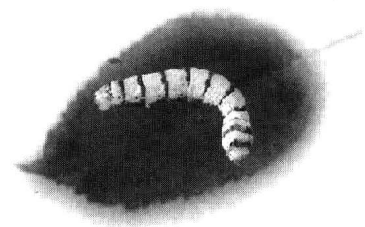


家蚕生物反应器

张耀洲 著



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS
浙江大学出版社



家蚕生物反应器

• 张耀洲 著



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

家蚕生物反应器/张耀洲著. —杭州: 浙江大学出版社, 2008. 7

ISBN 978-7-308-05705-9

I. 家… II. 张… III. 家蚕—生物学—反应器
IV. S881.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 196859 号

家蚕生物反应器

张耀洲 著

责任编辑 王 锴

出版发行 浙江大学出版社

(杭州天目山路 148 号 邮政编码 310028)

(E-mail: zupress@mail.hz.zj.cn)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

<http://www.press.zju.edu.cn>)

电话: 0571-88925592, 88273066(传真)

排 版 杭州大漠照排印刷有限公司

印 刷 德清县第二印刷厂

开 本 797mm×1092mm 1/16

印 张 22

字 数 600 千

版 印 次 2008 年 7 月第 1 版 2008 年 7 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-05705-9

定 价 60.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话(0571)88072522

序 言

昆虫核型多角体病毒(AcMNPV)高效表达系统最早由 Miller 和 Summers 于 1981 年提出。家蚕核型多角体病毒(BmNPV)高效表达体系于 1984 年由 Maeda 建立并超高效地表达了人 α -干扰素。重组昆虫病毒表达系统由于其高表达效率及表达后加工等能力而被广泛用于表达各种异源蛋白,尤其是用该系统进行多价外源基因共表达,表达产物被加工修饰或装配成生物活性蛋白。目前,昆虫杆状病毒表达载体系统已成为生产与研究各种原核和真核蛋白的有力而普及的工具,而家蚕是目前惟一能大规模人工饲养的经济昆虫,因此是目前最有应用前景的昆虫杆状病毒表达系统。通过在家蚕培养细胞内发生基因同源重组,将外源基因置于杆状病毒多角体基因启动子控制之下,获得重组杆状病毒,通过接种在昆虫细胞、虫体或蛹体中进行表达,可为人类生产急需的蛋白类药物、基因工程疫苗和基因工程杀虫剂等。

近几年,我们实验室在国内外率先利用蚕蛹作为生物反应器进行蛋白药物产业化研究,开拓了生物制药的新途径,尤其是蛋白口服化的研究成果,尤为引人注目。由于目前国际上生物技术工业界常用大肠杆菌和酵母表达制备药物,这一技术路线从实验室研究到中试和产业化生产都比较成熟,但对于家蚕生物反应器却没有现成的技术路线可能套用。为此,我们对家蚕表达的技术体系、规模化生产工艺、高纯度产品的制备技术、产品质控、家蚕表达技术体系安全性评价、制造和质检标准的制定和蛋白质口服相关的蛋白质功能等关键技术均进行了深入的研究,并取得了一定的研究成果。

1 原理及生产流程

1.1 原理

BmNPV 基因组是超螺旋的闭环双链 DNA,主要编码约 140 种结构蛋白和非结构蛋白。多角体蛋白基因在感染晚期进行高效表达,但不是病毒复制的必需基因,其编码的多角体蛋白只起到包埋病毒粒子的作用,与病毒粒子的形成没有直接的关系。多角体蛋白基因即使部分或全部被其他外源基因取代,仍能形成有感染性的病毒粒子。根据这一特性,通过基因操作将外源基因插入 BmNPV 的多角体蛋白基因启动子并使之在启动子控制之下,可使重组 BmNPV 在蚕体细胞中大量表达外源蛋白。

1.2 生产流程

利用 BmNPV 表达系统生产有用蛋白的流程见图 1: 首先将外源基因克隆进转移载体质粒内,获得重组转移载体;再把这一重组质粒 DNA 与野生型病毒基因组一起共感染家蚕

细胞系,通过细胞内同源重组,使外源基因置换多角体蛋白基因,并使外源基因在多角体启动子控制之下;最后通过空斑筛选等方法分离、纯化出重组型病毒。

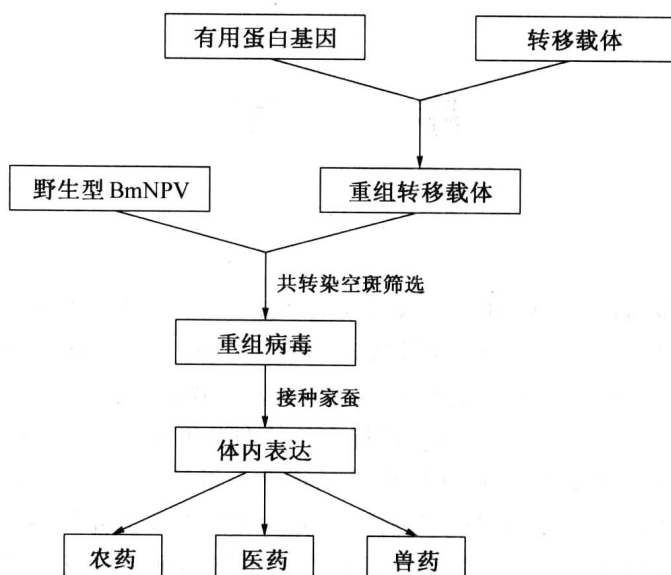


图1 家蚕/BmNPV 表达系统生产有用蛋白的流程

2 外源基因在 BmNPV 系统中的高效表达现状

前田进等用重组 BmNPV 在家蚕幼虫中首次表达了人的 α -干扰素基因(α -interferon, IFN),表达的 IFN 产物不仅具有生理活性,而且每 1mL 血淋巴表达量达 $100\mu\text{g}$,比其他真核生物表达系统的最高表达量还要高出千倍以上。这一发现揭示了 BmNPV 表达载体系统的潜在优势,引起了人们对该系统的强烈兴趣。近年来,多种外源蛋白基因均在该系统中得到了高效表达,获得相当的经济效益,主要可归纳为以下几个方面。

