

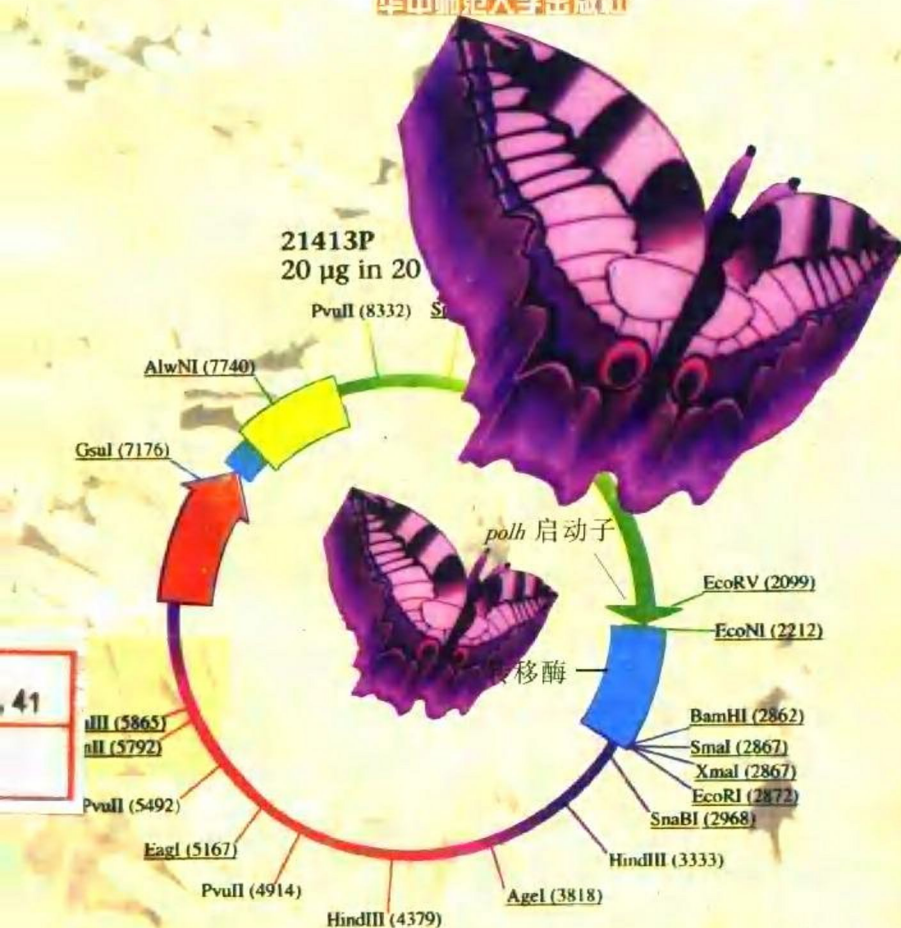
杆状病毒 表达载体系统

GANZHUANG BINGDU

BIAODA ZAITI XITONG

黎路林 编著

华中师范大学出版社



Q939.41

LLL

Y413.1/15

杆状病毒表达载体系统

黎路林 编著

华中师范大学出版社

(鄂)新登字 11 号

图书在版编目(CIP)数据

杆状病毒表达载体系统/黎路林 编著.

—武汉:华中师范大学出版社,1996. 8.

ISBN 7-5622-1628-2

I. 杆…

I. 黎…

Ⅲ. 杆状病毒—基因工程—表达载体系统

IV. Q939. 46

杆状病毒表达载体系统

◎ 黎路林 编著

华中师范大学出版社出版发行

(武昌桂子山 邮编:430070)

