG)(上海生物化学研究所)溶液后立即计时。以 0.5ml 1mol/L Na₂CO₃ 终止反应, 加水至 3ml 置分光光度计测定波长 420nm 处的光吸收值。酶反应产物——邻硝基苯在此波长处的克分子消光系数为 4500。酶活力定义为: 在 28 $^{\circ}$ C, pH7.0 时, 每分钟产生 1 毫微摩尔的邻硝基苯所需的酶量为 1 个酶活力单位^[7]。

(六) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

感染一定时间后的细胞悬浮于含 0.1% SDS 的 0.25mol/L 磷酸缓冲液中, 以 0 $^{\circ}$ C—-80 $^{\circ}$ C 反复冻融, 离心去除细胞碎片。取上清或感染细胞培养液等量加入终浓度为 1% SDS、2% β -巯基乙醇、20% 甘油和少量溴酚蓝的溶液, 37 $^{\circ}$ C 处理 3min 或 75 $^{\circ}$ C 热变性 20min 后上样。浓缩

胶为 3.7%、pH6.8, 分离胶为 10%、pH8.8, 均用核黄素光聚合。电泳在甘氨酸-Tris-SDS 电极缓冲液中于 4℃ 下进行。

(七) β -半乳糖苷酶在电泳后的凝胶上的特异性显色反应

电泳后凝胶浸泡于复性缓冲液(50m mol/L Tris-HCl, pH7.5, 1m mol/L EDTA, 5m mol/L β -巯基乙醇)^[8], 在 4℃, 半小时换一次缓冲液。2 h 后将凝胶转移至含 50 μ g/ml X-gal 的酶反应缓冲液, 37℃ 保温至凝胶上出现蓝色条带(约 1 h)。照相后凝胶用考马斯亮蓝进行蛋白染色。

结 果

(一) 转染和重组病毒的分离

转移载体 pAc360- β -gal 的结构如图 1 所示。在 AcNPV 多角体蛋白基因起始密码子下游第 34 至第 177 核苷酸之间插入 - 3 kb 大小的大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因片段, 构成 12.8kb 的转移载体。它还含有多角体蛋白 PolyA 信号、氨苄青霉素抗性基因以及在宿主菌中复制起始基因等。表达的产物应是受 AcNPV 多角体蛋白启动子控制的、多角体蛋白 N 端 11 个氨基酸与 β -半乳糖苷酶大部分结构的融合蛋白, 大小为 110kDa^[2,9]。

我们用这一转移载体与完整的野生型 AcNPV DNA 一起转染 IPLB-SF-21AE 细胞。由于琼脂糖培养液中含 X-gal, 在单层细胞上形成大小不等的蓝色空斑。说明载体中的 β -半乳糖苷酶基因已整合到野生型 AcNPV 基因组中形成了重组病毒。在我们的实验条件下, 形成的蓝斑与野生型病毒斑之比不小于千分之一, 重组率是较高的。将蓝斑重复转移数次作空斑纯

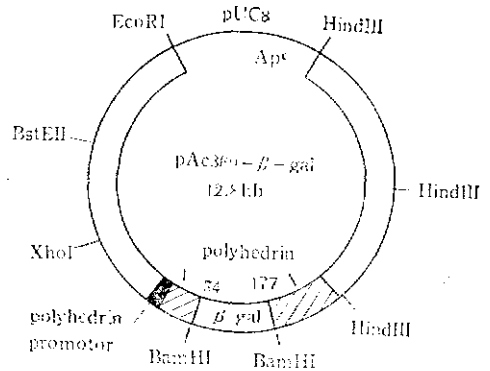


图 1 含有 AcNPV 多角体蛋白-大肠杆菌 β -半乳糖苷酶融合基因的杆状病毒转移载体 pAc360- β -gal
Fig.1 Baculovirus transfer vector pAc-360- β -gal containing the AcNPV polyhedrin-E.coli β -galactosidase fusion gene
 β -半乳糖苷酶基因片段的插入位置已在图中标明, 数字为原 AcNPV 多角体蛋白基因的核苷酸序号

