

3. Smith G. E., Summers M. D., Fraser M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with baculovirus expression vector // *Mol. and Cell. Biol.*— 1983.— 3, N 12.— P. 2156—2165.
4. Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector / S. Maeda, T. Kawai, M. Obinata et al. // *Nature*.— 1985.— 315, N 6020.— P. 592—594.
5. Кок И. П., Скуратовская И. Н., Строковская Л. И. Молекулярные основы репродукции бакуловирусов.— Киев: Паук. думка, 1980.— 175 с.
6. Структура и функционирование генома вируса ядерного полиэдроза кольчатого шелкопряда / И. Н. Скуратовская, Л. И. Строковская, С. В. Комиссаренко, П. В. Менделева // *Цитология и генетика*.— 1986.— 20, № 1.— С. 31—33.
7. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 478 с.
8. Identification, cloning and R-loop mapping of the polyhedrin gene from the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata* / G. F. Rohrmann, D. I. Leisy, K.-C. Chow et al. // *Virology*.— 1982.— 121, N 1.— P. 51—60.
9. Rohrmann G. F. Polyhedrin structure // *J. Gen. Virol.*— 1986.— 67, N 5.— P. 1499—1513.
10. Smith G. E., Summers M. D. DNA homology among subgroup A, B and C baculoviruses // *Virology*.— 1982.— 123, N 1.— P. 393—406.

Инст. молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 21.09.89

X.1K 578.811:577.21

© Л. И. Строковская, И. М. Кихно, О. В. Веселовский,
И. Н. Скуратовская, Н. Ю. Мирюта, А. И. Петренко, А. П. Соломко, 1990

ЭКСПРЕССИВНЫЙ БАКУЛОВИРУСНЫЙ ВЕКТОР НА ОСНОВЕ ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА КОЛЬЧАТОГО ШЕЛКОПРЯДА *MALACOSOMA NEUSTRIA*

Ген β -галактозидазы *Escherichia coli* встроен в рамке считывания в ген полиэдрина вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) кольчатого шелкопряда. Котрансфекцией рекомбинантной плазмиды *pMPEL- β -gal* с ДНК ВЯП *M. neustria* дикого типа связанный ген был встроен в геном ВЯП *M. neustria*. Инфицирование культуры клеток дубового шелкопряда *Antergaea perni* (МСАр-1) полученным рекомбинантным ВЯП *M. neustria-gal3* выявило высокий уровень экспрессии связанного белка полиэдрин- β -галактозидазы. Синтеза полиэдрина в этих клетках не обнаружено.

Введение. Бакуловirusы 6 лет назад впервые начали использоваться в качестве экспрессивных векторов для получения белков и пептидов различного происхождения [1]. В настоящее время с этими векторами работают более чем в 150 лабораториях мира. Все используемые векторы сконструированы на основе двух вирусов: ВЯП *Autographa californica* и ВЯП *Bombyx mori* [2]. Мы получили новый бакуловirusный экспрессивный вектор на основе ВЯП кольчатого шелкопряда *M. neustria*. Ранее было показано, что геном этого вируса представляет собой ковалентнозамкнутую молекулу ДНК с молекулярной массой около 90 000 (примерно 130 т. п. н.) [3]. Ген полиэдрина этого вируса был локализован и вместе с прилегающими участками вирусной ДНК клонирован в плаزمиды *pBR325* и *pUC18* (плазмиды *pMPEL* и *pMPEL*) [4].

В настоящей работе приведены данные по конструированию транспортногo вектора с геном бактериальной β -галактозидазы, получение рекомбинантного вируса ВЯП *M. neustria-gal3* и изучение экспрессии β -галактозидазы в клетках насекомых, инфицированных рекомбинантным бакуловirusом.

Материалы и методы. Вирус и клетки. В работе для конструирования рекомбинантной ДНК использован ВЯП *M. neustria*, штамм W1 [4].

Для накопления вируса, трансфекции и получения бляшек использовали культуру клеток дубового шелкопряда *MSAr-1* [5]. Процедура получения бляшек при окрашивании нейтральным красным, а также получение голубых бляшек в присутствии β -галактозидазного индикатора 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид (X-gal) для выявления экспрессии β -галактозидазы описаны в [6].

