

# 杆状病毒表达载体系统

张 力 侯 纬 敏

(北京医科大学生化教研室,北京 100083)

## 提 要

杆状病毒表达载体系统是近年来发展起来的较高效的表达外源基因系统。由于多角体病毒中多角体蛋白基因的非必需性、高表达性、重组病毒的易鉴定等特性,以及多角体蛋白基因的强启动子使其特别适于基因工程中作为表达载体,借助于转移载体可将外源目的基因转移到野生型 AcMNPV 中,在一个被转移载体和野生型 AcMNPV 共转染的细胞内,可以通过同源重组完成目的基因的转移。应用不同的转移载体可表达出融合及非融合蛋白质。经该系统表达的重组蛋白质具有生物学活性,其中大部分进行翻译后剪接产生与天然蛋白质相似的重组蛋白质。这些产物的抗原性,免疫原性和功能都与天然蛋白质非常相似。目前,应用该系统已成功地表达了许多酶、生长因子、病毒抗原包括病毒的外壳蛋白等有生物活性的蛋白质。本文对如何最大限度表达外源基因及该表达系统的发展前景作了讨论。

**关键词** 核多角体病毒 (AcMNPV), 多角体蛋白, 转移载体

能。它的化疗作用很可能主要是影响各种酶的金属辅因子,特别是 Mg(II) 离子<sup>[26]</sup>。人们目前还致力于寻找适宜的络合物(例如离子载体),把锂送到药物的作用部位,从而避免锂的过量吸收而引起的毒副作用。

除了上面重点介绍的几个方面以外,近年来在硫的生物循环、生物氧利用过程中的金属蛋白和酶、Vitamin B<sub>12</sub> 化学的研究、生物矿化以及众多的各具匠心的模型化合物的设计和研究都有长足的进展,本文就不一一赘述。

## 参 考 文 献

- 1 黄仲贤等. 自然科学年鉴. 上海:上海翻译出版公司, 1988: 341
- 2 Silver S, Misra T K. *Annu Rev Microbiol*, 1988; 42: 717.
- 3 Shewchuk L M *et al. Biochemistry*, 1989; 28: 2331
- 4 Klug A, Rhoades D. *Trends Biochem Sci*, 1987; 12: 464
- 5 Pan T, Coleman J E. *J Inorg Biochem*, 1989; 36: 343
- 6 Giedroc D P *et al. Biochemistry*, 1989; 28: 2410
- 7 Matzanke B F *et al. Biochemistry*, 1989; 36: 341

- 8 Barton J K. *Science*, 1986; 233: 727
- 9 Dervan P. *Science*, 1987; 238: 645
- 10 Barton J K *et al. J Amer Chem Soc*, 1989; 111: 4520
- 11 Dervan P B. *J Inorg Biochem*, 1989; 36: 272
- 12 Theil E C. *Adv Enzymol Mol Biol*, 1989; 63: 483
- 13 Tullius T D. *Trends Biochem Sci*, 1987; 12: 297
- 14 Huang J Q *et al. 结构化学*, 1987; 6: 219
- 15 Huang J Q *et al. Pure and Appl Chem*, 1988; 60: 1185
- 16 Schaffer A *et al. Biochemistry*, 1989; 27: 8509
- 17 Cousius R J. *Physiology Rev.* 1985; 65(2): 2381
- 18 Huang Z X *et al. Abstract on international conference on applied bioinorganic chemistry*. Wuhan: Huazhong Univ of Sci and Tech Press, 1990: 19
- 19 Meade T J, Gray H B. *J Inorg Biochem*. 1989; 36: 209
- 20 Hoffman B M, Ratner M A G. *J Amer Chem Soc*, 1987; 109: 6237
- 21 Stemp E D A *et al. J Inorg Biochem*, 1989; 36: 212
- 22 Farrell N P *et al. J Amer Chem Soc*, 1988; 110: 518.
- 23 Price S J B, Sadler P J. *Structure and Bonding*, 1988; 70: 27
- 24 Kopf-Maier P, Kopf H. *Chem Rev*, 1987; 87: 1137
- 25 Basolo F (美)著,高忆慈等译.无机化学前沿.兰州:兰州大学出版社,1988
- 26 Bach R O. *Medical hypotheses*, 1988; 23: 157

