

ject. These methods can not only detect genes regardless of their expression patterns, but also expand the size of the genomic region capable of being scanned for genes. Several new and old methods for were reviewed finding

new genes in positional cloning and discuss the advantages and limitations of them.

Key words new genes identification, positional cloning, human genome

构建重组杆状病毒的几种新方法

施先宗 陈曲侯

(华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430070)

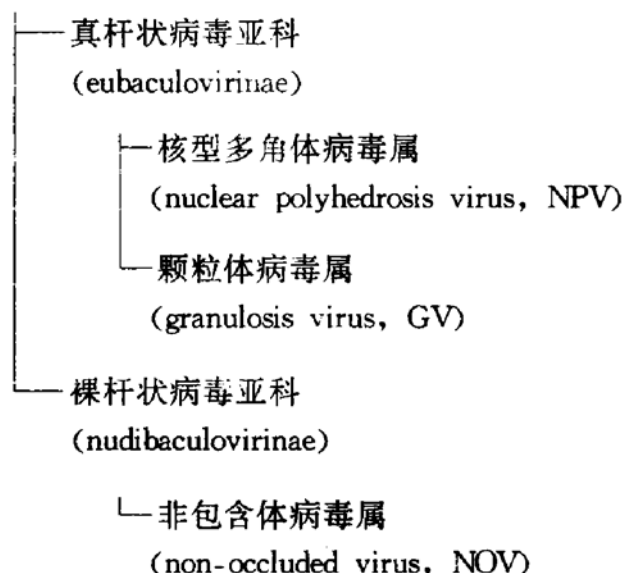
摘要 昆虫杆状病毒作为高效的表达载体, 现已广泛地用于各种外源基因的表达。但是, 用传统的方法构建重组杆状病毒, 存在着重组率低, 纯化难及耗时长等缺点, 围绕如何快速、简便、高效地构建重组杆状病毒, 近几年来人们进行了一些重大的改进, 包括使病毒 DNA 线状化以提高重组病毒的比例; 在体外进行重组; 同源重组和重组病毒的纯化与筛选在酵母和大肠杆菌中一次完成; 使重组病毒可以形成多角体等, 从而从根本上改变了传统方法中的不足。文章着重介绍了这几种新的改进方法。

关键词 重组杆状病毒, 重组率, 线状化, Cre-lox 系统, 转座子, 多角体

昆虫杆状病毒属杆状病毒科 (baculoviridae), 因其包埋于多角体中的病毒粒子呈棒状而得名。基因组由超螺旋的双链 DNA 组成, 大小为 88—160kb^[1]。根据国际病毒命名委员会第五次报告 (ICTV 5th Report, 1991), 杆状病毒科的组成情况如下:

杆状病毒科

(baculoviridae)



其中, 用作外源基因表达载体的杆状病毒目前仅限于核型多角体病毒属核型多角体病毒 (NPV)。

核型多角体病毒用作外源基因的表达载体, 通常是通过体内同源重组的方法, 用外源基因替代多角体蛋白 (polyhedrin) 基因而构建出重组病毒。这一构想最早由 L. K. Miller^[2]于 1981 年提出, 并由 Smith 和 Summers^[3]于 1983 年首次实现。他们在草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞 Sf9 中成功地表达出了人 β -干扰素。1985 年, Maeda 等^[4]用家蚕 (*Bombyx mori*) NPV 作表达载体, 在家蚕体内高水平地表达出了人 α -干扰素, 从而确证用杆状病毒作载体表达外源基因的可行性与高效性。国内的庞义等^[5]用粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) NPV 也高效地表达出了外源基因。

多角体蛋白基因的启动子很强, 在感染后期, 多角体蛋白量可占受染细胞蛋白总量的 50% 左右^[6]。用杆状病毒作表达载体, 正是将外源基因置于该启动子的控制之下, 所以外源

基因的表达量很高. 而且, 杆状病毒的安全性好, 不危害人畜的安全, 是世界卫生组织推荐的害虫防治的首选病毒 (FAO/WHO Report, 1973). 除此之外, 昆虫细胞可正确地进行 RNA 剪接^[7], 并可对表达产物进行正确的翻译后加工^[6], 这些优点, 使之成为一个不可多得的真核生物基因的表达系统. 正因如此, 已经有 200 多种外源基因在这一系统中得到了表达^[8].

