



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111378687 A
(43)申请公布日 2020.07.07

(21)申请号 201811607414.5

(22)申请日 2018.12.27

(71)申请人 陕西杆粒生物科技有限公司
地址 712100 陕西省咸阳市杨凌示范区康
乐西路农大景苑8-231室

(72)发明人 不公告发明人

(51)Int.Cl.
C12N 15/866(2006.01)

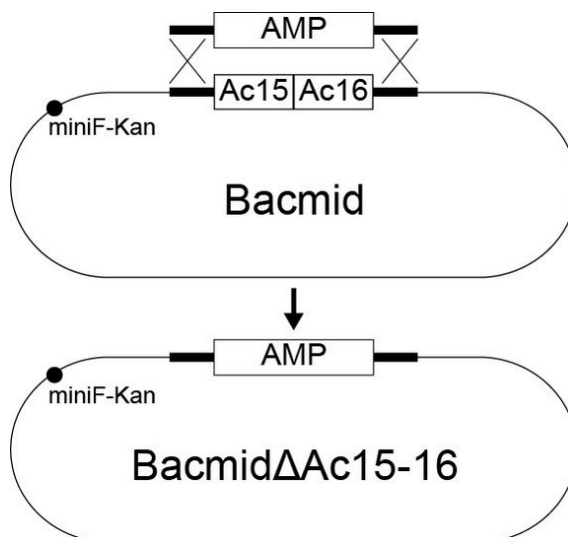
权利要求书1页 说明书4页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

一种高产杆状病毒表达载体

(57)摘要

本发明公开了一种基因敲除型高产杆状病毒表达载体。该载体通过同时敲除两个相邻的杆状病毒非必需基因Ac15和Ac16,使外源蛋白表达水平提高至少60%。同时,病毒的增殖特性也显著改善。表达产量的提高能显著降低企业的生产成本。该杆状病毒表达载体可用于生物制品工业领域,特别是亚单位疫苗工业领域。



1. 一种基因敲除型高产杆状病毒表达载体,其特征在于,杆状病毒表达载体上两个相邻的非必需基因Ac15和Ac16被同时敲除。
2. 如权利要求1所述的Ac15敲除,其特征在于,Ac15的启动子区被破坏,或者编码区被破坏,或者启动子区和编码区同时被破坏。
3. 如权利要求1所述的Ac16敲除,其特征在于,Ac16的启动子区被破坏,或者编码区被破坏,或者启动子区和编码区同时被破坏。
4. 权利要求1至3所述的杆状病毒表达载体在蛋白表达中的应用。
5. 权利要求1至3所述的杆状病毒表达载体在疫苗工业的应用。

一种高产杆状病毒表达载体

技术领域

[0001] 本发明属于重组蛋白质表达技术领域,尤其涉及一种基因敲除的高产杆状病毒表达载体。

背景技术

[0002] 杆状病毒是特异感染节肢动物的双链DNA病毒,苜蓿银纹夜蛾多核型多角体病毒(*Autographa californica nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV)是杆状病毒的模式种。自从1983年Smith GE等首次用杆状病毒在昆虫细胞中表达人 β -干扰素基因以来(*Mol Cell Biol.* 1983; 3:2156-65.),由于具有低成本、高产量,而且具备各种翻译后修饰系统等优点,杆状病毒表达载体系统在科研和生产中被广泛应用。

[0003] 但相较于工业上普遍使用的原核表达系统(大肠杆菌、枯草芽孢杆菌)和酵母表达系统,杆状病毒表达载体系统的产量还不尽人意。为此人们采取了多种策略提高该表达系统的产量,这些策略包括:

1、改造启动子及周边元件。比如通过串联p6.9和p10启动子可以将GFP产量提高4.4倍(*PLoS ONE.* 2014; 9(5): e96562.);在p10启动子下游重复一次Burst sequence可以使GUS酶活提高1.5倍(*Biotechnol Bioeng.* 2010; 107:909-16.)。