2.1 疫苗相关基因的表达

2.1.1 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)疫苗在家蚕培养细胞中的表达

世界上对乙型肝炎病毒(HBV)疫苗的需求量很大,因此,开发一种低成本、高效率的生产体系将具有重要的社会效益和经济效益。乙肝表面抗原基因在家蚕 BmNPV 系统中已获得高水平的表达,对其实用化的研究也取得了较大的进展。1991 年,Higashihashi 等将带有乙肝表面抗原的 M 蛋白基因(包括 S 基因及 pre S 基因)克隆到转移载体上,再与野生型病毒共转染获得重组病毒。该重组病毒感染家蚕幼虫,可获得高水平表达的 HBsAg($400\sim 600\mu\text{g}/\text{蚕}$)。我们利用 CsCl_2 密度梯度离心,再进行亲和层析,获得了纯度较高的直径为 22nm 的活性分子。重组 BmNPV 在家蚕幼虫及蛹中高效表达了具有生理活性的 HBsAg,幼虫的表达量为 $750\mu\text{g}/\text{蚕}$,蛹为 $690\mu\text{g}/\text{蛹}$ 。何家禄等对 HBsAg 蛋白的分离纯化方法也进行了研究,认为通过等密度离心及柱层析等步骤可获得均一的、直径约 22nm 的球形蛋白颗粒;李传松等研究了一种适合大规模生产的纯化方法,即先用等密度梯度离心,再利用 Sepharose 4B 层析,可以实现对 HBsAg 的完全分离;杨瑞丽等对家蚕蛹表达的乙型肝炎表

面抗原中蛋白口服免疫原性作了研究,在家蚕中表达了 rHBsAg(PreS2+S)基因,选择 4 周龄的 SD 大鼠,将重组病毒感染后的家蚕蛹制成口服剂型灌胃大鼠,ELISA 方法检测抗 HBs 抗体及抗 PreS2 抗体,结果表明在灌胃重组蛋白组中有 40% 鼠体血清内检测到了特异性抗 HBs 抗体及抗 PreS2 抗体,抗体应答反应持续 2~3 周,口服免疫后抗体转阳的 SD 鼠加强免疫后能产生较强的二次免疫应答,为利用家蚕/BmNPV 表达载体系统开发新一代的口服乙肝疫苗提供了参考。

近年来研究发现,该系统对外源基因在家蚕中的表达水平只占多角体蛋白量的 0.1%~1%,因此推测该表达系统能够识别并优先表达自身蛋白。Higashihasi 等在家蚕幼虫中表达了 HBsAg(PreS2+S)基因,但很难检测到 PreS2 的抗原性。为了进一步优化外源蛋白在家蚕/BmNPV 表达载体系统中高效表达的条件,杨瑞丽等构建了含有乙肝表面抗原中蛋白基因的重组病毒,HBsAg 的表达量达到 26.3g/mL 蛹血淋巴,虽能检测到 PreS2 抗原,但活性很低,这对生产含前 s2 区蛋白的基因工程疫苗不利,为此她们又构建了一个含有融合蛋白基因(HBMP)的重组病毒 BmPAK-HBMP,该重组病毒与 BmPAK-HBM 相比,感染家蚕后的表达产物具有较强的 S 抗原性和 PreS2 抗原性,蛋白的表达水平提高 8~10 倍。我们的研究团队近年来也致力于人乙肝病毒疫苗的研究,取得了一些成果,归纳如下。

2.1.1.1 人乙肝病毒前表面抗原 PreS1 在家蚕培养细胞中的表达

因人乙肝病毒前表面抗原 PreS1 诱导的免疫反应可以克服机体对乙肝病毒 S 蛋白的无反应状态,我们将人乙肝病毒 adr 前表面抗原 *preS1* 基因克隆到杆状病毒转移载体 pBacPAK8 中,获得重组转移载体 pBacPAKpreS1。用此转移载体与线性化病毒 BmBacPAK6 线性化基因组 DNA 共转染单层家蚕细胞(BmN),经细胞内同源重组和空白筛选,获得重组病毒。ELISA 结果表明,重组蛋白 PreS1 在家蚕培养细胞中的表达水平为 0.2pg/个细胞,Western 印迹证实此蛋白大小约为 14k。

2.1.1.2 家蚕蛹表达的乙型肝炎表面抗原中蛋白口服免疫原性的研究

为了探讨家蚕蛹表达的重组乙型肝炎表面抗原中蛋白 rHBsAg(PreS2+S)口服免疫原性,我们选择了 4 周龄的 SD 大鼠,将重组病毒感染后的家蚕蛹制成口服剂型灌胃大鼠,ELISA 方法检测抗 HBs 抗体及抗 PreS2 抗体。结果显示,在灌胃重组蛋白组中有 40% 鼠体血清内检测到了特异性抗 HBs 抗体及抗 PreS2 抗体,抗体应答反应持续 2~3 周,口服免疫后抗体转阳的 SD 鼠加强免疫后能产生较强的二次免疫应答。进一步研究表明,口服家蚕蛹表达的 rHBsAg(PreS2+S)具有加强免疫的效果:对酵母重组疫苗单剂腹腔注射过的 SD 鼠,用家蚕蛹表达的 rHBsAg(PreS2+S)灌胃加强免疫后,能诱导鼠体迅速产生较强的抗 HBs 抗体。家蚕 BmNPV 表达载体系统将有望开发成为新型的口服乙型肝炎疫苗表达系统。

2.1.1.3 家蚕蛹表达乙肝表面抗原中蛋白免疫原性的研究

我们将含有 HBV(*adr*)的表面抗原中蛋白基因的重组病毒 BmPAK-HBM 感染家蚕(*Bombyx mori*)蛹,ELISA 和 Western 杂交分析表明,家蚕蛹表达产物具有较高的 HBsAg 抗原性,并能检测到 PreS2 抗原性。将重组病毒感染蛹表达的乙肝表面抗原中蛋白对 SD 鼠进行注射免疫和口服免疫,注射免疫后的鼠体内能产生较强的特异性抗-HBs 抗体和抗-PreS2 抗体;口服免疫实验表明,连续添食 6 周后,约 40% 的鼠体内产生了免疫应答反应,在抗体转阳的鼠体内能同时检测到抗-HBs 和抗-PreS2 抗体。

