

网络出版时间:2015-11-11 16:16 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.12.026
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20151111.1616.052.html

利用 Red/ET 系统结合 *rpsL* 反向筛选敲除 *AcMNPV lef-10* 基因

白 玉,许晓东

(西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**利用 Red/ET 系统结合 *rpsL* 反向筛选建立苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*AcMNPV*)晚期表达因子 *lef-10* 点突变载体,为进一步研究 *AcMNPV lef-10* 的功能奠定基础。**【方法】**利用 Red/ET 系统结合 *rpsL* 反向筛选 BAC 修饰系统对 *AcMNPV lef-10* 进行点突变,由于 *lef-10* 和必需基因 *vp1054* 有重叠,所以在敲除 *lef-10* 时只能通过引进点突变使 *lef-10* 失活,避免影响 *vp1054* 的正常表达。首先,构建 *rpsL-AMP* 筛选盒,然后在野生型 *AcBacmid* 中引进点突变(方法是通过 2 次 Red/ET 重组:第 1 次重组在野生型 *AcBacmid lef-10* 中引进 *rpsL-AMP* 抗性筛选标记,形成一次重组 *Bacmid*,第 2 次重组是在一次重组 *Bacmid* 中引进含点突变的 *lef-10* 片段),再利用链霉素反向筛选去除 *rpsL-AMP* 抗性筛选标记,同时引入相应的点突变。将从 *lef-10* 基因点突变重组菌中提取得到的 *AcBacmid* 与质粒 pTriEx1.1 和 pTriEx-innateP-lef10 分别共转染草地贪夜蛾 *Sf9* 细胞,同时用野生型 *AcBacmid* 与质粒 pTriEx1.1 共转染 *Sf9* 细胞作为对照,显微镜下观察病毒的复制情况,确定 *lef-10* 基因是否为 *AcMNPV* 的必需基因。**【结果】**通过对重组 *Bacmid* 的 PCR 鉴定和点突变序列的测定,证明 *AcMNPV lef-10* 基因已经发生点突变;通过共转染试验发现,随着转染时间的延长,*lef-10* 补回型病毒和野生型病毒一样,均能在 *Sf9* 细胞中复制产生具有感染性的子代病毒粒子 BV,从而对邻近细胞造成二次感染,使得细胞死亡,且 *lef-10* 补回型重组病毒产生感染性病毒粒子的能力与野生型基本一致;而由于 *lef-10* 缺失型重组病毒不能产生有感染性的病毒粒子,所以在被 *lef-10* 缺失型重组病毒转染的细胞中,细胞数目不会随着转染时间的增加而发生明显改变。**【结论】**利用 Red/ET 重组系统结合 *rpsL* 反向筛选系统可以在 *AcMNPV lef-10* 基因中引入点突变,且 *lef-10* 是杆状病毒生活周期中的一个必需基因,其缺失会影响杆状病毒的复制。

[关键词] 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*AcMNPV*);*lef-10*;Red/ET 重组系统;*rpsL* 反向筛选系统;基因敲除
[中图分类号] Q786 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2015)12-0181-10

Disruption of *AcMNPV lef-10* by Red Recombination System in combination with *rpsL* counter-selection

BAI Yu,XU Xiao-dong

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

Abstract: **【Objective】**To study the function of late expression factor *lef-10* of *Autographa californica* nucleopolyhedro virus (*AcMNPV*),the RedET Recombination System in combination with *rpsL* counter-selection was used to introduce a single point mutation into the *AcMNPV lef-10* gene.**【Method】** Since the ORF box of the *lef-10* gene partially overlaps the upstream gene *orf53* and the downstream gene *vp1054*,a single point mutation was introduced into the *AcMNPV lef-10* gene to protect the complete gene

[收稿日期] 2014-04-24
[基金项目] 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2011JM3002)
[作者简介] 白 玉(1989—),女,内蒙古包头人,在读硕士,主要从事杆状病毒 *lef-10* 基因功能的研究。
E-mail:807738718@qq.com
[通信作者] 许晓东(1967—),男,黑龙江江南人,副教授,硕士生导师,主要从事分子病毒学研究。E-mail:xuxd@nwsuaf.edu.cn

sequence on both sides. First, we constructed *rpsL*-AMP screening box. Then introduction of point mutation was done through two RedET Recombination steps; the first Recombination was introduction of *rpsL*-AMP resistance selection marker into the *AcMNPV* *lef*-10 gene and the second Recombination was to introduce a single point mutation into the *AcMNPV* *lef*-10 gene through *rpsL* counter-selection, while removing the *rpsL*-AMP resistance selection marker. Then, *Sf*9 cells were co-transfected with *lef*10-KO-Bacmid DNA and pTriEx1.1 as well as *lef*10-KO-Bacmid DNA and pTriEx-innateP-*lef*10. The co-transfection with wtBacmid DNA and pTriEx1.1 was used as control. Then the infected cells were observed under the microscope. 【Result】Based on PCR identification of recombinant Bacmid and point mutations sequences, it was confirmed *lef*-10 gene had been disrupted. Co-transfection experiments showed that with the extension of the transfection time, $vAc^{lef-10KO-REP}$ and vAc^{wt} replicated in *Sf*9 cells to produce infectious virions BV. This resulted in secondary infection of neighboring cells and cell death. The production ability of infectious virions of $vAc^{lef-10KO-REP}$ was consistent with vAc^{wt} . Because $vAc^{lef10-KO}$ can not produce infectious virions, the number of cells did not change significantly with the extension of the transfection time when using $vAc^{lef10-KO}$ to transfect *Sf*9 cells. 【Conclusion】*AcMNPV* *lef*-10 gene has significant effects on replication of virus.

