

网络出版时间:2019-11-04 15:56 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.05.006
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20191101.0929.012.html

敲除 Ac148-150 对苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒复制和外源蛋白表达的影响

赵凯霞,陈红英

(西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】【目的】同时敲除苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)基因组的 Ac148、Ac149、Ac150(Ac148-150)基因,检测敲除 Ac148-150 基因片段对 AcMNPV 复制和外源蛋白表达能力的影响,为基因功能鉴定和缩小杆状病毒基因组提供参考。【方法】利用 Red/ET 同源重组系统和 rpsL-AMP 反向筛选系统对 Ac148-150 基因进行敲除,得到敲除型杆状病毒质粒(KOAc148-150 杆状病毒质粒),提取 AcMNPV KOAc148-150 杆状病毒质粒和野生型杆状病毒质粒,将其分别与报告基因表达载体共转染 Sf9 细胞,成功构建重组杆状病毒(野生型病毒 vAcMNPV/GFP 和缺失突变病毒 vAc Δ 148-150/GFP),测定 2 种重组杆状病毒的一步生长曲线并比较其差异。将 2 种重组杆状病毒感染 Sf9 细胞后,采用荧光显微镜观察 GFP 荧光细胞分布,用流式细胞仪检测 GFP 荧光强度,再通过 SDS-PAGE 和 Western blot 检测 Ac148-150 缺失突变体表达的 GFP 产量。【结果】菌落 PCR 结果表明,AcMNPV 中 Ac148-150 基因敲除成功。缺失突变病毒 vAc Δ 148-150/GFP 与野生型病毒 vAcMNPV/GFP 的一步生长曲线基本一致,说明 Ac148-150 缺失不影响病毒的复制。荧光显微镜观察和流式细胞仪分析结果表明,敲除 Ac148-150 对外源蛋白 GFP 分布和荧光强度未产生影响。SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果显示,缺失突变病毒 vAc Δ 148-150/GFP 和野生型病毒 vAcMNPV/GFP 表达 GFP 蛋白产量基本一致。【结论】从 AcMNPV 基因组中同时敲除 Ac148、Ac149、Ac150 基因后,对病毒的复制和外源蛋白的表达能力无影响。

【关键词】苜蓿银纹夜蛾;核型多角体病毒;Ac148-150;杆状病毒;基因敲除

【中图分类号】Q786

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2020)05-0042-07

Influence of deletion of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus Ac148-150 on viral replication and foreign protein expression

ZHAO Kaixia, CHEN Hongying

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The effect of Ac148, Ac149 and Ac150 (Ac148-150) deletion on AcMNPV replication and expression of foreign proteins was investigated to provide foundation for identification of baculovirus gene functions and shortening baculovirus genome. 【Method】Ac148-150 genes were knocked out by Red/ET homologous recombination and rpsL-AMP counter-selection systems. The recombinant baculoviruses (wild type virus vAcMNPV/GFP and deletion mutant virus vAc Δ 148-150/GFP) were successfully constructed by co-transfection with KOAc148-150 bacmid and wild type bacmid and reporter expression vector in Sf9 cells, and the one-step growth curve of two recombinant baculoviruses was determined. In Sf9

〔收稿日期〕 2019-05-06

〔基金项目〕 陕西省国际科技合作与交流计划项目“用于亚单位疫苗生产的杆状病毒表达载体的优化”(2016KW-022)

〔作者简介〕 赵凯霞(1993—),女,甘肃定西人,硕士,主要从事杆状病毒非必需基因研究。E-mail:15129086807@163.com

〔通信作者〕 陈红英(1970—),女,四川仁寿人,教授,博士生导师,主要从事分子病毒学研究。E-mail:chenhy@nwsuaf.edu.cn

cells infected with recombinant baculoviruses, GFP expression were then observed by fluorescence microscopy, and GFP fluorescence intensity was detected by flow cytometry. The expression of GFP in *Ac148-150* deletion mutant was examined by SDS-PAGE and Western blot. 【Result】 The knockout of *Ac148-150* was verified by PCR. Compared with the wild type virus vAcMNPV/GFP, the one-step growth curve of the deletion mutant virus vAc Δ 148-150/GFP was basically the same, indicating that *Ac148-150* deletion did not affect viral replication. Fluorescence microscopy and flow cytometry results showed that the deletion of *Ac148-150* had no effect on the expression of foreign proteins. As detected by SDS-PAGE and Western blot, there was no significant difference in GFP yield between *Ac148-150* deletion mutant and wild-type virus. 【Conclusion】 The deletion of *Ac148*, *Ac149*, *Ac150* from the AcMNPV genome had no effects on virus replication and the ability of expressing foreign proteins.

