

242-250  
金鱼生长激素 II 基因在杆状病毒中的表达\* 278林广云<sup>1</sup> 王珣章<sup>1</sup> 龙黎新<sup>1\*\*</sup> 黄安林<sup>2</sup> 庞义<sup>1</sup> 余奇理<sup>2</sup><sup>1</sup> (中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510775)<sup>2</sup> (香港大学动物系, 香港)

**摘要** 以 pSXIVVI<sup>+</sup>X3 为转移载体, 将编码金鱼生长激素 II 的 cDNA 插入粉纹夜蛾核型多角体病毒 (TnNPV) 基因组中, 构建了重组病毒株 TnNPV-SX<sup>+</sup>gfGH II 46。该毒株能在草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 离体培养细胞及银纹夜蛾 (*Agyrogramma agnata*) 幼虫中表达金鱼生长激素基因。蛋白免疫印迹表明, 表达的生长激素蛋白分子量为 22.5 kDa, 与理论计算值相符, 且表达的生长激素可分泌到感染细胞的培养基及虫体血淋巴中。RIA 结果表明, 表达产物与天然的生长激素有相似的免疫特性, 重组病毒在感染细胞 96 h pi 所表达的生长激素达到最高水平, 平均每 10<sup>5</sup> 个细胞可在细胞培养基中检测到金鱼生长激素 II 达 86.74 ng; 平均每克干虫可产生金鱼生长激素 II 214 μg。

**关键词** 杆状病毒表达载体系统, 金鱼生长激素 II 基因, 表达

以昆虫杆状病毒为载体、昆虫细胞或虫体为受体的基因工程由于具有独特的优点和巨大的发展潜力, 已受到各国学者重视<sup>[1]</sup>。仅是 1995 年及 1996 年期间, 就有 862 种外源基因通过杆状病毒表达载体在昆虫离体细胞或虫体中得到表达。

生长激素 (Growth Hormone, 简称 GH) 是一个由脑下垂体产生的分子量为 20 000~22 222 Da 的单链多肽激素。在鱼类中生长激素除承担着调节渗透压、电离平衡等与新陈代谢有关的功能外, 还具有着调节鱼类适应在水中生活的独特功能<sup>[2-4]</sup>。生长激素基因及其表达产物为研究蛋白质结构和功能之间的关系、进化以及基因的表达提供了一个重要的模型<sup>[5]</sup>。由于 GH 的重要性, 人们除直接从脑垂体纯化 GH 外, 还利用分子生物学手段, 将 GH 基因克隆到各种表达载体中进行高效表达<sup>[6,7]</sup>; 就鱼类 GH 而言, 世界上已有十多种鱼类的生长激素基因得到分离并在大肠杆菌中表达<sup>[8-10]</sup>。基因工程产品与直接从脑垂体分离 GH 相比有用料少、纯化方便、收获大等优点<sup>[11]</sup>, 并且, 目前用基因工程生产的重组生长激素制品投喂养殖鱼类以直接刺激它们快速生长已取得一定成效<sup>[12]</sup>。故克隆及表达金鱼生长激素基因无论在基础理论研究或生产实践上均有着重要的意义。

在金鱼体内克隆到两种编码生长激素的 cDNA<sup>[13]</sup>, 据推测是来自不同的基因<sup>[14]</sup>, 但此两种 GH 在金鱼体内的转录及翻译特性均在研究中。重组蛋白具有产物单纯的特点, 可作为一个标准品来研究两种 GH 的蛋白特性。利用杆状病毒表达系统能高效表达外源基因及对基因

收稿日期: 1997-10-13, 修回日期: 1997-12-26

\* 香港研究基金(RGC)及广东省自然科学基金资助项目

\*\* 联系作者

产物翻译后加工等优点<sup>[1]</sup>,编码金鱼生长激素 I 的 cDNA 已得到成功表达<sup>[14]</sup>。本研究再将编码金鱼生长激素 II 的 cDNA 插入到杆状病毒基因组中,利用虫体及昆虫离体培养细胞进行高效表达。现将结果报道如下。