The insertion position of β -galactosidase gene fragment was shown in the figure. The numbers indicated refer to the positions with respect to the translation initiation codon ATG in original AcNPV polyhedrin gene

化, 就能得到不含野生型 AcNPV 的重组病毒体 AcNPV- β -gal。这一重组病毒与野生型 AcNPV 相比, 感染细胞能力无明显差别。经过数次传代证明也是稳定的。

(二) 大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因在棉血细胞中表达产物的分析

用重组病毒 AcNPV- β -gal 感染棉血细胞 24h 以后, 细胞内开始出现 β -半乳糖苷酶活力(图 2)。48h 后酶的合成速率迅速增加, 在 72h 至 96h 达到高峰。酶蛋白在细胞内合成后即向胞外分泌, 使细胞培养液中酶活力持续上升。感染 120h 后, 每毫升培养液中酶活力达 40000 单位。棉血细胞被野生型 AcNPV 感染后, 无论细胞内还是培养液中均无 β -半乳糖苷酶活力。由于酶活力在感染的后期才出现, 与多角体蛋白的合成在时间上相符^[8], 可以认为外源性的 β -半乳糖苷酶基因在多角体蛋白

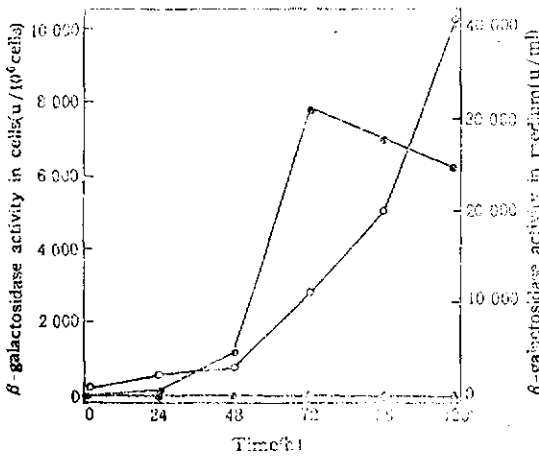


图 2 大肠杆菌β-半乳糖苷酶在AcNPV-β-gal 感染的棉铃虫细胞中的表达

Fig.2 Expression of *E.coli* β-galactosidase in AcNPV-β-gal infected *H. armigera* cells

感染后一定时间的细胞(●—●)或其培养液(○—○)或野生型AcNPV 感染的细胞及其培养液(▲—▲)中的酶活力用ONPG法测定。详见“材料与方

法”。β-galactosidase activity in the infected cells (●—●) or in medium (○—○) or in wt AcNPV infected cells plus medium (▲—▲) was determined by the ONPG assay See Materials and Methods for details.

启动子的控制下, 在棉血细胞中有效地表达。

为了进一步分析重组病毒感染后在细胞内表达的外源基因产物, 我们用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳来分离感染不同时间的细胞中的蛋白质(图版 I -A)。在感染后期的细胞内逐渐出现几条不同大小的蛋白染色带, 主要有110kDa(图中 f 带)和150kDa(e)二条。另有数条分子量更大的蛋白染色带(a—d)。这些带在野生型AcNPV 感染的细胞内不出现(图略)。为确定这些新合成的蛋白是否属外源基因的表达产物。我们应用特异性酶显色法来检测凝胶中蛋白的β-半乳糖苷酶活性。电泳后的凝胶洗去SDS使酶蛋白复性并进行酶反应, 生成的蓝色产物能结合在酶蛋白上

而形成特异性的显色带。结果共有五条活性带(图版 I -B), 与蛋白染色带 a—e 相对应。从感染后48h少量出现, 至96h 显色最深。五条活性带中, e 量最多, 其次为b、a、c、d量较少。图版 I -B中意外的是, 110kDa的蛋白(f)没有显示酶活性。

