

2011, 37(2): 0320–0324
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生长素

付 凡¹ 陈 蔚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,农业部桑蚕遗传改良重点开放实验室,江苏镇江 212018)

摘 要 人生长素是由腺垂体分泌的一种在人体生长、发育及代谢中发挥重要作用的激素,具有广泛的生理作用。利用家蚕核型多角体病毒(BmNPV) Bac-to-Bac 表达系统,将人生长素基因(*hgh*)克隆到杆状病毒转移载体 pFastBacHTb,通过细菌转座子原理,转化 BmDH10Bac 细胞,获得重组穿梭载体质粒 Bacmid-*hgh*,并将其转染家蚕 BmN 细胞,获得含有 *hgh* 的重组杆状病毒。将此重组病毒感染家蚕 BmN 细胞,收集重组病毒液并穿刺接种家蚕 5 龄起蚕,3 d 后观察到家蚕感染了杆状病毒的症状,并通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 方法在家蚕血液中检测到分子量约 20 kD 的目的蛋白,表明人生长素通过 Bac-to-Bac 系统在家蚕体内获得了表达。

关键词 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统; 家蚕核型多角体病毒; 家蚕; 人生长素基因

中图分类号 S881.2; Q78 文献标识码 A 文章编号 0257–4799(2011)02–0320–05

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

FU Fan¹ CHEN Wei¹ 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}

(¹ Jiangsu University of Science and technology, Zhenjiang Jiangsu 212003, China; ² The Key Laboratory of Genetic Improvement of Silkworm and Mulberry, Ministry of Agriculture, The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang Jiangsu 212018, China)

Abstract Human growth hormone (hGH) secreted by adenohypophysis plays an important role in human growth, development and metabolism, showing extensive physiological functions. Using Bac-to-Bac expression system of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV), a *hgh* gene was cloned into a baculovirus transfer vector pFastBacHTb which was used to transform BmDH10Bac to prepare recombinant shuttle vector Bacmid-*hgh* through bacterial transposition. The recombinant plasmid Bacmid-*hgh* was used to transfect BmN cells to obtain the recombinant baculovirus containing human growth gene *hgh*. The recombinant baculovirus was used to infect BmN cells and the recombinant virus was collected and used to inoculate newly exuviated *Bombyx mori* larvae of the 5th instar. After 3 d, the larvae showed symptom of infection by baculovirus. SDS-PAGE and Western blotting detected target protein with molecular weight of approximately 20 kD in hemolymph of the larvae, indicating that human growth hormone had been successfully expressed in *Bombyx mori* larvae through Bac-to-Bac system.

Key words Bac-to-Bac baculovirus expression system; *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus; *Bombyx mori*; Human growth hormone gene

收稿日期:2010–12–08 接受日期:2011–01–04

资助项目:国家自然科学基金项目(No. 31072083),国家高技术研究
发展计划“863”项目(No. 2007AA100504)。

作者简介:付凡(1986–),男,湖北,硕士研究生。

E-mail: ffuanff@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

人生长素(human growth hormone, hGH)是由腺垂体分泌的一种在人体生长、发育及代谢中发挥重要作用的激素。hGH 具有广泛的生理功能,其作用

靶组织包括骨、软骨、脂肪组织、免疫系统和生殖系统,甚至脑组织和造血系统^[1-2],特别是在促进人体生长发育和维持组织器官正常功能方面发挥重要作用,如果人体缺乏 hGH 就会产生侏儒症及造成组织器官萎缩和功能衰竭。在促进人体生长发育的过程中,人生长素通过促生长素介质(又称胰岛素样生长因子)的合成而促进骨骼、内脏和全身生长,促进蛋白质合成,加快脂肪和矿物质代谢等^[3-4]。此外,人生长素还可促进关节软骨缺损修复^[5]、血管再生,以及用于大面积烧伤伴随重度吸入性损伤、组织坏死、肌肉萎缩等疾病的辅助治疗。人生长素在机体免疫系统中发挥的重要作用是在分子及细胞水平上促进胸腺和淋巴细胞的增殖^[6]。过去应用于临床的 hGH 只能从人脑垂体中提取,其来源十分有限且价格昂贵,因而采用基因工程的方法表达生产重组人生长素有很好的发展前景。