## 材料与方法

### 1 菌株、质粒和病毒

含编码金鱼生长激素 II cDNA 的质粒(gf Growth Hormone II)由香港大学动物系余奇理博士实验室提供<sup>[12]</sup>。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为转化受体菌。不含起始密码 ATG 的转移载体质粒 pSXIVVI<sup>+</sup> X3 由本室构建<sup>[15]</sup>。粉纹夜蛾核型多角体病毒(*TnNPV*)属多粒包埋型,引自英国自然环境研究委员会病毒研究所(NERC, Institute of Virology, Oxford, England)。亲本毒株为含合成启动子和  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的无包含体粉纹夜蛾重组株 *TnNPV-SVI<sup>-</sup>G* 由本室构建<sup>[15]</sup>。草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda* 9, 简称 Sf9)昆虫细胞引自英国自然环境研究委员会病毒研究所。细胞培养基为 Tc-100 培养基补加 10% 小牛血清。

### 2 工具酶

限制性内切酶及其它工具酶均为 Promega 产品。

### 3 重组质粒的构建

按 Sambrook 等 1992 的方法<sup>[16]</sup>。

### 4 病毒 DNA 的提取、共转染、病毒纯化

均按 Summers 等 1987 的方法<sup>[17]</sup>。

### 5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及 Western 印迹

#### 5.1 样品制备

将  $2 \times 10^6$  个 Sf9 细胞移入直径为 30 mm 的细胞培养皿中,待细胞贴壁后,换以 100 ml  $2 \times 10^6$  pfu 病毒液,26℃ 吸附 1 h。弃去接种物,每皿加入 1 mL 的 Tc-100 培养基,待病毒感染后 24、48、72、96 h 分别收集细胞样品及培养液上清样品,收集细胞样品之前用 PBS 轻洗两次;收集的上清以 2 000 r/min 离心 5 min。

虫体样品制备:于人工饲料上涂加重组病毒多角体并喂食银纹夜蛾四龄幼虫,4 d 后收集被感染的六龄幼虫,剪腹足收集血淋巴,离心,过滤后收集上清,供 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析用。

#### 5.2 SDS-PAGE 和 Western 印迹

SDS-PAGE 的分离胶浓度为 10%,浓缩胶的浓度为 4%。Western 印迹按 Sambrook 等 1992 的方法<sup>[16]</sup>。第一抗体为抗兔金鱼生长激素抗体(由香港大学动物系 Aderson Wong 博士提供),工作浓度为 1:100 000;第二抗体及底物购自 Sigma 公司,按其说明使用。

### 6 金鱼生长激素 II (gfGH II) 含量的放射免疫分析(RIA)

按林浩然等 1988 的方法<sup>[18]</sup>。RIA 试剂盒购自于 Gibco 公司。其中正常兔血清(NRS)稀释度为 1:40;兔抗金鱼 GH 血清(由香港大学动物系 Aderson Wong 博士提供)稀释度为 1:38 000;羊抗兔血清(GAR)稀释度为 1:17 5。

## 结 果

### 1 含 gfGH II cDNA 的转移载体的构建

将含 gfGH II cDNA 的质粒用 Pst I /Xho I 双酶切,并将切出的 gfGH II cDNA 片段插入到转移载体质粒 pSXIVVI<sup>+</sup> X3 的 Pst I /Sal I 双酶切窗口中,构建成重组质粒 pCAGH II 46,构建过程如图 1 所示。经用 Pst I /Sac I 双酶切,结果证实 gfGH II cDNA 已正确插入 pSXIVVI<sup>+</sup> X3 中(图未显示)。

