

家蚕核型多角体病毒 *orf90* 基因在 Bac-to-Bac 家蚕杆状病毒系统中快速表达

王 强, 陈克平, 郭忠建, 姚 勤, 王海燕, 陈慧卿

(江苏大学生命科学研究院, 江苏镇江 212013)

摘要: 【目的】利用 BmNPV 的 Bac-to-Bac 系统快速表达目的基因 *orf90*, 为深入研究该基因打下基础。【方法】将目的基因 BmNPV *orf90* 克隆到转移载体 pFasBacHTb 上, 并将报告基因 *egfp* 插入到 *orf90* 的 3' 末端, 形成重组转移载体 pFasBacHTb-*egfp*-90。在将其转化到含穿梭载体 bacmid 的感受态细胞 DH10Bac 中, 通过转座作用, 经白斑筛选得到重组穿梭载体。纯化 DNA, 用脂质体介导转染家蚕 BmN 细胞, 得到重组病毒 bacmid-*egfp*-90。【结果】转染细胞 72 h 后在荧光显微镜下可以观察到强烈的绿色荧光。重组病毒穿刺接种家蚕蛹, 5 d 后观察到很强的荧光。结果表明构建的 Bac-to-Bac 系统能在家蚕细胞和蛹体中正确的快速表达外源基因。【结论】证明 BmNPV 的 Bac-to-Bac 是一个快速表达系统, 适合在家蚕上广泛应用。

关键词: BmNPV Bac-to-Bac 表达系统; *orf90*; *egfp* 基因

Rapid Expression *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus *orf90* Gene in Bac-to-Bac/BmNPV Baculovirus Expression System

WANG Qiang, CHEN Ke-ping, GUO Zhong-jian, YAO Qin, WANG Hai-yan, CHEN Hui-qing

(Institute of Life Science, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu)

Abstract: 【Objective】Present studies describe the rapid expression *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus *orf90* in Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system, which will provide basic information for deeply studying this gene. 【Method】The interest gene of BmNPV *orf90* was cloned into a transfer vector pFasBacHTb and the report gene of *egfp* was inserted into downstream of *orf90* to form the recombinant donor plasmid pFasBacHTb-*egfp*-90. The transfer vector was transformed into DH10Bac competent cell which contain the BmNPV bacmid. A recombinant shuttle vector was constructed by site-specific transposition and the colonies containing recombinant bacmid were collected by white selection. The cultured BmN cells were transfected with recombinant bacmid DNA mediating with Lipofectin and the pure recombinant baculovirus bacmid-*egfp*-90 was obtained. 【Result】The intensive green fluorescence was observed both in transfected BmN cells after 72 h and injected silkworm pupae after 5 d. The results indicated that the Bac-to-Bac/ BmNPV expression system could effectively express foreign gene. 【Conclusion】This method showed that Bac-to-Bac/ BmNPV could be a rapid expression system, which would be widely used in silkworm.

Key words: BmNPV Bac-to-Bac expression system; *orf90*; *egfp*

0 引言

【研究意义】杆状病毒表达系统 (baculovirus expression vector system, BEVS) 是 1983 年由 Smith

等^[1]发展起来的真核表达系统。该系统具有安全性高、加工和修饰表达产物、可以同时表达多个外源基因、适合表达细胞毒性蛋白等特点^[2]。已成为当今基因工程领域 4 大表达系统之一。而家蚕杆状病毒表达系统

收稿日期: 2007-02-01; 接受日期: 2007-03-21

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划, 2005CB121000), 江苏大学高级人才基金 (1283000169)

作者简介: 王 强 (1982-), 男, 安徽泾县人, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学。Tel: 0511-88791702; E-mail: flashwq@hotmail.com。通讯作者陈克平 (1960-), 男, 安徽无为, 教授, 研究方向为家蚕分子生物学。Tel: 0511-88791923; Fax: 0511-88791923; E-mail: kpchen@ujs.edu.cn

