

密级：

论文编号：

# 中国农业科学院 博士学位论文

杆状病毒泛素、多角体基因启动子分析  
及表达系统的应用

**Promoter analysis of *Baculovirus ubiquitin* and *polyhedrin* gene as  
Well as the Application of BmNPV-Silkworm Expression System**

博 士 研 究 生：林 旭 璦

指 导 教 师：张 志 芳 研究员

沈 桂 芳 教 授

申 请 学 位 类 别：农学博士

专 业：特种经济动物饲养

研 究 方 向：病毒分子生物学

培 养 单 位：研究生院

蚕业研究所

提交日期 2006 年 06 月

Secrecy:

No.

**Chinese Academy of Agricultural Sciences**  
**Ph.D Dissertation**

**Promoter analysis of Baculovirus *ubiquitin* and *polyhedrin* gene  
as Well as the Application of BmNPV-Silkworm Expression  
System**

Ph.D Candidate : Lin Xu-Ai

Advisor : Prof. Zhi-Fang Zhang

Prof. Gui-Fang Shen

Major : The rearing of special-type economic animals

Specialty : Molecular Biology of Virus

Chinese Academy of Agricultural Sciences

**June 2006**

# 独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间：     年     月     日

## 关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

**(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)**

论文作者签名：

时间：     年     月     日

导师签名：

时间：     年     月     日

论文评阅人、答辩委员名单

论文题目	杆状病毒泛素、多角体基因启动子分析及表达系统的应用				
论文作者	林旭瑗	指导教师	张志芳 沈桂芳	培养单位	蚕业研究所

	姓名	职称职务	导师类别	单位	专业
评阅人	陈建国	教授	博导	北京大学生命科学院	细胞生物学及遗传学
	徐卫华	教授	博导	中国科技大学生命科学院	生化与分子生物学
	周 婷	研究员	硕导	中国农科院蜜蜂研究所	动物病理学
答辩主席	吴祥甫	研究员	博导	中国科学院上海生命科学研究院	病毒分子生物学
答辩委员	孙崇荣	教授	博导	复旦大学生命科学院	生物化学
	华 刚	研究教授	博导	美国佐治亚大学生科院昆虫系	昆虫分子生物学
	鲁兴萌	教授	博导	浙江大学动科院	昆虫病理学
	时连根	教授	博导	浙江大学动科院	分子生物学
	张耀洲	教授	博导	浙江理工大学	病毒分子生物学
	李奕仁	研究员	博导	中国农科院蚕研所	特种经济动物饲养
答辩时间与地址		2006 年 06 月 17 日，中国农业科学院蚕业研究所			
记录人员		任永利			

# 摘要

本文围绕杆状病毒泛素 (*ubiquitin, ubi*) 基因启动子结构及功能元件、杆状病毒 IE1 及 *hr3* 对晚期 *ubi* 和极晚期 *polh* 启动子的作用、参与杆状病毒晚期基因泛素表达的病毒因子、耐高温  $\beta$ -glucosidase 在家蚕中的表达及纯化等方面作了一定的研究。

## (1) 杆状病毒 *ubiquitin* 基因启动子结构及功能元件的分析

克隆的启动子与 BmNPV T3 株及 AcMNPV C6 株 *ubi* 基因启动子的同源性分别为 98.9%、99.5%，二者之间的同源性为 92.8%。该序列中具有两个杆状病毒晚期基因转录起始位点 TAAG 和两个 TATA box，三个 CAAT。Northern blot 证明杆状病毒 *ubi* 为晚期表达基因，在病毒感染后约 12 h 或更早开始大量表达，并具有多个转录本。

*ubi* 启动子区域缺失分析证明 *Acubi* 基因启动子对病毒因子的主要响应区在 ATG 上游 -595~-382 bp；而 *Bmubi* 基因启动子中则主要位于 ATG 上游 -382~-124 bp；在 ATG 上游 -383~-187 bp 的 196 bp 启动子片段，含有一个 TAAG、CAA T 基序和 TATA box，也具有启动子的活性。

对 *ubi* 启动子进行突变分析发现，TATA box 和 TAAG 突变后均能降低该启动子的活性，而 CAAT 突变却可以提高启动子的转录活性大约 3 至 4 倍左右。

## (2) 杆状病毒 IE-1 及 *hr3* 对晚期 *ubi* 和极晚期 *polh* 启动子的作用

在病毒感染的情况下，顺式连接或反式作用的 *hr3* 可分别增强 *ubi* 基因启动子活性达 62 和 1.4 倍左右；与 *ie-1* 共转染时，顺式连接的 *hr3* 可增强 *ubi* 基因启动子转录约 210；反式作用则为 9 倍。*ubi* 基因启动子序列中与 *ie-1* 响应的区段主要位于 ATG 上游 -595~-382 bp 之间。

对于极晚期 *polh* 基因启动子，在 BmNPV 感染的细胞中，顺式连接的 *hr3* 可增强报告基因表达 283 倍，反式作用为 1.8 倍左右；报告质粒与 *ie-1* 共转染时，顺式或反式的 *hr3* 可分别增强 *polh* 启动子控制的报告基因表达 621 倍和 4.2 倍。

用报告质粒转染家蚕 5 龄第二天的幼虫，*hr3* 同样可显著提高 *ubi* 和 *polh* 启动子的转录活性。

## (3) 参与杆状病毒晚期基因 *ubi* 表达的病毒因子研究

通过构建 BmNPV 基因组文库，对参与 *ubi* 基因转录的病毒因子进行了筛选。单独的立即早期基因 *ie0*、*ie2*、*pe38* 等对 *ubi* 基因启动子没有激活作用，*ie-1* 能反式激活 *ubi* 基因启动子的转录，但报告基因的表达量较低。在 *ie-1* 存在时，*he65*、*lef-11*、*lef-6*、*p35* 及 *gp118-gp119*、*gp104-gp107* 片段均能启动 *ubi* 启动子的转录。

## (4) 耐高温 $\beta$ -glucosidase 在家蚕中的表达及纯化

获得了能够表达  $\beta$ -glucosidase 的重组病毒。酶活性为 10 199.5 U/毫升血淋巴，19 797.4 U/头蚕。酶的最适反应温度为 105℃，最适反应 pH 为 5.0，在 90-110℃ 保温 10 min，酶活性没有大的影响，当温度升高到 140℃ 时，酶活才会急剧下降；二价离子及高盐对表达的  $\beta$ -glucosidase 活性均没有显著影响。初步纯化的上清酶液中含有约 80% 以上的重组蛋白。耐高温  $\beta$ -glucosidase 在家蚕杆状病毒表达系统中的成功表达，为该酶的大规模生产及应用奠定了坚实的基础。

**关键词** 杆状病毒，启动子，病毒因子，基因表达

## Abstract

We studied the characters of *ubi* promoter, the effect of IE1 and *hr3* on late *ubi* and very late *polh* promoter activity, viral factors involved in late *ubi* gene expression as well as the expression of thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*.

This paper mainly includes following parts:

### (1) Structure and functional element of AcMNPV and BmNPV *ubi* gene promoter

Sequence analysis of cloned *ubi* promoter showed that it was 99.5% and 98.9% identity to AcMNPV C6 and BmNPV T3 strain, respectively, and 92.8% of each other. Both of the promoter region have baculovirus late transcriptional initiation site, TAAG motif. They also have promoter conservative motif, CAAT and TATA box, respectively. Northern blot analysis testified that *ubi* gene is a late expression gene, it start its expression at about 12 hours post infection (h.p.i.) or earlier, and has two or three transcriptional product.

Deletion analysis of *ubi* gene promoter region showed that *cis*-acting elements were mainly present within -595 to -382 bp upstream ATG of *Acubi* gene promoter and -382 to -124 bp upstream ATG of *Bmubi* gene promoters. Interestingly, the region between -383 to -187 bp upstream ATG, which containing the distal TAAG, CAAT motif and TATA box, also can drive the reporter gene expression.

Site mutation of TAAG, CAAT motif and TATA box showed that in the present of virus factors, both of the promoters were reduced obviously by TATA box and TAAG mutations, and increased remarkably by CAAT mutations.

### (2) Function of IE-1, *hr3* on the late and very late gene promoters of baculovirus

About *ubi* promoter, in the presence of BmNPV, *hr3* could significantly enhance the activity of *ubi* promoter activity about 62- and 1.4-fold in *cis*- or in *trans*-, respectively. Co-transfected *ie-1* and reporter plasmid, *hr3* could enhance *ubi* promoter transcription about 210- in *cis*- or 9-fold in *trans*-. Co-transfected *ie-1* and a series of deletion plasmid of *ubi* promoter. Transient expression result showed that *cis*-acting elements to IE-1 were mainly present above -595 to -382 bp of ATG in the promoter region.

Toward very late *polh* promoter, in BmNPV-infected cells, *hr3* could increase the expression of report gene about 283- in *cis*- and 1.8-fold in *trans*-. When co-transfected *ie-1* and reporter plasmid, *hr3* could increase *polh* promoter transcription about 621-fold in *cis*-, and 4.2-fold in *trans*-, respectively.

*Hr3* also could enhanced *ubi* or *polh* promoter transcription in the presence of *ie-1* or BmNPV when transfected *Bombyx mori* larvae.

### (3) Study of virus factors which involving in the expression of baculovirus late gene *ubi*

In this study, we developed a method to identify baculovirus genes required for late gene expression that is based on accession of clones from a BmNPV genome DNA library. The results showed that some early genes, *ie0*, *ie2*, and *pe38*, *et al.* didn't activate the *ubi* promoter. A low level of luciferase activity was observed in cells when pBmubi595luc co-transfected with pIE-1 plasmid only, implied there are other viral factors also participate in the transcription of *ubi* with the *ie-1*. Using pBmubi595luc, pIE-1 and BmNPV genome library co-transfected *Bm* cell lines in transient expression assay, and detected the reporter gene expression. Based on the result, nucleotide sequence of these plasmids, which can *trans*-activated the transcription of *ubiquitin* promoter, was determined, several repeated gene in these fragments were subcloned to pGEM-3Z, then co-transfected with pBm595ubiluc and pIE-1. Subsequent subcloning and luciferase assays indicated that, in the present of IE-1, late expression factors LEF-6, LEF-11, HE65, P35 and other gene fragments, gp118-gp119 and gp104 to gp107, were required for the activation of baculovirus late *ubi* gene promoter.

### (4) Expression and purification of thermostable $\beta$ -glucosidase in silkworm using baculovirus expression vector system

In this study, we cloned thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*, and obtained the recombinant virus containing *celB* gene. The recombinant thermostable  $\beta$ -glucosidase was purified to above 80% homogeneity in a single heat-treatment step. The optimal activity of the expressed  $\beta$ -glucosidase was obtained at pH 5.0 and about 105 °C, divalent cations and high ionic strength did not affect on the activity remarkably. The enzymatic characteristics of recombinant  $\beta$ -glucosidase were similar to the native counterpart. The expressed  $\beta$ -glucosidase accounted for more than 10% of silkworm total haemolymph proteins according to the protein quantification and densimeter scanning. The expression level reached to 10 199.5 U per ml haemolymph and 19 797.4 U per silkworm larva, and the specific activity of the one-step purified crude enzyme was 885 U per mg.

**Key words:** baculovirus; promoter; viral factors; gene expression

# 目 录

摘要.....	
Abstract.....	
目录.....	
中英文缩略表.....	
第一章 研究目的、内容和意义.....	1
1.1 研究目的.....	1
1.2 研究内容.....	2
1.2.1 杆状病毒 AcMNPV 和 BmNPV <i>ubiquitin</i> 启动子的特性分析 .....	2
1.2.2 杆状病毒 IE-1 及 <i>hr3</i> 对晚期 <i>ubiquitin</i> 和极晚期 <i>polyhedrin</i> 启动子的作用 .....	2
1.2.3 病毒因子对杆状病毒泛素基因转录的调控作用.....	3
1.2.4 耐高温 $\alpha$ -glucosidase 在家蚕杆状病毒表达系统中的表达及纯化方法的建立.....	3
1.3 研究意义.....	3
第一部分 杆状病毒 <i>ubiquitin</i> 、 <i>polyhedrin</i> 基因启动子分析.....	5
第二章 文献综述 .....	5
2.1 杆状病毒编码泛素的研究进展.....	5
2.1.1 泛素依赖的蛋白水解系统.....	5
2.1.2 病毒泛素基因的研究.....	6
2.2 病毒基因启动子的研究.....	8
2.2.1 病毒编码的启动子概况.....	8
2.2.2 几种主要杆状病毒编码启动子研究进展.....	9
2.2.3 泛素基因启动子研究情况.....	10
2.3 杆状病毒晚期表达因子的研究.....	10
2.3.1 参与病毒 DNA 复制的 LEFs.....	12
2.3.2 参与病毒 DNA 转录的 LEFs.....	13
2.3.3 其它转录 LEFs.....	14
2.4 杆状病毒泛素启动子的研究意义.....	15
第三章 材料和方法.....	17
3.1 细胞的冻存、复苏、传代及病毒繁殖.....	17
3.1.1 冻存.....	17
3.1.2 复苏.....	17

3.2 PCR 反应	18
3.2.1 病毒基因组模板	18
3.2.2 质粒模板	18
3.2.3 普通 PCR 反应体系	18
3.2.4 普通 PCR 反应条件	19
3.2.5 定点突变 PCR	19
3.3 限制性内切酶反应	19
3.4 玻璃奶法纯化回收 DNA 片段	19
3.5 DNA 的连接	20
3.6 荧光素酶报告质粒的构建	20
3.7 大肠杆菌感受态细胞的制备和质粒转化	20
3.7.1 少量制备	20
3.7.2 批量制备	21
3.7.3 质粒转化	21
3.8 质粒 DNA 抽提	21
3.8.1 小量抽提	21
3.8.2 大量抽提	22
3.9 病毒基因组文库的构建	22
3.9.1 基因组 DNA 的提取	22
3.9.2 基因组 DNA 的部分消化和片段的回收	23
3.9.3 连接, 转化及扩增	23
3.10 质粒 DNA 的转染	23
3.11 细胞裂解和荧光素酶活性的测定、蛋白质定量	24
3.11.1 细胞裂解	24
3.11.2 Luciferase 活性测定	24
3.11.3 蛋白浓度测定	24
3.12 细胞总 RNA 的抽提	25
3.13 随机引物法标记杂交探针	25
3.14 Northern blot	26
3.14.1 电泳与转膜	26
3.14.2 杂交、洗膜和冲片	26
第四章 BmNPV、AcMNPV <i>ubiquitin</i> 基因启动子的结构与功能分析	27
4.1 材料和方法	28
4.1.1 材料	28
4.1.2 方法	28
4.2 结 果	30
4.2.1 杆状病毒 <i>ubiquitin</i> 基因启动子的序列分析	30
4.2.2 Northern blot 分析	31

4.2.3 <i>ubiquitin</i> 基因启动子的功能分析.....	32
4.3 讨 论.....	34
第五章 <i>hr3</i> 、 <i>ie-1</i> 对杆状病毒晚期、极晚期启动子的激活作用.....	38
5.1 材料方法.....	39
5.1.1 报告质粒的构建.....	39
5.1.2 <i>IE-1</i> 与 <i>ubiquitin</i> 基因启动子顺式元件的结合.....	39
5.1.3 <i>ie-1</i> 、 <i>hr3</i> 对晚期 <i>ubiquitin</i> 基因启动子的作用.....	39
5.1.4 <i>ie-1</i> 、 <i>hr3</i> 对极晚期基因 <i>polh</i> 启动子的作用.....	39
5.1.5 家蚕饲养和转染.....	40
5.2 结 果.....	40
5.2.1 功能质粒的构建.....	40
5.2.2 <i>ie-1</i> 、 <i>hr3</i> 对晚期 <i>ubiquitin</i> 基因启动子的作用.....	40
5.2.3 <i>ubiquitin</i> 启动子中对 <i>ie-1</i> 的响应区段研究.....	41
5.2.4 <i>ie-1</i> 、 <i>hr3</i> 对极晚期 <i>polh</i> 基因启动子的作用.....	42
5.3 讨 论.....	45
第六章 参与杆状病毒泛素基因转录的病毒因子的研究.....	48
6.1 材料方法.....	49
6.1.1 病毒和细胞.....	49
6.1.2 BmNPV 基因组文库构建、瞬时表达分析.....	49
6.1.3 DNA 共转染.....	49
6.1.4 重组质粒的构建.....	49
6.2 结 果.....	50
6.2.1 BmNPV 文库 DNA 对 <i>ubiquitin</i> 启动子转录的影响.....	50
6.2.2 对 <i>ubiquitin</i> 启动子具有激活作用的病毒因子.....	51
6.2.3 病毒因子的突变分析.....	52
6.3 讨 论.....	53
第二部分 耐高温葡萄糖苷酶在家蚕杆状病毒中的表达.....	55
第七章 引言.....	55
7.1 杆状病毒表达系统研究.....	55
7.1.1 转移载体的发展.....	55
7.1.2 亲本病毒及重组介质的改良.....	56
7.1.3 外源蛋白表达的影响因素.....	56
7.1.4 表达系统的应用.....	57
7.2 高温 -葡萄糖苷酶的研究情况.....	58
7.2.1 -葡萄糖苷酶主要应用.....	59
第八章 耐高温葡萄糖苷酶在家蚕杆状病毒表达载体系统中的表达、特性 分析及纯化.....	61

8.1 材料和方法	62
8.1.1 耐高温古细菌( <i>Pyrococcus furiosus</i> )基因组 DNA 的提取	62
8.1.2 重组表达质粒的构建	62
8.1.3 超速离心法制备病毒 Bm-BacPAK6 基因组 DNA	62
8.1.4 Bm-BacPAK6 基因组 DNA 的线性化	63
8.1.5 共转染	63
8.1.6 重组病毒的筛选、纯化和扩增	63
8.1.7 PCR 鉴定外源基因的整合	64
8.1.8 家蚕接种和样品的初步纯化	64
8.1.9 $\alpha$ -glucosidase 表达时相	64
8.1.10 SDS-PAGE 电泳	64
8.1.11 celB 标准曲线的制作	65
8.1.12 耐高温 $\alpha$ -glucosidase 的活性分析	66
8.2 结 果	66
8.2.1 celB 基因序列分析及重组质粒的构建	66
8.2.2 同源重组及重组病毒的筛选	67
8.2.3 重组病毒在家蚕中的表达及初步纯化	67
8.2.4 表达的外源蛋白的特性分析	68
8.3 讨 论	71
第九章 结 论	74
9.1 ubiquitin 基因启动子克隆及功能分析	74
9.2 IE-1、hr3 对杆状病毒晚期 ubiquitin 基因启动子的调控	74
9.3 IE-1、hr3 对杆状病毒极晚期 polh 基因启动子的调控	75
9.4 参与 ubiquitin 基因表达的病毒因子的鉴定	75
9.5 耐高温 $\alpha$ -glucosidase 的表达及特性分析	75
参考文献	77
致 谢	88
作者简介	89
附 录	90

## 英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus	斜纹夜蛾核型多角体病毒
BEVS	baculovirus expression vector system	杆状病毒表达载体系统
Bm	<i>Bombyx mori</i>	家蚕
BmNPV	<i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus	家蚕核型多角体病毒
BV	budded virus	芽病毒
CelB	-glucosidase	-乳糖酶
cpm	counts per minute	每分钟计数
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
GV	granulovirus	颗粒体病毒
hpi	hours post infection	感染后时间
hpt	hours post transfection	转染后时间
ie	immediate-early gene	立即早期基因
LEFs	late expression factors	晚期表达因子
luc	luciferase gene	荧光素酶基因
NPV	nucleopolyhedrovirus	核型多角体病毒
ORF	open reading frame	开放阅读框
OV	occluded virus	包涵体病毒
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
pfu	plaque forming unit	空斑形成单位
	pfu DNA polymerase	pfu DNA 聚合酶
PHD	plant homeodomain	植物同源异型域
polh	polyhedrin gene	多角体基因
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>	草地夜蛾
5' UTR	5'untranslated region	5'非编码序列
UCEP	ubiquitin carboxyl extension protein	泛素羧基延伸蛋白
UPP	ubiquitin proteasome pathway	泛素蛋白酶体途径
ubi	ubiquitin	泛素
vlf	very late expression factor	极晚期表达因子

## 第一章 研究目的、内容与意义

### 1.1 研究目的

1.1.1、杆状病毒是目前所知唯一编码泛素蛋白的病毒，病毒通过泛素而改变其感染细胞的微环境，使病毒免受宿主免疫系统的攻击。转录调控是基因表达的主要调控环节，而启动子及其侧翼区的调控元件对基因的表达及表达量起关键作用。通过分析家蚕核型多角体病毒（BmNPV）和苜蓿尺蠖核型多角体病毒（AcMNPV）*ubiquitin (ubi)*基因启动子的特性，以期加深关于病毒对宿主侵染机制的认识，为病毒在宿主体内的复制及病毒粒子的组装和释放研究提供基础；

1.1.2、杆状病毒基因组的复制表达是一个级联事件，晚期和极晚期基因的表达均需要早期基因表达产物的参与。一些病毒反式激活因子，如在病毒复制的级联事件中起着重要作用的立刻早期基因产物 IE-1，能影响其后表达基因的转录，并为病毒复制所必需。本实验通过研究杆状病毒立即早期基因蛋白 IE-1 对病毒晚期基因 *ubi*、极晚期基因 *polyhedrin (polh)* 启动子的反式激活作用机理，为构建新的高效表达载体寻找实验依据；杆状病毒同源区（*hr*）序列是分散在杆状病毒基因组中的重复序列，已有实验证明 *hr* 序列既是杆状病毒复制起始原点，又具有增强子的作用，本文将 BmNPV 来源的 *hr3* 与 *ubi* 和 *polh* 启动子顺式连接或反式作用，在昆虫细胞和家蚕体内进行瞬时表达分析，探讨 *hr3* 对杆状病毒晚期 *ubi* 和极晚期 *polh* 基因启动子是否也具有增强子功能。

1.1.3、杆状病毒立即早期基因蛋白 IE-1 对病毒晚期 *ubi* 基因启动子虽然具有一定的反式激活作用，但这种作用是微弱的，比存在一种或几种病毒调控蛋白的整个病毒基因组 DNA 作用下得到的结果弱的多，说明在病毒基因组中还存在其它的病毒因子参与了晚期基因启动子的转录，本文通过筛选参与杆状病毒泛素基因转录调控的病毒因子，为从分子水平上阐明病毒泛素基因的表达调控提供材料；

1.1.4、乳糖是乳制品中存在的主要碳水化合物，乳糖进入体内后经小肠乳糖酶作用分解成葡萄糖和半乳糖。乳糖在肠道经发酵产生的乳酸可提高食物中钙、磷、钾、铁等矿物质的吸收利用。本研究利用昆虫杆状病毒表达系统实现耐高温  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的高效表达，并对其酶学特性进行研究，建立高温酶的纯化方法。该研究解决了目前乳糖酶生产过程中的单位产量低、酶后加工困难的难题，对乳糖酶传统的生产方法和工艺进行了革新，为乳糖酶廉价生产提供了一种可行的新方法。

## 1.2 研究内容

### 1.2.1 杆状病毒 AcMNPV 和 BmNPV *ubi* 启动子的特性分析

1.2.1.1、通过 PCR 法从 AcMNPV 和 BmNPV ZJ8 株基因组 DNA 中克隆 *ubi* 基因 5' 侧翼区，插入普通载体中并进行测序；

1.2.1.2、通过软件分析两个病毒株 *ubi* 启动子之间的序列差异，搜索启动子序列中可能含有的功能元件；

1.2.1.3、PCR 法和限制性内切酶法构建一系列质粒，分别含有缺失不同启动子调控区片段以及不同启动子元件发生突变的片段；

1.2.1.4、Northern blot 分析确定杆状病毒 *ubi* 基因的表达时期；

1.2.1.5、构建各种修饰启动子控制下的 *luciferase* 为报告基因的质粒，并转染相应的 *Bm* 或 *Sf* 细胞；

1.2.1.6、检测 *Luciferase* 活性，确定对杆状病毒 *ubi* 启动子功能影响较大的区段或不同调控元件对启动子活性的影响。

### 1.2.2 杆状病毒 IE-1 及 *hr3* 对晚期 *ubi* 和极晚期 *polh* 启动子的作用

1.2.2.1、根据文献资料，以杆状病毒表达载体 pVL1393 DNA 为模板，克隆多角体基因的启动子序列（包含载体的多克隆位点）；

1.2.2.2、将获得的 *Ppolh* 片段亚克隆到质粒 pKS 中，构建重组质粒 *ppolhluc* 及 *ppolhluc-hr3*，将构建的质粒 DNA 进行体内、体外表达分析，分析 *hr3* 对多角体启动子的作用；

1.2.2.3、将 *hr3* 片段亚克隆到含 *ubi* 启动子的报告质粒下游，构建重组质粒 *pBm595ubiluc-hr3*，并进行表达分析；

1.2.2.4、*pBmubi595luc*、*pBm595ubiluc-hr3*、*hr3* 与 *pBmubi595luc* 或者 *ppolhluc*、*ppolhluc-hr3*、*ppolhluc* 与 *hr3* 分别转染 *Bm* 细胞后再用 BmNPV 感染细胞，测定报告基因的表达量；

1.2.2.5、*ie-1* 分别与 *pBmubi595luc*、*pBm595ubiluc-hr3*、*hr3* 和 *pBmubi595luc* 或者与 *ppolhluc*、*ppolhluc-hr3*、*ppolhluc* 和 *hr3* 共转染家蚕 *Bm* 细胞，测定报告基因的表达量，并进行 *polh* 启动子的转录时相分析。

### 1.2.3 病毒因子对杆状病毒泛素基因转录的调控作用

- 1.2.3.1、构建 BmNPV 基因组文库；
- 1.2.3.2、用文库 DNA 与泛素基因完整启动子构建的报告质粒 pBmubi595luc 和 *ie-1* 共转染 *Bm* 细胞，筛选能够显著提高启动子活性的文库质粒进行测序；
- 1.2.3.3、将测序结果与 Genbank 数据库中 BmNPV 基因组全序列进行比对，确定病毒因子；
- 1.2.3.4、亚克隆可能的病毒因子与 *ubi* 启动子共转染 *Bm* 细胞，再次对其进行确证。

### 1.2.4 耐高温 $\alpha$ -glucosidase 在家蚕杆状病毒表达系统中的表达及纯化方法的建立

- 1.2.4.1、根据 Genbank 公布的  $\alpha$ -glucosidase 序列，用 PCR 方法扩增目的基因片段，克隆入通用载体 pGEM-3Z，并测序；
- 1.2.4.2、将目的片段亚克隆入杆状病毒表达载体 pVL1393，构建重组表达质粒 pVL-CelB；
- 1.2.4.3、pVL-CelB 与线性化亲本病毒 BmBacPAK6 共转染家蚕细胞，筛选、纯化重组病毒；
- 1.2.4.4、用重组病毒感染家蚕 5 龄幼虫，收集血淋巴或发病蚕体；
- 1.2.4.5、对表达的  $\alpha$ -glucosidase 进行活性分析及纯化。

## 1.3 研究意义

对杆状病毒基因启动子的研究为了解真核生物基因转录调控提供了模型。泛素依赖的蛋白降解系统广泛存在于真核生物，对调节细胞内蛋白周转，参与细胞多种生命过程均有重要作用。泛素启动子在真核细胞中的强启动子作用不仅与其核心区域的多种转录因子有关，也与泛素在细胞中的正常功能有关。由于泛素启动子不受组织细胞的限制，因而能够广泛用于基因治疗载体的构建，对病毒基因启动子的研究对于开发新型基因工程杆状病毒表达载体及杀虫剂具有实践上的重要意义。

病毒基因结构、功能和表达调控的研究是分子生物学领域的研究热点之一。其核心内容是揭示病毒基因组复制机理以及早期基因对晚期基因的调控机制。杆状病毒基因的表达是以极其复杂的级联式调控方式进行的，晚期和极晚期基因的表达需要早期基因表达产物的反式激活。对参与杆状病毒晚期基因表达的病毒基因的鉴定，是研究参与晚期基因转录的 RNA 聚合酶及病毒转录和 DNA 复制关系的重要步骤，对这些病毒因子的认知为建立体外研究病毒 DNA 复制及晚期基因转录提供了一种直接的方法；以前的普遍观点认为增强子序列只有与启动子顺式连接时才具有增强子的作用，并且对晚期和极晚期基因是不具有增强作用的，本研究认为在 IE-1 或病毒因子存在

时,无论顺式还是反式的 *hr3* 均可以促进晚期或极晚期启动子转录,即 *ie-1* 能够和 *hr3* 共同作用,促进 *ubi* 和 *polh* 基因启动子的转录,*IE-1* 发挥了一个 *hr3* 与启动子识别的桥梁作用,加深的对增强子作用方式的认识。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -glucosidase)属于水解酶类,是纤维素分解酶系中的重要组成部分。可水解结合于末端、非还原性的 $\alpha$ -葡萄糖苷键,同时释放 $\alpha$ -D-葡萄糖及相应的配基。目前世界上,尤其是亚洲和非洲国家约有70%的人口由于小肠中缺乏葡萄糖苷酶而患有乳糖不耐受症,导致了不能有效的吸收奶制品中的营养元素。高温菌来源的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶从其性质来讲非常适合添加到奶制品中,但要达到工业化应用首要的问题应是大幅度提高酶的产量及比活。杆状病毒表达系统自建立以来已成功表达了大量有用蛋白,相对于大肠杆菌及酵母表达系统,成功克服了这两种系统的分泌瓶颈及产量问题,因而本研究利用家蚕-杆状病毒表达系统为高效生产乳糖酶提供理论性依据,从而为规模化生产乳糖酶提供了一条高产、简便、廉价的新途径。

# 第一部分 杆状病毒 *ubiquitin*、*polyhedrin* 基因启动子分析

## 第二章 文献综述

### 2.1 杆状病毒编码泛素的研究进展

2004 年, 诺贝尔化学奖授予了三位在蛋白质降解方面作出卓越贡献的科学家, 以表彰他们发现了泛素介导的蛋白质降解途径。1975 年 Goldstein 等人[Goldstein, *et al.*, 1975] 首次从牛胸腺中分离到一种小分子蛋白质, 后来发现其广泛存在于各种真核生物中, 且不同种属来源的这种蛋白质具有类似的结构、功能和免疫学作用, 故命名为泛素 (ubiquitin) [Varshavsky, 1991]。大多数种属的泛素由 76 个氨基酸组成, 其分子量为 8.3 kD。泛素参与细胞周期的调控、应激反应、核糖体的生物合成、细胞分化等基本的细胞过程。

真核细胞编码的泛素基因主要分为两种类型。一类为多聚泛素基因 (*polyubiquitin*), 该类基因在染色体中由多个泛素基因单体头尾相连, 形成多个泛素单体的重复序列。由这类基因表达而合成的泛素常形成多聚体, 并由泛素 C-末端水解酶降解为泛素单体。这类基因的表达受到环境胁迫、胞内代谢状况和细胞分裂周期等多种因素调节[Genschik, *et al.*, 1992]; 另一类为泛素延伸基因 (*ubiquitin extension gene*), 该类基因的表达产物比泛素大的多, 它是一个泛素单体的 C-末端连接着一段由 52 或 76-81 个氨基酸残基组成的扩展肽, 称为泛素延伸蛋白 (ubiquitin carboxyl extension protein, UCEP)。此扩展肽被泛素羧端水解酶切割后, 形成 80 S 核糖体的组分。这类基因主要是在细胞快速增殖时表达[Courtney, *et al.*, 1994]。

#### 2.1.1 泛素依赖的蛋白水解系统

在正常的情况下, 生物体内各细胞调控网络具有高度的精确性, 而蛋白质的合成与降解则是其调控的主要环节。泛素系统的主要功能是选择性的标记需要降解的靶蛋白质, 通过对蛋白表达水平的调控而实现对细胞生物功能的调控。一个蛋白会通过共价键与多个分子组成的泛素蛋白酶系统 (ubiquitin proteasome pathway, UPP) 结合而被标记为“待降解蛋白”, UPP 的主要成分为泛素, 分子量为 8.6 kD。泛素活化酶 E1 (ubiquitin-activating enzyme) 可以通过给泛素的 C-端半胱氨酸加一个高能硫酯键而将泛素激活, 而被激活的泛素通过此高能硫酯键与泛素结合酶 E2

(ubiquitin-conjugating enzyme) 结合。泛素底物连接酶 E3 (ubiquitin ligase) 最后将泛素转运至底物蛋白, 其 C-末端与靶蛋白赖氨酸的  $\epsilon$ -或  $\gamma$ -氨基连接形成泛素-蛋白质复合物。随后, 泛素 48 位赖氨酸  $\epsilon$ -氨基进一步泛素化形成多聚泛素化的蛋白质, 泛素化的蛋白被运送到 26 S 的蛋白酶体而被最终降解, 同时释放出泛素重新投入利用 [Hershko and Ciechanover, 1998]。通常, 泛素系统中只含有一种 E1, 却存在多种的 E2 和更多种的 E3 及其复合物。其中 E2 可直接或通过 E3 连接而识别底物蛋白, 一个 E2 可和多个 E3 相互作用, 同时一个 E3 也可以同多种 E2 作用 (图 2.1) [Wojcik, 2001]。最近研究发现, 一种新的酶——E4 在少数底物的泛素化反应中对多聚泛素链的延长起着重要的作用 [Koegl, *et al.*, 1999]。

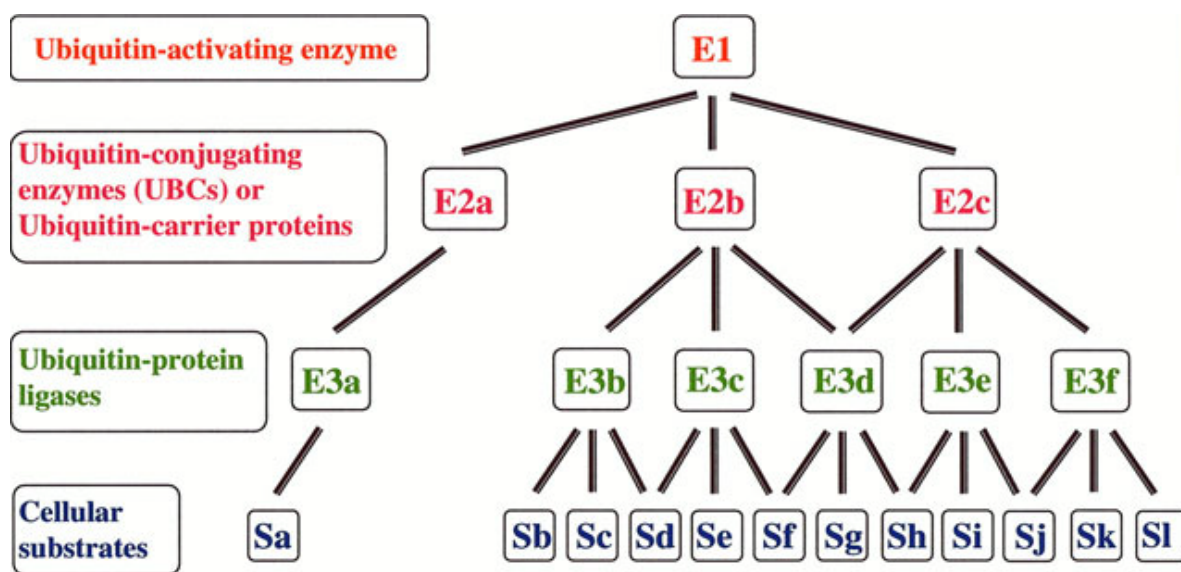


图 2.1 泛素依赖的泛素-蛋白酶体降解途径

Fig. 2.1 hierarchical structure of the ubiquitin conjugating machinery

泛素系统可以通过降解细胞周期调控因子、转录因子、肿瘤抑制因子等不同的底物蛋白来实现对细胞生物学功能的调控。大量的实验证明泛素系统参与了细胞发育过程, 如组织发育、细胞周期调控和细胞凋亡等。虽然这些过程潜在的机制还不清楚, 但对泛素系统的研究具有及其重要的意义。

### 2.1.2 病毒泛素基因的研究

泛素基因是一类多家族基因, 它存在于所有真核生物中, 在已鉴定的多个杆状病毒中基本是保守的, 只有 *Neodiprion lecontei* NPV、*Neodiprion sertifer* NPV 和 *Culex nigripalpus* NPV 中不包含泛素基因。人、果蝇和家蚕中的几种 *polyubi*、*ubi-52*、*ubi-53* 及 *ubi-80* 基因, 已进行了分子进化和功能的研究, 真核生物泛素在细胞周期调控、细胞凋亡调控及 mRNA 转录调控等重要生命活动都具有功能。自 1990 年以来, 已相继从昆虫杆状病毒的核多角体病毒属

