

用构建的新型 BmNPV 载体 在家蚕高效表达人 β -干扰素

邓继先 王少飞 杨 琴 程 萱 李 琳

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 构建了家蚕核多角体病毒(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV)新型载体 pBm92, 该载体将多角体蛋白基因的起始密码 ATG 改变为 ATT, 然后在多角体蛋白基因的+12 位后连接有 5 个外源基因的克隆位点。将 HuIFN- β 基因克隆在多角体蛋白基因的+12 位后, 构建了 pBmIFN+12; 同时构建了 Hu IFN- β 克隆在-3 位后的转移载体 pBmIFN-3。将两种转移载体 DNA 分别与 BmNPV 基因组 DNA 共转染 Bm-N 细胞。利用重组病毒不产生多角体蛋白的特征, 筛选重组病毒。用 HuIFN- β 基因探针与重组病毒 DNA 进行杂交鉴定。重组病毒 BmIFN+12 感染 Bm-N 细胞, 其上清 IFN 活性为 2.0×10^6 IU/ml, 将 BmIFN+12 注射 5 龄家蚕虫体, 表达水平为 5.0×10^7 IU/ml, 是 Hu IFN- β 基因克隆在多角体蛋白基因的-3 位后获得的重组病毒表达量的 2—4 倍。构建的新型 BmNPV 载体能够在家蚕高效地表达 HuIFN- β 。家蚕虫体生产的 rHuIFN- β 蛋白具有天然 HuIFN- β 的抗原性。

关键词 BmNPV, 转移载体, β -干扰素, 基因表达

许多学者在研究利用苜蓿尺蠖核多角体病毒(*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcNPV)多角体蛋白基因启动子调控外源基因表达时发现, 保留 AcNPV 多角体蛋白基因启动子的全部序列对外源基因的高效表达至关重要, 保留多角体蛋白基因 5' 端少量密码子对外源基因的 mRNA 在细胞内的稳定性有重要作用^[1]。基于上述原因, 我们突变了家蚕核多角体病毒(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV)多角体蛋白基因的 ATG 为 ATT, 并且保留了多角体蛋白基因 5' 端的+12 对碱基, 在+12 位处后面接有 5 个克隆位点, 从而构建了 BmNPV 新型通用载体 pBm92。虽然这一载体克隆位点在多角体蛋白基因的+12 位后, 但是表达的外源基因产物为非融合蛋白。迄今为止。还未见构建这种类型的 BmNPV 通用载体的报道。

为了比较外源基因克隆位置对其表达水平的影响, 分别将人 β -干扰素(HuIFN- β) 基因克隆在 BmNPV 多角体蛋白基因的+12 位后和-3 位后, 即克隆在 pBm92 和 pBm030^[2] 载体上, 从而构建了两种转移载体 pBmIFN+12 和 pBmIFN-3。用上述两种转移载体 DNA 分别与 BmNPV DNA 共转染培养的 Bm-N 细胞, 以此产生两种重组病毒即 BmIFN+12 和 BmIFN-3。BmIFN+12 在 Bm-N 细胞的表达 HuIFN- β 的水平为 2.0×10^6 IU/ml, 在 5 龄家蚕虫体的血淋巴的表达水平达 5.0×10^7 IU/ml; 而 BmIFN-3 在细胞和虫体的表达水平分别为 5.0×10^5 IU/ml 和 1.0×10^7 IU/ml。说明构建的新型 BmNPV 通用载体能高效地表达 HuIFN- β 。利用 pBm92 载体在家蚕虫体表达出的 rHuIFN- β 水平是目前 HuIFN- β 在真核表达系统获得的最高表达水平。

1 材料和方法

1.1 细胞和病毒

Bm-N 细胞采用含 10%FCS 的 TC-100 培养基(GIBCO BRL 产品),于 27℃培养, BmNPV 在 Bm-N 细胞培养物里增殖,感染后 4 天收集上清,用于病毒 DNA 提取。Hep-2 采用含 5%FCS 的 DMEM 培养基(GIBCO BRL 产品),于 37℃培养。