Key words: *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (*AcMNPV*); *lef*-10; RedET recombination system; *rpsL* counter-selection BAC modification system; gene disruption

杆状病毒是一类专性寄生于昆虫和某些甲壳类无脊椎动物的病原微生物,根据其包涵体的形态可分为 2 个属,即核多角体病毒属(Nucleopolyhedrovirus, NPV)和颗粒体病毒属(Granulovirus, GV)^[1]。苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, *AcMNPV*)是昆虫杆状病毒科核多角体病毒属的代表成员,是一类在宿主细胞核内复制的 DNA 病毒。其基因组长 134 kb,共有 154 个开放阅读框。*AcMNPV* 基因的表达可分为 4 个阶段:立即早期基因表达、早期基因表达、晚期基因表达和极晚期基因表达。

早期基因主要为病毒基因组 DNA 复制和晚期基因表达提供必需的蛋白因子。晚期基因的表达依赖于病毒基因组 DNA 的复制,并通过一种病毒编码或病毒改造过的 RNA 聚合酶转录,同时需要一类蛋白因子调控其表达,即晚期表达因子(Late expression factor, *lef*)。

瞬时表达试验证明, *AcMNPV* 中已鉴定的 19 种 *lef* 基因^[2-3]中有 11 种与病毒 DNA 的复制有关,即 *lef*-1^[4]、*lef*-2^[5]、*lef*-3^[6-7]、*lef*-7^[8]、*lef*-11^[9]、*p143*^[7]、*dnapol*^[10]、*ie1*^[11]、*ie2*^[12]和 *p35*^[13],另外 *lef*-10 基因也可影响病毒 DNA 的复制水平^[14]。其中 *lef*-1、*lef*-2、*lef*-3、*p143*、*lef*-11、*dnapol*和 *ie1*是 DNA 复制的必需基因,*lef*-10、*lef*-7、*ie2*和 *p35*是促进 DNA 复制的基因。*p35*对 DNA 复制的促

进作用与其抗细胞凋亡功能有关。*lef*-1 和 *lef*-2 既是 DNA 复制的必需基因,也是调控晚期基因表达的基因。其他参与晚期基因表达调控的基因有 *lef*-4^[15]、*lef*-5^[16]、*lef*-6^[17]、*lef*-8^[15]、*lef*-9^[15]、*lef*-10^[7,12]、*lef*-12^[18]、*39k*^[19]和 *p47*^[15],但除 *lef*-10 之外,这些基因均不参与病毒基因组 DNA 的复制。

在 19 个晚期表达因子中,目前关于 *AcMNPV* *lef*-10 基因功能的研究还比较少。*lef*-10 基因位于 *AcMNPV* 基因组 33.8~35.9 图谱单位,并且呈顺时针方向排列,其编码一个由 78 个氨基酸组成的小蛋白,分子质量为 8.7 ku,等电点为 3.6,是迄今鉴定的分子质量最小的晚期表达基因的产物。*lef*-10 的同源基因在所有的 Group I 和大部分 Group II 杆状病毒中都存在^[2]。瞬时表达试验证明, *lef*-10 与晚期和极晚期基因表达有关,但与早期基因表达无关^[7]。*lef*-10 也是晚期基因有效表达的必需基因^[7]。当用家蚕核多角体病毒(*BmNPV*) *lef*-10 缺失突变体转染 *BmNPV* 细胞时,检测到子代病毒滴度为零,病毒基因组复制水平下降,基因转录水平也显著下降,同时也未检测到早期基因 *lef*-3 的表达,这些结果表明, *BmNPV* *lef*-10 对于病毒基因组 DNA 的复制及晚期基因的转录具有重要作用,还会影响早期基因的表达水平^[14]。

虽然研究证实 *lef*-10 基因在 *BmNPV* 的生活周期中是必需基因,但并不表明在 *AcMNPV* 中也是必需的,如 *Ac16* 是 *AcMNPV* 的结构蛋白,对于

出芽型病毒(BV)和包涵体病毒(ODV)的形成具有重要作用,但却不是 *BmNPV* 的结构蛋白,其缺失不会影响 *BmNPV* 中 BV 和 ODV 的形成^[20-21]。*Ac31*^[22-23]和 *Ac68*^[24-25]是 *BmMNPV* 复制所必需的基因,但这 2 个基因的缺失却不会影响 *AcMNPV* 在昆虫细胞中的复制。*Ac74*、*Ac88*、*Ac102* 和 *Ac129/He118* 与 *AcMNPV* ODV 的形成有关,却与棉铃虫核多角体病毒(*HearNPV*) ODV 的形成无关^[21,26]。

本试验用到的反向筛选标记基因为 *rpsL-AMP*,这段基因中含有氨苄青霉素抗性基因和链霉素抗性抑制基因,将此基因导入 Bacmid 中并转化到特定的大肠杆菌株系(有链霉素抗性的 HS996、DH10B 等株系)后,会使得大肠杆菌获得氨苄青霉素抗性并抑制其本身的链霉素抗性,而用外源基因通过重组的方法将此标记基因替换后,菌株的链霉素抗性恢复而氨苄青霉素抗性消失,从而能方便地在大肠杆菌中获得 *lef-10* 点突变的重组杆状病毒质粒。本试验利用链霉素反向筛选方法,在 *lef-10* 基因中引入点突变,尽量避免对 *lef-10* 临近基因上下游调控序列的扰动,首次利用 Red 系统结合 *rpsL* 反向筛选成功敲除了 *AcMNPV lef-10* 基因,以期为进一步研究 *AcMNPV lef-10* 基因的功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和细胞

大肠杆菌 Top10(*Escherichia coli* Top10)、大肠杆菌 HS996(*Escherichia coli* HS996)(含 *AcMNPV* Bacmid DNA 和 Red/ET 重组质粒 pRedET)、大肠杆菌 BL21(DE3)、载体 pTriEx1.1 和 Sf9 细胞,皆由西北农林科技大学生命科学学院分子病毒学实验室保存;*AcMNPV* Bacmid 来源于 University of Reading,Prof. Ian Jones 实验室。

1.2 主要试剂

高载量 PCR 片段纯化试剂盒和柱式 DNAback 试剂盒购自北京天恩泽基因科技有限公司, SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自上海生工生物工程有限公司,限制性内切酶 *Bsp*H I、*Nco* I 和 *Xho* I 及 T4 DNA 连接酶均购自 Fermentas 公司, DL5000 DNA Marker 购自 Vazyme 公司,酵母浸粉和蛋白胨均购自北京奥博星生物技术有限公司, Eugene HD 转染试剂购自 Roche 公司,胎牛血清购自 Thermo Scientific HyClone 公司。

1.3 引物设计与合成

研究用到的引物均用 Primer Premier 5 软件设计(表 1),由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 本研究所用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	酶切位点 Restriction site
rpsL-UP	5'-CACGCTCGAGGATGGCCTGGTGATG-3'	<i>Xho</i> I
rpsL-Down-Amp	5'-TCATGATTGTCCTCCTTAAGCCTTAGGACG-3'	<i>Bsp</i> H I
rpsL-Down-Amp-1	5'-GGAAATGTTGAATACTCATGATTGTCCTCC-3'	<i>Bsp</i> H I
rpsL-AMP-UPNew	5'-GCTTAAGGAGGACAATCATGAG-3'	<i>Bsp</i> H I
10rpsLF	5'-GCATGACGAACGTATGGATGGCCTGGTGATGG-3'	
10AMPR	5'-GACGTCCGTCGCGAAGTTACCAATGCTTAATC-3'	
lef10MF	5'-GGACATTGAACTCGATTTTAGGCATTTTAAAAATGC-AATCATGACGAACGTATG-3'	
lef10MR	5'-ATCAAAAATAAATTATCTTTTCAGTACA-CAATTGATCAGGTTGACGTCCGTCGCGAA-3'	
lef10-promoter-F	5'-TGCATCTAGATGCTTCGAGAACTAAAGG-3'	
lef10-39R	5'-GTCAGGATCCATCGTTTCTTGGT-3'	
10MlinkF	5'-CATGACGAACGTATGATTCGCGACGGACGTCA-3'	
10MlinkR	5'-TGACGTCCGTCGCGAATCATACGTTTCGTCATG-3'	

