

- 13 Triesman A. Psychological review, 1990; 97: 460
14 王 甦. 见: 王 甦等著, 当代心理学研究. 北京: 北京大学出版社, 1993: 1
15 Crick F. Proc Natl Acad Sci USA, 1984; 81: 4580

The Oscillation and Synchronous Oscillation of Neuronal Activities in Visual Cortex. Zeng Xiaodong, Wang Yunjiu, Qi Xianglin (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Laboratory of Visual Information Processing, Beijing 100101, China*).

Abstract One of the important progress discovered recently in neuroscience is oscillation and synchronous oscillation in the visual cortex, which raises wide attentions in cognitive society. There are different opinions on its explanation, effect and significance in cognitive science.

Key words oscillation, synchronization, neuronal activity, cortex

昆虫杆状病毒表达系统中阳性重组病毒的筛选

朱反修 王福山 齐义鹏

(武汉大学病毒学研究所, 武汉 430072)

摘要 近年来, 随着杆状病毒表达系统的普遍应用, 阳性重组病毒筛选方法也有了很大的改进, 从过去的经验性的 ocu^+/ocu^- 空斑表型筛选发展到根据颜色差异, 药物抗性, 抗生素抗性等等筛选重组病毒. 同源重组过程也可在大肠杆菌或酵母甚至体外进行, 大大提高了重组率, 由于重组率是如此之高, 有些方法可以免去繁琐的空斑选择, 很快得到重组病毒的纯培养. 文章对各种筛选方法进行了比较, 并指出各自的优缺点.

关键词 杆状病毒, 筛选方法, 外源基因表达

自从 1983 年 Smith 等^[1]首次使用杆状病毒表达系统表达 β -干扰素以来, 杆状病毒表达系统取得了丰富的成果, 到目前为止已表达了数以百计的各种生物活性分子. 因为其表达量大, 后加工系统完备, 使用安全等特点而备受人们的青睐. 但由于其筛选鉴定重组病毒需一定的经验, 对非病毒学工作者来说费时费力, 在使用上受到一定限制.

杆状病毒由于基因组庞大, 外源基因的克隆不能通过酶切连接的方式直接插入, 而必须通过转移载体的介导, 即将极晚期基因, 比如多角体蛋白基因 (ocu) 及其边界区克隆入细菌的质粒中, 消除其编码区和不合适的酶切位点, 保留其 5' 端对高效表达必须的调控区, 并在其下游引入合适的酶切位点供外源基因的插入,

即得到转移载体. 将要表达的外源基因插入其启动子下游, 再和野生型 AcNPV DNA 共转染昆虫细胞, 通过两侧同源边界区在体内发生同源重组, 使多角体蛋白基因被外源基因取代, 而将外源基因整合到病毒基因组的相应位置. 由于 ocu 基因被破坏, 不能形成多角体, 这种表型在进行常规空斑测定时可以和野生型的具有多角体的病毒空斑区别开来, 这就是最初的筛选重组病毒的方式^[2,3]. 但由于重组比例低 (0.1%—1%, ocu^+/ocu^-), 表型差别不显著, 应用上有一定困难, 为此有不少人在这方面进行探索, 取得了可喜的进展.

1 β -半乳糖苷酶

1990年, Vialard 等人^[4]在 *ocu* 基因上游, 利用 p10 基因启动子带动 LacZ 基因构建了转移载体 pJVNhe I, 共转染 Sf 细胞后, 由于重组病毒可以表达 β -半乳糖苷酶, 在进行空斑测定时加入 X-gal 而形成蓝色空斑便于重组病毒的筛选. 同年 Zuidema 等^[5]构建了 pAcDZ I, 它利用果蝇热休克蛋白基因启动子控制 LacZ 筛选重组病毒, 并用这个转移载体表达了 CaMV 的 35S 蛋白. 以 β -半乳糖苷酶作标记的局限性在于: a. 有假阳性, 实验中发现相当数量的病毒表型为蓝色空斑, 但其多角体蛋白基因是完整的. 可能是由于转移载体因单交换整合于病毒基因组而含有串联重复的序列; b. 没有提高同源重组的比例, 实际上由于转移载体加大导致重组比例降低; c. 表达产物污染 β -半乳糖苷酶, 对纯化不利.

