

2011, 37(2): 0325–0329
ISSN 0257–4799; CN 32–1115/S
E-mail: CYKE@chinajournal.net.cn

利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统在家蚕中表达人瘦素蛋白

陈蔚¹ 付凡¹ 唐顺明^{1,2} 汪生鹏^{1,2} 黄金山^{1,2} 赵巧玲^{1,2} 沈兴家^{1,2}

(¹江苏科技大学, 江苏镇江 212003; ²中国农业科学院蚕业研究所, 江苏镇江 212018)

摘要 瘦素(leptin)蛋白由肥胖基因编码,对人体能量代谢等多种生理过程起着重要的调节作用。利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统技术,将人瘦素蛋白基因(*lep*)克隆到杆状病毒转移载体 pFastBacHTb,并转化 *E. coli* DH10Bac,获得重组杆粒 Bacmid-*lep*,然后转染家蚕 BmN 细胞,获得重组杆状病毒。用 SDS-PAGE 和 Western blotting 方法在感染重组病毒的家蚕 BmN 细胞检测到大小约 22 kD 的蛋白条带,与预期的人瘦素蛋白分子质量相符。给家蚕 5 龄起蚕注射重组病毒液后的 4~5 d 出现发病症状,RT-PCR 分析发病家蚕的血液中有 *lep* 基因转录,并通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测到大小为 22 kD 的人瘦素蛋白的表达。研究结果表明,利用 Bac-to-Bac 表达系统能够获得含有人瘦素蛋白基因的重组杆状病毒,并且目的蛋白能在家蚕细胞及幼虫体内表达。

关键词 人瘦素蛋白; Bac-to-bac 杆状病毒表达系统; 重组杆状病毒; 融合蛋白; 家蚕

中图分类号 S881.2; Q78 文献标识码 A 文章编号 0257–4799(2011)02–0325–05

Expression of Human Leptin in *Bombyx mori* Using Bac-to-Bac Baculovirus Expression System

CHEN Wei¹ FU Fan¹ TANG Shun-Ming^{1,2} WANG Sheng-Peng^{1,2} HUANG Jin-Shan^{1,2}
ZHAO Qiao-Ling^{1,2*} SHEN Xing-Jia^{1,2}

(¹Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang Jiangsu 212003, China; ²The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang Jiangsu 212018, China)

Abstract Leptin is coded by obese gene. It plays important regulatory roles in energy metabolism and a number of other physiological processes of human. Using the Bac-to-Bac baculovirus expression system, a human *lep* gene was subcloned into the baculovirus transfer vector pFastBacHTb and was transformed into *E. coli* DH10Bac to construct recombinant Bacmid-*lep*. Bacmid-*lep* was then used to transfect BmN cells to obtain the recombinant baculovirus. SDS-PAGE and Western blotting detected a protein band of about 22 kD in BmN cells infected by the recombinant virus, which was correspondent to the deduced molecular weight of human leptin. After the newly exuviated larvae of the 5th instar were injected with the recombinant virus, the symptoms of infection appeared 4 to 5 d later. RT-PCR analysis showed transcription of *lep* gene in the hemolymph of infected larvae. SDS-PAGE and Western blotting also detected expression of human leptin with 22 kD size in the hemolymph. The above results indicated that the Bac-to-Bac expression system can be use to prepare recombinant baculovirus containing human *lep* gene and the target protein can be expressed in BmN cells and *Bombyx mori* larvae.

Key words Human leptin; Bac-to-Bac baculovirus expression system; Recombinant baculovirus; Fusion protein; *Bombyx mori*