(nucleopolyhedrovirus, NPV) 和颗粒体病毒属 (Granulovirus, GV) 中克隆了泛素基因, 并对其在病毒结构中的定位与功能进行了相应的研究。Guarino 等发现纯化的 AcMNPV 芽生型病毒粒子 (budded virus, BV) 中含有大量游离的泛素, 进一步实验发现, 泛素通过一种新型磷脂锚连接到芽生型病毒粒子包膜的内表面 [Guarino, *et al.*, 1995]。

杆状病毒泛素与真核生物泛素的氨基酸序列有较大的不同: 在杆状病毒泛素的羧基端融合了不同长度的短肽, 且这些短肽与真核生物泛素延伸蛋白所融合的核糖体没有同源性, 经 C 端加工后成为泛素分子 [van Strien, *et al.*, 1996]; 杆状病毒泛素基因之间的同源性相差较大, 分别有 60-100%, 但一些介导泛素功能的氨基酸位点保守地存在于昆虫病毒泛素中 [Li, *et al.*, 2003], 可能杆状病毒泛素在病毒侵染过程中具有独特的作用。Guarino 等证明杆状病毒泛素基因是一个晚期基因, 在病毒感染后 8 h 开始表达, 其峰值出现在感染后 14-18 h [Guarino, 1990]。

最新的研究表明, 泛素在细胞凋亡过程中发挥着双重作用, 具有抑制和促进细胞凋亡的作用 [Wettern, *et al.*, 1990]。泛素在病毒的感染过程中同样发挥着重要作用, 可能病毒利用宿主细胞的泛素或泛素介导的蛋白质降解系统逃避免疫系统的监控、促进病毒复制以及进行病毒粒子的组装和释放。人腺病毒和乳头瘤病毒通过改变宿主 E3 的活性来直接降解宿主 p53; 疱疹病毒编码的 E3 通过促进免疫识别分子的泛素化和降解而逃避宿主免疫系统的攻击。病毒感染还可能促进宿主泛素的表达, 单纯疱疹病毒感染可显著提高感染细胞泛素基因的转录 [Kemp and Latchman, 1988]。杆状病毒和昆虫痘病毒中, *ubi* 的来源可能是最先获得细胞的 cDNA, 然后经过长时间的分子进化, 形成了现在有差别的不同种属的基因, 有利于病毒的感染和复制, 或逃避细胞对病毒的免疫。许多研究证明病毒和宿主的泛素系统可以发生相互作用, 宿主泛素蛋白可被病毒的泛素系统所泛素化, 这可能有助于病毒的感染及出芽过程。Dunigan 等证实烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus) 的病毒粒子的一些蛋白可和宿主的泛素蛋白相连接; 一些植物病毒, 如大麦条纹花叶病毒 (barley stripe mosaic virus)、雀麦草花叶病毒 (brome mosaic virus)、豇豆花叶病毒 (cowpea mosaic virus) 和卫星黍花叶病毒 (satellite panicum mosaic virus) 等的一些病毒蛋白也可与泛素连接 [Hazelwood and Zaitlin, 1990]。Aletta 等的进一步研究认为, 花椰菜花叶病毒 (cauliflower mosaic virus) 衣壳蛋白前体的两个末端结构域可以通过泛素依赖的蛋白酶水解而产生成熟蛋白, 这样的水解信号可以使衣壳蛋白的前体及衣壳蛋白不会因过量表达而使其折叠的构象发生错误 [Karsies, *et al.*, 2001]。腺病毒 (Adenovirus) 五邻体蛋白也可以被泛素化, 并且为病毒的出芽必需 [Richard, *et al.*, 2002]。一些病毒的基因还编码泛素连接酶 E3 类似物, 并具有相似的功能。另有研究证明泛素和泛素连接酶还参与了反转录病毒 (Retrovirus)、丝状病毒 (Filovirus) 和弹状病毒 (Rabdo virus) 的出芽过程 [Ronald, *et al.*, 2001]。疱疹病毒中发现编码一些含植物同源异型域 (plant homeodomain, PHD) 基元的蛋白, 被认为是一类新的泛素连接酶家族, 可以使免疫识别分子泛素化及蛋白酶降解, 从而使病毒逃避宿主的免疫系统 [Laurent and Don, 2003]。还有人乳头瘤病毒的 E6 蛋白可以和一个 100 kD 的细胞蛋白形成复合体而促进 p53 的泛素化 [Kuhne and Banks, 1998]。在病毒编码的蛋白中, 还有许多具有 RING finger, HECT, U-box 等结构域, 但目前对这类蛋白是否具有泛素连接酶的作用, 及在病毒的感染、复制、组装和出芽中起什么作用并不清楚。

1995 年, Fraser 等人 [Fraser, *et al.*, 1995] 在研究鳞翅目转座子 IFP2 的转座特性时, 首次间接证明了泛素对 AcMNPV 在离体宿主细胞中的复制是非必需的。转座突变表明, IFP2 插入失活 AcMNPV 的泛素基因后, 病毒空斑的大小、包涵体与芽病毒的数量及包涵体的形成都没有明显的

变化。1996 年, Reilly 等通过在 AcMNPV 泛素基因编码区内进行移码突变, 构建了不能产生功能性泛素的重组病毒 Vubi-FS。细胞感染结果表明, 泛素对 AcMNPV 的复制确是非必需的, 而感染性与总的芽生病毒的产量却明显下降, 即泛素是一种非必需蛋白, 但能使病毒在特定条件下获得生长优势[Reilly and Guarino. 1996]。

综合前人的研究结果, 认为病毒泛素主要通过与其宿主细胞的泛素系统竞争性地结合 E1, 或作为终止多聚泛素链的延伸, 或作为分子伴侣等发挥作用, 抑制宿主泛素依赖的蛋白降解途径中的酶对杆状病毒复制所需要的蛋白的降解, 从而有利于病毒的扩散及传播。

相对于 *polh*、*p10*、*egt* 等昆虫杆状病毒基因, 人们对杆状病毒泛素基因的研究较少。从目前的研究资料看, 昆虫杆状病毒泛素在病毒感染宿主细胞时, 与宿主细胞的泛素体系之间存在着复杂的相互作用。对昆虫杆状病毒泛素基因的结构、功能的研究, 不仅对了解昆虫杆状病毒的进化, 病毒与宿主之间的相互作用具有重要的理论意义, 且对于开发新型基因工程杆状病毒杀虫剂在实践上将起到深远的影响。

## 2.2 病毒主要基因启动子的研究

病毒的复制是病毒致病机制的重要环节, 病毒基因的表达与调控又是病毒复制研究的核心问题。研究病毒基因转录调控不仅可以揭示宿主细胞的某些基因调节机制, 对阐明真核细胞基因表达调控有重要理论意义, 而且为阐明病毒的致病机制、防治相关疾病及病毒载体的高效应用提供依据。

动物和人类病毒的基因转录调控机制与高等真核细胞的基因转录调控机制类似, 基本包括两类具有基因转录调控作用的元件: 启动子基本元件(basal promoter element), 是对有效转录起始所必需的, 但只能维持低水平的基础转录; 启动子调控元件(modulator promoter element), 包括增强子和起负调节作用的沉默子(silencer), 发挥增强或减弱基础转录效率的作用。

### 2.2.1 病毒编码的启动子概况

启动子是 RNA 聚合酶能够识别并与之结合, 从而起始基因转录的一段 DNA 序列, 通常位于基因上游。最常见的启动子基本元件为 TATA 框 (TATA box), 依赖 DNA 的 RNA 聚合酶的识别和结合位点, 一般位于转录起始位点上游几十个碱基处。在核心启动子上游通常会有一些特殊的 DNA 序列, 即顺式作用元件, 转录因子与之结合从而激活或抑制基因的转录, 其强弱决定基因转录水平的高低, 而启动子中所含有的转录因子则决定了启动子的强弱。一旦 RNA 聚合酶定位并结合在启动子上即可启动基因转录, 因此启动子是基因表达调控的重要元件, 它与 RNA 聚合酶及其他蛋白辅助因子等反式作用因子的相互作用是启动子调控基因转录的实质。

对杆状病毒启动子的研究表明, 早期基因启动子符合 RNA 聚合酶 转录的其它基因的启动子[Hoopes and Rohrmann. 1991]。对大于 150 bp 的早期基因上游序列测定表明, 大部分的早期基

因上游 A+T 含量与病毒基因组总的 A+T 含量相似, 约 42% 早期基因中存在早期转录基序 CAGT 或替代的 CGTGC 基序, 如 AcMNPV 的 *helicase* 基因启动子 [Lu and Carstens. 1992]; 而晚期基因则是从一个共感晚期启动子转录起始信号 TAAG 转录的 [Blissard and Rohrmann. 1990], 但也有些晚期基因并不利用 TAAG 作为转录起始位点, 如 AcMNPV 中 *cg30* 转录起始于 ATTAG 序列 [Thiem and Miller. 1989], *p47* 则起始于 GTAAAAC 序列 [Carstens, *et al.*, 1993]。

## 2.2.2 几种主要杆状病毒编码启动子研究进展

### 2.2.2.1、*ie-1* 启动子 :

IE-1 (Immediately early stage-1) 蛋白是杆状病毒基因复制必需蛋白, 它是一个多功能调节蛋白 [Kovacs, *et al.*, 1992], 既是早期基因反式激活因子, 又是晚期表达因子。其启动子具有两个主要的特性: 具有与真核生物相似的启动子元件, 能被宿主细胞 RNA 聚合酶 识别; 具有多种启动途径, 以适应昆虫细胞的复杂调控机制 [Chisholm and Henner. 1988; Guarino and Summers. 1987]。在 *ie-1* 基因启动子序列中 A+T 所占比例高于 G+C 的比例, 这个特性与真核生物启动子中碱基含量的比例相符。这样的结构有利于复制起始时双螺旋的打开。在 ATG 上游的启动子区域含有特征性的早期转录基序: 增强子类似元件、加帽位点和 TATA box 基元序列, 这符合 RNA 聚合酶 所识别的其它启动子序列规律。

### 2.2.2.2、*helicase* 启动子 :

*helicase* 基因为病毒早期基因, 在病毒 DNA 复制过程中发挥着解旋酶的作用。在起始密码子 ATG 上游存在早期启动子基序 GTGC 和晚期转录起始位点基序, 在转录起始位点上游有 TATA box 存在 [Lu and Carstens. 1992], 在没有其它病毒因子作用时, *hr* 可激活并增强解旋酶启动子的活性 15 倍, 立即早期基因产物 IE-1 和 PE38 可激活解旋酶启动子的活性 [Lu and Carstens. 1993]。启动子的基础转录活性区位于 ATG 上游-98 bp 区段, 在 ATG 上游-410 ~ -309 bp 为响应病毒因子的启动子区段 [Xiao, *et al.*, 2002]。

### 2.2.2.3、*gp64* 启动子 :

杆状病毒 GP64 蛋白是芽病毒主要的囊膜糖蛋白并参与了病毒向宿主细胞的侵入。该基因在病毒感染的早期与晚期均有表达, 是结构蛋白中惟一发现具有早期与晚期启动子的基因。早期启动子的存在是为了该基因表达以便质膜在核衣壳产生之前被修饰, 而晚期启动子在芽病毒产生与装配的整个循环中启动 *gp64* 的表达以不断补充质膜内因 BV 出芽而减少的囊膜糖蛋白。在 AcMNPV 和 BmNPV *gp64* 启动子区域, 二者均具有早期转录特征的 CAGT 基序, 在 CAGT 基序的上游存在两个晚期启动子基序 T/ATAAG, 但 BmNPV -73 位的 ATAAG 与 AcMNPV 相比, 发生了两个碱基变化, 变成 ATAGA。两个启动子在 -8 位置均有一个带有符合 Kozak 规则的起始密码子 ATG 的小顺反子, 在 -16 位有典型的真核启动子 TATA 盒存在 [Blissard, *et al.*, 1991; Zhou, *et al.*, 2003]。

#### 2.2.2.4、*polh* 及 *p10* 启动子：

*polh* 与 *p10* 均是杆状病毒极晚期高表达基因，在其启动子下游均富含一段与其高水平表达有关的 A/T 序列[Ooi, *et al.*, 1989]。在 *polh* 基因起始密码子 ATG 上游-20 ~ -70 bp 区段是一保守区；删除序列中存在的类似真核细胞的 TATA box 及 CCAAT 基序，对基因的转录与表达无影响，但删除近 ATG 的 AATAAG 序列，将导致启动子失活，因而是一个典型的极晚期基因[Gross and Rohrmann. 1993]。*p10* 基因比 *polh* 基因早几个小时被激活，起始密码子上游有晚期启动子基序 TAAG，且被包围在一个目前已知的所有杆状病毒高效表达晚期基因（极晚期基因）5'侧翼序列中都存在的 12 nt 保守序列中。其发挥启动子作用的区域主要为 ATG 上游 101 bp 之间的部分，TATA box 突变对启动子的转录活性没有明显影响[Weyer and Possee. 1993]。

#### 2.2.3 泛素基因启动子研究情况

泛素系统广泛存在于真核生物，对调节细胞内蛋白周转，参与细胞多种生命过程均有重要作用。随着对泛素作用网络的深入研究，为泛素在生物技术上的应用开拓了新的思路：通过调控泛素依赖的蛋白质降解途径，可以促进有用外源蛋白的表达，也可以抑制非必需的内源蛋白的表达，并可以对某些功能蛋白进行调控。同样泛素启动子在增强基因表达的长期性、稳定性等方面具有显著功效。

天然的泛素启动子与其它真核启动子相似，均由核心启动子和含有内含子的 5'非转录区 (5'untranslated region, 5'UTR)组成，与组成型启动子不同的是它不含增强序列。泛素启动子在真核细胞中的强启动子作用不仅与其核心区域的多种转录因子有关，也与其 5'UTR 的内含子的调控作用密不可分。另外，泛素启动子的部分活性与泛素在细胞中的正常功能有关。真核细胞中，泛素主要用于降解不正常或折叠错误的蛋白，并对组蛋白进行修正，激活基因进行表达，这些作用与病毒性启动子所受负调节相反，有利于激发启动子的活性，实现持续性表达[Ciechanover, *et al.*, 2000]。

由于泛素启动子具有高效启动转录的作用，且基本不受组织细胞的限制，因此能够广泛用于基因治疗载体的构建。通常，一些启动子/增强子只能在有限的组织细胞内发挥作用，在另一些细胞内，它们将失去作用或作用不明显，而泛素基因启动子则能在绝大多数的组织细胞中发挥强有力的转录控制作用，从而获得目的基因的长期高效表达。

### 2.3 杆状病毒晚期表达因子的研究

杆状病毒的宿主主要为鳞翅目、双翅目及膜翅目昆虫。其基因组为双链环状 DNA 分子，大小为 80-180 kb 不等[Blissard and Rohrmann. 1990; Kool and Vlak. 1993]。DNA 以超螺旋方式被压缩包装在杆状核衣壳 (rod-shaped nucleocapsid) 内，核衣壳包被脂质蛋白囊膜后形成病毒粒子。核

衣壳包括衣壳蛋白和髓核，其中衣壳蛋白是杆状病毒粒子的主要结构蛋白，髓核由病毒 DNA 分子及与其密切相关的碱性蛋白构成，碱性蛋白同 DNA 紧密结合以维持其复杂的超螺旋结构。

目前已有多种杆状病毒基因组的全序列已测定完成[Garcia-Maruniak, *et al.*, 2004; Lauzon, *et al.*, 2004]。其中研究的最为深入的是 AcMNPV 和 BmNPV 基因组，二者基因同源性相当高。根据杆状病毒基因的功能，将其大致分为如下几类：病毒 DNA 复制相关基因、病毒基因表达调控基因、病毒结构蛋白基因和与宿主细胞相互作用的基因如表 2.1。在病毒的发育循环中，DNA 复制是中心环节，但病毒的基因组织 (gene organization) 较为复杂，基因组的不同区域具有功能分化，基因的分布尚无规律可循。

表 2.1 杆状病毒有功能的基因

Table 2.1 functional gene of baculovirus

病毒基因的功能	病毒基因
病毒 DNA 复制相关	<i>dna-pol</i> , <i>lef-1</i> , <i>lef-2</i> , <i>lef-7</i> , <i>p35</i> , <i>p143</i> , <i>pe38</i>
晚期、极晚期基因表达调控	<i>dna-pol</i> , <i>ie-1</i> , <i>ie-2</i> , <i>lef-1~lef-11</i> , <i>p35</i> , <i>p143</i> , <i>p47</i> , <i>p39</i> , <i>pk-1</i> , <i>vlf-1</i>
抗宿主细胞凋亡基因	<i>p35</i> , <i>iap-1</i> , <i>iap-2</i>
宿主昆虫变态相关基因	<i>egt</i>
病毒宿主域相关基因	<i>lef-1</i> , <i>lef-7</i> , <i>p143</i> , <i>gp64</i>

杆状病毒基因组的表达是一个级联事件，早期、晚期和极晚期基因的连续表达对于杆状病毒的有效感染是必需的，早期基因（病毒进入宿主细胞并在病毒复制之前就开始表达的基因）表达的高峰期大约出现在病毒感染后 6-12 h [Friesen. 1997]，此时需要一个“开关”来完成对早期基因所需的宿主细胞来源的聚合酶 到晚期基因依赖的病毒编码 RNA 聚合酶的转变。晚期及极晚期基因启动子具有独特的 TAAG 基序[Morris and Miller. 1994]。一些早期基因作为晚期表达因子 (late expression factors, LEFs) 对许多晚期基因和极晚期基因的表达是必需的，它们通过三种不同的方式影响晚期基因的表达：一些 LEFs 直接参与晚期基因自身的转录；另外的是 DNA 复制基因，其影响晚期基因表达仅因为 DNA 复制对于晚期转录是必需的；其它的基因，如抗凋亡基因 *p35*，则是通过延长宿主细胞的存活而保证 DNA 的复制及晚期基因的表达（表 2.2）[Hefferon. 2004]。

表 2.2 已鉴定的晚期表达因子基因

Table 2.2 confirmed late expression factor gene

基因	大小(kD)	表达时期	复制(R)/ 转录(T)	可能的功能
<i>LEF-1</i>	30.8	early	R	primase
<i>LEF-2</i>	23.9	late	R	primase-binding protein
<i>LEF-3</i>	44.5	early	R	SSBP

<i>LEF-4</i>	53.9	early	T	CAP-binding protein; RNA polymerase complex
<i>LEF-5</i>	31.0		T	transcription initiation factor
<i>LEF-6</i>	20.4	early, late	T	unknown
<i>LEF-7</i>	26.6	early	R	possible SSBP
<i>LEF-8</i>	101.8	early	T	RNA polymerase complex
<i>LEF-9</i>	59.3		T	RNA polymerase complex
<i>LEF-10</i>	8.7	early	T	unknown
<i>LEF-11</i>	13.1		T/R	unknown
<i>LEF-12</i>	21.0		T	unknown
<i>IE-1</i>	66.9	early, late	R	Transactivation; hr-binding protein
<i>IE-2</i>	47.0	early	R	Transactivation; Cell-cycle control
<i>P143</i>	143.2	early, late	R	helicase
<i>DNApol</i>	114.3	early	R	DNA polymerase
<i>P35</i>	34.8	early, late	R	inhibitor of apoptosis
<i>P47</i>	47.5	early	T	RNA polymerase complex
<i>39K</i>	31.3	early, late	T	unknown

### 2.3.1 参与病毒 DNA 复制的 LEFs

瞬时表达实验证明 AcMNPV 中已鉴定的 19 种 LEFs 中有 10 种参与了病毒 DNA 的复制, 分别是 *lef-1* ~ *lef-3*、*lef-7*、*p143*、*DNApol*、*ie-1*、*ie2* 和 *p35*, *lef-11* 同时参与了病毒 DNA 的复制和转录。其中 *lef-1* ~ *lef-3*、*p143*、*DNApol* 和 *ie-1* 是 DNA 复制的必需基因[Kool, *et al.*, 1994; Lu and Miller. 1995], *lef-7*、*ie2* 和 *p35* 是促进 DNA 复制的基因[Rapp, *et al.*, 1998]。

#### *lef-1*、*lef-2*

*lef-1* 编码一个 30.8 kD 蛋白, 具有保守的引物酶基序和 C-末端 NTP 结合保守基序[Passarelli and Miller. 1993]。*lef-2* 编码 23.9 kD 的蛋白, 与其它已知的基因没有序列同源性或相似的功能基序。删除富含半胱氨酸的 C-末端, *lef-2* 则失去了转录激活作用[Sriram and Gopinathan. 1998]。Merrington 等通过定点突变实验证明 *lef-2* 具有调控 DNA 复制及极晚期基因表达两方面的独立功能[Merrington, *et al.*, 1996]。利用酵母双杂交系统及 GST 融合亲和实验, Evans 与 Rohrmann 证明 *lef-1* 和 *lef-2* 可相互作用, 其作用结构域位于 *lef-2* 的 20-60 位的氨基酸残基区域, LEF-2 是 LEF-1 的配体因子[Evans, *et al.*, 1997]。

#### *lef-3*、*p143*

*lef-3* 编码一单链 DNA 结合蛋白 (single-strand binding protein, SSBP), 分子量为 44.5 kD, 在 N 端具有推测的单链 DNA 结合保守序列[Li, *et al.*, 1993], 能够根据条件的不同而使 DNA 去折叠或退火[Mikhailov, *et al.*, 2005]。杆状病毒 P143 具有与解旋酶蛋白相似的功能域结构。氨基酸序列分析表明 P143 中具有 7 个保守区(包括 NTP 结合区、DNA 解旋功能区、DNA 结合保守区等)[Lu and Carstens. 1991]。LEF-3 能够与解旋酶 P143 相互作用, 介导其定向迁移至核内[Evans, *et al.*, 1999;

Wu and Carstens. 1998]。

### *ie-1* 和 *DNApol*

*ie-1* 基因是目前研究最多的杆状病毒调节基因。在病毒基因复制的表达调控方面起着核心作用, 调控着包括自身在内的所有早期基因启动子, 通过直接与被激活基因邻近的增强序列结合而实现对早期基因的激活[Choi and Guarino. 1995]; 对于晚期基因的调控作用则一般是非增强序列依赖型的[Kovacs, *et al.*, 1992]。杆状病毒 *DNApol* 分子量为 114.3 kD, 其宿主特异性不高, 从目前已鉴定出的数个杆状病毒 *DNApol* 来看, 其同源性较高, 包括多个保守的功能区, 均具有催化合成及在合成过程中进行校正的功能[Hang and Guarino. 1999; Todd, *et al.*, 1996]。

### *Lef-7*、*ie2* 及 *p35*

这三个基因产物是非必需的但均能刺激杆状病毒 DNA 复制。*lef-7* 是一个早、晚期均能表达的基因, 包括两个单链 DNA 结合保守区。在 C 端有一富含半胱氨酸的锌指基序。LEF7 蛋白能够刺激晚期和极晚期基因的转录, 但不能刺激早期基因的转录[Chen and Thiem. 1997; Morris, *et al.*, 1994]。*ie2* 基因是一个极早期基因, 含有一种双锌指基序和一个 C-末端亮氨酸拉链。其转录受 IE-1 负调控, 具有自我正调节功能。IE2 通过和某些转录因子结合而促进其它早期、晚期和极晚期基因的表达[Prikhod'ko, *et al.*, 1999; Yoo and Guarino. 1994a; Yoo and Guarino. 1994b]。*p35* 基因的主要功能是抑制病毒介导的细胞凋亡[Clem, *et al.*, 1991; Clem and Miller. 1994], 但大量的 P35 蛋白则能够调节杆状病毒 DNA 复制及晚期基因的表达[LaCount and Friesen. 1997]。

## 2.3.2 参与病毒 DNA 转录的 LEFs

杆状病毒早期基因转录向晚期基因转录过渡是通过病毒介导的 RNA 聚合酶来实现的[Grula, *et al.*, 1981]。通过瞬时表达分析及体外转录系统等方法鉴定了参与病毒 DNA 转录的 LEFs, 缺失 LEFs 会影响稳定的 RNA 水平, 其中有 9 个 LEFs 是报告质粒复制所必需的[Todd, *et al.*, 1995]。

### RNA Polymerase

杆状病毒 RNA 聚合酶是由四个等量的病毒编码的亚单位构成的四亚基复合酶, 这是目前所知的来自于真核生物的最简单的 RNA 聚合酶。通过构建一个不含胞嘧啶的转录模板与晚期或极晚期启动子结合, 同时提供来自于部分纯化的病毒感染细胞核抽提物组分, 鉴定了构成 RNA 聚合酶复合体的主要病毒基因成分为晚期表达因子 LEF-4、8、9 和 P47 [Guarino, *et al.*, 1998]。通过 N-末端氨基酸序列测定鉴定最小的两个亚单位分别为 LEF-9 和 P47, 通过蛋白指纹技术鉴定 55 kD 蛋白为 LEF-4, 而最大的亚单位 LEF-8 则是利用 Western blot 分析鉴定的。根据基因中存在的保守序列推测 LEF-8 和 LEF-9 为 RNA 聚合酶的活性亚基[Iorio, *et al.*, 1998; Titterington, *et al.*, 2003]。免疫共纯化分析显示 LEF-8 与 LEF-9 能够在体内结合[Acharya and Gopinathan. 2002]。LEF-4 在杆状病毒 RNA 聚合酶亚基组成中起骨架作用或者有其它未知的功能[Okano, *et al.*, 2006], Guarino 等从 AcMNPV 感染的昆虫细胞中纯化获得了 DNA 依赖的 RNA 聚合酶, 该酶能保证含有 TAAG 基序

的晚期及极晚期启动子的正确转录,但对早期启动子无活性,说明该酶具有完整的启动子识别功能[Guarino, *et al.*, 1998]。突变分析显示 RNA 聚合酶进行终止或多聚嘌呤化不需要 poly(A)信号,体外转录分析则显示晚期病毒 mRNAs 3'末端含有 RNA 聚合酶复合体固有特性的终止信号,既 RNA 聚合酶识别球蛋白分裂或多聚嘌呤化序列中的 T-富集区终止信号[Jin and Guarino. 2000]。

### *lef-4~lef-6*

LEF-4 是 RNA 聚合酶的亚基之一,具有 RNA 5'核苷三磷酸酶的作用,同时能够参与 RNA 帽子结构的形成,还具有核苷三磷酸酯酶和 ATPase 的活性[Gross and Shuman. 1998; Jin, *et al.*, 1998]。LEF-4 定位于核内,并与病毒发生基质有关[Durantel, *et al.*, 1998]。*lef-5* 是通过瞬时表达分析最先鉴定出来的参与 AcMNPV 晚期基因表达的基因[Passarelli and Miller. 1993]。LEF-5 能够自身相互作用,且在 LEF-5 的 C-末端具有一个潜在的 RNAPol 延伸因子同源物,其中的酸性残基能够无选择性的刺激来自于晚期和极晚期启动子的 RNA 聚合酶的转录活性[Harwood, *et al.*, 1998]。Guarino 等证明 LEF-5 的作用为起始因子而非延伸因子[Guarino, *et al.*, 2002a]。LEF-6 拥有一个序列基序与牛痘 RNA 聚合酶中的保守基序类似[Passarelli, *et al.*, 1994]。缺失 LEF-6 的病毒在 Sf9 细胞中其复制周期延缓,但能够复制[Lin and Blissard. 2002a]。

### *lef-11、lef-12*

LEF-11 位于被感染细胞核内[Lin, *et al.*, 2001]。通过构建 LEF-11 缺失的病毒证明该基因既参与了病毒 DNA 的复制,又与晚期和极晚期基因转录有关[Lin and Blissard. 2002b]。LEF-12 与其它基因没有序列同源性[Rapp, *et al.*, 1998]。利用 LEF-12 突变病毒证明该基因对病毒 DNA 复制及晚期基因表达是非必需的[Guarino, *et al.*, 2002b]。

## 2.3.3 其它转录 LEFs

虽然已经证明其它的 LEFs 对晚期基因表达的作用,但其在转录中的具体作用所知甚少[Lu and Miller. 1994; Todd, *et al.*, 1996]。*P39* 编码一个定位于病毒基质中的磷蛋白;*lef-10* 与其它基因没有明显的同源性,可能在转录过程中发挥辅助因子的作用。

另外, BmNPV 中鉴定出的 18 种 *lef* 基因在基因组上的位置与在 AcMNPV 中相似。它们编码的 LEF 蛋白的氨基酸序列同源性高达 73-98%。对在 *lef* 基因中插入 *lacZ* 基因,并缺失 *39k*、*ie2*、*lef7* 和 *p35* 的缺失病毒的研究证明其它 14 种 *lef* 基因是 BmNPV 复制的必需基因。进一步分析发现缺失 *lef7*、*p35* 和 *ie2* 导致病毒 DNA 复制水平降低。据此推测这三种基因产物可能对 DNA 复制有激活效果。缺失 *39k* 基因则显著降低晚期基因的表达及芽病毒的产量证明,*39k* 基因不影响 DNA 复制,但参与晚期基因转录[Gomi, *et al.*, 1997]。

## 2.4 杆状病毒基因启动子的研究意义

病毒启动子的研究为了解真核生物基因转录调控提供了模型。应用病毒的启动子和增强子等基因转录调节原理构建各类基因工程载体(包括克隆、表达、检测、基因治疗载体),可有效提高目的转录、表达效率,还可通过抑制细胞内存在的特异性病毒反式激活蛋白,寻找抗病毒治疗的新途径。转录因子也是设计各种新药的重要基础之一。如用反义寡核苷酸与相应的启动子或增强子结合,可抑制病毒某些基因的表达而起到抗病毒治疗的目的。

病毒基因有效转录并非专一的顺式、反式作用因子相互作用的结果,常是多种 DNA 结合蛋白与 DNA 之间以及 DNA 结合蛋白与其他蛋白质互相作用的结果。因而不能孤立地看待病毒某个启动子或增强子在基因转录调控中的作用。

启动子和增强子作用机制尚不很清楚。目前对真核基因启动子作用的机制有两种解释[Krumm, *et al.*, 1993]: RNA 聚合酶首先与基因 5'上游较远端的作用位点相结合,然后移向起始区;染色质的次级结构可能使某些线性 DNA 链上有一定距离的位点聚合在一起。增强子作用机制有以下几种假说;增强子为转录因子提供进入启动子区的位点;增强子可改变染色质或 DNA 的构象,即增强子作用机制的拓扑模型;增强子模块化作用模型。

泛素系统广泛存在于真核生物,对调节细胞内蛋白周转,参与细胞多种生命过程均有重要作用。相对于 *polh*、*p10*、*egt* 等昆虫杆状病毒基因,人们对杆状病毒泛素基因的研究较少。从目前的研究资料看,昆虫杆状病毒泛素在病毒感染宿主细胞时,与宿主细胞的泛素体系之间存在着复杂的相互作用。对昆虫杆状病毒泛素基因的结构、功能的研究,不仅对了解昆虫杆状病毒的进化,病毒与宿主之间的相互作用具有重要的理论意义,且对于开发新型基因工程杆状病毒杀虫剂在实践上将起到深远的影响。

基因的表达受多个水平层次的调控,转录调控是最主要的一个环节,启动子是一种顺式作用(*cis-acting*)正调控元件,其强弱决定基因转录水平的高低,而启动子及其侧翼区的调控元件对基因的表达与否、表达量起到决定性的作用。泛素启动子在真核细胞中的强启动子作用不仅与其核心区域的多种转录因子有关,也与其 5'UTR 的内含子的调控作用密不可分。另外,泛素启动子的部分活性与泛素在细胞中的正常功能有关。真核细胞中,泛素主要用于降解不正常或折叠错误的蛋白,并对组蛋白进行修正,激活基因进行表达,这些作用与病毒性启动子所受负调节相反,有利于激发启动子的活性,实现持续性表达[Ciechanover, *et al.*, 2000a; Ciechanover, *et al.*, 2000b]。由于泛素启动子具有高效启动转录的作用,且基本不受组织细胞的限制,因此能够广泛用于基因治疗载体的构建,并在增强基因表达的长期性、稳定性等方面具有显著功效。通常,一些启动子/增强子只能在有限的组织细胞内发挥作用,在另一些细胞内,它们将失去作用或作用不明显。而泛素基因启动子则能在绝大多数的组织细胞中发挥强有力的转录控制作用,从而获得目的基因的长期高效表达。泛素系统广泛存在于真核生物,对调节细胞内蛋白周转,参与细胞多种生命过程有重要作用,其基因家族中的泛素启动子更是在增强基因表达的长期性,稳定性等方面有显著功效。因而,对它的研究具有很强的现实意义。

病毒基因结构与功能和表达调控的研究是分子生物学领域的热点之一。其核心内容是揭示病毒基因组的复制机理以及早期基因对晚期基因的调控机制。杆状病毒基因的表达是以极其复杂的方式在转录与翻译水平上调控的。由于病毒基因可转录成一组重叠且不拼接的 RNA，其 5' 或 3' 端甚至方向或转录时间顺序上各有不同，病毒基因的表达可通过启动子封堵(promoter occlusion)、反义 RNA 或多顺反子翻译(poly-cistronic translation) 的途径调控。在宿主细胞因子或病毒自身编码的反式激活因子的作用下，病毒基因组以级联式(cascade) 进行时序性表达(temporal expression)。对参与杆状病毒晚期基因表达的病毒基因的鉴定，是研究病毒转录和 DNA 复制的关系以及参与晚期基因转录的 RNA 聚合酶的重要步骤。对这些病毒因子的认知为建立体外研究病毒 DNA 复制及晚期基因转录提供了一种直接的方法。本研究对了解昆虫杆状病毒的进化，病毒与宿主之间的相互作用具有重要的理论意义，且对于开发新型基因工程杆状病毒杀虫剂和构建新的外源基因高效表达载体在实践上将起到深远的影响。

## 第三章 材料和方法

常规试剂的配方参考《分子克隆实验指南》[Sambrook, *et al.*, 1992]。

### 3.1 细胞的冻存、复苏、传代及病毒繁殖

主要为家蚕 *Bm* 细胞株和秋粘虫 *Sf21* 细胞株。按照 Summers 手册进行[Summers and Smith, 1987]。

#### 3.1.1 冻存

用弯头吸管吹打贴壁细胞, 转移入 15 mL 离心管中, 1 000 g 离心 10 min, 弃上清, 加入一定体积的 TC-100 培养基重悬细胞, 用血球计数板计数, 使细胞的密度达到  $0.5-1.0 \times 10^7$  细胞/mL, 加入等体积的用于冻存的新鲜培养基(完全培养基中含 20% DMSO, 过滤除菌), 使 DMSO 最终浓度为 10%。将细胞悬浮液转移至冻存管中(通常为每管放 1 mL), 然后将冻存管置于塑料泡沫盒中, 缓慢冷冻细胞。先放入 -20 °C 冰箱中 1 h, 再转移至 -80 °C 冰箱中过夜, 最后将冻存管置于液氮瓶中。

#### 3.1.2 复苏

迅速取出液氮中冻存的细胞, 置于 37 °C 水浴中, 轻轻摇动, 待冻存液完全融化后, 将之转移入 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 并逐滴加入至少 5 倍体积的新鲜的冷(4 °C)的 TC-100 培养基(含 10% FBS, 100 µg/mL 链霉素, 50 µg/mL 青霉素), 让细胞在室温下贴壁 1 h, 再将之置于 27 °C 培养箱中培养 2-3 h 使细胞贴壁后, 更换培养基。根据细胞生长状况, 进行换液或传代。

向待传代的细胞瓶中加入新鲜培养基, 用弯头吸管吹打贴壁细胞, 使其脱落, 按照 1:2-3 的比例(根据细胞密度)将细胞悬浮液转移至新培养瓶中, 补加 1/2 体积新鲜的 TC-100 完全培养基。

家蚕杆状病毒(*BmNPV*)和苜蓿尺蠖核型多角体病毒(*AcMNPV*)分别感染 *Bm* 细胞和 *Sf21* 细胞进行传代繁殖。

### 溶液配方：

1、**1×TC-100 细胞培养液** 按 Gibco BRL 公司产品说明书进行。将 1 个包装(1×1L)TC-100 粉剂边搅拌边加到 ddw 中,加 0.35 g NaHCO<sub>3</sub>,用 5 mol/L NaOH 缓慢调 pH 至 6.22,调节渗透压,定容至 1 L,在消毒滤器中,将培养基通过 0.22 μm 消毒滤膜加压过滤除菌;

2、**1×TC-100 完全培养基** :1×TC-100 细胞培养液补加 FBS 和抗生素。FBS 保存于-20℃,使用前融化,并经 56℃ 水浴保温 30 min 使补体灭活,然后按 10%加入上述配制的 1×TC-100 培养基中。链霉素终浓度为 100 μg/mL,氨苄青霉素为 50 μg/mL。

