维普资讯 http://www.cqvip.com

第15卷第3期 中国病毒学 Vol.15 No.3
2000年9月 VIROLOGICA SINICA Sep. 2000

285-290

猪生长激素基因在杆状病毒载体系统中的表达*

欧阳菁[1]，魏平华[2]，杨林[1]，谢明权[2]，杨洁[1]，龙繁新[1]，王珣章[1]

[1](中山大学生物医药中心、生物防治国家重点实验室，广州 510275)
[2](广东省农业科学院，广州 510650)

摘要：通过对猪生长激素(pGH)基因的cDNA进行测序，得到pGH cDNA的全序列，并与Seeburg等报道的序列进行了比较和讨论。然后利用具人工合成启动子和多角体蛋白XIV启动子的转移载体质粒pSXIVV1⁺X3/4构建出含pGH基因的重组质粒pX3/4-pGH。将pX3/4-pGH与致死缺失型线性化AcMNPV-OCC⁻ DNA共转染Sf9细胞，构建出既能形成多角体又能表达pGH基因的苜蓿丫纹夜蛾核多角体重组病毒AcMNPV-pX3/4-pGH-OCC⁺。感染重组毒株的*Hi* 5细胞可溶蛋白及其培养上清的SDS-PAGE和Western blot的分析结果表明，感染细胞的蛋白电泳带的20.7 kDa处有一条猪生长激素特异带，但培养上清中没有。凝胶黑度扫描估测结果显示pGH蛋白占细胞可溶蛋白的4.48%。

关键词：猪生长激素基因；序列分析；杆状病毒载体系统；表达
中图分类号：Q786，S859.793 **文献标识码**：A **文章编号**：1003-5125(2000)03-0285-06

猪生长激素(Porcine Growth Hormone，pGH)是由猪脑垂体分泌的一种多肽激素，可促进蛋白质和脂肪动用，显著提高猪的生长速度、饲料报酬和瘦肉率，具有明显的经济效益和社会效益。为了更好地研究和利用pGH，人们除了直接从脑垂体分离pGH外，还应用生物工程技术，利用大肠杆菌表达[1~3]。但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功能[4,5]，如信号肽的切除，蛋白质的甲基化、糖基化和磷酸化，精确的蛋白折叠等，这使得表达的蛋白的生物活性得不到保障。本文采用我室组建的具有人工合成启动子和多角体蛋白XIV启动子的杆状病毒载体系统，对pGH基因在昆虫细胞中的表达进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和病毒 含猪生长激素(pGH)基因cDNA的质粒pPkGH由广东省农科院畜牧研究所提供；质粒pBluescript M13(-)、大肠杆菌*Escherichia coli*转化受体菌DH5α由中山大学生物防治国家重点实验室保存；含翻译起始密码子ATG的转移载体质粒pSXIVV1⁺X3/4由中山大学生物防治国家重点实验室构建[6]；线性化致死缺失型苜蓿丫纹夜蛾多角体病毒(AcMNPV-OCC⁻)基因组DNA购自PharMingen公司；含

收稿日期：1999-07-05，修回日期：1999-07-20
* 基金项目：广东省自然科学基金重点项目(963007)
作者简介：欧阳菁(1975年-)，女，湖南省人，硕士研究生，研究方向为病毒基因的调控

维普资讯 http://www.cqvip.com

合成启动子和β-半乳糖苷酶基因的无包涵体粉纹夜蛾重组毒株 TnNPV-SVI⁻-G 由中山大学生物防治国家重点实验室构建。

1.1.2 细胞 草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*, Sf9)昆虫细胞引自英国自然环境研究委员会病毒研究所(Institute of Virology, Oxford, England, NERC);粉纹夜蛾昆虫细胞(Hi5, BTI-TN-5B1-4)引自美国 Cornell 大学。

1.1.3 试剂 共转染缓冲液 A 和 B、昆虫细胞裂解缓冲液及蛋白酶抑制剂混合物购自 PharMingen 公司;T_4DNA 连接酶、所有限制内切酶、丙烯酰胺和 N,N'-亚甲双丙烯酰胺购自 Promega 公司;RNase A、Proteinase K 和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体为华美生物工程公司产品;兔抗猪生长激素抗体由广东省农科院畜牧研究所提供;双链 T_7DNA 序列分析试剂盒(T_7 Sequencing™ Kit)购自 Pharmacia Biotech 公司;X-gal 和 IPTG 购自 Sigma 公司;胎牛血清和无血清培养基购自 GIBCOL BRL 公司;硝酸纤维素膜购自 Schleicher & Schuell 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建 参照 Sambrook 等[7]的方法。