1.4 *rpsL-AMP* 筛选盒的构建

本试验用到的反向筛选标记基因为 *rpsL-AMP*,该基因是从 *rpsL-AMP* 筛选盒中通过 PCR 扩增得到的,所以首先需要构建 1 个 *rpsL-AMP* 筛选盒,构建过程(图 1)如下。

1.4.1 *rpsL* 基因的 PCR 扩增 *rpsL* 基因是通过

2 次 PCR 反应得到的,第 2 次 PCR 反应的目的是为了在 *rpsL* 基因的 3'末端引进一个 SD 序列,使未来构建的筛选盒中的 *AMP* 基因可以利用此序列进行翻译。具体做法如下:

以大肠杆菌 BL21(DE3)基因组 DNA 为模板,用引物 rpsL-UP/rpsL-Down-Amp 进行 PCR 扩增,

扩增体系为:大肠杆菌 BL21(DE3)单菌落用接种针挑一下作为模板,10×*Taq* Buffer 5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 5 μL,25 mmol/L dNTP 1 μL,10 μmol/L 上游引物 *rpsL*-UP 1 μL,10 μmol/L 下游引物 *rpsL*-Down-Amp 1 μL,*Taq* 酶 0.25 μL,ddH₂O 补足 50 μL。反应条件为:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 7 min,最后 16 ℃ 保存。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,并用柱式 DNABack 试剂盒纯化,再以纯化后的片段为模板,用引物 *rpsL*-UP/*rpsL*-Down-Amp-1

进行 PCR 扩增,扩增体系为:模板 *rpsL* 0.1 μL,10×*Taq* Buffer 5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 5 μL,25 mmol/L dNTP 1 μL,10 μmol/L 上游引物 *rpsL*-UP 1 μL,10 μmol/L 下游引物 *rpsL*-Down-Amp-1 1 μL,*Taq* 酶 0.25 μL,ddH₂O 补足 50 μL。反应条件为:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,30 个循环;72 ℃ 7 min,最后 16 ℃ 保存。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,并用高载量 PCR 片段纯化试剂盒纯化,-20 ℃ 保存。

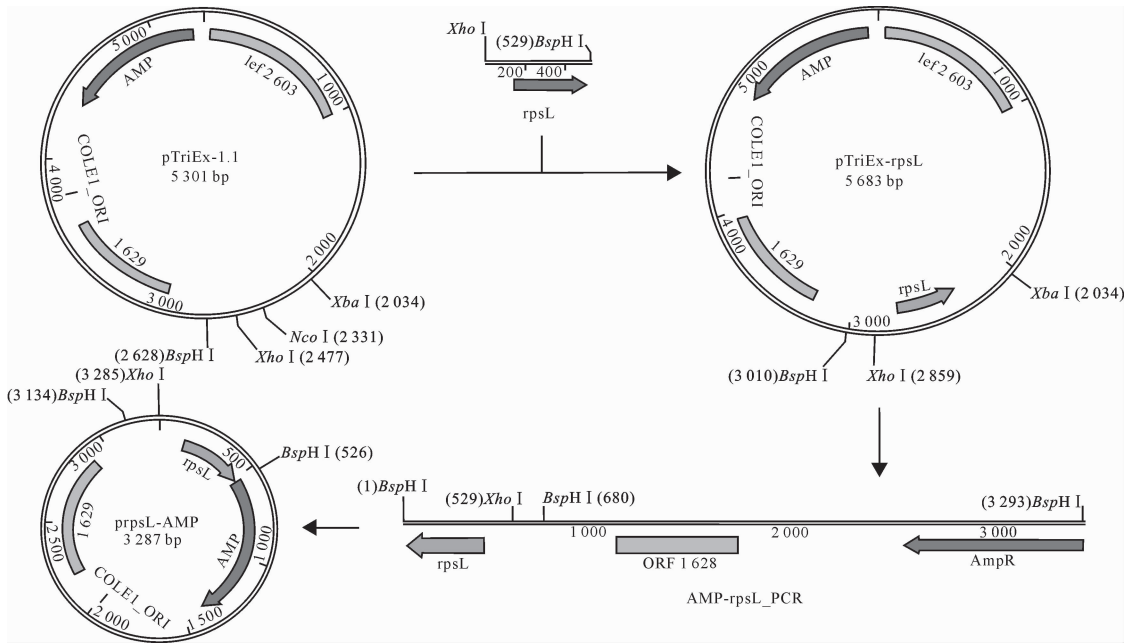


图 1 *rpsL*-AMP 筛选盒的构建过程

Fig. 1 *rpsL*-AMP screening boxes of construction process

1.4.2 pTriEx-rpsL 质粒的构建 用限制性内切酶 *BspH* I 和 *Xho* I 对上述第 2 次扩增的 PCR 回收产物进行双酶切,然后用 PCR 产物纯化试剂盒回收; *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切 pTriEx1.1 质粒,切胶回收酶切后的大片段,然后与酶切回收的 PCR 产物在 T4 DNA 连接酶作用下 16 ℃ 连接过夜。然后转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,涂布于含 50 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养平板上,37 ℃ 培养 16~20 h,挑单菌落进行 PCR 鉴定,将阳性菌落接种至含 50 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃、250 r/min 过夜摇菌,用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒,并对其用 *Xba* I 和 *Bam* H I 进行双酶切鉴定,将鉴定为阳性克隆的重组质粒送往上海生工生物工程有限公司测序,构建正确的重组质粒命名为 pTriEx-rpsL。

1.4.3 *rpsL*-AMP 片段的 PCR 扩增 以 pTriEx-

rpsL 质粒为模板,用引物 *rpsL*-AMP-UPNew/*rpsL*-Down-Amp-1 进行 PCR 扩增,该扩增产物包含了 ColEI 的复制起始位点。扩增体系如下: pTriEx-rpsL 质粒 0.1 μL,10×*Taq* Buffer 5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 5 μL,25 mmol/L dNTP 1 μL,10 μmol/L 上游引物 *rpsL*-AMP-UPNew 1 μL,10 μmol/L 下游引物 *rpsL*-Down-Amp-1 1 μL,*Taq* 酶 0.5 μL,ddH₂O 补足 50 μL。反应条件为:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 210 s,35 个循环;72 ℃ 10 min,最后 16 ℃ 保存。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,并用柱式 DNABack 试剂盒纯化,-20 ℃ 保存。

