

失活 *ChiA* 和 *v-cath* 基因的重组 BmNPV 表达 hGM-CSF*

贡成良** 薛仁宇 曹广力 石晓燕 沈卫德

(苏州大学生命科学学院, 苏州 215123)

摘要 利用 DNA 同源重组技术使家蚕核型多角体病毒的多角体蛋白基因取代 *v-cath*、*ChiA* 两基因的部分编码区域和共同的启动子区域, 获得了 *v-cath*、*ChiA* 两基因同时失活的、可形成多角体的、并能表达人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子的重组病毒 BmNPVpolh⁺CP-*ChiA*-GMCSF⁺. 研究结果显示: *v-cath*、*ChiA* 两基因的失活不影响病毒的复制及多角体的形成, 但感染细胞的存活时间比野生病毒感染得多 2 天, 可明显改善外源基因在培养细胞和家蚕中的表达水平; 感染 BmNPV polh⁺CP-*ChiA*-GMCSF⁺的家蚕幼虫体表保持正常, 无野生病毒感染后引起的破皮流脓现象.

关键词 家蚕核型多角体病毒, 半胱氨酸蛋白酶, 几丁质酶, 人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子

学科分类号 Q 786

昆虫杆状病毒是一种被广泛应用的真核表达载体, 它以其无限的开发潜力一直为众多的学者和科研人员所关注. 许多实验室致力于完善和开发昆虫杆状病毒表达载体系统, 对杆状病毒的基因组结构进行大量而细致的研究, 期望能通过基因改造等方式使该系统更有效、更安全、更方便地为人们所用. 业已明确, 核型多角体病毒(nucleopolyhedrovirus, NPV)的半胱氨酸蛋白酶基因(*v-cath*)为病毒复制非必需基因, 其氨基酸序列与木瓜蛋白酶超家族的半胱氨酸蛋白酶具有同源性, 特别是与在组织蛋白酶 B、H、L、S、木瓜蛋白酶之间保守的残基有很高的同源性, 认为该酶与宿主组织细胞降解有关, 在病毒水平传播中起重要作用^[1-3]. V-CATH 向昆虫血淋巴释放与杆状病毒的 fp25k 基因有关, fp25k 基因失活后, 释放到血淋巴中的 V-CATH 减少, 从而导致感染昆虫死后组织降解减轻^[4]. V-CATH 具有组织蛋白酶 L 样的序列, 底物专一性与组织蛋白酶 B 类似^[5, 6], 缺失 *v-cath* 基因的重组家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)可有效地提高荧光素酶和人生长激素在家蚕中的表达水平^[7], 培养细胞中加入蛋白酶抑制剂可以改善外源基因的表达水平^[8]. 已在多种杆状病毒的基因组中检测到几丁质酶(*ChiA*)基因编码的序列^[2, 9-11], 其氨基酸序列与来自灵菌(*Serratia marcescens*)的 *ChiA* 有 50%左右的同源性, 同时具有内切和外切几丁质酶活

性^[12, 13], 其主要功能是与 *v-cath* 基因一起作用, 导致感病虫体的液化, 促使病毒释放出体外引起另一轮感染^[14]. Hom 等^[15]报道, 杆状病毒的 *ChiA* 扮演 V-CATH 前体的分子伴侣, 当缺乏功能性 *ChiA* 基因的病毒感染细胞时, V-CATH 前体将不能被加工, 在内质网中形成不溶性的聚集体. 苜蓿斜纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)的 *ChiA* 在 C 端具有 KDEL 基序, *ChiA* KDEL 基序缺失的重组病毒对昆虫的致病力增强^[16]. 绝大多数杆状病毒具有 *v-cath* 及 *ChiA* 基因, 但在黎豆夜蛾核型多角体病毒(*Anticarsia gemmatilis* multicapsid nucleopolyhedrovirus, AgMNPV)^[17]和茶小卷(叶)蛾颗粒体病毒(*Adoxophyes orana* granulovirus, AdorGV)^[18]基因组中并没有发现 *v-cath* 及 *ChiA* 基因的同源序列.