[本文于1990年5月23日收到,8月18日修回]

杆状病毒表达载体系统 (baculovirus expression vector system, BEVS) 是近年来由美国得克萨斯农工大学的 Max Summers 和 Lois Miller 两人发展起来的<sup>[1]</sup>。与细菌、酵母细胞及哺乳动物细胞表达系统相比, 这种无脊椎动物表达载体的最大优点是能高效 (1—500 mg/L) 而广泛地表达重组蛋白质, 并且在大多数情况下, 表达蛋白质的抗原性、免疫原性和功能与天然蛋白质很相似; 此外, 杆状病毒对脊椎动物或植物没有致病性; 与哺乳动物表达系统不同, 该系统不需用转化细胞或转化因子<sup>[2]</sup>; 较高等的真核细胞内的蛋白质修饰、剪接及输送可在该表达系统内进行; 这对于重组蛋白质是否有完整的生物学功能是必需的。本文就这一表达系统的生物学特点、运用及发展前景作一综述。

## 一、杆状病毒生物学

核多角体病毒 (Autographa Californica nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV) 是杆状病毒家族的原型病毒<sup>[3]</sup>, 宿主范围非常广泛, 能感染 30 多种鳞翅目昆虫<sup>[4]</sup>。该病毒基因组长度大约为 128Kb<sup>[5]</sup>, 含有双链、环状和超螺旋 DNA。病毒感染后产生两种子代病毒形式, 即细胞外病毒颗粒 (ECV) 和包裹病毒颗粒 (OV)<sup>[6]</sup>, 后者病毒 DNA 由多角体蛋白所包裹。多角体蛋白分子量为 29kD, 是病毒编码的包裹体的主要结构蛋白<sup>[7]</sup>。病毒的包裹形式是天然病毒生活周期的一个重要部分, 是横向传播的基础。

AcMNPV 多角体蛋白基因图谱及序列已经清楚<sup>[8]</sup>。在培养细胞中, 该基因对胞外病毒颗粒的复制及产生并不重要<sup>[9]</sup>。多角体蛋白基因可通过删除和插入失活产生包裹体阴性病毒 (Occ<sup>-</sup>), 该病毒感染细胞所形成的噬斑和野生型病毒 (Occ<sup>+</sup>) 所形成的完全不同, 根据噬斑形态的明显差别可用肉眼筛选重组病毒。多角体蛋白基因的非必需性、高表达性及重组病毒的易鉴定性, 使该基因启动子特别适于基因工程中作为表达载体。

## 二、影响外源基因在杆状病毒载体系统表达的因素

在昆虫细胞内, 应用杆状病毒载体系统已经成功地表达了多种真核细胞和原核细胞的基因。表 1 总结了用该表达系统已成功表达的多种酶、生长因子、病毒抗原等有生物活性的蛋白质。

表 1 多角体病毒载体表达的外源基因<sup>[1, 8, 10, 11, 13-20, 22, 23]</sup>

AcMNPV 多角体蛋白	蓝舌病毒中和抗原 Vp1 Vp3
<i>Drosophila</i> krüppel 基因产物	大肠杆菌氯霉素乙酰转移酶
大肠杆菌 β-半乳糖苷酶融合产物	大肠杆菌 β-半乳糖苷酶
乙型肝炎病毒核心抗原表面抗原	人 C-myc 原癌基因
人集落刺激因子 I	人 α-干扰素
人免疫缺陷病毒外壳蛋白	人 β-干扰素
人免疫缺陷病毒核心蛋白	人白细胞介素 2
人免疫缺陷病毒反向转录酶	人-3 型副流感病毒血凝素神经氨酸苷酶
I 型人免疫缺陷病毒 P <sub>40</sub> 蛋白	
流感病毒聚合酶 P <sub>A</sub> , P <sub>B</sub> , P <sub>B2</sub>	流感病毒血凝素
淋巴细胞性脉络膜脑膜炎嵌沙样病毒糖蛋白前体 GPC 及核蛋白 N	N. Crassa 激活蛋白
多瘤病毒 T 抗原	<i>Phaseolus vulgaris</i> 之扁豆蛋白
Punta Toro phlebovirus N, N <sub>s</sub>	假狂犬病毒糖蛋白 50
SV <sub>40</sub> T, t 抗原	猿猴螺旋病毒外壳抗原 Vp6
人 5-脂肪氧合酶	土豆蛋白
	人巨噬细胞集落刺激因子