2 斑点杂交和原位杂交

斑点杂交也是一个有效的筛选方法^[2,3,5-8]. 有两种方式, 一种是选择可能有重组病毒的空斑感染 96 孔板中的培养细胞; 第二种方式是将共转染得到的子代病毒稀释再感染微孔板中培养的细胞. 分别抽提各培养孔细胞 DNA, 用斑点杂交器转移到硝酸纤维素 (NC) 膜上, 以外源基因作为探针进行杂交, 杂交阳性孔的病毒再进行空斑测定和斑点杂交, 进一步筛选鉴定得到均一的重组病毒.

也可通过和细菌原位杂交类似的方式, 直接将空斑转移到 NC 膜上进行杂交^[3]. 还可以用免疫方法进行斑点杂交筛选鉴定重组空斑^[9]. 杂交的方法虽然有效而准确, 但比较繁琐, 费时费力.

3 PCR 技术

PCR 技术可用于重组病毒的筛选^[10], 从单个空斑或培养上清制备模板, 用转移载体上插入位点两端的序列作引物进行 PCR 扩增, 根据扩增片段的大小, 即可判定是否发生了重

组. PCR 技术具有简便快速的特点. 但受仪器设备的限制.

4 线型化技术

1990年 Kitts^[11]提出了线型化技术, 其原理是线型化的杆状病毒基因组感染性很低, 但仍具有与引入细胞内的同源序列进行同源重组的能力, 如果同源序列位于线型化杆状病毒的两端, 则基因组即可环化恢复完整的感染性. AcNPV 上没有 Bsu36 I 切点, 将人工合成的含此酶位点的寡核苷酸引入转移载体 pAcRP6 中, 然后和野生型 AcNPV 共转染 Sf 细胞, 得到含有 Bsu36 I 单一切点的 AcRP6.Sc. 将 AcRP6.Sc 用 Bsu36 I 酶切线型化后和含 LacZ 的转移载体 pAcRP23.LacZ 共转染, 子代病毒在 X-gal 存在下进行空斑测定, 发现有 16%—39% 的空斑呈蓝色. 阳性重组率大大提高.

后来发现 LacZ 基因中含有一个 Bsu36 I, 使得这一方法更为完善, 只要含有 LacZ 基因的病毒都可作为线型化载体和外源基因进行共转染, 重组病毒在 X-gal 存在的情况下为无色空斑, 40%—80% 的白色空斑都含有相应的外源基因. 这一方法的缺点是, 重组率虽然高, 但子代病毒产率低.

5 体外酶促定位重组^[12]

Cre-Loxp 系统最早由 Sternberg 等^[13]详细论述. 噬菌体 P1 包含一重组位点 Lox (locus of crossover) 和一个 Cre 酶基因, 其产物 (Cre 酶) 为重组所必需. Cre 酶已被克隆纯化; Lox 序列已被测定, 它由 34 个核苷酸组成, 其两端为 13bp 的反转重复序列, 中间为 8bp 的非回文序列. 将此序列引入 AcNPV 基因组得 vAclox,

ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT
TATTGAAGCATATTACATACGATATGCTTCAATA

转移载体也引入 lox 得 plox. vAclox 和 plox 在 Cre 酶存在下 37℃ 保温 1h, 两者即可发生体外定点重组, 而将载体上的相应序列转到病毒的基因组上. 这是一个可逆酶促反应, 将反应混合物转染 Sf 细胞即可得到高比例的重组

子代病毒。

这个方法的特点是体外重组, 通过控制反应条件可达到很高的重组率。但由于重组是位点特异性的, 反应产物往往是转移载体多次插入亲代病毒的结果, 因而要多轮空斑纯化病毒。

6 酵母途径^[14]

这是一个全新的战略。它使杆状病毒基因组可在酵母体内进行复制, 病毒 DNA 和转移载体的同源重组过程也在酵母体内进行, 使得筛选重组病毒变得迅速、简便。首先构建一个能在酵母中复制的辅助病毒, 即在野生型 AcNPV 病毒基因组 *ocu* 基因启动子下游插入酵母自主复制序列 ARS, 和 CEN (它可以使 DNA 分子具有减数分裂的功能, 使质粒分子能稳定地在酵母体内维持低拷贝数) 及两个筛选标记 (URA3 和 SUP4-0), 顺序为 *ocu* 启动子, SUP4-0, ARS, URA3, CEN。转移载体中, 须表达的外源基因 5' 端为病毒序列, 3' 端为酵母 ARS, 它和辅助病毒在酵母体内发生同源重组导致 SUP4-0 缺失, SUP4-0 缺失的重组子在特定的酵母株系中可以在有精氨酸类似物 Canavanine 条件下生长, 直接选择 Canavanine 抗性的菌落, 即为阳性重组子。提取核酸转染昆虫细胞, 由于没有亲代病毒本底, 得到的都是阳性重组病毒, 故不需要费时费力进行空斑纯化, 可在 10—12d 内得到重组病毒。本方法的特色是不需空斑纯化。但缺点是: a. 酵母的转化率低; b. 提取作转染用的含重组病毒的酵母核酸须经蔗糖梯度离心。