为了进一步探讨缺失 *cath*、*ChiA* 两基因的作用, 我们构建了能形成多角体的、*v-cath* 和 *ChiA* 两基因同时失活、并能表达人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(hGM-CSF)基因的重组家蚕核型多角体病毒 BmNPVpolh⁺CP-*ChiA*-GMCSF. 研究表明, *v-cath*、*ChiA* 两基因的失活不影响病毒的复制及多

*国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2004AA2Z1020).

** 通讯联系人.

Tel: 0512-65880183, E-mail: chlgong@tom.com

收稿日期: 2005-04-12, 接受日期: 2005-06-30

角体的形成, 且感染细胞的存活时间比野生 BmNPV 感染的多存活 2 天, 外源基因的表达水平有明显改善.

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pBluescriptII SK (+)、受体菌 TG₁、BmNPV 苏州株(BmNPV_{SU})、含有 BmNPVsu *ChiA* 基因的质粒 pBmChiA^[19]、含有 BmNPVsu *v-cath* 基因的质粒 pBmCP^[20]以及家蚕 Bm 细胞株为苏州大学生命科学学院保存; 含有 BmNPV 多角体蛋白基因(*polh*)及其启动子的 pBmpolh 质粒由浙江大学昆虫研究所张传溪教授馈赠; BmNPV-hGMCSF (BmNPV 中的 *polh* 基因的编码区域被 hGM-CSF 基因所取代)、TF₁ 细胞株由浙江大学生物化学研究所提供; 限制性内切酶 *Sal* I、*EcoR* V、*Hind* III、*EcoR* I、*Xba* I、*Taq* DNA 聚合酶为 GIBICO BRL 公司产品; T4DNA 连接酶、Klenow 酶为 Boehringer Mannheim 公司产品; TC-100 培养基、胎牛血清(FBS)为 GIBICO BRL 公司产品; 多聚阳离子脂质体转染试剂(DOSPER)为 Boehringer Mannheim 公司产品; hGM-CSF 标准品购自 Schering-plugh 公司.

1.2 引物设计与合成

引物 GMCSF₁ 为 5' CGGATATCATGTGGC-TGCAGAGCCTGC 3'(下划线示 *EcoR* V 酶切位点), GMCSF₂ 为 5' CGGGTACCTCACTCCTGGACTGGCTCCC 3'(下划线示 *Kpn* I 酶切位点); 根据 BmNPVsu 的 *ChiA* (GenBank 上的序列登记号为 AY616663)和 *v-cath* (GenBank 上的序列登记号为 AY616664)基因序列设计引物. 引物 ChiA₃ 为 5' CAGAATTCATGTTGTACAAATTGTTAAAC 3'(下划线示 *EcoR* I 酶切位点)、ChiA₅ 为 5' ATCGGATCCAAATACTGCAG 3'(下划线示 *Bam* H I 酶切位点)、引物 *v-cath*₃ 为 5' GCCTCGAGTTAATAAATGACTGCAG 3'(下划线示 *Xho* I 酶切位点)、引物 *v-cath*₅ 为 5' TGAAGCTTGTGTAAGAGCGCGG 3'(下划线示 *Hind* III 酶切位点), 重组病毒鉴定引物 ChiA 为 5' GTTTAACAATTTGTACAACAT 3'(与 *ChiA* 基因起始密码 ATG 至下游 21 位间的序列互补), *v-cath* 为 5' CCGCGCTCTTTACAAC 3'(与 *v-cath* 基因起始密码 ATG 下游 37~52 位间的序列互补). 所有引物由上海生工生物工程有限公司合成.