Key word: *Autographa californica*; multiple nucleopolyhedrovirus; *Ac148-150*; baculovirus; gene knockout

杆状病毒是一类具有囊膜的 DNA 病毒,其基因组是一个双链闭合的环状 DNA^[1],直径 40~50 nm,长度 400~500 nm,包装在由脂质包膜环绕的棒状核衣壳中^[2]。苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)是杆状病毒的模式种,其基因组大小约为 130 kb,至少含有 154 个开放阅读框(ORFs)^[3]。根据杆状病毒基因的特异性表达时期,将 AcMNPV 的 154 个基因分为立即早期基因、早期基因、晚期基因和极晚期基因^[4]。

根据形态结构的差异,杆状病毒在感染宿主的生命周期产生两种病毒粒子:出芽型病毒粒子(budded virion, BV)和包埋型病毒粒子(occlusion-derived virion, ODV)^[5],其中 ODV 感染中肠上皮细胞以引发昆虫幼虫的原发感染,而 BV 负责幼虫体内细胞间感染,被称为全身性感染^[6-7]。一些 ODV 相关蛋白对于细胞培养的病毒复制和重组蛋白表达是非必需的。已有研究显示,删除杆状病毒几丁质酶(chiA)和组织蛋白酶(cath)基因可以使重组蛋白高水平生产,并且对不同昆虫细胞内蛋白和分泌蛋白的稳定性也有改善^[8-10]。此外,杆状病毒两种晚期基因中的多角体蛋白基因和 *p10* 基因对细胞培养的病毒复制也是非必需的^[11-12],说明可以删除多角体蛋白基因和 *p10* 基因。从杆状病毒基因组中删除 *p10* 及其侧翼基因 *p26* 和 *p74*,尽管重组病毒对细胞存活力无影响,但外源重组蛋白产量显著提高^[13]。

Ac148 是一种口服感染因子,编码 ODV 相关蛋白 ODV-E56^[14],对细胞培养的病毒感染是非必需的^[15-16]。*Ac149* 编码一个小分子量蛋白,其在 BmNPV 中的同源基因 *Bm125* 缺失也不影响病毒的生

长,因此 *Ac149* 可能也是非必需基因^[17]。*Ac150* 是介导昆虫口服感染的蛋白,已有研究表明,*Ac150* 缺失突变体对幼虫的感染性降低^[18],在 BmNPV 中敲除同源基因 *Bm126* 后,尽管其突变体杀死幼虫的时间延长,但对 BV 的产生无明显影响^[19]。以上研究是在不同杆状病毒中对 *Ac148*、*Ac149*、*Ac150* 3 个基因进行单个敲除获得的结果。*Ac148*、*Ac149* 和 *Ac150* 3 个基因在基因组上位置相连,同时敲除是否会影响杆状病毒的感染复制目前尚未见报道。

鉴于此,本研究利用 Red/ET 同源重组系统和 rpsL-AMP 反向筛选系统^[20]对 *Ac148*、*Ac149*、*Ac150* (*Ac148-150*) 基因同时进行敲除,检测 *Ac148-150* 同时敲除对 AcMNPV 复制和外源蛋白表达能力的影响,为杆状病毒非必需基因的鉴定和缩小杆状病毒基因组以容纳更大外源片段提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞系 含有 AcMNPV 杆状病毒质粒和 Red/ET 重组质粒的大肠杆菌 HS996 (*Escherichia coli* HS996)由 University of Reading, Prof. Ian Jones 实验室馈赠。pTriEx-GFP、prpsL-AMP 质粒、草地贪夜蛾 Sf9 细胞和大肠杆菌 Top10 (*Escherichia coli* Top10),均来源于西北农林科技大学生命科学学院分子病毒学实验室。

1.1.2 主要试剂 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒和 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司,蛋白胨和酵母浸粉购自北京奥博星生物技术有限公司,琼脂糖购自 HyraGene, *L*-阿拉伯糖购自 wolsen, DNA Marker

购自 Vazyme; λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III marker、Unstained Protein Ladder marker、胎牛血清和 SFX-INSECT 培养基购自 Thermo scientific 公司, 2 $\times$ Es Taq Master Mix 购自康为世纪公司, RNaseA 酶和 *Bsu*36 I 购自 NEB 公司, FuGENE

HD 转染试剂购自 Promega 公司。

1.3 引物设计与合成

根据 *rpsL-AMP* 基因序列和 AcMNPV 基因组中 Ac148-150 基因序列, 设计特异性扩增引物(表 1), 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

表 1 PCR 所用引物
Table 1 PCR primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
Ac148U	<u>TTATTATCGAGGGGCCGTTGTTGGTGTGGGGTTTTGCATAGAAATAACAATGGGGATGGCCTGGTGATGG</u>
Ac150D	<u>TTTATTTTtagTTTTGGTTAGCGGTACATCCATAATCTGATATAGGAACACAATTTACCAATGCTTAATC</u>
Ac148UT	ATTACAGGGTCTGGTTCC
1stUT	CACACAATATGAGGACGC

注:下划线为敲除基因两侧同源臂序列。
Note: Underlines are homologous arm sequences of the knockout genes.

