

# 苹果蠹蛾颗粒体病毒 GP37 蛋白 在 Bac-to-Bac 系统中的表达和亚细胞定位

刘向阳<sup>1,2</sup>, 孙修炼<sup>3</sup>, 张忠信<sup>3</sup>, 周琳<sup>1,2\*</sup>

1 河南农业大学植物保护学院, 河南 郑州 450002; 2 河南省新型农药创制与应用重点实验室, 河南 郑州 450002; 3. 中国科学院武汉病毒研究所, 湖北 武汉 430071

\*通讯作者, E-mail: zhoulin@henau.edu.cn

**摘要** 为丰富苹果蠹蛾颗粒体病毒(CpGV) GP37 蛋白的研究内容, 探寻该蛋白的增效机制, 本研究利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统, 将苹果蠹蛾颗粒体病毒 gp37 基因和绿色荧光蛋白基因(egfp)以 N 端或 C 端融合的方式插入苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(AcMNPV)基因组中, 获得重组的杆状病毒质粒(Bacmid), 转染昆虫细胞 Sf9, Western blot 检测到 GP37 和 EGFP 融合(vAc<sup>EGFPGP37</sup>、vAc<sup>GP37EGFP</sup>)和非融合(vAc<sup>GP37</sup>、vAc<sup>EGFP</sup>)蛋白都得到了高效表达; 用激光共聚焦显微镜观察蛋白的亚细胞定位情况, 结果显示, 融合 GP37 的 EGFP 主要聚集在细胞质中, 没有融合 GP37 的 EGFP 遍布整个细胞, 说明 CpGV GP37 蛋白定位于细胞质中。本研究对 CpGV GP37 蛋白的真核表达, 为该蛋白的后续研究提供了条件; 而该蛋白的亚细胞定位研究, 不仅为 CpGV GP37 蛋白增效机制的研究打下了基础, 同时丰富了杆状病毒 GP37 蛋白的相关理论。

**关键词** 苹果蠹蛾颗粒体病毒(CpGV), GP37 蛋白, Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统, 真核表达, 亚细胞定位

## Expression in Bac-to-Bac Baculovirus Expression System and Localization in Infected Cells of *Cydia pomonella granulovirus*

### GP37

LIU Xiang-Yang<sup>1,2</sup>, SUN Xiu-Lian<sup>3</sup>, ZHANG Zhong-Xin<sup>3</sup>, ZHOU Lin<sup>1,2\*</sup>

1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Key Laboratory for Creation and Application of Novel Pesticides of Henan Province, Zhengzhou 450002, China; 3. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China

\* Corresponding author, zhoulin@henau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301713); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A210024)

**批注 [11]:** 用星号标注通讯作者; 并在单位下方提供通信作者联系方式(页脚提供基金项目信息)。

**批注 [12]:** 按“目的, 方法, 结果, 结论”4 方面依次书写, 但文中不出现上述字眼。

**批注 [13]:** 关键词与关键词间用逗号隔开, 且空一格; 一般为 3-8 个实词。

**批注 [14]:** 英文题名单词的首字母大写(介词, 连词等虚词除外)。

**Abstract** To enrich the research contents of *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) GP37 protein and explore mechanism of synergism of nucleopolyheroviruses (NPVs) and *Bacillus thuringiensis* (Bt) by the GP37 protein, a series of recombinant *Autographa californica* multiple nucleocapsid NPV (AcMNPV) bacmids containing *egfp* or CpGV *gp37* fused with *egfp* were constructed. The resulting bacmids were named vAc<sup>GP37</sup>, vAc<sup>GP37EGFP</sup>, vAc<sup>EGFPGP37</sup>, and vAc<sup>EGFP</sup>, respectively. In vAc<sup>GP37EGFP</sup> and vAc<sup>EGFPGP37</sup>, EGFP was fused in frame with C terminal and N terminal, respectively. The bacmid vAc<sup>GP37</sup> expressed GP37 protein and vAc<sup>EGFP</sup> expressed EGFP only. All recombinant bacmids were confirmed by PCR. Sf-9 cells were transfected with the recombinant bacmids, and supernatants containing budded virus were collected 96 h post transfection. Examinations were carried out for protein expression by Western blot analysis using anti-GFP and anti-GP37 as primary antibody following SDS-PAGE of the cell lysates. The anti-GFP antibody showed cross-reaction with cells transfected with vAc<sup>GP37EGFP</sup>, vAc<sup>EGFPGP37</sup>, vAc<sup>EGFP</sup> and anti-GP37 antiserum showed cross-reaction with cells transfected with vAc<sup>GP37</sup>, vAc<sup>GP37EGFP</sup>, and vAc<sup>EGFPGP37</sup>. An about 50 kDa fusion protein, which was in consistence with the size of GP37 and EGFP, was detected in the cell lysates transfected with vAc<sup>GP37EGFP</sup> or vAc<sup>EGFPGP37</sup>. By contrast, an approximate 24 kDa protein was detected in those transfected by vAc<sup>GP37</sup> or vAc<sup>EGFP</sup>, where GP37 and EGFP were expressed separately. Sf9 cells ( $1 \times 10^5$ ) in 35-mm glass bottom cell culture dishes were infected with vAc<sup>GP37</sup>, vAc<sup>GP37EGFP</sup>, vAc<sup>EGFPGP37</sup>, and vAc<sup>EGFP</sup>, respectively. At 24 h post transfection, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature. The cells were washed with PBS and then permeabilized with 0.25% Triton X-100 for 3 min at room temperature. Following a wash with PBS, the cells were stained with Hoechst 33258 working reagent for 5 min at room temperature. Cells were washed three times with PBS and visualized with a Leica TCS SP2 confocal laser scanning microscope for fluorescence, respectively. In cells infected with vAc<sup>EGFP</sup>, EGFP was expressed without fusion of GP37 and fluorescence was dispersed uniformly throughout the cytoplasm and nucleus. In contrast, in cells infected with vAc<sup>GP37EGFP</sup> and vAc<sup>EGFPGP37</sup>, EGFP was expressed with fusion of GP37 and fluorescence distributed mainly in the cytoplasm. These results suggested that CpGV GP37 protein

**批注 [15]:** 英文摘要可以提供比中文摘要更详尽的信息。

注意：用过去时态叙述作者的工作，  
用现在时态叙述作者的结论。

localizes mainly in the cytoplasm. The eukaryotic expression of CpGV GP37 protein may provide conditions for further study of this protein. The subcellular localization of CpGV GP37 protein in infected cells would lay a foundation for the study of synergic mechanism of this protein and enrich the theory of baculovirus GP37 protein.