1.3 方法

1.3.1 重组杆状病毒转移载体的构建. 重组杆状病毒转移载体 pBmChiA-polh-CP 的构建过程如下: 以 pBmChiA 质粒 DNA 为模板, 用特异性引物 ChiA₃/ChiA₅ 进行 PCR 扩增, 将扩增出的 *ChiA* 片段(1.7 kb)经 *Bam* H I /*EcoR* I 双酶切后, 克隆进 pBluescript II SK(+)质粒的 *Bam* H I /*EcoR* I 位点, 从而获得重组质粒 pBmChiA-2. 同样, 用引物 *v-cath*₃/*v-cath*₅ 对 pBmCP 质粒 DNA 进行 PCR 扩增, 获得 *v-cath* 片段(1.0 kb), *Hind* III/*Xho* I 双酶切后克隆进 pBmChiA-2 的 *Hind* III、*Xho* I 位点, 获得的 pBmChiA-CP 质粒. 用 *Sal* I 从 pBmpolh 上切出带有 *polh* 基因的片段(1.4 kb), 经 Klenow 酶补平后, 与用 *EcoR* V 切割后的 pBmChiA-CP 连接, 连接产物转化大肠杆菌, 快抽质粒进行鉴定, 获得重组转移载体 pBmChiA-polh-CP, 其图谱如图 1 所示.

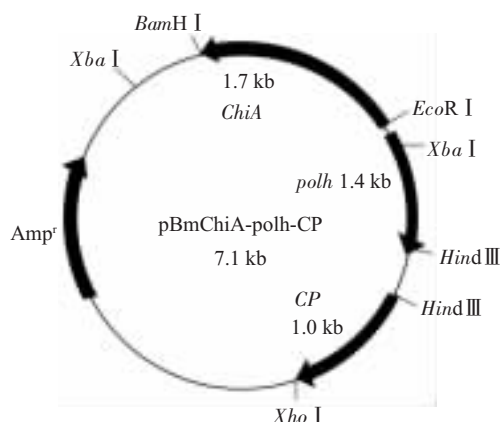


Fig.1 The map of recombinant transfer vector pBmChiA-polh-CP

1.3.2 重组病毒的筛选、鉴定. 重组转移载体 pBmChiA-polh-CP 2 μg 和 BmNPV-hGMCSF DNA 1 μg 利用 DOSPER 共转染于家蚕细胞, 待 7 天发病后收集上清, 感染细胞 5 天后, 依空斑法经过二轮筛选获得形成多角体的空斑, 经细胞扩增后, 以抽提的细胞总 DNA 作为模板, 用引物对 GMCSF₁/GMCSF₂ 和 ChiA/ *v-cath* 进行 PCR 检测, 获得重组病毒 BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺.

1.3.3 细胞表达. BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺及 BmNPV-hGMCSF、BmNPV 在家蚕培养细胞中传代, 用 5 MOI (multiplicity of infection, 感染复数) 的病毒感染 1×10⁶ 个家蚕培养细胞, 27℃培养 72 h

后收集上清, 12 000 r/min, 离心 10 min 去除杂质, 分装密封后置于 4℃ 保存.

1.3.4 家蚕整体表达. 病毒液(10^6 空斑数)皮下接种 5 龄起蚕(浙蕾×春晓), 25℃ 正常饲养, 120 h 后, 取血淋巴依 MTT 法^[21]测定 hGM-CSF 的表达水平. 家蚕血淋巴经 3 000 r/min 离心 5 min 后, 取上清与等体积 $2 \times$ SDS 凝胶上样缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L 二硫苏糖醇, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油)混合后, 100℃ 煮沸 5 min, 取 10 μ l 进行 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测.

2 结果与分析

2.1 重组杆状病毒转移载体的构建

按 1.3.1 的策略构建重组杆状病毒转移载体 pBmChiA-polh-CP. 限制性内切酶位点分析表明, BmNPV 的 *polh* 基因内含有 *Hind* III (1 370~1 376)、*Xba* I (339~345) 等酶切位点, pBmChiA-CP 质粒载体的 *Bam*HI 位点上游 11 bp 处也有一个 *Xba* I 位点, 所以对重组转移载体 pBmChiA-polh-CP 分别用 *Eco*R I、*Xba* I、*Hind* III 进行酶切鉴定. 结果显示: 分别用 *Hind* III、*Eco*R I 酶切可检测到一条约 7.0 kb 大小的条带, 用 *Xba* I 可切出约 5.0 kb 和 2.0 kb 大小的两条片段, 说明 *polh* 基因已经成功插入到转移载体 pBmChiA-CP 内, 且插入的方向与 *v-cath* 基因的一致.