## 3.2 PCR 反应

### 3.2.1 病毒基因组模板

取野生病毒感染的细胞培养液 150 μL 于 eppendorf 管中;加入 0.2 mol/L NaOH 150 μL,混匀后静置 5 min;加入 8 mol/L NH<sub>4</sub>Ac 溶液 20 μL,混匀后静置 5 min;加入等体积酚充分混合,5000 rpm 离心 5 min,取上清;用等体积氯仿抽提一次,离心取上清;加入 1/10 体积 5 mol/L NaAc (pH 6.5)、2 倍体积无水乙醇,冻存 2 h 后离心,沉淀用 75%乙醇洗一次;阴干后加入 40 μL 0.1×TE Buffer。做 PCR 时取 1 μL 作为模板。

### 3.2.2 质粒模板

以含有目的片段的质粒 DNA 做模板,一般将质粒 DNA 适量稀释,使 PCR 时取模板 DNA 的量约为 20 ng。

### 3.2.3 普通 PCR 反应体系

100 μL 反应体系中,10×Taq 或 Pfu buffer 10 μL,10 mM dNTP 2 μL,一定量的模板 DNA (质粒 DNA 约 20 ng,基因组 DNA 约 500 ng),20 pm 引物(两条),1.5 U Taq 酶或 2 U 的 Pfu 酶,加 ddw 使总体积为 100 μL。

### 3.2.4、普通 PCR 反应条件

95℃, 模板变性 5 min ; 94℃ 1 min , 55℃ 1 min (退火温度根据引物的  $T_m$  值等进行设定), 72℃ 1 min (时间根据目的片段的长度及所用聚合酶设定), 30 个循环; 72℃, 延伸 10 min。

### 3.2.5、定点突变 PCR

在需要突变的位置设计两条引物, 使突变碱基位于引物的中部, 分别与原始片段两端的引物配对进行 PCR 扩增后, 纯化回收合成片段。在高保真 *pfu* DNA 聚合酶的作用下, 两个片段进行退火, 加入原始片段两端的引物重新 PCR, 电泳回收目的条带进行常规操作。

## 3.3 限制性内切酶反应

参照产品目录中各种酶的推荐条件, 反应体系包含质粒 DNA 1-2  $\mu\text{g}$ , 1/10 体积的 10 $\times$  酶反应缓冲液, 酶量为 2-4 U/ $\mu\text{g}$  DNA, 反应体积一般为 20  $\mu\text{L}$ 。在合适条件 (一般为 37℃) 下, 反应 1-2 h, 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切是否完全。

## 3.4 玻璃奶法纯化回收 DNA 片段

用普通凝胶进行电泳, 切下所需 DNA 条带, 称重后放入 Eppendorf 管中, 加入 3 倍体积 (v/w) 的 6 mol/L NaI 溶液, 37℃ 下使凝胶充分溶解, 再加入 10  $\mu\text{L}$  玻璃奶吸附 DNA, 室温下放置 5 min, 稍离心 5 s, 去上清, 沉淀用 New Wash 洗液洗涤一次, 重复离心、洗涤两次, 晾干后用 30  $\mu\text{L}$  0.1  $\times$  TE Buf 溶解 DNA, 离心后取上清, 将 DNA 保存于 -20℃ 备用。

#### 溶液配方:

1、6 mol/L NaI: 将 0.75 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  溶于 40 mL ddw 中, 加入 45 g NaI 并搅拌至完全溶解。用 Whatman 滤纸或 NC 膜过滤, 在暗处储存;

2、玻璃奶 (Glassmilk): 将 10 g (100 mg/mL, Sigma S-5631) 的 Silica 溶于 100 mL PBS 中, 沉淀 2 h, 弃上清, 重复该步骤 2-3 次; 2 000 g 离心 2 min, 将沉淀物溶于 3 mol/L 的 NaI 中, 终浓度为 100 mg/mL, 4℃ 下避光保存;

3、New Wash 洗液: Tris-Cl (pH 7.4) 20 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; NaCl 100 mmol/L; 与等

体积的无水乙醇配制而成。

### 3.5 DNA 的连接

连接总体积一般为 10  $\mu$ L, 外源片段与载体的克分子比为 2-3:1, 10  $\times$  T4 DNA 连接缓冲液 1  $\mu$ L, 若为粘末端连接, 加 T4 DNA 连接酶 1  $\mu$ L, 14-16  $^{\circ}$ C 连接 8 h 以上; 若是平头连接, 应加 2  $\mu$ L T4 DNA 连接酶, 18-22  $^{\circ}$ C 连接过夜。

### 3.6 荧光素酶报告质粒的构建

根据 Genbank 登陆的杆状病毒泛素基因上游已知序列设计引物, 分别从 AcMNPV 或 BmNPV 基因组 DNA 中扩增不同长度的泛素基因上游序列。玻璃奶回收 PCR 产物, 用 *Bam*H / *Eco*R 酶切灭活后, 与同样酶切的 pGEM-3Z 载体连接, 插入片段和质粒的摩尔数比约为 10:1, 测序正确后, 构建质粒命名为 p595ubi。以适当稀释的 p595ubi 质粒为模板, 进行启动子中保守基序突变的 PCR 反应, 将目的片段同样插入 pGEM-3Z 载体并测序。将 *Bam*H 酶切回收的 *luciferase* 基因片段插入到测序正确的质粒中, 使位于启动子序列的下游, 通过合适的酶切位点 (*Xba*) 鉴定报告基因的插入方向。

### 3.7 大肠杆菌感受态细胞的制备和质粒转化

#### 3.7.1、少量制备

-70  $^{\circ}$ C 冻藏的 DH10B 甘油菌在 LB 平板上复苏。挑取单菌落(直径约 2-3 mm), 放入 3 mL LB 培养基中(不含 Amp), 37  $^{\circ}$ C 振荡培养 7 h, 取 100  $\mu$ L 培养物接种到另一 3 mL LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C 振荡培养 2-3 h, 使 O.D. 值在 0.6 左右。3 800 r/min 离心 5 min 收集菌体, 将菌体重悬于 800  $\mu$ L 75 mmol/L 的冷  $\text{CaCl}_2$  溶液中, 冰浴 30 min, 3 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 200  $\mu$ L 75 mmol/L 冷的  $\text{CaCl}_2$  溶液, 轻轻敲打管壁, 使混合均匀, 冰上放 2 h 用于转化。

### 3.7.2、批量制备

-70℃ 冻藏的 DH10B 甘油菌在 LB 平板上复苏。挑取单菌落(直径约 2-3 mm),放入 3 mL LB 培养基中(不含 Amp), 37℃ 振荡培养 7 h, 取 1 mL 按照 1%稀释的比例接种新鲜的 LB 液体培养基, 37℃ 振荡培养 2-3 h 后, 培养基收集在灭菌的离心管中, 3 800 r/min 4℃ 离心 5 min, 将菌体重悬于 20-30 mL 75 mmol/L 的预冷  $\text{CaCl}_2$  溶液中, 冰浴 30 min, 3 800 r/min 低温离心 5 min, 弃上清, 加入 10 mL 含 10%甘油的 75 mmol/L 冷  $\text{CaCl}_2$  溶液, 轻轻敲打管壁, 使混合均匀, 冰上放 2 h 后分装小管, -70℃ 冻存。

### 3.7.3、质粒转化

质粒 DNA 0.5-1 ng 或连接混合物 5  $\mu\text{L}$  加到 100  $\mu\text{L}$  上述制备的感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰浴 30 min。再进行热休克(42℃ 保温 2 min 或 37℃ 保温 5 min), 迅速置冰上 1.5 min, 加入 1 mL 37℃ 温育的 LB 液体培养基, 37℃、小于 225 rpm 振荡培养 1 h, 稍离心, 去部分上清后涂布于含 100  $\mu\text{g/mL}$  Amp 的 LB 平板上, 37℃ 倒置过夜培养。

## 3.8 质粒 DNA 抽提

### 3.8.1、小量抽提

挑取单菌落接种于含 Amp (100  $\mu\text{g/mL}$ ) 的 3 mL LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养过夜。取 1.5 mL 过夜培养物于 Eppendorf 管内, 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 弃上清。用 150  $\mu\text{L}$  Sol 悬浮沉淀, 冰浴 5 min; 加 300  $\mu\text{L}$  Sol, 再加入 150  $\mu\text{L}$  氯仿, 轻轻倒转混匀后冰浴 5 min; 加 450  $\mu\text{L}$  Sol, 倒转混匀后冰浴 15 min。12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 加 0.6 倍体积异丙醇, 混匀后于 4℃ 放置 20 min。12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀溶于 250  $\mu\text{L}$  TER (含 20  $\mu\text{g/mL}$  RNaseA 的 TE)中, 37℃ 消化 20 min, 加入 350  $\mu\text{L}$  PPT Buffer, 混匀后置 4℃ 20 min; 12 000 r/min 离心 6 min, 弃上清, 70%乙醇洗一次, 真空干燥沉淀, 用 100  $\mu\text{L}$  0.1  $\times$  TE Buffer (pH 8.0)溶解, -20℃ 保存备用。

### 3.8.2、大量抽提

单菌落接种 3 mL 液体 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 取培养液按 0.1% 接种于 100 mL LB (含 Amp 100 µg/mL) 中, 37℃ 振荡培养过夜。

5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 3 mL Sol I 振荡悬浮沉淀, 冰浴 20 min; 加 6 mL Sol II, 再加 500 µL 氯仿, 轻轻倒转混匀后冰浴 15 min; 加 9 mL Sol II, 剧烈振荡后冰浴 20 min。

12 000 r/min 离心 10 min, 上清加 0.6 倍体积异丙醇, 混匀后于 4℃ 放置 20 min。

12 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 1 mL TER (含 20 µg/mL RnaseA 的 TE) 溶解, 37℃ 消化 15-30 min, 加等体积苯酚、苯酚: 氯仿/异戊醇 (25:24:1)、氯仿各抽提一次。

加入 1/3 体积的 8 M NH<sub>4</sub>Ac、0.6 倍体积的异丙醇混匀, 室温静置 20 min, 12 000 r/min 离心 10 min 沉淀 DNA, 用 75% 冷酒精洗沉淀一次, 稍晾干。

用 0.7 mL 1× TE buf 溶解沉淀, 加入等体积的 1.6 M NaCl 溶液 (含 13% PEG) 中, 室温静置 20 min, 12 000 r/min 离心 10 min 沉淀 DNA, 用 75% 冷酒精洗沉淀一次, 稍晾干。

用 0.45 mL 1× TE buf 溶解沉淀, 加入 1/10 体积的 3 M NaAc (pH 6.5) 和 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 沉淀 DNA 2 h 以上, 12 000 r/min 离心 10 min, 用 75% 乙醇洗涤一次, 真空干燥沉淀。

沉淀溶于一定体积的 1× TE buf 中, 测定 O.D.260 和 O.D.280 值, 计算 DNA 的浓度和纯度。

#### 溶液配方:

1、**溶液 I (Sol I)**: 葡萄糖 50 mmol/L; Tris-HCl 25 mmol/L; EDTA (pH 8.0) 10 mmol/L。混合均匀后, 高压灭菌;

2、**溶液 II (Sol II)**: NaOH 0.2 mol/L; SDS 1%;

3、**溶液 III (Sol III)**: 5 mol/mL KAc 80 mL; 冰乙酸 12 mL; ddw 8 mL;

4、**TER 溶液**: 胰 RNase (RNase A) 溶解于 10 mM Tris-Cl、15 mM 的 NaCl 中, 配成 10 mg/mL 的储存液-20℃ 冻存, 再用 1× TE buf 稀释成 20 µg/mL 的工作液 4℃ 保存;

5、**PPt Buffer**: 异丙醇 22 mL; 5 mol/mL KAc 1 mL; ddw 2 mL;

6、**PEG 溶液**: 称取一定质量的 NaCl, 配成 1.6 M 的盐溶液, 加入一定量的 PEG, 使其终浓度为 13%。

## 3.9 病毒基因组文库的构建

### 3.9.1、基因组 DNA 的提取

收集野生型病毒感染的细胞培养液或感染的家蚕血淋巴, 5 000 r/min 离心 10 min, 除去细胞沉淀 (若仍有悬浮物可将上清再离心一次), 上清 25 000 rpm 超速离心 1 h, 用 1 mL 游离病毒抽

提液悬浮病毒粒子,加蛋白酶 K 至终浓度 50  $\mu\text{g/mL}$ , 50 $^{\circ}\text{C}$  保温 2 h;再加入 35%的 Sarkosyl 至终浓度 1%,继续于 50 $^{\circ}\text{C}$  保温 2 h。分别用等体积的饱和酚、苯酚:氯仿(1:1)、氯仿各抽提一次,5 000 rpm 离心 5 min,将上层水相转入新管中,添加 1/10 体积的 3 mol/L NaCl (pH 6.5), 2 倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 3.9.2、基因组 DNA 的部分消化和片段的回收

用 *Sau3A* 酶进行酶解 (*Sau3A* 只识别四个碱基,且酶切所产生的粘端与 PUC19 载体 *Sal* 的粘端匹配),先进行一系列预实验来确定产生 5 kb 左右片段的最佳酶量。酶切完成后,对 DNA 进行苯酚/氯仿抽提,乙醇沉淀,用 200  $\mu\text{L}$  TE 重溶后进行电泳。回收约 5 kb 左右的条带。

### 3.9.3、连接,转化及扩增

将回收的 DNA 片段与 *Sal* 酶切的 pUC19 载体连接后转化大肠杆菌,挑取单菌落穿刺接种于新的 LB 固体平板上,保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

挑取扩增的单菌落接种于 LB 液体培养基,抽提质粒 DNA,重溶于 TE buffer 中, -20 $^{\circ}\text{C}$  保存。

## 3.10 质粒 DNA 的转染

以  $0.5-1 \times 10^6$  cells/ml 的密度接种细胞于 15  $\text{cm}^2$  细胞培养瓶中, 27 $^{\circ}\text{C}$  培养过夜,使细胞完全贴壁生长。转染前把含胎牛血清的细胞培养液倒出,用 1.5 mL 无血清培养液洗细胞两次,加入 1.5 mL 无血清培养液。用脂质体 lipofectin 介导质粒的细胞转染液包括 1  $\mu\text{g}$  荧光素酶报告质粒、0.5  $\mu\text{g}$  内源参照质粒,加 ddw 到 50  $\mu\text{L}$ ,最后加入 5  $\mu\text{L}$  脂质体,混匀后室温静置 15 min,把转染液均匀地释放到无血清培养液中转染细胞,3 h 后在培养基中加入病毒母液(MOI = 0.5),感染 1 h。倾去旧培养基,加入 3 mL 含血清的完全培养基,再 27 $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 后收集细胞。如果进行两种质粒的共转染则两种质粒都为 1  $\mu\text{g}$ ,加上内源参照质粒,补加 ddw 到 50  $\mu\text{L}$ ,最后加入 8  $\mu\text{L}$  脂质体。每个转染实验均用含海肾荧光素酶基因的 pRL-CMV 质粒或者含 LacZ 基因 pSK-hsp70-LacZ 质粒共转染以校正萤火虫荧光素酶报告基因的表达,在某些情况下不用校正质粒。每个转染实验均重复三次以上。

#### 溶液配方:

**脂质体 lipofectin**: DDAB 和 DOPE 购自 Sigma 公司。Lipofectin Reagent 为 Gibco BRL 公司产品。6.6  $\mu\text{M}$  的 DDAB 和 13.4  $\mu\text{M}$  的 DOPE (摩尔比为 1:2) 溶解在 1 mL 无水乙醇中,取 142  $\mu\text{L}$  在涡旋振荡的情况下迅速加入到 858  $\mu\text{L}$  灭菌双蒸水中,终浓度为 2 mg/mL, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 3.11 细胞裂解和荧光素酶活性的测定、蛋白质定量

#### 3.11.1、细胞裂解

转染 48 小时后,用弯头吸管将细胞吹下来并转移到 1.5 mL EP 管中。4℃、9 000 rpm 离心 5 min,弃上清。用 1×PBS 1 mL 重悬细胞,4℃、9 000 rpm 离心 5 min。沉淀用 200 μL 1×lysis buf 充分重悬,-20℃冷冻 2 h 以上。冰上缓慢解冻后,4℃、9 000 rpm 离心 5 min,取上清进行荧光素酶活性的测定。

#### 3.11.2、Luciferase 活性测定

当用 pRL-CMV 作为校正质粒时,将一定量的 LAR 底物加入测定管中,再加入一定量的细胞裂解液,混合均匀后测定萤火虫 luciferase 的 cpm 值,再在上述管中加入一定的 Stop&Glo<sup>R</sup> reagent 溶液用以终止萤火虫荧光素酶活性,混合均匀后再用液体闪烁计数器中测定海肾 luciferase 的 cpm 值,用以校正萤火虫 luciferase 活性。

其它情况则加入一定量的荧光素酶分析试剂于测定管中,再加入前述制备的细胞裂解原液或适当稀释的裂解液一定体积,混合均匀后放入液体闪烁计数器中测定萤火虫 luciferase 的 cpm 值,测定温度为 25℃,荧光素酶活力以 15 s 内所释放的光亮子数表示。

#### 3.11.3、蛋白浓度测定

将牛血清白蛋白配制标准浓度的蛋白质(0.5 mg/ml),用酶标仪进行蛋白质定量。取 96 孔点样板 1 块,按照 1 个孔零对照,2 个孔标准蛋白孔,每个待测样品占 2 个孔,计算所需要的孔数,每个孔 G-250 染料 50 μL;在零对照孔中加入 20 μL 0.15M 的 NaCl,每个标准蛋白孔中加入 20 μL 标准蛋白溶液(0.5 μg/μL),每个样品孔中加入 20 μL 细胞抽提物样品,每次加入后用 Tip 头抽吸 2-3 下混匀;用酶联检测仪在 590 nm 波长下测定蛋白质含量。

-半乳糖苷酶活性的测定(1 mL 反应体系) 将 30 μL 细胞裂解液与 3 μL 100×Mg<sup>2+</sup>溶液、66 μL 4 mg/mL 的 ONPG 溶液及 201 μL 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.5)混匀后,28℃保温 10 min。加入 0.5 mL 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止反应。测定 420 nm 波长的吸光值。计算反应样品中的蛋白含量。对照为不加细胞裂解液的其它成分的混合液。

#### 溶液配方:

1、100×Mg<sup>2+</sup>溶液:0.1 mol/L MgCl<sub>2</sub>, 4.5 mol/L β-巯基乙醇与适量的 0.1 mol/L 磷酸钠溶液

混合；

2、**0.1 mol/L 磷酸钠溶液**：41 mL 0.2 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，9 mL 0.2 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  和 50 mL ddw。

### 3.12 细胞总 RNA 的抽提

将培养的细胞倾去培养基，用 0.5 mL Solution D 充分匀浆，加 50  $\mu\text{L}$  2 M NaAc (pH 4.0)，0.5 mL 酚(pH 7.0)，0.1 mL 氯仿/异丙醇(49:1)。颠倒混匀，冰上放置 15 min；4  $^{\circ}\text{C}$  10 000 g 离心 20 min 后，取上层水相(~ 0.5 mL)，加入 0.5 mL 异丙醇混匀，-20  $^{\circ}\text{C}$  放置 1 h 以上；4  $^{\circ}\text{C}$  12 000g 离心 15 min 沉淀 RNA 并干燥；沉淀重溶于 100  $\mu\text{L}$  solution D，加入 10  $\mu\text{L}$  NaAc (pH4.0)，300  $\mu\text{L}$  乙醇，混匀，-20  $^{\circ}\text{C}$  放置 1 h 以上；4  $^{\circ}\text{C}$  12 000g 离心 15min 沉淀 RNA，弃上清后加 70%乙醇 1mL，4  $^{\circ}\text{C}$  12 000g 离心 3 min 并弃上清干燥沉淀，重溶于 30  $\mu\text{L}$  DEPC 处理的 ddw 双蒸水中(如用于 Northern blot，可溶于 0.5% SDS 溶液或试样 buf)；-20  $^{\circ}\text{C}$  短期保存，-70  $^{\circ}\text{C}$  长期保存。

#### 溶液配方：

1、**Solution D**：10 g guanidinium thiocyanate (异硫氰酸胍)，0.106 g sarcosyl (十二烷基肌氨酸钠)，0.7 mL 0.75 M 柠檬酸钠 (pH 7.0)，11.72 mL ddw，65  $^{\circ}\text{C}$  溶解，不能高压灭菌。在 4  $^{\circ}\text{C}$  可保存 3 个月以上。用之前每 1mL 溶液加入 7  $\mu\text{L}$  2-mercaptorthanol (2-巯基乙醇)；

2、**2 M NaAc (pH4.0)**：配 2 M NaAc 溶液用乙酸调 pH 到 4.0；

3、**酚的平衡**：按分子克隆实验指南的方法但最终的 pH 为 7.0 上层为水相也可用商品化的水饱和酚；

4、**DEPC 处理 ddw**：把 1 mL DEPC 加入 1 L ddw 中 37  $^{\circ}\text{C}$  放置 4 h 或室温过夜，高压灭菌使 DEPC 分解。

### 3.13 随机引物法标记杂交探针(用 Takara 随机引物标记试剂盒)

取约 50 ng 的探针模板(胶回收的 PCR 产物或酶切片段)，2  $\mu\text{L}$  随机引物，加 ddw 至终体积为 14  $\mu\text{L}$  沸水煮 10 min 后冰上 5 min 使探针模板变性。把探针模板离心甩一下加入 dNTP(-C)、10  $\times$  Klenow Buf 各 2.5  $\mu\text{L}$ ，5  $\mu\text{L}$  [ $^{32}\text{P}$ ]dCTP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ ) 和 1  $\mu\text{L}$  Exo-free Klenow Fragment，37  $^{\circ}\text{C}$  保育 20 min 后，加入 7  $\mu\text{L}$  yeast tRNA (10 mg/mL)，20  $\mu\text{L}$  10 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ ，48  $\mu\text{L}$  ddw 和 300  $\mu\text{L}$  乙醇-20  $^{\circ}\text{C}$  放置 1 h 以上。4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g 离心 15min，沉淀用 70%乙醇洗一次，干燥后用 82  $\mu\text{L}$  TE 重溶。取 2  $\mu\text{L}$  用探测器测量放射性强度，如果  $>10^5$  cpm/ $\mu\text{L}$  则剩余探针保存在 -20  $^{\circ}\text{C}$  待用。

### 3.14 Northern blot

#### 3.14.1、电泳与转膜

把做好的变性琼脂糖凝胶在  $1 \times \text{MOPS}$  中  $100 \text{ V}$  预电泳。期间,用  $20 \mu\text{L}$  试样 buf 溶解  $30 \mu\text{g}$  RNA,  $65^\circ\text{C}$  保温  $15 \text{ min}$  后冰上放置  $5 \text{ min}$ 。稍离心加入  $2 \mu\text{L}$  上样 buf 和  $1 \mu\text{L}$   $200 \mu\text{g/mL}$  的 EB, 点样后用  $40\text{--}50 \text{ V}$  电泳  $1 \text{ h}$ 。然后  $80 \text{ V}$  电泳至溴酚蓝到胶的  $2/3$ 。(如果室温高于  $15^\circ\text{C}$  要在电泳槽的外部加冰水)。观察 RNA 的电泳质量并拍照。把琼脂糖胶的多余部分切去放到  $300 \text{ mL}$  ddw 中轻摇  $15 \text{ min}$ , 重复两次。预先搭好滤纸桥, 下部转移溶液为  $0.05 \text{ M NaOH}$ , 裁一张与琼脂糖胶大小一致的 Hybond<sup>+</sup> 尼龙膜 (Pharmacia), 两张滤纸和一叠吸水纸。把琼脂糖胶放到滤纸桥上, 上面依次放尼龙膜、滤纸和吸水纸, 再压一个平板和一个约  $100 \text{ g}$  的砝码。转移  $6$  个小时以后把膜取下。在  $0.05 \text{ M NaOH}$  中浸泡  $20 \text{ min}$ 。用  $2 \times \text{SSC}$  洗两次。凉干后  $4^\circ\text{C}$  保存。

#### 3.14.2、杂交、洗膜和冲片

把杂交膜放到塑料膜制成的杂交袋中加入约  $5 \text{ mL}$  预杂交液在  $42^\circ\text{C}$  预杂交  $4 \text{ h}$  以上。把杂交袋中的预杂交液倒出并加入杂交液 (预杂交溶液加上  $^{32}\text{P}$  标记的探针),  $42^\circ\text{C}$  杂交  $16$  小时以上。杂交完毕倒出杂交液, 在室温用  $2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$  和  $0.2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$  各洗脱一次, 然后用  $0.2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$  在  $42^\circ\text{C}$  和  $65^\circ\text{C}$  各洗一次膜, 稍许干燥后用保鲜膜包好置于 X 光片上感光。 $-70^\circ\text{C}$  曝光  $24$  个小时 (曝光时间根据杂交强度确定)。暗室中进行显影定影 (显影定影液配方按照产品说明)。

##### 溶液配方:

1、**鲑鱼精 DNA**: 把鲑鱼精 DNA (Sigma) 用  $0.1 \text{ M NaCl}$  溶液溶解, 用高强度的超声波以震  $10 \text{ s}$ , 间隔  $20 \text{ s}$  的方式重复  $20$  次, 直到溶液不显粘稠状态。用酚/氯仿抽提两次, 乙醇沉淀, 用 TE 重溶, 终浓度为  $10 \text{ mg/mL}$ ;

2、**杂交液**:  $6 \times \text{SSC}$ ,  $1 \text{ mM EDTA}$ ,  $50\% (\text{v/v})$  甲酰胺,  $5 \times \text{Denhart}$ ,  $0.1\% \text{ SDS}$ ,  $100 \mu\text{g/mL}$  鲑鱼精 DNA;

3、 **$5 \times \text{MOPS}$** :  $0.1 \text{ M MOPS}$ ,  $0.025 \text{ M NaAc}$ ,  $0.005 \text{ EDTA}$ ;

4、**试样 buf ( $20 \mu\text{L}$ )**:  $2 \mu\text{L}$   $5 \times \text{MOPS}$ ,  $3.5 \mu\text{L}$  甲醛,  $10 \mu\text{L}$  甲酰胺,  $4.5 \mu\text{L}$  ddw;

5、**上样 buf**:  $50\%$  甘油,  $0.1 \text{ mg/mL}$  溴酚蓝,  $0.001 \text{ EDTA}$ ;

6、**变性胶 ( $50 \text{ mL}$ ,  $1.2\%$ )**: 称  $0.6 \text{ g}$  agarose 加到  $31 \text{ mL}$  ddw 中, 加热溶解后放到  $60^\circ\text{C}$  水浴中。然后加入  $9 \text{ mL}$  甲醛和  $10 \text{ mL}$   $5 \times \text{MOPS}$ , 摇匀后倒胶。

## 第四章 AcMNPV、BmNPV *ubiquitin* 基因启动子的结构与功能分析

### 摘 要

杆状病毒 AcMNPV 和 BmNPV 均编码可能参与病毒感染的泛素蛋白。Northern blot 分析表明泛素基因在病毒感染后 12 h 左右表达量达到高峰,并具有多个转录本。启动子活性分析也表明该基因在病毒感染晚期表达,在病毒因子存在的条件下,瞬时表达分析表明响应病毒因子的顺式作用元件主要位于基因上游 5'端,在 ATG 上游约 187-383 bp 的片段,含有一个杆状病毒晚期基因启动子基序 TAAG 及 CAAT 和 TATA box,也具有启动子的活性。分别对启动子中的 TAAG、CAAT 和 TATA box 定点突变,瞬时表达分析显示,在病毒因子存在的条件下,AcMNPV 和 BmNPV 的泛素启动子中 TATA box 及 TAAG 基序突变可降低启动子的活性,CAAT 突变却可以提高启动子活性。

**关键词** 杆状病毒;泛素基因启动子;瞬时表达分析;启动子分析

杆状病毒是双链闭合的超螺旋 DNA 病毒,其宿主仅限于无脊椎动物。目前已有多种杆状病毒的全基因组序列得到测定,许多基因的结构与功能也得到了阐明。AcMNPV 与 BmNPV 基因组核苷酸序列的相似性约为 70%,保守基因之间的同源性则达到了 90%以上,推测是从同一个病毒祖先进化而来的[Gomi, *et al.*, 1999]。在宿主中,病毒基因表达及病毒 DNA 复制是以一种有序的极联事件发生的。宿主 RNA 聚合酶 介导早期基因的转录,晚期和极晚期基因的转录则需要病毒 RNA 聚合酶及早期基因的产物参与。杆状病毒 AcMNPV 和 BmNPV 编码泛素蛋白,与真核生物泛素的同源性约为 77%。通过对 AcMNPV 芽病毒的研究,Grarino 等认为杆状病毒泛素通过一种异常的磷脂锚定与病毒粒子囊膜结合[Guarino, *et al.*, 1995]。杆状病毒来源的泛素基因并非病毒 DNA 复制所必需,其主要功能可能是通过竞争性的结合泛素活化酶 E1 而调控宿主的免疫系统,从而参与病毒对宿主的侵染[Ghosh, *et al.*, 2003; Haas, *et al.*, 1996]。

总之,杆状病毒来源泛素的研究,对于提高病毒进化及病毒与宿主的相互作用的认识具有重要意义。为了探讨杆状病毒泛素基因的表达调控,我们克隆了 AcMNPV 和 BmNPV 泛素基因的完整启动子,并对启动子区域中的保守启动子元件 TATA box、CAAT 和 TAAG 进行了突变,以萤火虫荧光素酶(*luciferase*)基因为报告基因,并分别在 *Bm* 和 *Sf* 细胞中进行了表达分析。

## 4.1 材料和方法

### 4.1.1 材料

含完整萤火虫荧光素酶基因的质粒 pUL220、AcMNPV 和 BmNPV 病毒、Bm 和 *Sf* 细胞均为实验室保存；各种限制性内切酶、DDAB/DOPE 脂质体、T4 DNA 连接酶、高保真 DNA 聚合酶等为 Gibco-BRL 或 TAKARA 公司产品；GeneClean 试剂盒、荧光素酶检测试剂盒均购自 Promega 公司。

### 4.1.2 方法

#### 4.1.2.1、细胞培养

参照第三章。

#### 4.1.2.2、引物的设计与合成

根据已发表的 AcMNPV 和 BmNPV 基因组全序列，设计并化学合成多对引物，通过 PCR 扩增两种杆状病毒泛素基因的 5'侧翼序列及构建缺失、突变质粒所需要的一系列启动子片段。目的片段扩增所用引物如表 4.1。

表 4.1 本实验中所用引物名称、序列及用途

Table. 4.1 Name and sequence of primers used in the experiment

(A) primers used in promoter deletion analysis

the *Bam*H and *Eco*R sites were italic and underlined.

name	Sequence (from 5' to 3')	purpose
Pubi F1	TGGAATTCGATCGGATAGCGA	Used for 595, 383 and
Pubi F2	CGGAATTCGTGTAACAAAGTCG	124 bp promoter
Pubi F3	TGGAATTCATTGCCGTTGAAGGGAAAT	fragment
Pubi R	TTTGGATCCTTACACTATTACTTATAAATGACAACGG	
Pubi-2 <sup>nd</sup> F	CGGAATTCGTGTAACAAAGTCGACAGCG	Used for 196 bp
Pubi-2 <sup>nd</sup> R	GATGGATCCAAACGACTTAATATAACACC	promoter fragment
Pcore F	AATTCCTTATAAGTAATAGTGTAAG	Used for 26 bp
Pcore R	GATCCTTTTACACTATTACTTATAAG	promoter fragment

(B) primers used in promoter mutation analysis

the mutation sites were italic and underlined.

name	Sequence (from 5' to 3')	purpose
17M R	TTTGGATCCTTACACTATTACT <u>CG</u> TAAATGACAACGG	Used for two TAAG mutation
195M F	GTGGCCCGGTGTTAT <u>CG</u> GTCGTTTGAAAGC	
195M R	GCTTTCAAACGAC <u>CG</u> ATAACACCGGGCCAC	
19M R	TTTGGATCCTTACACTATTACTTA <u>CG</u> AATGACAACGG	Used for two TATA box mutation
269M F	CGTCAGCCTC <u>CG</u> TAATCTCGG	
269M R	CCGAGATTAC <u>CG</u> GAGGCTGACG	
71M F	CGCCTGTTGCAC <u>CG</u> TTCCACCAGCGGTG	Used for two CAAT mutation
71 M R	CACCGCTGGTGGA <u>CC</u> GTGCAACAGGCG	
359M F	GACAGCGAAAC <u>CG</u> TTTATCGTTTTC	
359M R	GAAAACGATAAA <u>CC</u> GTTTCGCTGTC	

#### 4.1.2.3、PCR 反应

分别以 AcMNPV 和 BmNPV ZJ8 株病毒基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应,扩增完整的泛素基因启动子片段。以后的缺失和突变启动子片段的扩增均以此完整启动子片段构建的质粒 DNA 为模板进行 PCR 反应。

#### 4.1.2.4、克隆与测序

按照 GeneClean 方法纯化 PCR 扩增产物,并克隆到 pGEM-3Z 载体中,用 T7 或 SP6 引物进行测序分析。

#### 4.1.2.5、功能质粒的构建

将 PCR 方法扩增的泛素基因启动子片段克隆到 pGEM-3Z 载体中,从 pUL220 质粒 DNA 中用 *Bam*H 酶切并分离纯化 *luciferase* 基因片段,亚克隆到含泛素基因启动子的重组质粒中,使位于该启动子的下游,酶切鉴定插入片段的方向,获得表达质粒。缺失及突变质粒的构建与其类似。

#### 4.1.2.6、转染昆虫细胞

细胞转染操作方法参照第三章。并以未转染细胞作为空白对照。每个实验至少重复三次。

#### 4.1.2.7、瞬时表达分析

转染后 48 h 冰上收集转染细胞,将细胞裂解后测定荧光素酶活性,操作方法参照第三章。

## 4.2 结 果

### 4.2.1 杆状病毒 *ubi* 基因启动子的序列分析

本文根据 Genbank 登录的 BmNPV 和 AcMNPV 基因组全序列,在 *ubi* 基因的 5'端的保守区域设计一对引物,并将该基因的起始密码突变,以构建非融合的表达载体。分别以 BmNPV 或 AcMNPV 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增获得约 600 bp 的启动子特异性条带。纯化并酶解后克隆到载体 pGEM-3Z 的 *Bam*H /*Eco*R 位点,转化 *E. coli* DH10B,对筛选的阳性克隆进行序列测定证明克隆片段为 595 bp,分别命名为 pBmubi595 和 pAcubi595。构建质粒的酶切图谱如图 4.1 所示。

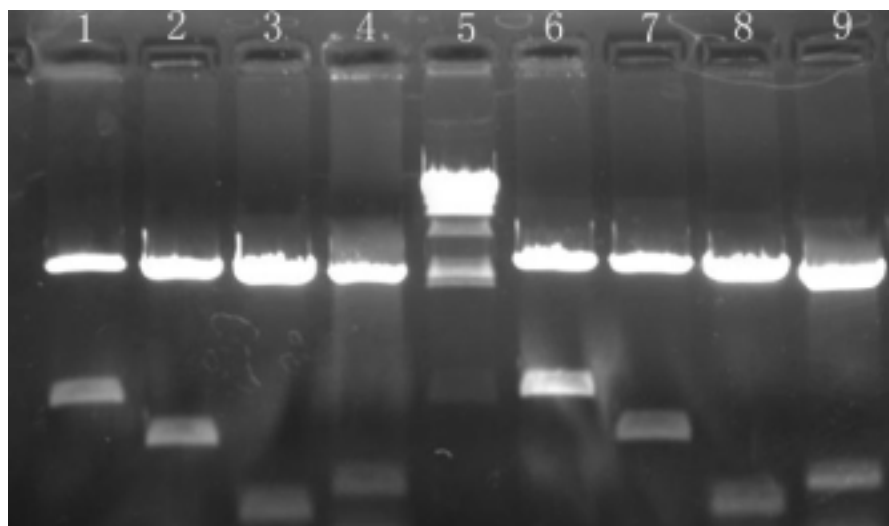


图 4.1 不同长度的启动子片段酶切分析图谱

Fig.4.1 Deletion analysis of Ac and Bm *ubi* gene promoter by *Bam*H and *Eco*R digested.

1 to 4: different length *ubi* gene promoter fragments from AcNPV that is pAcubi595, pAcubi382, pAcubi124 and pAcubi196; 5:  $\lambda$  DNA/ *Hind*III; 6 to 9: different length *ubi* gene promoter fragments from BmNPV that is pBmubi595, pBmubi382, pBmubi124 and pBmubi196.