1.2 方 法

1.2.1 AcMNPV KOAc148-150 杆状病毒质粒的构建 本试验采用 Red/ET 同源重组系统和 *rpsL-AMP* 反向筛选系统对 Ac148-150 (129 059 — 130 709;1 650 bp) 进行敲除。将含有靶标基因 Ac148-150 两侧同源臂的 *rpsL-AMP* DNA 片段敲入大肠杆菌 HS996 后, 与 AcMNPV 杆状病毒质粒发生同源重组, 将 *rpsL-AMP* 基因表达的氨苄青霉素抗性基因作为筛选标记, 使大肠杆菌获得氨苄青霉素抗性, 从而通过氨苄青霉素筛选得到基因敲除型杆状病毒质粒, 将其命名为 KOAc148-150 杆状病毒质粒。

(1) 含有 Ac148-150 基因两侧同源臂 *rpsL-AMP* 片段的扩增。以稀释 100 倍的 *prpsL-AMP* 质粒作为模板, 用引物 Ac148U/Ac150D 扩增含有 Ac148-150 基因两侧同源臂的 *rpsL-AMP* 片段。PCR 反应体系: 2 $\times$ Es Taq Master Mix 10 μ L, 10 μ mol/L 上游引物 1 μ L, 10 μ mol/L 下游引物 1 μ L, *prpsL-AMP* 质粒 0.5 μ L, ddH₂O 8 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒对 PCR 产物进行胶回收, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测得到 *rpsL-AMP* 片段, 将其命名为 Ac148-150-*rpsL-AMP*, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

(2) AcMNPV Ac148-150 的敲除。挑取大肠杆菌 HS996 单克隆接种于含 Kan(15 μ g/mL) 和 Tet (3 μ g/mL) 的 LB 液体培养基, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 避光过夜培养。按 1 : 100 体积比将过夜培养的菌液转接于含 Kan(15 μ g/mL) 和 Tet(3 μ g/mL) 的 LB

液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.2~0.3, 加入 50 μ L 质量分数 10% *L*-阿拉伯糖, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 45 min。根据 Counter-Selection BAC Modification Kit 手册^[21]制备大肠杆菌 HS996 感受态细胞。将 1~2 μ L Ac148-150-*rpsL-AMP* 片段加入到大肠杆菌 HS996 感受态细胞中, 混合均匀后转入电转杯, 利用 Eppendorf 多功能细胞电穿孔仪进行电转化, 电压设置为 1 300 V。电击结束后立即加入 1 mL LB 液体培养基(不含抗生素), 37 $^{\circ}$ C 低转速复苏培养 70 min, 最后涂布于含有 Kan (15 μ g/mL)、Tet(3 μ g/mL) 和 Amp(50 μ g/mL) 的 LB 固体培养基上, 30 $^{\circ}$ C 避光培养 36~48 h。

(3) 敲除 Ac148-150 基因菌落的筛选。挑取上一步中 LB 固体平板上的单菌落, 利用检测引物 Ac148UT 和 1stUT 进行 PCR 扩增, 筛选敲除成功的菌落。PCR 反应体系为: 2 $\times$ Es Taq Master Mix 10 μ L, 10 μ mol/L 上游引物 1 μ L, 10 μ mol/L 下游引物 1 μ L, 菌落 0.5 μ L, ddH₂O 8 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。然后将阳性菌落接种于 5 mL 含 Kan(15 μ g/mL)、Tet(3 μ g/mL) 和 Amp(50 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 避光过夜培养。

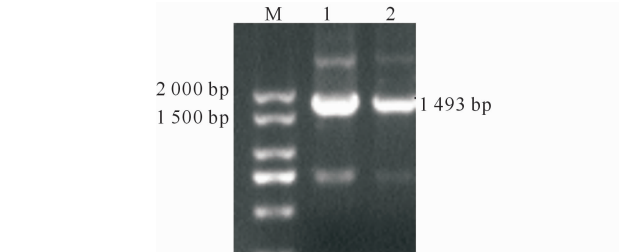
1.2.2 重组杆状病毒的构建 提取 AcMNPV 野生型杆状病毒质粒和 KOAc148-150 杆状病毒质粒, 并用 *Bsu*36 I 线性化, 分别与 pTriEx-GFP 质粒共转染于 Sf9 细胞。转染步骤如下: 将 Sf9 细胞铺入细胞培养皿中, 细胞密度为 50%~60%。取无菌的 1.5 mL 离心管, 加入 95 μ L dd H₂O(或无血清培养基), 再加入 5 μ L 转染试剂, 充分混匀。在另一无菌