[0004] 2、构建抗凋亡载体或细胞系。中国台湾一个课题组用RNA干扰载体在昆虫细胞Sf9中表达Sf-caspase-1的dsRNA,成功沉默了细胞中的Sf-caspase-1,使外源蛋白的产量显著提高(*Biotechnol Appl Biochem.* 2007; 48: 11-19.)。张潇月等将靶向Sf-caspase-1的双链小RNA编码序列直接克隆到杆状病毒基因组上,使表达的荧光素酶活性提高10倍(*BMC Biotechnol.* 2018; 18:24.)。

[0005] 3、敲除非必需基因。比如敲除几丁质酶和组织蛋白酶(ChiA/Cath)有助于提高分泌蛋白的表达(*J Virol Methods.* 2004; 122:113-118.);在此基础上再敲除三个连续的非必需基因p26、p10、p74,可以使EGFP的产量增加2.6倍(*Cell Biol Toxicol.* 2010; 26: 57-68.)。

[0006] 敲除非必需基因提高外源基因产量的机制是多样的。敲除组织蛋白酶(Cath)基因可以降低蛋白质的降解;敲除p10可以降低释放感染晚期的细胞内转录资源。此外,敲除非必需基因也可以减小杆状病毒基因组的大小,有利于容纳更大的外源DNA片段。

[0007] 我们通过检索文献,发现杆状病毒基因组中存在大量非必需基因,并且一些非必需基因彼此相邻成簇存在,这些成簇存在的非必需基因包括Ac15和Ac16。

[0008] Ac15编码蜕皮类固醇UDP-葡萄糖基转移酶(EGT)。EGT的功能是通过催化葡萄糖从UDP-葡萄糖转移到蜕皮类固醇,来阻止受感染幼虫的蜕皮和化蛹。EGT的存在可以延长感染幼虫的摄食阶段,从而使病毒能够在更大的幼虫中长时间复制,进而导致更高的病毒产量。研究发现,EGT基因失活的AcMNPV和BmNPV(*Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus*)突变体是可以感染和复制的(*J. Virol.* 1990; 64:1321-1328.),但昆虫的存活时间明显缩短(*Bio/Technology.* 1991; 9:1086-1089.)。用细胞系增值的杆状病毒经常可以分离到EGT基因的

自发缺失突变体(Virus Res. 1987; 7:335-349.)。

[0009] Ac16 可以与fp25(Ac61)相作,并与细胞肌动蛋白形成复合物(Virology. 1998; 240:64-75.)。在BmNPV中,Ac16的同源基因Bm8直接与IE-1相作(J. Gen Virol. 2005; 86: 3031-8.)。在AcMNPV中进行类似的观察,也发现Ac16与IE-1/IE-0相作(Virology. 2009; 385:484-95.)。此外,AcMNPV Ac16插入失活突变体具有复制活性,并且在昆虫细胞或幼虫中与野生型没有明显差异(J Gen Virol. 1990; 71:1029-37.)。分离BmNPV(Bm8)无效突变体的最初尝试不成功,但C末端缺失突变体是有复制活性的(Arch Virol. 2004; 149: 1581-94.)。但突变体的BV滴度较野生型低。在AcMNPV中的一项研究发现,Ac16的缺失导致DNA合成和BV产生的延迟(Virology. 2010; 404:168-79.)。但在另一项研究中则具有较小的影响(Virology. 2009; 385:484-95.)。

[0010] 总的说来,Ac15和Ac16都是杆状病毒的非必需基因,至少在昆虫细胞系中复制时,这两个基因并不表现出重要的功能。敲除这两个基因对外源基因表达量的影响还未曾被关注过。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于提供一种基因敲除型高产重组杆状病毒载体,旨在解决背景技术提及的表达量低的问题。

[0012] 本发明通过同时敲除Ac15和Ac16,获得了一个外源蛋白产量提高的杆状病毒表达载体。

[0013] 本发明是这样实现的,用带有Ac15-16上下游50bp同源臂的引物(SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2)扩增氨苄青霉素抗性基因,将获得的PCR产物(SEQ ID NO:3)转化到含有Bacmid的大肠杆菌中,通过诱导表达RedET重组酶,在大肠杆菌中实现同源重组,经氨苄青霉素抗性筛选,获得Ac15-16敲除的Bacmid(命名为Bacmid Δ Ac15-16)。