**Keywords** *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV), GP37, Bac-to-Bac baculovirus expression system, Eukaryotic expression, Subcellular localization

苹果蠹蛾颗粒体病毒 (*Cydia pomonella* granulovirus, CpGV) 最初从墨西哥感病的苹果蠹蛾 (*C. pomonella*) 幼虫中分离得到, 后被发展为微生物杀虫剂, 现已成为北美和西欧防治苹果蠹蛾最重要的生物药剂。在中国, 该药剂对苹果蠹蛾田间种群的防效也进入实验阶段 (Liu et al., 2013)。CpGV 基因组全长为 123500 bp, 含 143 个开放阅读框, 其中第 13 个开放阅读框 (*orf13*), 命名为 CpGV *gp37* 基因 (Luque et al., 2001)。CpGV *gp37* 基因与杆状病毒 *gp37* 和昆虫痘病毒 *fusolin* 基因具有较高的氨基酸序列同源性 (Salvador et al., 2012), 昆虫痘病毒 *fusolin* 基因编码的纺锤体蛋白能够明显增强核型多角体病毒 (Nucleopolyhedravirus, NPV)、昆虫痘病毒和素云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 的杀虫活性 (Hukuhara et al., 2001; Mitsuhashi et al., 2000; Mitsuhashi et al., 2014)。Liu 等 (2011) 通过对 CpGV GP37 蛋白的研究发现, 该蛋白不仅能增强甜菜夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera exigua* multiple nucleocapsid NPV, SeMNPV) 和苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* multiple nucleocapsid NPV, AcMNPV) 的活性, 而且能增强 Bt 的杀虫活力。但 CpGV GP37 蛋白的其它一些特性, 如该蛋白在被感染细胞中的定位等, 没有报道。

本研究通过构建真核表达载体, 利用 Bac-to-Bac 系统在昆虫细胞中对 CpGV GP37 蛋白进行表达, 随后利用激光共聚焦技术对该蛋白在细胞中的分布 (亚细胞定位) 进行探索, 旨在丰富 CpGV GP37 蛋白的研究内容, 为其增效机制的研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒和细胞系

苹果蠹蛾颗粒体病毒 (*Cydia pomonella* granulovirus, CpGV) 由德国 D. L. R. Rheinpfalz 研究所提供, 在甘肃省农业科学院张掖试验场完成增殖, 储存于 4 °C 冰箱中备用。

**批注 [16]:** 与中文关键词一一对应, 首字母大写, 且词与词之间用逗号隔开, 并空一格。

**批注 [17]:** 前言部分主要写研究背景, 前人研究进展, 本研究研究切入点, 拟解决的关键问题及研究意义等。

**批注 [18]:** 正文中参考文献用著者-出版年制。

**批注 [19]:** 按照以下结构组织文章

- 1: 材料与方法
- 2: 结果与分析
- 3: 讨论
- 4: 结论

草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞系 Sf9 为中国科学院武汉病毒研究所昆虫病毒基因工程学科组保存, 于 27℃ 培养, 生长培养基为 Grace's 昆虫细胞培养基(Cat. No.11300-043, Invitrogen, 美国)添加 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Cat. No.16000-044, Invitrogen, 美国)。

### 1.2 菌株、载体和试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  (TaKaRa, 中国大连) 和 DH10B (TaKaRa, 中国大连) 菌株均由中国科学院武汉病毒研究所昆虫病毒基因工程学科组保存;

载体 pMD18-T vector (TaKaRa, 中国大连) 购自宝生物工程(大连)有限公司, pFastBac™Dual (Invitrogen, 美国) 和 pEGFP-C1 (Clontech, 美国) 为中国科学院武汉病毒研究所昆虫病毒基因工程学科组保存。

荧光染料 Hoechst 33258 购自 BIOSHARP(美国); 转染试剂 lipofectin 购自 Invitrogen(美国); Nonidet P40 购自 Sigma(美国); PVDF 膜购自 Millipore(美国); PCR 纯化试剂盒购自 OMEGA(美国); 质粒提取试剂盒购自 OMEGA(美国)。

### 1.3 引物合成

利用 primer premier 5.0 软件, 根据 CpGV *gp37* 基因 (GenBank 登录号: NC\_002816) 核苷酸序列, 设计出 1 条正向引物和 2 条反向引物; 根据 pEGFP-C1 (GenBank 登录号: CVU55763) 核苷酸序列, 设计出 2 条正向引物和 2 条反向引物。除 M13-f 和 M13-r 外, 其余引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成 (表 1)。

**表 1 实验所用引物**

**Table 1 Primers used in the study**

引物 Primer	序列 (5'~3') Sequence (5'~3')	酶切位点 Restriction site
Cp-f1	<i>TGC TCTAGA</i> ATGCCGTTGGCGAGACAGCG	<i>Xba</i> I
Cp-r1	AA <i>CTGCAG</i> CTACAAATCACTTTTCGTTTGCTT	<i>Pst</i> I
Cp-r2	AA <i>CTGCAG</i> CAAATCACTTTTCGTTTGCTTGT	<i>Pst</i> I
EGFP-f1	CCG <i>GAATTC</i> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	<i>Eco</i> RI
EGFP-r1	<i>TGC TCTAGA</i> CTTGTACAGCTCGTCCATGC	<i>Xba</i> I
EGFP-f2	AA <i>CTGCAG</i> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	<i>Pst</i> I
EGFP-r2	CCC <i>AAGCTT</i> TTA $\overline{CTTGACAGCTCGTCCATG}$	<i>Hind</i> III
M13-f	GTTTTCCAGTCACGAC	-
M13-r	CAGGAAACAGCTATGAC	-