杆状病毒晚期基因表达调控非常复杂, 迄今尚未在分子水平上得到阐明。野生型 AcMNPV 多角体蛋白的表达随着感染细胞和组织的不同, 细胞培养液成分质与量的不同而变化。多角体蛋白的表达与病毒的复制并不成正比。此外, 高效表达需要健康的 sf9 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞, 97% 以上的细胞必需是活的, 并处于对数生长期, 每 16—18h, 细胞数增长一倍。任何规定的细胞培养条件及步骤的改变都可导致与多角体蛋白基因相连的外源基因在低水平进行表达<sup>[1]</sup>。插入同一载体的不

同基因的表达水平常常不同，可能与外源基因前导序列的长度和性质有关。此外，含有同一外源基因的不同重组杆状病毒常在不同水平表达该外源基因。在某些情况下，低水平的表达可能是由于基因产物本身所引起，这可能取决于蛋白质本身的内在特性或与细胞内蛋白质的剪接途径有关。诸如密码选择，RNA 和蛋白质的稳定性等因素尚无详尽的研究。

尽管有许多因素影响杆状病毒的晚期基因表达，但就如何在该系统内最大限度地提高表达能力，目前主要集中在多角体蛋白基因的转录和翻译信号的定位，以及改进转移载体结构。由于转移载体很容易进行突变，目前从分子水平上进行改进以获得高效表达，在于找出外源基因在转移载体内的最佳位置。

### 三、构建杆状病毒转移载体

迄今发表的大多数转移载体均由 AcMNPV 多角体蛋白基因的启动子，多角体蛋白基因及位于该基因两侧的不同长度的 5' 端和 3' 端病毒 DNA，克隆到多拷贝的细菌质粒上构建而

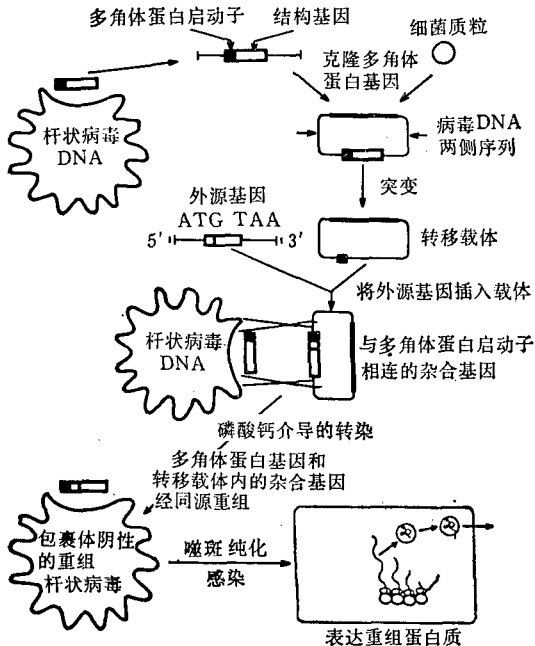


图 1 应用 BEVS 系统克隆外源基因和筛选重组噬斑的步骤和顺序

成。在一个被质粒和野生型 AcMNPV 共转染的细胞内，可以通过同源重组将重组质粒内的目的基因转移到野生型 AcMNPV DNA 中 (图 1)。

在构建重组杆状病毒时首先要考虑的问题是外源基因序列插入到多角体蛋白基因内的位置——起始密码子 ATG 前或后。此处腺苷酸是第一位碱基。多数情况下，希望表达一种成熟(非融合)蛋白质而不是融合产物。应用在多角体蛋白基因 ATG 下游只有一个克隆位点的转移载体，在多角体蛋白密码序列中插入一个开放阅读框，获得的融合蛋白质包括多角体蛋白 N-端的氨基酸，也包含了外源基因 ATG 之前的前导序列所翻译的氨基酸。