目前利用基因工程领域 4 大表达系统之一——大肠杆菌表达系统生产的重组人生长素(rhGH)已经用于临床,但使用该表达系统生产的重组人生长素在临床应用中容易诱导产生极大的免疫反应^[7]。之后,卢希彬^[8]用大肠杆菌和毕赤酵母成功表达了密码子优化了的人生长素。也有用哺乳动物细胞表达系统表达人生长素的报道^[9],但表达量通常较低,生产成本高^[10]。而与原核、酵母表达系统相比,杆状病毒表达载体系统(baculovirus expression vector system, BEVS)的表达产物具有更好的天然生物活性。1993 年 Luckow 等^[11]构建了一种高效、快速的昆虫杆状病毒表达系统(Bac-to-Bac 系统),使重组率达到 100%,且操作简单同时不需进行空斑纯化,只需 7~10 d 即可构建重组病毒。本研究利用近年来开发的家蚕核型多角体病毒(BmNPV) Bac-to-Bac 表达系统^[12],以家蚕为宿主表达人生长素,为利用该表达系统高效表达生产人生长素奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

人生长素基因(*hgh*)由江苏大学王文兵老师惠赠。BmNPV Bac-to-Bac 表达系统由浙江大学缪云根教授惠赠。pUC-*hgh* 质粒由本实验室构建,含 BmNPV Bacmid 的大肠杆菌 BmDH10Bac、pFast-BacHTb 质粒以及家蚕 BmN 细胞由本实验室保存。表达宿主家蚕的品种为 P50,由本实验室保存。

限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I、DNA Polymerase、T₄ DNA 连接酶、DNA marker、胶回收试剂盒、Trizol、M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 等均购自宝生物工程(大连)有限公司;蛋白质标准分子量 marker 及预染蛋白 marker 购自上海生工生物工程技术服务有限公司;Western blotting 所用抗体,购自碧云天生物技术研究,其中一抗为 His-tag 抗体、二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L);昆虫细胞培养基 TC-100、胎牛血清(FBS)、Cellfectin 转染试剂盒均购自 Invitrogen 公司;PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组转移载体 pFastBacHTb-*hgh* 的构建和鉴定 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 pUC-*hgh* 质粒,凝胶电泳回收目的片段,将其与经过相同酶切的供体质粒 pFastBacHTb 连接,然后转化 *E. coli* DH10B 感受态细胞,筛选阳性重组质粒 pFastBacHTb-*hgh*,用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 对重组转移载体双酶切,验证 *hgh* 基因插入 pFastBacHTb 质粒的正确性,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 重组家蚕杆状病毒质粒 Bacmid-*hgh* 的构建和鉴定 提取重组质粒 pFastBacHTb-*hgh* 后转化大肠杆菌 BmDH10Bac(含 BmNPV 的 Bacmid 和辅助质粒)感受态细胞,涂布于含卡那霉素(50 μg/mL)、四环素(10 μg/mL)、庆大霉素(7 μg/mL)、IPTG(40 μg/mL)、X-gal(100 μg/mL)的 LB 琼脂平板上。挑取白色菌落,用碱裂解法提取重组杆状病毒质粒 Bacmid-*hgh*,取蓝色菌落作为阴性对照,提取的质粒用 0.5% 琼脂糖凝胶在 25 V 电压下电泳 12 h 检测。用 M13 上、下游引物(上游引物 M13 forward:5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3';下游引物 M13 reverse:5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')、M13 上游引物和 *hgh* 基因特异性下游引物(*hgh* reverse:5'-GCCA-CAGCTGCCCTCCAC-3')、*hgh* 基因(GenBank 登录号:NM_000515.3)特异性上游引物(*hgh* forward:5'-TCTATTCCGACACCCTCCAACA-3')和 M13 下游引物分别进行 PCR 扩增,鉴定插入序列的大小以筛选目的重组杆粒 Bacmid。PCR 扩增条件为:93 ℃ 起始变性 3 min;94 ℃ 变性 45 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 4 min,25 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