\*斜体部分为保护碱基, 下划线部分为酶切位点

\*Italics sections are protective bases, and underlined sequences are restriction enzyme sites

批注 [10]: 国内购买的试剂注明公司所在城市, 进口试剂注明国家

批注 [11]: 表的要求:  
1: 所有表格一律为三线表。  
2: 表头, 表注, 及表中的内容均要求汉英对照。

#### 1.4 目的序列的扩增

参照 Smith 和 Crook(1988)所述的方法提取 CpGV 基因组。以 CpGV 基因组为模板, 以 Cp-f1 和 Cp-r1 分别作为正反向引物进行 gp37 序列 PCR 扩增, 扩增长度预计为 663 bp, 不含有 N 端疏水片段(1~93 nt); 以 Cp-f1 和 Cp-r2 分别作为正反向引物扩增进行缺失了 N 端疏水片段(1~93 nt)和终止密码子(TAG)的 gp37 基因(gp37(del TAG)), 预计片段长度为 660 bp。PCR 反应体系均为: 含模板 DNA 20 ng、正反向引物各 0.5 pmol、dNTP 1mmol/L、TaqDNA 聚合酶 2.5 U、10× buffer 1 μ L, 用灭菌双蒸水补足 10 μ L。PCR 反应条件均为: 94℃预变性 5 min; 94℃ 45 s, 59℃ 45 s, 72℃ 60 s 为一个循环, 进行 29 个循环; 72℃延伸 5 min; 最后 4℃保温 10 min。

以 pEGFP-C1 质粒为模板, 以 EGFP-f2 和 EGFP-r2 分别作为正反向引物, 扩增完整的 egfp 基因序列; 以 EGFP-f1 和 EGFP-r1 分别作为正反向引物, 扩增缺失终止密码子的 egfp 基因(egfp(del TAA))序列。PCR 反应体系均为: 含模板 DNA 20 ng、正反向引物各 0.4 pmol、dNTP 1 mmol/L、Taq DNA 聚合酶 2.5 U、10× buffer 1 μ L, 用灭菌双蒸水补足 10 μ L。PCR 反应条件均为: 94℃预变性 5 min; 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 60 s 为一个循环, 进行 29 个循环; 72℃延伸 5 min; 最后 4℃保温 10 min。

PCR 反应产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 用 PCR 纯化试剂盒(OMEGA, 美国)纯化和回收。

#### 1.5 重组表达载体的构建

将上述胶回收的 4 个片段连接到 pMD18-T 载体, 连接产物转化 E. coli DH5α, 挑取白斑接入 5 mL LB 液体培养基(含氨苄青霉素(Amp), 100 μ g/mL)中振荡培养 14 h。用质粒提取试剂盒按照说明书小量提取质粒酶切鉴定阳性克隆子并送到上海英骏生物技术有限公司进行测序, 分别命名为 pT-gp37、pT-gp37(del TAG)、pT-egfp 和 pT-egfp(del TAA)。从 pT-gp37 质粒上用 Xba I 和 Pst I 酶切 gp37 基因片段, 从 pT-gp37(del TAG)质粒上用 Xba I 和 Pst I 酶切 gp37(del TAG)基因片段, 从 pT-egfp 质粒上用 HindIII 和 Pst I 酶切 egfp 基因片段, 从 pT-egfp(del TAA)质粒上用 EcoR I 和 Xba I 酶切 egfp(del TAA)基因片段, 经回收后分别亚克隆到 pFastBacTMDual 载体, 转化 E. coli DH5α, 涂布于含有 50 μ g/mL Amp 和 7 μ g/mL 庆大霉素(Gm)的平板。挑取阳性菌落, 接入 5 mL LB 培养基(100 μ g/mL Amp, 7 μ g/mL Gm)中 37℃振荡培养过夜。依照质粒提取试剂盒说明书中介绍的方法, 分别提取质粒, 酶切鉴定阳性克隆子, 分别命名为 pD-egfp、pD-gp37、pD-egfp(del TAA)gp37 和 pD-gp37(del TAG)egfp。其中 pD-egfp(del TAA)gp37(GP37 蛋白

批注 [112]: PCR 扩增要交代清楚: 扩增引物; 扩增体系(各成分浓度和用量); 扩增条件

位于 C 端)和 pD-gp37(del TAG)egfp(GP37 蛋白位于 N 端)用于表达 GP37 和 EGFP 的融合蛋白(图 1)。

带格式的：两端对齐

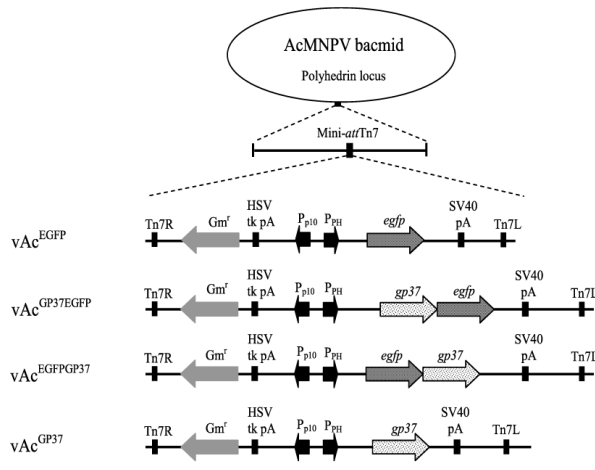


图 1 重组病毒的构建示意图

Figure 1 Construction of the recombinant AcMNPV bacmids

苹果蠹蛾颗粒体病毒 (CpGV) *gp37* 和绿色荧光蛋白 (*egfp*) 基因首先被克隆到 pFastBac™Dual 载体, 然后分别转座含有苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcMNPV) Bacmid (AcBacmid) 和 helper 的 DH10B 感受态细胞, 构建 GP37 和 EGFP 融合 (vAc<sup>EGFPGP37</sup>、vAc<sup>GP37EGFP</sup>) 和非融合 (vAc<sup>GP37</sup>、vAc<sup>EGFP</sup>) 的重组病毒