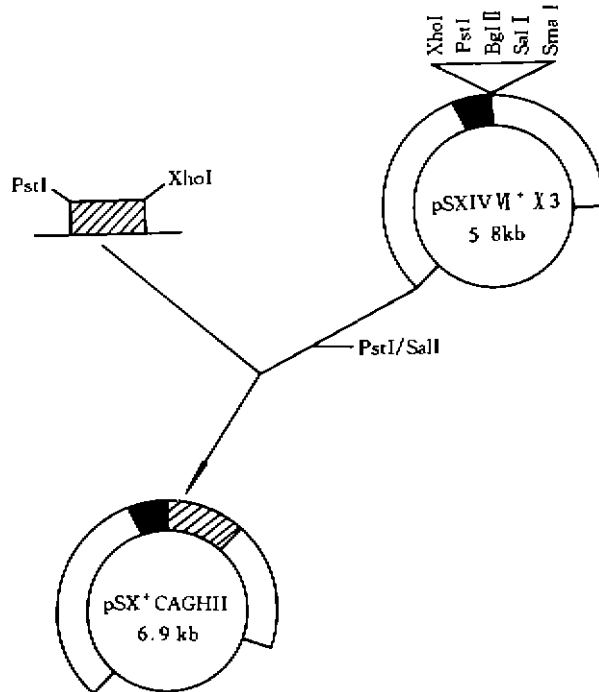
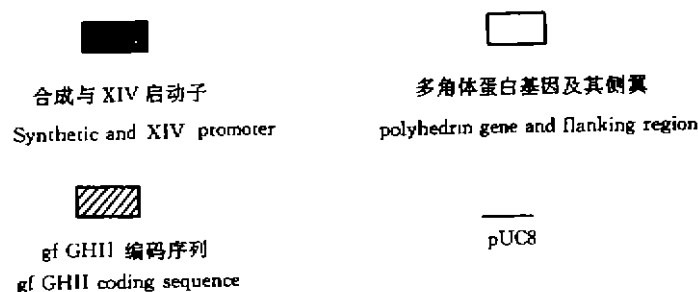


图1 重组质粒 pCAGHII46 的构建示意图

Fig 1 Construction of recombinant plasmid pCAGHII46



## 2 含 gfGH II cDNA 的粉纹夜蛾核型多角体病毒的重组及酶切鉴定

将重组质粒 pCAGH II46 DNA 与不形成多角体的粉纹夜蛾重组病毒 *TnNPV-SVI<sup>-</sup>G* DNA 共转染 *Sf9* 细胞, 经过空斑技术挑选从而纯化得到 5 株遗传稳定的含 gfGH IIcDNA 又形成多角体的重组毒株 *TnNPV-SX<sup>+</sup>gfGHII46a.b.c.d.e*。

随意选取重组毒株 *TnNPV-SX<sup>+</sup>gfGH II46a* (简称 VGH II46a) 用 *SacI* 进行酶解分析, 由于亲本毒株基因组中, 大小约 13.2 kb 的  $\beta$ -半乳糖苷酶基因 (*gal*) 及其侧翼<sup>[8]</sup>, 因与转移载体质粒等位基因交换而失去了其中的 *gal* 基因, 换为含双启动子、包括 *Sac I* 酶切点的多接头及内含 *Sac I* 酶切点的 gfGH II cDNA 片段, 故重组毒株 *SacI* 酶切图谱较野生型病毒 *SacI* 酶切图谱多出外源基因一部分的约 850 bp 片段, 从而证实了 VGH II46a 为重组毒株, 如图 2 所示。

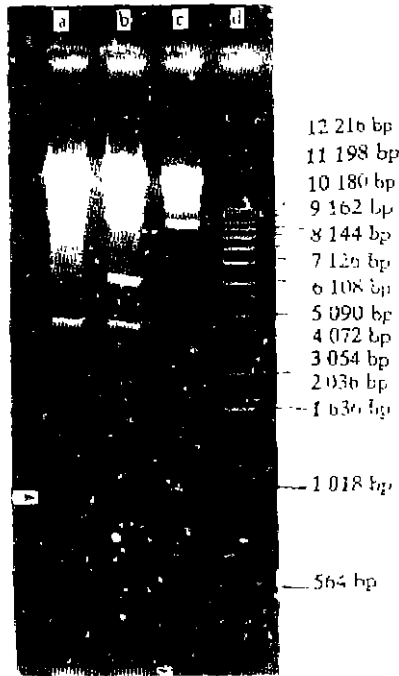


图2 重组病毒 VGH II 46a 的 Sac I 酶切鉴定图

a 经 Sac I 酶切的重组病毒 VGH II 46a DNA。b 经 Sac I 酶切的亲本株病毒 DNA。c 经 Sac I 酶切的野生型病毒 TrNPV DNA。d 1 kb DNA ladder 分子量。箭头所指为切出的部分 gfGH II 基因片段。