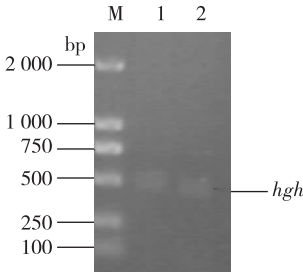
1.2.3 重组家蚕杆状病毒质粒 Bacmid-hgh 转染家蚕 BmN 细胞 提取重组家蚕杆状病毒质粒 Bacmid-hgh DNA,按照 Invitrogen 公司脂质体转染说明书将鉴定正确的重组家蚕杆状病毒质粒 Bacmid-hgh 转染 BmN 细胞,27 ℃ 培养 3~4 d,在荧光倒置显微镜下观察细胞生长状态。同时以野生型 Bacmid 转染的 BmN 细胞以及无病毒感染的 BmN 细胞作对照。收集病毒感染的细胞上清于 4 ℃ 保存。沉淀经 500 g 离心 5 min,移去细胞和大的碎片,获得第 1 代病毒 P1。将 P1 病毒再次感染细胞获得高滴度的重组病毒液。采用终点稀释法^[13]测定病毒液滴度,将收集的病毒液进行 10 倍系列的稀释($1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-6}$),然后用稀释的病毒液接种细胞,每个稀释度接种 6 孔,每孔 50 μ L,另外设一组空白对照。当病毒吸附 1 h 后倒掉病毒液,加入 100 μ L TC-100 培养基置于 27 ℃ 培养 5~7 d。根据细胞的感染情况计算该病毒的 50% 组织培养细胞感染剂量(TCID₅₀值)。

1.2.4 重组病毒接种家蚕表达目的产物及目的产物的检测 将重组杆状病毒上清 10 μ L 注射接种 5 龄起蚕,2 个对照组分别注射非重组病毒和 TC-100 培养基,25 ℃ 正常饲养家蚕。从蚕发病的第 3 天开始收集血液,-70 ℃ 保存。用 Trizol 试剂提取血液的 RNA,反转录为 cDNA,用目的基因特异性引物进行 PCR 扩增检测,并以 *BmActin3* 基因(扩增引物序列:上游引物 5'-CCCCATCGAACACG-3';下游引物 5'-CGCTCGGCAGTGGTAGTGAA-3')作为内参照。50 μ L 血液样品取加入 200 μ L 1 $\times$ PBS,再加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液 62.5 μ L,充分混匀;沸水浴 5 min,12 000 r/min 室温离心 5 min 后取 20 μ L 上清液进行 10% SDS-PAGE 以及 Western blotting 分析检测目的蛋白的表达。

2 结果与分析

2.1 重组转移载体 pFastBacHTb-hgh 的构建和鉴定

hgh 基因的大小为 456 bp,pUC-hgh 经 *Bam*H I/*Eco*R I 双酶切处理后,电泳显示目的条带约为 460 bp,与 *hgh* 基因的大小相符。供体质粒 pFast-BacHTb 的大小为 4.8 kb,构建的重组质粒 pFast-BacHTb-hgh 经 *Bam*H I/*Eco*R I 双酶切后,电泳显示出大小约 460 bp 的条带,与预期的结果相符(图 1),证明重组转移载体 pFastBacHTb-hgh 构建成功。



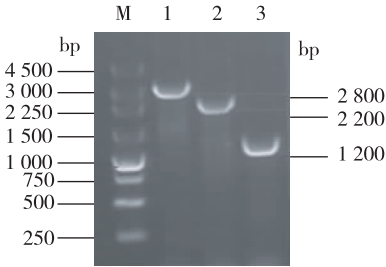
M. DL2000 DNA 分子标记
1,2. 重组质粒 pFastBacHTb-hgh 双酶切(*Bam*H I/*Eco*R I)
M. DL2000 DNA molecular marker
1,2. Recombinant plasmid pFastBacHTb-hgh digested with *Bam*H I and *Eco*R I

图 1 重组质粒 pFastBacHTb-hgh 的双酶切鉴定

Fig. 1 Verification of recombinant plasmid pFastBacHTb-hgh by dual enzymatic digestion

2.2 重组家蚕杆状病毒质粒 Bacmid-hgh 的 PCR 鉴定

用碱裂解法提取重组杆状病毒质粒 Bacmid-hgh,用 0.5% 琼脂糖凝胶在 25 V 电压下电泳,出现大小约 130 kb 的条带,结果显示已成功提取到含目的基因的重组杆状病毒质粒。以重组杆状病毒质粒 Bacmid-hgh 为模板,用引物对 M13 forward/M13 reverse、M13 forward/*hgh* reverse、*hgh* forward/M13 reverse 分别进行 PCR 扩增,目的基因 *hgh* 的大小为 456 bp,根据计算以引物 M13 forward/M13 reverse 扩增获得的条带大小为 2 886 bp、以引物 M13 forward/*hgh* reverse 扩增获得的条带的大小为 2 198 bp、以引物 *hgh* forward/M13 reverse 获得的条带的大小为 1 250 bp,PCR 扩增条带的大小与预期基本相符,结果表明 *hgh* 基因已经转座成功(图 2)。



