

- 1711
- 13 Tan K O, Myers A M, Robson R M *et al.* Mol Biol Cell, 1992; **3**: A253
 - 14 Takano-Ohmuro H, Nakauchi Y, Kimura S *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1992; **183**: 31
 - 15 Maroto M, Vinos J, Marco R *et al.* J Mol Biol, 1992; **224**: 287
 - 16 Benian G M, Kiff J E, Neckelmann N *et al.* Nature, 1989; **342**: 45
 - 17 Hu D H, Matsuno A, Terakado K *et al.* J Muscle Res Cell Motil, 1990; **11**: 497
 - 18 Nave R, Weber K. J Cell Sci, 1990; **95**: 535
 - 19 Kimura S, Matsuura T, Ohtsuka S *et al.* J Muscle Res Cell Motil, 1992; **13**: 39
 - 20 Flucher B E. Dev Biol, 1992; **154**: 245

以核多角体病毒为载体在家蚕中生产外源蛋白

张雨青

(苏州蚕桑专科学校, 苏州 215151)

摘要 以家蚕核多角体病毒 (BmNPV) 为载体, 在家蚕幼虫或家蚕培养细胞系中表达的外源基因越来越多, 其表达的产物已涉及到医用药物、医疗诊断、疫苗生产、生物防治等诸多领域。文章就 BmNPV 的特性及其基因组构造, 多角体蛋白基因的特性, 重组 BmNPV 的构建及其在家蚕幼虫体内和细胞系中的表达, BmNPV-家蚕表达系统的外源蛋白生产效率及其应用等各个方面作了全面、系统的综述。

关键词 家蚕, 家蚕核多角体病毒, 多角体蛋白基因, 基因表达, 重组病毒, 表达载体

近年来, 以昆虫杆状病毒作为表达载体已越来越受到人们的注意, 用这种杆状病毒为载体表达的外源基因已很多。所用的昆虫杆状病毒主要有苜蓿尺蠖多角体病毒 (AcNPV) 和家蚕核多角体病毒 (BmNPV)。与其他动物病毒表达系统相比, 这种鳞翅目昆虫 NPV 作为表达载体其优越性为: a. 这种杆状病毒有一环状双链的基因组; b. 杆状病毒对于脊椎动物和其他昆虫细胞是安全的; c. 有对这种病毒易感染的细胞系; d. 在强有力的多角体蛋白启动子转录控制下, 外源基因表达的水平高。而 BmNPV 表达系统比 AcNPV 更具魅力的原因在于应用家蚕幼虫的体内系统, 病毒易于增殖, 能大量生产外源蛋白。

1 家蚕核多角体病毒 (BmNPV)

BmNPV 属无脊椎动物杆状病毒科 (Baculoviridae), 杆状病毒属 (*Baculovirus*) A 亚组。BmNPV 能形成包涵体, 即常称为多角体 (图 1)^[1]。这种包涵体的蛋白基质, 主要由占病毒

包涵体蛋白总量 95% 以上的多角体蛋白 (polyhedrin) 所组成。多角体蛋白分子量为 28576, 也称 p29 蛋白。当家蚕幼虫食下包埋有病毒粒子的多角体后, 被中肠的碱性消化液溶解, 从而释放出病毒粒子。尔后, 病毒粒子就迅速地吸附于肠壁细胞, 而侵入到蚕体腔内, 进入血淋巴, 扩散感染到其他细胞进行增殖。另外, 病毒粒子也可直接经皮肤感染。在感染末期, 被合成的继代病毒再被包埋到包涵体内, 直至蚕死亡。

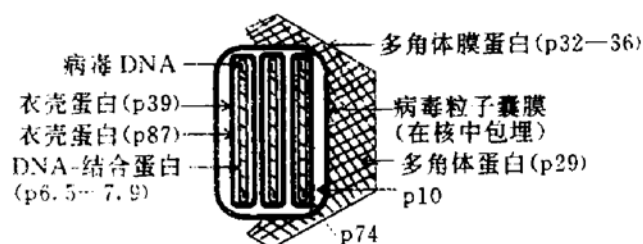


图 1 杆状病毒多角体的构造

BmNPV 基因组为超螺旋的闭环状双链 DNA, 长度约为 128kb, 约含有 100 多种编码不同蛋白的基因. 主要编码结构蛋白和非结构蛋白二类.