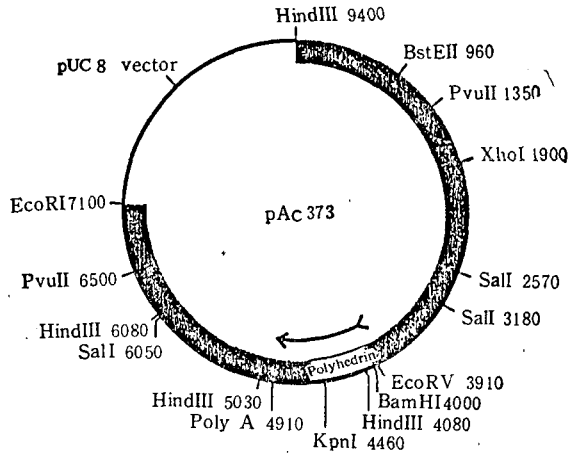


图 2 转移载体 pAc 373 限制性内切酶图谱

目前，引导外源基因进入 AcMNPV 表达非融合蛋白质最常用的转移载体是 pAc 373<sup>[10]</sup> (图 2)，pAc 373 由一个长 7kb 的 EcoRI 酶切片段的质粒衍生而来，该片段包含有克隆在 pUC8 EcoRI-HindIII 片段上的 AcMNPV 多角体蛋白基因。由于 Bal31 的突变和 BamHI 接头的加入，pAc 373 删除了一段从 -8 到 +171 (BamHI 切点) 的核苷酸序列。pAc 373 对非融合外源蛋白质进行较好的表达需要外源基因含有一段较短的前导序列。已表达的基因 5' 端和 3' 端的非密码序列从 3 到 400 个碱基不等。这些序列对基因表达水平的作用还不清

楚。所有的转移载体都有多角体蛋白基因完整的多聚腺苷酸信号,除了多角体蛋白基因的多聚A外,若外源基因还有其本身的多聚A的话,则表达水平较高。

#### 四、目前所应用的载体

已经构建了大量的转移载体,用于产生融合(图3)或非融合(图4)蛋白质。

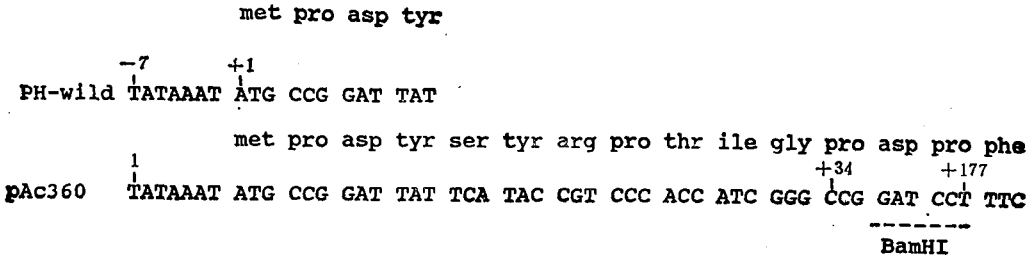


图3 融合蛋白表达载体中多角体蛋白起始位点附近的核苷酸序列

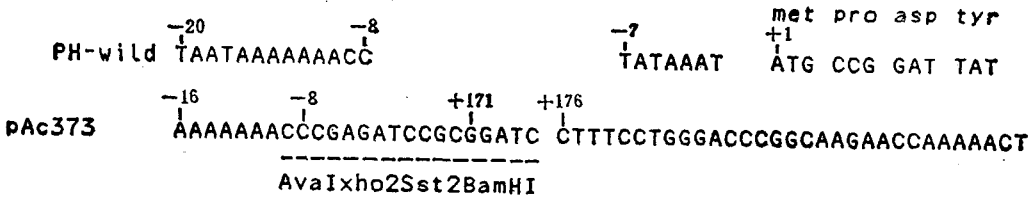


图4 非融合蛋白表达载体中多角体蛋白起始位点附近的核苷酸序列

质粒 pAc401 pVL101 pAc436 pVL106 pAc409 pAc311 pAc360 和 pAc101 pAc700 pAc701 pAc702 用于表达融合蛋白质产物,每个载体中在多角体蛋白基因编码序列内起始密码 ATG 下游的不同位置上仅有一个 BamHI 或 SmaI 酶切位点,若读码框准确的话,克隆到该内切酶位点的 DNA 片段将表达出与多角体蛋白 N-端一些氨基酸融合的蛋白质,选择不同的载体,融合的多角体蛋白氨基酸数目也可从 1—58 个不等。