新华书店湖北发行所经销

华中师范大学出版社印刷厂印刷

责任编辑:曾令波

封面设计:蔡跃华

责任校对:张 钟

督 印:方汉江

开本:850×1168 1/32

印张:9 字数:240 千字

版次:1996 年 8 月第 1 版

1996 年 8 月第 1 次印刷

ISBN 7-5622-1628-2/Q · 21

印数:1—1000 册

定价:12.00 元

本书如有印装质量问题,可向承印厂调换。

内 容 提 要

本书系统地介绍了杆状病毒表达载体系统以及利用杆状病毒表达载体系统表达外源基因的技术方法。内容包括杆状病毒的分子生物学特征、利用杆状病毒作为基因表达载体的原理、转移载体、亲本病毒、昆虫细胞培养、杆状病毒的滴定和纯化、外源基因与转移载体的嵌合、重组病毒的构建、筛选和鉴定以及重组蛋白的扩大生产等。本书可供从事病毒学、微生物学、昆虫学、生物化学和分子生物学等专业的科技人员、高等院校教师和实验技术人员参考，也可以作为相关专业研究生和高年级本科生的教学参考书。

前 言

1983 年, Smith 等首次报道利用苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒在草地贪夜蛾细胞系中成功地表达了人 β -干扰素。此后, 杆状病毒表达载体系统研究作为一个新的研究领域迅速发展。目前, 利用杆状病毒表达的外源基因已经超过 500 种, 其来源遍及动物、植物、真菌、细菌和病毒。杆状病毒已被证明是最有效的真核基因表达载体。这种新型的基因表达载体系统无论是作为生产系统在疫苗、酶和诊断试剂以及其它生物活性物质的制备方面, 还是作为研究工具对于基因表达调控、蛋白质与蛋白质、蛋白质与核酸的相互作用以及蛋白质的结构与功能方面的研究工作都具有重要的应用价值。

在短短十几年时间里, 利用杆状病毒表达外源基因的技术得到了迅速发展。1987 年 Summers 和 Smith 编写了第一本介绍利用杆状病毒在昆虫细胞中表达外源基因的操作方法的小册子“A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures”, 1992 年两本全面介绍杆状病毒表达载体系统及其应用技术的著作“Baculovirus expression system. A laboratory guide”(King and Possee)和“Baculovirus expression system. A laboratory manual”(O'Reilly et al.)面世。这几本书对于杆状病毒表达载体系统的推广应用及其本身的技术发展发挥了推动和指导作用。最近几年, 杆状病毒表达载体系统的研究工作又取得了许多重要成就, 主要体现在以下几个方面: 其一, 新建立的构建重

组杆状病毒的方法大大简化了重组病毒筛选和纯化的步骤。其二,新一代杆状病毒表达载体不仅能在昆虫细胞中高效表达外源目的基因而且能够使外源基因产物被细胞分泌和易于纯化。其三,以TN5B1细胞系为代表的新细胞系作为杆状病毒表达载体的基因表达受体系统其生产外源基因表达产物的能力大大优于传统的Sf细胞系。其四,利用昆虫细胞大规模培养生产重组蛋白的技术条件已日渐成熟。其五,杆状病毒分子生物学的研究工作取得了重大进展。1994年,Ayers等发表了AcMNPV基因组全序列分析结果;目前已经鉴定出8个杆状病毒DNA复制原点和18个晚期表达因子以及其它一些重要的功能基因。杆状病毒分子生物学的研究成果必然会使杆状病毒表达载体得到进一步改良和完善。

这本书共分10章。其中,前两章讨论杆状病毒分子生物学特征和利用杆状病毒作为基因表达载体的原理;三、四章讨论转移载体和亲本病毒以及在构建重组杆状病毒时选择转移载体和亲本病毒的策略;五、六章介绍昆虫细胞培养和利用昆虫细胞培养滴定和纯化杆状病毒的方法;七、八、九章介绍重组杆状病毒构建、筛选和鉴定的操作方法;最后一章简要介绍利用昆虫细胞培养和虫体生产重组蛋白以及昆虫饲养的方法。彭建新副教授参加编写了第二章。本书介绍的技术方法大部分取自以往发表的文献资料,其中大部分被作者的同事和作者本人采用过;有些方法是在前人的工作基础上根据自己的工作经验修改而成的。在编写本书的过程中,作者力求反应杆状病毒表达载体系统研究领域的最新成就。