而多角体蛋白基因属非结构蛋白基因, 它编码 244 个氨基酸的多角体蛋白. 此基因在许多种 NPV 中是高度保守的. 其编码的多角体蛋白在细胞内形成包埋达数百个病毒粒子, 大小为数微米的多角体.

BmNPV 多角体蛋白基因是在感染末期有选择地进行表达的基因, 它编码的多角体蛋白与病毒粒子的形成没有直接关系, 只起到包埋病毒粒子以防溶解的作用. 因此, 将这个基因的全部或部分用其它外源基因取代后, 仍能形成有感染性的病毒粒子, 但它不能形成多角体. 利用这一特性, 插入基因标记物用光学显微镜观察是否有多角体形成. 这样就能容易地将重组病毒进行克隆和筛选.

BmNPV 多角体蛋白基因中不存在内含子, 转录起始是位于翻译开始 ATG 的上游 50bp 处, 编码区是编码 244 个氨基酸的多角体蛋白基因. 而多聚 A 附加信号 AATAAA 位于终止密码的下游约 350bp 处. 实际上, 保持起始密码上游序列和终止密码下游序列的完整性, 对转录活性的高低起重要的作用.

这种多角体蛋白基因有非常强的启动子, 在感染末期多角体蛋白已经达到被感染细胞内全部蛋白质 20%—30%.

目前, 除多角体蛋白基因以外, 对 p10 基因也有研究. p10 蛋白基因像多角体蛋白基因那样也是感染末期高水平表达的^[1]. p10 蛋白形成高密度的纤丝结构, 并存在于感染细胞的核和细胞质中. 还不清楚 p10 蛋白是否为多角体所必需组分, 但常常发现 p10 与多角体有联系, 可能在多角体被膜 (PE) 形成过程中起重要作用. p10 蛋白似乎与多角体蛋白一样受到相同的调控, 但从结构上看, 不像多角体蛋白那样保守. 近来, 应用 p10 基因在其他昆虫中表达外源基因已有报道^[2,3], 但用此基因在家蚕中表达外源基因还未见任何报道.

2 重组 BmNPV 的构建

由于 BmNPV 基因组很大, 约 128kb, 只需用野生型 BmNPV DNA 和含有外源基因的重组质粒载体共转染家蚕细胞系, 就能获得含有外源基因的重组 BmNPV. 目前, 用于构建重组 BmNPV 的载体有二类, 一类是单独表达外源基因 (即非融合基因) 的载体, 另一类是以融合基因 (即部分多角体蛋白编码序列与外源基因连接) 形成表达的载体. 这些载体通常都含有多角体蛋白基因前后各约 3kb 的序列, 此两片段间用于外源基因插入的多克隆位点, 以及抗生素抗性基因 (如氨苄青霉素 Amp^r) 和细菌质粒 (如大肠杆菌) 中的 DNA 复制起始点.