批注 [113]: 图表要有自明性, 注释中对图的关键信息做简要说明

*Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) *gp37* gene and enhanced green fluorescence protein gene (*egfp*), were cloned into the pFastBac™Dual to generate donor plasmids. The donor plasmids were transformed into *Escherichia coli* strain DH10B cells containing *Autographa californica* multiple nucleocapsid NPV (AcMNPV) bacmid and helper plasmid, and four recombinant AcMNPV bacmids were constructed, including vAc<sup>GP37</sup>, vAc<sup>EGFP</sup>, vAc<sup>EGFPGP37</sup>, and vAc<sup>GP37EGFP</sup>. In vAc<sup>EGFPGP37</sup> and vAc<sup>GP37EGFP</sup>, CpGV *gp37* fused with *egfp* under the control of AcMNPV polyhedrin promoter (P<sub>PH</sub>)

### 1.6 重组病毒的获得及 PCR 检测

将 pD-egfp、pD-gp37、pD-egfp(del TAA)gp37、pD-gp37(del TAG)egfp 和 pFastBac™Dual 空载体(用作对照)分别转座含有苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒 (AcMNPV)Bacmid(AcBacmid)和 helper 的 DH10B 感受态细胞, 之后涂布于 LA 培养基平

板(含 50  $\mu$  g/mL 卡那霉素(kanamycin, Kana), 7  $\mu$  g/mL 庆大霉素(gentamicin, Gm), 10  $\mu$  g/mL 四环素(tetracycline, Tetra), 100  $\mu$  g/mL 5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-乳糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside, X-gal), 40  $\mu$  g/mL 异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(thiogalactopyranoside, IPTG)), 37 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h。检查平板上的蓝白斑, 白斑为重组 Bacmid 的菌落。将白色菌落重新划线在一个新鲜的 LA 培养基平板, 以确定其为白色菌落。

挑取白色单菌落, 接入 5 mL LB 培养基, 37  $^{\circ}$ C 振荡培养 14 h, 取出 1.5 mL 于 10 000  $\times$ g 离心 10 min; 加入 300  $\mu$  L 溶液 I (15 mmol/L Tris/HCl, 10 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), pH 8.0), 然后加入 300  $\mu$  L 溶液 II (0.2 mol/L NaOH, 1% SDS(十二烷基磺酸钠)), 室温静置 10 min, 缓慢加入 300  $\mu$  L 冰冷的溶液 III (3 mol/L 醋酸钾, pH 5.5), 混匀, 冰浴 10 min; 于 4  $^{\circ}$ C 14 000 $\times$ g 离心 10 min, 上清转入预先加入 800  $\mu$  L 异丙醇的离心管内, 混匀, 于 -20  $^{\circ}$ C 置 15~30 min; 14 000 $\times$ g 离心 15 min, 弃上清, 加入 1 mL 70% 的乙醇, 14 000 $\times$ g 离心 5 min, 重复 2 次; 倾去乙醇, 然后 Bacmid 沉淀置于室温自然干燥 10 min, 每管加入 30~50  $\mu$  L 无菌水溶解 30 min, 样品置 4  $^{\circ}$ C 保存。

以上述提取的 Bacmid 为模板, 以通用引物 M13-f 和 M13-r 以及目的片段上两端的引物(表 1)进行 PCR 检测。PCR 反应扩增体系中含 10 $\times$ buffer 10  $\mu$  L、模板 DNA 100 ng、正反引物各 0.4 pmol、dNTP 1 mmol/L、Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 用灭菌双蒸水补足 100  $\mu$  L; 反应条件均为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 1 min, 63~50  $^{\circ}$ C 50 s, 72  $^{\circ}$ C 4 min 为一个循环, 进行 29 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。鉴定正确的重组病毒依次命名为 vAcEGFP、vAcGP37、vAcEGFPGP37、vAcGP37EGFP 和 vAcDual, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

### 1.7 重组病毒转染昆虫细胞 Sf9

在 35 mm 的培养皿中接种 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 的 Sf9 细胞, 27 $^{\circ}$ C 培养过夜。在生物安全柜中弃去上层培养基, 加入 2 mL 无血清的培养基室温放置 1 h。取 5  $\mu$  g 1.5 中重组病毒 DNA 以及 6  $\mu$  L 脂质体(Invitrogen, 美国), 分别用无血清培养基稀释至 100  $\mu$  L, 将两者混合, 静置 15~40 min 后, 往脂质体和 DNA 的混合液中加入 800  $\mu$  L 培养基, 混匀, 移入 35 mm 培养皿中并加入前述脂质体和重组病毒 DNA 的培养基混合物, 培养 6 h 后, 移去转染液, 添加 2 mL 含 10% 血清的培养基, 混匀, 培养 72 h 后倒置荧光显微镜下观察是否有荧光信号, 回收上清, 即为 P1 病毒贮液, 4 $^{\circ}$ C 避光保存。

按照 2 $\times$ 10<sup>6</sup> 个细胞/孔的量将 Sf9 细胞转入六孔板中, 贴壁生长至少 1 h, 每孔加入

适量的上述 P1 病毒贮液，27 °C 湿盒孵育 72 h，收集各孔中的病毒上清液，500×g 离心 5 min 取上清，即为 P2 病毒贮液。制备了高效价的 P2 病毒贮液后，按上述方法扩增 P3 贮液，用于 vAcEGFPGP37、vAcGP37EGFP、vAcGP37 和 vAcEGFP 的高效表达。