Получение препаратов ДНК. Плазмидные ДНК получали по методу [7]. ДНК ВЯП *M. neustria* выделяли, используя свободные вирионы и вирионы, включенные в полиэдры. Свободные вирионы осаждали из культуральной среды при 20 000 об/мин в течение 40 мин. Полиэдры в клетках обрабатывали ультразвуком 40 с на льду и пропускали через 50 %-ный раствор сахарозы при 20 000 об/мин в течение 40 мин. Обработанные полиэдры объединяли со свободными вирионами. ДНК выделяли, как описано в [8] с модификациями.

К суспензии полиэдров и вирионов добавляли спермидин до концентрации 50 мМ, раствор бромистого этидия — до 400 мкг/мл и 1 н. NaOH — до pH 11,0. Суспензию очень мягко и тщательно перемешивали и через 5 мин 1 н. HCl доводили pH до 7,0, затем добавляли DS-Na до концентрации 1 %, протеиназу К — до 500 мкг/мл. Полученную смесь инкубировали при 37 °С в течение 16 ч. Далее обрабатывали фенолом, фенолхлороформом и осаждали этанолом. Полученную ДНК растворяли в 0,01 М трис-HCl, pH 7,2.

Определение нуклеотидной последовательности N-концевого участка гена полнэдрина ВЯП *M. neustria*. *Sall*-*Sall*-фрагмент размером 3 т. п. н. был вырезан из плазмиды *pMPEA* и клонирован в *pUC18* (*pMEASE*). Сиквенирование меченных ³²P по 3'-концам рестрикционных фрагментов проводили методом Максама и Гилберта [9] в модификации [10].

Конструирование транспортного вектора *pMPEA*-β-gal. Использовали плазмиду *pMPEA*, содержащую ген полнэдрина ВЯП *M. neustria* [4] и ген β-галактозидазы, полученный из плазмиды *pAc360*-β-gal [11] при обработке последней *Bam*HI (β-gal-фрагмент). Этот ген лигировали с плазмидой *pMPEA*, обработанной *Bam*HI, и трансформировали клетки *JM101*. На чашках со средой, содержащей ампициллин, X-gal и ИПТГ (изопропил-β-D-тиогаалактозид), были отобраны голубые колонии. ДНК анализировали с помощью рестриктазы *Bam*HI. Плазмиды, содержащие β-gal-фрагмент, представляют собой транспортный бакуловиральный вектор — *pMPEA*-β-gal.

Получение рекомбинантного ВЯП *M. neustria*-gal. В этом случае проводили котрансфекцию культуры клеток смесью вирусной ДНК ВЯП *M. neustria* W1 и ДНК плазмиды *pMPEA*-β-gal (соотношение 1:2) в соответствии с руководством [11]. Рекомбинантный вирус выявляли по появлению голубых пятен в присутствии X-gal. Для очистки от примеси дикого вируса рекомбинантный вирус 3–4 раза проводили через бляшки [11]. Препараты ДНК, полученные из рекомбинантного вируса, обрабатывали рестриктазами *Bam*HI, *Eco*RI и *Bam*HI+*Eco*RI и анализировали блоб-гибридизацией с ³²P-β-gal-фрагментом.

Определение уровня β-галактозидазы. Уровень β-галактозидазы определяли в реакции с *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозидом (ОНПГ) по методу, описанному в [6]. Клетки заражали рекомбинантным вирусом с множественностью 1 БОЕ на клетку. После адсорбции в течение 1 ч вирусную суспензию замещали средой и клетки инкубировали при 27 °С. Через определенные промежутки времени клетки отбирали и обрабатывали, как описано [6]. Специфическую активность определяли в соответствии с методом Миллера [12] и выражали как количество разрушенного ОНПГ за 1 мин на 1 мг белка; количество белка — по Брэдфорду [13]. Стандартная кривая построена на разведениях бычьего сывороточного альбумина.

Электрофоретическое разделение белков. Для анализа вирусиндуцированных белков в инфицированной культуре клетки через разные сроки после заражения осаждали, промывали, суспендировали в фосфатном буфере, содержащем 0,1 н. NaOH, и добавляли лизирующий буфер (1 % DS-Na, 5 % β-меркаптоэтанол, 0,01 М трис, 0,001 М ЭДТА, 10 % глицерин). После прогрева в течение 10 мин при 100 °С центрифугировали и супернатант анализировали электрофорезом в DS-Na-полиакриламидном геле [6].