外源基因插入 BmNPV 的步骤如图 2 所示. 外源基因导入载体就产生重组质粒, 此质

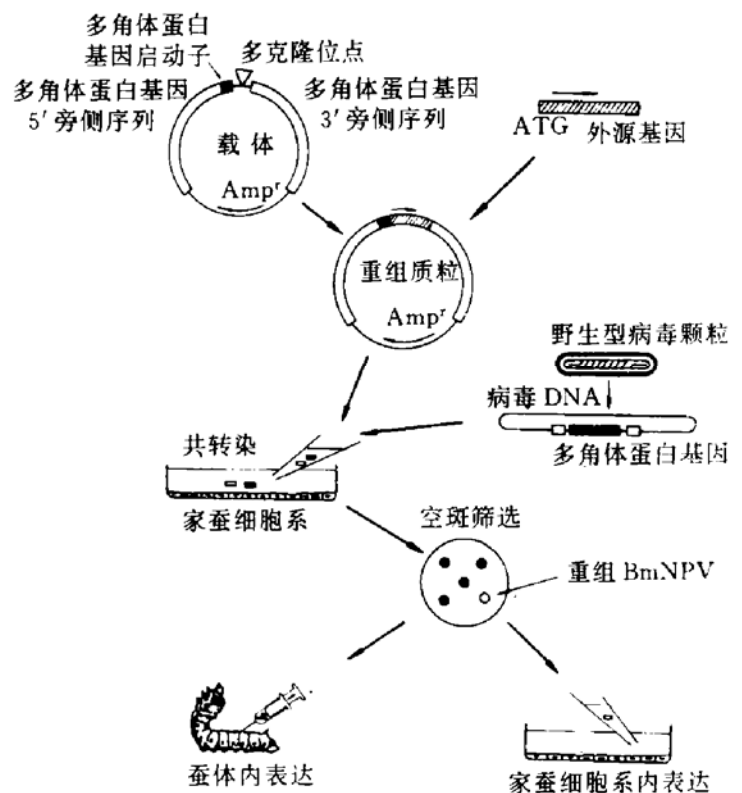


图 2 外源基因插入 BmNPV 的步骤

粒含有多角体蛋白基因的包括启动子在内的 5' 旁侧序列 (若含有部分多角体蛋白结构基因, 就成为融合基因) 和 3' 旁侧序列. 这样制作的重组质粒与野生型病毒 DNA 混合 (一般 DNA 摩尔比常为 50 : 1), 在家蚕细胞系 (如 BmN

细胞) 中进行共转染, 就可获得重组 BmNPV 病毒。

共转染是通过磷酸钙沉淀进行的, 这与转染其他真核细胞的方法相同。首先将 BmNPV 细胞放在 60mm 培养皿内进行单层培养, 每只培养皿约 10^6 个细胞, 然后再加入磷酸钙沉淀的上述 DNA 混合液 5ml。放置数小时至一昼夜后, 除去上清液, 将重组病毒用空斑法进行克隆。空斑的制作必需采用浓度为 0.75% 高纯琼脂糖, 以免琼脂糖中的不纯物毒害培养细胞。重组病毒的克隆是收集不形成多角体而显示出细胞病变的空斑。将此培养过程重复进行 2 次, 就能纯化到无野生型病毒株混入的重组病毒。重组的效率通常在 0.5% 左右, 范围从 0.1%—1% 不等。

3 在家蚕幼虫或家蚕细胞中外源基因的表达

家蚕幼虫一般用桑叶或人工饲料饲养。在 5 龄初, 注射 50 μ l 左右的重组病毒悬浊液约 10^5 — 10^7 PFU (空斑形成单位) 于蚕体腔内, 再饲养约 80h 后, 收集全部的血淋巴。若在培养细胞中表达的, 则收集培养液。经常规的离心、沉淀, 透析和色谱纯化等提纯手段, 纯化表达的外源蛋白。

4 家蚕生产外源蛋白的效率

以家蚕为寄主生产有用的外源基因产物有许多优点。蚕生长快, 从蚁蚕 (0.5mg) 开始发育到 5 龄蚕 (5g), 仅短短的 20d 时间其体重就增加 1 万倍, 而食下的桑叶只有 20g。蚕合成蛋白质的效率很高, 1d 内就可以合成几毫克的特种蛋白质。

家蚕比其他动物更易大量饲养, 成本低, 可用人工饲料作大规模的无菌饲养。

还有, 以重组 BmNPV 为载体的家蚕表达系统生产效率不仅比哺乳动物、大肠杆菌或酵母菌的产量高得多, 且表达的产物能向体外分泌, 进入蚕体液, 易于收集和分离。另外, 在家蚕中表达的外源蛋白生物活性高。

外源蛋白在家蚕系统中的表达效率大有潜力可挖。原来 BmNPV 病毒产物——多角体蛋白, 占感染细胞总蛋白的 20%, 在感染末期, 当其他蛋白降解后, 此比率随即提高到 50% 以上。家蚕 5 龄期生产的多角体蛋白约 20mg。而外源基因在家蚕中的表达量较低, 最高的也只占多角体蛋白量的百分之几。如前田等 (1985 年) 最早在家蚕中表达的人 α -干扰素效率比其他脊椎动物表达系统高 10 倍以上^[4], 但其量仍只占多角体蛋白量的 0.25% 左右。由此可见, 提高外源基因在家蚕中的表达效率将是今后进一步研究的重要内容。

影响外源基因在家蚕中表达效率的原因很多。其中, 在多角体蛋白基因 5' 端的启动子和转译起始密码子之间的序列为 71 个碱基对, 这在 AcNPV 和 BmNPV 中是高度保守的^[5]。如果在起始转译的上游去除 20 多个碱基后, 就会导致人 α -干扰素在家蚕幼虫和培养细胞中表达效率的剧烈下降^[6]。如前田等最初制作的载体为 p89B310, 因短少翻译起始上游 18bp 和终止密码下游 400bp, 故表达的效率较低。后经 Horiuchi 等 (1987 年) 改进, 使用 pBM030 质粒载体^[6], 尽可能地保留了多角体蛋白基因的 5' 和 3' 旁侧序列, 使人 α -干扰素的表达效率提高了 4 倍, 表达量达多角体蛋白的 1%。