1.2 病毒 DNA 和质粒 DNA 提取

按文献[3]方法从 BmNPV 感染 Bm-N 细胞培养上清中提取病毒;从收集的 BmNPV 多角体中提取病毒 DNA,首先洗涤多角体,离心沉淀后,再用碱性溶液(0.1mol/L NaHCO_3 、0.15mol/L NaCl, pH10.5)重新悬浮,室温放置半小时,加 SDS 至 0.5%,冰浴 30 分钟,用饱和酚抽提二次,氯仿抽提一次,加酒精后,用玻璃棒搅起粘稠的 DNA,置于 0.1×TE 溶液,4℃贮存备用。

1.3 用于 DNA 重组和共转染的质粒 DNA 制备

采用常规的碱变性法,用 Sepharose-CL4B(Sigma 产品)柱纯化。

1.4 质粒 DNA 的酶切、片断回收、连接、转化和其他分子克隆方法

参照文献[4]中的方法进行或稍作改进;DNA 共转染和重组病毒筛选,均按文献[5]方法进行。

1.5 家蚕活体表达 IFN- β

3—5 μl (3—5×10⁵pfu)的重组病毒溶液注射到 5 龄期家蚕体内,在 25℃条件下,桑叶饲养。4 日后,收取蚕体的血淋巴,10 000r/min、离心 5 分钟,上清用于 rHuIFN- β 活性测定。

1.6 干扰素测定

采用常规的微量板染色法测定,以国际标准品作为参照,用国际单位(IU)表示。

1.7 酶和生化试剂

DNA 操作所用酶购自 GIBCO BRL 公司和华美生物工程公司,化学试剂为国产分析纯产品。

2 实验结果

2.1 BmNPV 的载体构建

将 BmNPV DNA 用 EcoRI 酶切、经 Southern 印迹与多角体蛋白基因部分序列探针杂交,确定含多角体蛋白基因的酶切片段,片段大小与文献[6]报道一致(见图 1)。回收 9.6kb 片段,克隆到 pUC18 DNA 的 EcoRI 位点,构建成 pBm PE。用 Hind III 酶消化 pBmPE DNA,回收 3.9kb 的片段。将其连

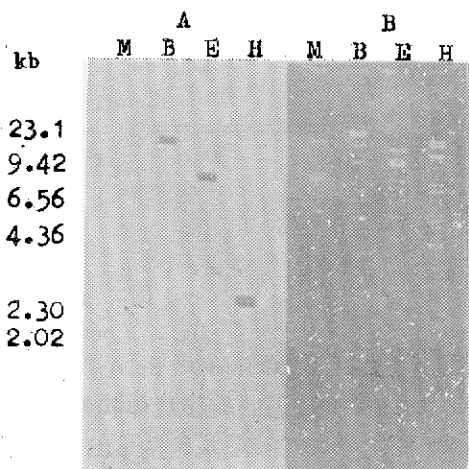


图 1 野生型 BmNPV DNA 酶切后的 Southern 印迹(A)和电泳图谱(B)

Fig. 1 Southern hybridization(A) and restriction pattern(B) of wild BmNPV DNA
M. Lambda DNA digested by Hind III, B. BamHI
E. EcoRI, H. Hind III

接在 pUC18 的 Hind III 位点处,利用多角体基因 DNA 序列上的 XbaI 酶切位点,鉴别出方向,命名为 pBH1。合成引物 1 为 CCTAT AAATA TTCCG AATTA TCTAG ACCC 共 29 个碱基,将多角体蛋白基因翻译起始密码 ATG 改为 ATT,并保留了多角体蛋白基因 5' 端的 12 个碱基,引物 2 为 pUC 质粒的共用引物。以 pBH1 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,获 2.7kb 片段,将此段用 Hind III 酶切,与 Hind III 和 SmaI 酶切后的 pUC18 连接,构建 pBH2。然后用 XbaI 和 EcoRI 酶切 pBm PE DNA,回收 5.2kb 片段,用 Klenow fragment 补平粘端,连接在 pBH2 的 EcoRI 酶切后补平的平端处,从而构建 pBm92 载体质粒(见图 2)。此载体质粒有 XbaI、SmaI、KpnI、SstI 和 EcoRI 5 个单一克隆位点。经序列分析 HpaI 至 EcoRI 的序列与文献[6]的报道一致。