[0014] 在Bacmid Δ Ac15-16中,Ac15全部编码区、Ac16的启动子区和5'端528bp部分编码区被敲除,导致Ac15-16彻底失活。

[0015] 以Bacmid Δ Ac15-16和对照Bacmid为表达载体,将荧光素酶基因FluC和GFP基因分别通过重组插到多角体位点。经测定,荧光素酶蛋白产量提高了60%,GFP荧光强度提高了近一倍。

[0016] 检测病毒的一次生长曲线,我们发现Ac15-16敲除型病毒的增殖特性优于对照病毒。

[0017] 本发明同时敲除相邻的两个病毒非必需基因后,蛋白表达水平显著提高、病毒的增殖水平显著提高,说明本发明确实能提供一个具有优良生产性状和高产特性的杆状病毒表达载体。

[0018] 本发明另一目的在于用上述的敲除型杆状病毒载体制备蛋白制品。

[0019] 本发明另一目的在于用上述的敲除型杆状病毒载体制备疫苗。

附图说明

[0020] 图1 本发明提供的杆状病毒载体的基因敲除策略示意图。

[0021] 图2 使用本发明提供的杆状病毒载体表达的荧光素酶FluC。全细胞蛋白电泳后经

考马斯亮蓝染色,结果显示本发明提供的杆状病毒载体产量明显高于对照,经密度扫描定量比较,产量提高了60.3%。

[0022] 图3 使用本发明提供的杆状病毒载体表达的绿色荧光蛋白GFP。病毒感染后4天的细胞经流式细胞仪分析,计算几何平均值得到总荧光强度。结果显示本发明提供的杆状病毒载体表达的GFP产量提高了94%。

[0023] 图4 本发明提供的杆状病毒载体的一次生长曲线。敲除了Ac15-16后并未影响病毒的增殖,反而使病毒的增殖能力明显提高。

具体实施方式

[0024] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0025] 下面结合附图对本发明的应用原理作详细的描述。

[0026] 1、Ac15-16基因的敲除。

[0027] 用带有Ac15-16上下游50bp同源臂的引物(SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2),以pTriEx1.1质粒为模板,扩增氨苄青霉素抗性基因片段,获得了1023bp的PCR产物(SEQ ID NO:3)。

[0028] 将获得的PCR产物用电转化的方法转入带有RedET质粒和Bacmid的大肠杆菌菌株HS996中,经阿拉伯糖诱导产生重组酶,重组后的大肠杆菌经氨苄青霉素抗性平板筛选,获得阳性克隆。此时Ac15-16 DNA片段已经被氨苄青霉素抗性基因片段替换。从大肠杆菌中提取Bacmid,测序鉴定后命名为Bacmid Δ Ac15-16(敲除策略见附图1)。

[0029] Bacmid Δ Ac15-16经质粒小提、Bsu36I限制性内切酶酶切线性化之后,供后续实验使用。

[0030] 2、表达萤光素酶Fluc。

[0031] 线性化的Bacmid Δ Ac15-16与pTriEx-FluC质粒(FluC基因片段克隆在pTriEx1.1 NcoI/XhoI位点之间)共转染Sf9昆虫细胞,转染后5天收集P0代重组病毒。P0代病毒扩增至P1代病毒,以3 MOI感染High Five细胞,感染后第四天收集细胞。细胞裂解后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、考马斯亮蓝染色检测(附图2)。考染的凝胶通过密度扫描数值化,计算结果比较后发现,萤光素酶Fluc产量相对于野生型提高了60.3%。

[0032] 3、表达绿色荧光蛋白GFP。

[0033] 线性化的Bacmid Δ Ac15-16与pTriEx-GFP质粒(GFP基因片段克隆在pTriEx1.1 NcoI/XhoI位点之间)共转染Sf9昆虫细胞,转染后5天收集P0代重组病毒。P0代病毒扩增至P1代病毒,以3 MOI感染Sf9细胞,感染后第四天收集细胞。用流式细胞仪检测细胞的绿色荧光强度,并计算几何平均数(附图3)。比较后发现绿色荧光蛋白GFP产量相对于野生型提高了94%。