2.2 重组病毒的筛选与鉴定

重组转移载体 pBmChiA-polh-CP 和 BmNPV-hGMCSF 共转染家蚕细胞, 共转染细胞培养上清感染细胞 5 天后, 通过空斑法二轮筛选, 获得含多角体的空斑(图 2). 经细胞扩增后, 以抽提的重组病毒感染细胞总 DNA 作为模板, 用引物对 GMCSF₁/GMCSF₂ 进行 PCR 检测, 结果如图 3 所示, 在约 0.4 kb 处可检测到特异性条带, 同以 BmNPV-hGMCSF 为模板扩增出的片段(hGM-CSF 基因)大小一致. ChiA 引物与 *ChiA* 基因起始密码 ATG 至下游 21 位间的序列互补, *v-cath* 引物与 *v-cath* 基因起始密码 ATG 下游 37~52 位间的序列互补, 在 BmNPV 基因组中, 二引物之间约 120 bp, 当用引物对 ChiA/*v-cath* 对重组病毒感染细胞总 DNA 进行 PCR 检测时, 未扩增出约 120 bp 特异性序列片段, 但可特异性地扩增出 1.4 kb 左右的片段(图 3), 与试验设计预测的结果一致, 显示含有 *polh* 基因的片段(1.4 kb)已取代病毒 *ChiA*、

v-cath 两基因间的序列, 说明所获得重组病毒(BmNPVpolh⁺CP⁻ChiA⁻GMCSF⁺)能形成多角体、并带有 hGM-CSF 基因. 由于在 BmNPV 基因组中, *ChiA* 与 *v-cath* 两基因是以背靠背形式存在的^[1], 当 pBmChiA-polh-CP 与 BmNPV-hGMCSF 的 DNA 共转染家蚕细胞时, 通过同源重组, *polh* 基因取代 BmNPV-hGMCSF 中 *ChiA* 和 *v-cath* 两基因共同的启动子区域和部分编码区域, 因此, 所筛选出的空斑为 *v-cath* 和 *ChiA* 两基因同时失活、并能表达 hGM-CSF、同时可形成多角体的重组病毒.

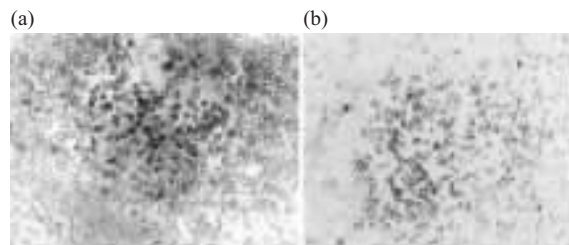


Fig.2 Plaque of the recombinant baculovirus
(a) BmNPV polh⁺CP⁻ChiA⁻GMCSF⁺; (b) BmNPV-hGMCSF.

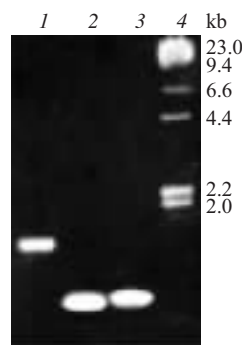


Fig.3 Identification of the recombinant baculovirus by PCR

1: BmNPVpolh⁺CP⁻ChiA⁻GMCSF⁺ was identified by PCR with primers ChiA/*v-cath*; 2: BmNPVpolh⁺CP⁻ChiA⁻GMCSF⁺ was identified by PCR with primers GMCSF₁/GMCSF₂; 3: BmNPV-hGMCSF was identified by PCR with primers GMCSF₁/GMCSF₂; 4: DNA marker (λ /HindIII).