收稿日期:2010–11–30 接受日期:2011–01–02

资助项目:国家高技术研究发展计划“863”项目(No. 2007AA100-504),国家自然科学基金项目(No. 31072083)。

作者简介:陈蔚(1986–),女,江苏,硕士研究生。

E-mail:chenweixd@163.com

通信作者:赵巧玲,研究员,博士生导师。

Tel:0511-85616707, E-mail:qlzhao302@126.com

瘦素(leptin)是肥胖基因编码并由脂肪组织分泌的多肽类激素。1994年 Zhang 等^[1]克隆了人和小鼠的肥胖基因,其翻译产物均由 167 个氨基酸组

成,二者间具有 84% 的相似度,蛋白分子质量为 18 kD。人瘦素蛋白基因(*lep*)位于 7 号染色体长臂 3 区 1 带 3 亚带,单拷贝,全长 20 kb,包括 3 个外显子和 2 个内含子。外显子 2 和 3 为编码区,共 501 bp,为保守的单一开放阅读框。人瘦素蛋白基因的 5' 端侧翼顺序含有 1 个 TATA 盒、3 个拷贝的 GC 盒和 1 个 CCAAT/增强子结合蛋白结合位点,3' 端包括 3.7 kb 的非编码区和富含 CT 的序列^[2]。人瘦素蛋白基因编码的由 167 个氨基酸组成的多肽称为人瘦素蛋白前体,其氨基端是由 21 个强亲水性氨基酸残基组成的信号肽,成熟蛋白由 146 个氨基酸组成,通过微粒体分泌进入血液^[3]。人瘦素蛋白不仅具有抑制摄食以及调节脂肪沉积、能量代谢和内分泌的功能^[4-5],而且还参与机体免疫、造血等生命活动过程。因此,研究体外高效表达生产人瘦素蛋白,用于治疗肥胖、糖尿病等疾病,具有重要的医学价值。1997 年已有人瘦素蛋白在大肠杆菌中成功表达的报道^[6],目前该蛋白的原核表达研究已较为广泛,纯化后的表达产物具有明显的生物学活性^[7-8],还能促进骨骼生长^[9]。近年有研究者利用鸡作为生物反应器,通过鸡输卵管特异性表达载体使重组人瘦素蛋白在鸡蛋蛋清中高效表达^[10]。

Bac-to-Bac 昆虫杆状病毒表达系统是一种快速、高效的真核表达系统^[11]。该系统利用细菌 *Tn7* 转座子的位点特异性,大大缩短了构建重组病毒的时间,并且使用杆状病毒中多角体蛋白基因的强启动子,可使目的基因在真核细胞中得到高效表达,该系统还具有对表达产物进行正常的翻译后加工和糖基化修饰等功能,因此被广泛用于外源基因的表达。为了探索利用家蚕生物反应器生产天然人瘦素蛋白的技术体系,本实验利用家蚕核型多角体病毒(Bm-NPV) Bac-to-Bac 表达系统构建含有 *lep* 的重组杆状病毒,并在家蚕细胞及 5 龄幼虫体内表达人瘦素蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

家蚕品种为 P50。人瘦素蛋白基因(*lep*)由扬州大学李碧春教授馈赠。*E. coli* DH10B 菌株由本实验室保存。家蚕杆状病毒(BmNPV) Bac-to-Bac 表达系统由浙江大学缪云根教授馈赠。*E. coli* DH10Bac 菌株由江苏大学生命科学研究院王文兵老师惠赠。家

蚕卵巢细胞 BmN 由本实验室传代培养。

细胞 DNA Polymerase、限制性内切酶、 T_4 DNA 连接酶、DNA marker、胶回收试剂盒等均购自宝生物工程(大连)有限公司。蛋白质标准分子质量 marker 及蛋白预染 marker 购自上海生工生物工程技术服务有限公司。Western blotting 分析所用抗体由上海碧云天生物技术有限公司生产,一抗为 His-tag 抗体,二抗为 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(H + L)。昆虫细胞培养基 TC-100、胎牛血清(FBS)、Cellfectin 转染试剂均购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 人瘦素基因的扩增与回收 将本实验室构建的 T-*lep* 重组质粒转化至 *E. coli* DH10B,提取质粒并进行 *Bam*H I / *Eco*R I 双酶切,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒回收 *lep*。