Результаты и обсуждение. Транспортный бакуловиральный вектор. Для создания транспортного вектора использовали плазмиду *pMPEA*, содержащую фрагмент ДНК ВЯП *M. neustria* размером 9,3 т. п. н. с геном полнэдрина, локализованным в области 4,2—5,5 (рис. 1, а). Картирование показало, что в этой области находятся сайты для рестриктаз *Bgl*II, *Bam*HI, *Hind*III, *Kpn*I. Для ориентации гена полнэдрина и локализации промоторной области проведен сиквенинг участка с геном полнэдрина. Для сиквенса рестриктазой *Sall* был вы-

резан участок размером 3 т. п. н. и субклонирован в *pUC18* — плазмиде *pMEASE* (рис. 1, б). На рис. 2 приведена нуклеотидная последовательность участка *BglII-BamHI*, содержащая 5'-нетранслируемую область гена полиэдрина и область, кодирующую N-концевую часть белка. Участок начала транскрипции по аналогии с генами полиэдринов других бакуловирусов [14] находится в положении —45—49 (последовательность —АТААГ—). При сравнении участка от начала транскрипции до иницирующего кодона АУГ с соответствующей областью гена полиэдрина ВЯП *A. californica* обнаружено 62% гомологии. Хотя полная последовательность белка полиэдрина ВЯП *M. neustria* пока не определена, исходя из представленной нуклеотидной последовательности можно сделать вывод, что N-конце-

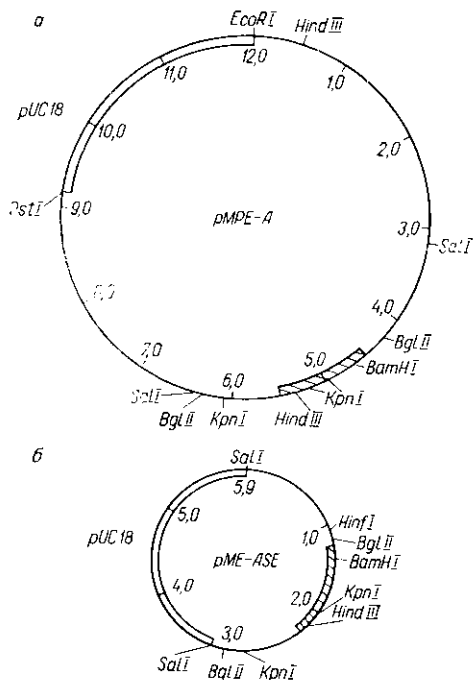


Рис. 1. Рестрикционные карты рекомбинантных плазмид *pMPEA* (а) и *pMEASE* (б), содержащих ген полиэдрина (заштрихованная область): а — *PstI-EcoRI*-фрагмент ДНК ВЯП *M. neustria* размером 9,3 т. п. н. (из плазмиды *pMEA* [4]) встроен в плазмиду *pUC18*; б — *SalI-SalI*-фрагмент плазмиды *pMPE* размером 3,0 т. п. н. встроен в *pUC18*

Рис. 2. Нуклеотидная и аминокислотная последовательность участка гена полиэдрина, содержащая 5'-нетранслируемый участок и область, кодирующую N-концевую часть белка полиэдрина

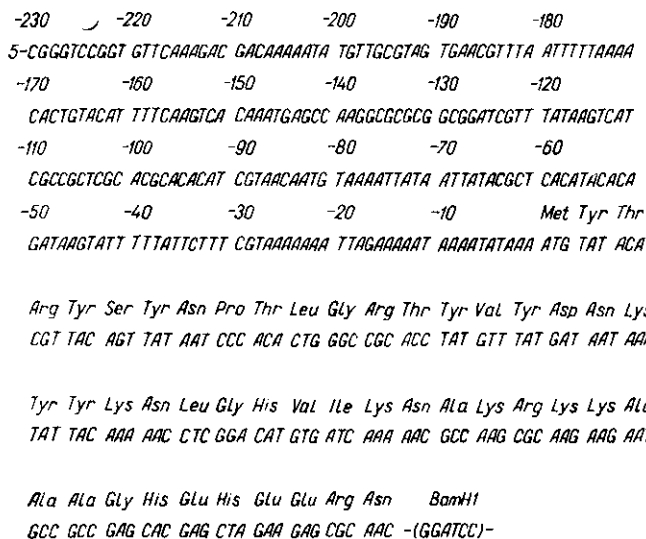


Рис. 2. Нуклеотидная и аминокислотная последовательность участка гена полиэдрина, содержащая 5'-нетранслируемый участок и область, кодирующую N-концевую часть белка полиэдрина

вой участок полиэдрина ВЯП *M. neustria* на 80—82% гомологичен аналогичным участкам полиэдринов других ВЯП [14], что подтверждает консервативность строения полиэдринов.