[0034] 4、病毒增殖特性。

[0035] 利用带有绿色荧光蛋白的重组病毒以0.1 MOI感染Sf9细胞,之后每24小时取一次样,用极限稀释法测定病毒滴度,绘制病毒一次生长曲线(附图4)。与野生型病毒相比,Ac15-16敲除的病毒具有更好的病毒增殖特性。

[0036] 以上所述的表达萤光素酶FluC和绿色荧光蛋白GFP仅为本发明的实施例而已,并不用以限制本发明。凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110>	陕西杆粒生物科技有限公司	
<120>	一种高产杆状病毒表达载体	
<160>	3	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	4	
<211>	66	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus)	
<400>	4	
	aatttgttac ataatcaaat taccagtaca gttattcggg ttgaagcaaa aacgcgcgga	60
	catgag	66
<210>	4	
<211>	66	
<212>	DNA	
<213>	人工序列 (Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus)	
<400>	4	
	cgactat ttt cataaactat gactcgcgaa ccaaacgccg ccgtcagcag ttaccaatgc	60
	ttaatc	66
<210>	4	
<211>	1023	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	4	
	aatttgttac ataatcaaat taccagtaca gttattcggg ttgaagcaaa aacgcgcgga	60
	catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat	120
	tcaacatttc cgtgtcgcgc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc	180
	tcaccagaaa acgctgggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg	240
	ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg	300
	ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga	360
	cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgat aactattct cagaatgact tggttgagta	420
	ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc	480
	tgccataacc atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc	540
	gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg	600
	ggaaccggag ctgaatgaag ccatacaaaa cgacgagcgt gacaccacga tgctgtagc	660
	aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca	720
	acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggcct	780
	tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat	840

cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg	900
gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat	960
taagcattgg taactgctga cggcggcggtt tggttcgca gtcatagttt atgaaaatag	1020
tcg	1023