1.2.2 重组杆状病毒转移载体 pFastBacHTb-*lep* 的构建 Bac-to-Bac 表达系统供体质粒 pFastBacHTb 经 *Bam*H I / *Eco*R I 双酶切,割胶回收,然后与之前回收的 *lep* 用 T_4 DNA 连接酶连接,转化至 *E. coli* DH10B,提取重组质粒,并筛选出阳性重组质粒 pFastBacHTb-*lep*,经双限制性内切酶酶切鉴定后,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。重组质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.3 重组杆粒 Bacmid-*lep* 的筛选及鉴定 将重组质粒 pFastBacHTb-*lep* 转化至 *E. coli* DH10Bac 菌株。该菌株带有一个病毒穿梭质粒(Bacmid),主要包括 1 个 *Tn7* 的转座目标位点和 1 个辅助质粒。转化反应时,pFastBac 进入细菌,其携带的 *Tn7* 转座子通过与 *E. coli* DH10Bac 的靶位点发生转座反应将目标序列插入到病毒基因组中。通过蓝白斑筛选,挑取白色菌落扩大培养以提取 Bacmid-*lep*。提取的质粒经 0.5% 琼脂糖凝胶电泳做初步鉴定。以 M13 引物对(M13-1:5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3', M13-2:5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')和 *lep* (GenBank 登录号:NM_000230)的特异性引物(*lep*-1:5'-AAC-CCTGTGCGGATTCTTGT-3', *lep*-2:5'-AATTCTCAGC-ACCCAGGG-3')分别组合为 3 对引物进行 PCR 鉴定。扩增条件为:93 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 5 min,30 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。用同样的方法将 pFastBacHTb 空质粒转化进 *E. coli* DH10Bac 菌株,获得不含外源基因的空 Bac-

mid,作为后续实验的对照。

1.2.4 重组杆粒 Bacmid-lep 转染家蚕 BmN 细胞及蛋白产物的检测 按照 Invitrogen 公司脂质体转染说明书,采用脂质体 (cellfectin reagent) 包裹含有目的基因重组转移载体的线状病毒 DNA 的方法,将鉴定的重组杆粒 Bacmid-lep 及空 Bacmid 分别转染进家蚕 BmN 细胞。在倒置显微镜下每日观察细胞形态变化,3~4 d 后收集培养液,500 g 离心 5 min 后上清即为第 1 代病毒 (P1) 液。将 P1 继续感染家蚕 BmN 细胞 2~3 d 后收集培养液,离心后的上清即为第 2 代病毒 (P2) 液。用终点稀释法^[12]测定 P2 病毒液滴度,将收集的第 2 代病毒液进行 10 倍系列稀释 ($10^{-1} \sim 10^{-6}$),然后用稀释的病毒液接种家蚕 BmN 细胞,每个稀释度接种 6 孔,每孔 50 μ L,另外设 1 组空白对照。当病毒吸附 1 h 后吸去病毒液,加入 100 μ L TC-100 培养基 27 $^{\circ}$ C 条件下培养 5~7 d。在倒置显微镜下观察细胞的形态以及细胞贴壁状态判断细胞的感染情况,从而计算病毒的 50% 组织培养细胞感染剂量 (TCID₅₀ 值)。收集第 2 代病毒感染后的细胞产物及上清,用 SDS-PAGE 和 Western blotting 方法鉴定目的蛋白。

1.2.5 第 2 代病毒感染家蚕幼虫及目的蛋白表达的检测 将获得的第 2 代病毒液 10 μ L 注射接种家蚕 5 龄起蚕,对照组注射空 Bacmid 转染家蚕 BmN 细胞获得的病毒及 TC-100 培养基,处理组与对照组家蚕同时正常饲养。当家蚕出现病症后收集其血液,提取血液总 RNA 并反转录为 cDNA,用人瘦素蛋白基因特异性引物 (lep-1/lep-2) 进行 RT-PCR 扩增,内参对照基因 (*BmActin3* 基因) 引物为 act-1 (5'-AACACCCCGTCCTGCTCACTG-3') 和 act-2 (5'-GGG-CGAGACGTGTGA-TTTCCT-3')。将家蚕血液与 PBS 混匀,加入 2 $\times$ 蛋白上样缓冲液,沸水浴中裂解细胞。裂解后的样品经 12% SDS-PAGE 电泳分离后电转移至硝酸纤维素膜。封闭后,相继与一抗 (1:1 000)、二抗 (1:1 000) 结合进行 Western blotting 分析。

2 结果与分析

2.1 人瘦素基因的扩增与回收

将含有 *lep* 的质粒转化 *E. coli* DH10B 过夜培养,提取其质粒经 *Bam*H I/*Eco*R I 双酶切,得到一条大小 500 bp 左右的条带 (图 1-A),与人瘦素蛋白