2.1.1.4 多角体蛋白基因核苷酸序列对 HBsAg(PreS2+S)在家蚕中表达的作用

应用 PCR 突变的方法,在乙肝病毒表面抗原(HBsAg)前 S2 序列的 5' 端融合了 BmNPV 多角体蛋白基因 5' 端的 12 个碱基,获得了融合乙肝表面抗原中蛋白基因(HBMp);通过同源重组将其插入到 BmNPV 基因组多角体启动子后,构建了重组杆状病毒 BmPAK HBMp。用重组病毒 BmPAK HBMp 和 BmPAK HBM(带有非融合乙肝表面抗原中蛋白基因)感染家蚕细胞及蛹,对两种病毒的表达产物用 ELISA 进行了跟踪检测,结果表明融合蛋白比非融合蛋白 HBsAg 活性提高了 60%~80%,作为 HBsAg 构成部分的 PreS2 抗原性提高了 8~10 倍。并且,HBsAg 和 PreS2 Ag 表达的时相曲线不同,PreS2 Ag 的表达量比 HBsAg 早 1~2d 达到最大值。ELISA 检测和 Western 杂交分析表明,多角体基因序列的存在更有利于中蛋白全基因(PreS2+S)的表达。

2.1.2 丙型肝炎抗原蛋白

丙型肝炎病毒(HCV)是一种导致慢性肝炎、肝硬化、肝癌等肝病的新型肝炎病毒,因此对 HCV 的预防和对感染者的正确诊断是非常重要的。已证明核心蛋白 C 和包膜蛋白 E 对 HCV 具有较好的抗原反应特性。我们利用重组的 BmNPV(带有 HCV C+E)接种家蚕幼虫,对其表达产物用硫酸铵分级沉淀、过 Sephadex G-100 分子筛和 MonoQ 柱,获得纯度约为 80%的 HCV + E 抗原。我们应用重组家蚕核多角体病毒在蚕体中表达人丙型肝炎病毒 C 区及 E1 区基因:将人丙型肝炎病毒的 C 区、E1 区及部分 E2 区基因装入转移载体 pBM030,经原位杂交筛选、酶切鉴定、Southern 杂交检测,确定转移质粒装载成功;将转移质粒与家蚕核多角体病毒重组,在家蚕 BmN 细胞中挑选重组病毒,经点杂交技术确证重组病毒带有目的基因;将重组家蚕核多角体病毒通过针刺和注射方法感染蚕蛹及 5 龄期家蚕,肽抑制试验检测目的基因表达的多肽活性,结果表明,目的基因已得到表达,表达量较高,为每蛹体约 60~600 μ g;我们利用家蚕作为生物反应器,高效表达了丙型肝炎 C+E 抗原蛋白,并将其制成口服药物,用大鼠和小鼠对其药效进行测试,经 ELISA 检测 80%以上的鼠体内均产生了较强的 HCV 抗体(即产生了免疫应答反应)。

2.1.3 逆转录病毒疫苗

目前,人嗜 T 淋巴细胞病毒 I 型(HTLV-I)基因 *env* 和 *p40*,人免疫缺陷病毒(HIV-I)基因 *gag*、*gpl20*、*gp41*、*pol*、*sor* 等,均在家蚕中获得表达。这些基因的表达产物可通过酶联免疫测定(ELISA)等方法有效地诊断病毒的存在。

最近,我们将人类免疫缺陷病毒(HIV-I)基因组中除 *env* 基因以外的其他两种结构蛋白基因(*gag* 和 *pol*)和 6 种调控基因(*tat*、*vif*、*vpr*、*vpu*、*nef* 和 *rev*)在该系统中进行了融合表达,成功表达出该融合蛋白,为探索研制新型爱滋病疫苗奠定了基础。

2.1.4 其他疫苗

AcMNPV 已用于生产鱼类弹状病毒属(*Rhabdovirus*)出血性败血病毒病毒(viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)的一种表面糖蛋白(G-protein),纯化的 G 蛋白可诱导 VHSV 中和抗体产生。Ohnura 认为,利用 BEVS 在蚕体中表达鱼类疫苗,采用口服蚕(蛹)方式喂鱼,既可促进养鱼业,也可促进蚕业的发展,是一种非常经济可行的办法。

2.1.4.1 家蚕表达传染性法氏囊病病毒 VP2 蛋白的免疫原性初步研究

在家蚕培养细胞及幼蚕中表达传染性法氏囊病病毒(IBDV)主要宿主保护性抗原 VP2 蛋白的基础上,初步研究了该表达产物的免疫原性。Western 杂交和 ELISA 均检测到春蚕

和秋蚕中的 VP2 蛋白活性。含 VP2 的春蚕蚕血制成的注射疫苗皮下注射 18 日龄非免疫鸡,两周后二免;含 VP2 的秋蚕蚕血冻干制成口服疫苗,隔天喂服 18 日龄非免疫鸡。于首免后第 10、13、21、28、37 日分别采血,第 37 日攻毒。病毒血清中和试验显示,注射组及口服组的中和抗体滴度最高可达 $1:4211.3$ 和 $1:3118.9$,攻毒结果显示它们对 IBDV 中国标准强毒株 BC6/85 的攻击保护率分别为 100%和 80%。以上研究表明,家蚕表达的 VP2 蛋白具有良好的免疫原性,IBDV 亚单位疫苗的口服免疫有效。这是一个重要发现,为开发实用、低成本的疫苗打下了扎实基础。。

2.1.4.2 重组家蚕病毒表达传染性法氏囊病病毒 VP2 蛋白

将传染性法氏囊病病毒 HZ96 株主要宿主保护性抗原 VP2 的 cDNA 基因克隆到杆状病毒转移载体 pBac PAK8 中,获得重组转移载体 pBacPAK VP2,载体 pBacPAK VP2 与修饰病毒 Bm BacPAK6 线性化基因组 DNA 共转染单层家蚕 *Bombyxmori*(Bm)N 细胞,经细胞内同源重组,筛选到重组病毒。ELISA 和 Western 杂交结果表明,VP2 在家蚕培养细胞和家蚕幼虫中均得到了表达。