的 1.5 mL 离心管中加入 95 μ L dd H₂O(或无血清培养基),再向离心管中加入 2 μ L 线性化杆状病毒质粒和 3 μ L pTriEx-GFP 质粒,充分混匀。将前一管混合物加入后一管中,混匀室温静置 20~30 min,然后逐滴均匀加入铺好的 Sf9 细胞中,28 $^{\circ}$ C 静置培养 4~6 d。收集病毒上清于 300 g 离心 5 min,传代 2 次,得到 2 种 P₂ 代重组杆状病毒:野生型病毒 vAcMNPV/GFP 和缺失突变病毒 vAc Δ 148-150/GFP。

1.2.3 重组杆状病毒一步生长曲线的测定 将重组杆状病毒以感染复数(MOI)=0.5 感染 Sf9 细胞,分别在感染 1,2,3,4,5,6 d 收集病毒上清,用极限稀释法^[22]测定重组杆状病毒滴度。步骤如下:用培养基稀释 Sf9 细胞悬液至细胞浓度约 5 $\times$ 10⁴ mL⁻¹,加入 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μ L。将重组杆状病毒原液连续作 10 倍梯度稀释,从 10⁻¹ 倍至 10⁻⁹ 倍接种于 96 孔板中,28 $^{\circ}$ C 培养连续 5~10 d,观察记录感染孔,直至不再有新的感染孔出现。按 Reed-Muench 两氏法^[22] 计算病毒滴度(TCID₅₀)。每一个生长曲线试验重复 3 次。

1.2.4 荧光显微镜分析重组杆状病毒在 Sf9 细胞中 GFP 的表达情况 将重组杆状病毒以 MOI=3 感染 Sf9 细胞,28 $^{\circ}$ C 培养 4 d,用 Leica 倒置荧光显微镜观察 GFP 的表达情况。

1.2.5 流式细胞仪分析重组杆状病毒在 Sf9 细胞中 GFP 的表达 收集 1.2.4 节被重组杆状病毒感染 96 h 后的 Sf9 细胞,利用流式细胞仪(Partec)在 488 nm 激发光波长下至少收集 3 $\times$ 10⁴ 个细胞作后续分析。在波长为 530 nm 的 FL1 通道下检测绿色荧光蛋白 GFP 的分布^[23],通过 FCS Express 6 和 FlowJo 7.6 分析收集的数据并做图。以未感染的



M. DNA Marker;1~2. rpsL-AMP 基因扩增产物
M. DNA Marker;1~2. PCR amplification products of rpsL-AMP gene

图 1 AcMNPV rpsL-AMP 片段的 PCR 扩增结果
Fig.1 Amplification of AcMNPV rpsL-AMP fragment

2.3 重组杆状病毒的检测

将线性化 AcMNPV 野生型杆状病毒质粒、

Sf9 细胞作为空白对照。

1.2.6 SDS-PAGE 和 Western blot 检测重组杆状病毒在 Sf9 细胞中 GFP 的表达情况 将重组杆状病毒以 MOI=3 感染 Sf9 细胞,28 $^{\circ}$ C 培养 4 d,弃掉培养基上清,用 PBS 小心洗涤 2 次以防止残留血清影响结果,然后在培养皿中加入 400 μ L 1 $\times$ SDS 上样缓冲液,收集蛋白样品于 1.5 mL 离心管中,置于干热仪中于 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min。将蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 电泳,然后用考马斯亮蓝染色。用 Western blot 检测蛋白质水平,具体步骤为:经 SDS-PAGE 分离的蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride,PVDF),用抗 His 的单克隆抗体作为一抗孵育,然后用含有 0.1% Tween-20 的 Tris-HCL 缓冲盐溶液洗涤 3 次后,再与 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体孵育^[24]。采用增强型化学发光试剂(ECL)显色标记抗体检测目的蛋白条带。

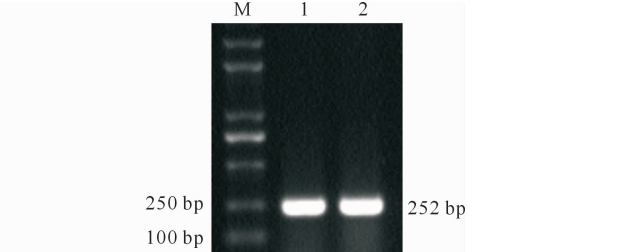
2 结果与分析

2.1 AcMNPV-rpsL-AMP 片段的扩增

以 prpsL-AMP 质粒作为模板,通过 PCR 扩增出带有 Ac148-150 基因两侧同源臂的 rpsL-AMP 片段,其长度为 1 493 bp,结果与预期一致(图 1)。

