



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102242147 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 21

(21) 申请号 201110123586. 7

(22) 申请日 2011. 05. 13

(73) 专利权人 浙江同点生物科技有限公司

地址 310018 浙江省杭州市江干区杭州经济
技术开发区 10 号大街 266 号 7 幢 2 层

专利权人 浙江大学

(72) 发明人 周继勇 钟伯雄 颜焰 危浩

阮系真 庄兰芳 郑育良

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务有限公
司 33200

代理人 林怀禹

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006. 01)

审查员 李娟娟

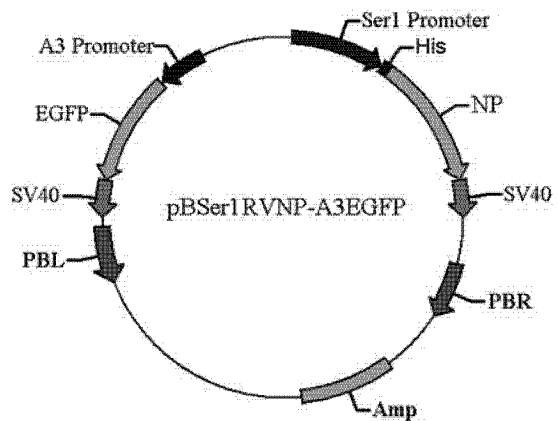
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

家蚕中部丝腺细胞合成分泌狂犬病病毒核蛋白的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种家蚕中部丝腺细胞合成分泌狂犬病病毒核蛋白的方法。先构建家蚕合成分泌狂犬病病毒核蛋白 RVNP 的载体 pBSer1RVNP-A3EGFP 质粒,再利用显微注射转基因家蚕技术将这种质粒与能够提供转座酶的辅助质粒一起导入到家蚕突变品种丝胶蚕已解除滞育的受精卵内,依靠 piggyBac 转座子的转座特性,使绿色荧光蛋白基因和狂犬病病毒核蛋白基因导入到丝胶蚕的基因组内,并得到稳定遗传和表达,从而创制成一种能够在家蚕中部丝腺细胞特异性合成分泌狂犬病病毒核蛋白的转基因家蚕。



1. 一种家蚕中部丝腺细胞合成分泌狂犬病病毒核蛋白的方法,其特征在于该方法的步骤如下:

(1) 采用分子生物学技术构建家蚕合成分泌狂犬病病毒核蛋白的载体 pBSer1RVNP-A3EGFP 质粒;

所述的 pBSer1RVNP-A3EGFP 质粒是以 piggyBac 转座质粒为基础,质粒带有 Amp 抗性基因以用于质粒的扩增和筛选,包含 piggyBac 转座子的 2 个转座臂 PBL 和 PBR,包含 2 个功能表达框,一个是 A3 启动子启动的绿色荧光蛋白基因表达框 A3 Promoter+EGFP+SV40,以用作转基因阳性家蚕的筛选标志,另一个是家蚕丝胶蛋白 1 启动子、带有便于提纯外源蛋白的 His 接头以及狂犬病病毒核蛋白基因的表达式 Ser1 Promoter +His+ RVNP +SV40,以表达狂犬病病毒核蛋白,辅助质粒包含 Amp 抗性基因、piggyBac 转座子的 1 个转座臂 PBR、A3 启动子启动的转座酶 trans 基因表达框 A3 Promoter+ trans,以提供转座酶;

(2) 采用显微注射转基因家蚕方法将 pBSer1RVNP-A3EGFP 质粒及能够提供转座酶 trans 的辅助质粒导入家蚕已解除滞育的受精卵内,蚕卵孵化后饲养至成虫,自交续代为 G1 代,在 G1 代转基因家蚕的小蚕期,通过荧光体视显微镜观察选择表达 EGFP 标志基因的转基因家蚕,饲养至成虫自交续代为 G2 代, G2 代以后均采用蛾区育,成虫自交续代,再经 1-3 代选种,每代采用转基因昆虫荧光基因表达相对量无损伤测定方法,以表达 EGFP 标志基因及丝胶蚕性状为留种筛选标志,育成中部丝腺细胞能够合成分泌狂犬病病毒核蛋白、基因纯合的转基因家蚕新品种。