7 TK 基因^[15]

胸苷激酶可将核苷类似物转变成有毒的中间体而抑制病毒的复制。这类核苷酸类似物作为疱疹病毒编码的胸苷激酶的底物能特异性地抑制单纯疱疹病毒、巨细胞病毒和 EB 病毒的复制。由于这些类似物对病毒的胸苷激酶有高度的选择性, 而细胞自身的胸苷激酶对这些类似物的结合常数很低, 故而能选择性地杀死表

达 HSV-TK 基因的细胞。

为了抑制病毒 DNA 的复制, 必须在病毒 DNA 复制前启动胸苷激酶的表达, Godeau 等人利用 AcNPV 的极早期基因 IE-1 基因启动子控制 HSV-TK 基因的表达。将 PCR 扩增得到的 IE-1 启动子和 HSV-TK 基因连接后插入转移载体 pVL941, 得到 pVL941-tk, 将它和野生型 AcNPV 共转染 Sf 细胞得到在 *ocu* 位相含有 HSV-tk 基因的 AcNPV-tk; 将它和 p10 位带分泌型碱性磷酸酶 (SEAP) 的病毒 AcNPV-p10-SEAP 共转染得到 SEAP⁺、HSV-tk⁺ 的重组病毒 (AcNPV-IE1-tk-p10SEAP)。

他们发现 GCV (一种核苷类似物) 浓度达到 100 μmol/L 对 Sf 细胞和野生型 AcNPV 都没影响, 说明鳞翅目昆虫细胞胸苷激酶和哺乳动物细胞的一样, 不能将这些核苷酸类似物转变成有毒化合物。但 AcNPV-IE1-tk-p10-SEAP 的复制 (由测定 SEAP 活性确定) 可被 GCV 抑制, 并呈明显的剂量效应, 低至 2 μmol/L, 半最高抑制剂量浓度为 10 μmol/L。

将 HSV-tk⁺ (AcNPV-tk) 和 HSV-tk⁻ (AcNPV-LacZ) 以 99:1 感染细胞, 以测定半乳糖苷酶活性作为 tk⁻ 病毒扩增指标, 发现其活性随 GCV 浓度增加而递增, 在 GCV 100 μmol/L, 其活性为不加 GCV 时的 150 倍。子代病毒在 X-gal 存在的情况下通过直接空斑测定, 在 GCV 为 100 μmol/L 时, 100% 为 LacZ 空斑。以上实验表明可一步得到重组病毒。

用 pVL1393-LacZ 和 AcNPVIE1-tk-p10-SEAP 共转染, 得到的子代病毒在 10 μmol/L 的 GCV 存在下以低感染复数感染 Sf 细胞。为了测定其重组频率, 将病毒稀释克隆化感染 96 孔板中的细胞, 21 孔为 SEAP 阳性, 说明有病毒存在, 测定半乳糖苷酶活性发现 21 孔都为阳性, 说明重组率为 100%。此方法优点是可直接得筛选重组病毒, 不需空斑纯化, 缺点是要构建 tk⁻ 的病毒作辅助病毒。

8 Neo 基因^[15]

Neo 是经典的显性选择标记, 它是一种细

菌编码的磷酸转移酶基因,可以使氨基糖苷类抗生素 G418 失活, G418 是一种蛋白质合成抑制剂,它干扰真核细胞 80S 功能. Neo 曾被引入几种脊椎动物病毒基因组中,如痘苗病毒, EB 病毒,作为选择标记. 1989 年 Jarvis 将 Neo 引到 Sf 细胞染色体上而得到 G418 抗性的细胞系^[17].