2.2 敲除 Ac148-150 基因 AcMNPV 阳性菌落的鉴定

通过菌落 PCR 检测氨苄抗性培养基上长出的阳性菌落,由于上游检测引物结合敲除基因上游位置,下游检测引物结合抗性基因,敲除成功则扩增出的目的片段大小应该为 252 bp,否则不能扩增出特异的 PCR 产物。图 2 显示,DNA 片段长度符合预期大小,说明氨苄抗性培养基上长出的菌落中 rpsL-AMP 片段成功替换掉了 Ac148-150 基因片段。



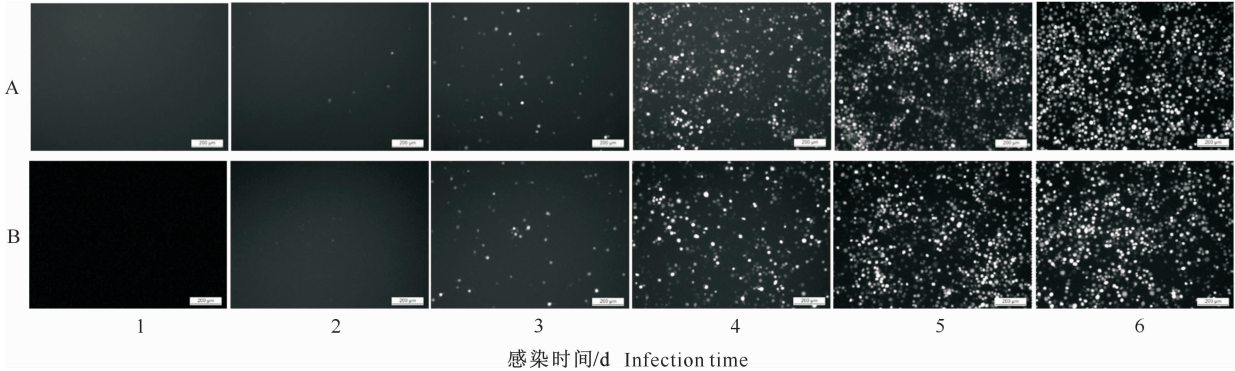
M. DNA Marker;1~2. 阳性菌落 PCR 产物
M. DNA Marker;1~2. PCR products of positive colony

图 2 敲除 Ac148-150 基因 AcMNPV 阳性菌落的 PCR 鉴定
Fig.2 Identification of knockout of Ac148-150 genes

AcMNPV positive colony by PCR
KOAc148-150 野生型杆状病毒质粒分别与 pTriEx-GFP 质粒共转染 Sf9 细胞,通过同源重组产生重组

杆状病毒。为了检测敲除 *Ac148-150* 基因是否对 *AcMNPV* 病毒的复制和感染产生影响,通过测定重组杆状病毒在不同感染时间点产生的病毒滴度,绘

制并比较野生型病毒 *vAcMNPV/GFP* 和缺失突变病毒 *vAc Δ 148-150/GFP*(*MOI*=0.5)在 *Sf9* 细胞中的一步生长曲线,结果见图 3 和图 4。



A. 野生型病毒;B. 缺失突变病毒;图片中右下角显示标尺,标尺大小 200 μ m

A. *vAcMNPV/GFP* Wild type virus *vAcMNPV/GFP*;B. *vAc Δ 148-150/GFP*Deletion mutant virus *vAc Δ 148-150/GFP*;

The ruler is displayed in the lower right corner of each picture with size of 200 μ m