用 DNA Star 软件分析显示,克隆 BmNPV ZJ8 株来源的 *ubi* 启动子片段与 BmNPV T3 株的相应核苷酸序列同源性的 98.9%,AcNPV 来源的 *ubi* 启动子与 AcMNPV C6 株的相应核苷酸序列同源性的 99.5%,克隆片段二者之间的同源性的 92.8%。用 MatInspector 软件分析,在 AcMNPV 和 BmNPV *ubi* 基因翻译起始位点上游可能存在的主要顺式作用元件有病毒的晚期转录起始位点基序 TAAG(-17 ~ -14 nt, -195 ~ -192 nt), TATA box(-19 ~ -15 nt, -269 ~ -265 nt)及 CAAT(-71 ~

-68 nt、-125 ~ -122 nt、-359 ~ -356 nt) 等。而在 *Ac ubi* 启动子的远端仍具有三个 TAAG 基序, 分别位于-473 ~ -470 nt、-501 ~ -498 nt 及-573 ~ -570 nt (图 4.2)。

Acubi	1	GATCGGATAGCGATTCAAATTTTGTAAGCGTTTGTAGCGCACGTTTGGCATCTTGTTTAA	60
Bmubi	1	GATCGGATAGCGACTCGAAGTTTGTGAGCGTTTGCAGCGCAAGTTTGGCATCTTGTTTAA	60
Acubi	61	AATTACACGACGACAGACAGTAAAAATATTCCTCGATAAGCATGACTACACCCATATCAC	120
Bmubi	61	AATTACACGACGACAGACAGTAAAGTATTCTTCGACAAGCATGACTACACCCATATCAC	120
Acubi	121	TGTTTAAGTGCTCGACGTAGTTGTTGCATGTTATGTGCGGTGTGCCGCGATACGCGTGAT	180
Bmubi	121	TGTTTAAATGCTCGACGTAGTTGTTGCATGCTATGTGCGGTGTGCCCCGATACGCGTGGT	180
Acubi	181	TTCGGTGAAATCACACCACAACCGTCGGCGTGCGTGTAAACAAAGTCGACAGCGAAACA	240
Bmubi	181	TTCTGTGAAATCACACCACAGCCAATCGGCGTGCGTGTAAACAAAGTCGACAGCGAAACA	240
Acubi	241	ATTTATCGTTTTTCCAAAAATTTAAATACTCGACAGTTTTGCAGCTTAGATTCCGCGTTT	300
Bmubi	241	ATTTATCGTTTTTCCAAAAATTTCAAATATTCGACAGTTTTGCAGCTGAGATTGCGCGTTT	300
Acubi	301	GATTCACCTTAAATCGTCGTGAGCTCTATAATCTCGGGCGACAGCTCGCCTTGTTGCC	360
Bmubi	301	GATTCACCTTAAATCGTCGTGAGCTCTATAATTTCTGGCAACAGTTTGCCTTGTTGCC	360
Acubi	361	CCATCGTATCGATCACCTCCCCAAGTGCCCGGTGTTATATTAAGTCGTTTAAATCAT	420
Bmubi	361	CCATTGCATCGATCACCTCGCCCAAGTGCCCGGTGTTATATTAAGTCGTTTGAAGCAT	420
Acubi	421	TTATTGCTTCCTGCACGTGCGCTGGTAATTTTGAACACGGCGTGGAATCAATTGCC	480
Bmubi	421	CTATCGCTTCTTGACGTGCGCTGATAATTTTGAATACGGCGTGGAATCAATTGCC	480
Acubi	481	GTTGAAGGGAAATAATTCGTGGTGTGGGTATCGGCCGCTGTTGCACAATCCACCAGCG	540
Bmubi	481	GTTGAAGGGAAATAATTCGTGGTGTGGGTATCGGCCGCTGTTGCACAATCCACCATCG	540
Acubi	541	GTGGAGGCAAGGGCGCATTACAGTAACCGTTGTCATTATAAGTAATAGTGTA	595
Bmubi	541	GTGGAGGCAAGGGCACATTACAGCAACCGTTGTCATTATAAGTAATAGTGTA	595

图 4.2 AcMNPV 和 BmNPV 的 *ubi* 基因启动子序列比对分析

Fig. 4.2 Nucleotide sequence alignment of cloned *ubi* gene promoter from AcMNPV and BmNPV.

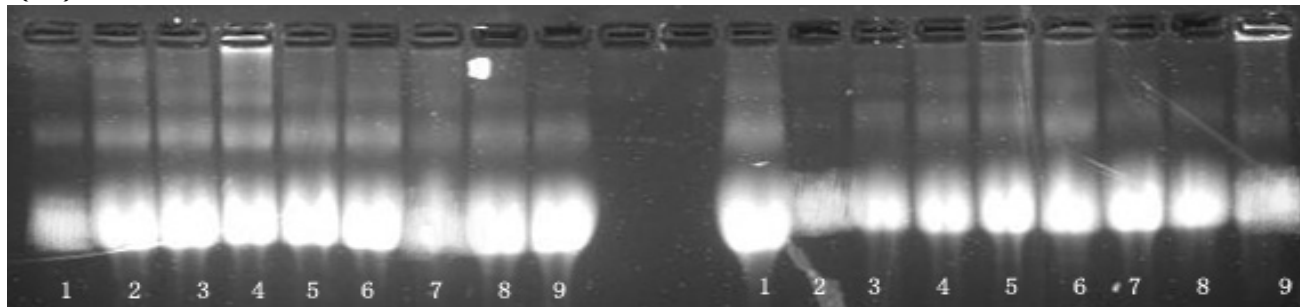
The late RNA initiation sites, TAAG motif, were marked by rectangle; CAAT motifs were shaded and TATA boxes were underlined.

#### 4.2.2 Northern blot 分析

接种约  $0.5-1 \times 10^6$  细胞于  $15 \text{ cm}^2$  培养瓶中, 贴壁培养过夜 (即细胞密度约为 80%)。用野生型 BmNPV 或 AcMNPV 病毒母液 (MOI = 0.5) 分别感染 *Bm*、*Sf21* 细胞。提取病毒感染后 0、2、4、8、12、24、48 和 72 小时的培养细胞总 RNA, 以未经病毒感染的细胞 RNA 为空对照做 Northern

blot 分析。结果显示, 杆状病毒 *ubiquitin* 基因为晚期表达基因, 且有多条不同长度的剪接方式, 其中 BmNPV *ubiquitin* 约在病毒感染 12 h 开始表达, 而 AcMNPV *ubiquitin* 要早一些, 并随着时间经过持续表达。(图 4.3 A, B)

(A) RNA



(B) Northern blot

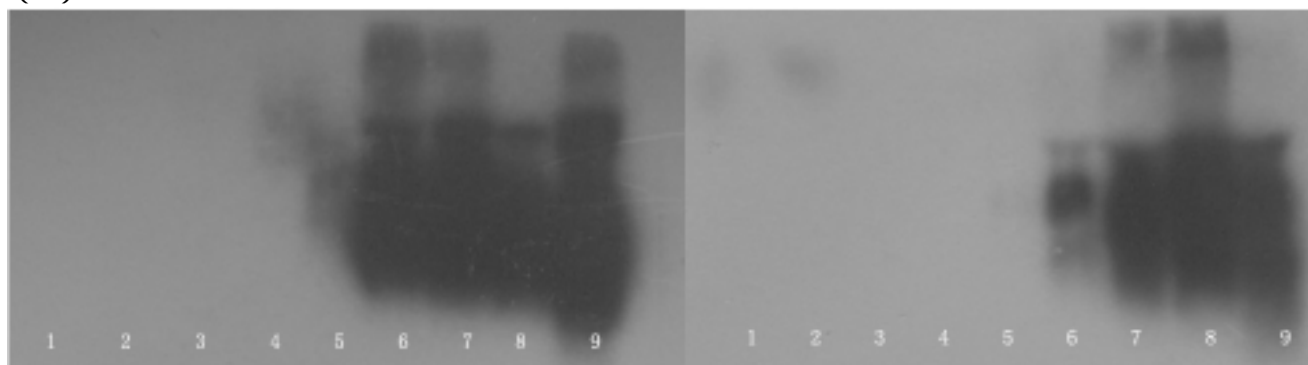


图 4.3 AcMNPV 和 BmNPV 来源的 *ubi* 基因的 Northern blot 分析

Fig.4.3 Northern blot analysis of *ubi* gene of AcMNPV or BmNPV.

(A) Electrophoresis of *ubi* RNA from AcNPV or BmNPV infected *Sf* or *Bm* cells at different stages.

(B) Northern blot analysis of *ubi* gene from AcNPV or BmNPV.

Left photos are AcMNPV *ubi* and right are BmNPV *ubi*. No.1 is the control cell RNA that no virus infected; No. 2 to No. 9 figured the time after infected, that is 2, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 h.

## 4.2.3 *ubi* 基因启动子的功能分析

### 4.2.3.1、功能质粒的构建

为了测定 *ubi* 基因启动子活性, 将 *luciferase* 基因克隆到测序正确的 pBmubi595 和 pAcubi595 质粒的 *Bam*H 位点, 使位于 *ubi* 基因启动子下游, 构建成报告质粒 pBmubi595luc 和 pAcubi595luc。

### 4.2.3.2、*ubiquitin* 基因启动子的转录活性

$1 \times 10^6$  的 *Bm* 或 *Sf*21 细胞于  $15 \text{ cm}^2$  细胞培养瓶中过夜, 将  $1 \mu\text{g}$  报告质粒 DNA 与  $5 \mu\text{L}$  脂质体

混合后转染贴壁细胞,3 h 后用相应的病毒感染细胞,48 h 后收集细胞并进行活性测定。以 pUL220 质粒转染的细胞、未经病毒感染的细胞作为对照,并以未转染的细胞作为空白对照。结果如表 4.2 所示。用报告质粒转染细胞 48 h 后测定的 10 $\mu$ g 细胞抽提物中的 luciferase 活性分别为 16、20,与未经质粒转染的细胞对照活性相似。而转染后用野生型 BmNPV 或 AcMNPV 感染的 10 $\mu$ g 细胞抽提物中,Bm 细胞中测定的 BmNPV *ubi* 启动子转录活性为 13378.7;AcMNPV *ubi* 启动子在 Sf21 细胞中的转录活性为 27588。

表 4.2 完整 *ubi* 启动子驱动的报告基因活性

Table. 4.2 Luciferase activity of constructs plasmid pAcubi595-luc and pBmubi595-luc in Sf21 or Bm cells.

plasmid name	Cell lines	Viral infection	CPM
pAcubi595-luc	Sf-21	-	16 $\pm$ 16
		+	27588 $\pm$ 664.87
pBmubi595-luc	Bm-N	-	20 $\pm$ 17.88
		+	13378.7 $\pm$ 481.63

Using pUL220 transfected or mock transfected cells as control. Each reaction contained 10  $\mu$ g of protein from Bm or Sf21 cells extract. 1 $\mu$ g of plasmid DNA was used in each transfection. The results represented averages from three separate transfections.

#### 4.2.3.3、*ubi* 基因启动子区的缺失分析

为了确定对 *ubi* 基因启动子功能影响较大的区段,本文对该启动子区域进行了 5'端缺失分析。在克隆了 ATG 上游 595 bp 启动子区的基础上,又分别在 ATG 上游-382 bp, -124 bp 设计引物,并 PCR 扩增了上述片段;同时人工合成了 ATG 上游 26 bp 的片段,该片段仅包含杆状病毒晚期转录起始位点 TAAG 及 TATA box;在 ATG 上游-383 bp 与-187 bp 处设计了一对引物,扩增了包含该启动子区域另一个晚期转录起始位点 TAAG 基序的 196 bp 片段。分别将扩增的片段克隆到 pGEM-3Z 载体后,再与 luciferase 报告基因构建相应的报告质粒。

用上述的缺失质粒分别在 Bm 和 Sf21 细胞中进行了转染分析 结果如图 4.4(A)所示。Luciferase 基因的瞬时表达结果显示,在病毒因子存在时,595 bp 完整启动子的转录活性最高,10 $\mu$ g Bm、Sf 细胞抽提物蛋白中的荧光素酶活性分别为 17180、32148;而将启动子的 5'端删除到剩下 382 bp 时,来自于 AcMNPV 的启动子基础转录活性大大降低,仅有完整启动子的 6.7%,删除到 124 bp 时,下降到 0.7%。进一步的删除实验表明,启动子活性没有明显的差别。来自于 BmNPV 的泛素启动子删除到 382 bp 时,启动子活性与 595 bp 时没有明显差别,约为完整启动子的 79%,继续删除到 124 bp 时,启动子活性下降到大约 11%。当只保留晚期转录起始位点时,启动子活性则分别下降到只有完整启动子的 0.4%左右,在该 26 bp 启动子质粒的 luciferase 基因下游插入杆状病毒同源重复序列 *hr3*,10  $\mu$ g 细胞抽提物蛋白中的荧光素酶活性均可增强 104 倍以上;而含有远离 ATG 的 TAAG 的 AcMNPV 和 BmNPV *ubi* 启动子部分则分别保留了完整启动子活性的 8.0%、31%,10  $\mu$ g 细胞抽提物蛋白中的荧光素酶活性为 2574、5244。这些结果意味着病毒因子作用的 *ubi* 基因启动子区段在 AcMNPV 与 BmNPV 中可能是不同的,在 AcMNPV 泛素启动子中主要位于 ATG 上游 -595 ~ -382 bp 之间,而在 BmNPV 泛素启动子中主要位于 ATG 上游-382 ~ -124 bp 之间,并且杆

状病毒的 *ubi* 基因启动子具有两个转录起始位点，仅带有 TAAG 及 TATA box 的 26 bp 小片段拥有启动子的基础转录作用元件。

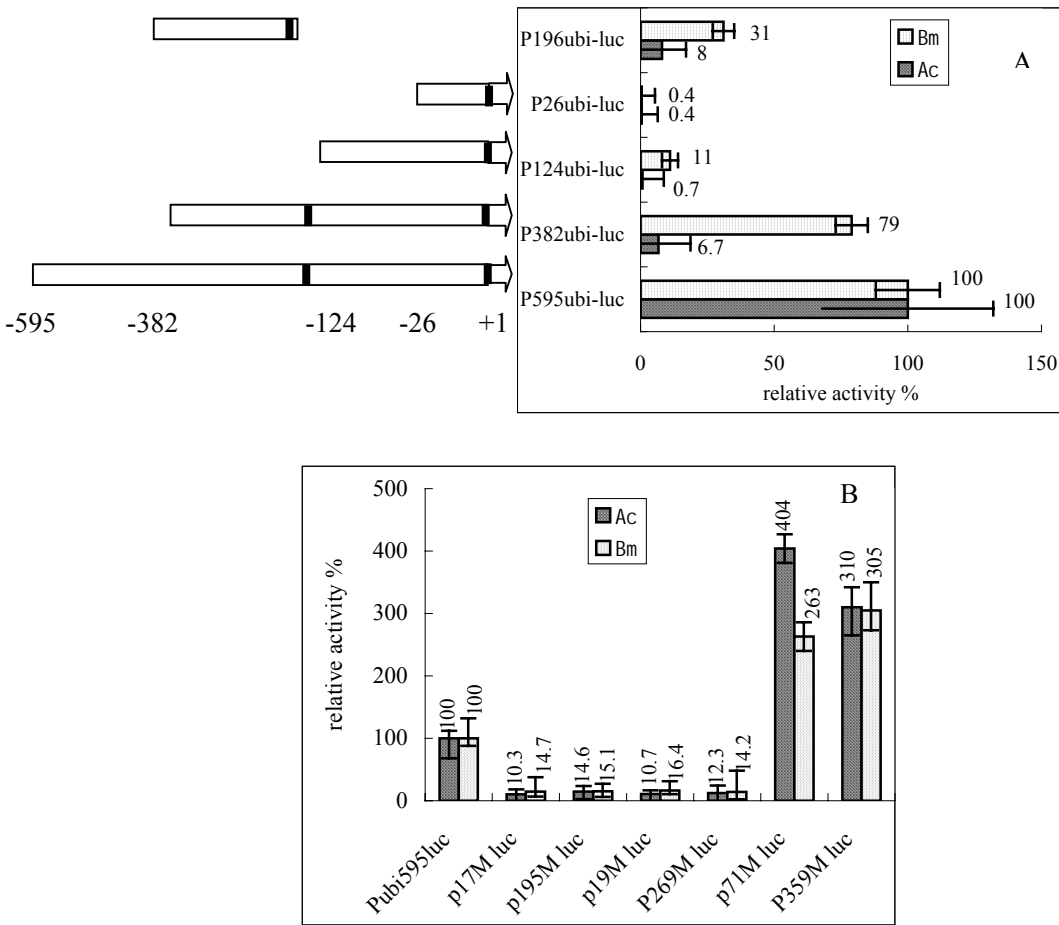


图 4.4 不同长度或突变启动子驱动的报告基因相对表达量

Table. 4.4 relative activity of luciferase controlled by the deletion or mutation *ubi* promoter

*Bm* or *Sf* cells were transfected with 1  $\mu$ g of each plasmid DNA and transient expression assays were performed 48 h post-transfection. Series 1 and 2 denoted relative luciferase activity controlled by *ubi* of AcMNPV or BmNPV, respectively.

(A) Schematic representation of the inserts used in the deletion analysis of the *ubi* promoter. Five plasmids were constructed by inserting the appropriate PCR product in Pgem-3Z. The BmNPV genome DNA used as matrix in the PCR. The inserts of these plasmids are shown as boxes (regions upstream from the initial ATG of *ubi*). The plasmid name, the length of the inserts fragments and the mortality associated with the plasmid in the transient expression assays are shown on the right of each insert. The presence of the TAAG motif in the promoter region of the inserts is marked with a black box.

(B) The effect of conserved elements on the promoter activity. The sequence of the *pubi595-luc* plasmid was modified by a series of point mutation in the conserved motifs upstream of the ATG, respectively. The plasmid containing the TAAG mutations was named as *p17Mluc* or *p195Mluc*, *p19Mluc* and *p269Mluc* containing the TATA box mutations, and

p71Mluc, p359Mluc containing the CAAT mutations.

#### 4.2.3.4、保守基序突变对启动子转录活性的影响

序列分析表明 *ubi* 基因启动子中存在多个杆状病毒保守序列。本文通过对这些保守序列进行定点突变,结合在昆虫细胞中的瞬时表达分析,研究了该启动子的转录活性具有显著影响的保守序列 TATA box、CAAT 及 TAAG。分别以 pAcubi595、pBmubi595 质粒 DNA 为模板,设计引物,使突变位点位于引物序列的中部,利用 PCR 方法扩增了 TATAA 突变为 CGTAA、CAAT 突变为 CGGT、TAAG 突变为 CGAG 的启动子片段,构建报告质粒并分别转染 *Bm* 或 *Sf*21 细胞。瞬时表达结果如图 4.4(B)显示,在病毒因子存在的情况下,TATA box 的突变均可使启动子的转录活性降低,位于-19~-15bp 的 TATA box 突变分别使 *Acubi* 和 *Bmubi* 分别下降到约 10.7%、16.4%,位于-269~-265bp 的 TATA box 突变则使其分别下降到 12.3%、14.2%;位于 ATG 上游的 TAAG 突变后,启动子活性明显下降,20  $\mu$ g 的 *Sf*、*Bm* 细胞抽提物蛋白中启动子转录活性仅占完整启动子的 10.3%、14.7%;ATG 上游-71~-68 nt 和-359~-356 nt 的 CAAT 突变为 CGGT 后,均能提高报告基因的表达水平。靠近 ATG 的 CAAT 突变后,20  $\mu$ g *Sf*、*Bm* 细胞抽提物蛋白中报告基因表达量分别提高了 4 倍、2.6 倍;-359~-356 nt 的 CAAT 突变后,20  $\mu$ g 的 *Acubi* 和 *Bmubi* 转染细胞抽提物蛋白中报告基因表达量均提高了约 3 倍。

### 4.3 讨 论

杆状病毒为双链、超螺旋 DNA 病毒。在病毒感染的细胞中,基因以级联方式表达,根据表达是否需要病毒 DNA 复制,分为早期、晚期和极晚期三种表达时期。早期基因启动子具有类似宿主 RNA 聚合酶启动子的结构,能够介导早期基因转录。晚期、极晚期基因的转录起始或靠近杆状病毒晚期基因保守序列(A/G/T) TAAG,并受病毒 RNA 聚合酶介导[Huh and Weaver. 1990; Rohrmann. 1986]。一些晚期基因包含不止一个 TAAG 序列或同时具有早期基因启动子。对于一个启动子活性是否影响相邻启动子的转录及功能仍是未知的。目前,已有多数晚期、极晚期基因启动子功能得到了详细的研究,TAAG 突变导致了晚期 RNA 稳定转录的显著降低[Morris and Miller. 1994; Todd, *et al.*, 1995]。杆状病毒编码的泛素蛋白,是病毒复制非必需的,可能通过调节宿主细胞等的免疫功能参与了病毒感染,以及病毒出芽和形成病毒粒子[Ghosh M, *et al.*, 2003; Reilly and Guarino. 1996]。

本文从杆状病毒的两个代表株 AcMNPV 和 BmNPV 中分别克隆了完整的 595 bp *ubi* 基因启动子,二者具有很高的序列同源性,但其启动子功能元件是否具有同样功能尚不清楚。本研究以荧光素酶基因为报告基因,对该启动子功能进行了分析。在单用含该启动子的报告质粒转染相应细胞系时,几乎测不到活性,只有在其它病毒因子存在的情况下,才能激活该启动子,暗示了 *ubi* 基因为晚期基因。Northern blot 分析也证明 *ubi* 基因为晚期基因,在病毒感染细胞 12 h 或稍早一些开始表达,具有多个转录本且能够持续表达。

转录起始需要 RNA 聚合酶和转录因子的参与, 转录因子结合到位于启动子序列上的各种顺式作用元件上。启动子元件鉴定的基本程序是应用一系列的突变技术对目的基因启动子序列进行诱变处理, 然后构建启动子-报告基因的融合载体来研究基因的转录, 通过对报告基因的产物分析, 可测定在启动子上特异性突变对目的基因转录和表达的影响, 从而鉴定出参与转录调节的相关启动子元件。对 *ubi* 基因启动子进行的缺失分析表明, 在病毒因子存在时, 删除启动子 5' 端区域可引起启动子活性的显著降低, 保留 ATG 上游 382 bp 时活性比 595 bp 完整启动子在 AcMNPV 和 BmNPV 中分别下降了 93.3%、21%。造成这种差异的原因, 一方面可能是细胞敏感性的不同, 另一方面可能是两种病毒启动子某些功能元件结构上存在差异, 这需要进一步的探讨。克隆 ATG 上游 383-187 bp 之间的片段, 含有 *ubi* 基因一个推定的晚期转录起始位点和 TATA box, 构建的报告质粒在瞬时表达时仍能够驱动报告基因的表达, 说明该区段具有启动子的功能。将该片段序列与宿主泛素基因 5' 侧翼序列比对显示, 二者具有很高的同源性, 推测杆状病毒在进化过程中, 吸收整合了对自身进化有利的宿主遗传信息, 并对其进行遗传改造, 使其更适合病毒的控制。

宿主 RNA 聚合酶识别并转录与细胞中启动子相似的早期基因启动子, 开始杆状病毒的感染。伴随着早期基因的复制, 杆状病毒 RNA 聚合酶开始晚期基因的转录。杆状病毒来源的 RNA 聚合酶识别一个五核苷酸的启动子序列 (A/G/T)TAAG, 并且转录一般起始于第一个或第二个核苷酸。突变分析是鉴定顺式作用元件的最可靠的方法, 此方法能分析各种类型的调控区域中的顺式作用元件。本研究中分别对 AcMNPV 和 BmNPV *ubi* 基因启动子中功能元件 CAAT、TAAG 及 TATA box 进行了突变分析研究。TAAG 的突变均可显著降低两个不同病毒株来源的启动子活性, 这主要是因为 TAAG 突变改变了 RNA 聚合酶的识别位点所造成的; TATA box 是启动子中相对于转录起始位点而言位置相对固定的上游启动子元件, TATA box 突变可以不同程度的降低启动子活性, 说明 TATA box 是启动子转录所必需的元件; CAAT box 是最早被人们描述的常见元件之一, 具有很强的突变敏感性, 在决定启动子转录效率上具有很强的作用。本研究中 CAAT 突变可以明显的提高启动子活性约 3-4 倍左右, 推测阻遏蛋白与 *ubi* 启动子中存在的 CAAT 基序结合, 从而阻止了 CAAT 结合因子的结合, 则也不能形成活性复合体, 而将该元件突变后阻遏蛋白失去了结合位点。

基因组成分的进化是生物学中最基本的问题之一, 基因是如何遗传、获得、丢失、交换、复制及进化的问题是近年的热点问题[Eisen. 2002; Eisenberg, *et al.*, 2000]。目前的几个全基因组计划, 以及基于基因的存在或缺失、基因家族或蛋白折叠的研究又重新挑起人们对这些问题的关注[Alb, *et al.*, 2001; Herniou, *et al.*, 2001; Lin and Gerstein. 2000; Snel, *et al.*, 2002]。杆状病毒以一种宿主依赖的方式进化, 自然选择控制下的相关种属之间的共生进化是病原体与宿主在长期作用过程中的主要调控因素[Harrison and Bonning. 2003; Woolhouse, *et al.*, 2002]。本文对 BmNPV 和家蚕的泛素基因序列比较发现, 二者之间的核苷酸同源性为 66.7%, 氨基酸同源性则为 74%。家蚕 *ubi* 的启动子对应于 BmNPV *ubi* ATG 上游 5' 非编码区-314bp 和-412 bp 之间的启动子序列, 二者之间具有很大的序列同源性。

基因调控机制是后基因组时代一个重要的研究内容, 转录因子与其结合部位的相互作用是基因调控的重要组成部分。对原核生物基因表达调控的研究表明, 在基因表达调控中, 除了 RNA 聚合酶的作用, 还有其它的蛋白也发挥着重要的作用。这些蛋白可以是结合到启动子特异 DNA 序列的抑制子或激活子。抑制子能直接阻止 RNA 聚合酶与启动子之间转录起始复合体的形成, 因为这些抑制子通常结合到与 RNA 聚合酶相互作用区域重叠的位点。通过结合到其作用位点, 抑制

子就通过一种与大肠杆菌乳糖操纵子类似的更复杂的机制阻碍了 RNA 聚合酶到达其作用位点 [Majumdar and Adhya. 1984]。

## Promoter Analysis of *Ubiquitin* Gene from AcMNPV and BmNPV

**Abstract** Baculoviruses *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) and *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) encode ubiquitin protein, which may involved in the virus infection. Promoter activity and Northern blot analysis indicate that *ubi* gene was expressed in the late phase of viral infection. In the present of viral factors, transient expression assay demonstrated that the *cis*-acting elements responsive to viral factors are mainly located within the 5' region upstream of ATG, and a 196 bp fragment, containing additional promoter elements, *i.e.* TATA box, CAAT and TAAG motif, upstream -383 bp to -187 bp from the initial ATG, can also stimulated the expression of reporter gene. Functional promoter elements in the 5' untranslated region of the *ubi* gene in the AcMNPV and BmNPV have been defined by transcriptional analysis of site-directed mutations. The results showed that the mutations of TATA box or TAAG in both AcMNPV and BmNPV *ubi* promoter region, remarkable reduced the promoter activity, while the CAAT mutations increased the reporter gene expression about 3 times. It may because, in the long-term co-evolution, baculovirus recombined beneficial gene or nuclide acids fragment from its host, and altered some nuclide acids to escape the control of host transcription and make it more compatible for virus itself.

**Key words:** baculovirus; *ubi* promoter; transient expression; promoter analysis

## 第五章 *hr3*、*ie-1* 对杆状病毒晚期、极晚期启动子的激活作用

### 摘 要

杆状病毒同源重复区 (*hrs*) 序列是病毒 DNA 复制的起点, 同时又具有增强子的作用, 在瞬时表达分析中能提高杆状病毒基因的表达水平, 而立即早期基因产物对其后表达的基因具有反式激活作用。本实验中将 BmNPV *hr3* 序列克隆到杆状病毒晚期 *ubi* 基因和极晚期 *polh* 基因启动子控制的 *luciferase* 报告基因下游或普通载体 pSK, 在 BmNPV 或 *ie-1* 存在的条件下进行 *hr3* 的顺式或反式体内、体外瞬时表达分析。结果表明在病毒感染或 *ie-1* 存在的条件下, 顺式或反式的 *hr3* 对晚期或极晚期启动子均具有显著的增强作用。在病毒感染的细胞中, *hr3* 可分别增强 *ubi* 基因启动子活性达 62 和 1.4 倍左右; 对于极晚期 *polh* 基因启动子, *hr3* 可顺式增强报告基因的表达 283 倍, 反式为 1.8 倍左右。当 *ie-1* 与报告质粒共转染时, 其结果显示 *hr3* 可分别顺式增强 *ubi* 和 *polh* 基因启动子转录活性达 210 和 621 倍; 反式则为 9 和 4.2 倍; 在转染的早期, 单纯的 *ie-1* 可以使 *hr3* 迅速增强报告基因的表达, 但后期 (约 48 h 后) 则远低于病毒感染的处理。用报告基因转染 5 龄家蚕幼虫, 在体内转染实验中, *hr3* 同样可显著提高启动子的转录活性。本实验中同时将 *ubiquitin* 基因启动子的不同删除片段构建的报告质粒与 *ie-1* 共转染, 瞬时表达结果表明, 启动子序列中与 *ie-1* 响应的区段主要位于 ATG 上游-595~-382 bp 之间。

**关键词** 启动子; 增强子; 反式激活

在病毒感染的细胞内, 病毒基因的表达受宿主与病毒转录调节因子之间互作的调控。立即早期基因由宿主细胞 RNA 聚合酶 Ⅱ 识别并转录, 瞬时表达试验揭示立即早期基因 (*ie-1*) 启动子在没有其他病毒基因产物存在的情况下可被充分活化。虽然延迟早期基因的基础转录可在病毒反式激活因子不存在的情况下检测出来, 然而, 这些基因启动子的充分激活尚需一个或多个立即早期基因产物。在 AcMNPV 基因组中已经鉴定出几个具有转录调控功能的立即早期基因, 如 *ie-1*, *ie-0*, *ie-N*, *cg30* 和 *pe38* 等。与早期基因不同, 晚期与极晚期基因的表达还依赖于病毒 DNA 的复制。

在真核基因表达调控中, 增强子也是非常重要的顺式作用元件, 与启动子、绝缘子及沉默子协同作用, 对调控真核基因的时空表达具有重要作用。其常与反式作用因子相互作用, 发挥增强启动子转录的功能。杆状病毒同源重复区 (homologous region, *hr*) 是一种广泛存在于昆虫杆状病毒基因组中的重复序列, 这些序列在所有深入研究过的杆状病毒中均存在。*hr* 是由不同数目的大约 70 bp 高度保守的重复序列组成, 每个重复含有以 *EcoR* 为中心的 30 bp 的回文序列, 回文序列的两侧则为约 20 bp 的直接重复。*hr* 元件具有病毒复制起始和转录增强子的功能。

早期的研究认为, 在杆状病毒基因组中的同源重复序列 (*hr*) 能促进早期基因特别是含有 TATA box 的早期基因的表达, 而对于晚期和极晚期基因启动子则无效应。认为 *hr* 促进转录的机制是提

高转录起始速率，而不是影响病毒 DNA 复制来增加 DNA 模板数量水平。为了探讨 BmNPV *hr* 元件对杆状病毒晚期和极晚期基因是否也具有增强子功能，我们以 *ubi*、*polh* 基因启动子为载体，在昆虫细胞和家蚕体内进行瞬时表达分析。

## 5.1 材料方法

### 5.1.1、报告质粒的构建

本实验分别构建了报告质粒 ppolhluc、pBmubiluc-*hr3* 和 ppolhluc-*hr3*，具体步骤参见第三章。

### 5.1.2、*IE-1* 与 *ubiquitin* 基因启动子顺式元件的结合

将前面第四章所构建的 pBm595ubiluc、pBm382ubiluc、pBm124ubiluc 以及 pBm26ubiluc 与 *ie-1* 质粒共转染 *Bm* 细胞；48 h 后收集细胞进行荧光素酶报告基因的测定，以确定在 *ubiquitin* 基因启动子片段中与 *ie-1* 的结合位置。

### 5.1.3、*ie-1*、*hr3* 对晚期 *ubi* 基因启动子的作用

将 pBm595ubiluc、pBm595ubiluc-*hr3* 或者 pBm595ubiluc 与 pSK-*hr3* 一起分别分别 *Bm* 细胞，然后用 BmNPV 感染上述转染细胞；同样的进行了上述三个处理的转染，仅用 *ie-1* 共转染代替了 BmNPV 感染。

### 5.1.4、*ie-1*、*hr3* 对极晚期基因 *polh* 启动子的作用

ppolhluc 和 ppolhluc-*hr3* 分别与 *ie-1* 共转染 *Bm* 细胞，或者 ppolhluc 与 *hr3*、*ie-1* 质粒分别转染 *Bm* 细胞，或者用一定量的 BmNPV 病毒感染细胞而不加 *ie-1* 共转染，收集 24、36、48、60、72、84、96、108 h 的细胞进行 luciferase 活性分析。

上述每个转染试验均进行 3 次重复，并对所测定的荧光素酶活性进行校正。

### 5.1.5、家蚕饲养和转染

家蚕在 24-25℃ 下进行常规桑叶饲养。

将质粒 DNA 与脂质体混合后静置 15 min，以每头蚕 1 µg 的 DNA 量将脂质体包埋的混合物注射入 5 龄第二天的蚕体内，常规饲养 48 h 后，收集蚕血淋巴进行报告基因活性测定。每个实验至少重复 3 次，每区实验蚕 10 头。

## 5.2 结 果

### 5.2.1、功能质粒的构建

为了研究杆状病毒立即早期基因 *ie-1* 和同源重复序列 *hr3* 对晚期、极晚期基因启动子瞬间转录活性的影响，我们构建了分别含晚期 *ubi* 基因和极晚期 *polh* 基因启动子的报告质粒 pBm595ubiluc 和 ppolhluc。即将荧光素酶报告基因分别亚克隆到同样经 *Bam*H 酶切的上述两个质粒上，并使之受启动子的正确控制。将 BmNPV 来源的同源重复序列 *hr3* 基因亚克隆到上述报告质粒中报告基因的下游，构建了报告质粒 pBmu595biluc-*hr3* 和 ppolhluc-*hr3*。

### 5.2.2、*ie-1*、*hr3* 对晚期 *ubi* 基因启动子的作用

为了检验 *ie-1* 和 *hr3* 对晚期基因启动子是否具有激活作用，我们将报告质粒 pBm595ubiluc 和 pBm595ubiluc-*hr3* 分别与 *ie-1* 质粒在脂质体充分包埋后共转染昆虫细胞；或者 pBm595ubiluc 和 pBm595ubiluc-*hr3* 转染 Bm 细胞后再用 BmNPV 感染细胞；同时进行了 *hr3* 的反式作用实验。转染 48 小时后收集细胞并裂解，然后用 Beckman 液体闪烁仪测定 cpm，荧光素酶活力以 15 秒内的光亮点数表示。将牛血清白蛋白配制标准浓度蛋白质 (0.5 mg/ml)，用酶标仪进行蛋白质定量，每个转染用从细胞抽提物所测定的蛋白对萤火虫荧光素酶活力进行校正，并以未转染的细胞作空白对照，每个实验设三个重复，结果如图 5.1 (A) 所示。

在 *ie-1* 存在的情况下，顺式连接的 *hr3* 可增强 *ubi* 基因启动子的转录活性达 210 倍，反式作用的 *hr3* 对 *ubi* 启动子同样具有增强作用，但增强的幅度较低，约有 9 倍。

当用病毒感染代替 *ie-1* 时，顺式连接的 *hr3* 可增强 *ubi* 基因启动子的转录活性达 62 倍，反式作用 *hr3* 的增强作用约有 1.4 倍。无论顺式还是反式，完整病毒基因组存在时 *hr3* 的增强作用远大于只有 *ie-1* 的情况，说明 *hr3* 对 *ubi* 启动子具有显著的增强作用，且这种增强不仅只有 *ie-1* 的参加。

按照转染细胞时的加样组合用脂质体包埋 DNA，以每头蚕 1 µg 的 DNA 量注射 5 龄第二天的

家蚕，48 h 后收集血淋巴细胞，测定荧光素酶的活力，结果如图 5.1 (B)。在家蚕幼虫体内，无论顺式还是反式作用的 *hr3* 对于 *ubi* 启动子控制下的报告基因的瞬时表达亦有极大的增强作用。

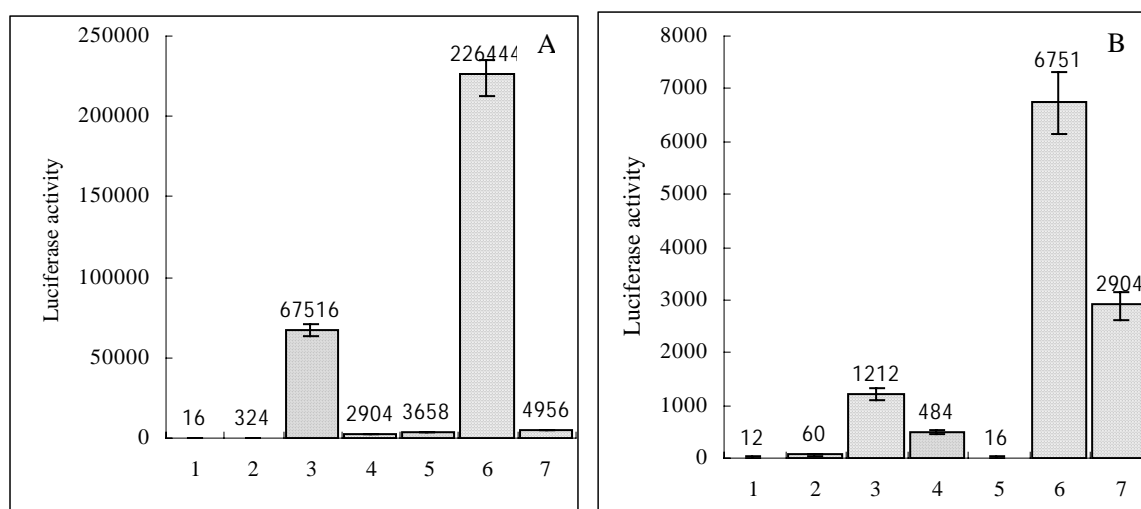


图 5.1 *ie-1*、*hr3* 对 *ubi* 启动子活性影响的体外、体内分析

Fig. 5.1 (A) *ie-1*, *hr3* affected on the *ubi* gene promoter activity *in vitro* and *in vivo* analysis

(A) Each reaction contained 10  $\mu$ g of protein for the analysis in the presence of *ie-1* and used 1  $\mu$ g of protein from BmNPV-infected Bm cell extract.