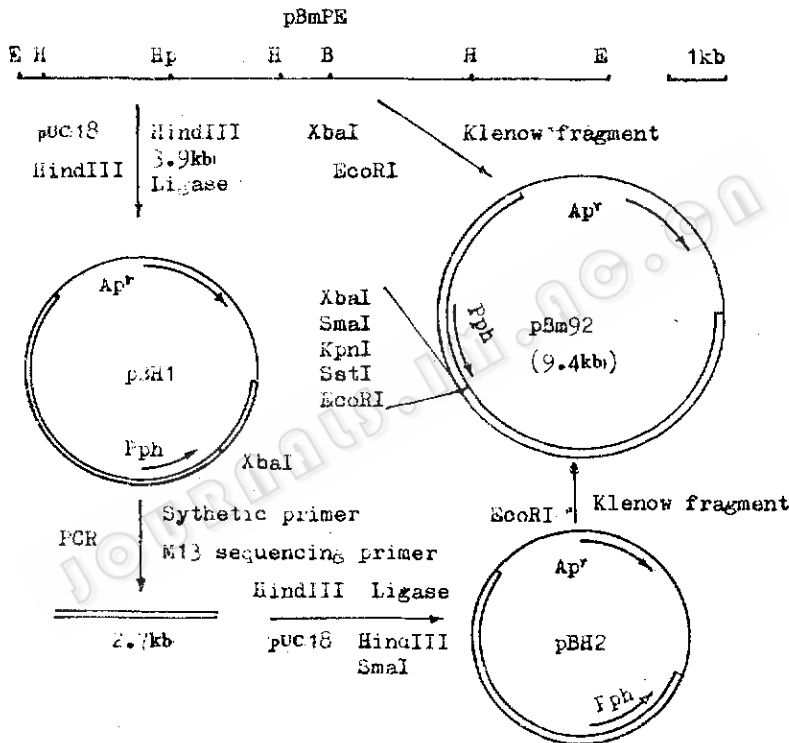


图 2 pBm92 载体质粒构建示意图

Fig. 2 Construction of pBm92 vector plasmid

E. EcoRI, H. Hind III, Hp. HpaI, B. BamHI, S. SmaI, Pph. Promoter of polyhedrin gene

2.2 HuIFN- β 基因的转移载体构建

含 HuIFN- β DNA 基因的 pIB 质粒的 DNA 用 Hind III 和 Bgl II 酶切,回收 570bp 片段,补平粘端后用于连接。用 XbaI 酶切载体质粒 pBm92DNA、S1 核酸酶消化粘端,与回收处理的 HuIFN- β 基因 DNA 连接(见图 3),使 HuIFN- β 基因处于多角体蛋白基因的 +12 后,形成 pBm-IFN+12 转移载体质粒。为比较 pBm92 载体表达 HuIFN- β 的水平,我们同时还利用 pBm030 载体构建了 HuIFN- β 基因克隆在多角体蛋白编码基因前 3 位即 -3 位处的转移载体质粒 pBmIFN-3(见图 3)。