(三) 棉血细胞和草地夜蛾细胞表达外源性β-半乳糖苷酶能力的比较

两种细胞感染重组 AcNPV-β-gal 120h后, 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结合β-半乳糖苷酶特异性显色和蛋白常规染色分析(图版 I -C、D), 两种细胞表达产物的大小完全相同。但从电泳图中可看出, 棉血细胞表达的酶蛋白量高于草地夜蛾细胞表达量。β-半乳糖苷酶活力测定进一步肯定了电泳结果(表1)。虽然棉血细胞表达产物的分泌率低于草地夜蛾细胞, 但同量细胞中活性产物的生成量前者明显高于后者, 每毫升培养液中酶量可达170μg, 揭示了细胞高效表达外源基因的潜力。

如果将样品经热变性处理后再进行电泳分离, 则 a—e 蛋白染色带消失, f 带(110kDa)显著加深。凝胶去除SDS后, 均检测不到β-半乳糖苷酶活性(图版 I -C、D 中的C、M)。由此推论, 表达产物是以多聚体或与其它蛋白形成复合物的形式存在于细胞中。仅靠SDS的作用不足以使它们完全解离成单体, 当去除结合的SDS后, 这些大分子都能恢复酶活性。但这些多聚体或复合物受热并在SDS作用下解离为无活性的单体。从电泳结果分析, 110kDa(f)蛋白应是外源基因表达的融合蛋白的最小单位, 与插入的基因大小相当^[2]。但这一蛋白在去除SDS的电泳凝胶上未能显示酶活性, 其原因尚不清楚。可能它在原培养液中或细胞内也是以活性的多聚、复合形式存在的。而在电泳条件下, 部分解离成单体。这些单体由于空间结构关系而不

表 1 棉铃虫细胞和草地夜蛾细胞感染 AcNPV- β -gal 后 β -半乳糖苷酶活性的比较
Table 1 Comparison of β -galactosidase activity produced by *H. armigera* cells and *S. frugiperda* cells infected with AcNPV- β -gal

细胞系 Cell line	细胞密度 Cell density(ml)	培养液中 In medium(u/ml)	细胞内 In cells (u/10 ⁶)	分泌率 Percentage secreted (%)
SIE-HAH-806	1 × 10 ⁶	51,000	7,400	81
IPLB-SF-21AE	1 × 10 ⁶	38,600	3,800	92

两种细胞分别各以约 5×10^6 密度接入有 5 ml 培养液的 25cm² 培养瓶中, 每种细胞 6 瓶, 每瓶用 0.5ml AcNPV- β -gal 原液感染, 120h 后, 悬浮细胞, 混合每种细胞计数、离心分离细胞和培养液, 分别测定 β -半乳糖苷酶活力。Seed ca. 5×10^6 cells into 25cm² flask containing 5 ml medium, 6 flasks for one cell line, and infect the cells with 0.5ml AcNPV- β -gal inoculum. After 120 h p.i., each of cell line was suspended, mixed and counted. Cells and medium were separated by centrifugation and their β -galactosidase activities were determined respectively.

表现酶活性。关于这一蛋白的性质需作进一步实验来确定。

讨 论

对于如何提高以杆状病毒为转移载体的外源基因在昆虫细胞中的表达效率, 国内外有关研究人员大多是从选择合适的转移载体, 或对其进行结构改造着手, 试图寻找外源基因插入多角体蛋白基因中的最佳位置^[2]。这固然是一个获得高效表达的关键步骤。但是我们还认为, 昆虫病毒不管是野生型的, 还是重组型的, 既然要

藉宿主细胞进行复制, 它们的活动, 比如某些基因的表达调控等必然会受到细胞的特性及其内外环境的影响。所以寻找更为合适的杆状病毒-昆虫细胞表达系统也是提高外源基因表达效率的重要途径之一^[10]。

棉铃虫血细胞不仅能在体外长期稳定传代培养, 而且对 AcNPV 敏感性较高, 细胞感染率可达 90% 以上, 能形成较多的多角体^[5]。这是我们选择这一细胞系与 AcNPV 组成一个杆状病毒-昆虫细胞系统的主要依据。这个系统表达效率是较高的。