除了 pAc373, 另有 3 个转移载体 pAc461 pAc610 pAc611 已经鉴定,并用于表达非融合蛋白质。在 pAc461 中,位于上游第 7 位碱基至下游 670 位碱基之间的多角体蛋白基因序列被删除,而由一个或一个半 SmaI 连接物所代替。pAc610 和 pAc611 质粒的构建是于 pAc461 质粒中的 SmaI 位点以任一方向插入 M13mp 10 上的多克隆位点。

pAcC4 和 pAcC5 质粒是由 pAc436 衍变而来,在唯一的 NcoI 位点中含有起始密码子 ATG,之后为多聚连接物序列,这些载体适用于表达那些在起始密码处有单一 NcoI 切点的

基因<sup>[11]</sup>。

在 pEVIV 载体中<sup>[12]</sup>,删除了大部分多角体蛋白基因,唯一的 KpnI 切点与 ATG 邻接,以表达融合蛋白质。该质粒先以 KpnI 作用,再用 Bal31 处理,除去起始位点上游不同数量的核苷酸,加入一段多聚连接物,即可获得表达非融合蛋白质的载体,如 pEV51、pEV55。

此外,用于表达非融合蛋白质的载体还有 pVL941 pVL1392 pVL1393 (图 5)。pVL1392 和 pVL1393 区别在于其多聚连接物方向相反,因此,同时使用 pVL1392 和 pVL1393,可以提高外源基因的表达几率。

近来应用融合性转移载体 pAc700 pAc701 pVL101 pVL106 pAc360 pAc311 pAc101 和非融合性转移载体 pAc461 pAc373 分别对氯霉素乙酰基转移酶,β-半乳糖苷酶和组织纤溶酶原激活剂的表达水平进行了比较,发现当多角体蛋白的氨基端基因与外源基因相融合时,蛋白质和 RNA 的表达水平最高,而非融合载体只获得中等或低水平的表达。并且在多角体蛋白 ATG 下游融合多于 30 个碱基的衍生物其蛋白质表达水平要高得多。这些结果提示,