2.2 药用蛋白基因的表达

目前,利用家蚕 BmNPV 系统表达已表达出几十种药用蛋白。1995 年,Okuda 等将人生长激素(hGH)cDNA 插入到 BmNPV 启动子的下游,获得的重组 BmNPV hGH 在家蚕幼虫中的表达量为 $160\mu\text{g/mL}$ 血淋巴。1996 年,Sumathy 等在家蚕幼虫中高效表达了全长的 hGH 基因,其表达量为 2.4×10^4 U/mg。1996 年,林松等将编码人骨形态形成蛋白(BMP2)基因的 cDNA 在蚕幼虫中表达,第 5 日表达量最高,1mL 血淋巴中约有 $10\mu\text{g}$ 表达产物,纯化的 BMP2 与骨基质胶原结合后植入大鼠皮下,7d 后在局部诱导生成软骨组织。邓继先等用构建的新型载体在 BmNPV 中高效表达了人的 β -干扰素基因,表达水平为 5×10^7 IU/mL。NGF 是一个神经营养因子,对老年性痴呆症等疾病具有较好的治疗效果。1999 年,郭丽英等以 BmNPV 为载体,在家蚕幼虫中高效表达了功能性的浙江蝮蛇神经生长因子(NGF),表达量为 $400\mu\text{g/mL}$ 血淋巴,这为今后大量表达 NGF 并应用于临床奠定了基础。此外,类胰岛素样生长因子(IGF-II)融合蛋白、人白细胞介素 3(IL-3)、人表皮生长因子(EGF)、人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(hGM-CSF)、人血小板生成素(hTPO)、人促红细胞生成素(hEPO)、人体血液凝固阻塞因子(TFPI)等基因,也在 BmNPV 系统中获得表达。近 20 年来,我们的研究小组在利用家蚕生物反应器生产药用蛋白方面也取得了一些研究进展。

2.2.1 人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子

人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(human granulocyte macrophage colony stimulating factor, hGM-CSF)是一种糖蛋白,具有调节造血细胞的功能,该因子对癌症、白血病、艾滋病等多种疾病有治疗或辅助治疗的效果。重组人粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子临床应用表明,对骨髓造血细胞功能障碍患者、肿瘤病人及免疫功能低下患者疗效显著。张志芳和吴金美分别用重组的 BmNPV 在家蚕幼虫及蛹中高效表达了具有良好生物活性的 hGM-CSF,幼虫血淋巴的表达量可达 4.8×10^5 U/mL,蛹表达量为 3.75×10^5 U/mL。李传松等发现,hGM-CSF 在家蚕幼虫、蛹中以可溶性形式存在,幼虫血淋巴、蛹的匀浆成分中含有较多的杂蛋白,可通过 HAC 沉淀、阳离子阴离子交换柱及凝胶过滤等纯化步骤获得纯度较高的活性分子。张耀洲教授研究团队近年来一直致力于 BmrhGM-CSF 口服临床药物的研究,现已进

人临床Ⅱ、Ⅲ期。

2.2.1.1 重组人粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)胶囊的一般药理学研究

我们利用家蚕生物反应器探索出一条蛋白口服给药的途径,研制出重组人粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子胶囊。为探明由家蚕生物反应器生产的 rhGM-CSF 胶囊的药理作用,以 200、400、800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 种剂量给小鼠灌服,结果对正常小鼠自主活动数与阈下剂量戊巴比妥钠合用对小鼠入睡动物数均无明显影响;以 100、200、400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量由十二指肠注入家猫,对家猫的血压、心率、心电图、呼吸频率和深度均无明显影响。药理实验证明,用家蚕生物反应器生产的 rhGM-CSF 可提高人体白细胞水平。为进一步阐明重组人粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子胶囊的药理作用,本研究以小鼠和猫为实验动物,分别研究重组人粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子胶囊对中枢神经系统和心血管系统、呼吸系统的影响,为其临床研究提供较全面的参考依据,为利用家蚕生物反应器规模化生产 hGM-CSF 口服升白药物奠定了基础。

2.2.1.2 利用家蚕蛹生物反应器生产的人粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子口服给药的临床前安全性评价

目前我们已开发了用家蚕蛹表达的人粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子 rhGM-CSF 的口服药物。试验评价了猕猴、大鼠和小鼠口服 rhGM-CSF 毒性情况,包括遗传毒性、单剂量和重复剂量的全身毒性以及生殖毒性。毒理学试验显示:静脉给药在 NIH 小鼠中最大耐受剂量为 3300 $\mu\text{g}/\text{kg}$,LD 为 2020 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在 SD 大鼠中 LD 为 3660 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。猕猴和大鼠的重复剂量毒性试验结果中显示:口服 rhGM-CSF 后,除了雌性 SD 大鼠的血糖含量增加外,其余各项指标包括白细胞、红细胞、血红蛋白含量、血小板数量以及血细胞凝集等都正常。雌性大鼠每天口服剂量为 1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,给药后血糖浓度显著增加($P<0.001$),但在恢复期间可恢复到正常水平。微核实验、CHL 染色体畸变试验和埃姆斯测验法都表明,无论是在体内还是体外服用 rhGM-CSF,均未见遗传毒性,普通的生殖毒性试验和围产期及致畸敏感期的毒性试验均未见异常现象,表明口服 rhGM-CSF 无明显生殖毒性。临床前毒性试验表明,口服超过临床剂量 10 倍的 rhGM-CSF 与严重的慢性中毒没有联系,其在药理学有效剂量的范围内是很安全的。

2.2.1.3 家蚕蛹生物反应器表达的 29k rhGM-CSF 蛋白口服有效

为了研究家蚕蛹生物反应器表达的 rhGM-CSF 蛋白口服是否有效,张耀洲等进行了体内和体外实验。研究发现,无论 24 小时前是否受到过 γ -射线辐射,口服 BmrhGM-CSF (29kD)均可促进骨髓细胞集落刺激因子形成。用 I^{125} 标记的 rhGM-CSF 在口服 15min 后,通过 SDS-PAGE 可在小鼠血液中检测到 20000 大小蛋白片段。免疫组织化学分析结果发现,BmrhGM-CSF 存在于肠道组织细胞中,推测其可能通过肠道微绒毛吸收。在患白细胞减少症的模型动物小鼠和匹克狗的实验结果表明:口服 BmrhGM-CSF 可刺激小鼠脾中 CFU-S 形成和骨髓细胞中 DNA 的合成,可刺激猕猴和匹克狗骨髓粒细胞的生长。研究结果表明,29000 的 BmrhGM-CSF 糖蛋白口服有效。

2.2.1.4 融合 6 个组氨酸的人粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子在家蚕幼虫中的表达

将融合 6 个组氨酸($6\times\text{his}$)序列的 hGM-CSF 基因插入杆状病毒转移载体 pBacPAK8 中,得到杆状病毒重组转移载体 pBacPAK-His-GM-CSF, pBacPAK-His-GM-CSF DNA 与线性化病毒 Bm-BacPAK6 DNA 共转染 BmN 细胞,获得了表达 rhGM-CSF 融合蛋白的重组