基因的大小一致,并回收该片段 (图 1-B)。

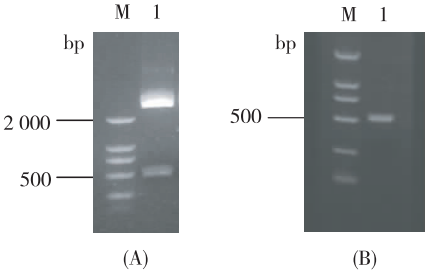


图 1 质粒 T-lep *Bam*H I/*Eco*R I 酶切 (A) 与回收产物 (B) 的电泳检测结果

Fig. 1 Electrophorogram of plasmid T-lep digested by *Bam*H I/*Eco*R I (A) and the recovered product (B)

2.2 重组杆状病毒转移载体 pFastBacHTb-lep 的构建与鉴定

供体质粒 pFastBacHTb 的大小为 4.86 kb,经连接转化至 *E. coli* DH10B,提取的重组质粒电泳条带大小与理论值 (5.3 kb) 相符。重组质粒经 *Bam*H I/*Eco*R I 双酶切的产物电泳图谱分别显示出大于 4.5 kb 和约 500 bp 的 2 条带,与预期结果相符 (图 2),证明重组转移载体 pFastBacHTb-lep 构建成功。

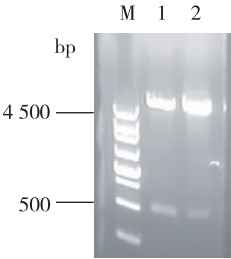


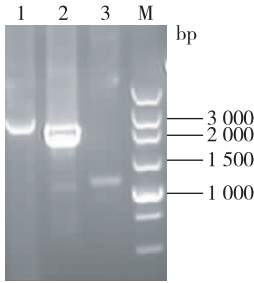
图 2 重组转移载体 pFastBacHTb-lep 的 *Bam*H I/*Eco*R I 酶切鉴定

Fig. 2 Verification of recombinant transfer vector pFastBacHTb-lep digested by *Bam*H I/*Eco*R I

2.3 重组杆粒 Bacmid-lep 的鉴定

将重组转移载体 pFastBacHTb-lep 转化进 *E. coli* DH10Bac 菌株后,提取重组杆粒 Bacmid-lep 在 23 V 电压下经 0.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。以重组杆粒 Bacmid-lep 为模板,用 3 对引物 (M13-1/M13-2, M13-1/lep-2, lep-1/M13-2) 进行 PCR 扩增。结果扩增产物的电泳图谱中出现大小为 2.9、2.0、1.1 kb

的 3 条带,与理论值相吻合(图 3),表明重组杆粒 Bacmid-lep 构建成功。



1. M13-1/M13-2 2. M13-1/lep-2 3. lep-1/M13-2

图 3 3 对引物对重组杆粒 Bacmid-lep 的 PCR 扩增鉴定

Fig. 3 Verification of recombinant Bacmid-lep by PCR amplification with 3 primer pairs

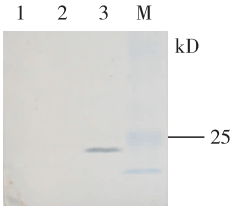
2.4 重组杆粒 Bacmid-lep 转染家蚕 BmN 细胞

将鉴定的重组杆粒 Bacmid-lep 与空 Bacmid 分别转染家蚕 BmN 细胞,在 72 h 后观察到细胞发生病变,与正常细胞明显不同:细胞外表出现小泡,并逐渐从培养皿上脱离,最后有的细胞甚至溶解。收集上清(P1)继续感染 BmN 细胞,当细胞出现感染症状后,再次收集上清(P2),作为接种 BmN 细胞及家蚕的病毒液,于 4 ℃ 保存。

根据终点稀释法观察每个孔的感染情况,计算病毒液的 TCID₅₀。以 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-6}$ 共 6 个梯度病毒稀释液分别感染家蚕 BmN 细胞,细胞感染率分别为 100%、83%、16%、0、0、0。可见,能使 50% 细胞孔出现病变的病毒稀释度在 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-3}$ 之间,按 Reed&Muerch 公式计算得出使 50% 细胞孔发生病变的病毒稀释度为 $10^{-2.49}$,即 TCID₅₀ 为 $10^{-2.49}$ 。