具有其它杆状病毒表达系统无法比拟的优势。本文利用该系统表达家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV) *orf90* 基因, 为构建适合 BmNPV 的 Bac-to-Bac 系统提供依据, 为研究 BmNPV *orf90* 基因与寄主间相互关系奠定基础。【前人研究进展】成功的杆状病毒表达系统目前主要有苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 和 BmNPV^[3]。传统重组杆状病毒的构建通常分为两个步骤: 表达的外源基因首先插入到较小转移载体的多克隆位点上, 再与病毒基因组 DNA 共转染昆虫细胞, 通过同源交换获得重组病毒。但重组率仅为 0.1%~10.0%, 常常需要多轮的空斑筛选得到重组病毒, 操作复杂、耗时也易出现假阳性。鉴定与纯化重组病毒就得花费一个多月的时间。1993 年 Luckow 等^[4]构建一种高效、快速的昆虫杆状病毒表达系统 (Bac-to-Bac 系统)。该系统由供体质粒 (donor plasmid) 和大肠杆菌 DH10Bac 组成, DH10Bac 中包括 bacmid 和辅助质粒 (helper plasmid)。Bacmid 在大肠杆菌中是一个质粒, 可以低拷贝复制, 在昆虫细胞中是一个病毒, 可以复制、表达、装配子代病毒。这样产生重组病毒全部操作都在大肠杆菌中进行。该系统重组率达到 100%, 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。家蚕虫体是一个天然的生物反应器, 具有易于饲养、表达量、成本低廉和安全性好等特点, 已有多蛋白在家蚕中得到高效表达^[5~7]。但由于 AcMNPV 寄主的特异性而不感染家蚕, 从而限制了该系统的在 BmNPV 上的应用。最近 Motohashi 等构建了 BmNPV bacmid^[8], 使利用该 bacmid 来构建适用于 BmNPV 的 Bac-to-Bac 系统成为可能。【本研究切入点】在已测序完成的 29 种杆状病毒中都发现了与 BmNPV *orf90* 同源的基因^[9], 一般认为这类保守基因与病毒的复制及包装有关^[10~12]。利用 BmNPV 的 Bac-to-Bac 系统来表达 BmNPV 基因的研究尚未见报道。【拟解决的关键问题】本文以 *egfp* 作为报告基因, 利用 BmNPV 的 Bac-to-Bac 系统在家蚕细胞和蚕蛹中快速表达目的基因 *orf90*。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞系 含 BmNPV bacmid 的大肠杆菌 BmDH10Bac 由日本 Shizuoka 大学 Park 教授惠赠。pFasBacHTb 由浙江大学张传溪教授赠送, 质粒

pEGFP-N1、大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。

1.1.2 试剂 各种限制性内切酶、pMD18-T 载体、胶回收试剂盒、T4 连接酶、高保真 DNA Taq 酶均购自 TaKaRa 公司。脂质体、胎牛血清为 Invitrogen 公司产品。昆虫细胞培养基 TC-100、胎牛血清为 Sigma 公司产品, 鼠抗 6 \times His 单克隆抗体为 Novagen 公司产品, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠的二抗为华美公司产品。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 *orf90* 和 *egfp* 引物的设计和 PCR 扩增 扩增 *orf90* 基因的引物为 90-F: 5'-AGGATCCATGCACGACGGTCGCGTT-3'; 90-R: 5'-GCTCGAGCAAAGTTTTGTATTT-3', 该引物对分别含有 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点 (下划线标注)。模板为 BmNPV 的基因组。扩增 *egfp* 的引物为: EGFP-F: 5'-ACTCGAGATGGTGAGCAAGGGCG-3'; EGFP-R: 5'-A AAGCTT TTA CTT GTA CAG CTC GTC-3' 引物设计分别引入 *Xho* I 和 *Hind*III 酶切位点 (下划线标注)。PCR 扩增的模板为质粒 pEGFP-N1。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性后进入循环, 循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物并用胶回收试剂盒纯化。分别将纯化的 PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体上。