构建重组杆状病毒, 其关键在于构建转移载体质粒. 经过十余年的努力, 人们已经构建出了大量的用于不同目的与不同需要的转移载体质粒. 其基本要点是在基础质粒 (如 pUC 质粒) 上插入多角体蛋白基因及其两端侧翼, 并在多角体蛋白基因启动子之下的编码区产生缺失, 去除编码序列, 然后在此缺失部位插入多接头 (polylinker), 用于外源基因的克隆. 图 1 示 Miller 等^[6]构建的转移载体质粒, 其中多角体蛋白基因的两端侧翼用于与病毒 DNA 进行同源重组. 重组杆状病毒构建的全过程如图 2 所示.

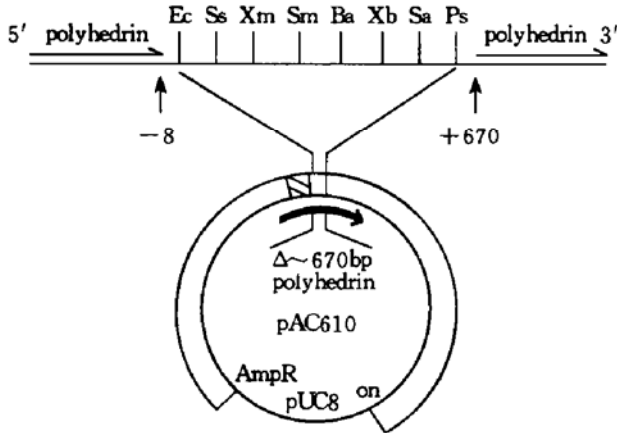


图 1 用于构建重组杆状病毒的转移载体质粒

图中空框示多角体蛋白基因两端之侧翼, 用于体内同源重组; 带线方框示多角体蛋白基因之启动子, 其下为克隆外源基因的多接头; 多角体蛋白基因的编码区约被缺失 670bp.

Ec: EcoRI; Ss: SstI; Xm: XmaI; Sm: SmaI;
Ba: BamHI; Xb: XbaI; Sa: SalI; Ps: PstI.

利用这种方法, 人们已经高水平地表达出了许多外源基因^[8], 但在技术上却存在着一些

明显的不足. 首先, 共转染率低, 而重组率则更低, 一般仅为 0.1%—1%. 这样, 会给重组病毒的纯化带来许多不便, 最主要是操作繁琐, 耗时长, 一般需要 4—6 周才能完成. 其次, 因为重组病毒不产生多角体, 不经过训练难以辨认出由重组病毒形成的空斑. 最后, 就是不能通过口服感染虫子而大规模地生产有经济价值的产品, 如若使用细胞培养的方法生产, 则生产成本势必将大幅度地增加. 为此, 近几年来, 人们在此基础上进行许多改进, 如在共转染时用脂质体而不用磷酸钙沉淀法以提高转染率^[9], 用 PCR 技术快速检测重组病毒^[10]等. 但是, 真正起了重大甚至根本改进的是下面介绍的几种方法. 这些方法的建立, 使杆状病毒基因工程的操作简便快速, 效果更好.