(B) Using 1  $\mu$ g total DNA to transfect fifth silkworm, each reaction contained 10  $\mu$ g of protein from *Bombyx mori* larva haemolymph.

The full-length promoter was arbitrarily set as 1. The effects of *cis*- or *trans*-*hr3* on the *ubiquitin* promoter activity were detected as shown in 2 to 4 in the presence of *ie-1*. And the effects of *cis*- or *trans*-*hr3* on *ubiquitin* promoter activity in BmNPV-infected Bm cells were shown as 5 to 7. Transfections were conducted in triplicate.

1: pBm595ubi-luc; 2: pBm595ubi-luc+*ie-1*; 3: pBm595ubi-luc-*hr3*+*ie-1*; 4: pBm595ubi-luc+*ie-1*+*hr3*;

5: pBm595ubi-luc+BmNPV; 6: pBm595ubi-luc-*hr3*+BmNPV; 7: pBm595ubi-luc+*hr3*+BmNPV.

### 5.2.3、*ubiquitin* 启动子中对 *ie-1* 的响应区段研究

在第四章中我们已经对 BmNPV *ubi* 基因启动子进行了缺失分析，发现在病毒因子存在的条件下，删除该启动子 5' 区可引起启动子活性的大幅度降低。*ie-1* 对 *ubi* 基因启动子具有一定的反式激活作用，本实验中用第四章所构建的一系列删除启动子片段与 *ie-1* 共转染 Bm 细胞，并测定报告基因的活性，检测了该启动子中与 *ie-1* 结合的活性位点，实验结果如图 5.2。当删除到 ATG 上游 382 bp 时，启动子活性明显下降，随着删除的不断进行，活性也明显降低，当删除到 ATG 上游 26 bp，仅包含 TATA box 和晚期基序 TAAG 时，报告基因的表达量为 4157 cpm。上述实验结果说明在 *ubi* 基因启动子中对 *ie-1* 的识别位点主要位于 ATG 上游 595 与 382 bp 之间，ATG 上游 26 bp

为核心启动子，在 *ie-1* 的反式激活作用下，具有一定的转录活性。

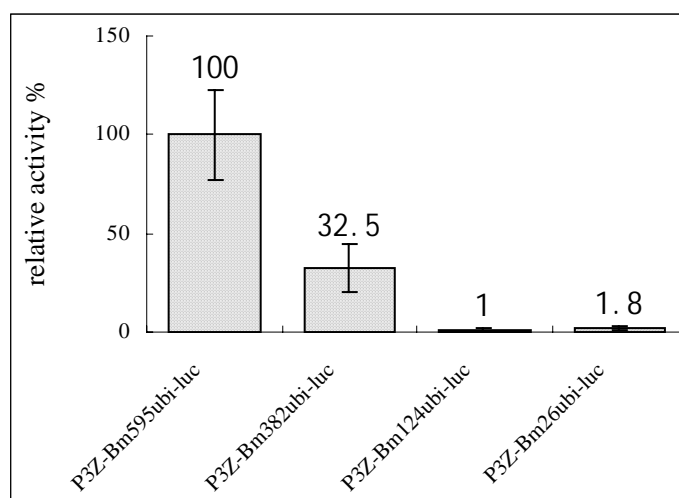


图 5.2 *ubi* 启动子中对 *ie-1* 响应区段分析

Fig. 5.2 Deletion analysis of the *ubi* gene promoter co-transfected with *ie-1*

In the presence of *ie-1*, the effect of the 5' deletion on luciferase activity in *Bm* cells were shown as the fold-stimulation relative to the full-length promoter fragment which was arbitrarily set as 100. Transfections were conducted in triplicate.

#### 5.2.4、*ie-1*、*hr3*对极晚期 *polh* 基因启动子的作用

本实验通过 *ie-1*、*hr3* 与包含 *polh* 的报告质粒或 *ie-1* 与带有 *hr3* 的 *polh* 报告质粒共转染 *Bm* 细胞或家蚕幼虫，考察了杆状病毒立即早期基因 *ie-1* 和同源重复序列 *hr3* 对杆状病毒极晚期启动子的作用。将报告质粒 ppolhluc 与 *ie-1* 共转染 *Bm* 细胞，或者 ppolhluc 转染 *Bm* 细胞后用 BmNPV 感染，如图 5.3 所示，在 *ie-1* 与报告质粒或增强子质粒共转染的处理中，顺式连接的 *hr3* 对报告基因的表达式量比对照可提高 621 倍，反式作用可提高 4.2 倍左右；在病毒感染的处理中，则可以分别提高 283 和 1.8 倍。

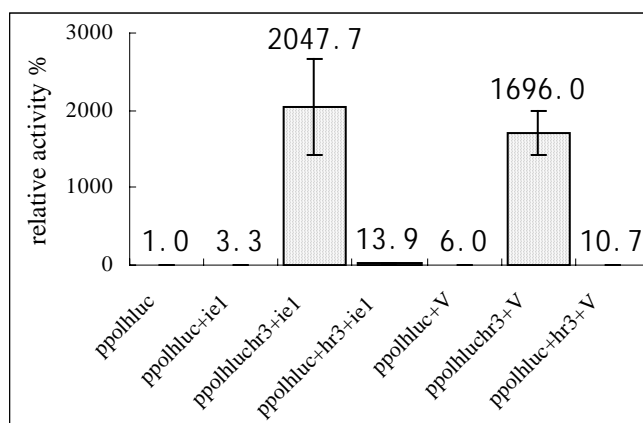
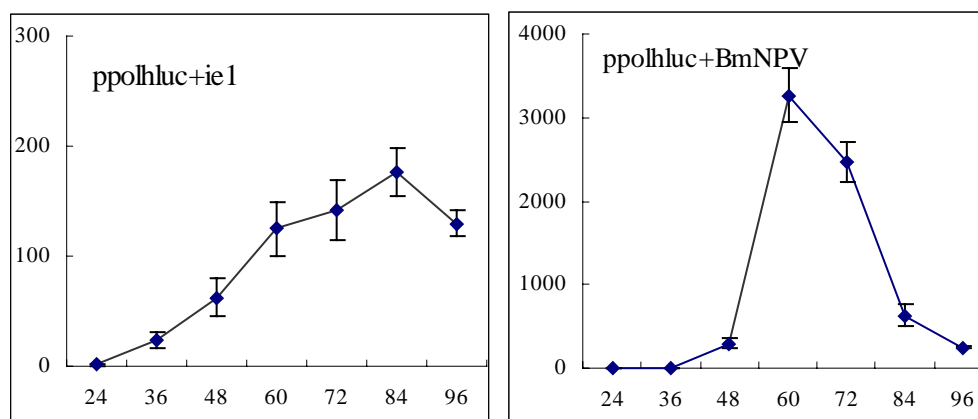


图 5.3 在 *ie-1* 或病毒存在时 *hr3* 对 *polh* 启动子活性的影响

Fig. 5.3 *hr3* affected on the *polh* gene promoter activity in the present of *ie-1* or BmNPV in vitro analysis

The full-length promoter was arbitrarily set as 1. In the present of *ie-1*, the effects of *cis*- or *trans*- *hr3* on the *polh* promoter activity were detected using 1  $\mu$ g of protein from *Bm* cell extract. And the effects of *cis*- or *trans*- *hr3* on *polh* promoter activity in BmNPV- infected *Bm* cells were detected using 0.1  $\mu$ g of protein from *Bm* cell extract. Transfections were conducted in triplicate.

分别在转染后 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 84 h 和 96 h 收获细胞, 测定荧光素酶活力。如图 5.4 所示, 在转染后 48 h 以前, 加入 *ie-1* 的处理中, 报告基因的表达量快速提高, 而加入病毒的处理中则基本没有明显变化。与 *ie-1* 共转染的报告质粒在转染后 24 h 即可检测到报告基因的表达, *hr3* 顺式连接的情况下, 10  $\mu$ g 细胞蛋白中报告基因的表达量达到了  $71308.01 \pm 1069.62$  cpm, 反式作用则只有 200 左右; 在转染后加入病毒的处理中, 24 h 时 10  $\mu$ g *hr3* 顺式连接的报告质粒蛋白中 *luciferase* 基因的表达量为  $2320 \pm 193.26$ , 远低于 *ie-1* 的平行处理。但随着时间的推移, 所有病毒因子存在的情况下, 报告基因的表达远高于仅有 *ie-1* 的情况。当 *hr3* 反式作用时, 无论是单独加 *ie-1* 的处理还是病毒感染的处理, 报告基因的表达量均明显低于 *hr3* 顺式连接的情况。



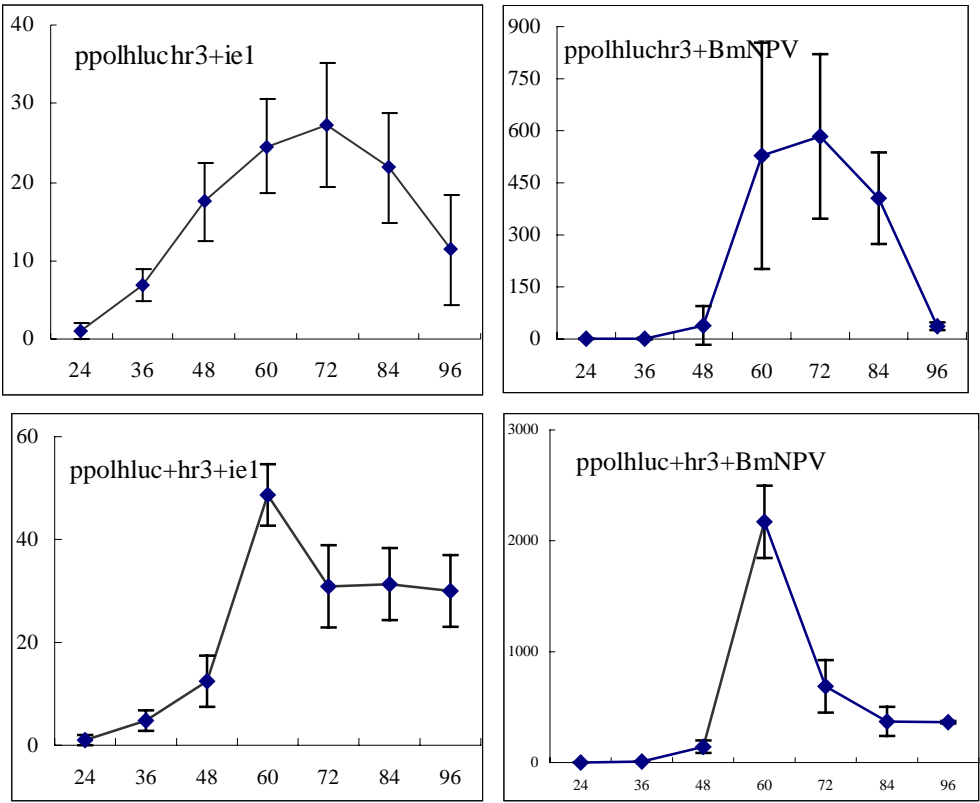
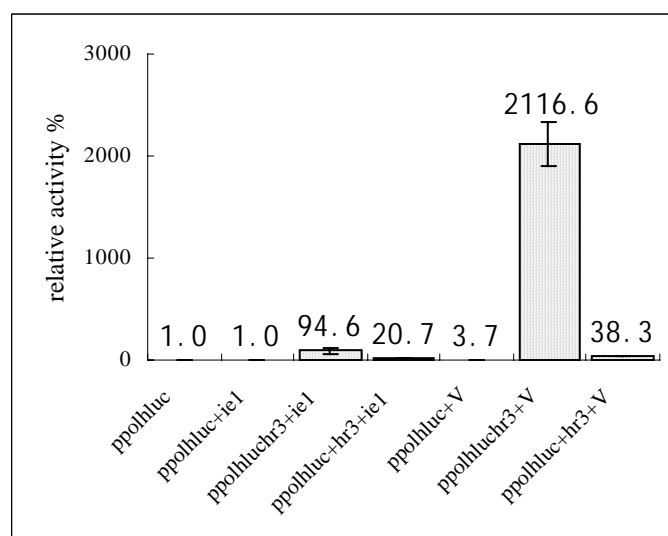


图 5.4 顺式或反式 *hr3* 对 *polh* 启动子活性影响的时相图

Fig. 5.4 *cis*- or *trans*- *hr3* affected on the *polh* gene promoter activity at different stages of transfection

Bm cells were co-transfected T-IE-1 with ppolhluc, ppolhluchr3, ppolhluc+pSK-hr3, respectively, shown at left; or transfected by ppolhluc, ppolhluchr3, ppolhluc+pSK-hr3, respectively, and infected with BmNPV, shown at right. After transfected 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 84 h and 96 h, cells were harvested and the luciferase activity was detected. X axes denoted the time after transfection and Y axes denoted the relative activity of luciferase, the cpm value at 24 h.p.t. arbitrarily set as a 1.0.

以转染 *Bm* 细胞相同的质粒组合方式，转染 5 龄第二天起蚕，48 h 后收集血淋巴进行荧光素酶活性测定，结果如图 5.5。在完整病毒感染的家蚕血淋巴中，*hr3* 顺式连接时，报告基因的表达量可对比照质粒高约 572 倍，反式 *hr3* 则可以增强约 10 倍左右；在 *ie-1* 质粒与其共转染的处理中，顺式 *hr3* 可增强报告基因的表达 95 倍，反式 *hr3* 则可增强 21 倍左右。

图 5.5 *ie-1*、*hr3* 对 *polh* 启动子活性影响体内分析图Fig. 5.5 *ie-1*、*hr3* affected on the *polh* gene promoter activity *in vivo* analysis

The full-length promoter was arbitrarily set as 1, using 1  $\mu$ g total DNA to transfect fifth silkworm, each reaction contained 10  $\mu$ g of protein from *Bombyx mori* larva haemolymph. Transfections were conducted in triplicate

### 5.3 讨 论

杆状病毒基因表达以级联模型按时序进行，一般以病毒 DNA 复制是否开始为界分为早期、晚期和极晚期三个综合时相。而早期基因又分为立即早期基因和延迟早期基因，立即早期基因的表达不需要其它病毒基因的产物，而延迟早期基因的转录则需要立即早期基因的表达产物[Carson, et al., 1988]。前面的研究发现，BmNPV 泛素基因启动子在没有病毒感染的细胞中是没有活性的，即其他的病毒因子对于该启动子的转录激活是必需的。当用 BmNPV 感染细胞后，启动子的转录活性增强了上万倍，说明病毒因子能够识别 BmNPV 泛素基因启动子并使之转录。后来的实验发现，立即早期基因 *ie-1* 对该启动子具有一定的反式激活作用。为了确定 BmNPV 泛素基因启动子中对 *ie-1* 响应的区段，我们将表达质粒 pBm595ubiluc 与 *ie-1* 质粒共转染 *Bm* 细胞，瞬时表达的结果显示，在 *ie-1* 存在的情况下，删除 ATG 上游-382 bp 序列时，启动子活性下降到只有完整启动子活性的 32% 左右。继续删除，启动子活性也随着下降。上述结果表明与 *ie-1* 响应的启动子元件可能主要位于 ATG 上游-595~-382bp 之间，这与我们前面病毒感染的实验结果不同，推测可能是其他病毒因子参与 *ubi* 基因启动子转录调控的结果。

在杆状病毒基因表达的级联调控中，晚期和极晚期基因的表达是在病毒 DNA 复制后发生的，病毒晚期与极晚期启动子在组成、结构上和功能上均与早期启动子明显不同。晚期基因启动子一般含有 TAAG 基序，并且不能象早期启动子一样被宿主 RNA 聚合酶识别，只能通过病毒编码

的 RNA 聚合酶转录[Beniya, *et al.*, 1996]。本实验中单独转染 *ubi* 或 *polh* 启动子时均检测不到报告基因的表达, 如果有病毒感染时则可以检测到 Luciferase 活性, 这与杆状病毒晚期启动子的特性相符。杆状病毒 RNA 聚合酶是由四个病毒编码蛋白 LEF4、LEF8、LEF9 和 P47 作为亚基结合在一起发挥作用的[Guarino, *et al.*, 1998]。而在本实验中, 我们在转染体系中加入 *ie-1* 基因后, *ubi* 和 *polh* 启动子均发生了转录, 这与前人研究结果是不符合的, 可能是因为病毒编码的 RNA 聚合酶并不是晚期和极晚期基因转录的唯一条件。

杆状病毒早期基因具有与真核生物相似的启动子元件, 能被宿主细胞识别; 晚期基因表达则既需要早期蛋白的反式作用, 又与晚期基因启动子序列中的顺式元件有关。在杆状病毒基因组中, 立即早期基因 *ie-1* 由宿主 RNA 聚合酶 识别并转录, 其表达不需要其他病毒因子的参与。该基因编码的 IE-1 蛋白是一个多功能调节蛋白, 既是早期基因反式激活因子, 又是晚期表达因子。*polh* 启动子是极晚期多角体基因启动子, 其转录需要病毒因子的参与, 有文献表明极晚期因子(very late factor, vlf)基因产物参与了 *polh* 启动子的转录[McLachlin and Miller. 1994; Vanarsdall, *et al.*, 2006]。目前对于晚期基因的表达是否需要病毒 DNA 的复制主要有两种相互矛盾的观点, 一种认为虽然其表达量很低, 但晚期基因表达不需要病毒 DNA 的复制, 推测造成表达量降低的原因主要是缺乏扩增的模板[Dobos and Cochran. 1980]; 另一种观点则检测了稳定水平的晚期转录, 在阿非迪霉素 (aphidicolin) 存在 24 h 后, Northern blot 不能检测到晚期的 mRNA[Rice and Miller. 1986]。有一种解释可以协调这两个实验, 即在没有病毒 DNA 复制的情况下, 晚期基因可以转录但转录水平极低。本研究中将 ppolhluc 质粒与 *ie-1* 共转染 *Bm* 细胞, 瞬时表达结果证明 *ie-1* 也可以微弱激活 *polh* 启动子的转录。如果有 *hr3* 存在时, 其转录活性更高; 相对应的是, 如果只有顺式连接的 *hr3*, 而没有立即早期基因产物, 晚期或极晚期启动子不能有效的转录, 说明在晚期和极晚期启动子的转录过程中, *ie-1* 和 *hr3* 共同发挥作用, 晚期基因的转录不需要病毒 DNA 的复制。

在杆状病毒基因组中的同源重复序列 (*hr*) 能促进早期基因特别是含有 TATA box 的早期基因的表达, 而对于晚期和极晚期基因启动子则无效应。同时早期研究认为 *hr* 只有与启动子顺式连接时才具有促进转录的作用, 且这种作用没有位置与方向效应[Lu and Carstens, 1993]。认为 *hr* 促进转录的机制是提高转录起始速率, 而不是影响病毒 DNA 复制来增加 DNA 模板数量水平。本研究中研究了 *hr3* 对晚期或极晚期启动子是否具有增强作用。我们将 *hr3* 分别顺式连接到报告质粒 pBm595ubiluc 和 ppolhluc 中 luciferase 基因的下游, 并用该质粒转染 *Bm* 细胞, 结果与前人的文献报道相符, 即 *hr* 不能增强晚期和极晚期基因启动子的转录活性, 但当这两个质粒转染 *Bm* 细胞后用 BmNPV 感染细胞, 则 *hr3* 可以明显的提高报告基因的表达水平。说明在病毒基因组中具有病毒因子可以介导 *hr3* 与基因启动子发生响应, 从而表现增强子的活性。随后用报告质粒与杆状病毒立即早期基因 *ie-1* 质粒共转染 *Bm* 细胞, 瞬时表达分析表明 *hr3* 同样可以增强目的启动子的转录, 进一步说明在病毒基因组中是立即早期基因 *ie-1* 在 *hr3* 与启动子的响应中发挥作用。如果将 *hr* 与含启动子的质粒共转染细胞时, *hr* 不表现增强作用, 既 *hr* 不以反式的方式刺激启动子的转录[Lu, *et al.*, 1997]。用 pBm595ubiluc 和 ppolhluc 与含 *hr3* 的质粒共转染 *Bm* 细胞, 实验结果表明单纯的 *hr3* 序列不能使目的启动子的转录增强, 这与前人的研究结果是一致的。如果在细胞转染后再用 BmNPV 感染细胞, 则可以检测到报告基因的表达, 说明 *hr3* 发挥反式作用时还需要其他病毒因子; 如果用 *ie-1* 质粒与上述质粒共转染 *Bm* 细胞, 则也可以检测到强的报告基因的表达, 说明 *ie-1* 在 *hr3* 与启动子的响应过程中, 发挥着一个桥梁的作用, 识别并转录 ubiquitin 基因与 *polh*

基因启动子，帮助 *hr3* 增强了目的启动子的转录作用。

## *IE-1*、*hr3* activating the late and very late gene promoter of BmNPV

**Abstract** Baculovirus homologous regions (*hrs*) act as viral DNA replication initiation sites, which also have been shown to enhance the expression of some baculovirus genes *in vitro*. Baculovirus immediately early gene product, IE-1, can transactivate the expression of genes, which expressed after it. In this study, BmNPV *hr3* was cloned into downstream of pBm595ubiluc or ppolhluc, which containing late *ubi* gene promoter or very late *polh* promoter, respectively, to study the effect of *hr3* and *ie-1* on late and very late gene promoter activity. The results showed that in BmNPV-infected cells, *hr3* could significantly enhance the activity of *ubiquitin* promoter, not only in *cis*-, but also in *trans*-. The promoter activity was increased by 62- and 1.4-fold, respectively, in *cis*- and in *trans*-. According to *polh* promoter, *hr3* could increase the expression of report gene about 283- in *cis*- and 1.8-fold in *trans*-. When co-transfected *ie-1* and reporter plasmid, *hr3* could increase *ubi* and *polh* promoter transcription about 210-and 621-fold in *cis*-, and 9-, 4.2-fold in *trans*-, respectively. At the early stage of transfection, report gene expression increased rapidly in the present of *ie-1* than BmNPV, and reversed at the late stage of transfection. When transfected *Bombyx mori* larvae, *hr3* also could enhance the expression of report gene at the present of *ie-1* only or BmNPV infected. In the presence of *ie-1*, deletion between -595 to -382 bp relative to ATG could reduce transcription of *ubiquitin* promoter remarkably. With continue deletion, the expression level of luciferase was reduced, but still could be detected. The results suggested that *cis*-acting elements responsive to *ie-1* was mainly present within -595 to -382 bp upstream of ATG, and 26 bp promoter fragment was the core promoter region.

**Key words** promoter; enhancer; trans-activator

## 第六章 参与杆状病毒泛素基因转录的病毒因子的研究

### 摘 要

本文报道一种基于杆状病毒基因组 DNA 文库的、用于筛选参与杆状病毒晚期基因表达的病毒因子的方法。在杆状病毒晚期 *ubi* 基因启动子下游插入受其控制的萤火虫荧光素酶报告基因,构建了报告质粒 pBmubi595luc。瞬时表达分析显示,报告质粒单独转染细胞时,检测不到报告基因的表达。报告质粒与杆状病毒立即早期基因 *ie-1* 共转染 *Bm* 细胞,可检测到低水平的报告基因表达,即 IE-1 对晚期基因 *ubi* 的表达是必需的但非有效的,还需要其它病毒因子的参与才能有效的调控 *ubi* 基因的转录。本实验中将报告质粒、*ie-1* 和文库 DNA 共转染 *Bm* 细胞,筛选能够激活报告基因表达的文库质粒 DNA。序列分析后,将不同质粒中含有的重复基因酶切或 PCR 亚克隆到普通载体中,再次与 *ie-1* 和报告质粒共转染 *Bm* 细胞,最后确定在 IE-1 存在时,LEF-6、LEF-11、HE65 和 P35 均参与了杆状病毒晚期基因 *ubi* 的表达;另外,在 BmNPV 基因组中的 gp104-gp107 以及 gp118-gp119 片段也能够对 *ubi* 启动子发挥一定的转录激活作用。

**关键词** 杆状病毒因子;瞬时表达;IE-1;泛素基因启动子

杆状病毒基因的表达是以一种有序的极联形式进行的,其基因表达主要分为三个时期:早期、晚期、极晚期,杆状病毒对这三个时期表达的基因具有独特的分子调控方式。早期基因的转录是通过宿主的 RNA 聚合酶起始的,晚期和极晚期基因的转录则是通过病毒 RAN 聚合酶和早期基因的产物共同起始的 [Huh and weaver. 1990],其基因的表达受早期蛋白的反式调控和晚期基因启动子中 DNA 序列的顺式调控。目前已鉴定了多个病毒晚期基因表达因子,但特异性参与病毒晚期基因表达的病毒基因并没有完全确定。一些杆状病毒早期基因表达产物,如 IE-0、IE-1、IE-N、PE-38、CG-30 和 ME-53,在瞬时表达分析中被认为具有基因表达调控功能[Passarelli and Miller. 1993c]。IE-1 被认为是对早期基因活性很强的反式激活子 [Guarino and Summers. 1986a],前期研究表明,在瞬时表达分析中,单独的 IE-1 能反式调控晚期基因[Guarino and Summers. 1988],并且这种反式作用可被其他杆状病毒基因所增强[Guarino and Summers. 1986b]。

本实验中我们建立了一种方法,用于鉴定参与杆状病毒晚期或极晚期基因表达的病毒因子。该方法利用萤火虫荧光素酶基因作为报告基因,并使之受控于杆状病毒晚期 *ubi* 基因启动子,将该质粒与 *ie-1*、BmNPV 基因组文库 DNA 共转染 *Bm* 细胞进行瞬时表达分析,筛选参与 *ubi* 基因表达调控的病毒因子。

## 6.1 材料方法

### 6.1.1、病毒和细胞

本实验中利用野生型的家蚕核型多角体病毒感染家蚕幼虫，收集血淋巴并抽提其中的病毒 DNA 用于构建病毒基因组文库。家蚕及细胞按常规方法培养。

### 6.1.2 BmNPV 基因组文库构建、瞬时表达分析

参照第三章

### 6.1.3 DNA 共转染

用一定比例的报告质粒、*ie-1* 质粒和病毒文库 DNA 共转染 24 孔板培养的 *Bm* 细胞，48 h 后收集细胞进行 luciferase 活性测定。本实验中同时用正常生长细胞、报告质粒单独转染 *Bm* 细胞、报告质粒与 *ie-1* 共转染 *Bm* 细胞作为对照。

### 6.1.4 重组质粒的构建

报告质粒包含杆状病毒晚期 *ubi* 基因启动子和萤火虫荧光素酶基因；通过 PCR 方法扩增了杆状病毒立即早期基因 *ie-1* 片段并 T/A 克隆到 pGEM-T-easy 载体中；病毒 DNA 片段克隆到末端半补平的 pUC19 载体中；来自于能够反式激活 *ubi* 启动子转录的文库 DNA 片段亚克隆到 pGEM-3Z 或 pGEM-T-easy 载体中。其中，*lef-6* (BamH /Pst)  $\lambda$  *lef-11* (Hind /Xba)  $\lambda$  *he65* (Hind /Xba)  $\lambda$  *gp105-gp107* (Hind /BamH) 克隆到相同酶切的 pGEM-3Z 载体中；*p35*、*gp104*、*gp118-gp119* 则是 PCR 扩增后 T/A 克隆到 pGEM-T-easy 载体；*gp118 only* 和 *gp119 only* 分别是 *gp119* 和 *gp118* 发生突变的 DAN 片段，分别克隆到 pGEM-T-easy 载体。所有克隆的片段均进行序列测定。PCR 反应所用引物如表 6.1 所示。

表 6.1 扩增病毒因子所用引物

Table 6.1 Primers used in viral factors amplification

name of primers	sequence	used in the experiment
p35-F	GACTCGTTGAAACGTGTTCGTC	Used for p35 gene amplification
p35-R	CTCAAATCTTGCGTTACGTGTAG	
gp104-F	CCGTGTCATACGATACCACATTG	Used for gp104 gene amplification
gp104-R	CTCGTTATGATTTTCATCATTTGATAGTG	
gp118-F	GTGCGTACTGTAACGATTTTAGCTC	Used for gp118 and gp119 gene amplification
gp119-R	ATCGTTGTTCTTGCGCGTAACGC	
gp118M-F	CAAAAATTCAAATGTTGCAAAG	Used for only gp119 gene amplification
gp118M-R	CTTTGCAACATTTGAATTTTGTG	
gp119M-F	CGGACATATTTTATATACACGAG	Used for gp118 gene amplification
gp119M-R	CTCGTGTATATAAAATATGTCCG	

## 6.2 结 果

### 6.2.1 BmNPV 文库 DNA 对 *ubi* 启动子转录的影响

本研究中首先用 *ie-1* 和报告质粒共转染 *Bm* 细胞，能够检测到微弱的报告基因表达。为了确定参与反式转录晚期 *ubi* 基因需要的病毒因子，本文构建了野生型 BmNPV 基因组 DNA 文库。用基因组文库 DNA、杆状病毒立即早期基因 *ie-1* 与 pBmubi595luc 质粒 DNA 共转染 24 孔板培养的 *Bm* 细胞，48 h 后收集细胞进行荧光素酶活性测定，在 *ie-1* 基因存在的条件下，筛选了 16 个文库质粒能够显著增加报告基因的表达量（见表 6.2）。本实验中同样用其它如 *ie0*、*ie2*、*cg30*、*me53* 和 *pe38* 等早期基因共转染，但检测不到荧光素酶活性。

表 6.2 对 *ubi* 启动子具有激活作用的 DNA 文库质粒分析Table 6.2 BmNPV genomic libraries DNA that can stimulate the *ubi* promoter transcription

	Lib plasmid	BmNPV sequence	ORFs in common	CPM
pBmubi595-luc + pIE-1 +	Lib7 <sup>#</sup>	93222-97237	gp104-107	160400±1459.64
	Lib13 <sup>#</sup>	91058-95532		118352.1±1372.88
	Lib60 <sup>#</sup>	22831-27575	gp026-034 (lef-11)	43740.03±835.43
	Lib107 <sup>#</sup>	22394-27216		8736±373.9
	Lib506 <sup>#</sup>	21358-27575		12912±454.50
	Lib76 <sup>#</sup>	122482-127733	gp138-142	14400.01±479.52
	Lib361 <sup>#</sup>	123964-128397	(bro-d、bro-e)	4700±274.01
	Lib138 <sup>#</sup>	16087-22712	gp020-023 (lef-6)	249960±199.68
	Lib194 <sup>#</sup>	18422-22712		578216.1±3064.55
	Lib 426 <sup>#</sup>	17788-23765		19440.01±557.93
	Lib141 <sup>#</sup>	101136-107264	gp118-120 (p35)	317200.2±2252.12
	Lib224 <sup>#</sup>	105105-111534		290848.4±2152.28
	Lib366 <sup>#</sup>	105420-109796		51776.67±828.43
	Lib259 <sup>#</sup>	81720-88603	gp091-093	77534.3±938.17
	Lib459 <sup>#</sup>	78463-86789	(he65)	229208.6±1627.38
	Lib470 <sup>#</sup>	115898-123016		4268±262.05

Using BmNPV genomic library DNA, *ie-1* and report plasmid, pBmubi595-luc, co-transfected *Bm* cells to screening the DNA plasmid, which can stimulate the transcription of *ubi* promoter at the present of *ie-1*, then the library DNA was sequenced and analyzed. Mock cells, report plasmid, *ie-1* and pBmubi595-luc co-transfected cells as different control.

### 6.2.2 对 *ubi* 启动子具有激活作用的病毒因子

对能够激活 *ubi* 启动子转录的质粒测序后, 与 Genbank 公布的 BmNPV 基因组序列进行比对发现, cy7<sup>#</sup>与 cy13<sup>#</sup>共同有 gp104-107; cy60<sup>#</sup>与 cy107<sup>#</sup>、cy506<sup>#</sup>共同有 gp026-031 (*lef-11*); cy76<sup>#</sup>与 cy361<sup>#</sup>共同有 gp138-142 (*bro-d*、*bro-e*); cy138<sup>#</sup>与 cy194<sup>#</sup>、cy426<sup>#</sup>共同有 gp020-025 (*lef-6*) 和 cy141<sup>#</sup>与 cy224<sup>#</sup>、cy366<sup>#</sup>共同有 gp118-120(*p35*); cy259<sup>#</sup>与 cy459<sup>#</sup>共同有 gp091-093(*he65*); cy470<sup>#</sup>没有重复, 杆状病毒晚期表达因子 *lef-6* 和 *lef-11* 均分别出现在三个文库质粒中; *he65* 出现在两个文库质粒中; *p35* 出现在 3 个中, gp118、gp119 位于 *p35* 基因 ATG 的上游; 其它还有 gp104-107 共同出现在两个文库质粒中, 还有两个质粒共同含有 *bro* 家族的 d、e。根据不同质粒中包含的重复基因, 通过 PCR 或限制性酶切获得单个的开放阅读框, 亚克隆到转移载体, 再次与 *ie-1*、pBmubi595luc 共转染 *Bm* 细胞, 证明 *he65*、*lef6*、*lef11* 和 *p35*, 同时有 gp104~107、gp118~119 片

段, 参与了 *ubi* 基因的转录调控 (见表 6.3)。

表 6.3 病毒因子存在时, *ubi* 启动子控制的报告基因表达量分析

Table 6.3 Luciferase activities that controlled by *ubi* promoter, in the present of viral factors

Name of plasmid		CPM
pBmubi595-luc		16±16
		960±123.94
	pLEF-6	4464±267.39
	pLEF-11	5336±292.41
pBmubi595-luc	pHE65	25040±578.42
	pP35	5708±301.95
+	pGP104	7776±353.03
	pGP105~GP107	836±32.02
pIE-1		
+	pGP104+pGP105~GP107	12044±438.40
	pGP118-GP119	11820±434.98
	pGP118 only	6788±329.22
	pGP119 only	6046.67±284.19

Co-transfecte *Bm* cells with cloned repeat gene plasmid, *ie-1* and pBmubi595-luc, the expressed luciferase activity were detected. Using pBmubi595-luc transfect *Bm* cells or co-transfect with *ie-1* as control.