Fig. 2 Identification of recombinant virus of VGH II 46a by Sac I digestion

a. Recombinant virus of VGH II 46a DNA digested with Sac I  
b. Parent virus digested with Sac I. c. Wild type virus digested with Sac I. d. 1 kb DNA ladder markers. The partial fragment of gfGH II gene is arrowheaded.

### 3 gfGH II cDNA 在昆虫离体培养细胞及银纹夜蛾幼虫中表达的定性检测

将重组病毒 VGH II 46a 接种培养的 Sf9 细胞,于感染后 24、48、72、96 h 收集细胞及培养基上清进行 SDS-PAGE 及 Western 印迹分析。结果表明病毒感染后 24 h pi,在 Sf 细胞培养基上清中已可检测到金鱼生长激素 II;感染后 96 h 达到最高值。如图 3 所示。

用 VGH II 46a 病毒感染银纹夜蛾六龄幼虫各四头(重量不同),4 d 后采血淋巴、离心、过滤后用上清进行 SDS-PAGE 和 Western 印迹,结果金鱼生长激素 II 基因在虫体中同样得到表达,且表达产物可在血淋巴中检测到。如图 4 所示。

### 4 在昆虫培养细胞及银纹夜蛾幼虫中 gfGH II 表达量的含量测定

分别将 100  $\mu$ L 重组病毒 VGH II 46a 接种  $2 \cdot 10^6$  离体培养的 Sf9 细胞,于感染后 24、48、72、96 h 收集细胞及培养基上清进行 PIA 定量表达的蛋白,结果如图 5 所示。表达的定量结果与定性相符合。在细胞感染 96 h pi,表达量最高,平均每  $10^5$  个细胞在细胞培养基中最高可测到的 gfGH II 表达量达 86.74 ng。在同一时间,胞内残留 gfGH II 33.84 ng/ $10^5$  细胞。

金鱼生长激素 II 基因在银纹夜蛾幼虫中的表达含量如表 1 所示。平均每克干虫可表达 gfGH II 达 214.1  $\mu$ g。所表达的金鱼生长激素 II 含量稀释曲线与金鱼 GH 标准曲线是平行的,说明表达产物与天然 GH 有相似的免疫特性,且实验结果是可靠的(图未显示)。

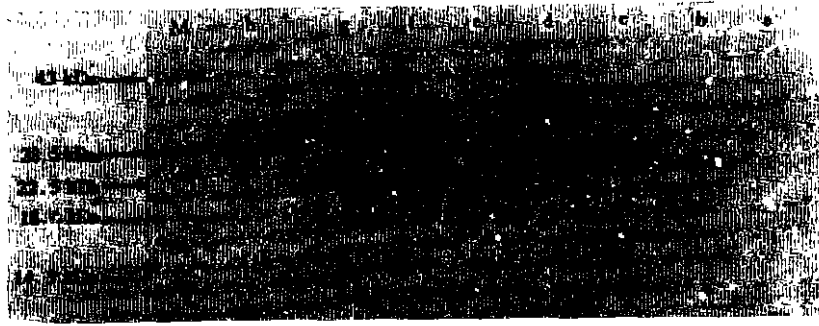


图 3 VGH II 46a 于不同时间间隔在培养的 Sf9 细胞及培养基上清表达的 gfGH II 的 Western 印迹鉴定  
a-d: 感染 VGH II 46a 24h pi (a), 48h pi (b), 72h pi (c), 96h pi (d) 的 Sf9 细胞培养基上清,  
e-g: 感染 VGH II 46a 48h pi (e), 72h pi (f), 96h pi (g) 的 Sf9 细胞。h: 正常的 Sf9 细胞。  
M: 预染的蛋白分子量

Fig. 3 Time course of gfGH II gene expression in Sf9 insect cells and culture medium

Lanes a-d: Medium of cultured cells infected with VGH II 46a for 24h pi (lane a), 48h pi (lane b), 72h pi (lane c), 96h pi (lane d). Lane e-g: Sf9 cells infected with VGH II 46a for 48h pi (lane e), 72h pi (lane f), 96h pi (lane g). Lane h: Normal cells. Lane M: Prestain molecular weight markers.