1.2.2 重组转移载体 pFasBacHTb-*egfp*-90 的构建 将 *egfp* 从 pMD18-T 载体上用 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切, 凝胶电泳回收目的片段, 与用相同酶切的供体质粒 pFasBacHTb 连接, 形成 pFasBacHTb-*egfp* 质粒。同样将 *orf90* 基因从 pMD18-T 载体上用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切后胶回收目的片段, 再与用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的 pFasBacHTb-*egfp* 质粒连接, 最终形成重组转移载体 pFasBacHTb-*egfp*-90。分别用 PCR 扩增和双酶切的方法对重组转移载体进一步验证 *orf90* 和 *egfp* 基因插入 pFasBacHTb 质粒的正确性。

1.2.3 重组家蚕杆状病毒 bacmid-*egfp*-90 的构建 提取重组转移质粒 pFasBacHTb-*egfp*-90 后转化大肠杆菌 BmDH10Bac (含 BmNPV 的 bacmid 和辅助质粒) 感受态细胞, 涂布于含四环素 (10 μ g \cdot ml $^{-1}$)、卡那霉素 (50 μ g \cdot ml $^{-1}$)、庆大霉素 (7 μ g \cdot ml $^{-1}$)、IPTG (40 μ g \cdot ml $^{-1}$)、X-gal (100 μ g \cdot ml $^{-1}$) 的 LB 琼脂平板上。发生转座作用的 bacmid 由于 *lacZ* 基因被插入失活, 使得带有重组 bacmid 的菌落生长为白色, 同时通过转

移载体上的小 Tn7 元素可以将 *orf90* 和 *egfp* 基因转座到 bacmid 上的 attTn7 靶位点 (图 3-A)。挑取白色菌落用碱裂解法提取重组 bacmid 基因组 DNA, 取蓝色菌落作为阴性对照。用 pUC/M13 引物进行 PCR 鉴定插入序列的大小以筛选目的重组病毒 bacmid。PCR 扩增条件为: 94°C 5 min 预变性, 循环参数为: 94°C 45s, 57°C 45s, 72°C 4 min, 35 个循环后 72°C 延伸 10 min。

1.2.4 重组 bacmid 在家蚕 BmN 细胞、蛹中表达 提取重组 bacmid DNA, 按照 Invitrogen 公司脂质体转染说明书转染 BmN 细胞, 27°C 培养 3~4 d, 在荧光倒置显微镜 (Leica DMIRB) 下观察荧光。同时以野生型 bacmid 转染的 BmN 细胞作对照, 在可见光下拍照。收取病毒感染的细胞上清于 4°C 保存。沉淀经 3 000 r/min 离心 5 min 后弃上清, 用 1×PBS (pH 7.4) 缓冲液洗涤 1~2 次。按 100 μl PBS 缓冲液/ml 感染液悬浮细胞后, 弃上清加入等体积 2×SDS 上样缓冲液煮沸 5 min, 12 000 g 离心 10 min 收集上清, 蛋白-20°C 保存备用。

用含有卡那霉素 (50 μg·ml⁻¹)、庆大霉素 (7 μg·ml⁻¹) 的重组病毒悬浮液穿刺接种蛹龄 2~3 d 的家蚕蛹, 病毒滴度 10⁶pfu。接种后 4~6 d, 在研究级体视荧光显微镜下观察荧光 (Olympus 公司; 型号 SZX12)。以野生型 bacmid 接种的蛹为对照, 在可见光下拍照。

1.2.5 表达产物的 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析 取上述蛋白样品 15 μl, 进行 SDS-PAGE 电泳, 其中分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 5%。以野生型 bacmid 转染的 BmN 细胞作阴性对照。