2.5 人瘦素蛋白在家蚕 Bm 细胞中的表达及检测

将重组与空重组第 2 代病毒分别感染 BmN 细胞 72 h 后,细胞基本上都发生病变,细胞核变大,细胞周围出现小泡,并从培养皿上脱离。收集细胞及上清,进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析。结果在感染重组杆状病毒的细胞检测到大小约 22 kD 的清晰蛋白条带,分子质量与预期的大小相符;而在正常细胞与空重组病毒感染的细胞未能检测到这样的条带,在细胞上清中也没有检测到目的条带。由此可以判定人瘦素蛋白在家蚕 BmN 细胞内获得表达(图 4)。



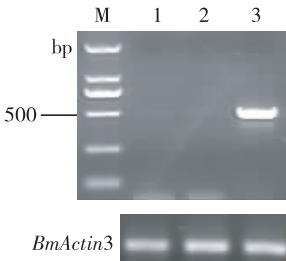
1. 正常 Bm 细胞 2. 感染空重组病毒的 BmN 细胞
3. 感染重组病毒的 BmN 细胞
1. Normal Bm cells 2. BmN cells infected by non-recombinant virus
3. BmN cells infected by recombinant virus

图 4 重组杆状病毒感染 BmN 细胞中目的蛋白表达的 Western blotting 分析

Fig. 4 Western blotting analysis of target protein expressed in BmN cells infected by recombinant baculovirus

2.6 人瘦素蛋白在家蚕体内的表达与检测

将重组杆状病毒接种家蚕 5 龄起蚕,4 ~ 5 d 后可观察到家蚕明显的发病症状,注射空重组病毒的对照组家蚕也有发病症状,注射培养基的家蚕无发病症状。分别取 3 组家蚕的血液提取 RNA,反转录为 cDNA 后用 lep 的特异性引物(lep-1/lep-2)进行 PCR 扩增,结果显示:经重组杆状病毒感染的家蚕血液中有 lep 的转录,而另外 2 个对照组没有该基因的转录(图 5)。3 组家蚕血液同时用 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测,结果在重组病毒感染的家蚕

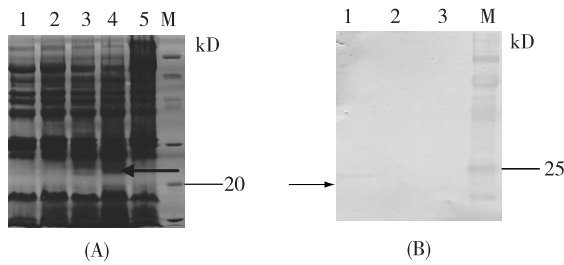


1. 注射 TC-100 培养基的家蚕 2. 注射空重组病毒的家蚕
3. 注射重组病毒的家蚕
1. Bombyx mori larvae injected with TC-100 culture medium
2. Bombyx mori larvae injected with non-recombinant virus
3. Bombyx mori larvae injected with recombinant virus

图 5 重组杆状病毒感染家蚕 5 龄幼虫血液中目的基因转录的 RT-PCR 检测

Fig. 5 RT-PCR detection of target gene transcription in hemolymph of Bombyx mori 5th instar larvae infected by recombinant baculovirus

血液中检测到目的蛋白(大小为 22 kD)的表达,与预期的蛋白分子质量一致;另外 2 个对照组未能检测到目的蛋白的表达(图 6)。



A. 1—注射 TC-100 培养基的家蚕,2,5—感染空重组病毒的家蚕,
3,4—感染重组病毒的家蚕
B. 1—感染重组病毒的家蚕,2—感染空重组病毒的家蚕,
3—注射 TC-100 培养基的家蚕
A. 1—*Bombyx mori* larvae injected with TC-100 culture medium,
2,5—*Bombyx mori* larvae injected with non-recombinant virus,
3,4—*Bombyx mori* larvae injected with recombinant virus
B. 1—*Bombyx mori* larvae injected with recombinant virus,
2—*Bombyx mori* larvae injected with non-recombinant virus,
3—*Bombyx mori* larvae injected with TC-100 culture medium