病毒 vBacPAK-His-GM-CSF。用重组病毒感染家蚕五龄起蚕,分别在 24、48、72、96、120h 和 144h 剪腹足取蚕血淋巴,ELISA 法测得 rhGM-CSF 融合蛋白在 120h 的蚕血淋巴中表达量最高,约为 $15\mu\text{g/mL}$ 蚕血淋巴。融合蛋白通过 Poly-His Protein Purification Kit 纯化,SDS-PAGE 和 Western 杂交分析表明,表达产物是 3 种糖基化程度不同的相对分子质量分别约为 18000、20000、31000 的蛋白质。

2.2.2 人乳铁蛋白 cDNA 的克隆及在家蚕细胞中的表达

人乳铁蛋白(human lactoferrin, hLF)是一种在人体中分布很广的蛋白质,主要存在于乳汁、唾液、泪液、胆汁等分泌物中。人乳铁蛋白具有多种重要的生物学功能:是人体非特异免疫系统的重要成员之一,具有广谱抗菌作用、防止脂肪氧化、抑制肿瘤细胞生长的抗病毒作用,还具有 DNA 酶、RNA 酶、ATP 酶、磷酸酶及淀粉酶等多种酶学活性。天然产物中人乳铁蛋白的含量都很低,要获得天然人乳铁蛋白非常困难,因此利用 DNA 重组技术实现 hLF 的异源表达,廉价获取 hLF 成为各国学者追求的目标。但是,近年来除了在牛表达体系中的表达量较高外,其他表达系统的表达量都较低。为了研究人乳铁蛋白基因在家蚕表达体系中的表达特征及其可能的应用价值,刘涛等以中国人正常的乳腺组织为材料,克隆了 hLF 的 cDNA,并首次将其在家蚕细胞中进行表达。ELISA 法测定结果表明,家蚕细胞中 rhLF 相对表达量在表达 120h 达到最高值,约为 13.5mg/L 。体外生物活性试验表明,重组 hLF 对大肠杆菌 JM109 具有抑菌活性。

2.2.3 人白细胞介素-11

白细胞介素-11(interleukin-11, IL-11)是哺乳动物造血微环境中来源于骨髓成纤维细胞的一种多功能细胞因子,它可以刺激 IL-6 依赖细胞株增殖,对于依赖于 T 细胞的 B 细胞抗体分泌具有刺激作用;与 IL-3 协同作用促进人及小鼠巨核细胞的形成与成熟,促进原始祖细胞的增殖,增加血小板数量,促进红细胞生成,诱导肝脏中急性期蛋白的分泌,作用于造血微环境,抑制脂肪的积累。自 1990 年 IL-11 分子克隆成功以来,IL-11 的基因结构及其生物学功能也相继得到阐明,并先后在哺乳动物细胞 cos21、小鼠成纤维细胞系 NIH23T3 和大肠杆菌中进行表达,获得了有活性的 IL-11。郭锡杰等选用缺少编码信号肽序列的 546 核苷酸 hIL-11 cDNA,构建了重组转移载体质粒,与经线性化修饰的家蚕核型多角体病毒(BmNPV) DNA 共转染家蚕培养细胞株 BmN,获得了插入 hIL-11 基因的重组病毒,分别在培养细胞和蚕体内表达了具有活性的 hIL-11。

2.2.4 低相对分子质量尿激酶与膜联蛋白的融合基因在家蚕杆状病毒表达系统中的表达

尿激酶(urokinase, u-PA)和组织型纤溶酶原激活物 tPA 已成功地用于血栓性疾病的溶栓治疗,但因其缺乏血栓特异性或体内半衰期较短,临床应用往往会出现出血等副作用。近年来,发展血栓特异性的靶向溶栓药物已成为人们研究的焦点。低相对分子质量尿激酶 scu-PA232K 具有与 scu2PA 相似的溶栓性质,并可使系统出血的副作用小。膜联蛋白(Annexin V)是从人胎盘及脐动脉内皮细胞提取的一种相对分子质量为 36000 的钙结合蛋白,具有很好的抗栓作用,可增加低相对分子质量尿激酶与膜联蛋白的融合。王丽鸳等将该融合基因重组于线性化的病毒 BmPAK6 DNA 中,获得重组病毒 BacPAK UKAV;用纤维蛋白平板溶圈法测定表达产物的纤溶活性,其融合蛋白具有明显的纤溶活性,约为 $5 \times 10^5 \text{U/个细胞}$ 。用 APTT 法测定表达产物的抗凝活性,比野生病毒 BmPAK6 感染表达产物的 APTT 时间延长了 1 倍以上,表现出明显的抗凝活性。体外实验表明,家蚕培养细胞和

幼虫表达的重组低相对分子质量尿激酶与膜联蛋白融合蛋白具有溶栓与抗栓双功能。

2.2.5 人干扰素 $\alpha 2b$ -胸腺肽 $\alpha 1$ 融合基因在家蚕细胞中的表达和活性研究

干扰素 α -IFN 是一类重要的抗病毒、抗肿瘤的治疗药物,它们具有抗病毒活性、激活自然杀伤细胞、抑制肿瘤细胞增殖及免疫调节等作用。胸腺肽 THY 是一类具有促进 T 淋巴细胞分化、成熟和增强细胞免疫功能的多肽,该活性多肽目前已广泛用于治疗免疫缺陷、肿瘤、病毒性肝炎和自身免疫等疾病。近几年,人们对 IFN 和 THY 进行了联合应用研究证实,IFN 和 THY 的联合应用,具有促进 T 细胞的生长、增殖、分化和激活 NK 细胞活性等功能,并有协同作用,可增强机体的免疫能力,对肿瘤和艾滋病以及其他病毒性疾病的治疗作用比它们单独使用时更强。但两者的融合表达至今尚未见报道,因此郭冬生等将干扰素 (IFN) α_2b 胸腺肽 (THY) α_1 融合基因插入线性化 Bm BacPAK6 DNA 中获得重组病毒 Bm BacPAK IFN THY。蛋白质印迹证明,IFN THY 在家蚕细胞中得到表达,具有 IFN 蛋白的免疫原性;微量细胞病变抑制法和玫瑰花结法显示,120h 表达产物 IFN 活性为 3.1×10^5 U/mL,表达的融合蛋白具有 IFN α_2b 和 THY α_1 的双重生物活性。

2.2.6 人血小板因子 IV 在家蚕杆状病毒表达载体系统中的表达

人血小板因子 IV (human platelete factor IV) (简称 hPF4) 是发现于巨核细胞和血小板 α -颗粒的一种具有特异功能的蛋白质, α -颗粒是血小板的主要贮存和分泌颗粒,它是在骨髓巨核细胞的胞浆里形成的,在血小板受到适当的刺激时分泌出来,具有抗肿瘤、中和肝素和抗凝作用、诱发炎症反应、组织损伤修复等多种生物学功能。于威等通过构建重组病毒将 hPF4 基因在家蚕培养细胞及蚕体内进行了高效表达,表达产物具有明显的生物学活性,表达量在家蚕培养细胞中第 3 天达到最高值,为 $6.088 \mu\text{g}/2 \times 10^6$ 个细胞。