图 3 重组杆状病毒的荧光检测

Fig. 3 Fluorescence microscopy detection of recombinant baculoviruses

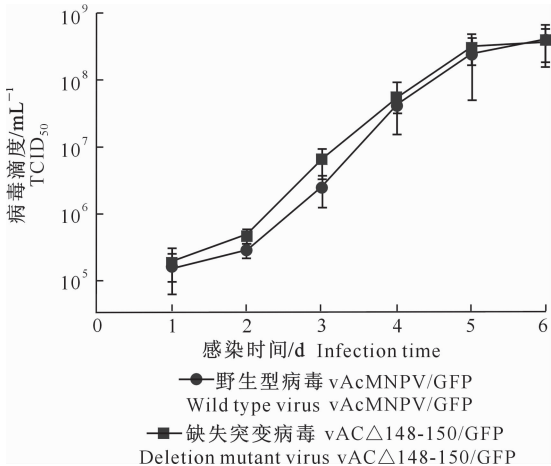


图 4 重组杆状病毒一步生长曲线的测定结果

Fig. 4 Determination of one-step growth curve of recombinant baculoviruses

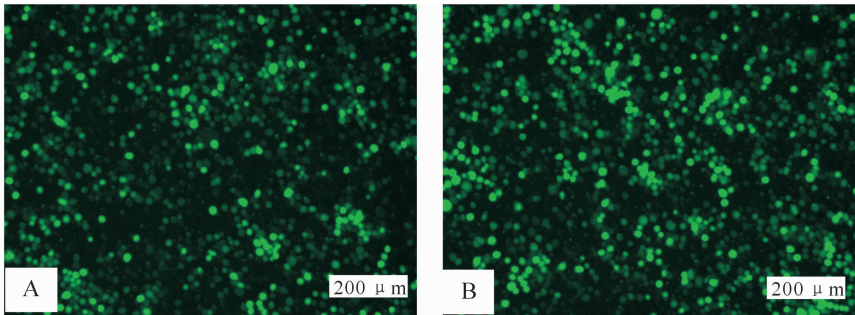
图 3 显示,缺失突变病毒 *vAc Δ 148-150/GFP*

在整个感染期间荧光细胞数量和 GFP 荧光强度与野生型病毒 *vAcMNPV/GFP*(对照)基本一致。

由图 4 可以看出,缺失突变病毒 *vAc Δ 148-150/GFP* 和野生型病毒 *vAcMNPV/GFP* 的一步生长曲线变化趋势基本一致。这说明敲除 *Ac148-150* 基因不影响 *AcMNPV* 病毒的复制和 BV 的产生。

2.4 重组杆状病毒在 *Sf9* 细胞中 GFP 的表达

2.4.1 荧光显微镜法分析 为检测重组杆状病毒表达外源蛋白的能力,重组杆状病毒以 *MOI*=3 感染 *Sf9* 细胞 4 d 后,被缺失突变病毒 *vAc Δ 148-150/GFP* 感染的 *Sf9* 细胞 GFP 荧光强度与野生型病毒 *vAcMNPV/GFP* 无明显差异(图 5),表明敲除 *Ac148-150* 不影响杆状病毒表达外源荧光蛋白的能力。



A. 野生型病毒 *vAcMNPV/GFP*;B. 缺失突变病毒 *vAc Δ 148-150/GFP*。图片中右下角显示标尺,标尺大小 200 μ m

A. Wild type virus *vAcMNPV/GFP*;B. Deletion mutant virus *vAc Δ 148-150/GFP*. The ruler is displayed in the lower right corner of each image with size of 200 μ m

图 5 重组杆状病毒在 *Sf9* 细胞内 GFP 表达的荧光显微观察

Fig. 5 Fluorescence microscopy analysis of GFP expression by recombinant baculoviruses in *Sf9* cells

2.4.2 流式细胞仪分析 图 6 显示,缺失突变病毒 $vAc\Delta 148-150/GFP$ 感染 Sf9 细胞中的 GFP 荧光强度和平均荧光强度均高于野生型病毒 $vAcMNPV/GFP$ 感染的 Sf9 细胞,但二者差异不显著。这说明敲除 *Ac148-150* 不影响重组杆状病毒表达 GFP 的荧光强度。

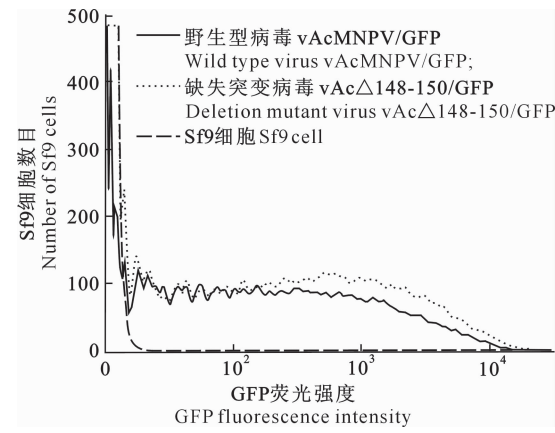
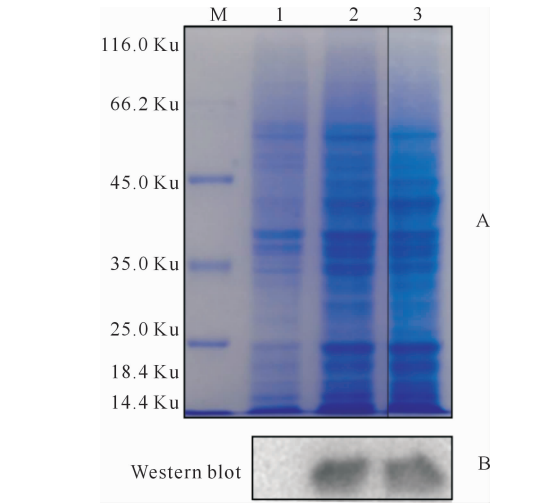


