

用杆状病毒为载体在昆虫细胞中表达 马立克病病毒 pp38 基因

崔治中

(江苏农学院农医系, 扬州, 225001)

L. F. Lee

Lee, LF

(美国农业部禽病及肿瘤实验室, 密西根, 美国)

S852.65

提 要

鸡马立克病病毒 (MDV) 38kd 磷蛋白 (pp38) 基因中包括起始密码子和终止密码子的完整编码序列被整合进杆状病毒 AcNPV 的转移载体质粒 pVL1392, 用所得的含 pp38 基因的重组转移载体质粒 pVLpp38 I 与野生型杆状病毒 AcNPV 的 DNA 共转染昆虫传代细胞系 Sf9 细胞后, 用荧光抗体法以抗 MDV 单克隆抗体 H₁, 筛选到能表达 MDV pp38 的重组杆状病毒克隆 BP38 I。免疫印迹试验表明, 在重组病毒 BP38 I 感染的 Sf9 细胞溶解物中, 可表现一条分子量约为 35—36kd 的为单克隆抗体 H₁ 识别的 MDV 特异性蛋白带。

关键词: 马立克病病毒 38kd 磷蛋白基因 杆状病毒 表达性载体

昆虫细胞

马立克病病毒

由单克隆抗体 H₁ 识别的鸡马立克病病毒 (MDV) 的 38kd 磷蛋白 (pp38)^[1,2] 被认为是一种与该病毒诱发肿瘤相关的抗原^[3]。不久前, 我们已用大肠杆菌噬菌体 λgt11 载体系统分离、克隆和表达了这一 pp38 基因的部分片段^[4], 进而又完成了对整个 pp38 基因的克隆、定序及结构分析^[5]。MDV 是目前唯一的一个能为疫苗有效预防的自然大批发病的致肿瘤病毒。对它的研究, 不仅对养禽业的发展有着经济意义, 而且对研究病毒致肿瘤的发生与预防机制也有广泛的生物学意义。由于 MDV 是一种细胞结合病毒, 提纯病毒的蛋白质成分将是很困难的。鉴于近几年来, 应用杆状病毒为载体在昆虫细胞中表达外源基因的技术日趋完善^[5,6], 本研究试图在昆虫细胞中表达 MDV 的 pp38 基因, 由此可提纯 MDV 的这种磷蛋白。这将有助于研究该蛋白质在 MDV 致肿瘤过程及免疫保护反应中的作用。

材 料 和 方 法

一、构建含 MDV pp38 基因的杆状病毒重组转移载体 杆状病毒 AcNPV 的转移载体质粒 pVL1392^[7] 由美国 Texas A & M 大学 Dr. Summers 赠给。MDV pp38 基因由笔者^[4] 等分离到, 完整基因

1991年3月11日收到, 7月20日修回

本研究为国家自然科学基金及江苏省教委自然科学基金资助项目, 也是和美国农业部禽病及肿瘤实验室的合作项目。

的克隆、定序及结构分析不久前亦已完成。编码 pp38 的译读序列由 870 个碱基对组成, 不含有内含子。一个从起始密码子 ATG 到终止密码子 TAA 下游约 70 个碱基对的两端分别接上了 BamHI 和 KpnI 识别序列的 pp38 基因 DNA 片段, 按图 1 所示从其相应质粒切下后于 BamHI 及 KpnI 切点处

