进一步的优化表达和纯化工作正在进行之中，这也为相关蛋白的表达工作提供了一条很好的思路和途径。

参考文献：

[1] Ilvanainen A, Kortesmaa J, Sahlberg C, *et al*. Primary structure, developmental expression, and immunolocalization of the murine laminin alpha4 chain[J]. J Biol Chem, 1997, 272(44): 27862－27868.
[2] Fujiwara H, Kikkawa Y, Sanzen N, *et al*. Purification and characterization of human laminin-8. Laminin-8 stimulates cell adhesion and migration through alpha3beta1 and alpha6beta1 integrins[J]. J Biol Chem, 2001, 276(20): 17550－17558.
[3] Ljubimova J Y, Lakhter A J, Loksh A, *et al*. Overexpression of alpha4 chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis[J]. Cancer Res, 2001, 61(14): 5601－5610.
[4] Talts J F, Sasaki T, Miosge N, *et al*. Structural and functional analysis of the recombinant G domain of the laminin alpha4 chain and its proteolytic processing in tissues[J]. J Biol Chem, 2000, 275(45): 35192－35199.
[5] Okazaki I, Suzuki N, Nishi N, *et al*. Identification of biologically active sequences in the laminin alpha 4 chain G domain[J]. J Biol Chem, 2002, 277(40): 37070－37078.
[6] Gonzalez A M, Gonzales M, Herron G S, *et al*. Complex interactions between the laminin alpha 4 subunit and integrins regulate endothelial cell behavior *in vitro* and angiogenesis in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(25): 16075－16080.
[7] Yokoyama E, Suzuki N, Haruki M, *et al*. Cyclic peptides from the loop region of the laminin alpha 4 chain LG4 module show enhanced biological activity over linear peptides[J]. Biochemistry, 2004, 43(42): 13590－13597.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)11-1112-01

BAC-TO-BAC 昆虫/杆状病毒系统在真核表达人 N 端脂多糖结合蛋白的研究中的应用

Application of BAC-TO-BAC insect/baculovirus system on eukaryotic expression of human N-terminal LBP

殷育松，王晓东，刘友生 （第三军医大学西南医院病理科，重庆 400038）

昆虫细胞表达体系自成功表达人 β-干扰素以来，已成为制备基因工程产品的优选体系。我们选用该系统成功构建 N 端脂多糖结合蛋白（tLBP）基因杆状病毒载体并进行重组蛋白的表达，现就该系统在实验研究中的应用及体会报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Grace 昆虫细胞培养基（11300-043）、SF-900 Ⅱ SFM（10902-088）和 sf21 昆虫细胞购自 GIBCO（Invitrogen）公司；6xHis 亲和纯化 TALON 柱芯（Cat. 8908-2）购自 Clontech 公司。

1.2 重组病毒的构建

1.2.1 外源基因转座入 Bacmid 及 pBacmidtLBP 的鉴定 将 1 ng pFASTBACtLBP 重组质粒 DNA 与 100 μl DH10BAC 感受态细胞混匀，按常规方法转化后于 37 ℃培养 24～36 h。经蓝白斑筛选挑取白色重组单菌落接种后，提取 Bacmid DNA。

1.2.2 重组 Bacmid 的 PCR 鉴定 以 pUC/M13 引物进行 PCR 扩增，F：5′-CCCAGTCAGGACGTTGTAAAACG-3′；R：5′-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3′。

1.3 重组病毒的鉴定

1.3.1 Bacmid DNA 转染 sf21 细胞及目的基因 PCR 鉴定 轻取 10 μl 新鲜提取的重组 Bacmid DNA 于 100 μl Sf-900IISFM 培养的 sf21 细胞中，同样取 6 μl CELLFECTIN，转染后 72 h，收获上清即得重组病毒。经 3 代病毒扩增后，以裂解细胞的 DNA 为模板，tLBP 基因引物进行 PCR 扩增。F：5′-GTCGAC TGCACTGGGAATCAAGGA-3′；R：5′-AAGCTT AATCTCTGTTGTAACTGG-3′。