他们首先将 Neo 置于一个早期基因, 35k 蛋白基因启动子控制之下,再插入转移载体 pEVocu⁺/PA 的 ocu 基因的启动子上游,得 pEVocu⁺/Neo. 在 ocu 启动子下游插入 LacZ 基因又得到 pEV-LacZ/Neo. pEVocu⁺/Neo 和多角体蛋白基因缺失的 AcNPV DNA 共转染 Sf 细胞,选择 ocu⁺的空斑得到 vNeo. pEV-LacZ/Neo 和野生型 AcNPV DNA 共转染在 X-gal 存在下挑选 ocu 的蓝色空斑得到 vNeo/LacZ.

以 0.05 单位感染复数(MOI)感染 Sf21 细胞,在不同 G418 浓度下,48h 后空斑测定子代病毒产量,发现用高浓度(2.5mg/ml) G418,野生型 BV 下降 1700 倍,而带 Neo 的病毒 vNeo 和 vNeo/LacZ 只降低了 2—5 倍.

将野生型和 vNeo/LacZ 分别按 $10^3:1$ 、 $10^4:1$ 、 $10^5:1$ 的比例以 0.05 MOI 感染 Sf21 细胞,再在 2mg/ml G418 存在下,连续盲传,在 X-gal 存在下进行空斑测定,以区别 vNeo/LacZ (蓝色, ocu⁻) 和野生型病毒 (无色, ocu⁺). 四代以后野生型和 vNeo/LacZ 的比例分别为 7:1、81:1、200:1. 最高扩增了 4200 倍,一般也扩增了 100—500 倍. 这说明 Neo 可以作为选择标记用于重组病毒的筛选.

本方法和 TK 基因相比略显繁琐,须经连续传代. 但它不用改造辅助病毒,只须在转移载体上引入 Neo 基因即可.

9 35k 蛋白基因^[15]

利用 35k 蛋白基因作位筛选标记是一个全新的方法. 35k 蛋白基因定位于 AcNPVEcoR I-S 片段,尽管 35k 蛋白的确切功能尚不明,但它可以直接或间接地抑制程序性细胞死

亡(apoptosis),即一种由宿主介导的细胞裂解和宿主细胞 DNA 降解的过程. Sf-21 细胞对病毒诱导的 apoptosis 敏感而对 *Trichoplusia ni* (TN368) 细胞则不敏感. 在 Sf-21 细胞中, 35k 蛋白基因缺失的重组病毒的子代病毒 BV 的产量极大地降低,形成包涵体的过程也被阻断. 将 35k 蛋白基因插入基因组另一位置可恢复 BV 产量,并能达到和野生型病毒一样的极晚期基因表达水平,同时形成包涵体. 这些发现为利用 35k 蛋白基因作为显性筛选标记打下了基础.

首先以 v Δ 35k 和 v Δ 35k/LacZ/35k⁺以 $2.4 \times 10^4:1$, $2.4 \times 10^5:1$, $1.2 \times 10^5:1$ 的比例感染 Sf 细胞,连续四代传代后其比例分别为 1:1, 1:1, 0.5:1, 意味着 35k⁺病毒被扩增了 24 000 倍, 240 000 倍和 2.4×10^5 倍. 如果以较低感染复数连续盲传,则扩增的比例会更高. 用带 35k 基因及 ocu 启动 LacZ 的转移载体和缺失 35k 基因的 v Δ 35k 共转染,重组子为蓝色 ocu⁺,而非重组子为无色 ocu⁻. 通过空斑测定发现,转染上清重组率达 15%. 和线型化技术结合起来,用转移载体 pocu⁺/35k⁺和线型化的 v Δ 35k/LacZ 共转染,空斑测定发现,96%为 ocu⁺的无色空斑,说明 ocu 基因取代了 LacZ 发生了重组,重组率高达 96%.

和 Neo 相比, 35k 蛋白基因有更高的选择扩增水平,将 35k 蛋白基因插到含 LacZ 的 ocu 型转移载体中,和 35k 蛋白基因缺失的病毒共转染 Sf-21 细胞,发现转染上清中有 15%—30%的子代带有相应的外源基因,是普通方法(0.1%—1%)的 15—300 倍. 如果将 35k 蛋白基因缺失的病毒线型化,重组子代病毒的比率可达到 82%—96%. 用脂质体介导的转染技术,只需 100—200ng 35k 蛋白基因缺失的病毒 DNA,在转染 2—4d 收获的子代病毒达到 10^3 — 10^5 pfu/ml. 同时由于重组病毒的比例是如此之高以致于一次空斑即可得到高纯度的子代病毒. 此法缺点是 35k⁻的辅助病毒必须在 TN368 细胞中才能大量复制,在 Sf 细胞则不能,故必须引入新的细胞系.