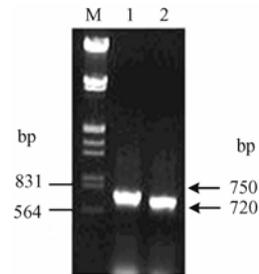
家蚕细胞中表达的蛋白电泳后, 将样品电转移至硝酸纤维膜上, 分别以鼠抗-His 为一抗, 山羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗进行反应, 在 DAB 和 H₂O₂ 的显色液中显色。再置于水中终止显色反应, 晾干后拍照。

2 结果与分析

2.1 重组转移载体 pFasBacHTb-*egfp*-90 的获得

BmNPV *orf90* 基因长 747 bp, 位于 BmNPV 基因组 T3 株的 86 702~87 449 bp 处, 蛋白预测分子量约为 28.9 kD^[13]。而 *egfp* 基因长 720 bp, 蛋白预测分子量为 26.9 kD。以 pEGFP-N1 质粒为模板 PCR 扩增出大小约为 720 bp *egfp*; 以 BmNPV 的基因组为模板, PCR 扩增出大小约为 750 bp 的 *orf90* 全基因 (图 1)。将它们分别克隆到 pFasBacHTb 载体上, 重组载体经双酶切和 PCR 鉴定, *orf90* 和 *egfp* 成功地克隆到

pFasBacHTb 载体中, 并最终获得了重组转移载体 pFasBacHTb-*egfp*-90。该转移载体中目的基因 *orf90* 定向克隆到多角体强启动子下游, 其中 *egfp* 位于 *orf90* 的 C 末端。N 端带有 6×His Tag, 能够进行融合表达。



M: DNA maker; 1: *orf90* 基因; 2: *egfp* 基因
M: Molecular maker; 1: *orf90* gene; 2: *egfp* gene

图 1 *orf90* 和 *egfp* 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR products of *orf90* and *egfp* genes

2.2 重组家蚕杆状病毒 bacmid-*egfp*-90 的检测

将重组转移载体转化到含有 bacmid 和辅助质粒的感受态细菌 BmDH10Bac, 在四环素、卡那霉素、庆大霉素、IPTG、X-gal 的 LB 琼脂平板上获得多个白色菌落 (图 2)。挑取白斑, 提取重组 bacmid 基因组 DNA, 用 pUC/M13 引物进行 PCR 鉴定。发生重组 bacmid 的 PCR 产物大小应该为 2 430 bp 加上外源插入片段的大小 (图 3-A)。电泳检测得到大小约为 3.9 kb 的目的带, 而没有发生转座的 bacmid 对照 PCR 产物的大小约为 300 bp 左右 (图 3-B)。这与预计的大小相一致, 说明外源基因 *orf90* 和 *egfp* 已经和 bacmid 发生了重组, 获得了重组病毒命名为 bacmid-*egfp*-90。

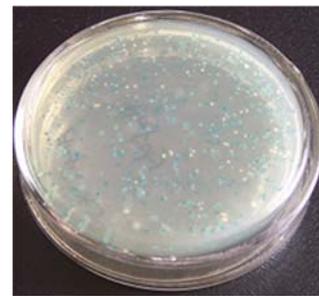
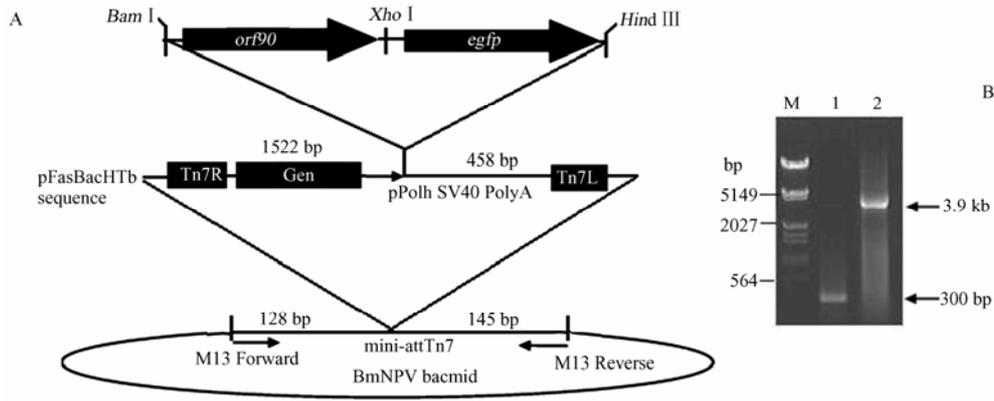