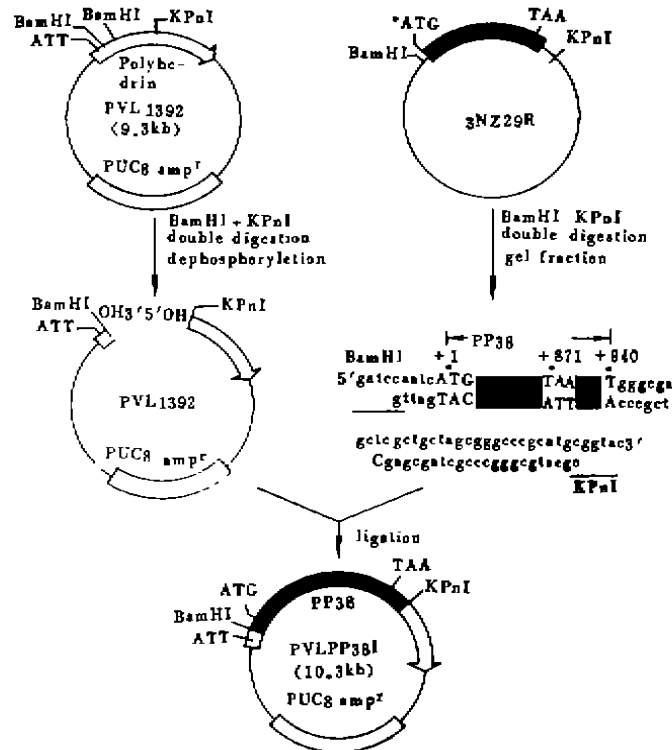


图 1. 构建重组转移载体质粒 pVLpp38 I 的模式图

Fig. 1. Schematic diagram of the construction of the recombinant transfer vector plasmid pVLpp38 I

整合进转移载体 pVL1392 质粒中, 由此得到的重组转移载体质粒为 pVLpp38 I。该质粒的正确性由酶切分析证实 (见图 2)。

二、从共转染的昆虫 Sf9 细胞中筛选能表达 MDVpp38 的重组杆状病毒 在含有 TNM-FH 培养液的平皿中培养的昆虫传代细胞系 Sf 9 细胞单层, 按 Summers 和 Smith^[9] 的方法, 用可转染性野生型 AcNPV 的 DNA (购自美国 Invitrogen 公司) 及用氯化铯梯度离心提纯的重组转移载体 pVLpp38 I 质粒 DNA 作共转染反应。经转染的 Sf9 细胞单层在 27℃ 下继续培养 4—5 天后, 收取培养液于 4℃ 下保存, 并按 Invitrogen 公司操作手册推荐的方法滴定其病毒效价。为了用荧光抗体法筛选能表达 MDVpp38 的重组病毒, 用 1000 个左右空斑形成单位感染位于 60mm 平皿中的 Sf 9 细胞单层, 再用含 0.4% 琼脂糖的新鲜培养液复盖细胞单层。在凝胶形成后, 移至 27℃ 温箱中培养 4—5 天。小心剥下琼脂糖凝胶, 保存于另一无菌的平皿中。用抗 MDV 单克隆抗体 H19^[11] 及山羊抗小鼠 IgG 荧光抗体对位于平皿上的感染细胞单层作荧光抗体试验。根据平皿上呈现荧光抗体反应阳性能表达 pp38 的重组病毒的空斑, 从沾有细胞单层印迹的琼脂糖凝胶上挑取相应重组病毒的复印斑, 并将其悬浮于新鲜培养液中再感染 Sf 9 细胞, 如此重复 3—4 次, 直至从一个完全孤立的空斑得到克隆化的能表达 MDVpp38 的重组杆状病毒为止。