由于作者本人的理论水平和实际工作经验的限制,书中一定会有许多不足或错误的地方,欢迎读者提出批评和修改意见。

本书在编写过程中得到了我的导师陈曲侯教授和中山大学龙繁新教授的指导。两位老师审阅了全部书稿并提出了许多修改意

见。中国科学院院士蒲蛰龙教授、余泽华副教授和吴柏春副教授审阅了书稿；洪华珠教授对本书的编写给予了支持和鼓励；施先宗博士、王国秀老师和吴文言博士校阅书稿并提出了不少有益的建议；李迎秋博士和王运湘老师提供了参考资料；本所病毒学和昆虫学专业研究生胡薇、钟雪萍、李春华等同学以及董炜同志在资料的收集、整理、书稿的誊写和插图的制作等方面提供了帮助；在此一并表示感谢。

本书的出版得到了华中师范大学出版基金的部分资助；华中师范大学出版社、科研处和孙先明处长给予了热情支持；责任编辑曾令波老师做了大量的工作；深表谢意。

在本书即将出版的时候，我还要感谢我的妻子董慧和我们的儿子扬扬，在编写本书的日子里，他们表现了极大的耐心，并给予了理解和支持。

作 者

1996年6月于武昌桂子山

目 录

前言	(1)
第 1 章 杆状病毒概论	(1)
1.1 杆状病毒的结构	(2)
1.2 杆状病毒的感染周期	(5)
1.2.1 对虫体的感染	(5)
1.2.2 离体复制	(7)
1.3 杆状病毒的基因组成	(11)
1.3.1 物理图谱	(12)
1.3.2 已经鉴定的杆状病毒基因	(14)
1.3.3 同源区	(30)
1.4 杆状病毒基因表达的调控	(31)
1.4.1 基因表达的时序性	(31)
1.4.2 转录的调节	(32)
1.5 杆状病毒 DNA 的复制	(39)
1.5.1 DNA 复制原点	(39)
1.5.2 DNA 复制的方式	(41)
1.6 杆状病毒感染对宿主基因表达的影响	(42)
第 2 章 利用杆状病毒作为基因表达载体的原理	(43)
2.1 杆状病毒作为基因表达载体的条件	(44)
2.2 受体系统——昆虫细胞系、幼虫和蛹	(45)
2.3 构建重组杆状病毒的技术原理和方法	(47)
2.4 杆状病毒介导外源基因表达的特点	(50)

第 3 章 杆状病毒转移载体	(54)
3.1 什么是杆状病毒转移载体?	(54)
3.2 杆状病毒转移载体的构建	(57)
3.3 杆状病毒转移载体的类型	(60)
3.3.1 单基因转移载体	(61)
3.3.2 多基因转移载体	(99)
第 4 章 构建重组病毒的策略	(107)
4.1 转移载体的选择	(107)
4.2 亲本病毒的选择	(109)
4.2.1 与 <i>polh</i> 位点型转移载体匹配使用的亲本病毒	(110)
4.2.2 与 <i>p10</i> 位点型转移载体匹配使用的亲本病毒	(112)
4.2.3 转移载体与亲本病毒的匹配	(113)
4.2.4 穿梭载体	(114)
4.3 重组介体	(115)
第 5 章 昆虫细胞培养	(121)
5.1 昆虫细胞系	(121)
5.2 昆虫细胞培养基	(123)
5.2.1 增补血清培养基	(123)
5.2.2 无血清培养基	(126)
5.2.3 低血清培养基	(127)
5.2.4 培养基的配制	(128)
5.3 昆虫细胞的传代培养	(131)
5.3.1 细胞培养的条件和操作规程	(131)
5.3.2 单层培养	(134)
5.3.3 悬浮培养	(135)
5.3.4 由有血清培养转入无血清培养的过渡	(136)
5.4 昆虫细胞的冻存和复苏	(137)
5.4.1 昆虫细胞的液氮冻存和复苏	(137)