1.2.2 核苷酸序列分析 参照 Pharmacia Biotech 公司的双链 T_7DNA 序列分析试剂盒使用说明。

1.2.3 重组病毒的构建 参照 Summers 等[8]的方法进行。采用磷酸钙沉淀法将经聚乙二醇纯化的含 pGH 基因的重组转移载体质粒与致死缺失型线性化 AcMNPV-OCC⁻ DNA 共转染 Sf9 细胞。

1.2.4 表达产物的检测

1.2.4.1 重组病毒的定量感染及样品制备 用 AcMNPV-pX3/4-pGH-OCC⁺ 及 AcMNPV-OCC⁻ 分别感染对数生长期的 *Hi* 5 细胞,27 ℃培养 72~120 小时后,收获细胞及培养上清,并制备细胞裂解物。

1.2.4.2 SDS-PAGE 及 Western blot 分析 按 Sambrook 等[7]的方法进行。

2 结果

2.1 猪生长激素基因的克隆及鉴定

2.1.1 pGH 基因的克隆

用 *Eco*R I 酶切质粒 pPkGH,得到一条 900 bp 大小的片段,与猪生长激素基因的 cDNA 大小一致,初步证明这一片段即为 pGH cDNA。将这一片段插入到质粒 pBluescript M13(-)多克隆位点的 *Eco*R I 窗口中,构成重组质粒 pBlue-pGH,并用 *Eco*R I 限制性内切酶酶切鉴定(图略)。

2.1.2 猪生长激素(pGH)基因的亚克隆及序列测定

根据已发表的 pGH cDNA 的全序列[9]可知,其中仅含有一个 *Sma* I 位点。用 *Sma* I 酶切 pBlue-pGH,得到一个约 3.4 kb 的大片段和一个约 400 bp 的小片段。大片段由 T_4 DNA 连接酶连接环化后克隆,小片段克隆到 pBluescript M13(-),然后分别用 Sanger 双脱氧链终止法进行序列测定和分析,并与 Seeburg 等的序列进行比较,发现在编码区中仅有一个碱基存在差异(图 1,不同的碱基用 * 标出),但它们所编码的氨基酸均为 Leu,因此确定所得到的片段就是 pGH 基因的 cDNA。

```
                                    *
S  ATC CAG GCC CTG ATG CGG GAG CTG GAA GAT GGC AGC CCC CGG GCA GGA
B  ATC CAG GCC CTG ATG CGG GAG CTC GAA GAT GGC AGC CCC CGG GCA GGA
    I   Q   A   L   M   R   E   L   E   D   G   S   P   R   A   G
```

S: Seeburg 等(1983)的 cDNA 顺序
S: cDNA sequence reported by Seeburg *et al*

B: 用 pBlue-pGH 亚克隆测得的 cDNA 顺序
B: pGH cDNA sequence in pBlue-pGH

图 1 猪生长激素基因的部分 cDNA 顺序及氨基酸序列

Fig. 1 Partial cDNA and amino acid sequence of porcine growth hormone

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 含 pGH 基因的重组质粒 pX3/4-pGH 的构建

从 pBlue-pGH 上用 *Pst* I 酶切出含 pGH 基因的片段，并克隆到转移载体质粒 pSXIVVI$^+$X3/4 的复合启动子 $P_{syn/XIV}$ 下游的 *Pst* I 酶切窗口中，构建成重组质粒 pX3/4-pGH(图 2)。复合启动子与 pGH 基因的部分序列见图 3。用 *Pst* I 酶切鉴定重组质粒，然后再用 *Sma* I 单酶切、*Pst* I/*Sma* I 双酶切进行鉴定，并挑选 pGH 基因插入方向正确的重组质粒(图 4)。