2.3 重组病毒的产生

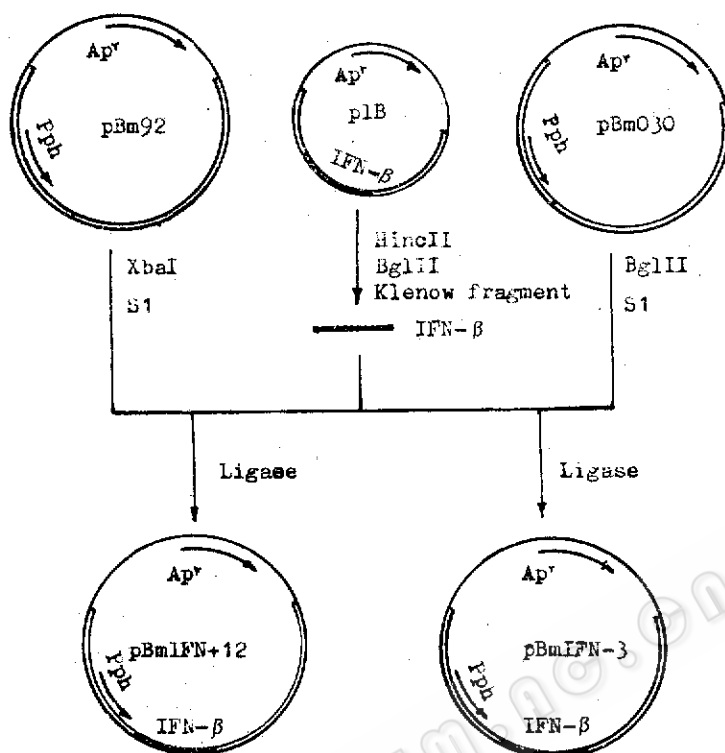


图 3 pBmIFN+12 和 pBmIFN-3 的构建

Fig. 3 Constructions of pBmIFN+12 and pBmIFN-3

将 pBm IFN+12 和 pBmIFN-3 DNA 分别与野生型 BmNPV 基因组 DNA 以 5:1 的比例,用脂质体包裹法共转染过夜培养的 Bm-N 细胞。4 天后,在显微镜下可见多角体蛋白形成的包涵体,收集培养上清,经两轮病毒空斑筛选,从 pBmIFN+12 共转染上清中纯化出重组病毒 6 株;从 pBmIFN-3 共转染上清中纯化出重组病毒 4 株。用上述 10 株重组病毒 DNA 进行点印迹,与³²P 标记的 IFN- β 基因探针杂交均为阳性(见图 4),说明纯化出的重组病毒均携带 HuIFN- β 基因。

2.4 BmIFN+12 和 BmIFN-3 在细胞和虫体的表达

分别用纯化的 6 株 BmIFN+12 和 4 株 BmIFN-3 感染 Bm-N 细胞,(感染细胞为对数生长期细胞),病毒与细胞之比为 2—5:1,感染后 3 天部分细胞死亡脱落,这时收集上清,测定其抗 VSV 活性,用国际单位标定,结果见表 1。重组病毒 BmIFN+12 在 Bm-N 细胞的最高表达水平为 2.0×10^5 IU/ml,而 BmIFN-3 的最高表达水平为 5.0×10^5 IU/ml。

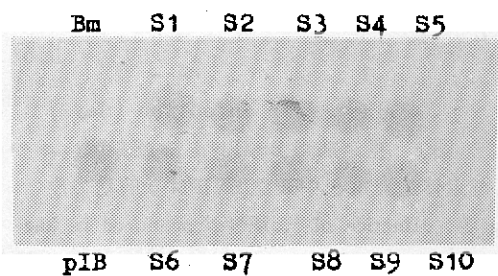


图 4 重组病毒 BmIFN+12 和 BmIFN-3 DNA 的点印迹杂交

Fig. 4 Dot bolt hybridization of recombinant BmIFN+12 and BmIFN-3
Bm, BmNPV DNA, pIB, pIB DNA, S1-S6, BmIFN+12, S7-S10, BmIFN-3

表 1 BmIFN+12 和 BmIFN-3

在 Bm-N 细胞的表达水平

Table 1 Production of BmIFN+12 and BmIFN-3 Bm-N cells

BmIFN+12 virus	IFN activity (IU/ml)	BmIFN-3 virus	IFN activity (IU/ml, $\times 10^5$)
1	0	1	1.0
2	2.0×10^5	2	5.0
3	5.0×10^5	3	5.0
4	2.0×10^6	4	2.5
5	1.0×10^6		
6	5.0×10^5		

5.0×10^7 IU/ml (见图 5); BmIFN-3 也在第 4 天达到最高表达水平, 为 2.5×10^7 IU/ml (资料未列出)。说明 BmNPV 通用表达载体 pBm92 构建是成功的。

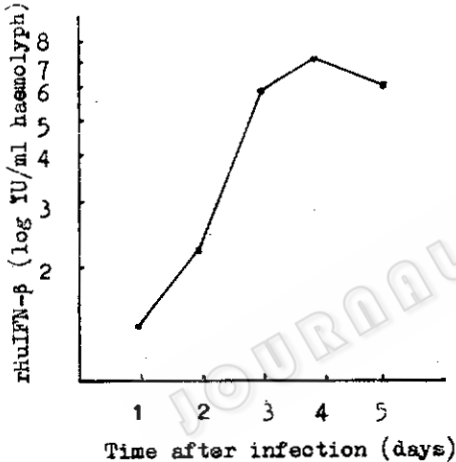


图 5 重组病毒 BmIFN+12 感染家

蚕虫体后血淋巴中表达 HuIFN-β 的动力学

Fig. 5 Kinetics of HuIFN-β produced in haemolymph of silkworm larvae infected with recombinant BmIFN+12