图 2 重组病毒的蓝白斑筛选 (白斑含有重组病毒)

Fig. 2 Blue/white colonies screening for recombinant baculovirus (white colonies contained the recombinant bacmid)



A: 重组病毒的构建; B: PCR 鉴定 M: Molecular maker; 1: 300 bp PCR 产物; 2: 3.9 kb PCR 产物
 A: Construction of recombinant baculovirus; B: PCR analysis M: DNA maker; 1: 300 bp PCR product of wild-type bacmid; 2: 3.9 kb PCR product of recombinant bacmid

图 3 重组病毒的构建及 PCR 鉴定

Fig. 3 Construction of recombinant baculovirus and identified by PCR

2.3 目的基因在家蚕 BmN 细胞和蚕蛹中表达

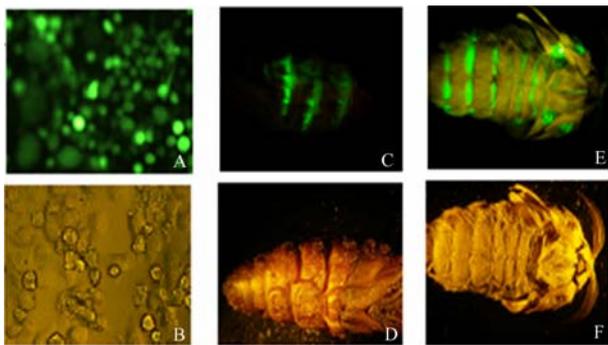
重组病毒 bacmid-*egfp-90* 转染家蚕 BmN 细胞 72 h 后, 出现病毒感染症状。细胞局部由梭形变成圆形状, 核仁增大, 细胞离壁悬浮, 在荧光显微镜下可以观察到转染细胞发出绿色荧光(图 4-A)。而野生型 bacmid 感染的家蚕细胞则没有绿色荧光(图 4-B)。

重组病毒 bacmid-*egfp-90* 接种家蚕蛹 5 d 后, 出现 BmNPV 感染蚕蛹的典型症状, 即病蛹体色暗褐, 蛹体松软, 体壁易破, 一经震动即流出浓汁。在体视荧光显微镜下观察很强的荧光, 部分蛹羽化为成虫,

也出现很强烈的荧光(图 4-C、E)。而野生型 bacmid 接种的蛹在体视荧光显微镜下则没有绿色荧光(图 4-D、F)。说明外源基因 *orf90* 在蛹中得到成功的表达。

2.4 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测

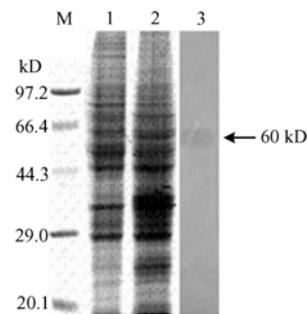
重组病毒转染 BmN 细胞 72 h 后, 提取细胞总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析。结果表明, 在约 60 kD 左右出现特异性表达条带, 这是因为约 28.9 kD 的 ORF90 的 C 端连上了 26.9 kD 的 EGFP, 而 N 端连接了 28 个氨基酸残基(包括 6 个 His, 分子量约为 3.6 kD)。三者表达的融合蛋白分子量应该约为 60 kD, 与预计的分子量相同, 而不含外源基因的 bacmid 转染的细胞中则没有此带(图 5)。



A: 家蚕细胞中的绿色荧光; C、E: 家蚕蛹中的绿色荧光; B、D、F: 可见光下的对照
 A: Green fluorescence in BmN cells; C, E: Green fluorescence in silkworm pupae; B, D, F: Control in visible light