SDS-PAGE 结果如图 4 所示. BmNPV-hGMCSF 感染的家蚕血淋巴在 23 ku 处可检测到特异条带, 与文献(专利申请号: 98124614.1)报道的重组病毒在家蚕表达的 hGM-CSF 分子质量相近, 推测为表达的糖基化的重组 hGM-CSF; BmNPVpolh⁺CP⁻ChiA⁻GMCSF⁺ 感染的家蚕血淋巴除在 23 ku 处可检测到特异条带外, 在 29 ku 处也可检测到特异性的多角体蛋白条带, 进一步表明 BmNPVpolh⁺CP⁻ChiA⁻GMCSF⁺ 既可表达 hGM-CSF, 又可形成多角体蛋白.

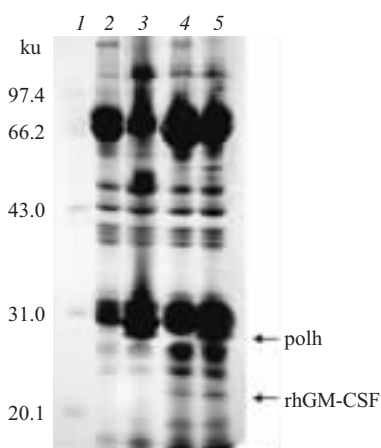


Fig.4 SDS-PAGE of hemolymph from silkworm larva infected with the recombinant baculovirus

1: Standard marker; 2: Hemolymph from ordinary silkworm larva; 3: Hemolymph from silkworm larva infected with BmNPV; 4: Hemolymph from silkworm larva infected with BmNPV-hGMCSF; 5: Hemolymph from silkworm larva infected with BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺.

2.3 细胞病变观察

BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺感染细胞后,表现出的细胞病变与 BmNPV 相类似,感染初期,细胞核膨大,第3天,细胞核内即可观察到多角体,第6天核内充满多角体.说明插入在 *ChiA* 及 *CP* 两基因启动子部位的 *polh* 基因能正确表达.从形成多角体数量来看, BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺与野生型 BmNPV 在细胞内形成的多角体数量并无明显区别,说明 *ChiA*、*v-cath* 两基因为病毒复制非必需基因,失活不影响多角体的形成.但从细胞存活时间来看, BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺感染的细胞存活 5.5~7 天,比 BmNPV、BmNPV-hGMCSF 感染细胞的存活时间长 2 天左右.

2.4 BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺感染家蚕幼虫

病毒穿刺接种家蚕五龄幼虫,其结果表明:感染 BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺、BmNPV 的蚕体,在病毒接种 72 h 后血淋巴中即可观察到多角体,但前者的血淋巴中的多角体数量明显少于后者.两种病毒所引起病蚕的症状并无明显区别,但从感染到死亡的时间二者有明显不同,在 25℃ 条件下, BmNPV 感染后约第 5 天死亡,而 BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺感染的蚕约 5.5~6 天死亡,死亡时间比 BmNPV 感染的蚕推迟半天到一天. BmNPV 感染的蚕发病时,蚕狂躁爬行,体皮易破泄脓,而 BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺感

染的蚕尽管也表现出狂爬,但体皮并不脆弱易破.

MOI 为 5 的 BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺、BmNPV-hGMCSF 和 BmNPV 分别感染家蚕细胞,72 h 后收集病毒液,涂抹新鲜桑叶,连续添食五龄起蚕 24 h (100 头/区, 25℃ 饲养)后,正常桑叶育,5 天后,添食 BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺和野生 BmNPV 的家蚕,分别有 62% 和 67% 的蚕发病,而添食 BmNPV-hGMCSF 的家蚕,仅有 7% 左右的发病率.

2.5 BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺表达 hGM-CSF 的水平

用 5 MOI 的病毒感染 1×10^6 个家蚕培养细胞,27℃ 培养 72 h 后收集上清,用 MTT 法测定 hGM-CSF 水平, BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺感染细胞上清中 hGM-CSF 活性为 6.94×10^5 U/ml,而 BmNPV-hGMCSF 感染细胞上清中的活性为 4.34×10^4 U/ml.