BamHI-сайт в положении +155 был выбран местом для встройки гена β-галактозидазы. Рестрикционный анализ плазмидных ДНК из голубых колоний, полученных при трансформации клеток *JM101* лигазной смесью плазмиды *pMPEA* и β-gal-фрагмента, показал, что

β -gal-фрагмент встроился в плазмиду *pMPEA*. На рис. 3 представлена структура транспортного бакуловирусного вектора с геном β -галактозидазы — плаزمиды *pMPEA*- β -gal.

Получение и анализ экспрессивного вектора. После котрансфекции монослоя клеток смесью ДНК ВЯП *M. neustria* W1 и плазмиды *pMPEA*- β -gal (1:2) экспрессию β -галактозидазы определяли по появлению синих бляшек в присутствии X-gal. Сравнение монослоя клеток, окрашенного нейтральным красным, и монослоя в присутствии X-gal свидетельствует, что примерно 0,1% бляшек экспрессирует β -галактозидазу.

Блот-гибридизация рестрицированной ДНК, полученной из рекомбинантного вируса (клон 3), проведенного через бляшки 3 раза, показывает, что β -gal-фрагмент встроился в ДНК ВЯП *M. neustria*

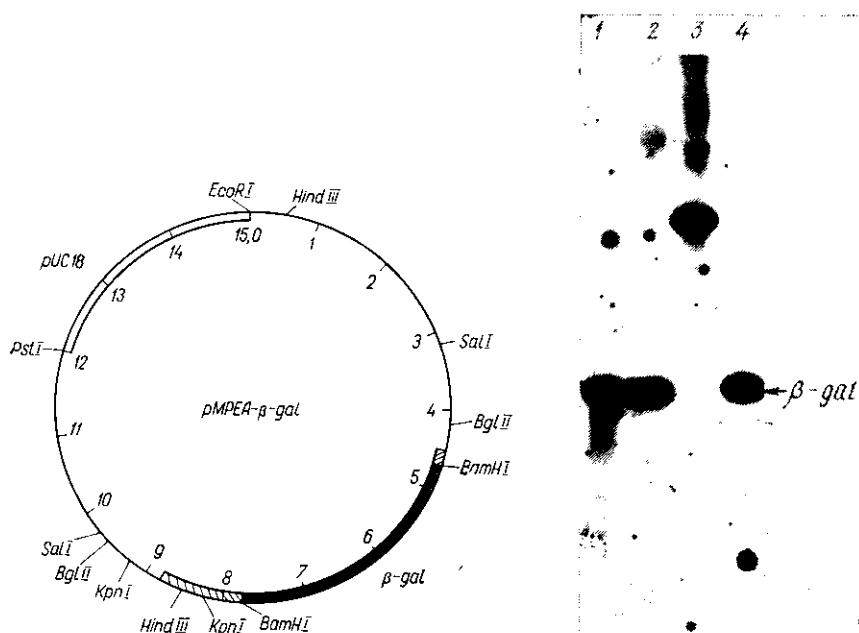


Рис. 3. Рестрикционная карта плазмиды *pMPEA*- β -gal, содержащей полиэдрин- β -галактозидаза-связанный ген

Fig. 3. Restriction map of *pMPEA*- β -gal plasmid containing a polyhedrin/ β -galactosidase fusion gene.

Рис. 4. Анализ голубых бляшек ВЯП *M. neustria*-gal3 блот-гибридизацией: ДНК рестрицирована *Bam*HI (1), *Bam*HI+*Eco*RI (2) и *Eco*RI (3) и гибридизована с 32 P- β -gal-фрагментом (4)

Fig. 4. Analysis of the blue MnNPV gal3 by blot-hybridization: DNA were digested with either *Bam*HI (1) or *Eco*RI+*Bam*HI (2) or *Eco*RI (3) restriction endonuclease and were hybridized with 32 P- β -gal fragment (4)

(рис. 4), т. е. произошло замещение гена полиэдрина дикого типа на ген полиэдрина с встроенным чужеродным геном — геном β -галактозидазы.