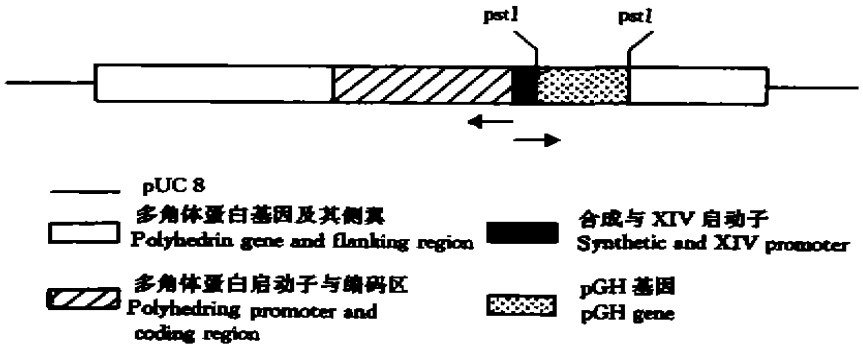

图 2　重组转移载体质粒 pX3/4-pGH 结构简图

Fig.2　Recombinant transfer plasmid pX3/4-pGH

```
        -170       -160       -150       -140       -130       -120
gggccaagcttggcgttattgaataagaatttaaaaatcaatcatttgtatactgtaaattaca
   HindIII  Psyn 转录起始 ⟶

   -110        -100       -90        -80        -70        -60
tactgttttatttaacaatagatATCATGGAGATAATTAAAATGccaagcttggCGCAAATAAA
                                                HindIII     PXIV 转录起

-50        -40        -30        -20        -10        +1
TAAGTATTTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAATAAAAAAACCTATAAATAgatcatcgaatt
始 ⟶
        EcoRI
aatatggcgaattctgcagGCCCTCGGACCTCCGTGCTCCTGGCTTTCGCCCTGCTCTGCCTGC
            PstI
pGH 基因起始 ⟶

CCTGGACTCAGGAGGTGGGAGCCTTCCCAGCCATGCCC……
```

图 3　复合启动子与 pGH 基因部分序列

Fig.3　Partial sequence of the pGH gene and complex promoter

2.3 含 pGH 基因重组病毒的构建及鉴定

将重组转移载体质粒 pX3/4-pGH DNA 用改进的聚乙二醇沉淀法纯化与致死缺失型线后性化 AcMNPV-OCC$^-$ DNA 共转染 Sf9 细胞，通过同源重组构建出含猪生长激素基因的重组病毒。27 ℃培养 3 d 后可观察到明显的有多角体形成的重组病毒斑。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.4 猪生长激素基因在 *Hi5* 细胞中的表达及其表达产物鉴定

将 MOI 约为 3～10 的重组毒株 AcMNPV-pX3/4-pGH-OCC$^+$ 及亲本毒株 AcNPV-OCC$^-$ 分别感染处于生长对数期的 *Hi5* 细胞，27 ℃培养 48～120 小时后，对细胞可溶蛋白和培养上清进行 SDS-PAGE 分析，结果显示 AcMNPV-pX3/4-pGH-OCC$^+$ 感染的细胞可溶蛋白样品比感染 AcNPV-OCC$^-$ 的细胞样品多了一条 20.7 kDa 的蛋白带(图 5)。该蛋白带与天然的猪生长激素(分子量约为 22 kDa)大小相近。培养上清中没有该特异带。进一步做 Western blot 分析，结果显示，AcMNPV-pX3/4-pGH-OCC$^+$ 感染的细胞可溶蛋白中有一条分子量为 20.7 kDa 的猪生长激素特异性反应带，而 AcMNPV-OCC$^-$ 毒株的免疫印迹结果为阴性(图 6)。这说明表达产物即为预期的 pGH 融合蛋白。

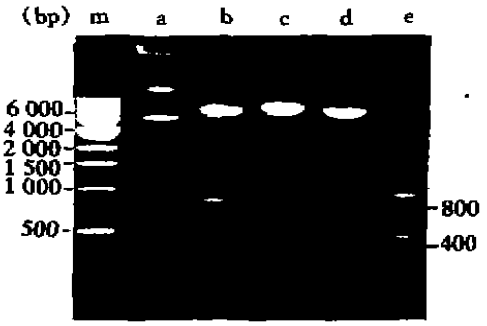

图 4 重组转移载体质粒 pX3/4-pGH 的酶切鉴定

Fig.4 Characterization of pX3/4-pGH by *Pst*I/*Sma*I digestion

m: 1 kb DNA ladder, a: pX3/4; b: px3/4-pGH/*Pst*I; cells c: pX3/4-pGH/*Sma*I; d: pX3/4-pGH/*Pst*I + *Sma*I; e: 100 bp DNA ladder