三、免疫印迹反应 为了显示在昆虫细胞中表达的 MDV pp38 的分子量大小, Sf9 细胞单层

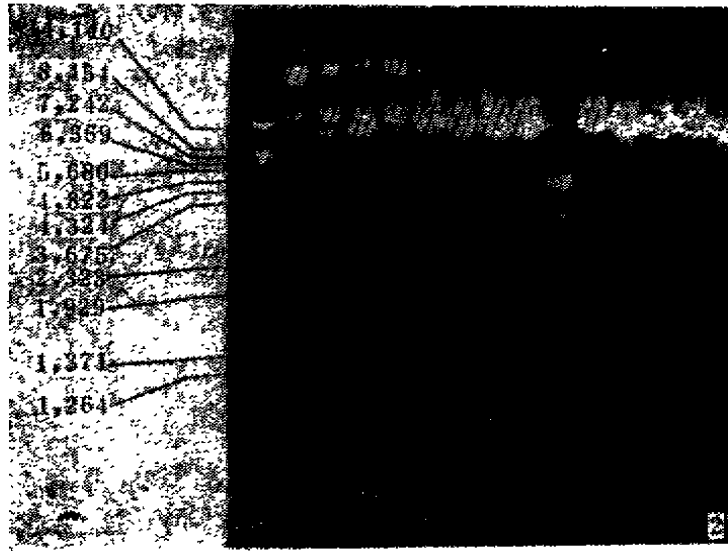


图 2. 重组转移载体质粒DNA酶切分析。在图 1 构建的重组转移载体质粒转化大肠杆菌 JM109 后, 以 ^{32}P -标记的 MDVpp38 基因 DNA 片段为探针, 做菌落原位杂交反应, 从右至左, 槽 1—14 分别加入从 14 个阳性菌落培养物提取的重组质粒 DNA 的 BamHI-KpnI 消化产物。槽 15 加入了噬菌体 DNA 的 BstEII 消化物作为 DNA 片段大小的标志。在这 14 个样品中, 有 7 个显出约 940bp 的插入片段。在槽 8 中显示最亮插入片段的重组转移载体质粒定名为 pVLpp38 I, 并与 AcNPV DNA 一道用来共转染 Sf9 细胞。

Fig. 2. RE analysis of the recombinant transfer vector plasmid DNA. After transformation of *E. coli* JM109 with the recombinant transfer vector plasmid constructed as in Fig. 1, colonies were chosen by colony-hybridization with the ^{32}P -labeled MDVpp38 gene DNA fragment as the probe. From the right to the left: lanes 1—14 were loaded with BamHI-KpnI digests of the recombinant transfer plasmid DNA extracted from the 14 hybridization-positive colonies respectively. Lane 15 was loaded with λ DNA digested with BstEII as DNA size markers. Among the 14 digests 7 showed the inserts of about 940 bp. The sample which gave the most bright insert in the lane 8 was designated as pVLpp38 I and used for cotransfection of Sf9 cells with AcNPV.

在经克隆化的重组杆状病毒感染(使每个细胞平均感染约 5 个空斑形成单位)后继续培养 2—3 天。将感染的细胞单层用 pH7.0 的 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液洗一次后, 悬浮于溶细胞缓冲液(含 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1% 去氧胆酸钠, 1% Triton X-100, 10mmol/L Tris-HCl, pH7.5)中, 每毫升约 5×10^6 细胞。在细胞溶解物中添加 2-巯基乙醇至 2.5%, 甘油至 10%。在沸水中加热 5 分钟后离心, 取上清液在 7.5—20% 梯度聚丙烯酰胺凝胶中电泳后, 将凝胶中的蛋白质电转移至硝酸纤维素膜上^[11]。用单克隆抗体 H19^[11] 及抗小鼠 IgG-碱性磷酸酶标记抗体做免疫印迹反应。

结 果

一、荧光抗体反应显示表达 MDVpp38 的重组杆状病毒感染昆虫细胞 在用共转染后的 Sf9 细胞培养液以适当稀释度再感染 Sf9 细胞单层并复盖以原脂糖培养液凝胶

