

棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白基因 2.1kb 片段在大肠杆菌中的表达

欧 洋 孟小林* 徐进平

(武汉大学病毒研究所 武汉 430072)

摘 要 以棉铃虫颗粒体病毒(*Helicoverpa armigera* granulosis virus, 简称 HaGV) 基因组 DNA 为模板, 设计引物 PCR 扩增病毒增效蛋白(Enhancin) 基因, 然后经 *Sac*I/*Pst*I 双酶切消化, 得到 5' 端截短的约 2.1kb 增效蛋白基因片段, 再与 pQE30 质粒连接, 构建了重组表达载体 pQE/EnC, 转化大肠杆菌 M15(pREP4), 在 IPTG 诱导下表达出分子量约为 78×10^3 D 的融合蛋白并命名为 P78, 纯化的 P78 包涵体显示了明显的增效活性, 可提高 AcMNPV 对小菜蛾幼虫的感染率 27.88% ~ 32.92%。

关键词 棉铃虫颗粒体病毒, 增效蛋白基因, 克隆, 表达, 生物活性测定

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0595-04

昆虫杆状病毒增效蛋白(Enhancin) 也称病毒增效因子(Viral enhancing factor, VEF), 是由某些杆状病毒基因编码具有促进核型多角体病毒感染的一类金属蛋白酶^[1], 具酯酶活性^[2], 而且能够提高苏云金杆菌伴孢晶体对幼虫的毒力^[3]。自 Tanada 1959 从美洲一星粘虫(*Pseudaletia unipuncta* , Pu) GV 中分离出增效蛋白^[4], 随后在粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*) GV、棉铃虫 GV、小菜粉蝶(*Pieris rapae*) GV、旋幽夜蛾(*Scotogramma trifolii*) GV 和舞毒蛾(*Lymantria dispar*) NPV 以及东方粘虫(*Pseudaletia separata*) 痘病毒(Entomopoxvirus, EPV)^[5~8]中发现了增效蛋白的存在。迄今关于增效蛋白协同杀虫的作用方式, 有两种观点, 一是增效蛋白具有蛋白酶活性, 能够降解宿主中肠围食膜的肠粘蛋白和糖蛋白, 破坏了靶昆虫抵御病原微生物的第一道防线, 使病毒粒子更易进入中肠细胞; 二是介导病毒囊膜与中肠细胞质膜的融合。目前的研究结果表明增效蛋白主要以第一种方式协同杀虫^[9]。

HaGV 增效蛋白基因的 ORF 大小为 2706bp, 编码含 902 个氨基酸, 分子量为 104.6kD 的蛋白质。我们构建了 HaGV enhancin 基因不同片段大小的一系列表达载体, 旨在探讨增效蛋白基因结构与功能的关系。本文报道了该基因 3' 端 2.1kb 的片段在大肠杆菌中的克隆与表达, 并对表达产物的增

效活性作了初步研究。该项工作对于我国在生物防治农林害虫的研究领域有着积极的理论及应用价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

棉铃虫颗粒体病毒 HaGV 由美国汤姆·杰弗逊大学微生物学及免疫学系 Zailin Yu 博士赠送, 质粒 pQE-30、大肠杆菌 M15(pREP4) 购自 QIAGEN 公司, 限制酶、T4DNA 连接酶等购自华美生物技术公司, 小菜蛾幼虫由武汉大学 Bt 研究室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 HaGV-DNA 的提取 参照文献 [10] 的方法进行。

1.2.2 HaGV-enhancin 基因的 PCR 扩增 据已发表 HaGV-enhancin 基因序列^[6], 设计引物为:

(1) 5' TGAATGTTTCGTTTGC TCTCGCGTTGT(上游引物),

(2) 5' ATACTGCAGTGTCTCCCACTACTAAT(下游引物, 含有 *Pst* I 酶切位点)

引物由上海生工公司合成。HaGV-DNA 模板 94℃ 预变性 5 min, PCR 循环参数: 94℃、60 s, 56℃、90 s, 72.5℃、180 s, 循环 30 次, 最后 72.5℃ 延伸 7 min。经电泳检测, 得到单一的长约 2.7kb 的