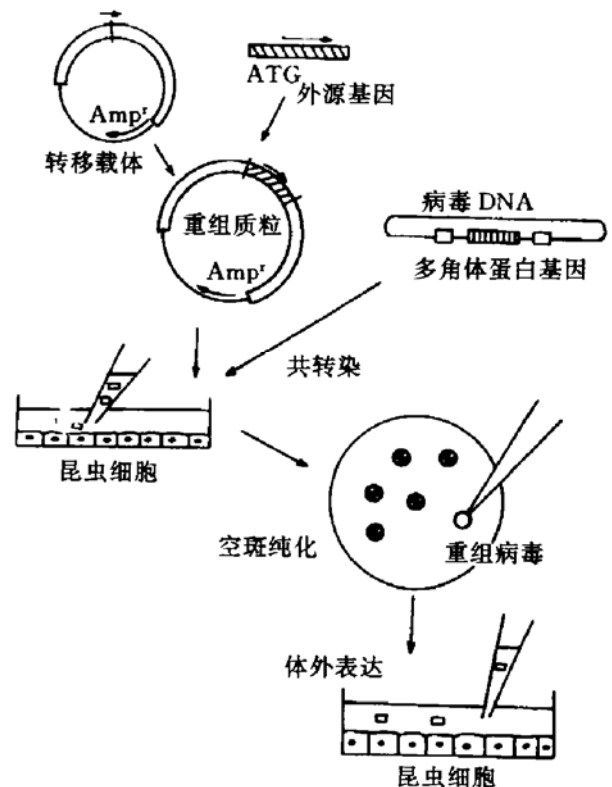


图 2 构建重组杆状病毒的流程图

1 将病毒 DNA 线状化

线状病毒 DNA 对昆虫细胞的侵染力比环状的 X 要低 5—150 倍^[11]. 因此, 将病毒 DNA

线状化,可以降低共转染时产生的非重组病毒的比例,结果,重组病毒的比例就会得到相应的增加.实现这一设想的关键在于要在杆状病毒的基因组中找到单一的酶切位点.但是,杆状病毒的基因组较大,很难满足这个要求. Kitts 等^[11]用许多商品酶消化苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) NPV (AcNPV) 的 DNA,最后才发现一种新酶 Bsu361 在 AcNPV DNA 中无酶切位点.于是,他们人工合成一段带 Bsu361 单一切点的寡聚核苷酸 [5' pGATCCCT (A, T) AGG 3'],插入转移载体 pAcRP6 多接头的 BamH1 位点,构建出新的质粒 pAcRP6. SC. 用 pAcRP6. SC 与 AcNPV DNA 共转染 Sf 细胞,通过正常的空斑法纯化出重组病毒 AcRP6. SC. 因为这种重组病毒只带单一的 Bsu361 酶切位点,所以可以将它作为亲本毒株,进行携带外源基因的重组杆状病毒的构建.

由于这种方法大大地降低了非重组病毒的比例,结果便重组病毒的比例增加了 10 多倍,在共转染后产生的子代病毒粒子中,约有 30% 的重组病毒.这样,使纯化工作大为简化. 1993 年他们又报道^[12],如果缺失掉杆状病毒基因组中多角体蛋白基因下游的一段必需片段,则可进一步将重组病毒的比例提高到 80% 以上.另外,在大肠杆菌的 β 半乳糖苷酶基因 (lacZ) 中也有一个 Bsu361 切点^[11],如果先构建出含 lacZ 的重组杆状病毒并用以作亲本毒株,然后再来构建带外源基因的重组病毒,则会使重组病毒的纯化更为简便,因为非重组病毒形成蓝色空斑,而重组病毒呈白色空斑.当然,这种方法还可以结合其它方法使用,但 Bsu361 价格不菲,是其不足.

2 应用 P1 噬菌体的 Cre-lox 系统

P1 噬菌体编码 Cre 重组酶 (Cre 为 causes recombination 字首缩写),其作用底物是 loxP (loxP 为 locus of crossover P1 之简写) 位点.如果杆状病毒基因组和转移载体质粒中含有 loxP 序列,则在 Cre 酶的作用下,重组病毒的

构建即可在体外进行.采用这一策略,Peakman 等^[13]成功地构建出了可以表达外源基因的重组杆状病毒.

Peakman 等首先人工合成一段含 lox 序列的寡聚核苷酸对,将它插入转移载体质粒中. lox 序列由两个 13bp 的反向重复核苷酸组成,中间间隔以 8 个核苷酸.用此质粒 DNA 与病毒 DNA 共转染 Sf 细胞,通过常规方法纯化出含 lox 序列的重组病毒 vAlox. 其次构建出含 lox 序列并可以克隆外源基因的质粒 polxZ. 该质粒以 Bluescript⁺ 为基础,有用于筛选的 lacZ,它置于另一个杆状病毒晚期超量表达基因 p10 启动子的控制之下.还有反向插入的多角体蛋白基因的启动子以及处于该启动子控制之下的用于克隆外源基因的 NheI 位点.构建携带外源基因的重组杆状病毒时,只需将 vAlox DNA 和带外源基因的 polxZ DNA 按一定的比例混合,加入 Cre 重组酶,37℃ 反应 30min,即可在体外将外源基因重组进 vAlox 中.重组后的杆状病毒 DNA 转染昆虫细胞,可以通过挑选蓝色空斑而纯化出重组病毒.

这种方法的优点在于:a. 由 Cre 重组酶介导的重组可在体外进行,高达 50% 的子代病毒为重组病毒;b. 引入的 lacZ 基因方便了纯化;c. 每微克起始质粒 DNA 可产生 5×10^7 个重组病毒,故该系统适于真核生物 cDNA 文库的表达检测.

以上两种方法存在着一个共同的缺点,就是重组病毒的纯化需要用空斑法在昆虫细胞中进行,所以操作起来仍然相当繁琐.如果能在大肠杆菌或酵母中扩增病毒 DNA,并且让同源重组也可以在其中进行,那么重组病毒的筛选就会变得快速简便. Patel 等^[14]与 Luckow 等^[15]采用这一策略,首先构建出所需要的不同的质粒和亲本毒株,然后分别在酵母和大肠杆菌中成功地构建出了表达外源基因的重组杆状病毒.