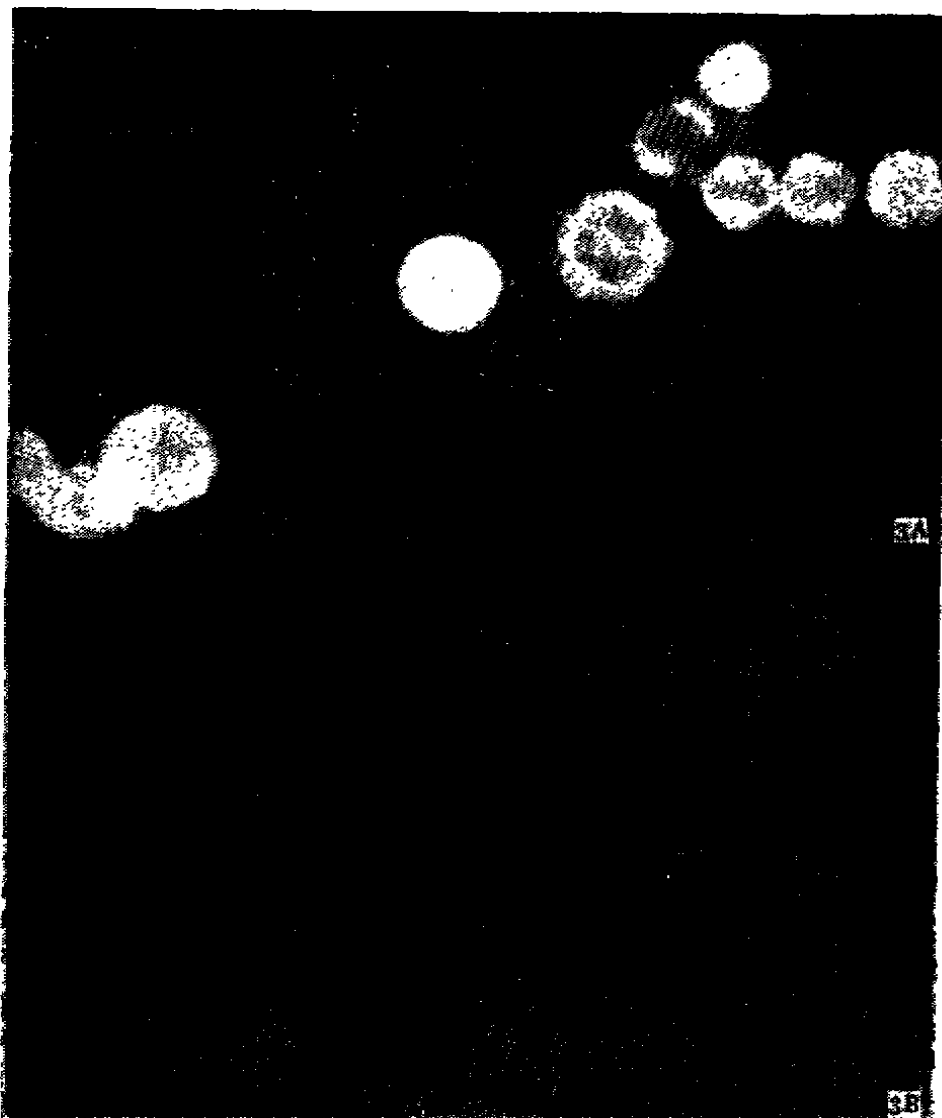


图 3. 用抗 MDV 单克隆抗体 H19 作荧光抗体试验

A: 重组杆状病毒 BP38 I 感染的昆虫 Sf 9 细胞单层, 可见几个能表达 MDV pp38 基因产物的荧光抗体阳性细胞, 其余细胞为未感染的阴性细胞。

B: 野生型 AcNPV 感染的昆虫 Sf 9 细胞单层作为阴性对照。

Fig. 3. Fluorescence antibody test with anti-MDV MAb H19

A: insect Sf9 cell monolayer infected with the recombinant baculovirus BP381 showing several FA positive cells with expressed MDV pp38 gene products. The rest cells were not infected.

B: insect Sf9 cell monolayer infected with the wild type AcNPV as a nesative control.