10 Bacmid^[18]

1993 年 Monsanto 公司的 Luckow 等人又发展了一种新的技术. 他们根据 F 因子载体原理, 用类似于酵母体内重组的方法, 构建了一种新的杆状病毒穿梭载体 Bacmid, 它可以像质粒一样在大肠杆菌中生长, 又对鳞翅目昆虫细胞有感染性. Bacmid 含有 F 因子复制子 (可在大肠杆菌中复制), 卡那霉素抗性基因, Tn7 转座位点 attTn7. 转移载体中外源基因置于 *ocu* 基因启动子之下, 两端分别为 Tn7 的左、右端, 转化含 Bacmid 的 *E. coli* 菌株, 由辅助质粒提供反式作用发生转座, 而将外源基因转到 Bacmid 的 attTn7 位置, 将这种重组了外源基因的 Bacmid 转染昆虫细胞, 可得到 100% 的阳性重组病毒.

这种方法都是在大肠杆菌中进行的, 非常简便. 和酵母途径一样, 由于没有本底干扰, 同样不需进行空斑纯化. 缺点是 F 因子提取不是很方便, 其稳定性也有待于观察.

以上各种方法各有特点, 通过很多人的共同努力新方法层出不穷, 虽然有些新方法需一定的条件, 但一旦建立起来后就可以方便迅速地得到阳性重组病毒, 为杆状病毒表达系统的普遍应用创造了良好的条件.

参 考 文 献

- 1 Smith G E, Summers M D, Fraser M F. *Mol Cell Bio*, 1983; **3**: 2156
- 2 King L A, Possee R D. *The baculovirus expression system*. London: Chapman & Hall, 1992; 1
- 3 Summers M D, Smith G E. *A manual of methods for baculovirus insect cell culture procedures*. Texas: Agricultural Experimental Station Bulletin, 1987; 1555
- 4 Vialard J, Lalumiere M, Vernet T *et al.* *J Virol*, 1990; **64**: 37
- 5 Zuidema D, Schouten A, Usany M *et al.* *J Virol*, 1990; **71**: 2201
- 6 Fung M-C, Chiu K Y M, Weber T *et al.* *J Virol Method*, 1988; **19**: 33

- 7 Greenfield C, Patel G, Clark S *et al.* *EMBO J*, 1988; **7**: 139
- 8 Pen J, Welling G W, Welling-Wester S. *Nucl Acids Res*, 1989; **17**: 451
- 9 Capone J. *Gene Anal Tech*, 1989; **6**: 62
- 10 Malitschek B, Scharl M. *Biotechniques*, 1989; **11**: 177
- 11 Kitts P A, Ayres M D, Possee R D *et al.* *Nucl Acids Res*, 1990; **18**: 5667
- 12 Peakman T C, Harris R A, Gewart D R. *Nucl Acids Res*, 1992; **20**: 495
- 13 Sternberg N, Hamilton D. *J Mol Biol*, 1981; **150**: 467
- 14 Patel G, Nesmyth K, Jones N. *Nucl Acids Res*, 1992; **20**: 97
- 15 Godeau F, Saucier C, Kourilsky P. *Nucl Acids Res*, 1992; **20**: 623
- 16 Lerch R A, Friesen F D. *Nucl Acids Res*, 1993; **21**: 1753
- 17 Jarvis D L, Fleming J-O, Kovacs G R *et al.* *Bio/Technology*, 1990; **8**: 950
- 18 Luckow V A, Lee S C, Barry G F *et al.* *J Virol*, 1993; **67**: 4566

Development of Selection Methods for Positive Recombinant Baculovirus. Zhu Fanxiu, Wang Fushan, Qi Yipeng (*Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract Several selection methods for positive recombinant baculoviruses have been developed in the past years. The traditional plaque morphology difference method has been and will be replaced gradually by new methods based on drug resistance, antibiotic resistance etc. Some methods allow the homologous recombination process to be taken place in *E. coli*, in *Saccharomyces cerevisiae* or even in *vitro*. Owing to the greatly increasing frequency of positive recombinant virus, the stocks of positive recombinant virus are obtained easily. The advantages and disadvantages of each method are discussed.

Key words baculovirus, selection method, expression of foreign gene