以 10^6 空斑数的 BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺接种 5 龄家蚕幼虫,120 h 后,取血淋巴测 hGM-CSF 的活性,每毫升血淋巴的表达水平达 5.4×10^6 U 左右,而 BmNPV-hGMCSF 在家蚕血淋巴中的表达水平约为 2.1×10^6 U.

2.6 hGM-CSF 在家蚕 BmN 细胞中的表达时相

将 BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺以 5 MOI 感染家蚕培养细胞,27℃ 培养,每隔 24 h 取细胞上清,测定 hGM-CSF 的活性,以不同时间 hGM-CSF 的活性对数作图,结果如图 5 所示.细胞接种 BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺24 h 后,其活性为 3.77×10^4 U/ml,到 72 h 活性达到最高,达 6.94×10^5 U/ml,感染 96 h 后其活性有所下降. BmNPV-hGMCSF 在细胞中的表达时相与

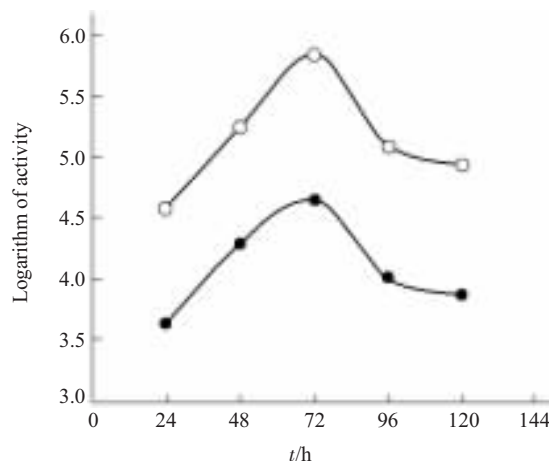


Fig.5 Expression phase of hGM-CSF in Bm cell

○—○: BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺; ●—●: BmNPV-hGMCSF.

BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺的类似,但在各个时点的表达水平明显低,表明 *ChiA*、*v-cath* 两基因失活后可改善外源基因的表达水平。

3 讨 论

业已明确,杆状病毒的 *v-cath*、*ChiA* 为病毒复制非必需基因,所编码的基因产物对宿主组织液化和降解有重要作用^[1-3, 14]。我们的研究结果显示, *v-cath*、*ChiA* 两基因同时失活的重组病毒 BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺感染家蚕所引起的症状与野生病毒有明显不同,感染野生病毒的家蚕,表皮易破泄脓,而 *v-cath*、*ChiA* 两基因失活的病毒感染的家蚕表皮保持正常,血淋巴中的多角体也明显少于野生病毒感染的家蚕,感染家蚕的死亡时间也有推迟的倾向。这一结果与 Ohkawa 等^[1]曾经报道的结果基本相似,可以认为杆状病毒编码的 V-CATH 和 *ChiA* 在降解表皮组、促进病毒多角体释放和加速病毒在宿主间的水平传播等方面发挥重要作用。除腺病毒 L3 的 23 ku 蛋白及人类免疫缺陷病毒 I 型蛋白酶外,所有已知的病毒编码的蛋白酶都发现或假设为与在加工过程中病毒多肽的专一性切割有关^[22, 23],但未发现在蛋白质降解中发挥重要作用。有试验表明,缺失 *v-cath* 基因的重组 BmNPV-CP-感染家蚕后,感染细胞抽提物中酸性蛋白酶的活性明显减少,推测杆状病毒编码的 V-CATH 不同于以往描述过的病毒半胱氨酸蛋白酶,也许可水解多种蛋白质底物^[1],暗示抑制 V-CATH 的活性可提高重组杆状病毒表达基因的水平。Suzuki 等^[7]的研究证实,失活 *v-cath* 基因,可改善重组 BmNPV 在家蚕中表达荧光素酶和人生长激素的水平。在细胞培养基中加入蛋白酶抑制剂也具有同样改善外源基因表达水平的效果^[8]。我们的研究结果显示: *v-cath*、*ChiA* 两基因同时失活的重组病毒可明显提高 hGM-CSF 的表达水平,其原因一方面是病毒自身编码的 V-CATH 的失活,减少了对外源基因表达产物的降解,使外源蛋白的表达量有了相对的提高。另一方面 *v-cath*、*ChiA* 两基因的失活延长了细胞^[24]、家蚕的存活时间,从而提高了外源蛋白的表达量。一般认为,无多角体的重组病毒经口感染蚕体的发病率非常低,但我们构建的重组病毒 BmNPVpolh⁺CP-ChiA-GMCSF⁺经口感染发病率达 60%以上,通过与其他方法结合有可能解决生产过程中无多角体病毒皮下接种所引起的问题,例如蚕的细菌性败血病发生率高,接种强度