2. 根据权利要求 1 所述的一种家蚕中部丝腺细胞合成分泌狂犬病病毒核蛋白的方法,其特征在于:采用显微注射转基因家蚕方法将 pBSer1RVNP-A3EGFP 质粒及能够提供转座酶 trans 的辅助质粒导入家蚕已解除滞育的受精卵,其家蚕品种是突变品种丝胶蚕,所述的以丝胶蚕性状为每代的留种筛选标志,其筛选的时期是蚕茧时期。

家蚕中部丝腺细胞合成分泌狂犬病病毒核蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及利用转基因技术构建一种家蚕中部丝腺细胞合成分泌狂犬病病毒核蛋白的方法。

背景技术

[0002] 狂犬病是当今世界公共卫生中有严重威胁的传染病之一。狂犬病是由狂犬病病毒感染恒温动物或人引起,导致动物或者人急性致死性脑脊髓炎,临床特征主要表现为狂躁不安、行为反常、攻击性、进行性麻痹和最终死亡,是一种人兽共患传染病。其特点是潜伏期长,致死率高,几乎 100% 死亡。

[0003] 狂犬病病毒属于弹状病毒科弹状病毒属,是单链不分节负链 RNA 病毒,病毒外形呈弹状,一端纯圆,一端平凹,有囊膜,内含衣壳呈螺旋对称,表面具有包膜,内含有单链 RNA。

[0004] 狂犬病病毒的基因组全长约 12kb,基因组的 3' 端至 5' 端排列着 N、P、M、G、L 5 个结构基因,各基因序列的长度分别为 1424、991、805、1675 和 6475bp,它们分别编码核蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、糖蛋白(G)和大蛋白(L或RNA依赖的RNA转录酶蛋白)。

[0005] 狂犬病病毒有两种主要抗原:一种是病毒外膜上的糖蛋白抗原,它能与乙酰胆碱受体结合,表现出神经毒性,能使体内产生中和抗体及血凝抑制抗体;另一种为内层的核蛋白抗原,它使体内产生补体结合抗体和沉淀素。

[0006] N 蛋白基因全长 1424 个核苷酸。编码 450 个氨基酸,相对分子质量为 50.5Da。在成熟的病毒粒子中,N 蛋白是构成核衣壳螺旋对称结构的主要成分之一,是病毒中最稳定的蛋白,可用作检测抗原,也是狂犬病病毒基因分型的主要依据。N 蛋白与狂犬病病毒基因组中的 RNA 结合,形成 RNP 结合物,能保护病毒 RNA 免遭核酸酶破坏。N 蛋白是一个磷酸化蛋白,C 端第 389 位 Ser 为磷酸化位点,能调节病毒的转录和复制水平。N 蛋白能够诱导细胞免疫。

[0007] 转基因家蚕中部丝腺生物反应器是在家蚕中部丝腺中表达外源基因的转基因动物表达系统。家蚕生长周期短,50 天左右可完成一个世代,每个雌蛾可产卵约 400 粒;家蚕经过长达四千多年的人工驯养、选育,性情温顺,已完成丧失飞翔逃逸能力,而在丝蛋白合成、分泌方面具有非常强的能力;合成的蛋白可以随蚕丝蛋白一起分泌到体外,蚕丝蛋白主要由 3 种丝素蛋白和 3 种丝胶蛋白构成,成分简单。所以,转基因家蚕丝腺生物反应器构建容易,运行安全,表达外源蛋白效率高,外源蛋白多具有生物活性,蛋白纯化方便,只需要通过饲养转基因家蚕,就可以非常方便地维持表达系统的延续,是一种非常有价值的表达系统,具有广阔的实用前景。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种家蚕中部丝腺细胞合成分泌狂犬病病毒核蛋白的方法,是利用转基因家蚕技术将狂犬病病毒核蛋白基因导入家蚕基因组内,并在家蚕中部丝