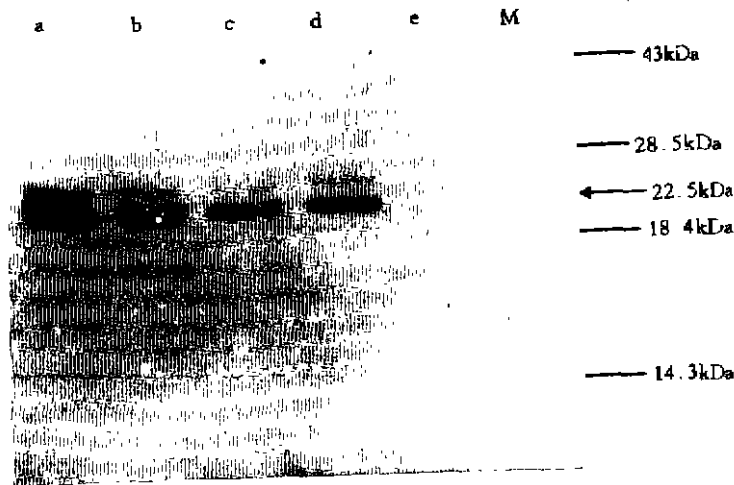


图 4 VGH II 46a 在银纹夜蛾幼虫中表达的 gfGH II 的 Western 印迹鉴定  
a-d. 不同重量的银纹夜蛾幼虫感染 VGH II 46a 96 h pi。e. 银纹夜蛾幼虫感染  
TnNPV 96 h pi。M. 预染的蛋白分子量。

Fig. 4 Western blot analysis of VGH II 46a expressed gfGH II in *Plusia ungnata* larvae

Lanes a-d: The haemolymph of four larvae of different weight which were infected with VGH II 46a for 96 h pi. Lane e: The haemolymph of larva which was infected with TnNPV for 96 h pi. Lane M: Prestain molecular weight markers.

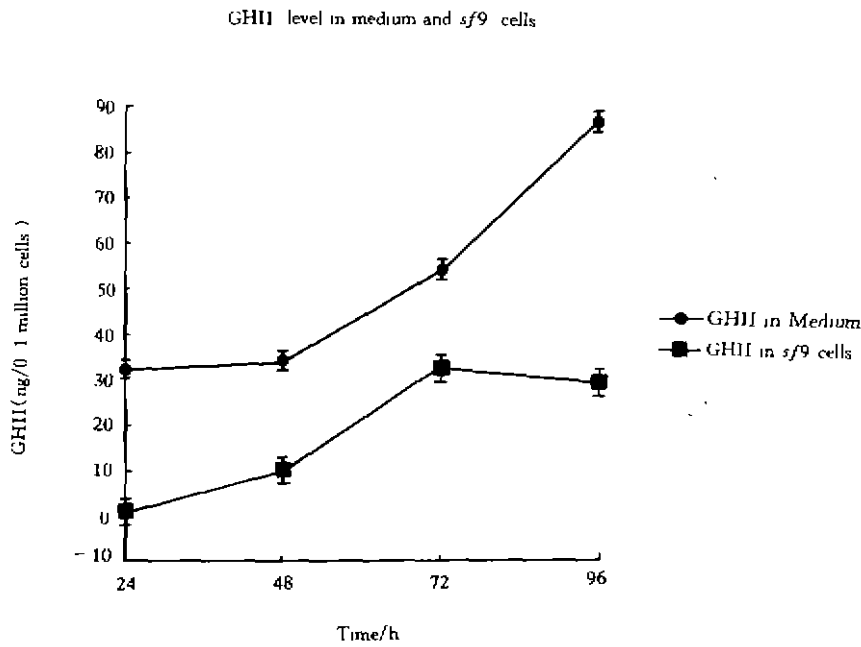


图5 用RIA测定gfGHII在Sf9细胞内及细胞培养基上清中的含量  
Fig. 5 Quantification of gfGHII in Sf9 cells and culture medium using RIA