3 利用酵母系统

酵母的自我复制序列 (autonomously repli-

cating sequence, ARS) 能使含该序列的 DNA 在酵母中进行自我复制, 而 CEN 序列 (centromere) 则可行使有丝分裂着丝粒的功能, 使 DNA 稳定地分离成低拷贝数的质粒. 如果将这两种序列插入杆状病毒的基因组中, 则杆状病毒不仅能在昆虫细胞中扩增, 同时也可以在酵母中扩增. 据此, Patel 等^[14]首先构建出含 ARS 和 CEN 序列的重组病毒, 并以此作为亲本毒株进行携带外源基因的重组病毒的构建. 为了方便在酵母中筛选重组病毒, 他们还在亲本毒株中插入 URA3 和 SUP4-0 两个基因, 作为筛选标记. URA3 使尿嘧啶 (uracil) 依赖型菌株变成非依赖型, 而 SUP4-0 基因则是 tRNA^{Tyr} 基因赭石突变型的校正等位基因 (ochre-suppressing allele of a tRNA^{Tyr} gene). 在合适的酵母株中, 它可以用作正选择或负选择. Patel 等采用 ADE2 和 CAN1 基因发生赭石突变的酵母株. ADE2 编码腺嘌呤合成途径中的一种必需酶, 该基因的突变不仅使酵母株变成腺嘌呤依赖型, 而且还使腺嘌呤合成途径中的一种中间产物氨基咪唑核苷酸 (phosphoribosyl-amidazole) 累积, 使菌落变成粉红色. CAN1 编码精氨酸通透酶 (arginine permease), 使细胞对精氨酸的类似物刀豆氨酸 (canavanine, Can) 敏感. Can⁻突变型因不能合成精氨酸通透性酶而抗刀豆氨酸. 这样, 在 SUP4-0 的存在下, 酵母株不仅不依赖腺嘌呤, 而且还对刀豆氨酸敏感.

然后, 他们构建了可以在酵母中自我复制的转移载体质粒. 在该质粒中, 有多角体蛋白基因的启动子及多接头, 还有利于同源重组的一段 3kb 的多角体蛋白基因 5' 侧翼序列. 在此基础上, 将亲本毒株 DNA 与转移质粒 DNA 共同转化酵母的原生质体, 通过抗性筛选, 就会很方便地得到重组病毒 DNA. 用此 DNA 转染昆虫细胞, 即可得到重组病毒. 这套系统虽然建立过程比较复杂, 但应用起来却很简便. 因为它可在酵母中扩增病毒 DNA, 又可在酵母中进行同源重组, 而且还可以通过抗性筛选重组杆状病毒, 大大地简化了纯化过程和纯化

所需要的时间.

4 利用细菌 Tn7 转座子

Patel 等人的方法虽然快速简便, 但也存在着转化酵母效率低的问题. 沿着 Patel 等人的策略, Luckow 等人^[15]利用细菌 Tn7 转座子的作用, 将外源基因插入在大肠杆菌中扩增的杆状病毒基因组中的特异性位点 attTn7 上. 结果, 在 7—10d (天) 内就得到了纯净的重组杆状病毒. 其构建过程如下.

首先, 通过常规途径构建出杆状病毒穿梭载体 (baculovirus shuttle vector), Luckow 等特称之为 bacmid (baculovirus plasmid 首尾合写). Bacmid 实际上是一种既可在昆虫细胞中又可在细菌中复制的重组杆状病毒, 原来的多角体蛋白基因已为卡那霉素抗性基因 (Kan^r) 和 Tn7 转座子的靶位点 mini-attTn7 以及复制子 mini-F 所替代. 由于有 mini-F 的存在, 所以 bacmid 可以在大肠杆菌中呈低拷贝数复制. 然后构建出供体质粒. 供体质粒在 Bluescript⁺ 质粒的基础上构建而成, 它有 Tn7 的左右两臂, 两臂之间为多角体蛋白基因的启动子和多接头. 另外还有庆大霉素抗性基因 (Gen^r), 用以筛选转位后的 bacmid. 转位是在辅助质粒的协助下进行的. 最后, 就是用 bacmid 与供体质粒共同转化已经带有辅助质粒 (Tet^r) 的感受态细菌, 在含卡那霉素, 庆大霉素及四环素的琼脂培养基上筛选含外源基因的 bacmid, 并用 bacmid 转化昆虫细胞, 获得重组杆状病毒. 不言而喻, 这种方法比起传统的方法来, 更容易操作, 结果更可靠, 所耗时间更短.