2.2.7 人内皮抑素在家蚕细胞和幼虫中的表达

内皮抑素 (endostatin) 是 1997 年发现的一种新的细胞因子,可抑制血管内皮细胞的增殖,是天然有效的血管生成抑制剂。研究表明,内皮抑素不但对肿瘤的血管形成有强烈的抑制作用,而且能抑制肿瘤的生长与转移,反复用药后可使肿瘤体积缩小并处于休眠状态,且无任何抗药性与毒副作用,因此其在恶性肿瘤的治疗中具有良好的前景,可望成为一种抗肿瘤新药。天然的内皮抑素含量极低,朱振洪等以家蚕杆状病毒为载体,在家蚕培养细胞和幼虫中高效表达了有生物活性的内皮抑素,表达产物经分析对人血管内皮细胞株 ECV304 具有明显的抑制活性。

2.2.8 人血管抑素 (k123) 在家蚕细胞和幼虫中的表达

人血管抑素是 O'Reilly 等发现的一种新生血管抑制剂,该物质通过抑制肿瘤新生血管的生成,切断肿瘤血液和营养的供应,从而抑制肿瘤的生长和转移。王莹飞等将编码人血管抑素的基因在家蚕细胞及蚕体内的得到了高效表达,并进行了抑制体外内皮细胞增殖实验和体内鸡胚尿囊膜 (CAM) 新生血管实验,家蚕细胞产物的活性在家蚕体内表达 144h 时生物活性达到最高值,表达量约 $159 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。表达产物用体外培养的人脐静脉血管内皮细胞 ECV304 及体内鸡胚尿囊膜 CAM 新生血管实验检测,测得血管抑素可明显抑制体外培养的内皮细胞增殖。

2.2.9 人修饰型降钙素和鼠酰胺化酶基因在昆虫细胞中的偶联表达

降钙素 (calcitonin, CT) 是由哺乳类动物甲状腺 C 细胞、鱼和鸟等非哺乳类脊椎动物后鳃体分泌的多肽激素,具有调节体内钙、磷代谢,降低血钙,促进骨对钙的吸收等功能。临床

上,降钙素已广泛用于治疗帕金森氏症、高钙休克、骨质疏松、癌的骨转移、变形性胃炎、骨折等。我们利用重组昆虫病毒表达系统,将蛋白修饰酶—大鼠甘氨酸 α -酰化单氧酶(PAM)与高活性人修饰型降钙素类似物基因在昆虫细胞中共表达,同时获得人降钙素-GST 融合蛋白和大鼠甘氨酸 α -酰化单氧酶的表达。该研究正在进行中。

2.2.10 核糖核酸酶抑制蛋白变体 RIv 在大肠杆菌和家蚕细胞中的表达

核糖核酸酶抑制蛋白(ribonuclease inhibitor, RI)是一种富含亮氨酸和半胱氨酸残基的酸性蛋白质。RI 在高等动物的许多组织中均有表达,胎盘中表达量最高。RI 能抑制胰腺来源的 RNA 酶(RNases of pancreatic type)活性,抑制血管形成因子(angiogenin)的 RNA 降解及促血管形成活性。因此,RI 被认为是胚胎发育、伤口愈合及肿瘤发生中新血管形成的一种调节因子,可以作为抑制因子用于某些依赖血管形成的疾病,也是一种潜在的抗肿瘤药物。黄广华等利用 PCR 方法,从人胚胎肝 cDNA 文库中克隆到了一个编码核糖核酸酶抑制蛋白的基因变体,命名为 RIv,在大肠杆菌中表达并纯化了该蛋白质,此重组蛋白质具有抑制 RNase A 的活性。另外,利用家蚕核型多角体病毒(BmNPV)表达系统在家蚕细胞(BmN)中表达了 RIv。

2.2.11 人促红细胞生成素

红细胞生成素(erythropoietin, EPO)具有促进人体红细胞生长的功能。用重组 BmNPV 在家蚕中表达了具有生物活性的 hEPO,幼虫表达量为 62800U/mL 血淋巴液,蛹表达量为 74000U/mL 血淋巴液。我们进一步在家蚕中高效表达 hEPO,蚕体中的表达量为 5.16×10^5 U/蚕,蛹中为 2.01×10^6 U/蛹,将其制成的口服药物对小鼠具有明显效果,正在进行临床前的病理、药理等方面的实验。

2.3 兽药用蛋白基因的表达

Miyajima 等在家蚕中表达了小鼠白细胞介素-3(IL-3),表达量为 1mg/蚕,这比其他系统要高 1 万倍。Kawai H. 等为了降低猪生长激素成本,利用家蚕 BmNPV 系统成功地表达了此激素,表达量为 500 μ g/mL 血淋巴液,实际用 10~70 μ g/kg 体重,就能明显促进猪的生长。Howk K. 等用重组的 BmNPV 在家蚕幼虫中表达了草鱼的生长因子(GH),每条蚕的表达量达 1mg,并具有免疫学和生物学的活性。将重组病毒感染的家蚕幼虫制成粉状,作为鱼饲料的添加剂,可以加快幼年草鱼的生长速度。肖庆利等用重组的 BmNPV 在家蚕幼虫中高效表达了禽马立克氏病毒糖蛋白 B(MDVgB)抗原,1mL 家蚕血淋巴的表达量可达 1mg 抗原蛋白,为大量生产抗 MDV 感染的亚单位疫苗提供了新的途径。我们在家蚕中表达了传染性鸡法氏囊病病毒(IBDV)主要宿主保护性抗原 VP2 蛋白。动物实验表明,该 VP2 蛋白具有良好的免疫原性,从而为进一步开发动物疫苗奠定了扎实的基础。