表1 虫体中表达的GHII含量

Table 1 Quantity of GHII expressed in larvae

稀释度 Dilution	未稀释的GHII含量 Quantity of GHII before dilution (ng/mL)	总体积 mL Total Volume	总GHII含量 mg Total GHII	干虫重 g Dry larvae	GHII mg/g 干虫 (gram of day larvae)
160	2985.12	35	0.1045	0.488	0.214

## 讨 论

本研究所表达的编码金鱼生长激素II cDNA,从表达产物的Western印迹及RIA的实验结果来看,gfGHII cDNA所编码的蛋白与天然的gfGH具有相似的免疫原性及免疫活性。与gfGHI基因的表达<sup>[14]</sup>相比,无论在离体培养的Sf9细胞及银纹夜蛾幼虫中,gfGHI的表达量都高于gfGHII<sup>[14]</sup>;由于用的是同一个表达载体,因此表达水平的差异主要是因为外源基因类型的不同。我们所采用的杆状病毒载体系统由于具有两个串联的强启动子,可大大提高外源基因的表达水平<sup>[15]</sup>;且重组病毒可形成多角体,便于重组病毒株的挑选及经口服感染虫体。由于gfGH cDNA 5'端具有信号肽序列,因此理论上它所编码的蛋白可分泌到被感染的离体培养Sf9细胞培养基上清及虫体的血淋巴中,这样为金鱼生长激素的提纯工作带来了方便;同时,由于重组病毒可形成多角体,昆虫可经口服感染,也为利用虫体来大量生产金鱼生长激素

提供了一条廉价而方便的途径。

人们曾经尝试用大肠杆菌 (*E. coli*) 表达系统如 GST, His-Tag 融合蛋白的方法来生产金鱼生长激素, 但都没有成功 (O. L. Anderson, 私人通讯)。这主要是因为外源蛋白在 *E. coli* 中会形成包涵体并且表达的外源蛋白处于未折叠的状态<sup>[7]</sup>。另外, 大肠杆菌表达系统属原核表达系统, 它缺乏对表达的真核蛋白的翻译后加工 (例如: 信号肽的切除、甲基化、糖基化等) 功能<sup>[1,7]</sup>, 这样, 被表达蛋白的活性就不能得到保障。从上述各点来看, 选用真核的杆状病毒表达系统就可较好地解决上述问题。生长激素已被人们作为一个模型来研究生理学、基因表达的调节、进化以及结构与功能之间的关系, 带有相似结构与交叉生物学功能的生长激素可形成一个多肽激素的家族<sup>[5]</sup>。到目前为止, 金鱼的两种生长激素在金鱼体内的转录及翻译水平还未得到深入的研究, 因此用昆虫杆状病毒表达系统表达金鱼生长激素的成功, 亦可为天然生长激素的基础理论研究提供一个方便; 其纯化产物将可作为一个标准品来研究金鱼脑垂体内的两种天然的生长激素的特性, 并可用作生长激素制品投喂养殖鱼类以直接刺激它们快速生长。