5.4.2 昆虫细胞的短期低温保存	(139)
第6章 杆状病毒在昆虫培养细胞中的增殖、滴定 和纯化	(141)
6.1 杆状病毒对培养细胞的感染	(141)
6.1.1 影响杆状病毒感染培养细胞的因素	(142)
6.1.2 单层培养细胞的感染	(144)
6.1.3 悬浮培养细胞的感染	(146)
6.2 杆状病毒的滴定	(146)
6.2.1 空斑测定	(147)
6.2.2 TCID ₅₀ 测定	(150)
6.3 杆状病毒毒种的纯化	(152)
6.3.1 空斑纯化	(153)
6.3.2 终点稀释纯化	(154)
6.4 杆状病毒毒种的扩增	(156)
6.5 BVs 的大量制备	(158)
第7章 外源基因与转移载体的嵌合	(160)
7.1 外源基因的分离和修饰	(160)
7.1.1 外源目的基因的分离	(161)
7.1.2 外源基因片段的修饰	(163)
7.2 转移载体的准备	(165)
7.3 外源基因与转移载体的连接	(167)
7.4 嵌合转移载体的筛选和鉴定	(168)
7.4.1 细菌的转化	(168)
7.4.2 嵌合转移载体的检测	(170)
7.5 嵌合转移载体的扩增和纯化	(174)
7.5.1 细菌的大量培养和裂解	(175)
7.5.2 嵌合转移载体 DNA 的纯化	(177)

第 8 章 重组病毒的构建	(181)
8.1 感染性亲本病毒 DNA 的准备	(181)
8.1.1 从 BVs 提取 DNA	(181)
8.1.2 从 PIBs 提取 DNA	(184)
8.1.3 亲本病毒 DNA 的线化	(185)
8.2 嵌合转移载体和亲本病毒 DNA 对昆虫细胞的共转染	(186)
8.2.1 磷酸钙-DNA 共沉淀转染法	(186)
8.2.2 Lipofectin 介导转染法	(187)
8.3 将嵌合转移载体和亲本病毒 DNA 导入酵母细胞	(188)
8.4 将供体质粒和亲本病毒 DNA 导入大肠杆菌细胞	(192)
8.5 重组病毒的筛选和纯化	(194)
8.5.1 重组病毒的筛选	(194)
8.5.2 重组病毒的纯化	(195)
第 9 章 重组病毒的分析 and 鉴定	(198)
9.1 重组病毒基因组的分析	(198)
9.1.1 从受感染细胞中提取病毒 DNA	(198)
9.1.2 病毒 DNA 的限制性内切酶分析	(200)
9.1.3 病毒 DNA 的 Southern 杂交分析	(202)
9.2 外源基因表达产物分析	(207)
9.2.1 病毒感染细胞蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳	(208)
9.2.2 病毒感染细胞蛋白质的放射性标记	(212)
9.2.3 病毒感染细胞蛋白质的免疫学分析	(214)
9.2.4 外源基因产物表达的时程分析	(224)
9.3 外源基因表达产物转译后加工的分析	(225)
9.3.1 糖基化分析	(225)

9.3.2 磷酸化分析	(228)
9.3.3 十六脂酸化和十四脂酸化分析	(229)
9.4 外源基因转录的分析	(230)
9.4.1 从病毒感染细胞中提取 RNA	(230)
9.4.2 病毒 RNA 的 Northern 杂交分析	(232)
第 10 章 重组蛋白的扩大生产	(236)
10.1 利用培养细胞生产重组蛋白	(237)
10.1.1 利用悬浮培养细胞生产重组蛋白	(237)
10.1.2 利用生物反应器生产重组蛋白	(239)
10.2 利用昆虫虫体生产重组蛋白	(241)
10.2.1 鳞翅目昆虫的发育	(241)
10.2.2 鳞翅目昆虫的饲养	(242)
10.2.3 病毒感染	(246)
10.2.4 重组蛋白的收集	(248)
10.2.5 从虫体中分离纯化多角体	(250)
附录 常用贮备液、缓冲液和培养基	(252)
参考文献	(256)

第 1 章 杆状病毒概论

杆状病毒 (Baculoviruses) 因其所有成员的病毒体呈杆状而得名。这类病毒目前主要见于昆虫体内, 尚未发现节肢动物以外的杆状病毒宿主。杆状病毒基因组为双链 DNA 分子, 病毒体有包膜。根据包含体的有无以及包含体的形状, 杆状病毒(科)被区分为三个属: 核型多角体病毒属 (Nuclear polyhedrosis viruses)、颗粒体病毒属 (Granulosis viruses) 和非包埋杆状病毒属 (Nonoccluded baculoviruses) (图 1-1)。关于杆状病毒的研究工作, 目前主要集中在以苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) 为代表的核型多角体病毒。常用作基因表达载体的杆状病毒除了 AcMNPV 外, 还有家蚕核型多角体病毒 *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV)。