2.4 农药用蛋白基因的表达

通过基因工程技术,将内毒素、激素或酶基因插入到 BmNPV 基因组中,重组 BmNPV 不仅能增强杀虫效果,而且还能克服害虫的抗药性,避免化学农药残留污染环境。1989 年, Maeda 将利尿激素基因和 BmNPV 基因组 DNA 重组,并在家蚕幼虫中获得高效表达,其杀虫效果也有所增强。1990 年,保幼激素酯酶(JHE)基因被导入家蚕重组 BmNPV,在家蚕幼虫中也获得很高水平的表达。1991 年,澳洲蝎毒素液的 AaIT 基因被插入到 BmNPV 载体 pBK273 中,构建的重组病毒在家蚕幼虫中表达产生的 AaIT 蛋白具有较强的杀虫活力。1997 年,我们构建了含慈姑蛋白酶抑制剂(API)B 基因的重组 BmNPV,该重组病毒在家蚕

幼虫和蛹中获得高水平表达,幼虫血淋巴液中最高表达量相当于 1.04mg/mL,蛹体内约为 1.35mg/mL。这为进一步利用蚕体大量生产农作物害虫杀虫剂提供了基础。

2.4.1 Tn 细胞凋亡抑制蛋白(Tn IAP)在粉纹夜蛾细胞中的表达和活性研究

细胞凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis,IAP)广泛存在于真核细胞中,并在细胞凋亡过程中起至关重要的作用。当细胞接受了细胞内和细胞外的细胞凋亡触发信号后,与 IAP 作用的蛋白质如 Smac 就通过结合 IAP 而消除了 IAP 对 caspase 的抑制,从而引发细胞凋亡的整个过程。由于第一个 *iap* 基因是从杆状病毒中克隆而来,而且细胞凋亡机制在进化上具有保守性,所以,对杆状病毒宿主细胞如粉纹夜蛾细胞、秋黏虫细胞的内源 IAP 基因的功能研究受到人们的密切关注。1999 年,Dixit 博士的实验室从粉纹夜蛾细胞 Tn2368 中克隆了 *TnIAP* 基因,并在基因水平研究了 *iap* 对昆虫细胞凋亡的抑制效应。廖文韬等对从粉纹夜蛾细胞 Tn25B124 克隆出的 *TnIAP* 在粉纹夜蛾细胞 Tn25B124 进行了表达研究,可溶的重组 TnIAP 能够直接抑制 caspase-9 酶解 Ac-LEHD2AFC 的活性,也能抑制 caspase-9 激活 HEK293 细胞抽提物酶解 Ac-DEVD-AFC 的活性。

2.4.2 东亚钳蝎抑制型神经毒素基因在昆虫细胞中的表达及活性鉴定

东亚钳蝎抑制型神经毒素基因 *BmK IT3* 所编码的多肽物质,是专一性作用于昆虫的神经毒素,它对哺乳动物无害或毒性很小,可作为一种安全、有效的生物杀虫剂。于继彬等根据基因 *BmK IT3* 已知序列,在不影响蝎毒素蛋白序列的前提下,合成基因时参考该类基因表达产物后加工的特点,直接略去了最后 3 个氨基酸的核苷酸序列,并考虑到杆状病毒表达系统密码子的偏爱性,对原基因进行了密码子优化:在氨基酸序列不变的情况下,对该基因的 21 个核苷酸进行改变,将使之适合于通过杆状病毒表达系统进行表达,其 G+C 含量也由原来的 44% 提高到 52%,得到了新蝎毒素基因 *BmK IT3R*,并将其连接到转移载体 pBluescript II SK 上构建重组质粒合成的 pSK(IT3R),使其在真核生物表达系统中进行了毒素蛋白表达。

2.5 其他有用蛋白基因的表达

2.5.1 植酸酶基因在家蚕—杆状病毒表达系统中的表达及其酶学特性

植物性饲料中 2/3 的磷是与植酸结合在一起的,不能为单胃动物(猪、鸡等)利用,从而使植物性饲料养分利用率降低。植酸一直被认为是饲料中的抗营养因子。植酸酶能水解植酸,释放出磷,提高植物性饲料中磷的利用率,并减少动物粪便中的有机磷造成的环境污染。王文兵等将黑曲霉(*Aspergillus niger*)的植酸酶基因在家蚕—杆状病毒系统中进行了表达,蚕体和蛹的表达量分别达到 1.43g/L 血淋巴液和 1.90g/L 血淋巴液。酶活性测定结果表明,蚕体和蛹的表达活性分别为 4.67×10^8 U/L 血淋巴液和 5.99×10^8 U/L 血淋巴液。该酶活性的最适温度范围为 50~60℃,最适 pH 值为 5.5~5.0 和 2.5。杆状病毒系统表达的植酸酶具有耐酸性和抗高温的特性,可以用于生产饲用植酸酶。

2.5.2 氯霉素乙酰基转移酶基因在家蚕核型多角体病毒 P10 基因启动子控制下的表达

我们对家蚕核型多角体病毒(BmNPV)P10 基因,应用 PCR 技术进行 ATG 区定点突变,在 ATG 被突变的同时形成一个 *Bgl* II 酶切位点,得到一个不含 ATG 的 BmNPV P10 基因启动子。将长为 230bp 的经突变后的 *BmNPV P10* 基因 5'端(包括启动子所有特征)片段克隆进 pMMTV-CAT 质粒中,构建成一个 CAT 基因在 *BmNPV P10* 基因启动子控制下的 pBmP10-CAT 瞬间表达质粒。该质粒通过转染进入经野生型 BmNPV 感染的 BmN 细胞

中, CAT 得以表达, 证明 *BmNPV P10* 启动子是比较强的启动子, 可以在 *BmN* 细胞表达外源基因, 具备了作为表达载体启动子的特性。

3 利用家蚕生产有用蛋白的技术开发

由于家蚕用来表达外源基因具有其特有的优势, 今后有可能将蚕体作为有用蛋白质的加工工厂, 重组病毒可以在蚕体内生产医药、兽药、农药等各种有用蛋白质。为此有必要建立具有一定规模的、高效率的生产工厂, 并开发相应的生产技术。

目前, 日本蚕丝昆虫农业技术研究所已实现了从病毒载体的接种到蚕体液收集整个过程的系统化操作, 做成了以一星期循环养蚕 2 万头的规模生产有用蛋白的模式工场。该模式工场的技术特点(见图 2 所示)。