图 6 感染重组杆状病毒家蚕 5 龄幼虫血液中
目的蛋白表达的 SDS-PAGE(A) 和
Western blotting(B) 分析
Fig. 6 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analyses
of target protein expressed in hemolymph
of *Bombyx mori* 5th instar larvae infected
by recombinant baculovirus

3 讨论

家蚕杆状病毒表达系统作为外源蛋白的低成本高效生产体系日益受到国内外学者的关注。本项研究利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统,构建了含有人瘦素蛋白基因的重组杆状病毒,将该重组杆状病毒注射到家蚕 5 龄幼虫体内,实现了人瘦素蛋白在家蚕体内的表达。表达的人瘦素蛋白分泌到胞外,进入家蚕血液,易于被收集与分离。利用 pFast-BacHTb 供体质粒表达的人瘦素蛋白在 N 端带有 His 标签和蛋白酶 rTEV 剪切位点,因此目的蛋白可经 Ni²⁺ 纯化并可用蛋白酶 rTEV 剪去 His 部分,不影响人瘦素蛋白的空间结构和生物活性。

本项实验所检测到的目的蛋白表达较微弱(图 6)。研究表明家蚕品种、接种量、接种时间与重组

病毒液的存放时间都会影响外源基因的表达效率,尤其是不同家蚕品种间外源蛋白表达效率的差异较大^[13]。因此初步认为,本项实验所使用的家蚕品种 P50 可能不是最适宜人瘦素蛋白表达的品种。此外,本实验的重组病毒液一直存放于 4 ℃ 冰箱,未经家蚕细胞复苏就直接接种家蚕,这可能也是大大降低人瘦素蛋白在家蚕体内的表达效率的原因之一。

在未来的实验工作中需要进一步优化表达技术体系中的各个环节,提高人瘦素蛋白的表达效率。例如进一步研究 Bacmid 质粒的浓度和质量、病毒液的效价、家蚕注射病毒液后的生长环境、向蚕体注射病毒液的剂量及样品收集后的处理方法等。只有大幅提高人瘦素蛋白在蚕体中的表达量,才能为利用家蚕生物反应器生产天然人瘦素蛋白奠定良好的基础。

参考文献 (References)

[1] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue[J]. *Nature*, 1994, 372 (6505): 425 - 432
[2] 李宏睿, 孙文夏, 潘杰. 瘦素功能研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12(1): 108 - 112
[3] Considine R V, Caro J F. Leptin and the regulation of body weight[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(11): 1255 - 1272
[4] Schubring C, Blum W F, Kratzsch J, et al. Leptin, the *ob* gene product, in female health and disease[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2000, 88(2): 121 - 127
[5] Holness M J, Munns M J, Sugden M C, et al. Current concepts concerning the role of leptin in reproductive function[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, 157(1/2): 11 - 20
[6] 廖洪军, 邓义斌. 中国人肥胖基因克隆及其原核表达载体的构建[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1997, 13(3): 249 - 253
[7] 双宝, 李明, 李成, 等. 人瘦素基因的克隆及原核表达[J]. *东北农业大学学报*, 2010, 21(4): 67 - 69
[8] 曾沃坦, 单永强, 王晓霞, 等. 重组人瘦素融合蛋白在大肠杆菌中的低温自诱导表达、纯化和活性鉴定[J]. *军事医学科学院院刊*, 2008, 32(5): 443 - 451
[9] 韩国胜, 唐天骊, 顾勇, 等. 人 Leptin 基因融合蛋白表达载体构建及对成人成骨细胞的作用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(7): 1232 - 1236
[10] 陈强. 转基因鸡生物反应器生产人瘦素蛋白的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2009
[11] 吴小锋, 岳万福, 刘剑梅, 等. Bac-to-Bac 系统的研究进展及在家蚕中的应用[J]. *蚕业科学*, 2007, 33(1): 146 - 150
[12] 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
[13] 刘金明, 傅志强, 林矫矫, 等. 影响家蚕表达外源基因效率的几个重要因子的比较研究[J]. *中国兽医寄生虫病*, 2005, 13(1): 5 - 7