腺细胞中特异表达,开发出合成分泌狂犬病病毒核蛋白的家蚕,为利用狂犬病病毒核蛋白研制更加安全、高效、经济和使用方便的人用狂犬病新型疫苗奠定基础。

[0009] 为了达到上述目的,本发明采用的技术方案步骤如下:

[0010] (1) 采用分子生物学技术构建家蚕合成分泌狂犬病病毒核蛋白的载体 pBSer1RVNP-A3EGFP 质粒;

[0011] (2) 采用显微注射转基因家蚕方法将 pBSer1RVNP-A3EGFP 质粒及能够提供转座酶 trans 的辅助质粒导入家蚕已解除滞育的受精卵内,蚕卵孵化后饲养至成虫,自交续代为 G1 代,在 G1 代转基因家蚕的小蚕期,通过荧光体视显微镜观察选择表达 EGFP 标志基因的转基因家蚕,饲养至成虫自交续代为 G2 代, G2 代以后均采用蛾区育,成虫自交续代,再经 1-3 代选种,每代采用转基因昆虫荧光基因表达相对量无损伤测定方法,以表达 EGFP 标志基因及丝胶蚕性状为留种筛选标志,育成中部丝腺细胞能够合成分泌狂犬病病毒核蛋白、基因纯合的转基因家蚕新品种。

[0012] 所述的 pBSer1RVNP-A3EGFP 质粒是以 piggyBac 转座质粒为基础,质粒带有 Amp 抗性基因以用于质粒的扩增和筛选,包含 piggyBac 转座子的 2 个转座臂 PBL 和 PBR,包含 2 个功能表达框,一个是 A3 启动子启动的绿色荧光蛋白基因表达框 A3 Promoter+EGFP+SV40,以用作转基因阳性家蚕的筛选标志,另一个是家蚕丝胶蛋白 1 启动子、带有便于提纯外源蛋白的 His 接头以及狂犬病病毒核蛋白基因的表达框 Ser1 Promoter+His+hLYZ+SV40,以表达狂犬病病毒核蛋白,辅助质粒包含 Amp 抗性基因、piggyBac 转座子的 1 个转座臂 PBR、A3 启动子启动的转座酶 trans 基因表达框 A3 Promoter+ trans,以提供转座酶。

[0013] 采用显微注射转基因家蚕方法将 pBSer1RVNP-A3EGFP 质粒及能够提供转座酶 trans 的辅助质粒导入家蚕已解除滞育的受精卵,其家蚕品种是突变品种丝胶蚕,所述的以丝胶蚕性状为每代的留种筛选标志,其筛选的时期是蚕茧时期。

[0014] 本发明具有的有益效果是:

[0015] 本发明借助荧光标志基因筛选转基因家蚕,这种转基因家蚕能够在家蚕中部丝腺细胞特异地合成分泌狂犬病病毒核蛋白,为提高狂犬病病毒核蛋白的生产效率、降低生产成本、并研制更加安全、高效、经济和使用方便的人用狂犬病新型疫苗奠定基础。

附图说明

[0016] 图 1 是家蚕中部丝腺细胞合成分泌狂犬病病毒核蛋白的 pBSer1RVNP-A3EGFP 载体结构图。

[0017] 图 2 是能够提供转座酶的辅助质粒结构图。

具体实施方式

[0018] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

[0019] 实施例 1:

[0020] 将 pBSer1RVNP-A3EGFP 质粒(图 1)及能够提供转座酶的辅助质粒(图 2)按 2:1 比率混合,2 种质粒的总浓度为 0.4 μ g/ μ l,质粒溶解在 0.5mM、pH7.0 含有 5mM 氯化钾的磷酸缓冲液中,然后采用显微注射方法导入丝胶蚕产卵后 8 小时以内的、已解除滞育的受精卵内,