### 1.8 Western blot 检测

取 P3 病毒贮液感染 Sf9 细胞，72 h 后将细胞吹起，500×g 离心 5 min，取适量细胞沉淀，加 50 μL 的 SDS-PAGE 上样 buffer，在进行 SDS-PAGE 电泳后转膜，分别以 GP37 蛋白多克隆抗体和 anti-GFP 单克隆抗体为一抗，用 Western blot 法检测 GP37 是否高效表达。

### 1.9 GP37 的亚细胞定位

用 P3 病毒贮液感染贴壁生长 24 h 的 Sf9 细胞(覆盖玻底培养皿 50%)，27 °C 培养 24 h，移除细胞培养基，用 PBS(pH 7.4)将细胞洗 1 遍，加入 4% 多聚甲醛(过滤除菌)室温静置固定 15 min，再用 PBS(pH 7.4)将细胞洗 1 遍；加入透化液(0.25% triton× 100)，室温静置 10 min；用 PBS(pH 7.4)洗细胞，加荧光染料 hoechst 33258 染核 5~10 min，然后用 PBS 洗 3 遍，再加入 1 mL PBS。用激光共聚焦显微镜(TCS SP2, Leica, 德国)观察绿色荧光分布情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组病毒载体构建

用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测表明，以 pEGFP-C1 为模板，以 EGFP-f1 和 EGFP-r1 为正反向引物进行 PCR，扩增出删除了终止密码子 (TAA) 的 *egfp* 基因片段，命名为 *egfp*(del TAA)；以 EGFP-f2 和 EGFP-r2 为正反向引物进行 PCR，扩增出全长 *egfp* 基因，命名为 *egfp* (图 2)。

分别以 Cp-f1 和 Cp-r1、Cp-f1 和 Cp-r2 为正反向引物，以 CpGV 基因组为模板进行 PCR，扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测，扩增片段大小分别为 663 bp 和 660 bp，与预计相符，分别命名为 *gp37* 和 *gp37*(del TAG) (图 2)。



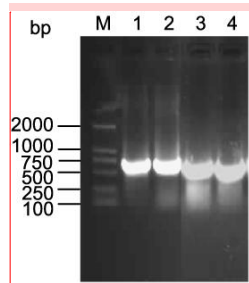


图2 *egfp* 和 *gp37* 基因的 PCR 产物鉴定

Figure 2 PCR results of different fragments of *egfp* and *gp37*

M: DL 2000 DNA 分子标记; 1: *egfp*(del TAA) PCR 产物; 2: *egfp* PCR 产物; 3: *gp37* PCR 产物; 4: *gp37*(del TAG) PCR 产物

M: DL 2000 DNA Marker; 1: PCR result of *egfp*(del TAA); 2: PCR result of *egfp*; 3: PCR result of *gp37*; 4: PCR result of *gp37*(del TAG)

将上述 PCR 产物回收, 分别克隆到 pMD18-T 载体, 经酶切和测序双重验证正确后, 双酶切目的片段并回收, 亚克隆至 pFastBacDual 载体, 构建质粒 pD-*egfp*、pD-*gp37*、pD-*egfp*(del TAA)*gp37* 和 pD-*gp37*(del TAG)*egfp*。分别用 HindIII 和 Pst I、Xba I 和 Pst I、EcoR I 和 Pst I、Xba I 和 HindIII 双酶切 pD-*egfp*、pD-*gp37*、pD-*egfp*(del TAA)*gp37* 和 pD-*gp37*(del TAG)*egfp*, 产生的线性化质粒和目的片段大小与预期相符(图 3)。

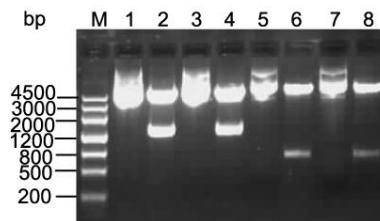


图3 重组表达载体的酶切鉴定

Figure 3 Restriction enzyme digestion of the recombinant expression vector

M: DNA 分子标记; 1: pD-*egfp*(del TAA)*gp37* 质粒; 2: pD-*egfp*(del TAA)*gp37* 双酶切片段; 3: pD-*gp37*(del TAG)*egfp* 质粒; 4: pD-*gp37*(del TAG)*egfp* 双酶切片段; 5: pD-*egfp* 质粒; 6: pD-*egfp* 双酶切片段; 7: pD-*gp37* 质粒; 8: pD-*gp37* 双酶切片段

M: DNA Marker; 1: the plasmid pD-*egfp*(del TAA)*gp37*; 2: restriction enzyme fragments of pD-*egfp*(del TAA)*gp37*; 3: the plasmid pD-*gp37*(del TAG)*egfp*; 4: restriction enzyme fragments of pD-*gp37*(del TAG)*egfp*; 5: the plasmid pD-*egfp*; 6: restriction enzyme fragments of pD-*egfp*; 7: the plasmid pD-*gp37*; 8:

**批注 [14]:**

图的要求:

- 1: 图题、图注、横坐标、纵坐标、图例、等均需英汉对照。
- 2: 图中字号以小五或六号为宜, 不宜太大或太小; 中文用宋体, 数字和英文用 Times New Roman。
- 3: 胶图需注明 marker 各条带大小, 在图注中说明各泳道代表的含义。
- 4: 图表的数据一般要经过统计检验, 并标明在 0.01 或 0.05 水平上的差异显著性。:

restriction enzyme fragments of pD-gp37

分别将 pFastBacTMDual(空载对照)、pD-egfp、pD-gp37、pD-egfp(del TAA)gp37 和 pD-gp37(del TAG)egfp 转座含有 AcBacmid 和 helper 质粒的 DH10B 感受态细胞, 经培养后提取 Bacmid DNA。为了验证目的基因是否整合到 AcBacmid 基因组中, 以病毒 DNA 为模板, 分别以通用引物 M13-f 和目的片段上的反向引物进行 PCR 检测重组病毒, 同时以 M13-f 和 M13-r 为正反向引物检测不含有目的片段的对照重组病毒。反应产物经 0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果表明各个重组病毒均构建正确, 分别命名为 vAcDual、vAcEGFP、vAcGP37、vAcEGFPGP37 和 vAcGP37EGFP(图 4)。