1.4.4 prpsL-AMP 质粒的构建 用限制性内切酶 *BspH* I 对 1.4.3 中 PCR 回收产物进行部分单酶切,然后用柱式 DNABack 试剂盒回收大片段,将回收的酶切产物在 T4 DNA 连接酶作用下 16 ℃ 连接

过夜,然后转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,涂布于含 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16~20 h,挑单菌落进行 PCR 鉴定,将阳性菌落接种至含 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 过夜摇菌,用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒,并对其用 *Bsp*HI 进行双酶切鉴定,将鉴定为阳性克隆的重组质粒送往上海生工生物工程有限公司测序,构建正确的重组质粒命名为 prpsL-AMP。

1.5 lef-10-KO-Bacmid 的构建

1.5.1 一次同源重组线性片段 lef10MF-rpsL-AMP-lef10MR 的制备 通过对 *lef-10* 进行保守区间分析以及参考 *lef-10* 上下游基因的转录分析,在 *lef-10* 基因起始密码子 ATG 下游 12 bp 处插入 *rpsL*-AMP 片段,造成插入突变以破坏 *lef-10* 的结构。但该片段的插入可能会影响 *lef-10* 下游基因 *vp1054* 的表达,所以需要利用 *rpsL* 反向筛选敲除策略进行二次重组,用含 *lef-10* 点突变的 Linker DNA 片段将 *rpsL*-AMP 替换出去,造成 *lef-10* 点突变,以最大限度地破坏 *lef-10* 的结构而又不影响其下游基因的表达。

为了通过 ET 重组完成对 *lef-10* 基因的插入缺失,参照 *AcMNPV* 基因组全序列^[27] 和已构建好的 prpsL-AMP 质粒序列,用 Primer Premier 5 软件设计特异性扩增引物对 10rpsLF/10AMPR 和 lef10MF/lef10MR(表 1)。10rpsLF/10AMPR 引物对分别由 AMP 基因的引物区域和 *rpsL* 基因的引物区域组成。lef10MF/lef10MR 引物对均由两部分组成,分别是 *lef-10* 的同源臂区域和 AMP 基因的引物区域以及 *lef-10* 的同源臂区域和 *rpsL* 基因的引物区域。lef10MF-rpsL-AMP-lef10MR 的同源臂区域长 50 bp,为 *lef-10* 基因中被插入区域上下游 50 bp 的序列。PCR 反应以 prpsL-AMP 质粒为模板,进行两轮扩增,扩增产物即为 lef10MF-rpsL-AMP-lef10MR。具体做法如下:

以 prpsL-AMP 质粒为模板,用 10rpsLF/10AMPR 进行第一轮 PCR 扩增,扩增体系如下: prpsL-AMP 质粒 0.1 μL ,10 $\times$ *Taq* Buffer 5 μL ,25 mmol/L MgCl_2 5 μL ,25 mmol/L dNTP 1 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 10rpsLF 1 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 10AMPR 1 μL ,*Taq* 酶 0.25 μL ,ddH₂O 补足 50 μL 。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 80 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,最后 16 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检

测,并用柱式 DNAback 试剂盒纯化,再以纯化后的片段为模板,用引物 lef10MF/lef10MR 进行第二轮 PCR 扩增,扩增体系为:模板 0.1 μL ,10 $\times$ *Taq* Buffer 5 μL ,25 mmol/L MgCl_2 5 μL ,25 mmol/L dNTP 1 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 lef10MF 1 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 lef10MR 1 μL ,*Taq* 酶 0.25 μL ,ddH₂O 补足 50 μL 。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min,最后 16 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 5 μL PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,其余的加入 5 μL 3 mol/L NaAc(pH 7.0)和 150 μL 体积分数 100% 乙醇进行沉淀,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 500 μL 体积分数 70% 乙醇洗涤,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,将沉淀在超净台上风干 5~10 min,加入 5 μL 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)溶解,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5.2 一次重组 Bacmid 的构建 挑取 *Escherichia coli* HS996 (含 *AcMNPV* Bacmid DNA 和 Red/ET 重组质粒 pRedET)单克隆,接种到含卡那霉素(15 $\mu\text{g/mL}$)和四环素(3 $\mu\text{g/mL}$)的 LB 液体培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。转接过夜培养的菌液,培养至 OD₆₀₀ 为 0.2~0.3,加入 L-阿拉伯糖至终质量浓度 3~4 g/L 后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 0.75~1 h,按 Counter-Selection BAC Modification Kit 的方法制备电转化感受态细胞。将 1 μL 乙醇沉淀回收的 lef10MF-rpsL-AMP-lefMR 线性化片段和 *Escherichia coli* HS996 感受态细胞混合后,转入电击杯中,用 SCIENTZ-2B 基因导入仪进行电转化。电击参数设置为电压 1 350 V,电容 5 μF ,电阻 600 Ω 。电击后立刻加入 1 mL 的不含抗生素的 LB 液体培养基,30 $^{\circ}\text{C}$ 复苏培养 1 h,然后涂布于含氨苄青霉素(50 $\mu\text{g/mL}$)、卡那霉素(15 $\mu\text{g/mL}$)和四环素(3 $\mu\text{g/mL}$)的 LB 固体平板上,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h。

1.5.3 一次重组 Bacmid 的 PCR 鉴定 随机挑取抗氨苄青霉素、卡那霉素和四环素的单菌落,用不同的引物组合进行 PCR 扩增,以验证 *lef-10* 基因是否发生插入突变。所用的扩增引物分别为 *lef-10* 基因的上、下游引物 lef10-promoter-F 和 lef10-39R(表 1)及 *rpsL*-AMP 基因内部引物对 rpsL-AMP-UPNew 和 10AMPR。不同组合分别为 lef10-promoter-F/10AMPR 和 rpsL-AMP-UPNew/lef10-39R。所有的 PCR 反应都用野生型病毒 Bacmid 作为对照。

1.5.4 二次同源重组线性片段 lef10MF-Linker-

lef10MR 的制备 参照 AcMNPV 基因组全序列, 用 Primer Premier5 软件设计特异性 Linker DNA 引物 10MlinkF 和 10MlinkR(表 1), 引物中的划线部分为引进的点突变, 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