图 6 重组杆状病毒在 Sf9 细胞中 GFP 表达的流式细胞仪检测结果

Fig. 6 Detection of GFP expression by recombinant baculovirus in Sf9 cells by flow cytometry

2.4.3 SDS-PAGE 和 Western blot 检测 重组杆状病毒在 Sf9 细胞中 GFP 表达的 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B) 检测结果见图 7。



M. 蛋白 Marker;1. Sf9 细胞;2. 野生型病毒 $vAcMNPV/GFP$;
3. 缺失突变病毒 $vAc\Delta 148-150/GFP$
M. Protein Marker;1. Sf9 cell;2. Wild type virus $vAcMNPV/GFP$;
3. Deletion mutant virus $vAc\Delta 148-150/GFP$

图 7 重组杆状病毒在 Sf9 细胞中 GFP 表达的 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B) 检测结果

Fig. 7 Detection of GFP expression by recombinant baculoviruses in Sf9 cells by SDS-PAGE (A) and Western blot (B)

染色结果显示,缺失突变病毒 $vAc\Delta 148-150/GFP$ 感染的 Sf9 细胞中表达的 GFP 与野生型病毒 $vAcMNPV/GFP$ 基本一致(图 7-A)。Western blot 检测结果表明,缺失突变病毒 $vAc\Delta 148-150/GFP$ 感染的 Sf9 细胞中 GFP 的表达量与野生型病毒 $vAcMNPV/GFP$ 相比无明显差异(图 7-B),说明从 *AcMNPV* 基因组中敲除 *Ac148-150* 后,缺失突变病毒 $vAc\Delta 148-150/GFP$ 表达外源蛋白的能力未受到破坏。

3 讨论

随着对杆状病毒分子生物学的不断深入研究,发现杆状病毒基因组 1/3 以上基因功能未知,其中部分基因对病毒的增殖是非必需的^[25],但其对于基因调控和影响外源蛋白表达机制了解甚少。研究表明,在杆状病毒体外感染中同时敲除杆状病毒基因组上的几丁质酶基因和类组织蛋白酶基因,能够提高杆状病毒分泌蛋白和膜蛋白的表达量^[8-10];删除 *p10* 以及两侧基因 *p26* 和 *p74* 时,重组病毒的蛋白表达能力显著提高^[13]。*Ac148*、*Ac150* 基因及其在 *BmNPV* 中的同源基因缺失不影响病毒的复制^[17],而关于 *Ac149* 基因研究的较少,其对病毒复制是否必需仍然未知。本研究中,同时敲除 *Ac148*、*Ac149*、*Ac150* 3 个基因对病毒粒子 BV 的产生无影响,说明 *Ac148*、*Ac149*、*Ac150* 对于病毒复制都是非必需的,这与已有研究中报道 *Ac148* 和 *Ac150* 是口服感染相关蛋白和 BV 产生非必需基因的结果^[16,18] 一致,并且首次证明 *Ac149* 是 *AcMNPV* 的一个非必需基因。

为了评估重组杆状病毒表达外源蛋白的能力,以荧光蛋白 GFP 作为检测蛋白,荧光显微镜观察和流式细胞仪检测结果显示,与野生型病毒 $vAcMNPV/GFP$ 相比,缺失突变病毒 $vAc\Delta 148-150/GFP$ 感染 Sf9 细胞的 GFP 荧光强度未降低。通过 SDS-PAGE 和 Western blot 检测发现,*Ac148-150* 缺失突变体(缺失突变病毒 $vAc\Delta 148-150/GFP$)和野生型病毒 $vAcMNPV/GFP$ 表达的荧光蛋白 GFP 产量基本一致。说明敲除 *AcMNPV* 基因组中 *Ac148-150* 基因对该病毒复制和外源蛋白表达无影响。

本研究获得的 *Ac148*、*Ac149*、*Ac150* 敲除的野生型杆状病毒质粒,可以作为进一步缩小 *AcMNPV* 基因组的研究材料,敲除的 *Ac148*、*Ac149*、*Ac150* 位点也可以作为外源基因的敲入位点,用于构建携带外源基因的重组杆状病毒。

[参考文献]