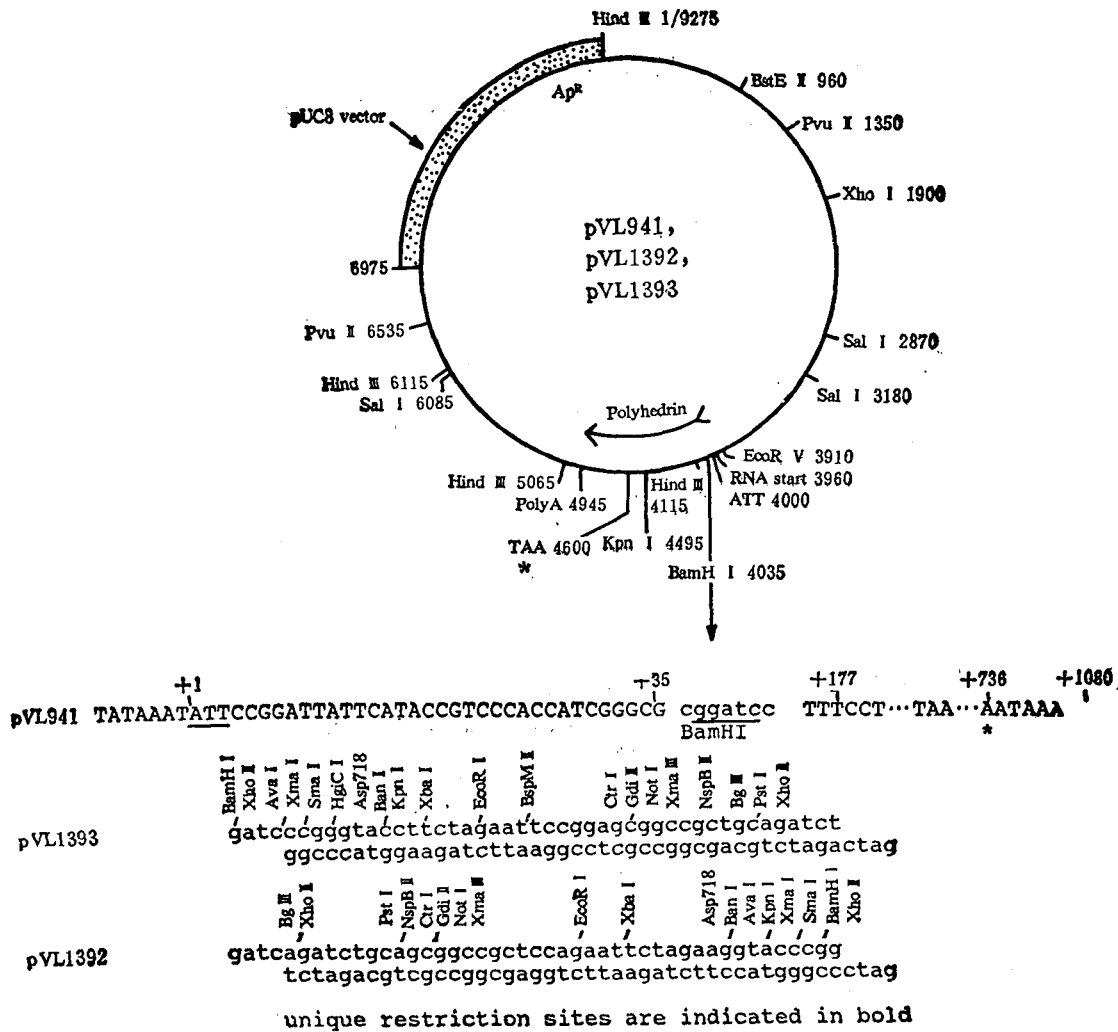


图5 衍生载体 pVL941, pVL1392, pVL1393 限制性内切酶图谱

包括多角体蛋白起始密码在内的上游的序列,对转录调节具有重要的作用<sup>[13]</sup>。此外,结果也表明,从起始密码 ATG 下游序列对翻译调节也具有重要作用。

### 五、重组蛋白质的生物学活性

用杆状病毒在昆虫细胞内表达的重组蛋白质具有生物学活性,其中大部分进行翻译后剪接产生与天然蛋白质非常相似的重组蛋白质。重组蛋白质可以分泌<sup>[10]</sup>,定位于核<sup>[11]</sup>及细胞表面<sup>[13]</sup>,装配成寡聚复合物<sup>[14]</sup>,由二硫键连接成二聚体、蛋白降解<sup>[15-16]</sup>、磷酸化<sup>[11]</sup>、N-糖基化<sup>[13,16]</sup>、O-糖基化<sup>[17]</sup>、脂肪酰化。这些产物的

抗原性、免疫原性和功能都与天然蛋白质非常相似。某些病毒抗原在体外可中和病毒<sup>[18]</sup>,在体内对病毒感染有保护作用<sup>[17]</sup>。

尽管在鳞翅目昆虫细胞内获得的重组蛋白质在剪接、转移、定位方面与哺乳细胞内相似,在分子水平上搞清这些过程的调节还需大量的工作。为了预测外源蛋白质的处理过程及定位,搞清昆虫蛋白质输送和定位于内质网、高尔基体、细胞表面、胞核或其它细胞器的信号和机制是非常重要的。

### 六、未来方向

所有结果表明:应用重组杆状病毒载体表

达人类,重要的动物、植物蛋白质将继续得到很快发展.为了提高表达水平,外源基因于转移载体中的最佳位置还需进一步改进.目前一些实验室正在从分子水平上剖析多角体蛋白基因启动子,有希望揭示出位于多角体蛋白基因两侧的增加转录和翻译的信号的重要作用以及与大量表达有关的多种抑制因素.