大、效率低等。我们所构建的重组杆状病毒转移载体 pBmChiA-polh-CP 为通用型重组转移载体,用该载体与目前普通的无多角体重组家蚕核型多角体病毒的 DNA 共转染,筛选出形成多角体的重组病毒可以改善外源基因的表达。因为 *v-cath* 基因的失活,所以也减少了表达产物在贮藏加工过程中的降解。

参 考 文 献

- Ohkawa T, Majima K, Maeda S. A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. J Virol, 1994, **68** (10): 6619~6625
- Slack J M, Kuzio J, Faulkner P. Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. J Gen Virol, 1995, **76** (5): 1091~1098
- 贡成良, 小林淳, 宫岛成寿, 等. HcNPV 半胱氨酸蛋白酶基因的核苷酸序列. 生物化学与生物物理学报, 1998, **30** (3): 307~310
Gong C L, Kobayashi J, Miyajima N, et al. Acta Biochim Biophys Sin, 1998, **30** (3): 307~310
- Katsuma S, Tanaka S, Shimada T, et al. These results show that the release of cysteine protease into the hemolymph of *B.mori* larvae infected with fp25 K-mutated BmNPVs is reduced and, as a consequence, postmortem host degradation of infected insects is lessened. Arch Virol, 2004, **149** (9): 1773~1782
- Bromme D, Okamoto K. The baculovirus cysteine protease has a cathepsin B-like S2-subsite specificity. Biol Chem Hoppe-seyler, 1995, **376** (10): 611~615
- Rawlings N D, Pearl L H, Buttler D A. The baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome includes a papain-like sequence. Biol Chem Hoppe-seyler, 1992, **373** (12): 1211~1215
- Suzuki T, Kanaya T, Okazaki H, et al. Efficient protein production using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus lacking the cysteine proteinase gene. J Gen virol, 1997, **78** (12): 3073~3080
- Kato T, Takeomi M, Taichi U, et al. Improvement of GFPuv-βGnT₂ fusion protein production by suppressing protease in baculovirus expression system. Biosci Biotechnol Biochem, 2003, **67** (11): 2388~2395
- Ahrens C H, Russell R L Q, Funk C J, et al. The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. Virology, 1997, **229** (2): 381~399
- Kang W, Tristem M, Maeda S, et al. Identification and characterization of the *Cydia pomonella* granulovirus cathepsin and chitinase genes. J Gen Virol, 1998, **79** (9): 2283~2292
- 贡成良, 小林淳, 宫岛成寿, 等. 美国白蛾核型多角体病毒几丁质酶基因核苷酸序列研究. 病毒学报, 1999, **15** (3): 260~267
Gong C L, Kobayashi J, Miyajima N, et al. Chin J Virol, 1999, **15** (3): 260~267
- Hawtin R E, Arnold K, Ayres M D, et al. Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. Virology, 1995, **212**