### 6.2.3 病毒因子的突变分析

在筛选的病毒基因中, 其中有 4 个为以前报道过的病毒晚期表达因子, 另外的 *gp104~107*、*gp118~119* 目前还没有相关文献资料。本实验中通过限制性酶切获得了包含完整 *gp105~107* 的片段, 亚克隆到 pGEM-3Z 载体中与报告质粒和 *ie-1* 共转染, 结果不能反式调控报告基因的表达, 通过 PCR 方法获得了 *gp104* 的编码框, 同样共转染发现对 *ubi* 基因启动子具有微弱的转录增强作用, 同时加入含 *gp105~107* 的质粒共转染, 则极其显著的提高报告基因的表达量; 通过 PCR 扩增了包含 *gp118~119* 的片段, 共转染能够激活报告质粒启动子的转录。对这两个基因进行了移码突变, 破坏其编码框, 结果表明与未突变的编码框相比, 突变后无论单独的 *gp118* 或 *gp119* 对 *ubi* 基因启动子的转录活性均有一定的激活作用, 同时 *gp118* 和 *gp119* 联合对 *ubi* 启动子具有更强的激活作用, 具体机理还需要进一步的研究。结果如表 6.3。

### 6.3 讨 论

杆状病毒基因表达是一个级联事件,晚期与极晚期基因的表达依赖于病毒 DNA 的复制。*ubi* 基因为晚期基因,其表达受其它极早期或早期基因的调控。本文构建了野生型 BmNPV 基因组 DNA 文库,用以筛选参与调控 *ubi* 基因启动子转录的其它病毒因子。最后确定 *he65*、*lef6*、*lef11*、*p35* 以及病毒基因组中以前没有确定功能的 *gp104~gp107* 以及 *gp118*、*gp119* 均参与了晚期基因 *ubi* 的表达。

瞬时表达分析揭示立即早期基因启动子在没有其它病毒基因产物存在的情况下可被充分活化,表明杆状病毒立即早期基因是由宿主细胞 RNA 聚合酶 转录的。早期基因启动子的转录则需要一个或多个立即早期基因产物的参与[Wu, *et al.*, 1993]。与早期基因不同,晚期与极晚期基因的表达还依赖于病毒 DNA 的复制[Erlandson, *et al.*, 1985]。杆状病毒 *ubi* 基因属于晚期基因,需要其它早期基因表达产物的刺激才能获得有效表达。Northern blot 分析证明该基因在感染后约 12 h 开始持续表达,并具有多个转录本。本研究中构建了 BmNPV 病毒基因组 DNA 文库,结合瞬时表达分析,对参与 *ubi* 基因表达的病毒基因进行了筛选与鉴定。试验发现,IE-1 蛋白与其它晚期基因表达因子 LEF-6、LEF-11、P35 及早期基因 *he65* 的表达产物共同参与了杆状病毒 *ubi* 基因的表达,即杆状病毒 *ubi* 启动子的转录活性能被病毒反式作用因子刺激而加强。在 *ubi* 基因启动子分析实验中,含 IE-1 和 LEF-6 或 LEF-11 的质粒在瞬时表达中对启动子的激活情况与 BmNPV 病毒有所不同,暗示病毒基因组中可能存在某些病毒调控蛋白对 *ubi* 基因启动子具有调控作用。因此,与含有一种或几种病毒调控蛋白基因的质粒相比,在整个病毒基因组存在下得到的结果可能更加真实的反映在感染细胞中 *ubi* 基因启动子的调控情况,以及在病毒复制晚期病毒调控蛋白与细胞特异性因子之间的相互作用。

相对于 *polyhedrin*、*p10* 基因启动子,*ubi* 基因启动子为弱启动子,到目前为止,基本没有对杆状病毒弱启动子的详细研究。本文通过瞬时表达分析,研究了杆状病毒弱 *ubi* 基因启动子的功能及调控,对研究杆状病毒的进化等将产生积极的作用。

## Viral Factors Involved in the Transcription of *Ubi* Gene from BmNPV

**Abstract** In this study, we developed a method to identify baculovirus genes required for late *ubi* gene expression that is based on co-transfection BmNPV genomic library DNA, reporter plasmid and immediately early gene, *ie-1*, in transient expression assay. A plasmid, pBmubi595luc, containing the *luciferase* gene under the control of BmNPV late *ubi* gene promoter was constructed. Transient expression assays indicated that the late promoter was active in *Bm* cells co-transfected with *ie-1* and some BmNPV DNA but not when pBmubi595luc was transfected alone. Low levels of luciferase activity were observed in cells co-transfected with *ie-1* and reporter plasmid. That is to say, *ie-1* was necessary but not sufficient for transcription of the *ubi* promoter, it need some other genes to co-regulate the transcription of *ubi* promoter effectively. Using this assay, we found that four genes, *lef-6*, *lef-11*, *he65* and *p35*, located in BmNPV genome were involved in transcription of the late *ubi* gene promoter, in the present of *ie-1* DNA. However, another genes identified in the BmNPV genome were specifically required for expression from the *ubi* promoter. These were gp104 to gp107, gp118 and gp119.

**Key words** baculoviral factors; transient expression; *ie-1*; *ubi* gene promoter

## 第二部分 耐高温葡萄糖苷酶在家蚕-BmNPV 中的表达

### 第七章 引言

杆状病毒是以无脊椎动物为专性寄主的多家族病毒，是已知昆虫病毒中的最大类群，也是发现最早、研究最多且极具实用意义的病毒。杆状病毒作为外源基因的表达载体，由于具有类似于真核生物的翻译后加工修饰系统和高效表达外源基因的能力等特点，已经在病毒学、分子生物学、药理学、病理学、生物药物领域广泛应用，现已成功表达了近千种高价值蛋白。同时，昆虫杆状病毒表达系统还具有安全性高，对外源基因克隆量大，重组病毒易于筛选等优点，因而有着广泛的应用前景[Possee, 1997]。随着杆状病毒载体的不断改进，该系统获得重组病毒的几率已从最初的 0.1-1% 提高到现在的 80-90% 以上，并出现了一些新的宿主域扩大的昆虫杆状病毒载体和高水平表达重组蛋白的昆虫细胞系。它所含有的糖蛋白在病毒繁殖、感染宿主的生命周期中，特别是在细胞识别、分泌及在蛋白质的加工、折叠和稳定方面，都起着不容忽视的重要作用。杆状病毒载体将在未来的药物研发、疫苗生产、基因治疗、重组杆状病毒杀虫剂等领域得到广泛的应用。

#### 7.1 杆状病毒表达系统研究

20 世纪 80 年代早期, Summers 研究小组 [Smith, *et al.*, 1983] 与 Meada [Maeda, *et al.*, 1985] 分别创建了 AcMNPV/秋粘虫和 BmNPV/家蚕杆状病毒表达系统。早期的杆状病毒表达系统有很多不足，如重组效率低、筛选困难、操作周期长、产物不易纯化等。随着杆状病毒表达系统的迅速发展及不断完善，已成为当今基因工程领域四大表达系统之一，在研究基因表达调控、蛋白质结构和功能分析及各种生物活性物质的制备等方面发挥着越来越重要的作用。

##### 7.1.1 转移载体的发展

杆状病毒转移载体根据表达外源基因的能力分为单一表达载体和多元表达载体。目前多数杆状病毒单一表达载体多在 *polh* 与 *p10* 基因启动子下游插入多克隆位点，利用其强晚期启动子的特性驱动外源基因的表达。另外，杆状病毒早期基因启动子如 *pcna*、*ie-0* 和 *ie-1* 等也用于杆状病毒表达载体，外源基因的表达时间提前，但杆状病毒早期启动子的活力普遍不高，表达效率较低，通过早期基因启动子与杆状病毒同源重复序列构建复合启动子盒可使表达开始早，表达水平高 [Chen, *et al.*, 2004; Gray, *et al.*, 2004; Olson, *et al.*, 2002]。多元表达载体含有两个或多个相同或不同

的启动子,可同时表达两个或多个外源基因。如 *polh* 和 *p10* 启动子以相反的方向插入基础质粒构建的转移载体,二者基因的表达各有其各自的调控系统,互不影响,但外源基因的表达产量大大提高[Merrington. 1999; Weyer and Possee. 1991]。

### 7.1.2 亲本病毒及重组介质的改良

最先的杆状病毒表达系统是利用野生型病毒作为亲本病毒,重组效率低,筛选困难。BEVS 的最大改进之一是通过亲本病毒的线性化降低了野生型病毒背景,使重组病毒的比例达到了 95% 以上,提高了重组病毒的筛选效率[Kitts and Possee. 1993]。酵母筛选系统的出现打破了传统的以昆虫细胞作为重组的概念。Patel 等构建了一种能在酵母中繁殖的杆状病毒,从而省略了繁琐的挑斑过程,获得重组病毒的时间缩短至 10-12 d,但易出现假阳性、转染效率不高[Patel, *et al.*, 1992]。大肠杆菌-昆虫细胞穿梭载体系统为一种新兴的杆状病毒载体系统,同时也是目前最为方便、快捷的载体系统,能使重组病毒的筛选工作缩短至 7-10 d,而且重组效率极高[Leusch, *et al.*, 1995; Luckow, *et al.*, 1993]。但表达量较传统的同源重组略有下降,可能是 *polh* 启动子的工作环境由于外源基因的插入而遭到了破坏造成的。Godeau 等将单纯疱疹病毒 I 型的胸苷激酶基因引入极早期基因 *ie-1* 启动子之下,构建了重组拯救缺陷型表达系统[Godeau, *et al.*, 1992]。该方法只需要一轮筛选,且外源基因的表达量也较高。

### 7.1.3 外源蛋白表达的影响因素

一些影响杆状病毒系统表达外源基因产物的因素在近两年得到了研究。利用病毒晚期强启动子驱动表达外源基因,其影响因素除了病毒本身,还与受感染细胞的种类、状态及培养基的情况等有关。(1) 一般情况下,杆状病毒在细胞中多次传代后,可能引起基因组的变化,尤其是形成包涵体病毒的能力降低[Kool, *et al.*, 1995]。这会造成外源基因的表达水平降低。(2) 不同启动子类型的选择也会显著影响外源基因表达水平,目前最常用的启动子为晚期 *polh* 和 *p10* 启动子及少量的早期启动子,同一目的基因在不同启动子控制下,表达水平会有很大的差异[DiFalco, *et al.*, 1997]。(3) 外源基因 5' 及 3' 端非编码区长度在 3-400 bp 范围,且起始密码子附近序列符合 Kozak 规则,表达效果最好[Kozak. 1986]。(4) 保留一部分多角体 5' 端序列与外源基因以相同的框架相融合,表达水平最高;如果框架不同,那么从距启动子最近的起始码开始翻译,表达产物水平相对偏低[Sriram, *et al.*, 1997]。(5) 杆状病毒吸附宿主细胞的动力学参数是影响细胞感染效果和表达物产量的因素之一。Petricevich 等研究发现影响细胞感染效果的主要参数是胎牛血清浓度。不用胎牛血清或经高温处理后再使用,反而可以获得更高浓度的表达产物[Petricevich, *et al.*, 2001]。(6) 重组病毒感染 Sf21 的效果与细胞周期有关,该研究结果对于选择病毒感染宿主细胞的时期有一定的借鉴意义[Saito, *et al.*, 2002]。(7) Olejnik 等采用补料分批培养讨论了高渗透压对昆虫细胞表达重组蛋白产量的影响,其实验结果对于提高重组蛋白的产量具有重要意义[Olejnik, *et al.*, 2003]。

#### 7.1.4 表达系统的应用

由于昆虫杆状病毒表达系统独特的性质, 现已被广泛应用于药物研发、疫苗生产、重组病毒杀虫剂等众多领域中。

##### 7.1.4.1、基础研究

随着人类基因组测序工作的完成, 功能基因组学将成为人类基因组计划的延伸。功能基因组学的研究需要生产大量的蛋白质。杆状病毒表达系统的简便, 快速等优点, 使其最适合于大量生产这些蛋白。日本学者已经在这方面进行了有益的探索[Akihiro. 2001]

##### 7.1.4.2、表达具较大潜力的高价值的药用物质

重组杆状病毒在昆虫细胞内表达的外源蛋白几乎都是可溶性的, 其抗原性、免疫原性以及生物功能非常接近天然来源的分离物。由杆状病毒表达系统生产人用疫苗的研究开始于 20 世纪 80 年代对 HIV 疫苗的研究, 疟疾疫苗也于 90 年代进入临床。虽然该系统来源的重组蛋白对人是安全的, 但由于这是一个新的宿主系统, 且发达国家无养蚕业, 以及这两种疾病的特殊性, 所有其表达产品并未被使用。国内口服重组表达的多肽药物已有开发, 正进入药物审批阶段。在兽用疫苗方面, 已有多种病毒的保护性抗原基因经杆状病毒避过虐待系统制造出有免疫效力的实验室亚单位疫苗, 如牛乳头瘤病毒、鸡传染性贫血病病毒、鸡新城疫病毒、猪轮状病毒、伪狂犬病毒等数十种动物病毒抗原蛋白先后被 BEVS 表达和纯化, 其中相当一部分正在进行商品化开发。另外, 已有一定数目的 AcMNPV 生产鱼出血性败血病病毒疫苗用于水产等方面[Ohura. 2000]。

##### 7.1.4.3、进行重组杆状病毒杀虫剂的研究

在害虫综合治理中, 化学农药部分地被取代是一个趋势, 对取代化学农药的杀虫剂要求更加高效、廉价、并有利于环境安全。NPV 用作生物杀虫剂的突出优点是对人体安全, 不伤害害虫的天敌, 不污染环境; 但其过高的宿主特异性与缓慢的发病致死作用也影响了病毒杀虫剂商品化的速度。目前, 国内外科学家正致力于用不同类型的外源毒素基因来构建新的重组杆状病毒, 或者通过影响昆虫激素分泌, 如敲除杆状病毒 *egt* 基因而防治害虫[Inceoglu, *et al.*, 2001]。

##### 7.1.4.4、将外源基因导入哺乳动物的细胞

向哺乳类细胞传递基因在基因治疗等方面具有重要意义。目前已有多种向哺乳类细胞传递目的基因的方法, 但在外源基因的大小、传递的有效性、细胞专一性、细胞毒性和安全性以及代价等方面普遍具有各自的优势和局限性。非病毒的基因传递方法多表达水平较低, 并对细胞有不同程度的毒性; 而病毒载体则会出现细胞病变等。近年的研究发现杆状病毒表达载体还可以用来介导外源基因进入到各种哺乳动物细胞, 并通过哺乳动物启动子的驱动使外源蛋白得到高效稳定的表达, 而其自身基因组并不复制和表达[Ghosh, *et al.*, 2002; Kost and Condreay. 2002]。1995 年, Hofmann 等首先将由巨细胞病毒极早期启动子驱动的荧光素酶基因重组至 AcMNPV 基因组, 并用

该重组病毒感染几种不同的哺乳动物细胞，结果报告基因获得了高效的表达[Hofmann, *et al.*, 1995]。此后，杆状病毒作为哺乳动物细胞表达载体系统不断地得到改进并被广泛地应用，可用于表达的宿主细胞系范围也不断扩大。Condreay 等报道杆状病毒载体除了介导外源基因在哺乳动物细胞内瞬时表达外，也可用于筛选稳定表达的细胞系[Condreay, *et al.*, 1999]。

昆虫杆状病毒系统虽然具有很多的优点，但其自身及其相关技术仍需要进一步完善提高，作为外源蛋白包括疫苗、各种治疗因子和诊断试剂的大规模商业化生产还存在着缺陷和局限性。首先，由于外源蛋白在该系统中只是瞬时表达，而且外源基因表达常发生在感染晚期，宿主细胞许多功能受阻，蛋白质加工能力降低；其次，多次感染循环会产生缺损干扰病毒，它影响并限制该系统有效生产时间等问题都有待进一步解决。此外，昆虫细胞蛋白加工途径与更高等的真核细胞不完全一致，糖基化方式与哺乳动物细胞存在一定差异，其生产的重组糖蛋白一般仅具有高甘露糖或寡甘露糖型糖链，糖链末端极少带有半乳糖、唾液酸残基，难以生成复杂型糖链[Ailor, *et al.*, 2000; Breitbach and Jarvis. 2001; Tomiya, *et al.*, 2004]。Jarvis 等通过在 AcMNPV 中导入半乳糖基转移酶基因和唾液酸转移酶基因，构建了一种能够在鳞翅目昆虫细胞中唾液酸化重组糖蛋白的新载体[Jarvis, *et al.*, 2001]。随后 Hollister 等用哺乳动物半乳糖基转移酶基因和唾液酸转移酶基因转化 Sf9 细胞，得到了糖基化能力很强的 Sf 细胞系，所表达的糖蛋白糖链末端几乎都带有唾液酸或果糖末端[Hollister and Jarvis. 2001]。

在昆虫杆状病毒系统的基础研究和应用技术研究方面，目前的杆状病毒基因组学，特别是功能基因组学的研究相对薄弱，有关病毒晚期基因的高效表达和调控机制等仍不十分明确；杆状病毒可能的其它宿主还没有完全清楚[Lynn. 2003]；表达产物的纯化和多元表达等方面的技术仍不够完善[Hu, *et al.*, 2003]。

对昆虫杆状病毒表达外源蛋白能力的改进方面，可加重对杆状病毒功能基因组学方面的研究，通过构建稳定表达哺乳动物糖基转移酶的昆虫杆状病毒表达系统，在培养时添加 N-乙酰葡萄糖胺酶抑制剂及调整培养条件，适当选择培养细胞等基因工程及代谢工程手段构建新的昆虫糖基化工程可改善昆虫杆状病毒的糖基化处理能力，拓展昆虫杆状病毒表达系统对所表达外源蛋白的糖基化处理能力，形成接近天然构型的糖蛋白。

当前应重点加强杆状病毒的基因组学，特别是功能基因组学的深入研究，一是有助于杆状病毒载体的进一步改良，二是随着一些调节外源蛋白表达的基因结构和功能的深入了解，有利于外源基因的高效表达和调控。

## 7.2 高温 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的研究情况

$\alpha$ -葡萄糖苷酶 ( $\alpha$ -glucosidase)，该酶属于水解酶类，又称  $\alpha$ -D-葡萄糖苷水解酶，是纤维素分解酶系中的重要组成部分。可水解结合于末端、非还原性的  $\alpha$ -葡萄糖苷键，同时释放  $\alpha$ -D-葡萄糖和相应的配基。生物体中该酶多以单体或二聚体形式存在。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶在高等动植物及细菌、微生物中广泛存在。在微生物领域， $\alpha$ -葡萄糖苷酶是一种重要的纤维素酶类，纤维素酶类包括内切  $(1,4)$ 葡聚糖酶、外切  $(1,4)$ 葡聚糖酶和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶，此三种酶类先后作用，共同将纤

纤维素水解成葡萄糖。在纤维素的糖化作用中， $\alpha$ -葡萄糖苷酶将纤维素二糖和纤维素寡糖水解成葡萄糖，且能强烈的影响纤维素的水解速度。近年来，已成功的从动植物、微生物中分离、纯化、鉴定出高活力、低底物抑制的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶，并进行了广泛的酶学性质研究[Falk and Rask. 1995; Gonzalez-Candelas, *et al.*, 1990; Grabnitz, *et al.*, 1991; Misawa and Nakamura. 1998; Xu and Grabowski. 1998]。

$\alpha$ -葡萄糖苷酶在自然界广泛分布，几乎在所有的生物体中都有存在，但植物或动物来源的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性远比微生物来源的要低。目前高温葡萄糖苷酶主要来自于一些高温性的细菌或古细菌，如耐热嫌气菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、嗜热链球菌等，而在酵母菌和霉菌中存在较少。自然界中微生物来源的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶源菌其产酶能力相对较低，其中细菌的酶活又比酵母菌和霉菌低一些。而在高温细菌中，细胞产 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的能力普遍不高，所以，尽管高温菌来源的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶从其性质来讲非常理想，但要达到工业化应用首要的问题应是大幅度提高其酶的产量及比活。

## 7.2.1 $\alpha$ -葡萄糖苷酶主要应用

### 7.2.1.1、降解乳糖和生成低聚半乳糖

牛乳和乳清中含有大量乳糖，它是乳制品中的主要碳水化合物。但世界上约有 70% 的人因葡萄糖苷酶的缺乏和乳糖不耐受而影响了乳制品中营养物质的摄入[Goldberg and Tewari. 1989; Rosado, *et al.*, 1987]。乳糖不易发酵，溶解度较低。在冷冻制品中易形成结晶影响食品加工性能，液态牛奶在通过管道进行超高温瞬时杀菌时乳糖的存在会产生胶状物堵塞管道。乳清中的大量乳糖使得乳清的排放造成很大的环境污染问题。乳糖经葡萄糖苷酶水解生成其组分单糖-葡萄糖和半乳糖，不仅大大改善了其加工性能，而且甜度提高，发酵性能好，更易被小肠消化吸收。

### 7.2.1.2、合成或修饰其它碳水化合物以及促进果蔬软化和成熟

利用酶的选择性来实现复杂碳水化合物的区域定向和立体定向合成，比传统的化学方法要简便，操作清洁温和。利用 $\alpha$ -葡萄糖苷酶的糖苷转移作用人工合成糖苷化合物，这对食品添加剂、药品和其它生理活性物质的合成有潜在意义。

早期的研究表明，糖苷酶对糖苷的亲水受体无严格的专一要求，唯一的限制因素即受体的水溶性。用固定化的 $\alpha$ -半乳糖苷酶催化合成的中等链长的醇基-糖苷表面活性剂，已成为食乳化剂中的重要一族。 $\alpha$ -葡萄糖苷酶普遍存在于各种植物中，了解它在果蔬各个生长时期的含量对于果蔬的成熟、风味、颜色及采收后加工都有重要意义。一般在植物成熟期 $\alpha$ -葡萄糖苷酶含量增加，它降解含糖苷的胞壁。目前多已用于梨、苹果、土豆和中国水栗的软化和番茄、胡椒、甜瓜、樱桃、核果和牛油果的成熟。

### 7.2.1.3、利用 $\alpha$ -葡萄糖苷酶筛选好的基因

在各种表达系统中的可能表达效果是基因工程中常用的筛选基因表达系统方法。巴斯德毕氏酵母 *Pichia pastoris* 由于其生长能达到非常高的细胞浓度 (120 g/L) 具有严格控制的启动子和高

效的分泌系统,已被作为高水平表达多种重组蛋白的有机体。以 $\alpha$ -半乳糖苷酶基因作为外源基因,融合到 *Pichia pastoris* 的乙醇氧化酶基因 AOX1 启动子的下游,并研究这个组合模型在乙醇氧化酶缺陷型菌株的融合蛋白生产情况。通过测定表达物中的 $\alpha$ -半乳糖苷酶的活力来优化这一表达系统。实验结果认为以甘油为碳源进料速率为 1g/Lh 时,融合蛋白表达效果最好,这时测得酶活力为  $8.62 \times 10^7 \text{U/g}$  干细胞重。

#### 7.2.1.4、在免疫、检测及疾病诊断方面的应用

免疫学方面,将 $\alpha$ -葡萄糖苷酶与人体胞外淀粉状蛋白前体融合形成融合蛋白,可作为 Alzheimer 病的免疫源,并进一步制备其单克隆抗体。还有报道将 $\alpha$ -葡萄糖苷酶作为一种辅蛋白,用来稳定和增加 UR5-UR1 融合蛋白的溶性,以此作为猫白血病病毒 gp70 的疫苗。在诊断方面,将抗菌性 HIV 病毒基因与 $\alpha$ -葡萄糖苷酶基因重组后作为诱导基因在 COS 细胞中产生缺陷型病毒,最后在 CD<sup>4+</sup>靶细胞中表达 $\alpha$ -葡萄糖苷酶。用这一系统可定量 HIV 利用循环的早期抑制作用,并预先化合物抗 HIV 的活性。在环境检测方面,大肠杆菌 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性检测可快速分析浴场和渔场地区海水水体受排泄污染程度。

生物技术的发展使生产的 $\alpha$ -葡萄糖苷酶纯度更高,活性更强,更利于生产上实际操作。对其反应机制,动力学行为的深层研究,使此酶的应用不再仅仅局限于乳糖水解,广泛应用在食品、医药、免疫、环境检测等各个领域。也由于近 20 年来基因工程、酶工程、蛋白工程的迅猛发展,对编码此酶的基因及其表达调控在分子水平上做了大量深入研究,如重组基因、融合蛋白等,反过来也促进了生物技术诸多领域的发展。

## 第八章 耐高温葡萄糖苷酶在家蚕杆状病毒表达载体系统中的表达、特性分析及纯化

### 摘 要

$\alpha$ -葡萄糖苷酶是一种特异性催化各种低聚糖分解为  $\alpha$ -D-葡萄糖的糖基水解酶。本研究中克隆了耐高温古细菌 *Pyrococcus furiosus* 中编码耐高温  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的 *celB* 基因,并使之位于多角体基因启动子的控制之下。与线性化的亲本病毒 BmBacPAK6 基因组 DNA 共转染 *Bm* 细胞,铺板纯化含有 *celB* 基因的重组病毒,注射家蚕 5 龄起蚕。根据 SDS-PAGE 和蛋白密度扫描认为,表达蛋白约占血淋巴总蛋白的 10%以上;平均每毫升血淋巴中目的蛋白表达量为 10,199.5 U,每头蚕中表达量为 19,797.4 U,对收获血淋巴中的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶进行热处理纯化,可得到约每毫克 885 U 的目的蛋白产物,其纯度约为 81%。对表达的重组蛋白进行酶活性分析,该耐高温  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的最适反应条件为 105  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 5.0,热稳定性检测表明该酶在二价离子和高盐对酶活性影响不大。与天然或原核表达的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶相比,酶学特性没有明显改变,但表达产量却得到了极其显著的提高。利用家蚕杆状病毒表达系统可为该酶的大规模生产提供有实际意义的途径。

**关键词**  $\alpha$ -葡萄糖苷酶; *Pyrococcus furiosus*; 杆状病毒表达系统; 特性分析

迄今为止,已从多种生态系统,主要为高温海域或湿地中分离了大量的耐高温古细菌或细菌 [Stetter, 1992]。耐高温微生物的最适生长温度为 90  $^{\circ}\text{C}$  左右,并且在 80-110  $^{\circ}\text{C}$  能很好的生长 [Stetter, *et al.*, 1990],由于其突出的耐热性,耐高温微生物具有很好的基础研究和生物技术应用 [Huber, *et al.*, 2000]。耐高温微生物的发现同时为分离耐高温酶提供了可能 [Adams, *et al.*, 1995; Niehaus, *et al.*, 1999]。分离自浅海高温温泉的 *Pyrococcus furiosus* 菌株的最适生长温度超过 100  $^{\circ}\text{C}$ ,该菌株通过复杂的酶网络分解利用多种复杂的糖原,这些酶多具有理想的工业应用价值。耐高温葡萄糖苷酶是 *P. furiosus* 酶系中重要的水解酶,目前被广泛应用于多种领域 [Fischer, *et al.*, 1996; Hansson, *et al.*, 2001; Splechtna, *et al.*, 2002]。目前工业所用  $\alpha$ -葡萄糖苷酶多来自于动物肝脏或其它微生物,从而导致了产量低、花费大、对高温敏感等缺点。耐高温  $\alpha$ -葡萄糖苷酶高温条件下分解底物,可大大提高反应效率,节省劳动力和生产成本。本实验中利用家蚕杆状病毒表达系统高效表达生产耐高温  $\alpha$ -葡萄糖苷酶,相对于其它原核表达系统,在基本的酶学特性未发生改变的同时,又极大的提

高了生产量和生产效力。

## 8.1 材料和方法

### 8.1.1 耐高温古细菌(*Pyrococcus furiosus*)基因组 DNA 的提取

*P. furiosus* (strain JCM8422)购自日本微生物收集中心,培养方法参照[Kengen, *et al.*, 1993]. 基因组 DNA 的提取方法参照[Laderman, *et al.*, 1993]。具体步骤如下,将 98 培养的 *P. furiosus* 菌液离心后,重悬于 0.5 ml 含有 25%蔗糖的 0.05 M Tris-HCl (pH 8.0)中,加入 100  $\mu$ L (5 mg/mL) 的溶菌酶;20 孵育 1 h,随后加入 SET 溶液 4 mL、5% SDS 500  $\mu$ L、10 mg/mL 蛋白酶 K 100  $\mu$ L;37 孵育 1 h,用苯酚/氯仿抽提,上清加入 2 $\times$  体积的无水乙醇沉淀 DNA, -20 放置 1 h 以上,离心后用 80%的乙醇洗涤沉淀,稍微晾干后将 DNA 重溶于 TE 中,或-20 保存于乙醇中备用。

#### 溶液配方:

**SET 溶液:** 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)

### 8.1.2 重组表达质粒的构建

根据 Genbank 登录的 *P. furiosus* -glucosidase (*celB*)序列(Genbank accession No. AF013169)设计引物,以 *P. furiosus* 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。

forward: 5'- GAGGGATCCAATATGAAGTTCCCAAAAACTTCATGT -3'

reverse: 5'- AAAGAATTCTGGCTACTTTCTTGTAACAAATTTGAG -3'

在引物的 5'端和 3'端分别引入了两个限制性酶切位点 BamH<sub>I</sub>、EcoR (用下划线标出)。PCR 反应循环体系设计为:94 5 min 充分变性后进入循环体系:94 , 1 min;55 , 1 min;72 , 3 min;共 30 个循环,然后 72 延伸 10 min。取 PCR 产物 10  $\mu$ L 电泳检测。酶切用玻璃奶法纯化回收的扩增产物,70 灭活后与同样酶切的 pEGM-3Z 连接、转化。挑取阳性克隆测序正确后用 BamH<sub>I</sub> /EcoR 酶切后插入杆状病毒转移载体 pVL1393 构建重组质粒 pVL-celB,酶切鉴定目的基因正确插入后用于同源重组。

### 8.1.3 超速离心法制备病毒 Bm-BacPAK6 基因组 DNA

收集 Bm-BacPAK6 病毒感染的细胞培养液或感染的家蚕血淋巴,5 000 r/min 离心 10 min,除去细胞沉淀(若仍有悬浮物可将上清再离心一次),上清 25 000 rpm 超速离心 1 h,用 1 mL 游离病毒抽提液悬浮病毒粒子,加蛋白酶 K 至终浓度 50  $\mu$ g/mL,50 保温 2 h;再加入 35%的 Sarkosel 至终浓度 1%,继续于 50 保温 2 h。分别用等体积的饱和酚、苯酚:氯仿(1:1)、氯

仿各抽提一次, 5 000 rpm 离心 5 min, 将上层水相转入新管中, 添加 1/10 体积的 3 mol/L NaCl (pH 6.5), 2 倍体积的无水乙醇, 20℃ 放置 2 h 以上, DNA 呈絮状沉淀, 5 000 rpm 离心 10 min, 用 70%乙醇洗沉淀一次, 稍晾干, 用适量 TE 溶解 DNA, 4℃ 保存备用。

#### 8.1.4 Bm-BacPAK6 基因组 DNA 的线性化

反应体积为 30  $\mu$ L, 其中病毒 DNA 20  $\mu$ L (约 1-2  $\mu$ g), Bsu36 酶 2  $\mu$ L, 相应的 10 $\times$  酶切缓冲液 3  $\mu$ L, ddw 5  $\mu$ L, 37℃ 温育 3-4 h。电泳检查酶切完全后, 将酶切混合物 65℃ 灭活 10 min, 4℃ 保存。

#### 8.1.5 共转染

接种约  $0.5-1 \times 10^6$  Bm 细胞于 15 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 贴壁培养过夜 (即细胞密度约为 80%)。除去含 FBS 的培养基, 用无血清培养基洗细胞二次, 再加 1 ml 无血清培养基。在 50  $\mu$ L 反应体系中加入线性化的 Bm-BacPAK6 病毒 DNA 1  $\mu$ g, 质粒 DNA 2  $\mu$ g, 脂质体 5  $\mu$ L 混合, 加水补足体积, 轻轻混匀, 27℃ 温育 15 min, 逐滴加入培养瓶中, 边加边摇匀。27℃ 培养 4-6 h 后倾去含转染液的无血清培养基, 补加 4.5 ml 无血清培养基并加入 500  $\mu$ L 的 FBS, 使其终浓度为 10%, 封口, 27℃ 培养 4-5 d, 至细胞浮起后, 收集上清液用于重组病毒的筛选。

#### 8.1.6 重组病毒的筛选、纯化和扩增

接种适量细胞 (平皿底部面积的 80%) 于 35 mm 小 dish 中, 27℃ 培养 16 h 至细胞贴壁后, 吸去培养基, 将共转染上清液按  $10^{-3}-10^{-5}$  作适当稀释后, 取 1 mL 稀释液加到贴壁细胞中, 分布均匀。27℃ 感染 1 h, 将 2% 低熔点琼脂糖凝胶于 60℃ 水浴中融化, 冷至 40℃ 与等体积经 40℃ 预热的 2 $\times$ TC-100 培养基 (含 20% FBS) 混合均匀, 添加 X-gal 使其终浓度达 150  $\mu$ g/mL, 沿小 dish 边缘将胶慢慢倒入, 凝固后用 Parafilm 封口, 27℃ 倒置培养 4-7 d。显微镜下选取无色重组病毒空斑, 超净台内用 Tip 头挑取重组病毒斑, 溶于 400  $\mu$ L TC-100 培养基中, 4℃ 放置 4 h 使病毒粒子释放出来, 取 100  $\mu$ L 病毒液感染 24 孔板中的细胞, 27℃ 培养 3 d 后, 取 150  $\mu$ L 感染细胞上清液按碱变性法快速制备病毒基因组 DNA, 进行 PCR 扩增分析。将能扩增出目的片段的病毒上清液铺斑进行第二次筛选。最终获得含目的基因的重组病毒。分别取 100  $\mu$ L 重组病毒感染正常生长的 Bm-5 贴壁细胞, 在感染后约 5 d 待细胞浮起后, 4℃ 保存, 用以注射。

### 8.1.7 PCR 鉴定外源基因的整合

取重组病毒感染的细胞上清 150  $\mu\text{L}$ ，加入等体积的 0.5 M NaOH 后混匀，再加入 20  $\mu\text{L}$  8 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ ，混匀后用等体积的苯酚、氯仿各抽提一次，酒精沉淀后用 20  $\mu\text{L}$  TE buf 溶解 DNA。参照多角体基因启动子序列在 ATG 上游 40 bp 处设计一条引物：

polh-F：5' -ACTGTTTTTCGTAACAGTTTTGTAA-3'

取上述抽提的病毒基因组 DNA 1  $\mu\text{L}$  为模板，以 polh-F/ CelB-R 为引物进行 PCR 反应。扩增条件：94  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min；94  $^{\circ}\text{C}$  1 min，51  $^{\circ}\text{C}$  1 min，72  $^{\circ}\text{C}$  2 min，30 个循环；72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。取 10  $\mu\text{L}$  的 PCR 产物进行凝胶电泳分析。

### 8.1.8 家蚕接种和样品的初步纯化

将纯化扩增的重组病毒以  $1 \times 10^5$  pfu 的量注射 5 龄第二天的蚕，注射约 120 h 左右冰上收集发病蚕的血淋巴，-20  $^{\circ}\text{C}$  冻存。或者适量的含重组病毒的蚕血淋巴 90  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 min，4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 rpm 离心 10 min 去除沉淀，上清用于酶活性分析及 SDS-PAGE 电泳。

### 8.1.9 $\alpha$ -glucosidase 表达时相

用稀释 50 倍的重组病毒细胞培养液按每头蚕  $1 \times 10^5$  pfu 的量注射家蚕 5 龄起蚕，收集注射后 24 h、48 h、60 h、72 h、84 h、96 h、108 h、120 h 的蚕血淋巴，-20  $^{\circ}\text{C}$  冷冻保存。

### 8.1.10 SDS-PAGE 电泳

5%浓缩胶、10%分离胶参照分子克隆配制。取发病蚕的血淋巴，用 PBS 稀释后，或者 90  $^{\circ}\text{C}$  水浴 15 min，低温离心后取上清，与等体积 SDS-PAGE 上样缓冲液混合，煮沸变性 3 min，冰上放置，各孔加 15  $\mu\text{L}$ ，加样完毕后，打开电源，浓缩胶时电压为 35 伏，分离胶时为 45 伏进行 SDS-PAGE 电泳分析。至染料迁移到距下口约 1 cm 时，停止电泳，进行染色和脱色，以标准蛋白质分子量对照目的蛋白的分子量。

8.1.11 cel B 标准曲线的制作

称取 0.028 g pNP，先溶解于 1 mL 甲醇中，再用 0.1 M pH 5.0 的缓冲液定容至 100 mL，配成 2 mM pNP 母液。取不同量的母液与 0.1 M 的缓冲液混匀，加入 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液 2 mL，测定 405 nm 波长的吸光值。根据吸光值绘制标准曲线。

	1	2	3	4	5	6	7
2 mM pNP (μL)	0	50	100	150	200	250	300
0.1 M buf (mL)	2	1.95	1.9	1.85	1.8	1.75	1.7
1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mL)	2	2	2	2	2	2	2
pNP 终浓度 (nM)	0	100	200	300	400	500	600
O.D 405 平均值	0	0.440	0.879	1.306	1.731	2.084	2.360

以 405 nm 波长的吸光值为横坐标，pNP 的摩尔浓度为纵坐标作图，得出公式如下：

$$U=(231.04X-1.2797)\times5\times N/10/1000$$

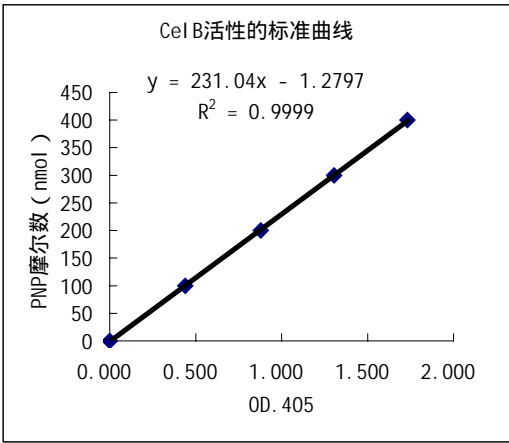
X: 405 nm 处吸光值；

5：将 200 微升稀释酶液中的酶活折算为 1 ml 的酶活性；

N：稀释倍数；

10：反应时间 10 min

1000：nmol 与 umol 的转换。



### 8.1.12 耐高温 $\alpha$ -glucosidase 的活性分析

所有活性分析至少重复三次。

#### 8.1.12.1、活力测定

活性分析方法参照[Kengen, *et al.*, 1993]并适当修改。含有终浓度为 1 mM pNPG 的 0.1 M 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.0) 1.8 ml 加温至 90 °C, 加入 200  $\mu$ L 适当稀释的酶样品, 90 °C 保温 10 min 后冰上终止反应。立即加入 2 ml 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  显色, 测定 405 nm 波长的吸光值。所有反应均以 90 °C 未加酶的 pNPG 作为校正(该温度只有低于 0.5% 的分解速率), 对照反应为未加酶的缓冲液, 其余步骤相同。

1 个单位 (U) 酶活性定义为给定条件下, 每分钟释放 1  $\mu$ mol pNp 所需要的酶量。

#### 8.1.12.2、最适温度、pH 与热稳定性

对于最适温度与 pH 的测定, 分别为将待测样品分别在 0.1 M pH 5.0 的醋酸-醋酸钠 buf 中, 于 70-100 °C 的水浴、100-140 °C 的油浴中保温; 或者在 90 °C, pH 范围在 2.5-8.0 的缓冲液中保温, 其余步骤同活性测定。

不同 pH 的缓冲液组成为: pH 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 的缓冲液为 0.1 M 柠檬酸-柠檬酸钠; pH 7.0、7.5、8.0 的缓冲液为 0.1 M 0.1 M 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠; pH 2.5 - 3.0 用两种缓冲液分别进行, 为 0.1 M 磷酸氢二钠-柠檬酸或 0.1 M 柠檬酸-柠檬酸钠; pH 6.0、6.5 为两种 0.1 M 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠或 0.1 M 柠檬酸-柠檬酸钠。

酶的热稳定性测定为酶样品在 0.1 M pH 5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液中分别在不同的温度范围中保温 10 min, 然后室温中复性 30 min, 测定方法同前。

#### 8.1.12.3、不同离子对酶活性的影响

在标准反应液中添加不同的金属离子以确定  $\alpha$ -glucosidase 的活性是否受反应环境中离子的影响。主要为 1 mM 的  $\text{CaCl}_2$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{CuCl}_2$ 、 $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{ZnSO}_4$  和  $\text{NaWO}_4$ 。为确定高离子强度对酶活性的影响, 在反应液中添加了浓度为 0.1-1.7 M 的  $\text{NaCl}$ 。其余步骤同酶活性测定。

## 8.2 结 果

### 8.2.1 *celB* 基因序列分析及重组质粒的构建

根据 Genbank 公布的 *celB* 基因序列, 设计了正反两条引物, 以耐高温古细菌 *P. furiosus* 基因组 DNA 为模板, 扩增了 *celB* 基因的完整 ORF, 克隆到转移载体 pEGM-3Z 的 BamH I/EcoR 位

点，将测序结果与 *P. furiosus* 基因组中的 *celB* 基因序列比对显示，PCR 扩增产物没有发生突变。将从转移载体中酶切得到的 *celB* 片段亚克隆到杆状病毒表达载体 pVL1393 中，获得表达质粒 pVL-*celB*，酶切鉴定结果表达基因已正确插入载体中。

8.2.2 同源重组及重组病毒的筛选

用 2  $\mu\text{g}$  的 pVL-*celB* 质粒 DNA、1  $\mu\text{g}$  病毒 DNA 与脂质体共转染家蚕 Bm 细胞，待细胞感染上浮后收集病毒上清液。用系列稀释的病毒上清感染 35 mm 小 dish 中培养的细胞，挑取形成空斑的病毒接种 24 孔板培养的细胞，经过两轮结合酶活性测定的筛选后，获得高表达量的重组病毒。

8.2.3 重组病毒在家蚕中的表达及初步纯化

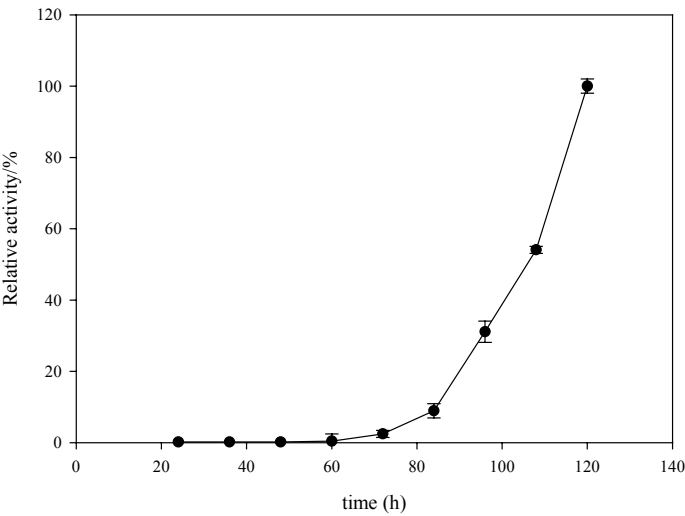


图 8.1  $\beta$ - glucosidase 在家蚕中表达时相图

Fig. 8.1 The time courses of  $\beta$ -glucosidase expressed in silkworm

Larval haemolymph was collected on ice every 12 h from 24 h post-infection. Using pNPG as substrate to determine the  $\beta$ -glucosidase activity. The amount of expressed  $\beta$ -glucosidase was represented by the relative activity at corresponding time.