分别取 10MlinkF 和 10MlinkR 各 20 μL 混合均匀, 在 PCR 仪上进行高温变性-低温复性反应: 95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 16 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 使 Linker DNA 成为双链。以双链 Linker DNA 为模板, 用引物 lef10MF/lef10MR 进行 PCR 扩增, 扩增体系为: 模板 0.1 μL , 10 $\times$ Taq Buffer 5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 5 μL , 25 mmol/L dNTP 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 lef10MF 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 lef10MR 1 μL , Taq 酶 0.25 μL , ddH₂O 补足 50 μL 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min, 最后 16 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 5 μL PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 其余的加入 5 μL 3 mol/L NaAc(pH 7.0) 和 150 μL 体积分数 100% 乙醇进行沉淀, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 500 μL 体积分数 70% 乙醇洗涤, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 将沉淀在超净工作台上风干 5~10 min, 加入 5 μL 10 mol/L Tris-HCl(pH 8.0) 溶解, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5.5 二次重组 Bacmid 的构建 挑取一次重组的 *Escherichia coli* HS996 单克隆接种到含氨苄青霉素(50 $\mu\text{g/mL}$)、卡那霉素(15 $\mu\text{g/mL}$)和四环素(3 $\mu\text{g/mL}$)的 LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。转接过夜培养的菌液, 培养至 OD₆₀₀ 为 0.2~0.3, 加入 L-阿拉伯糖至终质量浓度 3~4 g/L 后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 45~60 min, 按 Counter-Selection BAC Modification Kit 的方法制备电转化感受态细胞。将 1 μL 乙醇沉淀回收的 lef10MF-Linker-lef10MR 线性化片段和一次重组的 *Escherichia coli* HS996 感受态细胞混合后, 转入电击杯中, 用 SCIENTZ-2B 基因导入仪进行电转化。电击参数设置为电压 1 350 V, 电容 5 μF , 电阻 600 Ω 。电击后立刻加入 1 mL 不含抗生素的 LB 液体培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 复苏培养 1 h, 然后涂布于含链霉素(50 $\mu\text{g/mL}$)和卡那霉素(15 $\mu\text{g/mL}$)的 LB 固体平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h。

1.5.6 二次重组 Bacmid 的 PCR 鉴定 随机挑取抗链霉素、卡那霉素和四环素的单菌落, 用不同的引物组合进行 PCR 扩增, 以验证 *lef-10* 基因是否发生点突变。所用的扩增引物分别为 *lef-10* 基因的上、

下游引物 lef10-promoter-F 和 lef10-39R 及 *rpsL-AMP* 基因的上游引物 rpsL-AMP-UPNew。不同组合分别为 lef10-promoter-F/lef10-39R 和 rpsL-AMP-UPNew/lef10-39R。所有的 PCR 反应都用野生型病毒 Bacmid 作为对照。

1.6 lef-10-KO-Bacmid 转染草地贪夜蛾 Sf9 细胞 为构建野生型、敲除型和恢复型重组病毒, 提取二次重组病毒 Bacmid DNA, 用 pTriEx1.1 与野生型 AcMNPV Bacmid(对照)、pTriEx1.1 与二次重组病毒 Bacmid 及 pTriEx-innateP-lef10 与二次重组病毒 Bacmid 分别共转染 Sf9 细胞, 形成重组病毒的基因组可以在宿主细胞中进行表达。转染步骤为: 取 0.5 mL 离心管, 向其中加入 100 μL 无菌水、5 μL 构建好的质粒和 5 μL 线性化 Bacmid, 混匀后加入 5 μL 转染试剂, 再充分混匀, 静置 10~30 min 后均匀加入到铺好的 Sf9 细胞中。转染 4 d 后收集上清病毒, 然后取 100 μL 病毒重新感染 Sf9 细胞, 3 d 后, 置于普通光学显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 *rpsL-AMP* 筛选盒的构建

2.1.1 *rpsL* 基因的 PCR 扩增及重组质粒 pTriEx-rpsL 的双酶切鉴定 以大肠杆菌 BL21(DE3) 基因组为模板, 通过 2 次 PCR 扩增 *rpsL* 基因, 得到 513 bp 的特异性片段, 大小与预期结果吻合(图 2-A)。构建的重组质粒 pTriEx-rpsL 经 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切后, 得到约 723 bp 的片段(图 2-B), 与预期片段大小相同, 表明载体构建正确。

2.1.2 *rpsL-AMP* 片段的 PCR 扩增及重组质粒 prpsL-AMP 的单酶切鉴定 以 pTriEx-rpsL 质粒为模板, 通过 PCR 扩增 *rpsL-AMP* 片段, 得到 3 322 bp 的特异性片段, 大小与预期结果吻合(图 3-A)。构建的重组质粒 prpsL-AMP 经 *Bsp*HI 单酶切后, 得到 2 645 和 677 bp 的 2 条片段(图 3-B), 与预期片段大小相同, 表明载体构建正确。

2.2 lef-10-KO-Bacmid 的构建

2.2.1 一次同源重组线性片段 lef10MF-rpsL-AMP-lef10MR 的鉴定 以 prpsL-AMP 质粒为模板, 通过两轮 PCR 扩增 lef10MF-rpsL-AMP-lef10MR 片段, 琼脂糖凝胶电泳后得到 1 486 bp 的特异性片段, 大小与预期结果吻合(图 4)。该片段即为一次重组所需的线性化片段。

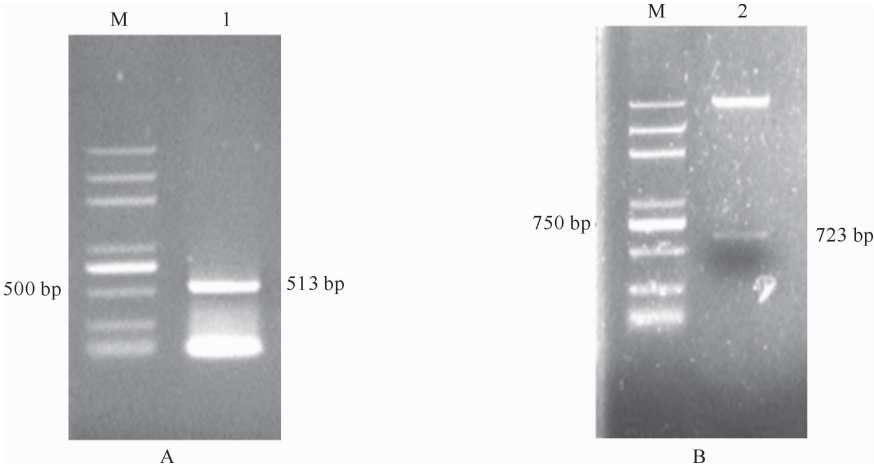


图 2 *rpsL* 基因的 PCR 扩增结果(A)及重组质粒 pTriEx-rpsL 的双酶切鉴定(B)