以融合蛋白的形式在家蚕中的表达的效率较非融合蛋白要高得多。在多角体蛋白基因转译起始密码子下游的位点插入外源基因, 这样, 在家蚕幼虫或细胞系中表达的是融合蛋白 (含多角体蛋白 N 端序列的外源蛋白)。如 Sekine 等 (1988 年) 用家蚕 BmN 细胞系表达 HPV6bE2 蛋白时, 是与多角体蛋白 N 端 52 个氨基酸残基片段肽一起表达的^[7]。他们用 BmNPV E21 重组病毒感染家蚕培养细胞后, 其表达的 E₂ 融合蛋白量达到了野生型 BmNPV T3 感染的细胞系中生产多角体蛋白量的 2/3。这个表达效率显然是很高的。Maromoto 等 (1987 年) 以融合蛋白形式在家蚕中表达人体类胰岛素生长因子 II (IGF-II)^[8]。他们用 pBM030 载体构建的重组质粒 pFIGF II-120,

在家蚕中生产 IGF-Ⅱ 融合蛋白的量每头蚕为 3.6mg, 此值相当于多角体蛋白的 18%。又如 Morishita 等 (1991 年) 以融合蛋白形式在家蚕幼虫中表达的猿猴肉瘤病毒致癌基因 V-sis 蛋白的水平要比单独表达 (非融合蛋白) 高 3—4 倍^[9]。以融合蛋白形式表达的还有 BPV1E2 蛋白^[10], HTLV-1p40^x^[5] 等。

还有, 以 BmNPV 为载体在蚕体内表达的效率均比家蚕细胞系中表达的要高。如 Miyajima 等 (1987 年) 应用 pBE520-IL3 质粒载体在蚕体内表达的鼠白介素-3 (IL3) 的水平比在 BmN 细胞中高 500 倍^[11], 而比用 SV40 转染的猿猴 COS7 培养细胞表达的量高 1 万倍之多。Marumoto 等 (1987 年) 在蚕体表达的 IGF-Ⅱ 融合蛋白量每头蚕为 3.6mg, 而在 BmN 细胞中仅为 0.3mg/ml 培养基^[6]。Hideki 等 (1992 年) 在蚕体内表达的猪生长激素的产量高出哺乳动物或细胞系 10 倍左右^[12]。又如小林等 (1992 年) 用重组质粒 pBm4-799Bgl Ⅱ 在蚕体中表达的蛙 α -酰胺化酶的浓度是 BoMo-15A Ⅱ c 细胞系中表达的最大浓度的 100 倍^[13]。

另外, 表达的外源蛋白在最后的纯化过程会直接影响生产效率。如在蚕体内提取不彻底会直接降低外源蛋白的量。因此, Marumoto 等 (1992 年) 改进了以前用收集蚕体液的抽提方法^[8] 用整个感染的蚕体在水中匀浆后抽提^[14], 这样, 蚕体内表达的 IGF-Ⅱ 蛋白就能全部得到回收。

5 重组 BmNPV-家蚕系统的应用与展望

以 BmNPV 为表达载体在蚕体中生产外源蛋白的前景十分诱人, 是一项实用价值高, 经济效益巨大的生物工程。从目前已在家蚕或培养细胞内表达的外源蛋白来看, 主要有以下几方面的应用。

a. 药物 如已在家蚕幼虫或细胞系中表达的有人 α -干扰素^[4,6]、猫 α -干扰素^[15]、人 IL-3^[5]、鼠 IL-3^[11]、人和鼠 IL-4^[5] 等。据说生产 1g 人白介素价值 250 万元, 目前, 国外正在进入