导入总体积为 20n1。将显微注射的蚕卵在 25℃、85%湿度、12h 光照条件下饲养至成虫，自交续代(G1 代)。在转基因实验的 G1 代小蚕期，通过荧光显微镜(Olympus, SZX12, 日本)观察获取表达 EGFP 标志基因的转基因家蚕 1 蛾，荧光显微镜的激发波长为 460nm ~ 490nm，发射波长为 510 nm ~ 550 nm。将蚕饲养至成虫自交产卵续代(G2)。自第 G2 代以后的转基因家蚕均采用单蛾育，在小蚕期采用转基因昆虫荧光基因表达相对量无损伤测定方法，挑选表达 EGFP 标志基因的转基因家蚕，饲养至成虫，选择蚕茧特性为丝胶的个体自交续代，经自交 3 代选择留种，在每代的小蚕期，采用转基因昆虫荧光基因表达相对量无损伤测定方法，观察选留表达 EGFP 标志基因的转基因家蚕，在蚕茧时期选留蚕茧特性为丝胶的个体。经此育成中部丝腺细胞能够合成分泌狂犬病病毒核蛋白、且狂犬病病毒核蛋白含量占丝蛋白含量较高比例的基因纯合的转基因家蚕新品种，定名为 SN2。

[0021] 取 SN2 品种基因组 DNA 为模板，采用 Inverse PCR 扩增 RVNP 基因在家蚕基因组中的插入片段，对扩增片段进行克隆、测序和染色体定位分析，结果显示如下：

[0022] 狂犬病病毒核蛋白基因在家蚕基因组中的插入位点鉴定

[0023]

品系	染色体	序列片段	基因或间隔区	左侧基因组序列	载体	右侧基因组序列
SN2	Chr. 17	Bm_scaf33 (2923746)	A3gene	TAAGTTTTAATTTAA	<i>piggyBac</i>	TTAAAATTCGAAAGA

[0024] 提取蚕丝蛋白为材料，采用 Western blot 分析转基因家蚕核蛋白的表达情况。经鼠抗狂犬病病毒核蛋白 MAb 作一抗的分析，结果得到与预期分子量大小相符的特异性蛋白条带。

[0025] 研究结果证明 RVNP 基因已插入到家蚕基因组第 17 染色体的 A3 肌动蛋白基因中，并获得了稳定的遗传和表达，已育成中部丝腺细胞能够合成分泌狂犬病病毒核蛋白的转基因家蚕新品种。

[0026] 实施例 2：

[0027] 将 pBSer1RVNP-A3EGFP 质粒(图 1)及能够提供转座酶的辅助质粒(图 2)按 2:1 比率混合，2 种质粒的总浓度为 0.4μg/μl，质粒溶解在 0.5mM、pH7.0 含有 5mM 氯化钾的磷酸缓冲液中，然后采用显微注射方法导入丝胶蚕产卵后 8 小时以内、已解除滞育的受精卵内，导入总体积为 20n1。将显微注射的蚕卵在 25℃、85%湿度、12h 光照条件下饲养至成虫，自交续代(G1 代)。在转基因实验的 G1 代小蚕期，通过荧光显微镜(Olympus, SZX12, 日本)观察获取表达 EGFP 标志基因的转基因家蚕 2 蛾，荧光显微镜的激发波长为 460nm ~ 490nm，发射波长为 510 nm ~ 550 nm。将蚕饲养至成虫自交产卵续代(G2)。自第 G2 代以后的转基因家蚕均采用单蛾育，在小蚕期采用转基因昆虫荧光基因表达相对量无损伤测定方法，挑选表达 EGFP 标志基因的转基因家蚕，饲养至成虫，选择蚕茧特性为丝胶的个体自交续代，经自交 1 代选择留种，在每代的小蚕期，采用转基因昆虫荧光基因表达相对量无损伤测定方法，观察选留表达 EGFP 标志基因的转基因家蚕，在蚕茧时期选留蚕茧特性为丝胶的个体。经此育成中部丝腺细胞能够合成分泌狂犬病病毒核蛋白、且狂犬病病毒核蛋白含量占丝蛋白含量较高比例的基因纯合的转基因家蚕新品种，定名为 SN3、SN4。