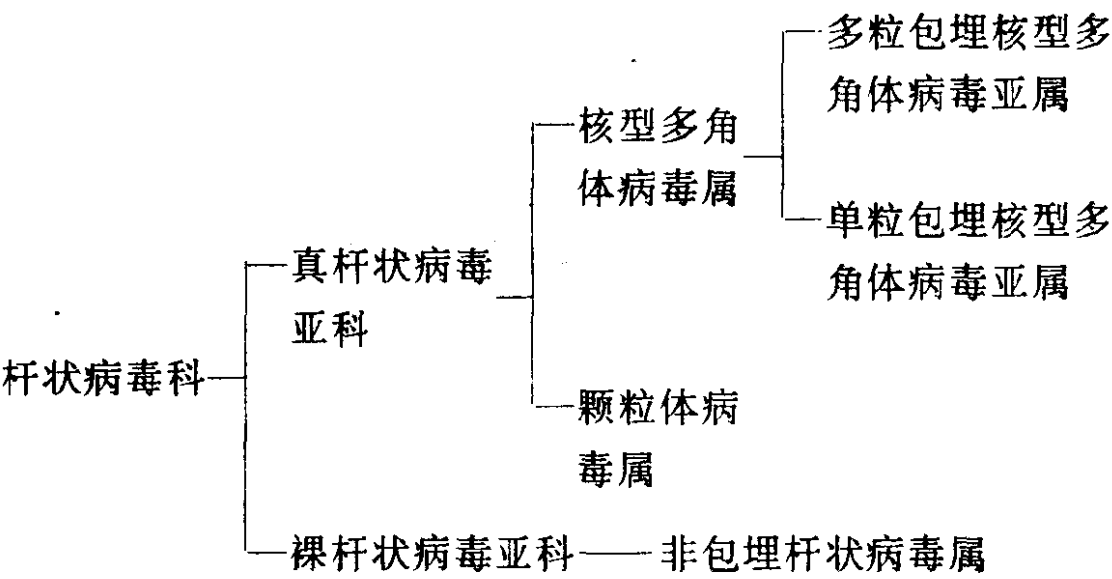


图 1-1 杆状病毒的分类

1.1 杆状病毒的结构

杆状病毒的病毒体(virion, 又称病毒粒子)由壳体(capsid)、壳体内部的核心(core)和壳体外的包膜(envelope)构成。壳体呈圆筒状。真杆状病毒亚科病毒的壳体直径 30~50nm, 长 250~300nm (Wilson, 1991)。壳体两端的结构存在差异, 其长度可延伸, 故而可容纳更大的 DNA 分子(Fraser, 1986)。核心由浓缩的 DNA 分子与蛋白质结合而成的核蛋白构成, 与 DNA 结合的主要蛋白质是一种分子量为 6.9k 的碱性蛋白 P6.9(又称核心蛋白、VP12 或碱性蛋白)(Tweeten et al., 1980; Wilson et al., 1986)。壳体与其包围的核心合称核壳(nucleocapsid)。杆状病毒基因组是一个双链、环状 DNA 分子, 呈超螺旋状态, 其长度为 90~230kbp(千碱基对)(Wilson, 1991)。AcMNPV DNA 的长度为 134kbp (Ayers et al., 1994), BmNPV DNA 的长度与 AcMNPV 相近 (Maeda, 1992)。