5 产生多角体

以上介绍的几种改进方法也都还存在一个缺陷, 那就是形成的重组病毒不带多角体. 如果要大量地生产某种生物产品, 还必须采用细胞培养的方法进行. 但是, 培养细胞需要耗用大量的牛血清, 势必造成生产成本居高不下. 目前, 解决这个问题有两种途径. 一是研制昆

虫细胞的无血清培养基^[16], 另外就是构建可使重组病毒产生多角体的转移载体质粒, 使外源基因在昆虫体内表达. 为此, 王珣章等^[17]构建了 pSX1VV1⁺X3 系列质粒.

pSX1VV1⁺X3 系列质粒是在 pUC8 基础上构建的. 它具有完整的多角体蛋白基因及其两端侧翼, 还具有模拟杆状病毒晚期基因启动子结构的人工合成启动子和多角体蛋白基因的 XIV 启动子^[18], 并以反方向插入多角体蛋白基因的上游, 在人工启动子和 XIV 启动子之下插入了四种多接头, 一种不带 ATG, 三种带 ATG, 但阅读框不同. 亲本毒株用多角体蛋白基因被 *E. Coli* 的 lacZ 基因取代的 TnNPV. 这样, 共转染后产生的重组病毒具备多角体, 易于辨认; 而非重组病毒无多角体, 但可使培养基中的 X-gal 变蓝, 从而使纯化易于进行. 而且, 人工合成启动子的活性高于野生型, 结果外源基因的表达量提高了 3 倍.

由于重组病毒带多角体, 故可通过口服感染的方法在昆虫体内表达外源基因. 而且, 亲本毒株的 lacZ 基因中有单一的 Bsu361 酶切位点, 故可通过使病毒 DNA 线状化的方法来提高重组率, 从而使之应用起来更为方便.

参 考 文 献

- 1 Burgess S. J Gen Virol, 1977; **37**: 501
- 2 Miller L K. In: Panopoulos N J ed. Genetic engineering in the plant science, New York: Praeger Press, 1981: 203—235
- 3 Smith G E, Summers M D, Fraser M. J Mol Cell Biol, 1983; **3**: 183
- 4 Maeda S, Kawai T, Obinata M *et al.* Nature, 1985; **315**: 592
- 5 庞 义, 谢伟东, 陈其津, 龙策新等. 中山大学学报(自然科学版), 1987; **2**: 104
- 6 Miller L K. Annu Rev Microbiol, 1988; **72**: 177
- 7 Kovacs G R, Guarino L A, Graham B L *et al.* Virol, 1991; **185**: 633
- 8 Luckow V A. In: Prokop A, Bajpai R K, Ho C ed. Recombinant DNA technology and applications, New York: McGraw-Hill Press, 1991: 97—152
- 9 Hartig P C, Cardon M C. J Virol Methods, 1992; **38**: 61
- 10 Malitschek B, Scharl M. BioTechniques, 1991; **11**: 177
- 11 Kitts P A, Ayres M D, Possee R D. Nucleic Acids Res,

1990; **18**: 5667

- 12 Kitts P A, Possee R D. BioTechniques, 1993; **14**: 810
- 13 Peakman T C, Harris R A, Gewert D R. Nucleic Acids Res, 1992; **20**: 495
- 14 Patel G, Nasmyth K, Jones N. Nucleic Acids Res, 1992; **20**: 97
- 15 Luckow V A, Lee S C, Barry G F *et al.* J Virol, 1993; **67** (5): 4566
- 16 Chen Q, McIntosh, Yu Z *et al.* J Invertebra Pathol, 1993; **63** (3): 216
- 17 王珣章, 谢伟东, 龙策新等. 病毒学报, 1991; **7** (3): 253
- 18 王珣章, 谢伟东, 龙策新等. 中国科学 (B 辑), 1992; **1**: 39

Improved Methods for the Construction of Recombinant Baculoviruses. Shi Xianzong, Chen Quhou (*Institute of Entomology, Central China Normal University, Wuhan 430070, China*).

Abstract Being as an efficient expression vector, baculovirus is now being used to express a wide variety of genes from viruses, fungi, plants and animals. However, some shortcomings, such as low efficacy of homologous recombination and difficulty as well as long time consumed in purification of recombinant baculoviruses, accompany the traditional method of constructing a recombinant baculovirus. To overcome the shortcomings, some new and efficient techniques, including linearizing viral DNA to increase the ratio of recombinant baculoviruses, recombining foreign genes *in vitro*, completing homologous recombination and selection of recombinant viruses in yeast and in *E. coli*, and making recombinant viruses to produce polyhedra, have been developed in recent years to construct the recombinant baculoviruses rapidly and conveniently. These improved methods are, therefore, to be described.

Key words recombinant baculovirus, recombination efficacy, linearization, Cre-lox system, transposon, polyhedra