实用化研究阶段。

b. 疫苗 日本国预防卫生研究所开发利用蚕生产流行性感宫的疫苗, 要比从鸡蛋中提取的成本低得多, 一头蚕生产的量相当于 10 只鸡蛋生产的疫苗量, 现正在进行实用化研究。国内储瑞银等 (1990 年) 也成功地用家蚕培养细胞表达出了乙型肝炎病毒表面抗原^[16]。而日本也正在加紧这种疫苗的实用研究。另外, BmNPV 系统也可用于医疗诊断。已在家蚕中表达的有 TLV-1 env 和 p40^x; HIV-1 gag; pol, sor, gp41 和 gp120^[5] 等。如小林和前田等表达的爱滋病病毒 HIV gp41 蛋白, 用免疫学方法对 109 例爱滋病患者和 50 例健康人进行血清试验, 结果能明确区分所有的爱滋病患者。所以, 在这一领域, 在本世纪末和下世纪初将会有很大的发展。

c. 促进生长的添加剂 如日本 Hideki 等 (1992 年) 为了降低猪生长激素的生产花费, 在 BmNPV 多角体蛋白基因启动子下游插入猪生长激素 cDNA, 结果在蚕体中生产出具有生物活性的猪生长激素^[12]。

d. 重要蛋白 在家蚕幼虫或细胞系中表达的有人载脂蛋白 A 和 E^[5], 牛乳头状瘤病毒 PV1E2 和 PV1E6^[10], 猿猴肉瘤病毒致癌基因 V-sis 蛋白^[9], hst-1 蛋白^[17] 等。如 Sekine 等 (1988 年) 表达的人乳头状瘤病毒 6bE2 蛋白是一种参与癌化的蛋白^[17]。所以, 生产这种蛋白有利于致癌机理的研究。又如 Morishita 等 (1991 年) 表达的猿猴肉瘤病毒致癌基因 V-sis 的产物^[9], 为癌病的研究提供了方便。

e. 基因表达研究 日本小林等 (1992 年) 应用 pBm4-799Bgl Ⅱ 重组质粒在家蚕幼虫中表达了蛙 α -酰胺化酶^[13]。这种酶能催化肽 C 端甘氨酸转化成具有生物活性的 C 端 α -酰胺化肽。通过此酶的表达可用于研究基因表达的载体系统。俄国学者 Kopylova-Sviridova 等 (1990 年) 应用重组 BmNPV 病毒, 在家蚕培养细胞中表达了 *Photinus pyralis* 虫萤光素酶基因, 结果产生了稳定的虫萤光素酶, 若用生物发光技术检测, 则既灵敏又快速^[18]。所以,

可用来研究病毒的增殖与基因的表达. 用于这一研究目的还有氯霉素乙酰转移酶和 β -半乳糖苷酶也已在家蚕中得到表达^[5].

此外, BmNPV-家蚕系统还能用于生物农药的研制. 如前田等(1991年)人工合成了一个编码澳洲蝎毒液的 AalT 毒素基因和家蚕毒素分泌信号前部序列, 然后把它插入 BmNPV 载体 pBK273 中, 在多角体蛋白启动子的控制下, 在感染的家蚕 BmN 细胞系和幼虫体中得到表达. 试验表明血淋巴中表达的 AalT 蛋白具有杀虫活力^[19]. 所以, 家蚕-BmNPV 表达系统用于杀虫基因的筛选, 对害虫防治的优化将提供新的手段.

目前, 世界上已有数百家大学或研究单位都在尝试用家蚕-BmNPV 系统生产各种有用的蛋白. 可以预计, 到本世纪末下世纪初, 许多对人类十分有用的蛋白将会用家蚕系统进行大规模的商业生产.

参 考 文 献

- 1 Rohrmann G F. J Gen Virol, 1992; **73**: 749
- 2 Gonnet P, Devauchelle G C R. Acad Sci Ser II, 1987: 111
- 3 Vlak J M, Klinkenberg F A, Zaal K J M *et al.* J Gen Virol, 1988; **69**: 765
- 4 Maeda S, Kawai T, Obinata M *et al.* Nature, 1985; **315**:

592

- 5 Maeda S. Ann Rev Entomol, 1989; **34**: 351
- 6 Horiuchi T, Marumoto Y, Saeki Y *et al.* Agric Biol Chem, 1987; **51** (6): 1573
- 7 Sekine H, Fuse A, Tada A *et al.* Gene, 1988; **65**: 187
- 8 Marumoto Y, Sato Y, Fujiwara H *et al.* J Gen Virol, 1987; **68**: 2599
- 9 Morishita K, Sakano K, Takeda K *et al.* J Biochem, 1991; **109**: 36
- 10 Tada A, Fuse A, Sekine H *et al.* Virus Res, 1988; **9**: 357
- 11 Miyajima A, Schreurs J, Otsu K *et al.* Gene, 1987; **58**: 273
- 12 Hideki K, Tamura T, Kato Y *et al.* Anim Sci Technol, 1992; **63** (4): 349
- 13 Kobayashi J, Imanishi S, Inoue H *et al.* Cytotechnology, 1992; **8** (2): 103
- 14 Marumoto Y, Teruuchi T, Enjoh T *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1992; **56** (1): 13
- 15 Toru S, Ueda Y, Sato M. J Vet Med Sci, 1992; **54** (3): 563
- 16 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
- 17 Miyagawa K, Sakamoto H, Yoshida T *et al.* Oncogene, 1988; **3**: 383
- 18 Kopylova-Sviridova T N, Gorelova T V, Krauzova V I *et al.* Dokl Akad Nauk SSSR, 1990; **312** (6): 1507
- 19 Maeda S, Volarth S, Hanzlik T *et al.* Virology, 1991; **184**: 777

V 型 H^+ -ATP 酶的分子结构及其药理学意义

蔡惠罗

(中国科学院动物研究所, 北京 100080)

摘要 V 型 ATP 酶广泛存在于细胞内膜系统, 如溶酶体, 内膜体, 高尔基体, 分泌颗粒等. V-ATP 酶水解 ATP, 建立跨膜质子电化学梯度 ($\Delta\bar{\mu}H^+$), 酸化细胞内外环境. 研究证明 $\Delta\bar{\mu}H^+$ 和酸化作用为细胞的内吞、外泌、膜流和物质转运等生理生化反应提供了必需的条件. V-ATP 酶在生命活动中的重要性和它的实际意义, 日益引起人们的兴趣与关注, 是当前 H^+ -ATP 酶家族中一个异常活跃的研究分支.

关键词 V-ATP 酶, 跨膜质子电化学梯度, 膜泡结构

system

The Fine Myofilament of Myofibril of Striated

Musale: Connectin. Chen Ming. (*Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 403—406

In the myofibril of striated muscle, there are three myofilaments: thick, thin, and fine myofilaments. Titin (connectin) is a giant elastic contractile protein, with molecular weight of 3000 kD and length of 0.9 μm , and forms fine myofilament extended from M-line to Z-line in the myofibril. It may play roles in maintaining thick myofilament in the middle of sarcomere, acting as molecular template for assembly of thick myofilament, and modulating the myosin activity.

Key words connectin (titin), fine myofilament, myofibril, striated muscle

Production of the Useful Protein in the Silkworm Using the *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus as a Expression Vector.

Zhang Yuqing. (*Suzhou Sericulture College, Suzhou 215151*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 406—410

More and more foreign genes have been expressed in the silkworm larvae or silkworm cell lines using the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) as a expression vector. The expressed products involve in many fields such as pharmaceuticals, medical diagnosis, vaccine production and biological control. The characteristics of BmNPV and its genome structure, characteristics of polyhedrin gene, construction of recombinant BmNPV and its expression in the silkworm larvae and cell line, and efficiency of production for the foreign gene products expressed in the silkworm-Bm-

NPV system and application of the expressed product were described systematically in the review.

Key words silkworm, *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, polyhedrin gene, gene expression, recombinant virus, expression vector

Structure and Phamacology of V-ATPase.

Cai Huiluo. (*Institute of zoology, Academia Sinica, Beijing 100080*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 410—414

V-ATPases are present in large numbers of organelles including lysosomes, endosomes, golgi complex and several secretory granules in animal cell. The function of V-ATPase is to generate protonmotive force and to cause limited acidification of the internal space of vacuolar system and extracellular compartments at the expense of ATP. The acidification and the electrochemical H^+ gradient formed by V-ATPase serve an improtant function in endocytosis, exocytosis, membrane traffic and transport systems of cells. In the families of H^+ -ATPases, increasing attention is being given to V-ATPase, about which much has been learned in recent years.

Key words V-ATPase, electrochemical proton gradient $\Delta\mu\text{H}^+$, vacuolar system

Progress of Interferon-Stimulated Genes (ISGs) Research.

Li Zhou, Fan Qixiu. (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 414—417

Interferon-stimulated genes (ISGs) is the central part of the research on interferon (IFN) function mechanism. After IFN binds to its receptor, through signal transducing in cyto-