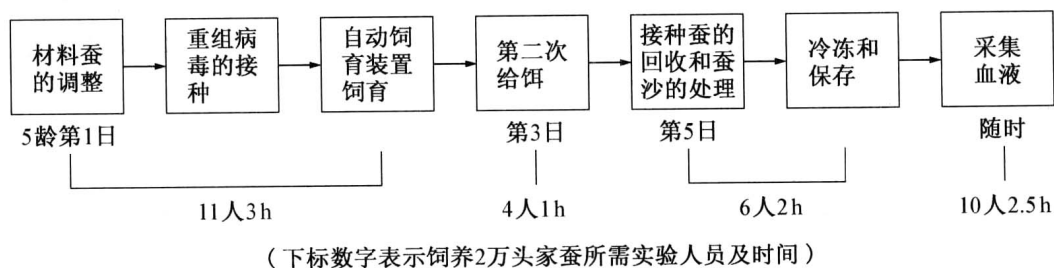


图 2 高科技养蚕技术体系的流程

3.1 高效率接种装置

开发出了重组病毒连续注射装置, 用该装置给 2 万头家蚕接种, 4 人操作约 23h, 即每人每小时可接种 2174 头蚕, 大大提高了工作效率。

3.2 自动饲育装置

自动饲育装置包括能保证进行基因重组操作的高度清洁环境的硬件设备、能自动调节室内温湿度的电脑检测控制系统及家蚕饲育自动运转系统等三个部分。该装置可按预先设定的操作程序(循环、给饵、作业等)自行操作。

3.3 家蚕体液收集技术

开发了体液冷冻收集技术, 大大提高了重组蛋白质的提取效率。据统计, 可以从 500 头家蚕中成功提取 370mL 的体液, 即可从每头蚕中提取 0.74mL 血淋巴, 所收集的体液达到家蚕全部体液的 80%。

4 家蚕生物反应器的发展趋势

从外源基因产物的大量生产方面来讲, 家蚕 *BmNPV* 是一种高效的表达系统。以 *BmNPV* 作为表达外源基因的载体, 它的宿主范围狭窄, 安全性好, 同时由于人工孵化及人工饲料技术的发展, 可以全年进行大规模无菌饲养, 为大量生产有用物质提供了保证。自该系统问世的二十多年来, 国内外众多实验室和科研工作者相继利用该系统进行了相关的基础研究、应用基础研究以及应用开发研究, 尤其是在生物制药领域和农林等领域的应用研

究。我国在利用家蚕生物反应器开发医药用基因工程产品方面也有诸多的研究,如:表达产物的分离纯化技术、产品质量的检测技术、动物免疫实验、毒理实验及临床试验等,均取得了相当的成绩,从而为利用家蚕生物反应器大量生产有用物质奠定了基础。

5 《家蚕生物反应器》的重点内容及其意义

本书共分为五个章节,主要包括家蚕的分子生物学、核型多角体病毒为载体的昆虫表达系统、家蚕胚胎细胞系的构建、家蚕生物反应器及其应用、家蚕生物反应器的应用前景五方面的内容。实现对家蚕生物反应器的系统论述,对推广和推动家蚕生物反应器产业化具有重要的意义。

著 者

2008年5月

目录 CONTENTS

第一章 家蚕的分子生物学 / 1

第一节 家蚕的生物学特性 / 1

- 1 生活史 / 1
- 2 蚕的外部形态 / 2
- 3 家蚕的生长与发育 / 2
- 4 养蚕的环境标准 / 3

第二节 杆状病毒基因组学 / 3

- 1 杆状病毒及其侵染机制 / 3
- 2 杆状病毒基因组学研究 / 7
- 3 杆状病毒基因结构与功能 / 20

第三节 蚕蛹的小 RNA 研究 / 35

- 1 蚕蛹小 RNA 的研究 / 35
- 2 蛹 mRNA-like 小 RNA 的研究 / 43

第四节 家蚕蛹 cDNA 文库的构建和蛋白质组学 / 75

- 1 家蚕蛹 cDNA 文库的构建 / 75
- 2 家蚕蛹蛋白质组学 / 79

第五节 基于家蚕杆状病毒表面展示技术的膜蛋白组学 / 90

- 1 基于家蚕杆状病毒表面展示技术分离膜蛋白的方法 / 91

第二章 以核型多角体病毒为载体的昆虫表达系统 / 98

第一节 昆虫细胞 /NPV 表达系统的原理和经典操作方法 / 98

- 1 原理 / 98
- 2 转移载体质粒的构建 / 98

- 3 重组病毒的组建和筛选 / 101
- 第二节 最新发展的改进型操作方法 / 102
 - 1 NPV DNA 线性化 / 102
 - 2 NPV DNA 线性化并删除 *ORF1629* / 103
 - 3 在 *S. cerevisiae* 中 YAC 介导的 NPV 重组 / 103
 - 4 在 *E. coli* 中转座子介导的 NPV 重组 / 104
 - 5 体外定点重组 / 104
 - 6 Bac to Bac 系统 / 105
 - 7 杆状病毒表面展示技术 / 109
- 第三节 外源基因的表达、转录及转译后加工 / 112
 - 1 真核生物、病毒、细菌、霉菌等多种来源基因的表达 / 112
 - 2 转录后加工 / 112
 - 3 糖基化 / 113
 - 4 磷酸化、脂肪酰化和酰胺化 / 113
 - 5 蛋白水解 / 114
 - 6 细胞内定位和分泌 / 114
 - 7 高级结构的形成 / 114
- 第四节 昆虫细胞/NPV 表达系统的优越性和缺陷 / 115
 - 1 昆虫细胞/NPV 表达系统的优越性 / 115
 - 2 家蚕/BmNPV 表达系统相对于 Sf 细胞/AcMNPV 表达系统的优势 / 115
- 第五节 BmBacPAK 病毒的组建 / 116
 - 1 BmBacPAK 病毒的组建技术 / 116
 - 2 BmBacPAK 病毒 / 118
- 第六节 BmBacPAK 载体病毒在家蚕细胞中进行报告基因的表达 / 121
 - 1 质粒的构建 / 121
- 第七节 家蚕核型多角体病毒 *p26* 基因及同源重复区 *hr3* 的克隆和序列分析 / 125
- 第八节 家蚕核型多角体病毒同源重复区 *hr5* 的克隆和序列分析 / 128
 - 1 BmNPV DNA *Kpn* I-D 片段的克隆及两端序列分析 / 128
 - 2 BmNPV *hr5* 全序列分析 / 128
- 第九节 BmNPV *hr5* 的重复起始区功能 / 130
 - 1 含 BmNPV *hr5* 结构的质粒在 BmNPV 感染的 BmN 细胞中的复制 / 130
 - 2 pB *hr5* 和 pB *hr5a* 质粒在 AcMNPV 感染的 Sf21 细胞中的复制 / 131
 - 3 AcMNPV 的 *hr* 序列是一种增强子 / 131
 - 4 不同 NPV 在不同宿主细胞中功能和结构不同 / 132