真杆状病毒亚科病毒具有两种类型的病毒体(图 1-2)。核壳在细胞核内形成后以两种不同的方式获得包膜。有些核壳通过细胞质膜芽殖获得包膜, 其包膜来源于细胞质膜。这一类病毒体通过细胞质膜芽殖释放到细胞外的细胞间质(或细胞培养的培养基)中, 称为芽殖病毒体(budded virion, BV), 或胞外病毒体(extracellular virion, ECV), 或非包埋型病毒体(nonoccluded virion, NOV)。BV 的包膜比较宽松, 其一端具有突起的膜粒。另一些核壳在宿主细胞核内获得包膜。这类病毒体的包膜也具有脂质双分子层结构, 但其来源目前尚不能确定, 有可能是来源于宿主细胞核内膜。这类在细胞核内获得包膜的病毒体最后被包埋在蛋白质结晶包含体中, 称为多角体源性病毒体(polyhedron-derived virions, PDV)。BV 与 PDV 包膜的化学组成存在很大差别。gp64(gp67)蛋白是 BV 包膜特有的和主要的糖蛋白, 对 BV 以吸附内吞的方

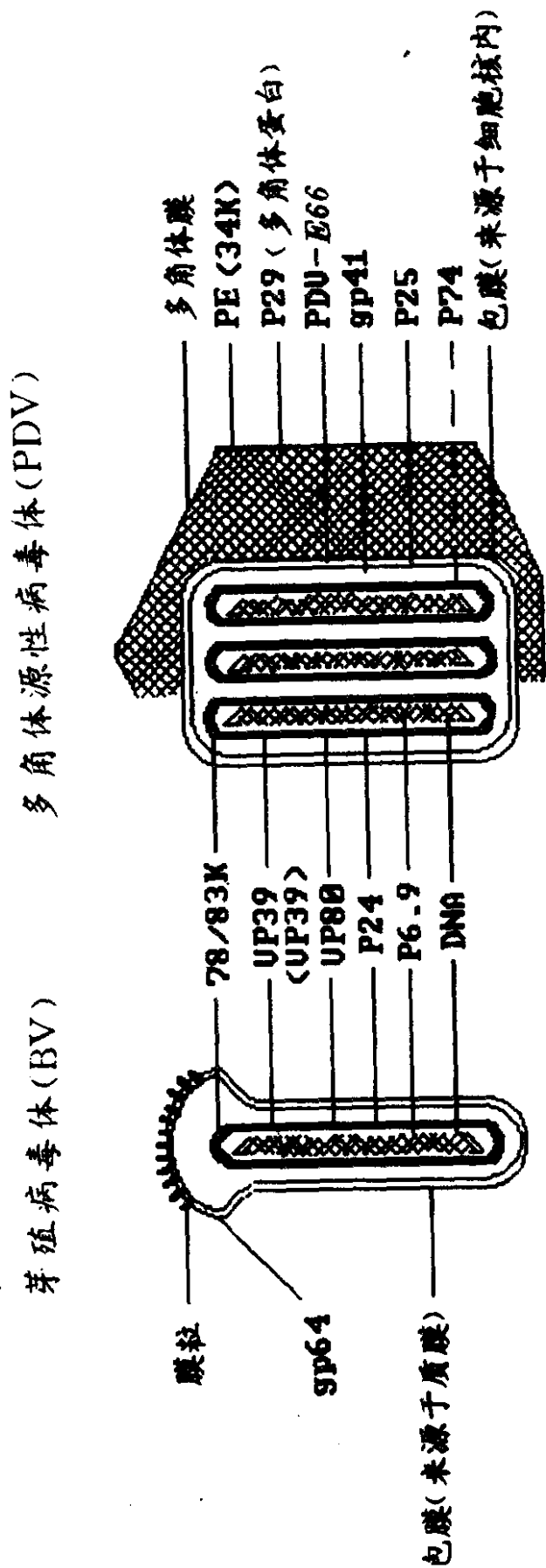


图 1-2 杆状病毒的结构(根据 Rohrmann, 1990 修改)

式侵入宿主细胞起重要作用(Volkman & Goldsmith, 1985; Blissard & Wenz, 1992)。PDV-E66、PDV-E43、gp41 和 P25 是 PDV 包膜特有的结构蛋白(Braunagel & Summers, 1994; Russell & Rohrmann, 1993; Whitford & Faulkner, 1992)。最近, 在 AcMNPV 中还发现了 BV 特有的另外 5 种糖蛋白和 1 种磷蛋白以及 PDV 特有的 6 种糖蛋白和 1 种磷蛋白。同时还发现缩醛磷脂酰丝氨酸是 BV 包膜的主要磷脂成份, 卵磷脂和磷脂酰乙醇胺是 PDV 的主要磷脂成份(Braunagel & Summers 1994)。