2.5 rHuIFN-β 的鉴定

收集的 BmIFN+12 感染家蚕的血淋巴, 以 10 000r/min 离心 5 分钟, 用 DMEM 培养基稀释到 5 000IU/ml, 然后分别与 500IU/ml 的 HuIFN-β 抗体和 HuIFN-α 抗体等体积混合, 37℃温育 1 小时后用于保护 Hep-2 细胞, 6 小时后用 VSV 攻击, 被 HuIFN-β 抗体中和的 rHuIFN-β 无保护作用, 不用抗体处理的 rHuIFN-β 和用 HuIFN-α 抗体处理的 rHuIFN-β 都有保护作用。说明 BmIFN+12 感染的家蚕生产的 rHuIFN-β 具有天然 HuIFN-β 的抗原性。经 C8 反相柱、CM 离子交换柱层析和疏水柱层析分离的虫体表达 rHuIFN-β, 用 SDS-PAGE 电泳也表

将 BmIFN+12 和 BmIFN-3 分别用于家蚕虫体表达 HuIFN-β。选用 5 龄蚕, 注射 3—5μl 病毒溶液到蚕体, 大约含病毒粒子为 $(3-5) \times 10^5$ pfu, 注射后于室温下桑叶饲养, 分别于感染后第 1、2、3、4 和 5 天测定蚕血淋巴液中 IFN 活性, 为了克服蚕个体间差异, 每次收集 10 条蚕的血淋巴液。感染重组病毒后第 4 天, 血淋巴液中 IFN 活性最高, 收取量较多; 感染后第 5 天, 死蚕大量增加, 血淋巴液收取量少, BmIFN+12 在第 4 天达最高表达水平, 为

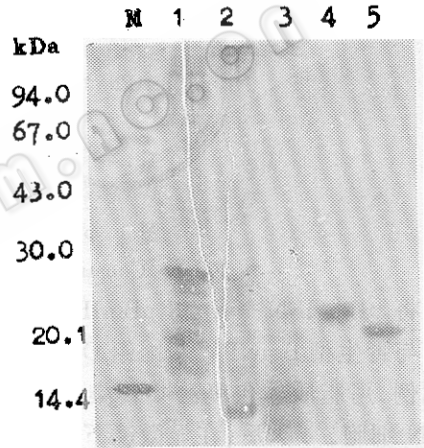


图 6 家蚕细胞和虫体表达的

rHuIFN-β 的 SDS-PAGE 结果

Fig. 6 SDS-PAGE result of rHuIFN-β expressed in Bm-N cells and silkworms: M. Protein standard molecular weight, 1. Sample produced in silkworm, 2. Sample produced in Bm-N cells, 3. Sample purified with C8 RP HPLC, 4. Purified rHuIFN-β produced in silkworm, 5. rHuIFN-β expressed in *E. coli*.

明其分子量明显大于大肠杆菌表达的 rHuIFN- β , 约为 23kDa (见图 6), 与报道的天然 IFN- β 类似。

3 讨 论

Smith 等^[7]和我们曾经用 AcNPV 载体和秋粘虫 (*Spodoptera frugiperda*, Sf) 细胞表达体系成功地表达了人 β -干扰素^[5]。使用 Sf 细胞生产 HuIFN- β 费用较高, 操作繁琐。虽然 AcNPV 表达载体也能在活虫体进行表达, 但大多数虫体较小, 而且没有成熟的饲养技术。家蚕饲养却有成熟的技术可利用, 价格低廉。使用 BmNPV 作为表达载体, 在国内使用的通用载体都是利用国外有关实验室构建的载体^[8], 在载体设计构思上都是利用八十年代初期对多角体蛋白基因表达调控的研究结果。近几年人们发现保留多角体蛋白基因起始密码 ATG 及其下游一段序列对外源基因的 mRNA 的稳定性和 mRNA 与核糖体的结合更有利^[9], 但是, 如果直接将外源基因克隆在 ATG 的下游, 表达出的外源蛋白就为融合蛋白, 必将影响外源蛋白的生物活性和抗原性。基于这种观点, 我们构建的 pBm92 通用载体, 将多角体蛋白基因的 ATG 改为 ATT, 并保留了结构基因的 12 个碱基对, 这样表达出的 HuIFN- β 仍为非融合蛋白。我们将这一载体和 pBm030 进行了同步比较, 从我们获得的结果看, 用 pBm92 载体获得的重组病毒, 其表达水平高于 pBm030 载体获得的重组病毒, 至少可以说 pBm92 载体对于表达 HuIFN- β 基因是适宜的。