于 27℃ 下培养 4—5 天后, 以单克隆抗体 H19 用荧光抗体法作初级筛选表明, 约有 1—2% 的空斑呈现荧光抗体反应阳性, 选取一典型阳性空斑, 经重复三次筛选, 从一完全

孤立的阳性空斑挑取克隆化的重组杆状病毒进一步扩增后保存。该克隆称为 BP38 I。图 3 A 为重组病毒 BP38 I 感染的 Sf 9 细胞单层，图中可见几个明显发亮的由单克隆抗体 H19 识别的荧光抗体反应阳性的 BP38 I 感染细胞。表达的 MDVpp38 主要位于细胞质中。图 3 B 为野生型杆状病毒感染的 Sf 9 细胞单层作为阴性对照。

二、免疫印迹试验显示在昆虫细胞中表达的 MDV 特异的蛋白带 图 4 为抗 MDV 38kd 磷蛋白单克隆抗体 H19 作免疫印迹试验结果。单克隆抗体 H19 从重组杆状病毒 BP 38 I 感染的 Sf 9 细胞溶解物中识别出一条很清晰的分子量为 35—36kd 的 MDV 特异蛋白带。这表明，在昆虫细胞中表达的 MDVpp38 基因产物在分子量上非常接近 MDV 感染的成纤维细胞中该基因的天然产物。



图 4. 用抗 MDV 单克隆抗体 H19 对 Sf9 细胞溶解物作免疫印迹试验。槽 A、B 和 C 分别为重组杆状病毒 BP38 I 感染的及野生型 AcNPV 感染的 Sf9 细胞和未感染的 Sf9 细胞的溶解物。

Fig. 4 Immanoblot of Sf9 cell lysates with anti-MDV MAb H19. Lanes A, B and C are the recombinant baculovirus BP38 I-infected, the wild type AcNPV-infected, and uninfected Sf9 cell lysates respectively.

讨 论

自六十年代中期发现 MDV 以来，鸡马立克病一直作为研究病毒致肿瘤及疫苗预防病毒性肿瘤的机制的动物模型之一而引起研究者的注意。为此，建立了一系列由 MDV 诱发肿瘤细胞系。其中一些细胞系仍可分离出完整的 MDV，而另一些细胞系则分离不出有传染性的 MDV 颗粒。Nakajima^[9]等发现，在不能分离出传染性 MDV 的由 MDV 诱发的肿瘤细胞系中，唯一能检出的 MDV 特异抗原是一种分子量为 39/36kd 的磷蛋白。为此，推测这一磷蛋白与 MDV 诱发肿瘤有关。他们还指出，这一磷蛋白与由 Lee 等^[11]

制备的抗 MDV 单克隆抗体 H19 所识别的 38kd 蛋白质^[2]相同。鉴于 MDV 是一种细胞结合病毒, 从全细胞中提纯某一病毒成分比较困难。为了进一步阐明这一磷蛋白在肿瘤发生中的生物学作用, 我们分离了 MDV 的这一磷蛋白基因并将该基因的部分片段在大肠杆菌 λ gt11 噬菌体中以融合蛋白的形式表达出来^[4]。但这仍不足以用作研究该蛋白质完整的生物学功能。

Summers 等^[5]以昆虫杆状病毒为载体, 发展了一种新的真核生物表达系统。鉴于在该系统中外源基因的表达产物可被再加工, 如糖基化、磷基化等, 而且表达水平也很高, 所以越来越多的实验室趋向于采用该表达系统。最初的研究表明, 当外源基因在利用杆状病毒的多角体蛋白基因的启动子及起始密码子以融合蛋白质的形式表达时, 表达水平较高。如仅利用多角体蛋白的启动子但利用外源基因自身的起始密码子时, 表达水平较低^[5]。但后来发现, 这是因为多角体蛋白基因的启动子与起始密码子之间的核酸序列及起始密码子下游一小段核酸序列也明显地影响基因的表达水平^[6]。为此, 他们将转移载体中多角体蛋白基因的起始密码子 ATG 突变为 ATT (如图 1 所示), 在 ATT 后几十个碱基对处建立外源基因的插入点。这样, 在利用多角体基因的启动子及 ATT 附近的有关序列的条件下, 外源基因可利用自身起始密码子 ATG 并得以高水平的表达^[5,7]。例如, 在该昆虫细胞系统中表达的牛 I 型疱疹病毒 gIV 糖蛋白可占整个昆虫细胞可着色蛋白质的 18%^[8]。