M. 250 bp DNA molecular marker 1. M13 forward/M13 reverse
2. M13 forward/*hgh* reverse 3. *hgh* forward/M13 reverse

图 2 重组杆状病毒质粒 Bacmid-hgh 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR product of recombinant baculovirus plasmid Bacmid-hgh

2.3 人生长素在 BmN 细胞中的表达及重组病毒的感染性滴度

将鉴定的重组杆状病毒质粒 Bacmid-hgh DNA 转染对数生长的 BmN 细胞,在荧光倒置显微镜下观察到 72 h 后细胞发生病变,与正常细胞有明显的不同,感染细胞形状首先变圆,核仁增大,然后细胞内有小泡生成,细胞离壁悬浮。收集上清作为再次接种细胞或家蚕的病毒液进行保存。

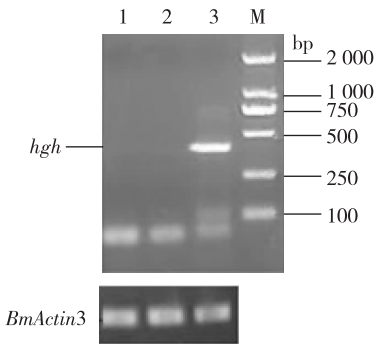
重组病毒液感染 BmN 细胞 72 h 后,细胞全部病变。根据终点稀释法观察每个孔的感染情况,计算病毒 TCID₅₀,能使 50% 细胞孔出现病变的病毒稀释度在 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-3}$ 之间,按 Reed-Muerch 公式计算,能使 50% 细胞孔发生病变的病毒稀释度为 $10^{-2.5}$,即 TCID₅₀ 为 $10^{-2.5}$ 。

2.4 人生长素在家蚕 5 龄幼虫的表达及检测

将重组病毒接种家蚕 5 龄起蚕,3 d 后可以明显观察到家蚕发病症状,非重组病毒接种的对照组家蚕也观察到发病症状,注射培养基的对照组正常家蚕无发病症状。

取家蚕的血液提取 RNA,通过 Reverse Transcriptase M-MLV 反转录获得 cDNA,再以该 cDNA 为模板,用 hgh 基因特异引物进行扩增检测。结果显示,在重组病毒感染的家蚕血液中,目的基因 hgh 有明

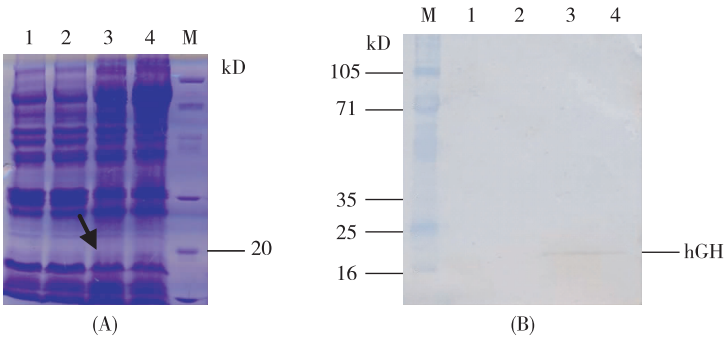
显转录,而 2 个对照组都无转录情况发生(图 3)。同时用家蚕血液进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析,结果在重组病毒感染的家蚕血液中,明显可见目的蛋白表达,特异性条带大小约为 20 kD,与预计结果一致,表明人生长素在家蚕体内得到了表达(图 4)。



M. DL2000 分子标记 1. 正常家蚕
2. 非重组病毒感染的家蚕 3. 重组病毒感染的家蚕
M. DL2000 DNA molecular marker 1. Normal *Bombyx mori* larvae
2. *Bombyx mori* larvae infected by non-recombinant virus
3. *Bombyx mori* larvae infected by recombinant virus