Регуляция экспрессии β -галактозидазы. Чтобы выяснить, находится ли экспрессия гена β -галактозидазы под таким же временным контролем, как и экспрессия полиэдрина, определяли специфическую активность β -галактозидазы в клетках, зараженных рекомбинантным ВЯП *M. neustria*-gal3, через разное время после заражения. Активность β -галактозидазы обнаруживается уже через 24 ч, затем нарастает и к 120-му ч составляет $13 \cdot 10^3$ ед. акт. (рис. 5). В данном опыте мы не наблюдали снижения активности β -галактозидазы, возможно, из-за низкой множественности заражения. Активность β -галактозидазы для нашего вектора несколько выше (примерно в 1,5 раза), чем для вектора ВЯП *A. californica* LIGP-gal3 [6].

При анализе в DS-Na-полнакриламидном геле (рис. 6) было обнаружено, что в клетках, инфицированных ВЯП *M. neustria-gal3*, линия, соответствующая β -галактозидазе, появляется через 24 ч и интенсивность ее нарастает до 96–120 ч после заражения клеток вирусом. Линии, соответствующей полиэдрину, в этих клетках не выявлено.

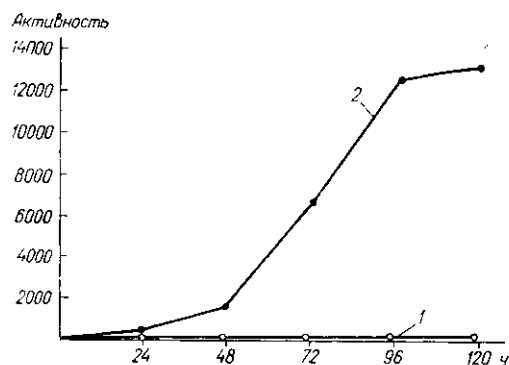


Рис. 5. Временная регуляция экспрессии полиэдрин- β -галактозидаза-связанного гена при инфицировании рекомбинантным вирусом ВЯП *M. neustria-gal3*. Клетки дубового шелкопряда инфицированы вирусом дикого типа *wt MnNPV* (1) или ВЯП *M. neustria-gal3* (2) при множественности заражения 1 БОЕ/клетка. Специфическая активность β -галактозидазы определена в различные время после заражения и выражена как количество (нм) ОНПГ, разрушенного за 1 мин, на 1 мг белка

Fig. 5. Temporal regulation of polyhedrin/ β -galactosidase fusion gene expression after infection with *MnNPV-gal3*. *Antheraea pernei* cells were infected with *wt MnNPV* (1) or *MnNPV-gal3* *Antheraea pernei* cells were infected with *wt MnNPV* (1) or *MnNPV-gal3* (2) at the multiplicity of infection 1. The specific activity of β -galactosidase in the infected cells was determined at various times p. i. and was reported as nanomoles of ONPG cleaved for a minute per a milligram of protein

В клетках, инфицированных ВЯП *M. neustria W1*, полиэдрин обнаруживается через 24 ч и количество его нарастает до 120 ч, т. е. экспрессия β -галактозидазы и полиэдрина находится под одинаковым временным контролем.

Количество β -галактозидазы через 120 ч составляет 18,3 % общего белка, окрашиваемого кумасси, а количество полиэдрина через 120 ч

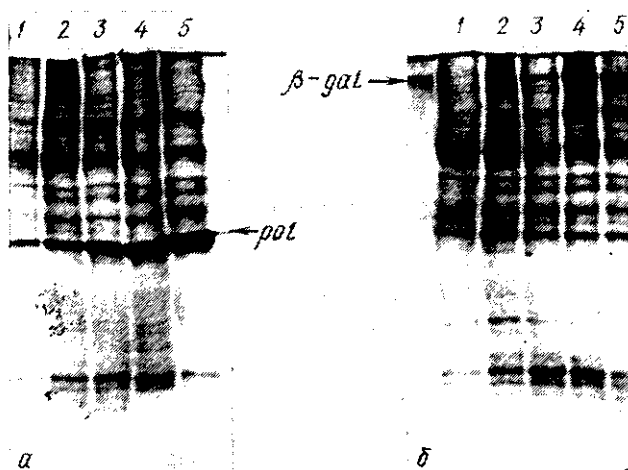


Рис. 6. DS-Na-полнакриламидные кумасси-окрашенные профили белков из клеток дубового шелкопряда, инфицированных *wt MnNPV* (a) или рекомбинантным вирусом ВЯП *M. neustria-gal3* (b), в различное время после заражения: 1 — 24; 2 — 48; 3 — 72; 4 — 96; 5 — 120 ч. Стрелками обозначено месторасположение полиэдрина и β -галактозидазы