HuIFN- β 是一种具有高度生物活性的糖蛋白, 在动物细胞的最高表达水平为 5×10^6 IU/ml。我们使用 pBmIFN+12 载体获得的重组病毒在家蚕虫体能获得 5.0×10^7 IU/ml 血淋巴的表达水平, 这是迄今为止 HuIFN- β 在真核表达系统获得的最高表达水平, 而且价格远比细胞培养低廉, 我们的实验表明, 不仅感染的家蚕血淋巴中 rHuIFN- β 含量极高, 而且整条蚕体都含有 rHuIFN- β , 将整条蚕匀浆后, 加 PBS, 离心后取上清测定 IFN 活性仍达 $(2.0 - 5.0) \times 10^6$ IU/ml (具体资料未列出), 说明整个蚕体都是可利用材料, 由此看来, 利用家蚕生产外源蛋白是一条可取的途径。

参 考 文 献

- [1] 邓继先、肖成祖. 生物技术通讯, 1993, 4(3): 101.
- [2] Huriuchi T, Marumoto Y, Saeki Y *et al.* Agric Biol Chem, 1987, 51(6): 1573.
- [3] Webb N R and Summers M D; Technique-A Journal of Methods in Cell and Molecular Biology, 1990, 2: 173.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F and Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, New York: Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989. pp. 1. 21.
- [5] 邓继先、卢建申、杨 琴等. 军事医学科学院院刊, 1994, 18(1): 53.
- [6] Maeda S, Kawai and T, Obinata M *et al.* Nature, 1985, 315: 592.
- [7] Smith G E, Vlak J M and Summers M D. Mol Cell Biol, 1983, 3: 2156.
- [8] 储瑞银、宓怡德、吕鸿声等. 生物化学与生物物理学报. 1990, 22(4): 385.
- [9] Lanford R E, Luckow V and Kennedy R C *et al.* J Virol, 1989, 63(4): 1549.

High Level Expression of the Human Beta-interferon Gene in the Silkworm with New Constructed BmNPV Vector

Deng Jixian Wang Shaofei Yang Qin Cheng Xu Li Lin

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract The *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) and *Bombyx mori* cells as well as silkworm larvae were used successfully for production of biologically active recombinant proteins. But the types of BmNPV general vectors are fewer. Therefore, new type vector plasmid pBm92 was constructed in this experiment. The translational initiation codon ATG of the polyhedrin gene in pBm92 was changed into ATT, then five cloning sites of foreign gene ligated after +12 bp of polyhedrin gene. Human beta-interferon(HuIFN- β)gene was cloned into pBm92, constructing pBmIFN+12; meanwhile we constructed the transfer vector pBmIFN-3 in which HuIFN- β gene was cloned after -3 bp of the polyhedrin gene. Two types of transfer vector DNAs and BmNPV genomic DNA were cotransfected Bm-N cells respectively. Recombinant viruses were screened with the character of recombinant viruses no producing polyhedrin in the virus plaque assay, and identified by the hybridization of recombinant virus DNA with HuIFN- β gene probe. IFN activity of media of Bm-N cells infected by recombinant virus BmIFN+12 was 2.0×10^6 IU/ml, and IFN activity of haem lymph of silkworm larvae infected by BmIFN+12 was 5.0×10^7 IU/ml. Expression level of BmIFN+12 was more than 2-4 times that of BmIFN-3. rHuIFN- β produced by Bm-N cells and silkworm larvae has the antigenity identical to the native HuIFN- β .

Key words BmNPV, transfer vector, human beta-interferon, gene expression.