

© Л. И. Строковская, О. В. Веселовский,
И. М. Кихно, Н. Ю. Мирюта, 1990

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА ПОЛИЭДРИНА ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА КОЛЬЧАТОГО ШЕЛКОПРЯДА

Настоящее исследование — первый этап конструирования бакуловирального экспрессионного вектора на основе вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) кольчатого шелкопряда (КШ). Локализован ген полиэдрина в геноме ВЯП КШ. Сконструирована рекомбинантная плазмида, содержащая вирусный фрагмент, включающий ген полиэдрина с прилегающими участками ДНК. Данная плазмида может быть использована в качестве основы для создания транспортного вектора.

Введение. В последние годы бакуловirusы нашли практическое применение в качестве экспрессионного эукариотического вектора [1]. В настоящее время с их помощью получены следующие продукты: α - и β -интерфероны человека, *c-tus* белок, интерлейкин-2 человека, интерлейкин-3 мыши, интерлейкин-4 мыши и человека, оболочечные белки вируса СПИД и др. [1, 2], для чего были использованы векторы на основе ВЯП калифорнийской совки [3] и ВЯП тутового шелкопряда [4].

Нами ранее [5] была подобрана высокопродуктивная бакуловиральная система на основе ВЯП КШ и культуры клеток табачной совки, что является предпосылкой для создания отечественного бакуловирального экспрессионного вектора. Данная работа — начальный этап конструирования вектора на основе ВЯП КШ. Цель ее заключается в локализации гена полиэдрина на геноме вируса, получение и картирование плазмиды, содержащей ген полиэдрина с прилегающими участками вирусной ДНК.

Материалы и методы. Вирионные ДНК ВЯП КШ штамма *W1* и ВЯП большой волняной моли (БВМ) штамма *M1* получены по описанным ранее методам [5, 6].

Выделение препаратов плазмидных ДНК, обработка ДНК рестриктазами, клонирование фрагментов ДНК ВЯП в плазмидах *pBR325* и *pUC18*, получение высокоочищенных 32 P-ДНК и блот-гибридизацию проводили в соответствии с руководством Маннингса и соавт. [7]. Фрагменты ДНК из геля получали электрофоретическим переносом на бумагу DE-81 с последующей их экстракцией [8].

Результаты и обсуждение. Электрофореграмма ДНК ВЯП КШ штамма *W1*, обработанной различными рестриктазами, представлена на рис. 1.

Для локализации гена полиэдрина на вирусной ДНК были использованы данные, показывающие, что примерно 75% последовательностей гена полиэдрина различных бакуловirusов консервативны [9].

В данной работе в качестве зонда для выявления гена полиэдрина в геноме ВЯП КШ была использована полученная в лаборатории Рормана (США) плазмида *pOMS-Q* [8], содержащая ген полиэдрина из ВЯП волнянки псевдотуговой (ВП). Для гибридизации использованы как вся плазмида, так и вирусный фрагмент *Q*, вырезанный из плазмиды рестриктазой *Sall*. Размер этого фрагмента составляет 2,5 г. н. н. Блот-гибридизацией рестрицированной ДНК ВЯП КШ с 32 P-*pOMS-Q* (или с 32 P-*Q*-фрагментом) были выявлены 5 *EcoRI*-, 5 *HindIII*-, 4 *BamHI*-, 3 *Sall*-фрагмента вирусной ДНК, гибридизующихся с зондом (рис. 2). Исходя из этих данных можно было бы предположить, что в геноме ВЯП КШ присутствует несколько копий гена полиэдрина. Но рядом авторов доказано, что ген полиэдрина присутствует в единичной копии и в строго специфическом месте [9]. Поэтому мы предположили, что наличие такого большого количества гибридизующихся фрагментов можно объяснить гомологией прилегающих к гену полиэд-

рина участков ДНК ВЯП ВП и ДНК ВЯП КШ. Известно, что геномы некоторых бакуловирусов имеют высокую степень гомологии [10]. Как было показано в нашей лаборатории, ДНК ВЯП КШ имеет всего 5% гомологии с ДНК ВЯП БВМ. Поэтому для выявления гена полиэдрина в геноме ВЯП КШ решено было использовать ген полиэдрина ВЯП БВМ. Фрагмент ДНК, содержащий ген полиэдрина ВЯП БВМ, определяли при помощи блот-гибридизации рестрицированной ДНК ВЯП БВМ с ^{32}P -Q-фрагментом плазмиды *pOMS-Q* (рис. 3). Наименьший по размеру гибридизующийся фрагмент *HindIII-R* (1 т. п. н.) кло-