参 考 文 献

- [1] Maeda, S., *Ann. Rev. Entomol.*, 34:351-372, 1989.
- [2] Luckow, V. A. and Summers, M. D., *Bio/Technology*, 6:47-55, 1988.
- [3] Pennock, G. D. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 4:399-406, 1984.
- [4] Vaugh, J. L. et al., *In vitro*, 13:213-217, 1977.
- [5] 朱国凯等: 昆虫学研究集刊, 上海科学技术出版社, 第四集, pp.145-149, 1984.
- [6] Summers, M. D. and Smith, G. E., *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No.1555, 1987.
- [7] Miller, J. H., *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor, N. Y., pp. 352-355, 403-404, 1972.
- [8] Spanos, A. and Hubscher, U., *Methods in Enzymology*, Vol. 91 Eds. Hirs, C. H. W. and Timasheff, S. N., 263-277, 1983.
- [9] Smith, G. E. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 3:2156-2165, 1983.
- [10] 侯云德: 分子病毒学, 学苑出版社, p. 90, 1990.

High Level Expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in *Heliothis armigera* Cells by Using a Baculovirus Vector

Zhu Guokai Tu Yizeng Zhou Qin

Lin Xiuqing Song Weijun Gu Haihua

(Shanghai Institute of Entomology, Academia Sinica, Shanghai)

The *E. coli* β -galactosidase gene carried by a baculovirus vector pAc360- β -gal was transferred into the AcNPV genome by cotransfection of *S. frugiperda* cells. A recombinant baculovirus, AcNPV- β -gal was obtained by means of X-gal selection and plaque purification. This recombinant baculovirus could effectively infect established *H. armigera* cell line and express the biologically active β -galactosidase under the control of the baculoviral polyhedrin promoter. More than 80% the β -galactosidase was secreted from infected *H. armigera* cells and over 50 000u/ml of activity, equal to calculate 170 μ g/ml of protein was detected in infected cells medium. Separation with SDS-PAGE and detection of β -galactosidase activity directly on gels showed that the products of the foreign gene expressed in *H. armigera* cells infected with AcNPV- β -gal existed in the forms of five active polymers or complexes. By comparison of abilities of the β -galactosidase expression with widely used *S. frugiperda* cells, we think *H. armigera* cells might be developed as an alternative to *S. frugiperda* cells and the *H. armigera* cells—AcNPV might become a new insect cells—baculovirus expression system.

Key words

Baculovirus vector; *H. armigera* cells; β -galactosidase; gene expression

朱国凯等：利用杆状病毒载体在棉铃虫血细胞中表达大肠杆菌 β -半乳糖苷酶
 Zhu Guokai et al: High level expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in *Heliothis armigera* cells by using a baculovirus vector

图版 I
 Plate I



- A. 棉铃虫血细胞感染AcNPV- β -gal后不同时间表达产物的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图，考马斯亮蓝染色
 SDS-PAGE profiles of proteins from *H. armigera* cells infected with AcNPV- β -gal at various times (h), Coomassie-blue stained
- B. 与A相同凝胶，染色前用X-gal进行特异性 β -半乳糖苷酶反应的结果
 The same gel as A. detected with X-gal for β -galactosidase activity before the protein stain
- C. 棉铃虫细胞或草地夜蛾细胞感染AcNPV- β -gal后表达产物的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图。C示在感染细胞中；M示在感染细胞培养液中；下方划线示相应的样品经热变性处理后上样。
 SDS-PAGE profiles of proteins from *H. armigera* or *S. frugiperda* cells both infected with AcNPV- β -gal. C means in infected cells, M means in infected medium and underlined letters mean corresponding samples pretreated by heating denaturation
- D. 与C相同凝胶，染色前用X-gal进行特异性 β -半乳糖苷酶反应的结果
 The same gel as C. detected with X-gal for β -galactosidase activity before the protein stain