用筛选的重组病毒感染家蚕 5 龄起蚕，分别在感染后 12、24、36、48、60、72、84、96、108、120 h 收集发病蚕的血淋巴，测定表达的  $\beta$ -glucosidase 活性，确定其表达时相，虽然在 60 h 前，

该酶有微量的表达，但大量的表达产物形成于病毒感染的后期，在 120 h 达到高峰（图 8.1）。在病毒感染 120 收集的 1 mL 血淋巴或一头蚕中能检测到酶活性分析为 10 199.5 U、19 797.4 U。将收集的血淋巴在 90 ℃ 保温 15 min，离心后收集上清。SDS-PAGE 电泳显示，表达的目的蛋白条带约为 55 kD，与野生型病毒感染的蚕血淋巴相比，外源基因获得了显著表达（图 8.2）。密度扫描的结果显示，表达的外源蛋白约占总血淋巴蛋白的 10%，初步纯化后，目的蛋白的含量可达 82%，已去除了大部分的蚕体蛋白。

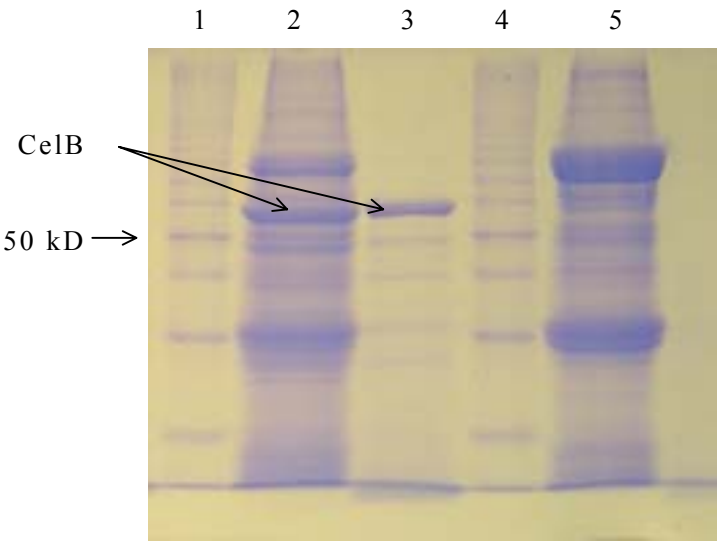


图 8.2 重组杆状病毒表达的  $\beta$ -glucosidase SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 8.2 SDS-PAGE analysis of the  $\beta$ -glucosidase expressed by recombinant BEVS

Lane 1 and 4: 10 kDa standard protein ladder; Lane 2: Silkworm haemolymph with expressed  $\beta$ -glucosidase; Lane 3: Heat-treated silkworm haemolymph with expressed  $\beta$ -glucosidase; Lane 5: Haemolymph of silkworm infected with BmBacPAK6. The arrows indicated a 50 kD protein ladder and the CelB band.

#### 8.2.4 表达的外源蛋白的特性分析

##### 8.2.4.1、最适反应温度

在 0.1 M pH 5.0 的反应缓冲液中，于 70-100 ℃ 的水浴、100-140 ℃ 的油浴中保温 10 min，根据在 405 nm 波长测定释放的 pNP 的吸光值，计算酶活性并作图如 8.3。由图可见，在 105 ℃ 时具有最大的酶活性，在 90 ℃ -120 ℃ 时，仍然具有最大酶活的 80% 以上。

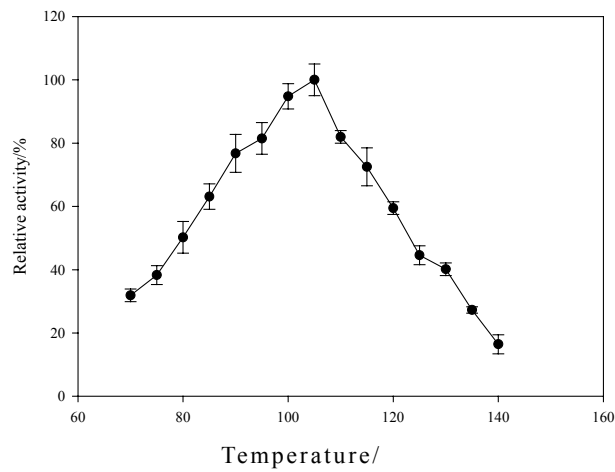


图 8.3 β-glucosidase 的最适反应温度分析

Fig. 8.3 The temperature profile of the expressed β-glucosidase

The enzymatic activity of β-glucosidase expressed in silkworm was measured at pH 5.0 and a temperature range from 70 to 140 in water or oil bath using pNPG as substrate. The optimal temperature for enzymatic reaction was 105. The β-glucosidase activity at the optimal temperature was arbitrarily set as 100%.

8.2.4.2、最适反应 pH

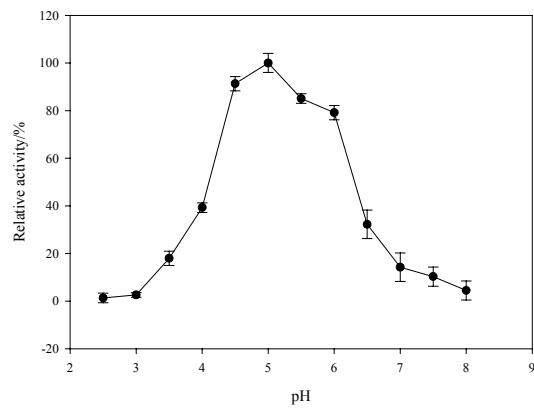


图 8.4 β-glucosidase 的最适反应 pH 值分析

Fig. 8.4 The pH profile of the BEVS-derived β-glucosidase

The enzymatic reactions were carried out at 90 and different pH values from 2.5 to 8.0 using pNPG as substrate. The optimal pH for enzymatic reaction was 5.0. The β-glucosidase activity at the optimal temperature was arbitrarily set as 100%.

在 90℃，pH 范围 2.5-8.0 的缓冲液中保温 10 min，然后终止反应。根据不同 pH 条件下的酶活性作图如 8.4。在 pH5.0 具有最大酶活性，在 pH 4-6.5，仍保留了约 40%的活性，在 pH 4-4.5 以及 pH 6-6.5，酶活性急剧下降。

8.2.4.3、酶活力分析

取注射重组病毒后 120 h 的蚕血淋巴或蚕体匀浆液，在最适反应温度 105℃，最适 pH 5.0 的条件下，测定表达的重组蛋白的最大酶活性。在每 mL 的血淋巴或一头蚕中的平均酶活性分别为 10 199.5 U、19 797.4 U。

8.2.4.4、酶的热稳定性

将用 0.1 M pH 5.0 的缓冲液适当稀释的酶液分别在不同的温度保温 10 min，然后室温复性 30 min，测定残留的酶活性，结果如图 8.5。在 90、100、110℃ 时，酶活性基本没有变化；在 120、130℃ 处理后，约有 80%的残存酶活性；而当 140℃ 保温时，酶活性急剧下降。

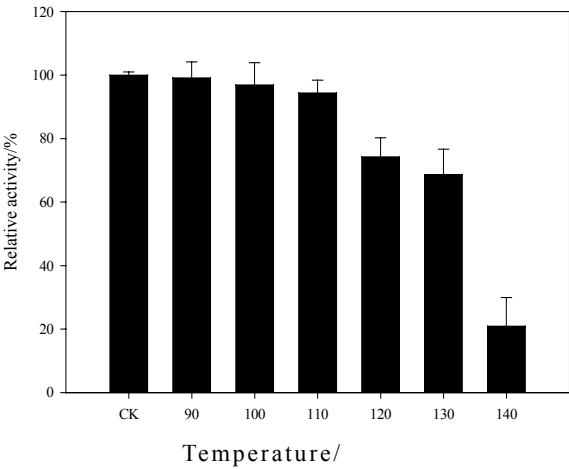


图 8.5 β-glucosidase 的热稳定性分析

Fig. 8.5 Thermostability analysis of the expressed β-glucosidase

Samples were incubated for 10 min at temperatures ranging over 90-140℃ in oil bath. The enzyme samples were allowed to renature for 30 min at room temperature then placed the tubes on ice until standard activity assays were performed. Samples without heat treatment were carried out as control (CK).

8.2.4.5、离子对酶活力的影响

在 0.1 M pH 5.0 的缓冲液中添加 1 mM 的不同二价离子，常规方法测定酶活性，确定离子对酶活力的影响，结果如图 8.6。酶活力基本不受本实验中所用的基本离子的影响。在含浓度逐渐增加的 NaCl 溶液的 0.1 M pH 5.0 的缓冲液中，酶活力也基本没有受到太大的影响。

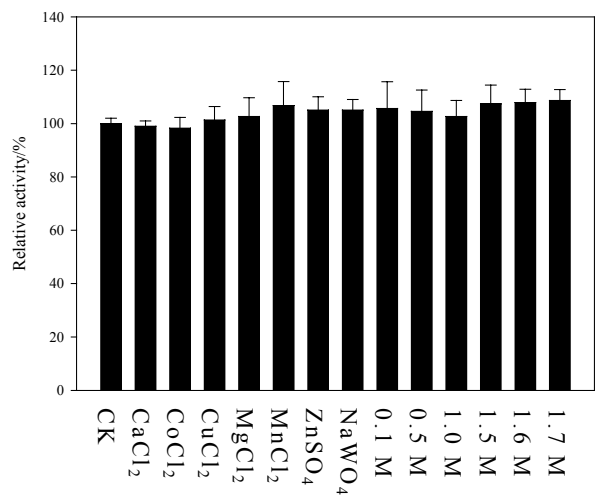


图 8.6 不同离子对 β-glucosidase 活性的影响分析

Fig. 8.6 The modulation effects of various ions or NaCl on the activity of the BEVS-derived β-glucosidase

The ions effect on the β-glucosidase activity was determined by method as described priviously using pNPG as substrate at pH 5.0 and 90 . All ions were at a concentration of 1 mM, between 0.1 mM and 1.7 mM indicated the concentration of NaCl. Enzymatic activity of the non-additive samples was performed as control.

8.3 讨 论

耐高温微生物具有高于 90 的最适生长温度，在 80-110 的环境条件下能够快速生长。由于其具有极强的耐热性和代谢适应性，这些微生物很适合基础研究及生物技术应用。目前从各种极端环境中分离了大量的耐高温古菌、细菌等，最近的研究表明这些菌株具有独特的生活环境，自这些菌株中分离的耐高温酶适合工业用途，具有巨大的经济效益 [Adams, *et al.*, 1995; Niehaus, *et al.*, 1999]。分离自浅海温泉的 *Pyrococcus furiosus*，其最适生长温度高于 100，是目前研究最为深入的耐高温微生物 [Woese, *et al.*, 1990]。 *P. furiosus* 具有及其复杂的食物网，能够利用复杂的肽或糖（如淀粉、糖原、麦芽糖和纤维素等）作为碳源和能源，从而决定了该微生物必需分泌多种相关的酶以吸收这些成分。耐高温 -glucosidase 是参与 *P. furiosus* 吸收利用 键连接糖的主要

酶,现被广泛应用于食品、医药、奶制品、环境保护及有机化学工业等[Fischer *et al.*, 1996; Hansson *et al.*, 2001; Splechtna *et al.*, 2002]。该酶已被作为研究耐高温微生物来源酶的稳定性及催化作用的模式系统[Lebbink *et al.*, 2001]。目前所用的耐高温  $\alpha$ -glucosidase 多表达于大肠杆菌或酵母表达系统,具有产量低、易形成包涵体的缺点[Smith and Robinson, 2002],这限制了其在工业上的大量应用。在中国已有上千年的栽桑养蚕历史,饲养成本低,每头蚕只有 5-6 分,蚕粉是一种对人无害无副作用的营养品和功能食品。目前,在韩国约有 70%的蚕用于生产蚕粉[Ryu, *et al.*, 1997]。而家蚕-BmNPV 表达系统是近年来发展起来的在真核生物个体水平上高效表达外源蛋白系统,得到了越来越广泛的认可,相对于其它表达系统,家蚕杆状病毒表达系统具有显著的优点,如 BmNPV 宿主域狭窄,仅感染家蚕,对哺乳动物或植物没有感染性,并且家蚕饲养容易,生命周期短,生产成本低,且表达产物稳定。

另外,在乳制品的生产过程中,需要一个高温灭菌的步骤,家蚕杆状病毒在此高温条件下可以迅速失活,因而是安全的。目前在奶制品中添加的乳糖酶基本不耐高温,需要降低温度后再进行添加,从而增加了生产成本,如果添加耐高温的乳糖酶,则可以很好的解决这个问题,提高了经济效益。

本研究中,我们成功的利用家蚕杆状病毒表达系统生产并初步纯化了耐高温  $\alpha$ -glucosidase。经 SDS-PAGE 凝胶电泳并结合密度扫描分析,推算耐高温  $\alpha$ -glucosidase 的表达量为 10,199.5 U 每 mL 血淋巴及 19,797.4 U 每头蚕,远远高于大肠杆菌表达系统中的 50-80 mg (约 13,000-20,800 U) 每升培养基。对家蚕-BmNPV 系统表达的耐高温  $\alpha$ -glucosidase 酶学性质分析表明,该重组酶与其天然产物在性质上没有发生明显的改变,却克服了利用前述两种表达系统的缺陷。本研究中将含有表达产物的蚕血淋巴在 90 °C 保温 15 min,离心后的上清中约含有 80%的重组蛋白,达到了初步纯化的目的,解决了工业应用该酶需要大量的纯化成本的问题。因而,利用家蚕-杆状病毒表达系统生产耐高温  $\alpha$ -glucosidase 既提高了蛋白的产量,随后的热纯化又节约了时间,从而降低了生产成本。尤其在中国,已有数千年的栽桑养蚕历史,饲养成本低廉。因此,利用该系统生产耐高温  $\alpha$ -glucosidase 具有广阔的前景。

## Expression, Analysis and Purified of hyperthermophilic $\beta$ -Glucosidase from *Pyrococcus furiosus* using a Baculovirus Expression Vector System in Silkworm, *Bombyx mori*

**Abstract**  $\beta$ -Glucosidase is a member of the glycosyl hydrolases that specifically catalyze the hydrolysis of terminal nonreducing  $\beta$ -D-glucose residues from the end of various oligosaccharides with the release of  $\beta$ -D-glucose. *celB* gene, encoding the thermostable  $\beta$ -glucosidase, was amplified from the *Pyrococcus furiosus* genome and then cloned into the baculoviral transfer vector under the control of the *polh* gene promoter. After co-transfection with genetically modified parental BmNPV, the recombinant virus containing *celB* gene was used to express  $\beta$ -glucosidase in silkworm. The recombinant  $\beta$ -glucosidase was purified to about 81% homogeneity in a single heat-treatment step. The optimal activity of the expressed  $\beta$ -glucosidase was obtained at pH 5.0 and about 105 mM, divalent cations and high ionic strength did not affect on the activity remarkably. It suggested that the enzymatic characteristics of recombinant  $\beta$ -glucosidase were similar to the native counterpart. The expressed  $\beta$ -glucosidase accounted for more than 10% of silkworm total haemolymph proteins according to the protein quantification and densimeter scanning. The expression level reached to 10,199.5 U per ml haemolymph and 19,797.4 U per silkworm larva, and the specific activity of the one-step purified crude enzyme was 885 U per mg. It was demonstrated to be an attractive approach for mass production of thermostable  $\beta$ -glucosidase using this system.

**Key words**  $\beta$ -Glucosidase; *Pyrococcus furiosus*; baculovirus expression vector system; characteristic analysis

## 第九章 结 论

本文分别从 AcMNPV 和 BmNPV 基因组 DNA 中克隆了杆状病毒 *ubi* 基因启动子,以 *luciferase* 基因为报告基因,经脂质体转染相应的昆虫细胞,对 *ubi* 基因启动子进行了功能及调控分析。同时克隆并构建了含有杆状病毒极晚期 *polh* 基因启动子的报告质粒,通过进行体内、体外表达分析,考察了 IE-1 和增强子 *hr3* 对病毒晚期、极晚期启动子的顺式、反式调控作用。本文利用家蚕-杆状病毒表达系统在蚕体内高效表达并纯化了耐高温  $\alpha$ -glucosidase,对于该酶的一般酶学性质也进行了分析。

### 9.1 *ubi* 基因启动子克隆及功能分析

克隆的 AcMNPV、BmNPV *ubi* 基因启动子经序列分析为 595 bp,二者序列同源率为 92.8%。MatInspector 软件分析,克隆的片段可能有以下几种功能元件:-17 ~ -14 nt、-195 ~ -192 nt 的杆状病毒晚期转录起始位点 TAAG;-19 ~ -15 nt、-269 ~ -265 nt 的 TATA box;-71 ~ -68 nt、-125 ~ -122 nt、-359 ~ -356 nt 的 CAAT 基序。

以 595 bp 启动子序列为模板,用 PCR 方法扩增启动子区域缺失的一系列启动子片段,将 *luciferase* 基因插入启动子下游,使受其驱动。在病毒因子存在的情况下,进行了瞬时表达分析,证明 AcMNPV 来源的 *ubi* 基因启动子主要功能区位于-595 ~ -382 bp 之间,而 BmNPV 来源的 *ubi* 基因启动子主要功能区位于-382 ~ -124 bp 之间。含有远离 ATG 的 TAAG 序列和 TATA box 的启动子片段也能驱动报告基因的表达,仅含有近端 TAAG 序列及 TATA box 的 26 bp 启动子片段在有杆状病毒同源重复序列 *hr3* 的顺式作用下才具有较高的活性。

以 595 bp 启动子序列为模板,用 PCR 方法构建了一系列保守序列突变的报告质粒。瞬时表达分析证明两个 TATA box,以及 TAAG 突变,均能够使启动子的活性大大降低;而两个 CAAT 的突变则可显著提高启动子的活性约 3 倍左右。说明在 *ubi* 启动子中,TATA box 和 TAAG 发挥正调控的作用,而 CAAT 却发挥着负调控的作用。

### 9.2 IE-1、*hr3*对杆状病毒晚期 *ubi* 基因启动子的调控

Northern blot 分析证明 *ubi* 基因为晚期表达基因,从而其表达需要其它早期病毒基因产物的参与。杆状病毒立即早期基因 *ie-1* 具有激活子的作用,本研究利用 *ie-1* 反式激活 *ubi* 基因启动子,能够检测到一定的报告基因活性,用 *ie-1* 和 *ubi* 基因启动子一系列删除突变的报告质粒共转染 Bm 细胞,证明该启动子中与 *ie-1* 结合的位点主要位于-595~-382 bp 之间,这与病毒参与的情况是不

同的,可能是因为病毒基因组中还有其他因子也参与了 *ubi* 启动子的转录。靠近 ATG 的 26 bp 启动子在 *ie-1* 参与时也能驱动 *luciferase* 基因的表达,具有基础转录活性。将杆状病毒同源重复序列 *hr3* 插入到报告基因的下游或普通载体中,在 BmNPV 或 *ie-1* 存在条件下,转染 Bm 细胞,证明 *hr3* 在顺式或反式的状态下均能够增强 *ubi* 基因启动子的转录。

### 9.3 IE-1、hr3 对杆状病毒极晚期 *polh* 基因启动子的调控

本实验通过 *ie-1*、*hr3* 与包含 *polh* 的报告质粒或 *ie-1* 与带有 *hr3* 的 *polh* 报告质粒共转染 Bm 细胞或家蚕幼虫,考察了杆状病毒立即早期基因 *ie-1* 和同源重复序列 *hr3* 对杆状病毒极晚期启动子的作用。通过基因表达时相分析,认为在 *ie-1* 存在的条件,无论顺式连接还是反式作用的 *hr3* 对 *polh* 启动子均具有增强子的作用,顺式连接 *hr3* 的报告质粒在转染后 24 h 就能测到很高的报告基因表达,比反式作用 *hr3* 的质粒表达量约高 147 倍,比没有 *hr3* 连接的质粒高 621 倍;当质粒转染后用 BmNPV 感染细胞时,在转染的初期其报告基因的表达没有用 *ie-1* 激活的快,但随着时间的推移,其表达量逐渐超过同期与 *ie-1* 共转染的质粒。说明在 *hr3* 与极晚期启动子的相互作用过程,*ie-1* 发挥着重要作用,同时还需要其他病毒因子的参与。

### 9.4 参与 *ubi* 基因表达的病毒因子的鉴定

前面的实验证明,IE-1 与 *ubi* 基因启动子的低水平转录有关,在病毒基因组中还有其它的病毒因子参与了晚期基因的表达。本文构建了 BmNPV 病毒基因组 DNA 文库,通过文库 DNA 与含 *ubi* 启动子的报告质粒以及 *ie-1* 共转染 Bm 细胞,筛选了参与晚期 *ubi* 基因转录的病毒因子,包括 LEF6、LEF11、HE65、P35 以及 GP104-GP107、GP118-GP119。结果证明在 *ie-1* 存在时,GP104 单独能够提高 *ubi* 启动子的转录,但当 GP104 与 GP105-GP107 片段共转染时,其增强作用更明显,说明 GP104 与其他三个基因联合参与晚期启动子的转录;分别对 gp118 和 gp119 进行突变分析,认为并非 GP118 和 GP119 的编码产物参与了 *ubi* 基因的转录,其具体原因尚需进一步确定。

### 9.5 耐高温 $\alpha$ -glucosidase 的表达及特性分析

本文利用 PCR 方法从高温古细菌中克隆了耐高温  $\alpha$ -glucosidase,并利用家蚕杆状病毒表达系统对其进行了表达,通过酶学分析证明该系统表达的目的蛋白,最适反应温度为 105 $^{\circ}\text{C}$ ,适反应 pH 为 5.0,二价金属离子同样不会对酶活性产生剧烈的影响。与天然蛋白在酶学性质上没有发生明显改变,但目的蛋白的产量却得到了极大的提高。与目前工业上应用的曲霉来源的乳糖酶相比,该酶在热稳定性、金属离子稳定性、比活以及 pH 适用范围等方面均具有明显的优越性,从而为其在工业生产中的大量应用提供了保证。将含有重组蛋白的蚕血淋巴在 90 $^{\circ}\text{C}$  保温 15 分钟,离心

后上清中 80% 以上为目的蛋白，可以简单快捷的对酶进行纯化。这在很大程度上解决了乳糖酶大规模生产应用中的分泌和纯化两个技术难题，从而开发了一条产量高、分离纯化简便、廉价的大规模生产乳糖酶的新途径。

## 参考文献

- 1 . Acharya A., Gopinathan K. Characterization of late gene expression factors *lef-9* and *lef-8* from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. J Gen. Virol., 2002, 83(Pt8): 2015-2023.
- 2 . Adams M., Perler F., Kelly R. Extremozymes: expanding the limits of biocatalysis. Biotechnology (NY), 1995, 13(7), 662-668.
- 3 . Ailor E., Takahashi N., Tsukamoto Y., Masuda K., Rahman B., Jarvis D., Lee Y., Betenbaugh M. N-glycan patterns of human transferrin produced in *Trichoplusia ni* insect cells: effects of mammalian galactosyltransferase. Glycobiology, 2000, 10(8): 837-847.
- 4 . Akihiro U. Improvement of baculovirus expression system (A). prospects for the development of insect Factorie (M). Japan: Institute of Insect and Animal Science national Institute of Agrobiological Science, 2001, 57-63.
- 5 . Alba M., Das R., Orenge C., Kellam P. Genomewide function conservation and phylogeny in the *Herpesviridae*. Genome Res., 2001, 11(1): 43-54.
- 6 . Beniya H., Funk C., Rohrmann G., Weaver R. Purification of a virus-induced RNA polymerase from *Autographa californica* nucleopolyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells that accurately initiates late and very late transcription in vitro. Virology. 1996, 216:12-19.
- 7 . Blissard G., Rohrmann G. Baculovirus diversity and molecular biology. Annu. Rev. Entomol., 1990, 35: 127-155.
- 8 . Blissard G., Rohrmann G. Baculovirus *gp64* gene expression: analysis of sequences modulating early transcription and transactivation by IE1. J Virol., 1991, 65(11): 5820-5827.
- 9 . Breitbach K., Jarvis D. Improved glycosylation of a foreign protein by Tn5B1-4 cells engineered to express mammalian glycosyltransferases. Biotechnol. Bioeng., 2001, 74(3): 230-239.
- 10 . Bulach D., Kumar A., Zaia A., Liang B., Tribe E. Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of *polyhedrin* and *DNA polymerases* gene sequences. J Invertebr. Pathol., 1999, 73(1): 59-73.
- 11 . Carson D., Summers M., Guarino L. Functional mapping of an AcNPV immediately early gene which augments expression of the IE-1 trans-activated 39 K gene. Virology. 1988, 162(2): 444-451.
- 12 . Carstens E., Lu A., Chan H. Sequence, transcriptional mapping, and overexpression of *p47*, a baculovirus gene regulating late gene expression. J Virol., 1993, 67(5): 2513-2520.
- 13 . Chisholm G., Henner D. Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *IE-1* gene. J Virol., 1988, 62(9): 3193-3200.
- 14 . Chen C., Thiem S. Differential infectivity of two *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus mutants on three permissive cell lines is the result of *lef-7* deletion. Virology. 1997, 227 (1):

- 88-95.
- 15 . Chen X., Ijkel W., Dominy C., Zanotto P., Hashimoto Y., Faktor O., Hayakawa T., Wang C., Prekumar A., Mathavan S., Krell P., Hu Z., Vlak J. Identification, sequence analysis and phylogeny of the *lef-2* gene of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid baculovirus. *Virus Res.*, 1999, 65(1): 21-32.
  - 16 . Chen Y, Yao B, Zhu Z, Yi Y, Lin X, Zhang Z, Shen G. A constitutive super-enhancer: homologous region 3 of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004,318(4): 1039-1044.
  - 17 . Choi J., Guarino L. The baculovirus transactivator IE1 binds to viral enhancer elements in the absence of insect cell factors. *J Virol.*, 1995, 69(7): 4548- 4551.
  - 18 . Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*, 2000a, 22(5): 442-451.
  - 19 . Ciechanover A., Orian A., Schwartz A. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J Cell Biochem.*, 2000b, 77(S)34:40-51.
  - 20 . Clem R., Fecheimer M., Miller L. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, 1991, 254(5036): 1388-1390.
  - 21 . Clem R., Miller L. Control of programmed cell death by the baculovirus genes *p35* and *iap*. *Mol. Cell. Biol.*, 1994, 14(8): 5212-5222.
  - 22 . Condreay J., Witherspoon S., Clay W., Kost T. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96(1): 127-132.
  - 23 . Coscoy L., Ganem D. PHD domains and E3 ubiquitin ligases: viruses make the connection. *Trends Cell Biol.*, 2003, 13(1): 7-12.
  - 24 . Courtney S., Rider C., Stead A. Changes in protein ubiquitination and the expression of ubiquitin encoding transcripts in daylily petals during floral development and senescence. *Physiol. Plant*, 1994,91(2): 196-204.
  - 25 . Dobos P., Cochran M. Protein synthesis in cells infected by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV): the effect of cytosine arabinoside. *Virology*, 1980, 103: 446-464.
  - 26 . DiFalco M., Bakopanos E., Patricelli M., Chan G., Congote L. The influence of various insect cell lines, *p10* and *polyhedrin* promoters in the production of secreted insulin-like growth factor-interleukin-3 chimeras in the baculovirus expression system. *J Biotechnol.*, 1997, 56(1): 49-56.
  - 27 . Durantel D., Croizier G, Ravallec M., Lopez- Ferber M. Temporal expression of the AcMNPV *lef-4* gene and subcellular localization of the protein. *Virology*. 1998, 241(2): 276-284.
  - 28 . Eisen J. 2002. Brouhaha over the other yeast. *Nature*. 415(6874): 845-848.
  - 29 . Eisenberg D., Marcotte E., Xenarios I., Yeates T. Protein function in the post-genomic era. *Nature*, 2000, 405(6788): 823-826.
  - 30 . Evans J., Leisy D., Rohrmann G. Characterization of the interaction between the baculovirus

- replication factors LEF-1 and LEF-2. J Virol., 1997, 71(4): 3114-3119.
- 31 . Evans J., Rosenblatt G., Leisy D., Rohrmann G. Characterization of the interaction between the baculovirus ssDNA-binding protein (LEF-3) and putative helicase (P143). J Gen. Virol., 1999, 80 ( Pt 2): 493-500.
- 32 . Falk A., Rask L. Expression of a zeatin-O-glucoside-degrading *beta*-glucosidase in *Brassica napus*. Plant Physiol., 1995,108(4): 1369-1377.
- 33 . Fischer L., Bromann R., Kengen S., de Vos W., Wagner F. Catalytical potency of *beta*-glucosidase from the extremophile *Pyrococcus furiosus* in glucoconjugate synthesis. Biotechnology (N Y), 1996,14(1): 88-91.
- 34 . Fraser M., Cary L., Boonvisudhi K., Wang H. Assay for movement of *Lepidopteran* transposon IFP2 in insect cells using a baculovirus genome as a target DNA. Virology, 1995, 211(2): 397-407.
- 35 . Friesen P. Regulation of baculovirus early gene expression. In: The Baculovirus. Edited by LK Miller. New York: Plenum Press. 1997, pp. 141-166.
- 36 . Erlandson M., Gordon J., Carstens E. Size and map locations of early transcription products on the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. Virology, 1985,142(1):12-23.
- 37 . Galinier R., Gout E., Lortat-Jacob H., Wood J., Chroboczek J. Adenovirus protein involved in virus internalization recruits ubiquitin-protein ligases. Biochemistry, 2002, 41(48):14299-14305.
- 38 . Garcia-Maruniak A., Maruniak J., Zanutto P., Doumbouya A., Liu J., Merritt T., Lanoie J. Sequence analysis of the genome of the Neodiprion sertifer nucleopolyhedrovirus. J. Virol., 2004, 78(13): 7036 - 7051.
- 39 . Genschik P., Parmentier Y., Durr A., Marbach J., Criqui M., Jamet E, Fleck J. *Ubiquitin* genes are differentially regulated in protoplast-derived cultures of *Nicotiana sylvestris* and in response to various stresses. Plant Mol. Biol., 1992, 20(5): 897-910.
- 40 . Ghosh M., Huang K., Berberich S. Overexpression of Mdm2 and MdmX fusion proteins alters p53 mediated transactivation, ubiquitination, and degradation. Biochemistry, 2003, 42(8): 2291-2299.
- 41 . Ghosh S., Parvez M., Banerjee K., Sarin S., Hasnain S. Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy. Mol. Ther., 2002, 6(1): 5-11.
- 42 . Godeau F., Saucier C., Kourilsky P. Replication inhibition by nucleoside analogues of a recombinant *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus harboring the herpes thymidine kinase gene driven by the *IE-1 (0)* promoter: a new way to select recombinant baculoviruses. Nucleic. Acids Res., 1992, 20(23): 6239-6246.
- 43 . Goldberg R., Tewari Y. A calorimetric and equilibrium investigation of the hydrolysis of lactase. J Biol. Chem., 1989,264 (17): 9897-9900.
- 44 . Goldstein G., Scheid M., Hammerling U., Schlesinger D., Niall H., Boyse E. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte- differentiating properties and is probably represented universally in living cells. Proc. Natl. Acad Sci. USA., 1975, 72(1): 11-15.