图 3 重组病毒感染家蚕 5 龄幼虫血液中目的基因的 RT-PCR 检测

Fig. 3 RT-PCR product of target gene in hemolymph of the 5th instar *Bombyx mori* larvae infected by recombinant virus



M. 蛋白质分子质量标准/预染蛋白 marker 1,2. 非重组病毒感染家蚕血液 3,4. 重组病毒感染家蚕血液

M. Protein molecular mass standard/pre-stained protein marker 1,2. Hemolymph of *Bombyx mori* larvae infected by non-recombinant virus
3,4. Hemolymph of *Bombyx mori* larvae infected by recombinant virus

图 4 重组病毒感染家蚕 5 龄幼虫血液中目的蛋白的 SDS-PAGE(A) 和 Western blotting(B) 分析

Fig. 1 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analyses of target protein in hemolymph of the 5th instar *Bombyx mori* larvae infected by recombinant virus

3 讨论

人生长素因其在机体生长发育中的重要作用在

临床上应用广泛,用基因工程技术表达生产天然人生长素有着很好的发展前景。家蚕杆状病毒表达系统由于生产成本低,蛋白质合成能力强,质量高及安

全性好等优点而备受欢迎。Bac-to-Bac 杆状病毒快速表达系统大大缩短了重组病毒构建所需的时间,并且转化率高。本实验采用 BmNPV Bac-to-Bac 杆状病毒表达体系,以家蚕 BmN 细胞和 5 龄幼虫为材料,成功表达了人生长素,表达的目的蛋白大小为 20 kD。因目的蛋白末端带有 6 个 His 短肽作为标签,并有蛋白酶 rTEV 剪切位点,这为后续的蛋白纯化和功能研究提供了方便。

今后将进一步优化表达体系中的病毒液的效价、供试家蚕的生长环境、蚕体注射病毒液的剂量及样品收集处理等因素,提高人生长素在家蚕杆状病毒表达系统的表达效率,为制取能用于临床治疗的人生长素提供技术支撑。

参考文献 (References)

[1] Strobl J S, Thomas M J. Human growth hormone [J]. Pharmacol Rev, 1994, 46 (1) : 1 - 34

[2] Nyberg F, Burman P. Growth hormone and its receptors in the central nervous system-location and functional significance [J]. Horm Res, 1996, 45 (1/2) : 18 - 22

[3] Wabitsch M, Hauner H, Heinze E, et al. The role of growth hormone/insulin-like growth factors in adipocyte differentiation [J]. Metabolism, 1995, 44 (10 Suppl 4) : 45 - 49

[4] Andreassen T T, Jorgensen P H, Flyvbjerg A, et al. Growth hormone

stimulates bone formation and strength of cortical bone in aged rats [J]. J Bone Miner Res, 1995, 10 (7) : 1057 - 1067

[5] 董伟强, 白波, 陈艺, 等. 基因重组人生长素对关节软骨缺损修复作用的实验研究 [J]. 第三军医大学学报, 2006, 28 (13) : 1417 - 1419

[6] Geffner M. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1 on T- and B-lymphocytes and immunefunction [J]. Acta Paediatr, 1997, 423 : 76 - 79

[7] 陈蓓, 朱威. 人生长激素研究进展 [J]. 生物学杂志, 2004, 21 (1) : 9 - 11

[8] 卢希彬. 密码子优化的人生长素基因在大肠杆菌及人生长素基因在毕赤酵母中表达的研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2006

[9] Lipinski D, Jura J, Kalak R, et al. Transgenic rabbit producing human growth hormone in milk [J]. J Appl Genet, 2003, 44 (2) : 165 - 174

[10] 蓝航莲. 家蚕蛹表达人生长激素蛋白及其生物活性的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2009

[11] Luckow V A, Lee S C, Barry G F, et al. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli* [J]. J Virol, 1993, 67 (8) : 4566 - 4579

[12] 吴小锋, 曹翠平, 许雅香, 等. BmNPV 和 AcNPV 扩大寄主域杂交重组病毒表达载体的构建和改进 [J]. 中国科学 C 辑 生命科学, 2004, 34 (2) : 156 - 164

[13] 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

 中国农业网
www.zgny.com.cn

农业企业的商务信息平台

中国农业网

www.zgny.com.cn

网络实名, 通用网址: 中国农业网

客户服务电话: 010-62110035 62110967

京ICP证030017号

网络文化经营许可证
文网发[2004]0034号