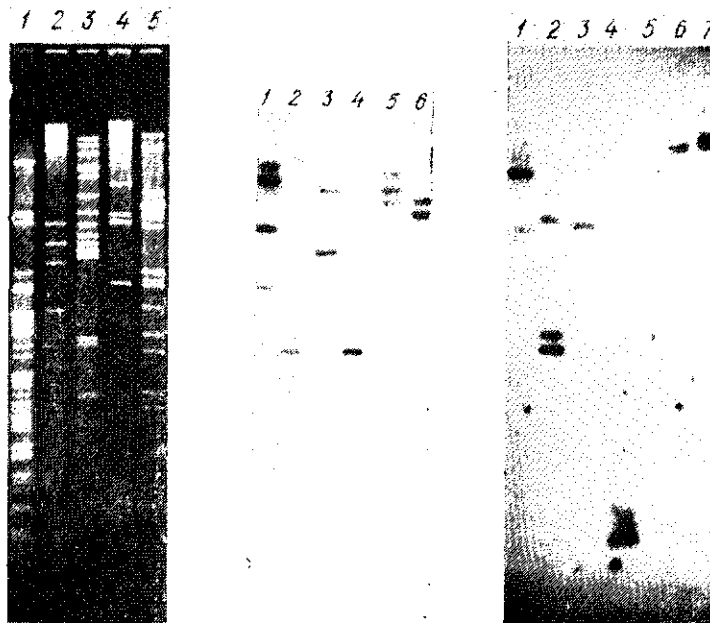


Рис. 1. Рестрикционный анализ ДНК ВЯП КШ, обработанной рестриктазами: *SalI* (1); *KpnI* (2); *HindIII* (3); *BamHI* (4); *EcoRI* (5)

Fig. 1. Restriction endonuclease analysis of the *Malakosoma neustria* NPV DNA cleaved by: *SalI* (1); *KpnI* (2); *HindIII* (3); *BamHI* (4); *EcoRI* (5)

Рис. 2. Гибридизация по Саузерну ^{32}P -*pOMS-Q* с ДНК ВЯП КШ, расщепленной рестриктазами: *BamHI* (1); *SalI* (2); *EcoRI* (3); *XhoI* (4); *PstI* (5); *HindIII* (6)

Fig. 2. Southern hybridization of ^{32}P -labelled *pOMS-Q* with *Malakosoma neustria* NPV DNA cleaved by: *BamHI* (1); *SalI* (2); *EcoRI* (3); *XhoI* (4); *PstI* (5); *HindIII* (6)

Рис. 3. Гибридизация по Саузерну ^{32}P -*pOMS-Q* с ДНК ВЯП БВМ, расщепленной рестриктазами: *SalI* (1); *SalI* (2); *EcoRI* (3); *HindIII* (4); *PstI* (5); *BamHI* (6); *SmaI* (7)

Fig. 3. Southern hybridization of ^{32}P -labelled *pOMS-Q* with *Galleria mellonella* NPV DNA cleaved by: *SalI* (1); *SalI* (2); *EcoRI* (3); *HindIII* (4); *PstI* (5); *BamHI* (6); *SmaI* (7)

нирован в плазмиде *pBR325*. Эта плаزمида *pGH-R* была использована в качестве зонда для выявления гена полиэдрина в геноме ВЯП КШ.

При блот-гибридизации рестрицированной ДНК ВЯП КШ с ^{32}P -*pGH-R* было обнаружено, что *R*-фрагмент гибридизуется с фрагментами *EcoRI-A* (18,2 т. п. н.), *BamHI-D* (8,9 т. п. н.), *HindIII-J* (4,9 т. п. н.) (рис. 4). Эти фрагменты были клонированы в *pBR325*. При картировании полученных плазмид выявлено, что ген полиэдрина в *BamHI-D* и *HindIII-J*-фрагментах расположен на одном из флангов, что является препятствием для создания транспортного вектора. В плазмиде *pME-A*, содержащей *EcoRI-A*-фрагмент, ген полиэдрина локализован в центральной области фрагмента, содержащей сайты для рестриктаз *BamHI*, *KpnI*, *HindIII* (рис. 4, 5).

Плазмида *pME-A* имеет большой размер — 24,2 т. п. н., кроме того, содержит дополнительные сайты для ферментов, рестрицирующих ген полиэдрина. Поэтому ее обработали ферментами *EcoRI* и *PstI*, вырезали фрагмент 9,3 т. п. н. и встроили последний в плазмиду *pUC18*. Расположение гена полиэдрина в центре фрагмента и наличие приле-