- [1] Rohrmann G F. Baculovirus molecular biology [M/OL]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (US), (2013) [2019-05-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114593/>.
- [2] Ihalainen T O, Laakkonen J P, Paloheimo O, et al. Morphological characterization of baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus [J]. *Virus Research*, 2010, 148 (12): 71-74.
- [3] Ayres M D, Howard S C, Kuzio J, et al. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus [J]. *Virology*, 1994, 202(2): 586-605.
- [4] Friesen P D, Miller L K. The regulation of baculovirus gene expression [J]. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 1986, 131(131): 31-40.
- [5] Rohrmann G F. Baculovirus structural proteins [J]. *Journal of General Virology*, 1992, 73(2): 749-757.
- [6] Volkman L E, Summers M D. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: comparative infectivity of the occluded, alkali-liberated, and nonoccluded forms [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1977, 30(1): 102-103.
- [7] Summers M C. Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of trichoplusiani [J]. *Journal of Ultrastructure Research*, 1971, 35(5): 606-625.
- [8] Kaba S A, Salcedo A M, Wafula P O, et al. Development of a chitinase and v-cathepsin negative bacmid for improved integrity of secreted recombinant proteins [J]. *Journal of Virological Methods*, 2004, 122(1): 113-118.
- [9] Lee K S, Je Y H, Woo S D, et al. Production of a cellulase in silkworm larvae using a recombinant bombyx mori nucleopolyhedrovirus lacking the virus-encoded chitinase and cathepsin genes [J]. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(9): 645-650.
- [10] Hitchman R B, Possee R D, Crombie A T, et al. Genetic modification of a baculovirus vector for increased expression in insect cells [J]. *Cell Biology & Toxicology*, 2010, 26(1): 57-68.
- [11] Smith G E, Fraser M J, Summers M D. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene [J]. *Journal of Virology*, 1983, 46(2): 584-593.
- [12] Vlak J M, Klinkenberg F A, Zaai K J M, et al. Functional studies on the *p10* gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a *p10*-galactosidase fusion gene [J]. *Journal of General Virology*, 1988, 69 (4): 765-776.
- [13] Van Oers M M, Pijlman G P, Vlak J M. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology [J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96(1): 6-23.
- [14] Braunagel S C, Elton D M, Ma H, et al. Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56 [J]. *Virology*, 1996, 217(1): 97-110.
- [15] Harrison R L, Sparks W O, Bonning B C. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 envelope protein is required for oral infectivity and can be substituted functionally by rachiplusia ou multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 [J]. *Journal of General Virology*, 2010, 91 (5): 1173-1182.
- [16] Sparks W O, Harrison R L, Bonning B C. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ODV-E56 is a per os infectivity factor, but is not essential for binding and fusion of occlusion-derived virus to the host midgut [J]. *Virology*, 2011, 409(1): 69-76.
- [17] Ono C, Kamagata T, Taka H, et al. Phenotypic grouping of 141 BmNPVs lacking viral gene sequences [J]. *Virus Research*, 2012, 165(2): 197-206.
- [18] Zhang J. Effects of Ac150 on virulence and pathogenesis of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus in noctuid hosts [J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86(6): 1619-1627.
- [19] Hao B, Huang J, Sun X, et al. Variants of open reading frame Bm126 in wild-type *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus isolates exhibit functional differences [J]. *Journal of General Virology*, 2009, 90(1): 153-161.
- [20] Zhang X, Xu K, Ou Y, et al. Development of a baculovirus vector carrying a small hairpin RNA for suppression of sf-caspase-1 expression and improvement of recombinant protein production [J]. *BMC Biotechnology*, 2018, 18(1): 24-31.
- [21] Westenberg M, Soedling H M, Mann D A, et al. Counter-selection recombineering of the baculovirus genome: a strategy for seamless modification of repeat-containing BACs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(16): e166.
- [22] 黄仕和, 余模松. 测定杆状病毒滴度方法的研究进展 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2007, 35(2): 79-83.
Huang S H, Yu M S. Research progress in the determination of baculovirus titer [J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2007, 35(2): 79-83.
- [23] 欧艳梅, 许晓东. 重组杆状病毒表达 Sf-caspase-1 双链 RNA 对昆虫细胞凋亡的影响 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2016, 44(11): 187-192.
Ou Y M, Xu X D. Influence of insect cell apoptosis by expression of Sf-caspase-1 double-stranded RNA in recombinant baculovirus [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2016, 44(11): 187-192.
- [24] Wang Y L, Mao Y H, Xu X D, et al. Codon usage in signal sequences affects protein expression and secretion using baculovirus/insect cell expression system [J]. *PLOS ONE*, 2015, 10 (12): e0145887.
- [25] Kool M, Voncken J W, van Lier F L, et al. Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties [J]. *Virology*, 1991, 183(2): 739-746.