### 参 考 文 献

- 1 O'Reilly D R, Miller I. K, Luckow V A. Baculovirus expression vectors. A laboratory manual, New York: W H Freeman 1992
- 2 Komourdijan M P, Saunders R I., Fenwick J C. The effect of porcine somatotropin on growth and survival of atlantic salmon (*Salmo salar*). Can J Zool, 1976, 54:534 - 535
- 3 Miwa S, Inui Y. Effects of L-thyroxine and ovine growth hormone on smoltification of anago salmon. Gen Comp Endocrinol, 1985, 58:436 - 442
- 4 Boltin J P, Collie N L., Kawauchi *et al* . Osmoregulatory actions of growth hormone in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J of Endocrinol, 1987, 112: 63 - 68
- 5 Peter R E., Marchant T A. The endocrinology of growth in carp and related species. Aquaculture, 1995, 129:299 - 321
- 6 Sumathy S, Palhan V B, Gopinathan K P. Expression of human growth in silkworm larvae through recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus Protein Expression and Purification, 1996, 7:262 - 268
- 7 Keiko K O, Masanori Y, Yoshiaki H *et al* . Baculovirus-mediated production of the human growth hormone in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995, 213(2):389 - 396
- 8 Chao S C, Pan F M, Chang W C. Purification of carp growth hormone and cloning of the complementary DNA, Biochimica et Biophysica Acta, 1989, 1007:233 - 236
- 9 Saito K, Sekine S, Komatsu Y, *et al* . Molecular cloning of *ee1* growth hormone cDNA and its expression in *Escherichia coli*. Gene, 1988, 73:545 - 551
- 10 Ho W K K, Wong M W, Chan A P Y. Cloning and sequencing of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) growth hormone gene. Biochimica et Biophysica Acta, 1991, 1090: 245 - 248
- 11 Skarphednesson O, Power D M, Ingleton P M. Separation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) growth hormone by gel electrophoresis. General and Comparative Endocrinology, 1990, 80: 393 - 398
- 12 Lin H R, Zhang Q, Peter R E. Effects of recombinant tuna growth hormone and analogs of gonadotropin-releasing hormone on growth of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Aquaculture, 1995, 129: 342
- 13 Law M S, Cheng K W, Fung T K *et al* . Isolation and characterization of two distinct growth hormone cDNA from the gold fish, *Carassius auratus*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996, 330:19 - 23
- 14 林广云, 王珣章, Aderson Wong 等. 利用杆状病毒表达载体系统表达金鱼生长激素 I 基因. 生物工程学报, 1997, 13(2):149 - 153

- 15 王珣章, 谢伟东, 龙寨新等. 形成多角体的杆状病毒载体系统的建立, 病毒学报, 1991, 7(3): 253-261
- 16 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1. 34~1. 69
- 17 Summers M D, Smith G E. A Manual of methods for baculovirus vectors and insect culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555, 1987, 1-36
- 18 林浩然, 彭纯, 梁坚勇等. 鱼类生理学实验技术和方法. 广州中山大学: 中山大学出版社. 1988, 62-66

## Gene Expression of Gold Fish Growth Hormone II in Baculovirus

Lin Guangyun<sup>1</sup> Wang Xunzhang<sup>1</sup> Long Qingxin<sup>1</sup> Wong Onlam<sup>2</sup>  
Pang Yi<sup>1</sup> Yu Keil<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(State key laboratory for biological control of ZhongShan University, GuangZhou, 510275)

<sup>2</sup>(Department of Zoology, The University of Hong Kong, Hong Kong)

**Abstract** Using a transfer vector plasmid pSXIVVI<sup>+</sup>X3 without an initiation codon, the occluded recombinant *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus as an expressing vector carrying the cDNA encoding gold fish growth hormone II (gfGH II) under the control of the *SynXIV* promoter has been constructed. Immunoblot analysis revealed that the virus-mediated gfGH II can be detected as early as 24 hr pi and the expression level reached to the highest in 96 hr pi in the Sf cells and culture medium or larvae and haemolymph, the molecular weight of the expressed protein is 22.5 kDa, which is equivalent to the value calculated from the predicted amino-acid sequence. The expression level *in vivo* and *in vitro* was quantified using RIA. Average 10<sup>5</sup> Sf9 cells may secrete gfGH II into medium reaching level of 86.74 ng. The expression level of gfGH II in larvae may reach to 214μg per gram of dry larvae.

**Key words** Baculovirus expression vector system, Gold fish GH II gene, Expression