在分子水平上,有关蛋白质处理方面还有许多工作要做.迄今为止大多数工作是用一种多角体病毒(AcMNPV)在一种昆虫细胞株(sf 卵巢组织)内完成的.通过选用其它组织及敏感的宿主种类获得不同细胞株,研究重组蛋白质的表达水平、剪接、定位、运输,可以得到更多的这方面的知识.

为了适于大规模的培养,需要检查有关杆状病毒与不同宿主的范围.从经济方面考虑,有人建议用从活昆虫体内以取代细胞培养获得重组蛋白质<sup>[19]</sup>,但从活昆虫体内回收蛋白质的工作还有待解决.

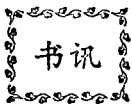
使用空气发酵罐可以大量增殖昆虫细胞并可通过杆状病毒表达系统获得重组蛋白质<sup>[20,21]</sup>.

最近发展了一种廉价的无蛋白质培养基<sup>[20]</sup>,可使昆虫细胞生长、病毒复制,重组蛋白质表达水平与含血清的培养基相同,并且表达产物的纯化较含血清的培养基容易得多.使用该培养基应用杆状病毒系统在昆虫细胞内表达人的巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF 产量可达 40mg/l.

## 参 考 文 献

- 1 Summers M D *et al.* *A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures*. Second printing, Texas: Texas A & M University College Station, 1987: 1—2
- 2 Reznikoff W *et al.* *Maximizing gene expression*. NY: Butterworth Publishers, 1986: 375—376
- 3 Matthews R E F. *Fourth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Basel: Karger, 1982
- 4 Groner A. *The biology of baculoviruses*. Vol. I, *Biological properties and molecular biology*. Boca Raton: CRC Press Inc, 1986: 177—202
- 5 Smith G E *et al.* *Virology*, 1978; 89: 517
- 6 Volkman L E *et al.* *J Virol*, 1976; 19: 820
- 7 Rohrmann G F. *J Gen Virol*, 1986; 67: 1499
- 8 Hooft van Iddekinge *et al.* *Virology*, 1983; 131: 561
- 9 Smeth G E *et al.* *J Virol*, 1983; 46: 584
- 10 Smith G E *et al.* *Proc Nat Acad Sci USA*, 1985; 82: 8404
- 11 Jeang K *et al.* *J Virol*, 1987; 61: 708
- 12 Miller D W *et al.* *Genetic engineering*. Vol. 8, *Principles and methods*. NY: Plenum Publishing Corp, 1986: 277—298
- 13 Matsuura Y *et al.* *J Gen Virol*, 1987; 68: 1233
- 14 Estes M K *et al.* *J Virol*, 1987; 61: 1488
- 15 Madisen L *et al.* *Virology*, 1987; 158: 248
- 16 Hu S L *et al.* *J Virol*, 1987; 61: 3617
- 17 Thomsen D R *et al.* *Twelfth international herpesvirus workshop*. Philadelphia, Pennsylvania: University of Pennsylvania, 1987
- 18 Inumaru S *et al.* *Virology*, 1987; 157: 338
- 19 Horiuchi T *et al.* *Agric Biol Chem*, 1987; 51: 1573
- 20 Brian Maiorella *et al.* *Bio/Technology*, 1988; 6: 1406
- 21 David W *et al.* *Bio/Technology*, 1988; 6: 1411
- 22 Colin D Funk *et al.* *Proc Nat Acad Sci USA*, 1989; 86: 2592
- 23 Colin D Funk *et al.* *Proc Nat Acad Sci USA*, 1989; 86: 2587

[本文于1990年6月12日收到,9月3日修回]



书讯

## 脑血管病的血液流变学

### ——英文版国际脑血管病血液流变学学术会议论文集

(1991年6月24—28日,中国上海)

主编: 施永德(中) 联合主编: E. Ernst (奥)

出版社: 上海科学技术文献出版社 书号: ISBN 7-80513-857-5/R·97

16开本,共554页,包括153个表、70幅图.其中有79篇论文全文、220篇摘要.作者来自于美、英、法、德、

(下转第401页)