1.3.2 病毒空斑分析 接种 1×10^6 cells/孔于 6 孔培养板，28 ℃培养 4～6 h，每孔加入 500 μl 不同稀释度的第 3 代病毒，培养 4～5 d 后数出空斑数并计算病毒滴度。

1.4 重组病毒的表达[1]

1.4.1 重组病毒的蛋白表达及其产物的纯化 将 MOI 加入处于对数生长期的 Sf21 细胞中，感染 1～2 h 后，将培养基换为 Sf-900 II SFM，28 ℃培养 65～72 h 收集上清。常规洗脱蛋白质，Lowry 法测定蛋白质浓度，BIO-RAD 毛细管电泳进一步鉴定纯化蛋白的纯度。

1.4.2 SDS-PAGE 及 Western Blot 样品经 12% SDS-PAGE 电泳及凝胶银染，Western Blot 采用 6×His 特异抗体间接检测 C 端融合有 6×His 的重组蛋白。

（下转 1119 页）

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39970757，30000171）
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39970757, 30000171)
作者简介：殷育松（1970－），男，安徽省太湖县人，硕士研究生，实验师，主要从事病理学技术方面的研究。电话：(023)66681548
通讯作者：王晓东，E-mail：xiaodong.wang@mssm.edu
收稿日期：2004-12-28；修回日期：2005-01-27

照制剂，采用威布尔参数的比较方式对本室自制复方制剂的两种成份进行溶出度评价。分析结果表明，复方二甲双胍片中二甲双胍的溶出特性与普通二甲双胍片相似，而格列本脲的溶出特性与普通格列本脲片差异，复方二甲双胍片中格列本脲的溶出速率快于普通片。

口服药物进入胃肠道后，必须经过崩解、溶出才能被机体吸收，溶出速度在一定程度上能反映药物的吸收情况，可作为固体制剂的质量控制指标。测定药物的溶出度，研究药物的溶出曲线并计算出若干溶出参数，对控制药品质量尤其对难溶性药物来讲显得尤为重要。据文献报道，磺酰脲类药物的粒度与生物利用度有相关性，格列本脲与盐酸二甲双胍组成复方制剂后，格列本脲的粒度范围直接影响复方制剂口服生物利用度。因此，国外已上市同品种对其格列本脲的粒度进行了限定：5% 不得大于 6 μm，50% 不得大于 10 μm，75% 不得大于 21 μm 以保证制剂的生物利用度，我们自行研制的复方二甲双胍片采用先将格列本脲溶解后加入二甲双胍混合干燥制粒压片方法，与常规粉末直接压片法比较，理论上使格列本脲呈“超微粒度”状态，这可能是本实验复方二甲双胍片中格列本脲溶出度高于普通格列本脲片的原因，这也再次证明了含格列本脲的制剂必须考虑微粉化工艺、固定原料药的粒度，并订入原料药内控标准，以保证质量的一致性。

参考文献：

[1] 简龙海，李丽敏，丁　黎，等. 盐酸二甲双胍/格列本脲复方片剂在人体的药代动力学[J]. 中国药理学报，2004，20(3)：334－337.

[2] 杜小莉，张翠莲. 降血糖新药——格列本脲和盐酸二甲双胍复合片[J]. 中国药学杂志，2002，37(11)：869－871.

[3] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 2005 年版二部. 北京：化学工业出版社，2005：73.

[4] 彭永富，董　慧. 药物溶出度 Weibull 分布的计算机求解[J]. 中国药学杂志，1996，31(10)：606－608.