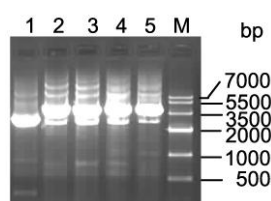


图 4 重组 Bacmid 的 PCR 检测结果

Figure 4 PCR results of recombinant Bacmids

M: DNA 分子标记; 1: vAcDual PCR 验证结果; 2: vAcEGFP PCR 验证结果; 3: vAcGP37 PCR 验证结果; 4: vAcEGFPGP37 PCR 验证结果; 5: vAcGP37EGFP PCR 验证结果

M: DNA Marker; 1: PCR result of vAcDual; 2: PCR result of vAcEGFP; 3: PCR result of vAcGP37; 4: PCR result of vAcEGFPGP37; 5: PCR result of vAcGP37EGFP

## 2.2 GP37 蛋白的 Western blot 检测

用 2.1 中构建的重组病毒分别转染 Sf9 细胞, 然后分别以 anti-GFP 单克隆抗体和 GP37 蛋白多克隆抗体为一抗, 用 Western blot 法检测 GP37 和 EGFP 以及二者的融合蛋白是否高效表达。用 anti-GFP 作为一抗的实验中, 在 vAcEGFP 转染的细胞中检测到大小约为 30 kD 的目的条带, 而在 vAcEGFPGP37 和 vAcGP37EGFP 转染的细胞中检测到大小约为 50 kD 的目的条带(图 5A); 用 GP37 多克隆抗体作为一抗的实验中, 在 vAcGP37 转染的细胞中检测到大小约为 25 kD 的目的条带, 而在 vAcEGFPGP37 和 vAcGP37EGFP 转染的细胞中检测到大小约为 50 kD 的目的条带(图 5B); 作为对照, vAcDual 转染后的细胞样品中没有特异性条带出现(图 5A, B)。这些结果表明, 无论是 EGFP、GP37 还是二者的融合蛋白都得到了高效表达。

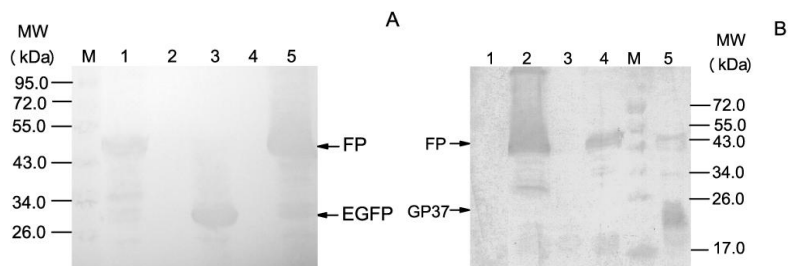


图 5 真核表达蛋白的 Western blot 检测

Figure 5 Western blot analysis of proteins expressed in insect cells

A: 用 anti-GFP 作为抗体的 Western blot 分析结果. M: 蛋白分子量标记; 1: vAcEGFPGP37 表达产物; 2: vAcDual 对照; 3: vAcEGFP 表达产物; 4: vAcGP37 对照; 5: vAcGP37EGFP 表达产物. B: 用 GP37 抗血清作为抗体的 Western blot 分析结果. M: 蛋白分子量标记; 1: vAcDual 对照; 2: vAcGP37EGFP 表达产物; 3: vAcEGFP 对照; 4: vAcEGFPGP37 表达产物; 5: vAcGP37 表达产物. FP: 融合蛋白

A: Detected the existence of proteins by Western blot using anti-GFP antibody. M: Protein marker; 1: Protein expressed by vAcEGFPGP37; 2: vAcDual control; 3, Protein expressed by vAcEGFP; 4: vAcGP37 control; 5: Protein expressed by vAcGP37EGFP. B: Detected the existence of proteins by Western blot using anti-GP37 antiserum. M: Protein marker; 1: vAcDual control; 2: Protein expressed by vAcGP37EGFP; 3: vAcEGFP control; 4: Protein expressed by vAcEGFPGP37; 5: Protein expressed by vAcGP37. FP: Fusion protein.

### 2.3 GP37 蛋白的亚细胞定位

分别用 vAc<sup>EGFPGP37</sup>、vAc<sup>GP37EGFP</sup> 和 vAc<sup>EGFP</sup> 的 P3 病毒贮液感染贴壁生长 24 h 的 Sf9 细胞, 27 °C 培养 24 h, 用激光共聚焦显微镜观察荧光在细胞中的分部。结果显示, 在表达 EGFP 蛋白的 vAc<sup>EGFP</sup> 感染的细胞中, 绿色荧光均匀地布满了整个细胞; 而无论在表达 GP37 和 EGFP 融合蛋白的 vAc<sup>EGFPGP37</sup> 还是 vAc<sup>GP37EGFP</sup> 感染细胞中, 绿色荧光基本分布在核外的胞质中 (无论 GP37 蛋白位于 N 端还是 C 端) (图 6), 表明 CpGV GP37 蛋白主要定位在细胞质中。