M. DNA Marker;1. *rpsL* 基因的 PCR 扩增产物;2. pTriEx-rpsL 的双酶切产物

Fig. 2 PCR product of *rpsL* gene (A) and identification of recombinant plasmid pTriEx-rpsL by restriction enzyme digestion (B)

M. DNA Marker;1. PCR product of *rpsL* gene;2. pTriEx-rpsL digested by *Xba* I and *Xho* I

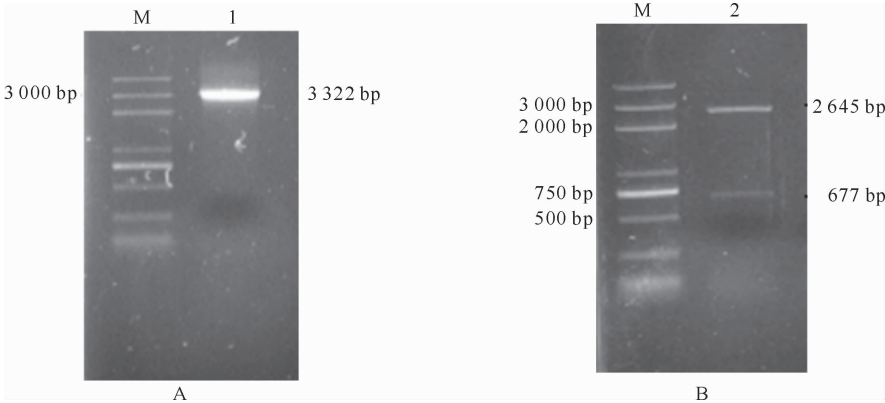


图 3 *rpsL-AMP* 基因的 PCR 扩增结果(A)及重组质粒 prpsL-AMP 的单酶切鉴定结果(B)

M. DNA Marker;1. *rpsL-AMP* 基因的 PCR 扩增产物;2. prpsL-AMP 的单酶切产物

Fig. 3 PCR product of *rpsL-AMP* gene (A) and identification of recombinant plasmid prpsL-AMP by restriction enzyme digestion (B)

M. DNA Marker;1. PCR product of *rpsL-AMP* gene;2. prpsL-AMP digested by *Bsp*HI

2.2.2 一次重组 Bacmid 的构建 将回收的线性片段电转化 L-阿拉伯糖诱导后的 *E. coli* HS996,在重组酶作用下,线性片段与 *lef-10* 基因发生同源重组,在含氨苄青霉素、卡那霉素和四环素的固体平板上获得了多个重组转化子。

2.2.3 一次重组 Bacmid 的 PCR 鉴定 随机挑取单克隆,用不同组合引物进行交叉 PCR 鉴定。不同引物组合分别为 *lef10-promoter-F/10AMPR* 和 *rpsl-AMP-UPNew/lef10-39R*。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测得到的目的片段(图 5),结果与预期结果大小相同。表明 *lef-10* 基因中已经插入外源线性 DNA 片段 *rpsL-AMP*,一次重组病毒构建正确。

2.2.4 二次同源重组线性片段 *lef10MF-Linker-lef10MR* 的制备 以双链 Linker DNA 为模板,通过 PCR 扩增 *lef10MF-Linker-lef10MR* 片段,琼脂糖凝胶电泳后得到 118 bp 的特异性片段,大小与预期结果吻合(图 6),该片段即为二次重组所需的线性化片段。

2.2.5 二次重组 Bacmid 的构建 将回收的线性片段电转化 L-阿拉伯糖诱导后的一次重组大肠杆菌 HS996,在重组酶作用下,线性片段与 *lef-10* 基因发生同源重组,在含链霉素、卡那霉素的固体平板上获得了多个重组转化子。

2.2.6 二次重组 Bacmid 的 PCR 鉴定 随机挑取单克隆,用不同组合引物进行交叉 PCR 鉴定。不同

组合引物分别为 lef10-promoter-F/lef10-39R 和 rpsL-AMP-UPNew/lef10-39R。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测得到的目的片段(图 7), 结果与预期大小相同,表明 *lef*-10 基因中可能已经

引入点突变。对用引物对 lef10-promoter-F/lef10-39R 扩增的 PCR 产物测序,结果显示 *lef*-10 基因中确实已引入点突变(图 8),表明二次重组病毒构建正确。

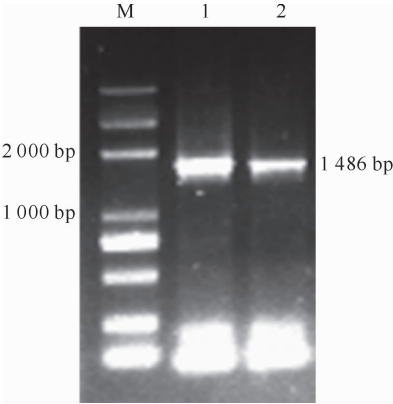


图 4 lef10MF-rpsL-AMP-lef10MR 片段的 PCR 扩增结果
M. DNA Marker;1,2. lef10MF-rpsL-AMP-lef10MR 片段的 PCR 扩增产物

Fig. 4 PCR product of lef10MF-rpsL-AMP-lef10MR DNA fragment
M. DNA Marker;1,2. PCR products of lef10MF-rpsL-AMP-lef10MR DNA fragment

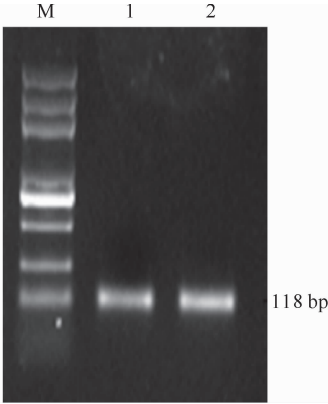


图 6 lef10MF-Linker-lef10MR 片段的 PCR 扩增结果
M. DNA Marker;1,2. lef10MF-Linker-lef10MR 片段的 PCR 扩增产物

Fig. 6 PCR product of lef10MF-Linker-lef10MR DNA fragment
M. DNA Marker;1,2. PCR products of lef10MF-Linker-lef10MR DNA fragment