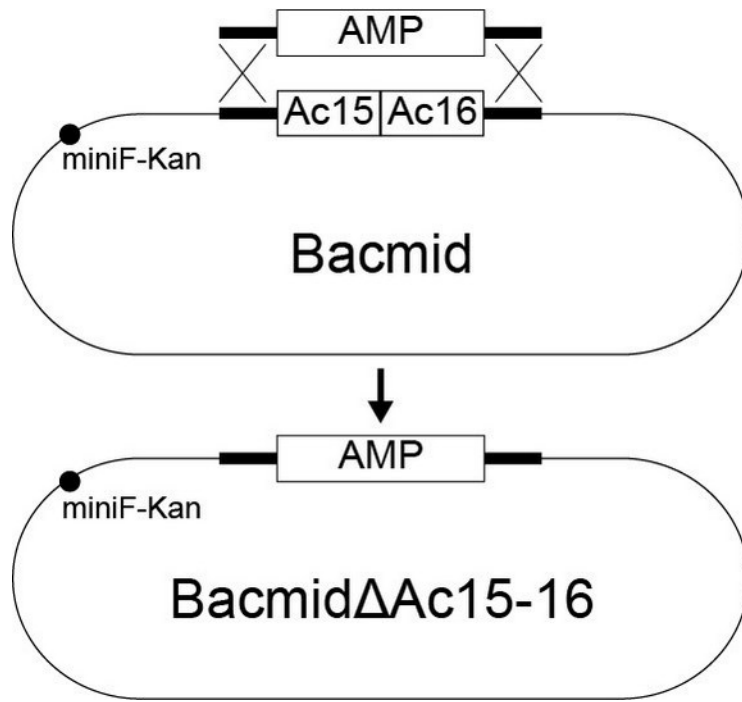


图 1

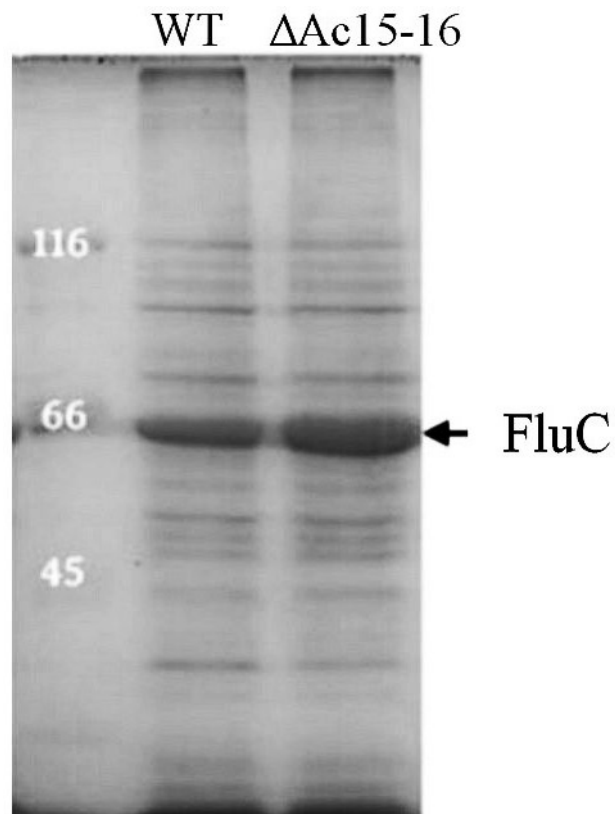


图 2

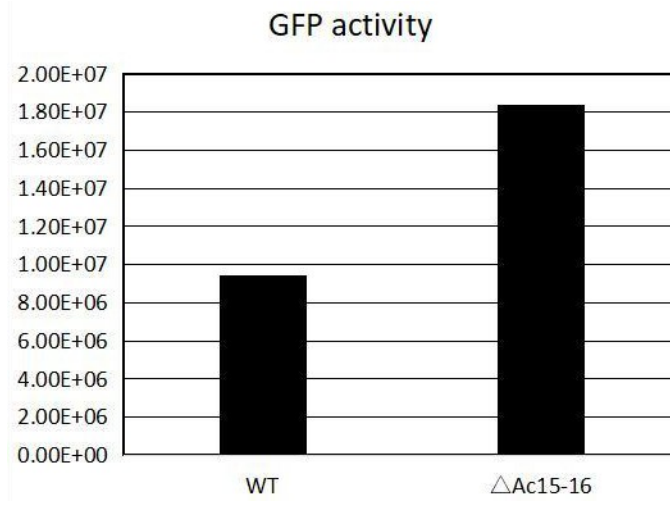


图 3

一次生长曲线

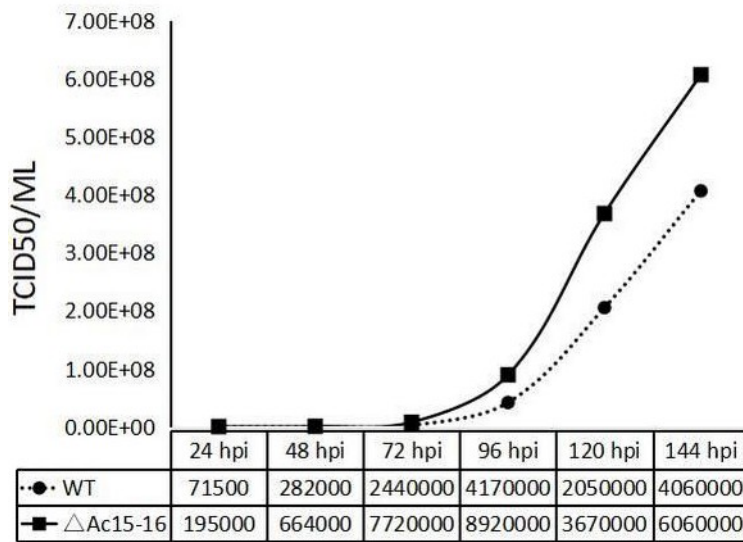


图 4