[0028] 取 SN3、SN4 基因组 DNA 为模板，采用 Inverse PCR 扩增 RVNP 基因在家蚕基因组中的插入片段，对扩增片段进行克隆、测序和染色体定位分析，结果显示如下：

[0029] 狂犬病病毒核蛋白基因在家蚕基因组中的插入位点鉴定

[0030]

品系	染色体	序列片段	基因或间隔区	左侧基因组序列	载体	右侧基因组序列
SN3	Chr. 17	Bm_scaf33 (2923720)	间隔区	CTTGTCACTTATTAA	<i>piggyBac</i>	TTAAAGTTTAGGTCGA
SN4	Chr. 8	Bm_scaf19 (7860408)	间隔区	ATGGTGCTGTTTTAA	<i>piggyBac</i>	TTAAAACTTTCCACT

[0031] 提取 SN3、SN4 蚕丝蛋白为材料,采用 Western blot 分析转基因家蚕核蛋白的表达情况。经鼠抗狂犬病病毒核蛋白 MAb 作一抗的分析,结果得到与预期分子量大小相符的特异性蛋白条带。

[0032] 研究结果证明 RVNP 基因已插入到 SN3 家蚕基因组第 17 染色体和 SN4 家蚕基因组第 8 染色体的基因间隔区中,并获得了稳定的遗传和表达,已育成中部丝腺细胞能够合成分泌狂犬病病毒核蛋白的转基因家蚕新品种。

[0033] 实施例 3:

[0034] 将 pBSer1RVNP-A3EGFP 质粒(图 1)及能够提供转座酶的辅助质粒(图 2)按 2:1 比率混合,2 种质粒的总浓度为 0.4 μ g/ μ l,质粒溶解在 0.5mM、pH7.0 含有 5mM 氯化钾的磷酸缓冲液中,然后采用显微注射方法导入丝胶蚕产卵后 8 小时以内、已解除滞育的受精卵内,导入总体积为 20nl。将显微注射的蚕卵在 25 $^{\circ}$ C、85%湿度、12h 光照条件下饲养至成虫,自交续代(G1 代)。在转基因实验的 G1 代小蚕期,通过荧光显微镜(Olympus, SZX12, 日本)观察获取表达 EGFP 标志基因的转基因家蚕 2 蛾,荧光显微镜的激发波长为 460nm ~ 490nm,发射波长为 510 nm ~ 550 nm。将蚕饲养至成虫自交产卵续代(G2)。自第 G2 代以后的转基因家蚕均采用单蛾育,在小蚕期采用转基因昆虫荧光基因表达相对量无损伤测定方法,挑选表达 EGFP 标志基因的转基因家蚕,饲养至成虫,选择蚕茧特性为丝胶的个体自交续代,经自交 2 代选择留种,在每代的小蚕期,采用转基因昆虫荧光基因表达相对量无损伤测定方法,观察选留表达 EGFP 标志基因的转基因家蚕,在蚕茧时期选留蚕茧特性为丝胶的个体。经此育成中部丝腺细胞能够合成分泌狂犬病病毒核蛋白、且狂犬病病毒核蛋白含量占丝蛋白含量较高比例的基因纯合的转基因家蚕新品种,定名为 SN6、SN8。

[0035] 取 SN6、SN8 基因组 DNA 为模板,采用 Inverse PCR 扩增 RVNP 基因在家蚕基因组中的插入片段,对扩增片段进行克隆、测序和染色体定位分析,结果显示如下:

[0036] 狂犬病病毒核蛋白基因在家蚕基因组中的插入位点鉴定

[0037]