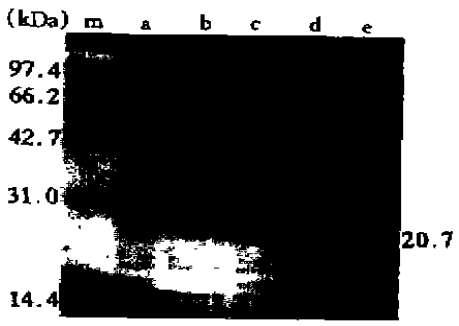

图 5 经重组病毒 AcNPV-pX3/4-pGH-OCC$^+$ 感染 48-120 小时的 *Hi5* 细胞可溶蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of the soluble cellular proteins of *Hi5* from 48 to 120 h postinfection

m: Mid-range protein molecular weight marker,

a: *Hi5* cells infected with TnNPV-SVI-G;

b-e: *Hi5* cells infected with AcNPV-pX3/4-pGH-OCC$^+$ from 48, 72, 96 to 120 h respectively

2.5 表达效率测定

将经重组病毒感染了 48、72、96、120 小时的细胞的可溶蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝 R-250 染色后，用日本岛津 CS-930 双波长薄层扫描仪扫描估测可知，表达产生的猪生长激素量分别占细胞可溶蛋白的 1.15%、1.20%、1.50%、4.48%，即感染后 120 小时达最高峰。

3 讨论

通过对 pGH cDNA 的全序列进行分析，并与 Seeburg 等发表的结果[9]比较证明，所得片段为 pGH 基因。本研究得到的 cDNA 和 Seeburg 等报道的核苷酸序列同源性很高，仅在编码区中有一个碱基不同(图 1)，但它们所编码的氨基酸均为 Leu，这说明它们表达出的成熟生长激素是相同的。

维普资讯 http://www.cqvip.com

本研究的猪生长激素基因 cDNA 在 *Hi*5 细胞中的表达产物的 Western blot 实验结果表明,pGH cDNA 编码的蛋白与天然的猪生长激素具有相似的免疫原性。

杆状病毒表达载体具有很强的表达外源基因的能力。为了在昆虫离体细胞和虫体中大量表达猪生长激素,本实验利用既可高效表达外源基因又可形成多角体的杆状病毒表达载体 pSXIVVI⁺3/4 构建了重组质粒 pX3/4-pGH。因为利用的是载体的起始密码子,载体质粒与外源基因间融合了一个二肽(Arg-Leu),所以外源蛋白在表达系统中的稳定性应得到提高,表达量应得到增大。但通过对 SDS-PAGE 的凝胶黑度扫描估测发现,最大的表达量仅为 4.48%,可见表达水平不甚理想。这可能与基因本身的性质有关,因为不同的基因即便在同一表达系统中,其表达水平仍有可能存在很大差异。5′编码序列也可能影响表达水平。以基因结构十分相近的牛生长激素表达为例,George 曾将牛生长激素前 20 个氨基酸中的 13 个氨基酸的密码子改变为大肠杆菌中常用的密码子,表达水平提高了 10 倍[10]。本文 pGH 的 5′端某些氨基酸的低频密码子的出现也可能影响到翻译水平。另外,若外源基因中存在大量的 CTTG,则可通过反义 RNA 使表达量大大减少。pGH 基因中有多个 CTTG 序列,这可能也是影响表达量的原因之一[4]。由于最终表达出的是一个融合蛋白,若昆虫细胞未能很好识别融合两个氨基酸的 pGH 的信号肽,就有可能使表达产物不能正确加工和分泌,使培养上清中得不到预期的成熟生长激素。针对这个问题,我们已拟在将来的实验中进行改进,去掉 pGH 基因本身的信号肽序列,将其构建到带有强信号肽序列的昆虫杆状病毒表达载体 pAcGP67-A 上,以确保信号肽的正常切割,获得所需的成熟生长激素。