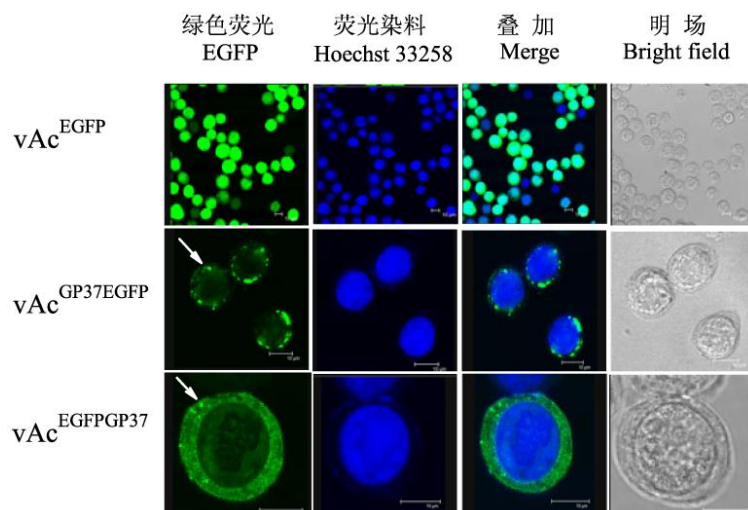


图 6 融合了 EGFP 的 GP37 在昆虫细胞中的定位

Figure 6 Subcellular localization of GP37 fused with EGFP in infected Sf9 cells

分别用重组病毒  $vAc^{EGFP}$ 、 $vAc^{GP37EGFP}$  和  $vAc^{EGFPGP37}$  感染生长在玻底培养皿中的 Sf9 细胞，培养 24 h 后弃去细胞培养基，用核染料 Hoescht 33258 染色，然后在激光共聚焦显微镜下观察、拍照。绿色荧光蛋白在显微镜中呈现绿色(图中 EGFP 部分)，而经染料染色后，细胞核呈现亮蓝色(图中 Hoescht 33258 部分)。如二者叠加，颜色重叠部分则呈青色(图中 Merge- $vAc^{EGFP}$  部分)。图中白色箭头所指为聚集在一起的融合蛋白

Sf9 cells were infected with  $vAc^{EGFP}$ ,  $vAc^{GP37EGFP}$  and  $vAc^{EGFPGP37}$ , respectively. Grace's culture medium was discarded 24 h p.i. and nuclei were stained with Hoescht 33258. The samples were observed under a confocal laser scanning microscope. EGFP emitted green fluorescence by microscope (EGFP parts in figure), and the nucleus emitted bright blue fluorescence by microscope (Hoescht 33258 parts in figure) when it was stained with Hoescht 33258. When two color fluorescence images were merged by the use of the confocal laser scanning microscope, the cyan fluorescence were observed (Merge- $vAc^{EGFP}$  parts in figure). The arrows show the aggregation of fusion proteins

### 3 讨论

Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统因具有对外源基因克隆容量大、重组病毒易于筛选、完备的翻译后加工修饰系统和高效表达外源基因的能力等优点 (Possee, 1997)，现已广泛应用于外源蛋白表达 (Chen et al., 2013) 和基因治疗 (Hitchman et al., 2011; Rivera-Gonzalez et al., 2011) 等多个领域。作为表达载体，AcMNPV 被广泛用来表达各

批注 [115]: 照片图、电镜图等分辨率需设置在 600 dpi 以上，且在图中注明标尺。

批注 [116]: 讨论应该着重写本研究与前人研究相比较有何相同不同之处，突出本研究对前人研究结果有何突破、创新点及研究意义。

种外源蛋白和转运基因 (Airenne et al, 2000; Hu, 2006; Kost et al, 2005; López-Vidal et al., 2013; Summers, 2006)。本研究将 CpGV *gp37* 基因和 *egfp* 基因分别以融合、非融合的方式克隆到 pFastBac™Dual 载体上后转座含有 AcBacmid 和 Helper 质粒的 DH10B 感受态细胞, 经 PCR 验证转座成功后, 用重组的 Bacmid 转染昆虫细胞 Sf9, 以 Western blot 分析蛋白的表达情况, 确定了 GP37 蛋白可以在 Bac-to-Bac 系统中高效表达。

GP37 是一类糖蛋白, 具有几丁质结合域, 该类蛋白在很多杆状病毒中都存在。不同病毒所编码的 GP37 蛋白, 在氨基酸序列上具有 30%~40% 的同源性 (Cheng et al., 2001)。几种病毒所编码的 GP37 蛋白的亚细胞定位已经被研究, 如黄杉毒蛾核型多角体病毒 (*Orgyia pseudotsugata* multiple nucleocapsid NPV, OpMNPV) 和甘蓝夜蛾核型多角体病毒 (*Mamestra brassicae* multiple nucleocapsid NPV, MbMNPV) 编码的 GP37 蛋白主要定位在细胞质中 (Gross et al., 1993; Phanis et al., 1999), 而 AcMNPV 和斜纹夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera litura* multiple nucleocapsid NPV, SpltMNPV) GP37 蛋白遍布在被感染细胞的细胞质和细胞核 (Li et al., 2003; Vialard et al., 1990)。本研究显示, CpGV GP37 蛋白的亚细胞定位与 OpMNPV、MbMNPV GP37 蛋白相似, 主要分布在细胞质中。在感染的细胞中, 棉铃虫痘病毒 (*Heliothis armigera* entomopoxvirus, HAEV) 纺锤体的形成经历了 fusolin 蛋白在细胞核周围空间和内质网的浓缩、聚集、结晶化的过程 (Lai-Fook et al., 2000)。本研究中, GP37-EGFP 融合蛋白在细胞质中也有浓缩、聚集的现象出现 (图 5, 箭头所示), 这些结果或许预示着 GP37 蛋白在宿主细胞中与昆虫痘病毒 fusolin 具有类似的特性。