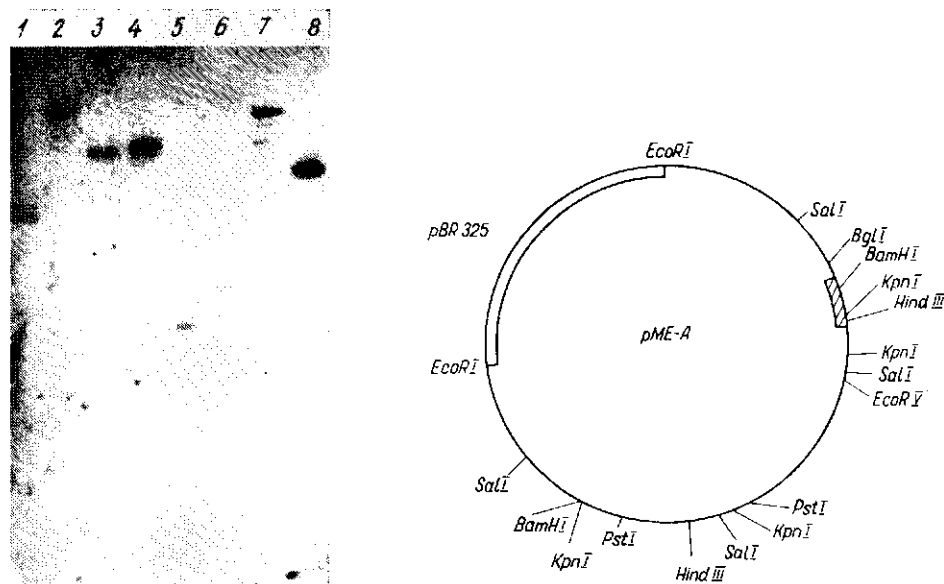


Рис. 4. Гибридизация по Саузерну ^{32}P -*pGH-R* с ДНК ВЯП КШ, расщепленной рестриктазами: *BamHI* (1); *SalI* (2); *PstI* (3); *EcoRI* (4); *HindIII* (5); *KpnI* (6); *SmaI* (7); *EcoRV* (8)

Fig. 4. Southern hybridization of ^{32}P -labelled *pGH-R* with *Malakosoma neustria* NPV DNA cleaved by: *BamHI* (1); *SalI* (2); *PstI* (3); *EcoRI* (4); *HindIII* (5); *KpnI* (6); *SmaI* (7); *EcoRV* (8)

Рис. 5. Рестрикционная карта рекомбинантной плазмиды *pME-A*, содержащей *pBR-325* и *EcoRI-A*-фрагмент ДНК ВЯП КШ размером 18,2 т. п. н.

Fig. 5. Restriction map of recombinant plasmid *pME-A* containing plasmid *pBR325* and 18.2 kb *EcoRI-A*-fragment of *Malakosoma neustria* NPV DNA

гающих вирусных фрагментов, необходимых для гомологической рекомбинации при создании экспрессивного вектора, позволяют использовать данную плазмиду в качестве основы для конструирования транспортного вектора.

CLONING OF THE MALAKOSOMA NEUSTRIA NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS POLYHEDRIN GENE

L. I. Strohovskaya, O. V. Veselovsky, I. M. Kikhno, N. Yu. Mirjuta

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

Summary

This investigation is the first step of baculovirus expressive vector construction using the *Malakosoma neustria* nuclear polyhedrosis virus (MnNPV). The polyhedrin gene has been localized in the MnNPV genome. Recombinant plasmid has been constructed carrying a viral DNA fragment containing a polyhedrin gene with flanking DNA nucleotide sequences. This plasmid can be used for the transfer vector construction.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luscow V. A., Summers M. D. Trends in the development of baculovirus expression vectors // *Biotechnology*.— 1988.— 6, N 1.— P. 47—55.
2. Functional studies on the *p10* gene of *Autographa californica* NPV using a recombinant expression a *p10*-beta-galactosidase fusion gene // J. M. Viak, F. A. Klinkenberg, K. J. M. Zaai et al. // *J. Gen. Virol.*— 1988.— 9, N 4.— P. 765—776.

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. П., Строковская Л. И. Молекулярные основы репродукции бакуловирусов.— Киев : Наук. думка, 1980.— 175 с.
6. Структура и функционирование генома вируса ядерного полиэдроза кольчатого шелкопряда / И. П. Скуратовская, Л. И. Строковская, С. В. Комиссаренко, Н. 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. Rohrman, D. I. Leisy, K.-C. Chow et al. // *Virology*.— 1982. — 121, N 1.— P. 51—60.
9. Rohrman 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.

На т. молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 21.09.89

УДК 578.811:577.21

© Л. И. Строковская, И. М. Кихно, О. В. Веселовский,
И. П. 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 рамку 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. Синтез 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 плазмиды *pBR325* и *pUC18* (плазмиды *pME1* и *pMPEL*) [4].

В настоящей работе приведены данные по конструированию транспортно-го 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 МСАр-1 [5]. Процедура получения бляшек при окрашивании нейтральным красным, а также получение голубых бляшек в присутствии β -галактозидазного индикатора 5-бром-4-хлор-3-индолл- β -D-галактопиранозид (X-gal) для выявления экспрессии β -галактозидазы описаны в [6].