- (2):673~685
- 13 Saville G P, Thomas C J, Possee R D, *et al.* Partial redistribution of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chitinase in virus-infected cells accompanies mutation of the carboxy-terminal KDEL ER-retention motif. *J Gen Virol*, 2002, **83** (3): 685~694
 - 14 Hawtin R E, Zarkowska T, Arnold K, *et al.* Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology*, 1997, **238** (2): 243~253
 - 15 Hom L G, Volkman L E. *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus chiA is required for processing of V-CATH. *Virology*, 2000, **277** (1): 178~183
 - 16 Saville G P, Patmanidi A L, Possee R D, *et al.* Deletion of the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus chitinase KDEL motif and *in vitro* and *in vivo* analysis of the modified virus. *J Gen Virol*, 2004, **85** (4): 821~831
 - 17 Slack J M, Bergmann M R, Marlinda L de S. The gp64 locus of anticarsia gemmatalis multicapsid nucleopolyhedrovirus contains a 3' repair exonuclease homologue and lacks *v-cath* and *ChiA* genes. *J Gen Virol*, 2004, **85** (1): 211~219
 - 18 Wormleaton S, Kuzio J, Winstanley D. The complete sequence of the *Adoxophyes orana* granulovirus genome. *Virology*, 2003, **311**(2): 350~65
 - 19 贡成良, 薛仁宇, 曹广力, 等. 家蚕核型多角体病毒几丁质酶基因. 蚕业科学, 2001, **27** (4): 283~286
 - 20 石晓燕, 马志明, 薛仁宇, 等. BmNPV 半胱氨酸蛋白酶基因的核苷酸序列研究. 苏州大学学报(自然科学版), 2003, **19** (1): 98~103
 - 21 贡成良, 金勇丰, 吴卫东, 等. 家蚕生物反应器表达 hGM-CSF 产业化若干问题的研究. 蚕业科学, 2002, **28** (3): 207~210
 - 22 Chen P H, Ornelles D A, Shenk T. The adenovirus L₃ 23-kilodalton proteinase cleave the amino-terminal head domain from cytokeratin 18 and disrupts the cytokeratin network of HeLa cell. *J Virol*, 1993, **67** (6): 3507~3514.
 - 23 Shoeman R L, Honer B, Stoller T J. Human immunodeficiency virus type 1 protease cleave the intermediate filament proteins vimentin desmin and glial fibrillary acidic protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (16): 6336~6340
 - 24 贡成良, 小林淳, 金伟, 等. HcNPV 半胱氨酸蛋白酶、几丁质酶基因失活分析. 生物化学与生物物理学报, 2000, **32** (2): 187~191
 - Gong C L, Kobayashi J, Jin W, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 2000, **32** (2): 187~191

hGM-CSF Expression by Using Recombinant BmNPV With Inactivated Chitinase and Cathepsin Genes*

GONG Cheng-Liang**, XUE Ren-Yu, CAO Guang-Li, SHI Xiao-Yan, SHEN Wei-De

(School of Life Science, Suzhou University, Suzhou 215123, China)

Abstract Obtained by homologous recombination of replacing part coding region and common promotor region of cathepsin (*v-cath*) and chitinase (*ChiA*) genes with polyhedrin gene, the recombinant baculovirus BmNPVpolh⁺CP⁻ChiA⁻GMCSF⁺, in which the *v-cath* and *ChiA* genes were inactivated, could express hGM-CSF gene and polyhedrin gene simultaneously. It was revealed that the inactivation of *v-cath* and *ChiA* genes had no significant effect on viral growth or polyhedron production in BmN cells, and the cells infected with the recombinant baculovirus BmNPVpolh⁺CP⁻ChiA⁻GMCSF⁺ survived 2 days more than those infected by BmNPV and BmNPV-hGMCSF, the expression level of foreign gene could be obviously improved. The *B. mori* larva infected with BmNPVpolh⁺CP⁻ChiA⁻GMCSF⁺ retained a healthy, normal white epidermis color, in contrast to the typical discoloration of the larval epidermis seen after death in wild-type BmNPV-infected larvae, whose cuticle becomes soft and easily punctured

Key words *Bombyx mori*, nucleopolyhedrovirus, cathepsin, chitinase, gene inactivation

*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China (2004AA2Z1020).

**Corresponding author. Tel: 86-512-65880183, E-mail: chlgong@tom.com

Received: April 12, 2005 Accepted: June 30, 2005