Fig. 6. SDS-polyacrylamide coomassie blue-stained electrophoresis profiles of proteins from *Antheraea pernei* cells infected with *wt MnNPV* (a) or recombinant virus *MnNPV-gal3* (b) at various time p. i.: 1 — 24 h, 2 — 48 h, 3 — 72 h, 4 — 96 h, 5 — 120 h. Arrows indicate the position of polyhedrin and β -galactosidase

после заражения составляет около 73 %. Таким образом, на основе ВЯП *M. neustria* получен новый экспрессивный бакуловирусный вектор. Возможно, модифицируя этот вектор, можно будет повысить экспрессию встроеного чужеродного гена до уровня экспрессии неповрежденного гена полиэдрина.

Мы предполагаем в дальнейшем использовать рекомбинантный ВЯП *M. neustria-gal3* в качестве основы для создания рекомбинантных бакуловирусов, несущих другие чужеродные гены, что значительно упростит их обнаружение.

MALACOSOMA NEUSTRIA NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS
EXPRESSION VECTOR

*L. I. Strokovskaya, I. M. Kikhno, O. V. Veselovsky, I. N. Skuratovskaya,
N. Yu. Miryuta, A. I. Petrenko, A. P. Solomko*

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

The β -galactosidase gene of *E. coli* was inserted in phase with coding sequence of the *Malacosoma neustria* nuclear polyhedrosis virus (MnNPV) polyhedrin gene. The fusion gene was inserted into the MnNPV genome by cotransfection of recombinant plasmid pMPEA- β gal and wild-type MnNPV DNA. Infection of *Antheraea pernyi* cells (MCAP-1) by the resulting recombinant MnNPV gal 3 has shown high level of expression of polyhedrin- β -galactosidase fusion protein, no synthesis of polyhedrin being revealed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith G. E., Summers M. D., Fraser M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector // *Mol. and Cel. Biol.*— 1983.— 3, N 12.— P. 2156—2165.
2. Luscow V. A., Summers M. D. Trends in the development of baculovirus expression vectors // *Biotechnology*.— 1988.— 6, N 1.— P. 47—55.
3. Структура и функционирование генома вируса ядерного полиэдроза кольчатого шелкопряда / И. Н. Скуратовская, Л. И. Строковская, С. В. Комиссаренко, Н. В. Менделеева // *Цитология и генетика*.— 1986.— 20, № 1.— С. 31—33.
4. Клонирование гена полиэдрина кольчатого шелкопряда / Л. И. Строковская, О. В. Веселовский, И. М. Кихно, Н. Ю. Мирюта // *Биополимеры и клетка*.— 1990.— 6, № 3.— С. 81—84.
5. Сухорида Е. М., Каниюка В. Ю., Милосердова В. Д. Размножение вируса ядерного полиэдроза кольчатого шелкопряда при длительном пассировании в клетках переливаемых личинок насекомых // *Энтомопатоген. вирусы и их практ. значение*.— Киев: Наук. думка, 1981.— С. 44—50.
6. Pennock G. D., Shoemaker Ch., Miller L. K. Strong and regulated expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in insect cells with a baculovirus vector // *Mol. and Cel. Biol.*— 1984.— 4, N 3.— P. 399—406.
7. Маннатиус Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 478 с.
8. Черепенко Е. И., Маргынченко Е. П. Простой метод получения ДНК бакуловирусов // *Молекуляр. биология*.— 1985.— 19, № 6.— С. 1519—1524.
9. Maxam A. M., Gilbert W. A new method for sequencing DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1977.— 74, N 2.— P. 560—564.
10. Чувпило С. А., Кравченко В. В. Твердофазный метод определения нуклеотидной последовательности ДНК // *Биоорг. химия*.— 1983.— 9, № 12.— С. 1634—1637.
11. Summers M. D., Smith G. E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures.— Texas: Col. Stat., 1987.— 56 p.
12. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.— М.: Мир, 1976.— 436 с.
13. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*— 1976.— 72, N 2.— P. 248—254.
14. Rochrman G. F. Polyhedrin structure // *J. Gen. Virol.*— 1986.— 67, N 5.— 1499—1513.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 13.11.89