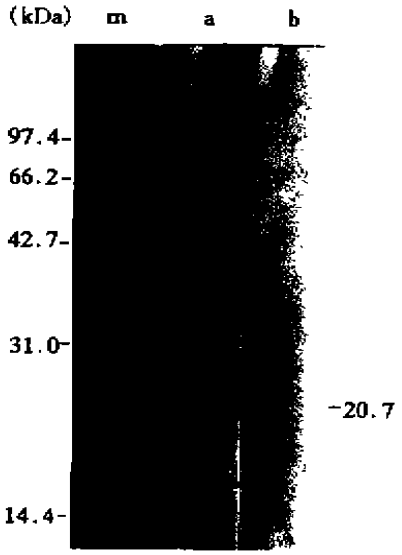

图6　pGH 基因在 *Hi*5 细胞中表达产物的 *Western-blot* 分析

Fig. 6　Western-blot analysis of pGH expressed in *Hi*5 cells

m: Mid-range protein molecular weight marker;

a: *Hi*5 cells infected with AcNPV-pX3/4-pGH-OCC⁺;

b: *Hi*5 cells infected with TnNPV-SVI-G

参 考 文 献

[1] 苏惟之、Oxender D L, RI-Geweley M E, 等. 猪生长激素 cDNA 重组及在大肠杆菌中表达[J]. 生物化学与生物物理学报, 1990, 22(2): 111－120

[2] 余旭平、齐顺章. 在大肠杆菌中温度诱导高效表达猪生长激素[J]. 生物工程学报, 1991, 7(4): 307－311

[3] O'Reilly D R, Passarelli A L, Goldman I F, *et al*. Characterization of the DA26 gene in a hypervariable region of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome [J]. Journal of General Virology, 1990, 71: 1029－1037

[4] O'Reily D R, Miller L K, Luckow V A. Baculovirus expression vetors, A laboratory Mannul [M]. New york: WH Freeman, 1994

[5] Maeda S, Kawai T, Obinata M, *et al*. Production of human α-inferferon in silkworm using a baculovirus vector [J]. Na-

维普资讯 http://www.cqvip.com

true, 1985, 315: 592 - 594

[6] 王瑞章、谢伟东、龙繁新、等.形成多角体的杆状病毒载体系统的建立[J].病毒学报, 1991, 7(3): 253 - 261

[7] Sambrook J, Pritsch E F, Maniatis T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd Ed, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1989.

[8] Summers M D, Smith G E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture rocedures, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin [J]. 1985, (555): 27 - 30

[9] Seeburg P H, Sias S, Adelman J, *et al*. Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormone [J]. DNA, 1983, 2: 37 - 45

[10] George H J, L'Italien J J, Pilacinski W P, *et al*. High-level expression in *Escherichia coli* of biologically active bovine growth hormone [J]. DNA, 1985, 4: 273

Expression of Porcine Growth Hormone Gene in Baculovirus Vector System

OUYANG Jing[1], WEI Ping-hua[2], YANG Lin[1], XIE Ming-quan[2], YANG Jie[1], LONG Qing-xin[1], WANG Xun-zhang[1]

[1](*Biopharmaceutical Center, State Key Laboratory for Biological Control, Zhongshan University, Guangzhou* 510275, *China*)

[2](*Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou* 510650, *China*)

Abstract: The cDNA sequence encoding porcine growth hormone (pGH) was inserted into the plasmid of pBluescript M13(-). The sequening results showed that a 984 base-pair fragment is identical to that reported by Seeburg *et al*., with the exception of one different base-pair in the ORF. Then, a baculovirus recombinant vector (pX3/4-pGH) with the pGH ORF was constructed and cotransfected *Hi*5 cells with the linearized parental virus (AcMNPV-OCC$^-$) DNA to produce the recombinant virus AcMNPV-pX3/4-pGH-OCC$^+$, in which the pGH gene was driven by the synthetic and XIV promoters. The SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the pGH gene product, 20.7 kDa fusion protein, was obtained. The expressed pGH accumulated up to about 4.48% of the soluble cellular proteins as estimated by CS-930 scanning of the SDS-PAGE gel stainning by Coomassie Brilliant Blue R250.

Key words: Porcine growth hormone; Sequence analysis; Baculovirus vector system; Expression