病毒包含体是包埋着病毒体的蛋白质晶体。核型多角体病毒的包含体在宿主细胞核内形成, 呈多面体形, 称为多角体(polyhedral inclusion body, PIB), 有时为了区别于质型多角体病毒(一类 RNA 病毒)在细胞质内形成的多面体形包含体, 也将核型多角体病毒的包含体叫做核多角体。构成核多角体的蛋白质称为多角体蛋白(polyhedrin)。核型多角体病毒的每个包含体内通常包埋着许多病毒体, 其中有些病毒体以多个成束包被在一层被膜中(称为病毒束), 再以病毒体束的形式包埋在包含体中, 这样的核型多角体病毒称为多粒包埋核型多角体病毒(multiply embedded nuclear polyhedrosis viruses, MNPV); 有些病毒的多角体中病毒体只以单个的形式包埋在包含体中, 一个多角体中含有许多单个的病毒体, 称为单粒包埋核型多角体病毒(singly embedded nuclear polyhedrosis virus, SNPV)。核型多角体病毒包含体表面还有一层富含碳水化合物的外被, 称为多角体膜(polyhedron envelope, PE 或 calyx)。多角体膜借硫醇键与多角体蛋白相连。其作用可能是增加包含体的稳定性。

颗粒体病毒包含体呈卵圆形, 称为颗粒体(granule)或蒴状体(capsule)。每个颗粒体内只包埋一个病毒体, 其体积比核多角体小得多。构成颗粒体的蛋白质称为颗粒体蛋白(granulin)。

裸杆状病毒亚科病毒的病毒体独立存在, 不形成包含体。属于

这个亚科的椰蛀犀金龟 *Oryctes rhinoceros* 病毒的核壳大小为 $10 \times 100\text{nm}$, 在其一端有一个细长的尾状突起($10 \times 270\text{nm}$)。美国棉铃虫非包埋型杆状病毒(*Heliothis zea nonoccluded virus*, HzNOB)的病毒体形态与包埋型病毒的病毒体相似, 大小为 $80 \times 414\text{nm}$, 但比后者大得多。

1.2 杆状病毒的感染周期

杆状病毒具有明显的宿主特异性, 一种病毒只能感染一种或少数几种昆虫。例如, 棉铃虫核型多角体病毒(HaNPV) 仅发现能感染棉铃虫和烟青虫幼虫(湖北省荆州地区微生物站, 华中师范学院生物系生防组, 1976)。AcMNPV 是目前所知宿主谱最宽的杆状病毒, 可以感染 40 多种昆虫(Bishop et al., 1988)。杆状病毒在昆虫体内的感染还具有组织特异性, 一般在中肠、脂肪体、表皮、血细胞和气管上皮细胞中复制。在培养细胞中, 各种病毒也具有不同的受纳细胞(permissive cells)系统。一般说来, 核型多角体病毒比较容易在昆虫细胞系中复制, 而在颗粒体病毒中至今尚未建立一个比较满意的颗粒体病毒—受纳细胞系统。人们最熟悉的杆状病毒—昆虫细胞系统是 AcMNPV—Sf 细胞系统(Sf 是草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 细胞系 IPLB—Sf—21 及其克隆株 Sf9 的简称)。有关杆状病毒复制周期、基因组织和基因表达调控的许多实验都是利用这一病毒—细胞实验系统进行的。AcMNPV—Sf 细胞系统也是最常用的杆状病毒基因表达载体系统。

1.2.1 对虫体的感染

昆虫的早龄幼虫对杆状病毒比较敏感。病毒感染的最初阶段发生在中肠。病毒多角体随食物被虫体吞食后进入中肠, 在中肠内的碱性条件下分解并释放出病毒体。病毒体穿过围食膜附着在中肠细胞的微绒毛膜上, 通过病毒包膜与细胞质膜融合将病毒核壳释放到细胞质中(Granados & Williams, 1986)。在中肠细胞中复