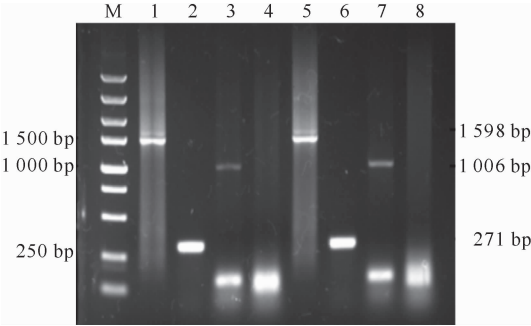


图 5 一次重组病毒的 PCR 鉴定
M. DNA Marker;1,2,5 和 6 是用引物对 lef10-promoter-F/10AMPR 进行 PCR 扩增的产物;3,4,7 和 8 是用引物对 rpsL-AMP-UPNew/lef10-39R 进行 PCR 扩增的产物,图谱底部的小片段是引物二聚体。泳道 1,3,5 和 7 使用一次重组病毒作为模板;泳道 2,4,6 和 8 使用 wtBacmid DNA 作为模板

Fig. 5 Polymerase chain reaction (PCR) confirmation of first recombinant virus
M. DNA Marker;1,2,5 and 6. PCR products after use of lef10-promoter-F/10AMPR as primers;3,4,7 and 8. PCR products after use of rpsL-AMP-UPNew/lef10-39R as primers;the small fragments in the bottom of the lane are primer dimer. Lanes 1,3,5 and 7 used first recombinant virus as template;Lanes 2,4,6 and 8 used wtBacmid DNA as template

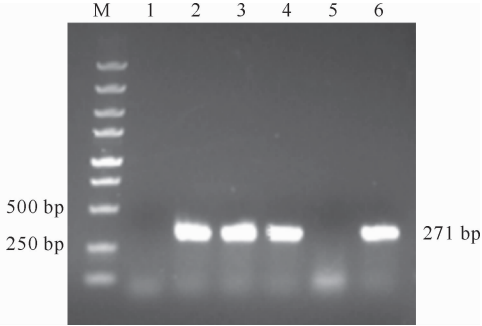


图 7 二次重组病毒的 PCR 鉴定
M. DNA Marker;2,3,4 和 6 是用引物对 lef10-promoter-F/lef10-39R 进行 PCR 扩增的产物;1 和 5 是用引物对 rpsL-AMP-UPNew/lef10-39R 进行 PCR 扩增的产物。泳道 1—4 使用重组病毒作为模板;泳道 5—6 使用 wtBacmid DNA 作为模板

Fig. 7 Polymerase chain reaction (PCR) confirmation of recombinant virus
M. DNA Marker;2,3,4 and 6. PCR products after use of lef10-promoter-F/lef10-39R as primers;1 and 5. PCR products after use of rpsL-AMP-UPNew/lef10-39R as primers;Lanes 1—4. Used recombinant virus as template;Lanes 5—6. Used wtBacmid DNA as template

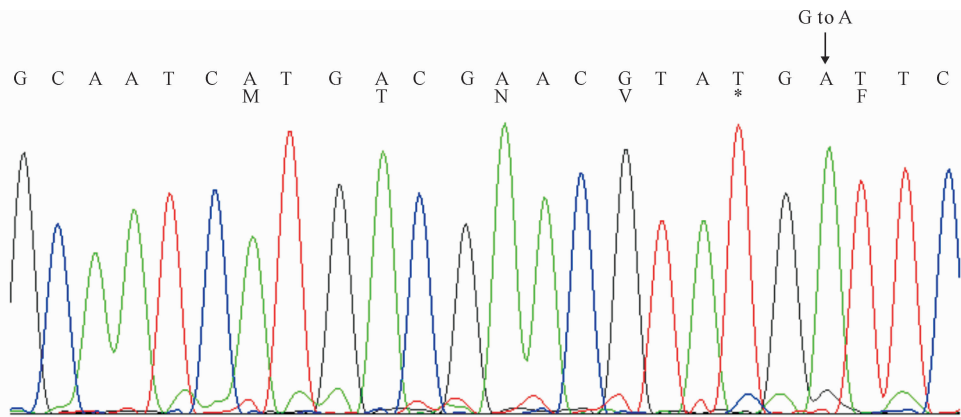


图 8 *lef-10* 基因部分序列的测序结果

Fig. 8 Sequencing results of partial gene sequencing of *lef-10*

2.3 *lef-10*-KO-Bacmid 转染草地贪夜蛾 *Sf9* 细胞

用 pTriEx1.1 与野生型 *AcMNPV* Bacmid、pTriEx1.1 与重组 *AcMNPV* Bacmid 及 pTriEx-in-nateP-*lef10* 与重组 *AcMNPV* Bacmid 分别共转染 *Sf9* 细胞,形成重组病毒的基因组可以在宿主细胞中进行表达,从而使得细胞大量死亡。在普通光学显微镜下观察 *Sf9* 细胞的生长情况(图 9)可以发现,随着转染时间的延长,被 *lef-10* 补回型重组病毒和野生型病毒转染的细胞出现大量死亡,死亡的

细胞不再贴壁生长,而是游离悬浮于细胞培养液中,表明 *lef-10* 补回型病毒与野生型病毒一样,均能在 *Sf9* 细胞中复制产生具有感染性的子代病毒粒子 BV,从而对邻近细胞造成二次感染,使得细胞死亡;而在被 *lef-10* 敲除型重组病毒转染的细胞中,细胞数目不会随着转染时间的增加而发生明显改变,细胞能够密集地贴壁生长。因此可以初步判断,*lef-10* 基因的缺失会影响病毒的复制,进一步说明 *lef-10* 基因点突变型重组病毒构建成功。

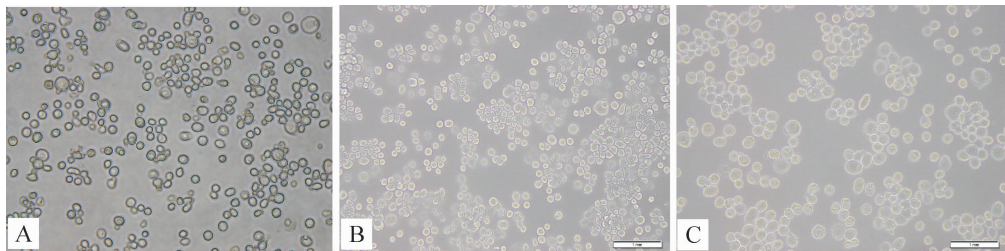


图 9 野生型病毒(A)、敲除型病毒(B)和补回型病毒(C)转染 *Sf9* 细胞后的光镜观察

Fig. 9 Microscopy of *Sf9* cells transfected with wild type virus (A),knockout virus (B),and recovery type virus (C)