图 4 家蚕细胞和蛹中绿色荧光的观察

Fig. 4 Observation of green fluorescence both in BmN cells and silkworm pupae



M: 蛋白质分子量 maker; 1: bacmid 感染的 BmN 细胞; 2: 重组病毒感染的 BmN 细胞; 3: Western blot 分析
 M: Portein molecular marker; 1: BmN cells infected bacmid; 2: BmN cells infected recombinant baculovirus; 3: Western blot analysis

图 5 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

Fig. 5 SDS-PAGE and Western blot analysis

用鼠抗 His 单克隆抗体进行 Western blot 分析,结果表明在分子量约为 60 kD 的位置出现一明显条带,证明表达产物为 6×His 融合蛋白,说明 *orf90* 基因在家蚕细胞中表达成功。

3 讨论

Bac-to-Bac 系统是一种新颖的快速杆状病毒表达系统,在 AcMNPV 中已得到了广泛的应用,目前已有多种蛋白在该系统中得到了表达^[14-16]。但由于 BmNPV 和 AcMNPV 各自寄主的特异性,限制了该系统在 BmNPV 上的应用。虽然有构建杂交型重组杆状病毒 (hybrid baculovirus) 的报道^[17-19],这种杂交重组病毒具既能感染所有 AcNPV 的寄主,又可以在家蚕细胞及虫体中表达。但 these 方法中仍然需要一系列的分离和纯化步骤来得到重组病毒,并且这种杂交型杆状病毒对家蚕细胞感染效率低^[3,6,20]。在 Bac-to-Bac 系统中,其特异性主要集中在 bacmid 上,而转移载体没有特异性^[21]。在本试验中目的基因 *orf90* 在家蚕细胞及蚕蛹中成功的表达,说明了转移载体 pFasBacHTb 的通用性。

本文中分子量约为 26.9 kD 报告基因 *egfp* 融合在 *orf90* 的 C 末端,方便目的基因的检测。重组病毒感染的 BmN 细胞在 2~3 d 内,便可以直接通过绿色荧光的有无来判断转染的成功与否及目的基因是否表达。所用的 pFastBacHTb 载体的多角体启动子下游带有 ATG 起始密码子、6×His tag、多克隆位点及凝血酶识别位点,因此可以表达出带 His-Tag 的融合蛋白,方便表达后的蛋白通过 His-Tag 达到分离和纯化。通过该系统,一旦构建好重组供体质粒,7~10 d 即可得到重组病毒产物,完成目的蛋白的表达。

4 结论

本文中目的基因 *orf90* 在转染家蚕细胞后,通过观察到绿色荧光判断 *orf90* 得到了正确表达。SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测进一步说明了该结果的可靠性。将重组的病毒穿刺接种家蚕蛹,蚕蛹在感染 4~6 d 内,同样可观察到很强烈的绿色荧光,说明目的基因 *orf90* 在家蚕蛹中得到了正确的表达。

通过 BmNPV 的 Bac-to-Bac 系统外源基因在家蚕细胞和蛹中快速表达,证明 BmNPV 的 Bac-to-Bac 是一个快速表达系统。

References

[1] Smith G E, Summers M D, Fraser M J. Production of human beta

interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1983, 3(12): 2156-2165.