前面谈到, 不久前 MDVpp38 的完整基因已被克隆和定序^[9]。本研究将 MDV 的这个基因从其起始密码子开始到终止密码子后 70 个碱基对的 DNA 片段整合进杆状病毒, 利用其多角体蛋白基因的强大启动子及相关序列, 以 MDVpp38 基因自身起始密码子为转译起点在昆虫细胞系 Sf 9 中将 pp38 表达出来。荧光抗体试验表明, MDVpp38 基因产物如同其它外源基因一样, 主要分布在感染细胞的细胞质中。

鉴于在凝胶电泳中测定分子量的自然误差, 在用³⁵S-蛋氨酸标记的 MDV 感染的成纤维细胞溶解物作免疫沉淀反应时, 由单克隆抗体识别的这一磷蛋白的分子量分别报告为 38kd^[2]及 39/36kd^[3]。在免疫印迹试验中, 重组杆状病毒 BP38 I 在 Sf 9 细胞中表达的为单克隆抗体 H19 识别的 MDV 特异蛋白的分子量约 35—36kd, 与该基因在 MDV 感染的鸡成纤维细胞中的天然产物非常相似。这使我们确信, 在昆虫细胞中表达并进一步提纯的 pp38 基因产物将有助于深入研究这一与病毒致肿瘤有关的磷蛋白的生物学功能。

考 参 文 献

- [1] Lee L.F. et al., 1983, *J. Immunol.* 130: 1003—1006.
- [2] Silva R.F. and L.F. Lee, 1984, *Virology* 138: 307—320.
- [3] Nakajima K. et al., 1987, *J. Gen. Virol.* 68: 1379—1389.
- [4] Cui Z. et al., 1990, *Virus Genes* 3: 309—322.
- [5] Summers M.D. and G.F. Smith., 1987, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin*,

No.1555.

- [6] Luckow V.A. and M.D. Summers., 1989, *Virology* 170: 31—39.
[7] Webb N.R. and M.D. Summers., 1990, *Technique—A Journal of Methods in Cell and Molecular Biology*, 2: 173—188.
[8] Van Drunen Littel-van den Hurk S. et al., 1991, *J. Virol.* 65: 263—271.
[9] 崔治中等, 1991, *江苏农学院学报*, 12(3): 1—5。

Expression of Marek's Disease Virus pp38 Gene in Insect Cells with Use of Baculovirus as a Vector

Cui Zhi-zhong

(*Jiangsu Agricultural College, Yangzhou, 225001*)

L. F. Lee

(*Avian Disease and Oncology Laboratory, USDA, 3006 East Mt. Hope Road, East Lansing, Michigan 48823, USA*)

The complete encoding sequence with the initiation and stop codons of Marek's disease virus (MDV) 38 kd phosphorylated protein (pp38) gene was integrated into the baculovirus AcNPV transfer vector pVL1392. The insect cell line Sf9 cells were cotransfected with the recombinant transfer vector pVLpp38 I and the wild type AcNPV DNA. A recombinant baculovirus clone BP38 I, which was expressing the MDV pp38 gene, was screened with the anti-MDV monoclonal antibody (MAb) H19 in fluorescence antibody test. Immunoblot indicates that the MAb H19 could recognize a MDV-specific protein band of 35—36 kd from the recombinant virus BP38 I-infected Sf9 cell lysates.

Key words: MDV pp38 gene Baculovirus Expressing vector