（编辑　汪勤俭）

（上接 1112 页）

2　结果

2.1　蓝白斑筛选重组 BacmidtLBP 及 pBacmidtLBP 的 PCR 鉴定

本实验通过转座成功获得白色菌落。经电泳发现了 1 条转座了 pFASTBACtLBP 的 Bacmid DNA 条带(3.0 kb)。

2.2　细胞转染鉴定

经 3 代病毒扩增，取细胞沉淀用 PCR 扩增出 695 bp 的 tLBP 目的基因。

2.3　病毒空斑计数及感染复数计算

病斑分析根据空斑数和病毒稀释度即得到噬斑形成单位(pfu)，再除以感染细胞数即得感染复数(MOI)。

$$\text{感染复数(MOI)} = \frac{4.2\times10^{7}}{5\times10^{6}} = 8$$

2.4　重组 tLBP 蛋白 SDS-PAGE

经特异洗脱纯化后鉴定，当咪唑洗脱物浓度达到 100 mmol/L 时，其洗脱物即为特异的目的纯化蛋白产物。

3　讨论

BAC-TO-BAC 杆状病毒表达体系是近年来发展迅速的一种快速、高效、便捷的新型表达系统。通过位点特异的转座可方便地将外源基因插入到杆状病毒穿梭载体上，然后提取含有外源基因的重组 Bacmid，将其转染入昆虫细胞即可获得含有外源基因的重组病毒用于表达目的蛋白[2]。

在目前常用的昆虫宿主表达体系中，sf9 主要适用于病毒的扩增和悬浮培养用作规模化蛋白表达，sf21 由于细胞较大而适合某些蛋白的高水平表达，而 High Five 细胞是分泌性蛋白高水平表达的理想宿主细胞，其表达效率是其它昆虫细胞的 25 倍，并且该细胞能快速适应无血清培养基和悬浮培养。通常由于相对低的细胞密度与产物浓度的局限，限制了批量培养昆虫细胞和大量获得表达产物，同时，昆虫细胞培养过程中需氧量较高，而为提高氧传递率使用的搅拌、通气等手段产生的气体泡末和剪切应力又容易引起细胞的损伤和死亡[3]。

随着基因工程技术的不断发展，逐渐认识到昆虫细胞杆状病毒表达系统也存在一些局限性，如使用的是杆状病毒晚期启动子，重组产物的加工可能存在不完全；通过多次感染的长期连续传代后，病毒的感染能力会有下降等。这就迫切需要建立稳定的转化细胞表达系统，如新近开发的 Insect Select 系统等，它是一个简单而直接的表达系统，具有高表达的杆状病毒即刻早期蛋白启动子和快速纯化稳定转化细胞系的 Zeocin 抗性基因。该系统无需杆状病毒感染就能获得高产量的表达，免除了蓝白斑纯化和重组杆状病毒的扩增，用该系统表达的产物其分泌性和糖基化程度远优于 BEVS 表达系统[4]。因此，昆虫细胞杆状病毒表达系统将不断完善和发展，必将广泛应用于生物学、农科学以及医药学的基因工程研究和开发。

关键词：杆状病毒；sf21 昆虫细胞；N 端脂多糖结合蛋白

中图法分类号：R37　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 王晓东，刘友生，张　杰，等. 人截断型 LBP 基因的克隆及其杆状病毒表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报，2001，23(6)：637－640.

[2] 张　杰，薛沿宁，郑　莉，等. 重组人可溶性 CD14 在昆虫细胞表达系统中的表达[J]. 生物技术通讯，2001，12(3)：184－187.

[3] Donaldson M，Wood H A，Kulakosky P C，*et al*. Glycosylation of a recombinant protein in the Tn5B1-4 insect cell line：influence of ammonia，time of harvest，temperature，and dissolved oxygen[J]. Biotechnol Bioeng，1999，63(3)：255－262.

[4] 周亚竞，张志芳，张元兴，等. 昆虫细胞培养研究进展[J]. 蚕业科学，2000，26(增刊 1)：74－78.

（编辑　王　红）