- [2] Possee R D. Baculoviruses as expression vectors. *Current Opinion in Biotechnology*, 1997, 8(5): 569-572.
- [3] Deo V K, Hiyoshi M, Park E Y. Construction of hybrid *Autographa californica* nuclear polyhedrosis bacmid by modification of p143 helicase. *Journal of Virological Methods*, 2006, 134(1-2): 212-216.
- [4] Luckow V A, Lee S C, Barry G F, Olins P O. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 1993, 67(8): 4566-4579.
- [5] Chen J, Wu X F, Zhang Y Z. Expression, purification and characterization of human GM-CSF using silkworm pupae (*Bombyx mori*) as a bioreactor. *Journal of Biotechnology*, 2006, 123 (2): 236-247.
- [6] Muneta Y, Nagaya H, Minagawa Y, Enomoto C, Matsumoto S, Mori Y. Expression and one-step purification of bovine interleukin-21 (IL-21) in silkworms using a hybrid baculovirus expression system. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(18): 1453-1458.
- [7] Zhu J, Ze Y, Zhang C, Zang Y, Lu H, Chu P, Sun M, Qin J. High-level expression of recombinant human paraoxonase 1 Q in silkworm larvae (*Bombyx mori*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 72 (1): 103-108.
- [8] Motohashi T, Shimojima T, Fukagawa T, Maenaka K, Park E Y. Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 326 (3): 564-569.
- [9] Jehle J A, Blissard G W, Bonning B C. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of Virology*, 2006, 151(7): 1257-1266.
- [10] Davison A J, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. *Journal of General Virology*, 2003, 84(11): 2895-2908.
- [11] Gubser C, Hue S, Kellam P, Smith G L. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *Journal of General Virology*, 2004, 85(1): 105-117.
- [12] Shackelton L A, Holmes E C. The evolution of large DNA viruses: combining genomic information of viruses and their hosts. *Trends in Microbiology*, 2004, 12 (10): 458-465.
- [13] Gomi S, Majima K, Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, 1999, 80 (5): 1323-1337.

- [14] 耿朝晖, 郜 鹏, 刘 莹, 赵东明, 张宝珠, 俞新大, 李建民. 用 Bac-to-Bac 杆状病毒系统表达人生长激素. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(1): 59-63.
- Geng Z H, Gao P, Liu Y, Zhao D M, Zhang B Z, Yu X D, Li J M. Expression of human growth hormone gene in Bac-to-Bac baculovirus system. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 18 (1): 59-63. (in Chinese)
- [15] 樊惠英, 陈焕春, 佟铁铸, 璐春梅, 吕建强, 黄红亮. 猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因在昆虫细胞中的表达及其特性. 生物工程学报, 2005, 21(6): 975-978.
- Fan H Y, Chen H C, Tong T Z, Ju C M, Lv J Q, Huang H Q. The Expression of porcine circovirus type 2 ORF2 gene in insect cells and its character. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, 21(6): 975-978. (in Chinese)
- [16] 沈立荣, 邢丽苹, 张传溪, 程家安. 意大利蜜蜂毒磷脂酶 A2 基因在杆状病毒-昆虫细胞系统的表达. 昆虫学报, 2006, 49(3): 367-372.
- Shen L R, Xing L P, Zhang C X, Cheng J A. Expression of phospholipase A2 gene from the venom of *Apis mellifera* in the baculovirus-insect cell system. *Acta Entomologica Sinica*, 2006, 49 (3): 367-372. (in Chinese)
- [17] Kondo A, Maeda S. Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*, 1991, 65(7): 3625-3632.
- [18] Croizier G, Croizier L, Argaud O, Poudevigne D. Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1994, 91(1): 48-52.
- [19] Wu X F, Cao C P, Xu Y X, Lu X M. Construction of a host range-expanded hybrid baculovirus of BmNPV and AcNPV, and knockout of cysteinase gene for more efficient expression. *Science in China Series C-Life Sciences*, 2004, 47(5): 406-415.
- [20] Muneta Y, Zhao H K, Inumaru S, Mori Y. Large-scale production of porcine mature interleukin-18 (IL-18) in silkworms using a hybrid baculovirus expression system. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2003, 65(2): 219-223.
- [21] 邓小昭, 朱 应, 刁振宇, 齐义鹏, 周宗安. 一种新型家蚕核多角体病毒 Bac to Bac 系统的构建. 微生物学报, 2000, 40(2): 155-160.
- Deng X Z, Zhu Y, Diao Z Y, Qi Y P, Zhou Z A. Construction of a novel BmNPV Bac to Bac system. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(2): 155-160. (in Chinese)

(责任编辑 赵利辉, 毕京翠)