3 讨 论

传统的杆状病毒改造大多采用同源重组的方法进行,即将构建好的转移载体与病毒基因组 DNA 共转染宿主细胞,从而构建出发生了同源重组的病毒。然而这种方法有很大的局限性,因为当杆状病毒的必需基因被敲除后,病毒便无法进行复制产生子代病毒,从而无法得到重组病毒,也使得研究无法继续。随着科学的发展,Red/ET 重组技术渐趋成熟,并成功运用于杆状病毒的基因敲除和基因补回,使得对杆状病毒的研究进入了一个前所未有的高度。目前,利用该项技术已经对许多基因进行了精确敲除,这对于研究杆状病毒的必需基因在病毒生

命周期中的作用,以及在病毒复制中扮演的角色有着重要意义。

为了研究 *AcMNPV lef-10* 基因的功能区,首先要对该基因进行敲除。通过对 *AcMNPV lef-10* 基因的分析可知,*lef-10* 基因的转录方向与上游基因 *ac53* 和下游基因 *vp1054*、*ac55* 的转录方向均一致,其中与上游基因 *ac53* 有 3 bp 的重叠区域,与下游基因 *vp1054* 有 143 bp 的重叠区域。如果对 *lef-10* 整个 ORF 进行敲除的话,可能会影响下游基因转录的起始。因此,本研究在敲除 *lef-10* 时考虑通过引进点突变使 *lef-10* 失活,以此确保对 *lef-10* 基因保守区域进行最小程度的破坏。引进点突变的方法是通过 2 次 Red/ET 重组:第 1 次重组引进 *rpsL*-

AMP 抗性筛选标记,第 2 次重组通过链霉素反向筛选去除 *rpsL*-AMP 抗性筛选标记,同时引入相应的点突变。需要说明的是,虽然有商品化的 *rpsL*-Kan 筛选盒,但本试验却自行构建 *3rpsL*-AMP 筛选盒,主要原因是试验所用的 AcMNPV Bacmid 是由 Zhao 等^[28]改造过的含有 Kan 抗性标记的筛选盒,所以无法使用商品化的筛选盒。本试验利用 Red/ET 重组技术成功构建了一次重组病毒,并利用链霉素反向筛选获得 *lef*-10 点突变的重组病毒。

本试验构建的载体可以与 Bacmid 发生重组,形成可以表达外源基因的重组病毒。为了研究 AcMNPV *lef*-10 缺失型重组病毒侵染细胞时是否会影响病毒的复制,构建了野生型、*lef*-10 缺失型重组病毒以及 *lef*-10 补回型重组病毒,在普通光学显微镜下观察重组病毒在 Sf9 细胞内的复制情况,结果表明被 *lef*-10 缺失型重组病毒转染的细胞内部无法产生具有感染性的子代病毒粒子 BV,从而无法造成细胞间的二次感染,也就是说 *lef*-10 基因是 AcMNPV 生活周期中的一个必需基因,其缺失会影响病毒 DNA 的复制,然而目前还不清楚 *lef*-10 基因如何精确调控病毒基因组的 DNA 复制。这些结果还说明,利用 Red/ET 系统的重组功能结合 *rpsL* 反向筛选 BAC 修饰系统对靶基因进行点突变的方法是有效的。

本研究得到了 AcMNPV *lef*-10 基因点突变的重组病毒,后续将进一步通过构建含有截断 *lef*-10 基因的载体来研究 AcMNPV *lef*-10 的功能区。

4 结 论

本研究首次采用 Red/ET 系统结合 *rpsL* 反向筛选系统,构建了 AcMNPV *lef*-10 基因点突变的重组病毒,通过转染细胞试验证明 AcMNPV *lef*-10 基因是病毒增殖所必需的基因,该方法对以后进行杆状病毒基因改造具有一定的参考价值。

〔参考文献〕

- [1] Marc H V, Claude M. Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses [R]//Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000.
- [2] Lu A, Miller L K. The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication [J]. J Virol, 1995, 69: 975-982.
- [3] Rapp J C, Wilson J A, Miller L K. Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression

- [J]. J Virol, 1998, 72: 10197-10206.
- [4] Mikhailov V S, Rohrmann G F. Baculovirus replication factor LEF-1 is a DNA primase [J]. J Virol, 2002, 76: 2287-2297.
- [5] Wu C P, Huang Y J, Wang J Y, et al. *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus LEF-2 is a capsid protein required for amplification but not initiation of viral DNA replication [J]. J Virol, 2010, 84: 5015-5024.
- [6] Ito E, Sahri D, Knippers R, et al. Baculovirus proteins IE-1, LEF-3, and P143 interact with DNA *in vivo*: A formaldehyde cross-linking study [J]. Virol, 2004, 329: 337-347.
- [7] Yu M, Carstens E B. Identification of a domain of the baculovirus *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus single strand DNA-binding protein LEF-3 essential for viral DNA replication [J]. J Virol, 2010, 84: 6153-6162.
- [8] Chen C J, Thiem S M. Differential infectivity of two *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus mutants on three permissive cell lines is the result of *lef*-7 deletion [J]. Virol, 1997, 227: 88-95.
- [9] Lin G, Blissard G W. Analysis of an *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus *lef*-11 knockOut; LEF-11 is essential for viral DNA replication [J]. J Virol, 2002, 76: 2770-2779.
- [10] McDougal V V, Guarino A. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase: Measurement of processing and strand displacement [J]. J Virol, 1999, 73: 4908-4918.
- [11] Olson V A, Wetter J A, AFriesen P D. Oligomerization mediated by a helix-loop-helix-like domain of baculovirus IE1 is required for early promoter transactivation [J]. J Virol, 2001, 75: 6042-6051.
- [12] Yoo S, Guarino L A. The *Aurographa californica* nuclear polyhedrosis virus *ie2* gene encodes a transcriptional regulator [J]. Virol, 1994, 202: 746-753.
- [13] KOol M, Ahrens C H, Goldbach R W, et al. Identification of genes in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 11212-11216.
- [14] Yu W, Du Y, Quan Y P, et al. Characterization of late gene expression factor LEF-10 from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus [J]. Virus Research, 2013, 175: 45-51.
- [15] Acharya A, Gopinathan K P. Characterization of late gene expression factors *lef*-9 and *lef*-8 from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus [J]. J Gen Virol, 2002, 83: 2015-2023.
- [16] Guarino L A, Dong W, Jin J. *In vitro* activity of the baculovirus late expression factor LEF-5 [J]. J Virol, 2002, 76: 12663-12675.
- [17] Lin G, Blissard G W. 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 transcription [J]. J Virol, 2002, 76: 5503-5514.
- [18] Guarino L A, Mistretta T A, Dong W. Baculovirus *lef*-12 is not required for viral replication [J]. J Virol, 2002, 76: 12032-12043.