杆状病毒基因的转录、基因组的复制、大量结构蛋白的合成和衣壳的组装均在被感染细胞的细胞核内 (Federici et al., 1997)。而在本研究中, CpGV GP37 蛋白出现在被感染细胞的细胞质内, 或许预示着该蛋白能够自由出入核膜, 是一种跨膜蛋白。杆状病毒被昆虫吞食后, 在中肠的碱性环境和蛋白酶的作用下, 多角体的蛋白组分被碱解, 释放出病毒粒子 (Occlusion-body derived virus, ODV)。ODV 通过昆虫围食膜后再与昆虫中肠上皮的微绒毛结合以直接的膜融合方式侵入中肠上皮细胞, 释放出核衣壳 (Federici et al., 1997)。在这个过程中, CpGV GP37 蛋白是否作为跨膜蛋白辅助 ODV 与中肠上皮的微绒毛融合从而促进 ODV 进入中肠上皮细胞还没有得到证实。作者之前的研究已经表明 CpGV GP37 蛋白能够增强 NPV 和 Bt 的杀虫活性 (Liu et al., 2011), 但对其增效机制的研究并不深入。通过促进 ODV 与昆虫中肠上皮的微绒毛的融合而增加病毒的感染力, 或许就是 CpGV GP37 蛋白的增效机制之一。当然, 这需要进一步的研究证实。

## 4 结论

本研究通过克隆 CpGV gp37 和 egfp 基因,借助 DH10B 感受态细胞,将 CpGV gp37 和 egfp 基因以 N 端或 C 端融合的方式插入 AcMNPV 基因组中,构建了 GP37 和 EGFP 融合(vAcEGFPGP37、vAcGP37EGFP)和非融合(vAcGP37、vAcEGFP)的重组病毒,利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统,对融合和非融合的蛋白进行表达。Western blot 检测到 GP37 和 EGFP 融合和非融合蛋白都得到了高效表达,为 GP37 蛋白后期研究工作提供了保障。将构建的重组病毒转染并感染 *S. frugiperda* 细胞系 Sf9,用激光共聚焦显微镜观察绿色荧光在被感染细胞内的分布情况,证实融合 GP37 的 EGFP 主要聚集在细胞质中,而没有融合 GP37 的 EGFP 均匀分布在细胞质和细胞核中,表明 CpGV GP37 蛋白定位于细胞质中。CpGV GP37 蛋白的亚细胞定位研究不仅丰富了杆状病毒 GP37 蛋白的相关理论,同时也为 CpGV GP37 蛋白增效机制的研究提供基础资料。

## 参考文献

### [1] 期刊

作者(不满 3 人者全部写出,超过 3 人只写前 3 名,后加“等”或“et al.”),年. 论文题目[J]. 期刊名,卷(期): 起止页码。

例 1: 谭祖猛,李云昌,胡琼,等. 2009. SSR 和 SRAP 标记研究油菜杂交种骨干亲本的遗传多样性[J]. 农业生物技术学报, 17(5): 882-890. (Tan Z M, Li Y C, Hu Q, et al. 2009. Genetic diversity of parental lines of rapeseed hybrids based on SSR and SRAP markers[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 17(5): 882-890.)

例 2: Beineke A, Puff C, Seehusen F, et al. 2009. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 127(1-2): 1-18.

### [2] 书籍

作者. 出版年. 书名[M]. 出版单位, 出版地. pp. 起止页码。

例: 殷震, 刘景华. 1997. 动物病毒学[M]. 科学出版社, 北京. pp. 746-767. (Ying Z, Liu J H. 1997. Animal Virology[M]. Science Press. Beijing. pp. 736-767.)

### [3] 学位论文

作者. 年份. 论文题目[D]. 硕士或博士学位论文, 单位, 导师. 起止页码。

例: 张光忠. 2011. 基于基因组的金针菇遗传连锁图的构建与数量性状位点(QTL)的分析[D]. 硕士学位论文, 福建农林大学, 导师: 谢宝贵. pp. 61-69. (Zhang G Z. 2011. The construction and application of genetic linkage map based on the genome sequencing of *Flammulina velutipes*[D]. Thesis for M.S., Fujian Agriculture and Forestry University, Supervisor: Xie

带格式的: 缩进: 左侧: 0 厘米, 首行缩进: 0 字符

带格式的: 缩进: 左侧: 0 厘米, 首行缩进: 0 厘米, 定义网格后不调整右缩进

带格式的: 缩进: 左侧: 0 厘米, 首行缩进: 0 字符

批注 [117]: 按照中文文献在前, 英文文献在后, 首字母顺序排序。中文文献英汉对照。

批注 [118]: 英文刊名用全称, 不用缩写。

B G pp. 61-69.)

[4] 技术标准

**起草责任者. 出版年. 标准代号, 标准名称[S]. 出版地:出版单位.**

朱水芳, 覃文, 曹际娟, 等. 2003. SN/T 1204-2003, 植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检测方法[S]. 北京: 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. (Zhu S F, Tan W, Cao J J, et al. 2003. SN/T 1204-2003, Protocol of the real-time PCR for detecting genetically modified plants and their derived products[S]. Beijing: General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the Peoples Republic of China(AQSIQ))

[5] 专利文献

**专利申请者. 年份. 专利名[P]. 专利国别, 专利号.**

胡赞民, 石锐, 杨晨敏, 等. 2003. 一种向莴苣叶绿体中导入外源DNA的方法以及用于该方法的莴苣叶绿体DNA片段 [P]. 中国, 01129515.5. (Hu Z M, Shi R, Yang C M, et al. 2003. A method on transport exogenous DNA into lettuce chloroplast, and the DNA fragments of lettuce chloroplast[P]. China, 01129515.5.)

[6] 论文集

**作者. 出版年. 论文题目[C]. 论文集名. 出版单位, 期卷: 起止页码.**

吕素莲, 张举仁, 李汝忠. 2003. 农杆菌介导的棉花茎尖遗传转化[C]. 中国细胞生物学学会第八届会员代表大会暨学术大会论文摘要集. 中国细胞生物学学会, 1: 15-20. (Lv S L, Zhang J R, Li R Z. 2003. Genetic transformation of cotton shoot tips mediated with Agrobacterium[C]. Chinese Society for Cell Biology, 1: 15-20.)