- 45 . Gomi S., Zhou C., Yih W., Majima K., Maeda S. Deletion analysis of four of eighteen late gene expression factor gene homologues of the baculovirus, BmNPV. *Virology*. 1997, 230(1): 35-47.
- 46 . Gomi S., Majima K., Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J. Gene. Virol.*, 1999, 80:1323-1337.
- 47 . Gonzalez-Candelas L., Ramon D., Polainal J. Sequences and homology analysis of two genes encoding  $\beta$ -glucosidase from bacillus *polymyxa*. *Gene*, 1990, 95(1): 31-38.
- 48 . Grabnitz F., Seiss M., Rucknagel K., Staudenbauer W. Structure of the  $\beta$ -glucosidase gene *balA* of *clostridium thermocellum* sequence analysis reveals a superfamily of cellulase and  $\beta$ -glucosidase including human lactase/ phcorizin hydrolase. *Eur. J Biochem.*, 1991, 200(2): 301-309.
- 49 . Gray C., Coates C. High-level gene expression in *Aedes albopictus* cells using a baculovirus *hr3* enhancer and IE1 transactivator. *BMC Mol. Biol.*, 2004,5(1): 8.
- 50 . Gross C., Rohrmann G. Analysis of the role of 5' promoter elements and 3' flanking sequences on the expression of a baculovirus polyhedron envelope protein gene. *Virology*, 1993, 192(1): 273-281.
- 51 . Gross C., Shuman S. RNA 5'-triphosphatase, nucleoside triphosphatase, and guanylyltransferase activities of baculovirus LEF-4 protein. *J Virol.*, 1998, 72(12): 10020-10028.
- 52 . Grula M., Buller P., Weaver R. *Alpha*-amanitin resistant viral RNA synthesis in nuclei isolated from nuclear polyhedrosis virus-infected *Heliothis Zea* larvae and *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Virol.*, 1981, 38: 916-921.
- 53 . Guarino L., Summers M. Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *J Virol.*, 1986a, 57(2): 563-571.
- 54 . Guarino L., Summers M. Interspersed homologous DNA of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus enhances delayed-early gene expression. *J Virol.*, 1986b, 60: 215-223.
- 55 . Guarino L., Summers M. Functional mapping of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genes required for late gene expression. *J Virol.*, 1988, 62(2): 463-471.
- 56 . Guarino L. Identification of a viral gene encoding a ubiquitin-like protein. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1990,87(1): 409-413.
- 57 . Guarino L., Smith G., Dong W. Ubiquitin is attached to membranes of baculovirus particles by a novel type of phostholipid anchor. *Cell*, 1995, 80(2): 301-309.
- 58 . Guarino L., Xu B., Jin J., Dong W. A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells. *J Virol.*, 1998, 72(10): 7985-7991.
- 59 . Guarino L., Dong W., Jin J. In vitro activity of the baculovirus late expression factor LEF-5. *J Virol.*, 2002a, 76(24):12663-12675.
- 60 . Guarino L., Mistretta T., Dong W. Baculovirus *lef-12* is not required for viral replication. *J Virol.*, 2002b, 76(23): 12032-12043.
- 61 . Haas A., Katzung D., Reback P., Guarino L. Functional characterization of the ubiquitin variant encoded by the baculovirus *Autographa californica*. *Biochemistry*, 1996,35(17): 5385-5394.
- 62 . Hang X., Guarino L. Purification of *Autographa californica* nucleopolyhedrosis virus DNA

- polymerase from infected insect cells. J Gen. Virol., 1999, 80 (Pt 9): 2519-2526.
- 63 . Hansson T., Kaper T., van Der Oost J., de Vos W., Adlercreutz P. Improved oligosaccharide synthesis by protein engineering of *beta*-glucosidase CelB from hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus*. Biotechnol. Bioeng., 2001, 73(3): 203-210.
- 64 . Harrison R., Bonning B. Comparative analysis of the *Rachiplusia ou* and *Autographa californica* multiple nucleopolyhedroviruses. J. Gen. Virol., 2003, 84(Pt7): 1827-1842.
- 65 . Harty R., Brown M., McGettigan J., Wang G., Jayakar H., Huibregtse J., Whitt M., Schnell M. Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin-proteasome system: a budding interaction. J Virol., 2001, 75(22): 10623-10629.
- 66 . Harwood S., Li L., Ho P., Preston A., Rohrmann G. AcMNPV late expression factor-5 interacts with itself and contains a zinc ribbon domain that is required for maximal late transcriptional activity and is homologous to elongation factor TFIIS. Virology, 1998, 250(1): 118-134.
- 67 . Hazelwood D., Zaitlin M. Ubiquitinated conjugates are found in preparations of several plant viruses. Virology, 1990, 177(1): 352-356.
- 68 . Hefferon K. Baculovirus late expression factors. J Mol. Microbiol. Biotechnol., 2004, 7(3): 89-101.
- 69 . Herniou E., Luque T., Chen X., Vlak J., Winstanley D., Cory J., O'Reilly D. Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny. J. Virol., 2001, 75(17): 8117-8126.
- 70 . Herrera C., Pellmyr O. Plant-animal interactions an evolutionary approach, Blackwell Science Ltd., Oxford, United Kingdom. 2002.
- 71 . Hershko A., Ciechanover A. The ubiquitin system. Annu. Rev. Biochem., 1998, 67:425-479.
- 72 . Hofmann C., Sandig V., Jennings G., Rudolph M., Schlag P., Strauss M. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. Proc. Natl. Acad Sci. USA, 1995, 92(22): 10099-10103.
- 73 . Hollister J., Jarvis D. Engineering lepidopteran insect cells for sialoglycoprotein production by genetic transformation with mammalian *beta* 1,4-galactosyltransferase and *alpha* 2,6-sialyltransferase genes. Glycobiology, 2001, 11(1): 1-9.
- 74 . Hoopes R., Rohrmann G. In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. Proc. Natl. Acad Sci. USA, 1991, 88(10): 4513-4517.
- 75 . Hu Y., Bentley W., Edwards G., Vakharia V. Chimeric infectious bursal disease virus-like particles expressed in insect cells and purified by immobilized metal affinity chromatography. Biotechnol. Bioeng., 1999, 63(6): 721-729.
- 76 . Huber R., Huber H., Stetter K. Towards the ecology of hyperthermophiles: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. FEMS Microbiol. Rev., 2000, 24(5), 615-623.
- 77 . Huh N., Weaver R. Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J Gen. Virol., 1990, 71(Pt): 195-202.
- 78 . Inceoglu A., Kamita S., Hinton A., Huang Q., Severson T., Kang K., Hammock B. Recombinant

- baculoviruses for insect control. *Pest Manag. Sci.*, 2001, 57(10): 981-987.
- 79 . Iorio C., Vialard J., McCracken S., Lagace M., Richardson C. The late expression factors 8 and 9 and possibly the phosphoprotein p78/83 of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus are components of the virus-induced RNA polymerase. *Intervirology*, 1998, 41(1): 35-46.
- 80 . Jarvis D., Howe D., Aumiller J. Novel baculovirus expression vectors that provide sialylation of recombinant glycoproteins in *lepidopteran* insect cells. *J Virol.*, 2001, 75(13): 6223-6227.
- 81 . Jin J., Dong W., Guarino L. The LEF-4 subunit of baculovirus RNA polymerase has RNA 5'-triphosphatase and ATP activities. *J Virol.*, 1998, 72(12): 10011-10019.
- 82 . Jin J., Guarino L. 3'-end formation of baculovirus late RNAs. *J Virol.*, 2000, 74(19): 8930-8937.
- 83 . Jin T., Qi Y., Liu D., Su F. Nucleotide sequence of a 5892 base pairs fragment of the LsMNPV genome and phylogenetic analysis of LsMNPV. *Virus Genes*. 1999. 18: 265-276.
- 84 . Karsies A., Hohnm T., Leclerc D. Degradation signals within both terminal domains of the cauliflower mosaic virus capsid protein precursor. *J Plant*, 2001, 27(4): 335-343.
- 85 . Kemp L., Latchman D. The herpes simplex virus type 1 immediate-early protein ICP4 specifically induces increased transcription of the human *ubiquitin B* gene without affecting the *ubiquitin A* and *C* genes. *Virology*, 1988, 166(1): 258-261.
- 86 . Kengen S., Luesink E., Stams A., Zehnder A. Purification and characterization of an extremely thermostable  $\beta$ -glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Eur. J. Biochem.*, 1993, 213(1), 305-312.
- 87 . Kitts P., Possee R. A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *Biotechniques*, 1993, 14(5): 810-817.
- 88 . Koegl M., Hoppe T., Schlenker S., Ulrich H., Mayer T., Jentsch S. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, 1999, 96(5): 635-644.
- 89 . Kool M., Vlak J. The structural and functional organization of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Arch. Virol.*, 1993, 130(1-2): 1-16.
- 90 . Kool M., Ahrens C., Goldbach R., Rohrmann G., Vlak J. Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1994, 91(23): 11212-11216.
- 91 . Kool M., Ahrens C., Vlak J., Rohrmann G. Replication of baculovirus DNA. *J Gen. Virol.*, 1995, 76 ( Pt9): 2103-2118.
- 92 . Kost T., Condreay J. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol.*, 2002, 20(4): 173-180.
- 93 . Kovacs G., Choi J., Guarino L., Summers M. Functional dissection of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early 1 transcriptional regulatory protein. *J Virol.*, 1992, 66(12): 7429-7437.
- 94 . Kozak M. Point mutations defines a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 1986, 44(2): 283-292.

- 95 . Krumm A., Meulia T., Groudine M. Common mechanisms for the control of eukaryotic transcriptional elongation. *Bioessays*, 1993, 15(10):659-665.
- 96 . Kuhne C., Banks L. E3-ubiquitin ligase/E6-AP links multicopy maintenance protein 7 to the ubiquitination pathway by a novel motif, the L2G box. *J Biol. Chem.*, 1998, 273(51): 34302-34309.
- 97 . LaCount D., Friesen, P. Role of early and late replication events by induction of apoptosis by baculoviruses. *J Virol.*, 1997, 71(2): 1530-1537.
- 98 . Laderman K., Asada K., Uemori T., Mukai H., Taguchi Y., Kato I., Anfinsen C. *Alpha*-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. Cloning and sequencing of the gene and expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268(32): 24402-24407.
- 99 . Lauzon H., Lucarotti C., Krell P., Feng Q., Retnakaran A., Arif, B. Sequence and organization of the *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedrovirus genome. *J Virol.*, 2004, 78(13): 7023 - 7035.
- 100 . Leusch M., Lee S., Olins P. A novel host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. *Gene*, 1995, 160(2): 191-194.
- 101 . Lin J., Gerstein M. Whole-genome trees based on the occurrence of folds and orthologs: implications for comparing genomes on different levels. *Genome Res.*, 2000, 10(6): 808-818.
- 102 . Li Y., Passarelli A., Miller L. Identification, sequence, and transcriptional mapping of *lef-3*, a baculovirus gene involved in late and very late gene expression. *J Virol.*, 1993, 67(9): 5260-5268.
- 103 . Li Z., Gong Y., Yin C., Wang L., Li C., Pang Y. Characterization of a novel ubiquitin-fusion gene *Uba256* from *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *Gene*, 2003, 303(1-2): 111-119.
- 104 . Lin G., Slack J., Blissard G. Expression and localization of LEF-11 in *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus infected Sf9 cells. *J Gen. Virol.*, 2001, 82(): 2289-2294.
- 105 . Lin G., Blissard G. Analysis of an *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus *lef-6*-null virus; LEF-6 is not essential for viral replication but appears to accelerate late gene expression. *J Virol.*, 2002a, 76(): 5503-5514.
- 106 . Lin G., Blissard G. Analysis of an *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *lef-11* knockout: LEF-11 is essential for viral DNA replication. *J Virol.*, 2002b.76(): 2770-2779.
- 107 . Lu A., Carstens E. Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1991, 181(1): 336-347.
- 108 . Lu A., Carstens E. Transcription analysis of the *EcoR* D region of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus identifies an early 4-kilobase RNA encoding the essential *p143* gene. *J Virol.*, 1992, 66(2): 655-663.
- 109 . Lu A., Carstens E. Immediate-early baculovirus genes transactivate the *p143* gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1993, 195(2): 710-718.
- 110 . Lu A., Miller L. Identification of three late expression factor genes within the 33.8 to 43.3 map unit region of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol.*, 1994, 68(10): 6710-6718.
- 111 . Lu A., Miller L. The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription

- and DNA replication. J Virol., 1995,69(2): 975-982.
- 112 . Lu M., Ferrell P., Johnson R., Latrou K. A baculovirus (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus) repeat element functions a powerful constitutive enhancer in transfected insect cells. J Biological, Chem., 1997, 272(49): 30724-30728.
- 113 . Luckow V., Lee S., Barry G., Olins P. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site specific transposon mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. J Virol., 1993, 67(8): 4566-4579.
- 114 . Lynn D. Comparative susceptibilities of insect cell lines to infection by the occlusion-body derived phenotype of baculovirus. J Inverteb. Pathol., 2003, 83(3): 215-222.
- 115 . Maeda S., Kawai T., Obinata M., Fujiwara H., Horiuchi T., Saeki Y., Sato Y., Furusawa M. Production of human *alpha*-interferon in silkworm using a baculovirus vector. Nature, 1985, 315(6020): 592-594.
- 116 . Majumdar A., Adhya S. Demonstration of two operator elements in gal: in vitro repressor binding studies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81(19): 6100-6104.
- 117 . McLachlin J., Miller L. Identification and characterization of *vlf-1*, a baculovirus gene involved in very late gene expression. J Virol., 1994, 68(12): 7746-7756.
- 118 . Merrington C., Kitts P., King L., Possee R. An *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *lef-2* mutant: consequences for DNA replication and very late gene expression. Virology, 1996, 217(1): 338-348.
- 119 . Merrington C. Baculovirus expression systems. In "Protein Expression: a practical approach" (M). New York: Oxford University press Inc, 1999, 101-127.
- 120 . Mikhailov V., Okano K., Rohrmann G. The redox state of the baculovirus single-stranded DNA-binding protein LEF-3 regulates its DNA binding, unwinding, and annealing activities. J Biol. Chem., 2005, 280(33): 29444-29453.
- 121 . Misawa N., Nakamura K. Expression and stability of a  $\beta$ -glucosidase gene of *ruminococcus albus* in *zymononas mobilis*. Agric. Biol. Chem., 1998, 53(3): 723-727.
- 122 . Morris T., Todd J., Fisher B., Miller L. Identification of *lef-7*: a baculovirus gene affecting late gene expression. Virology, 1994, 200(2): 360-369.
- 123 . Morris T., Miller L. Mutational analysis of a baculovirus major late promoter. Gene, 1994, 140(2): 147-153.
- 124 . Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M., Antranikian G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999,51(6): 711-729.
- 125 . Ohura M. The 5th NISES/COE International symposium: Research for the utilization of insect properties prospect for the development of new materials. Tsukuba, Japan. 2000.
- 126 . Okano K., Vanarsdall A., Mikhailov V., Rohrmann G. Conserved molecular systems of the baculoviridae. 2006, 344(1): 77-87.
- 127 . Olejnik A., Grajek W., Marecik R. Effect of hyperosmolarity on recombinant protein productivity in baculovirus expression system. J Biotechnol., 2003, 102(3): 291-300.

- 128 . Olson V., Wetter J., Friesen P. Baculovirus transregulator IE1 requires a dimeric nuclear localization element for nuclear import and promoter activation. J Virol., 2002, 76(18): 9505-9515.
- 129 . Ooi B., Rankin C., Miller L. Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus *polyhedrin* gene. J Mol. Biol., 1989, 210(4), 721-736.
- 130 . Passarelli A., Miller L. Identification and characterization of *lef-1*, a baculovirus gene involved in late and very late gene expression. J Virol., 1993a, 67(6): 3481-3488.
- 131 . Passarelli A., Miller L. Identification of genes encoding late expression factors located between 56.0 and 65.4 map units of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. Virology, 1993b, 197(2): 704-714.
- 132 . Passarelli A., Miller L. Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: *ie-1*, *ie-n*, and *lef-2*. J Virol., 1993c, 67(4): 2149-2158.
- 133 . Passarelli A., Todd J., Miller L. A baculovirus gene involved in late gene expression predicts a large polypeptide with a conserved motif of RNA polymerases. J virol., 1994, 68(7): 4673-4678.
- 134 . Patel G., Nasmyth K., Jones N. A new method for the isolation of recombinant baculovirus. Nucleic. Acids. Res., 1992, 20(1): 97-104.
- 135 . Petricevich V., Palomares L., Gonzalez M., Ramirez O. Parameters that determine virus adsorption kinetics: toward the design of better infection strategies for the insect cell - baculovirus expression system. Enzyme Microb. Technol., 2001, 29(1): 52-61.
- 136 . Possee R. Baculoviruses as expression vectors. Curr Opin Biotechnol. 1997, 8(5): 569-572.
- 137 . Prikhod'ko E., Lu A., Wilson J., Miller L. In vivo and in vitro analysis of baculovirus *ie-2* mutants. J Virol., 1999, 73(3): 2460-2468.
- 138 . Rapp J., Wilson J., Miller L. Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression. J Virol., 1998, 72(12): 10197-10206.
- 139 . Reilly L., Guarino L. The viral *ubiquin* gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is not essential for viral replication. Virology, 1996, 218(1): 243-247.
- 140 . Rice W., Miller L. Baculovirus transcription in the presence of inhibitors and in nonpermissive cells. Virus Res., 1986, 6:155-172.
- 141 . Rohrmann G. Polyhedrin structure. J Gen., Virol., 1986, 67(8): 1499-1513.
- 142 . Rosado J., Allen L., Solomons N. Milk consumption, symptom response, and lactose digestion in milk intolerance. Am. J Clin. Nutr., 1987, 45(6): 1457-1460.
- 143 . Ryu K., Lee H., Chung S., Kang, P. An activity of lowering blood-glucose levels according to preparative condition of silkworm powder. Korean J. Sericult. Sci., 1997, 39(1): 79-85.
- 144 . Saito T., Dojima T., Toriyama M., Park E. The effect of cell cycle on *GFPuv* gene expression in the baculovirus expression system. J Biotechnol., 2002, 93(2): 121-129.
- 145 . Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 分子克隆实验指南 (M), 北京: 科学出版社, 1992, 880-887.
- 146 . Smith G., Summers M., Fraser M. Production of human *beta* interferon in insect cells infected

- with a baculovirus expression vector. *Mol. Cell Biol.*, 1983, 3(12): 2156-2165.
- 147 . Snel B., Bork P., Huynen M. Genomes in flux: the evolution of *archeal* and *proteobacterial* gene content. *Genome Res.*, 2002. 12(1): 17-25.
- 148 . Splechna B., Petzelbauer I., Kuhn B., Kulbe K., Nidetzky B. Hydrolysis of lactose by *beta*-glycosidase *CelB* from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: comparison of hollow-fiber membrane and packed-bed immobilized enzyme reactors for continuous processing of ultrahigh temperature-treated skim milk. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2002, 98-100: 473-488.
- 149 . Sriram S., Palhan V., Gopinathan K. Heterologous promoter recognition leading to high-level expression of cloned foreign genes in *Bombyx mori* cell lines and larvae. *Gene*, 1997, 190(1): 181-189.
- 150 . Sriram S., Gopinathan K. The potential role of a late gene expression factor, *lef2*, from *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus in very late gene transcription and DNA replication. *Virology*, 1998, 251(1): 108-122.
- 151 . Stetter K., Fiala G., Huber G., Huber R., Seegerer A. Hyperthermophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1990, 75: 117-124.
- 152 . Stearns S. Evolution in health and disease. Oxford University Press. New York, N.Y. 1999.
- 153 . Stetter K. Life at the upper temperature border. In: J.&K. Trần Thanh Vân, J.C. Mounolou, J. Schneider and C. Mc Kay (eds). Colloque Interdisciplinaire du Comité National de la Recherche Scientifique, Frontiers of Life, Editions Frontières, Gif-sur-Yvette, France. 1992, pp. 195-219.
- 154 . Summers M., Smith G. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures. Texas Agricultural Experiment Station, College Station. TX, USA. 1987.
- 155 . Thiem S., Miller L. A baculovirus gene with a novel transcription pattern encodes a polypeptide with a zinc finger and a leucine zipper. *J Virol.*, 1989, 63(11): 4489-4497.
- 156 . Thompson, J. What we know and do not know about coevolution: insect herbivores and plant as a test case, In H. Olff, V. K. Brown, and R. H. Drent (ed.), *Herbivores: between plants and predators*. Blackwell Science Ltd., Oxford, United Kingdom. 1999, p. 7-30.
- 157 . Titterington J., Nun T., Passarelli A. Functional dissection of the baculovirus late expression factor-8 gene: sequence requirements for late gene promoter activation. *J Gen. Virol.*. 2003. 84(7): 1817-1826.
- 158 . Todd J., Passarelli A., Miller L. Eighteen baculovirus genes, including *lef-11*, *p35*, *39K*, and *p47*, support late gene expression. *J Virol.*, 1995, 69(2): 968-974.
- 159 . Todd J., Passarelli A., Lu A., Miller L. Factors regulating baculovirus late and very late gene expression in transient-expression assays. *J Virol.*, 1996, 70(4): 2307-2317.
- 160 . Tomiya N., Narang S., Lee Y., Betenbaugh M. Comparing N-glycan processing in mammalian cell lines to native and engineered lepidopteran insect cell lines. *J Glycoconj.*, 2004, 21(6): 343-360.
- 161 . van Strien E., Jansen B., Mans R., Zuidema D., Vlak J. Sequence and transcriptional analysis of the *ubiquitin* gene cluster in the genome of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus. *J Gen.*

- Viol., 1996, 77 ( Pt 9): 2311-2319.
- 162 . Vanarsdall A., Okano K., Rohrmann G. Characterization of the role of very late expression factor 1 in baculovirus capsid structure and DNA processing. J Virol., 2006, 80(4): 1724-1733.
- 163 . Varshavsky A. Naming a targeting signal. Cell, 1991, 64(1): 13-15.
- 164 . Wettern M., Parag H., Pollmann L., Ohad I., Kulka R. Ubiquitin in Chlamydomonas reinhardtii. Distribution in the cell and effect of heat shock and photoinhibition on its conjugate pattern. Eur. J Biochem., 1990, 191(3): 571-576.
- 165 . Weyer U., Possee R. Analysis of the promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *p10* gene. J Gen. Virol., 1989, 70(Pt1): 203-208.
- 166 . Weyer U., Possee R. A baculovirus dual expression vector derived from the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *polyhedrin* and *p10* promoters: co-expression of two influenza virus genes in insect cells. J Gen. Virol., 1991, 72 (Pt12): 2967-2974.
- 167 . Wojcik C. Ubiquitin--more than just a signal for protein degradation. Trends Cell Biol., 2001, 11(10): 397-399.
- 168 . Woolhouse M., Webster J., Domingo E., Charlesworth B., Levin B. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. Nat. Genet., 2002. 32(4): 569-577.
- 169 . Wu X., Stewart S., Theilmann D. Alternative transcriptional initiation as a novel mechanism for regulating expression of a baculovirus trans activator. J Virol., 1993, 67(10): 5833-5842.
- 170 . Wu Y., Carstens E. A baculovirus single-stranded DNA binding protein, LEF-3, mediates the nuclear localization of the putative helicase P143. Virology, 1998, 247(1): 32-40.
- 171 . Xiao Q., Zhang Z., Yi Y., He J., Wu X. Identification of functional region of *helicase* gene promoter in *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. Acta Biochimica. et Biophysica. Sinica (生物化学与生物物理学报). 2002, 34(5): 560-564.
- 172 . Xu Y., Grabowski G. Translational inefficiency of acid *beta*-glucosidase mRNA in transgenic mammalian cell. Molecular Genetics and Metabolism, 1998, 64(2): 87-97.
- 173 . Yoo S., Guarino L. The *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus *ie2* gene encodes a transcriptional regulator. Virology, 1994a, 202(2): 746-753.
- 174 . Yoo S., Guarino L. Functional dissection of the *ie2* gene product of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, 1994b, 202(1): 164-172.
- 175 . Zanutto P., Kessing B., Maruniak J. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. J Invertebr. Pathol. 1993, 62(2): 147-164.
- 176 . Zhou Y., Yi Y., Zhang Z., He J., Zhang Y., Wu X. Promoter activities in the baculovirus envelope glycoprotein *gp64* gene. Acta Biochimica. et Biophysica. Sinica (生物化学与生物物理学报), 2003, 35(1):18-26.

## 致 谢

才送走五彩缤纷的春天，还没来得及让飘香的八月桂沁入心脾，我就要挥挥衣袖，作别那片青青的翠竹了。此刻要感谢的人很多很多，心中涌起的却是离别的愁绪。

伴随着我点滴进步，是我的导师张志芳与沈桂芳两位研究员的殷勤指导。导师过人的才智、敏捷的思维、深刻的洞察力让人在严谨的科研中能感受到一种思维的乐趣。

感谢何家禄老师和孙崇瑜老师在生活上所给予的诸多帮助，是他们让我漂泊的心拥有一种家的温馨；感谢易咏竹老师对我实验和生活上的照顾。

感谢那些和我一起努力工作，献身科研的老师和同学们，正是你们不倦的耕耘，睿智的思维，热烈的探讨让我在科研道路上没有感到丝毫的孤独。

感谢中国农业科学院蚕业研究所的各级领导和各位老师给予的关心与支持！

感谢中国农业科学院研究生院的老师们！正是你们的教育，使我获得充分的基础知识来完成学位论文。

感谢中国科学技术大学徐卫华老师、洪波、徐军等各位同学在部分实验上所提供的大力帮助！

谢谢我的父母、姐姐、姐夫和哥哥、嫂子等亲人在精神上对我的关心和照顾，虽然他们不知道我从事何种研究，但是他们都为我骄傲。

深深地感谢我的爱人陈寅，这些年，我们都在为各自的研究努力工作，我们共同分享工作、学习和生活上的收获和进步，一起承担生活的压力。无论面临多大的困难，我们都默默地相互扶持，毫无怨言，有了他的陪伴是我今生最大的幸福。

最后，谨向参加本论文评阅和答辩的全体专家致以最诚挚的谢意！

天下没有不散的宴席，每一个新的结束也是一个新的开始，我只能以新的执着追求和点滴进步来回报我的恩师和我的亲人。“谁言寸草心，报得三春晖”，谨以此文献给上述提到的和没有提及的所有曾给予我教诲、支持、关心和友爱的人们。

林 旭 璁

2006 年 6 月于镇江

## 作者简历

**林旭璦**，女，汉族，1976年02月生于山东省栖霞市。1996年9月进入山东农业大学特种经济动物饲养专业学习并获得学士学位。2000年9月继续攻读本校的特种经济动物饲养专业硕士研究生，研究方向为病毒分子生物学，于2003年7月毕业并获得硕士学位。同年9月开始在中国农业科学院研究生院攻读特种经济动物饲养专业博士学位，研究方向为分子病毒学。期间主要进行了杆状病毒基因表达调控方面以及杆状病毒表达系统应用等方面的工作。

博士三年期间发表论文主要如下：

1. **林旭璦**, 陈寅, 张志芳, 何家禄, 沈桂芳, 杆状病毒表面展示系统的研究进展, 生物技术通报, 2004, 4: 5-9
2. **Xu'ai Lin**, Wei Zhang, Yin Chen, Bin Yao, Zhi Fang Zhang. Overexpression of *celB* Gene Coding for  $\beta$ -Glucosidase from *Pyrococcus furiosus* Using Baculovirus Expression Vector System in Silkworm, *Bombyx mori*. "Zeitschrift für Naturforschung C", in press (SCI 收录 0.783)
3. **Xu'ai Lin**, Zhongze Zhu, Yin Chen, Yongzhu Yi, Zhifang Zhang, Jialu He, Guifang Shen. Comparison of Expression Efficiency Using Various Transfer Vector in Silkworm Baculovirus Expression System, Submitted to "International Journal of Industrial Entomology"
4. **Xu'ai Lin**, Yin Chen, Yongzhu Yi, Zhifang Zhang. Transcription and mutation analysis of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *ubiquitin* gene promoter. Submitted to "Archives of Virology". (SCI 收录 1.711)
5. **Xu'ai Lin**, Yin Chen, Yongzhu Yi, Zhifang Zhang. Characteristics of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus *ubiquitin* gene promoter. Submitted to "Biochimica et Biophysica Acta". (SCI 收录 1.782)
6. **Xu'ai Lin**, Yin Chen, Yongzhu Yi, Zhifang Zhang. Baculovirus Genes Involved in BmNPV Ubiquitin Gene Expression in Transient Expression Assays. Submitted to "ICIPMC" (IX International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control).
7. Yin Chen, Zhongze Zhu, **Xu'ai Lin**, Yongzhu Yi, Zhifang Zhang, Guifang Shen. Overexpression and Characterization of *appA* Phytase Expressed by Recombinant Baculovirus Infected Silkworm. J Microbiol. Biotechnol., 2005, 15(3): 466-471 (SCI 收录 1.66)
8. Chen Y, Yao B, Zhu Z, Yi Y, **Lin X**, Zhang Z, Shen G. A constitutive super-enhancer: homologous region 3 of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, 318(4): 1039-1044. (SCI 收录 2.90)

申请专利一项：

“一种耐高温葡萄糖苷酶的制备方法” 申请号：2000610001785.X，第二完成人。

## 杆状病毒表面展示系统的研究进展\*

林旭瑗<sup>1,2</sup> 陈寅<sup>1,2</sup> 张志芳<sup>1,2</sup> 何家禄<sup>1</sup> 沈桂芳<sup>2</sup>( <sup>1</sup>中国农业科学院蚕业研究所, 镇江 212018; <sup>2</sup>中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

**摘 要:** 杆状病毒表面展示系统是近几年发展起来的一种新的真核展示系统, 通过在病毒衣壳蛋白 gp64 插入外源肽、二者融合表达或与特异性的锚定部位结合, 在病毒表面进行融合表达而筛选出目的活性肽或蛋白。可用来展示需糖基化、二硫键异构化等翻译后修饰才表现功能活性的复杂真核蛋白及构建多肽文库、抗体库等。本文简述了该技术的原理、研究进展、应用及发展前景等。可以预见, 杆状病毒表面展示技术的发展必将对生命科学及相关领域的发展产生深远的影响。

**关键词:** 表面展示 杆状病毒 真核生物 gp64

## Progress in Baculovirus Surface Display System

Lin Xuai<sup>1,2</sup> Chen Yin<sup>1,2</sup> Zhang Zhifang<sup>1,2</sup> He Jialu<sup>1</sup> Shen Guifang<sup>2</sup>( <sup>1</sup> Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018;<sup>2</sup> Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract:** Baculovirus surface display system is a new eukaryotic display technology developed in recent years, which can be used for reconstructing and screening the interested active polypeptide or protein, through fused to a second copy of the entire coat protein of baculovirus, gp64 or alternatively to the membrane anchor domain of gp64, simultaneous expression of the fusion construct and the native gp64 envelope protein results in packaging of both proteins into the viral coat and its presence on the surface of baculovirus-infected insect cells and/or budded virions. Especially in the use of displaying complex eukaryotic proteins requiring post-translational processing including glycosylation and efficient folding for functional activity. In this paper we mainly described the basis of this technology, its development, its applications and perspective. Therefore, the development of baculovirus surface display technology will bring profound influence on life science and related subjects.

**Key words:** Surface display Baculovirus Eukaryote Gp64

Smith 于 1985 年首次提出噬菌体展示<sup>[1]</sup>, 即将外源肽或蛋白质与噬菌体表面特定蛋白质融合并展示于噬菌体表面, 构建蛋白质或多肽文库, 从中筛选目的特异性蛋白质、多肽或抗体的基因工程技术。其重要特征和优点是靶分子肽与其编码 DNA 存在于一个细胞中, 可通过 DNA 模板的制备和序列测定而确定 DNA 序列, 进而推断所编码的靶分子结合肽氨基酸组成, 达到了基因型与表现型的统一。在短短几年的时间里, 表面展示技术得到了日新月异的发展, 相继建立了多种原核、真核表面展示系统<sup>[2,3]</sup>。杆状病毒表面展示系统属于高等真核生物展示系统, 可弥补原核展示系统的不足, 并保持表面

展示系统的优点, 在高亲和力抗体及多肽药物的筛选、蛋白质抗原表位分析等方面具有广阔的应用前景。目前研究及应用最为广泛的是苜蓿尺蠖核型多角体病毒 (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 表面展示系统。最近, Rahman 等以家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus, BmNPV) 作为展示系统成功展示了 GFP 重组蛋白, 为杆状病毒真核生物活体展示系统提供了新的选择和发展潜力<sup>[4]</sup>。

### 1 杆状病毒表面展示的基础——囊膜糖蛋白 gp64

在杆状病毒表面展示中用于和外源蛋白发生融

\* 国家自然科学基金 (39970571, 30271007) 资助项目

## Overexpression of *celB* Gene Coding for $\beta$ -Glucosidase from *Pyrococcus furiosus* Using a Baculovirus Expression Vector System in Silkworm, *Bombyx mori*

Xu' Ai Lin<sup>a,b</sup>, Wei Zhang<sup>a</sup>, Yin Chen<sup>b</sup>, Bin Yao<sup>a,\*</sup>, and Zhi Fang Zhang<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081, China. Fax: 86-10-68975136, E-mail: yaobin@mail.caas.net.cn

<sup>b</sup> Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, 212018, China. Fax: 86-511-5615044, E-mail: zhifangzhang@yahoo.com

\* Author for correspondence and reprint requests

Z. Naturforsch. **61c**, 1111–1117 (2006); received November 22, 2005/January 13, 2006

$\beta$ -Glucosidase is a member of the glycosyl hydrolases that specifically catalyze the hydrolysis of terminal nonreducing  $\beta$ -D-glucose residues from the end of various oligosaccharides with the release of  $\beta$ -D-glucose. *CelB* gene, encoding the thermostable  $\beta$ -glucosidase, was amplified from the *Pyrococcus furiosus* genome and then cloned into the baculoviral transfer vector under the control of the *polyhedrin* gene promoter. After co-transfection with the genetically modified parental *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV), the recombinant virus containing *celB* gene was used to express  $\beta$ -glucosidase in silkworm. The recombinant  $\beta$ -glucosidase was purified to about 81% homogeneity in a single heat-treatment step. The optimal activity of the expressed  $\beta$ -glucosidase was obtained at pH 5.0 and about 105 °C; divalent cations and high ionic strength did not affect the activity remarkably. This suggested that the enzymatic characteristics of recombinant  $\beta$ -glucosidase were similar to the native counterpart. The expressed  $\beta$ -glucosidase accounted for more than 10% of silkworm total haemolymph proteins according to the protein quantification and densitometer scanning. The expression level reached 10,199.5 U per ml haemolymph and 19,797.4 U per silkworm larva, and the specific activity of the one-step purified crude enzyme was 885 U per mg. It was demonstrated to be an attractive approach for mass production of thermostable  $\beta$ -glucosidase using this system.

**Key words:**  $\beta$ -Glucosidase, *Pyrococcus furiosus*, Baculovirus Expression Vector System

### Introduction

A variety of hyperthermophilic archaea and bacteria have been isolated from many ecosystems, mainly from water-containing terrestrial and marine high temperature areas (Stetter, 1992). Hyperthermophilic microorganisms have their optimal growth temperature at about 90 °C, and grow fast at temperatures between 80 °C and 110 °C (Stetter *et al.*, 1990). Due to the metabolic flexibility and their outstanding heat resistance, they are of great value for basic research as well as for biotechnological applications (Huber *et al.*, 2000). The discovery of hyperthermophilic microorganisms led to the isolation of enzymes that could function optimally at temperatures exceeding their host growth (Adams *et al.*, 1995; Niehaus *et al.*, 1999). *Pyrococcus furiosus*, isolated from a shallow marine hydrothermal vent, with an optimal growth temperature at above 100 °C, is one of the most well studied hyperthermophilic microorganisms (Woese *et al.*, 1990). *P. furiosus* forms complex

food webs, which use complex peptide mixtures or sugars as carbon and energy sources, e.g. starch, glycogen, maltose and cellobiose, so it must secrete various relevant enzymes to assimilate these compounds (Laderman *et al.*, 1993; Dong *et al.*, 1997). These enzymes are a useful extension of the enzyme application in industry for their extremophilic properties (like temperature, pH and pressure). Hyperthermophilic  $\beta$ -glucosidase has a variety of applications and is widely used in numerous fields, such as food, medicine, dairy products, environment protection and organic chemical industries (Fischer *et al.*, 1996; Hansson *et al.*, 2001; Splechna *et al.*, 2002).  $\beta$ -Glucosidase is one of the key enzymes of *P. furiosus* involved in growth on  $\beta$ -linked sugars. This enzyme serves as a model system for studying the molecular mechanisms that are employed by hyperthermophilic organisms to optimize enzyme stability and catalysis (Lebbink *et al.*, 2001).  $\beta$ -Glucosidase purified from *P. furiosus* is composed of four identical subunits,