品系	染色体	序列片段	基因或间隔区	左侧基因组序列	载体	右侧基因组序列
SN6	Chr. 2	Bm_scaf83 (3110498)	间隔区	CTTATTTTAAAAATTAA	<i>piggylBac</i>	TTAATAAAGAAATC
SN8	Chr. 11	Bm_scaf16 (22908836)	间隔区	TATTGATCTTCTTTAA	<i>piggylBac</i>	TTAAACAAATTTCTAC

[0038] 提取 SN3、SN4 蚕丝蛋白为材料,采用 Western blot 分析转基因家蚕核蛋白的表达情况。经鼠抗狂犬病病毒核蛋白 MAb 作一抗的分析,结果得到与预期分子量大小相符的特异性蛋白条带。

[0039] 研究结果证明 RVNP 基因已插入到 SN6 家蚕基因组第 2 染色体和 SN8 家蚕基因组第 11 染色体的基因间隔区中,并获得了稳定的遗传和表达,已育成中部丝腺细胞能够合成

分泌狂犬病病毒核蛋白的转基因家蚕新品种。

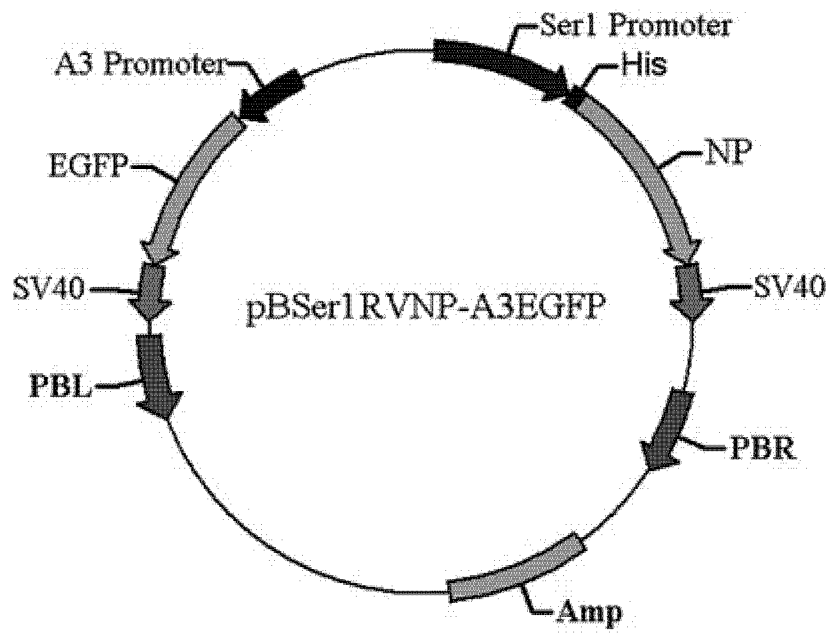


图 1

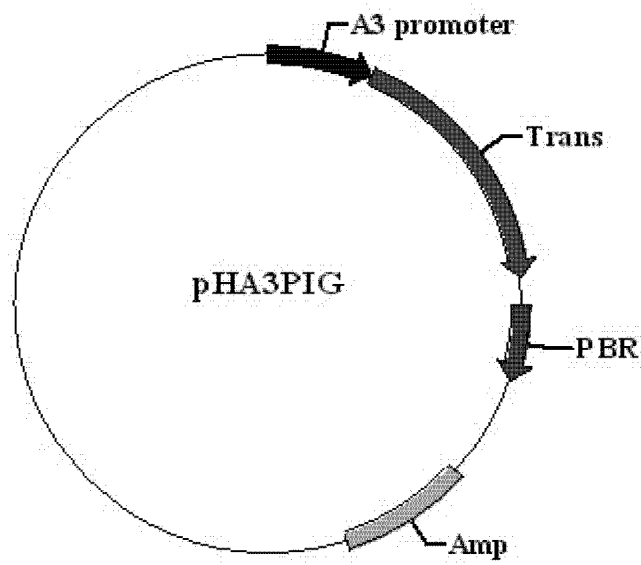


图 2