HaGV-enhancin 基因片段。

1.2.3 重组表达质粒 pQE/EnC 的构建:利用 HaGV-enhancin gene 内部有 *SacI* 单一酶切位点,用 *SacI*/*PstI* 双酶切质粒 pQE-30 和 PCR 产物,PCR 产物经 *SacI*/*PstI* 双酶切,产生 0.6kb(HaGV-enhancin gene 5' 端片段)和 2.1kb(HaGV-enhancin gene 3' 端片段)的两个片段,0.7% 低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化回收 2.1kb 的片段和双酶切消化的质粒片段。用 T4DNA 连接酶于 16℃ 水浴连接 4 h,转化感受态细胞 *E. coli* M15(pREP4),经 Ampicillin 和 Kanamycin 双抗平板筛选得到阳性转化子。此构建的重组质粒命名为 pQE/EnC。

1.2.4 pQE/EnC 的酶切鉴定:重组质粒 DNA 分别经 *PstI*,*SacI* 单酶切,*BamHI*/*HindIII*,*KpnI*/*HindIII* 双酶切,0.7% 琼脂糖电泳照相。

1.2.5 Enhancin gene 3' 端 2.1kb 片段的表达:挑取重组子单菌落接种于 5 mL LB 培养基中(Ampicillin 100 μg/mL 和 Kanamycin 25 μg/mL,下同)活化过夜。活化菌液以 1:20 稀释接种到 10 mL LB 中,34℃ 培养 3 h,加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,37℃ 诱导 5 h,取诱导 5 h 和未诱导培养物各 1 mL,收集菌体进行 SDS-PAGE。

1.2.6 表达产物的初步纯化:离心收集诱导后菌体,加裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH8. 0,0. 1 mol/L NaCl,溶菌酶 2 mg/g 菌体蛋白),溶菌酶 37℃ 1 h,冰浴超声波破碎 10 min,处理物上蔗糖梯度 30% ~ 60% ,4000(r/min)× 40 min,取出白色包涵体带,洗糖 3 次,将包涵体样品稀释后于透射电镜下观察并照相,剩余样品 4℃ 保存备用。

1.2.7 生物测定 将 AcNPV 和纯化的包涵体表达产物(命名为 P78)作 10 倍稀释并用血球记数板记数。设(1) NPV :即 AcNPV 2.43×10^6 PIB/mL (polyhedra inclusion body ,多角体);(2) NPV + 10^3 OB :即 AcNPV 2.43×10^6 PIB + P78 1.2×10^3 OB/mL (occlusion body ,包涵体);(3) NPV + 10^4 OB :即 AcNPV 2.43×10^6 PIB + P78 1.2×10^4 OB/mL ;(4) NPV + bacterial protein ,即 AcNPV 2.43×10^6 PIB/mL + 未诱导菌体蛋白 1 μg (5) 健康幼虫对照,仅喂食新鲜菜叶。将小菜蛾 2~3 龄幼虫单虫饲养于 24 孔 Costar® 细胞培养皿中,将上述(1)(2)(3)(4)分别制备处理液 500 μL,涂抹于洗净的新鲜菜叶表面,待菜叶晾干,把菜叶剪成大小一致的若干小叶片,放置于每孔细胞皿中,幼虫取食 48 h 后,更换新鲜菜叶。逐日记录死亡和存活虫数。

2 实验结果

2.1 重组表达质粒 pQE/EnC 的构建与酶切鉴定
重组表达质粒 pQE/EnC 的构建过程如图 1。根据已报道的 HaGV 增效基因序列及 pQE - EnC 的构建过程。pQE/EnC 经 *PstI* 单酶切,应得 5.5kb 的片段,宿主菌自身携带有质粒 pREP4(3.7kb), pREP4 上具有 *PstI* 的两个识别位点,经 *PstI* 单酶切,得 2.8kb 和 0.9kb 片段;pQE/EnC 经 *BamHI*/*HindIII* 双酶切,得 3.4kb 和 2.1kb 的片段,pREP4 具有 *HindIII* 单一酶切位点,无 *BamHI* 酶切位点,经 *HindIII* 单酶切,得 3.7kb 的片段;pQE/EnC 经 *KpnI*/*HindIII* 双酶切,应得 4.6kb 和 0.9kb 的片段,pREP4 上无 *KpnI* 酶切位点,有 *HindIII* 单一酶切位点,凝胶电泳结果与预期相符。结果如图 2。

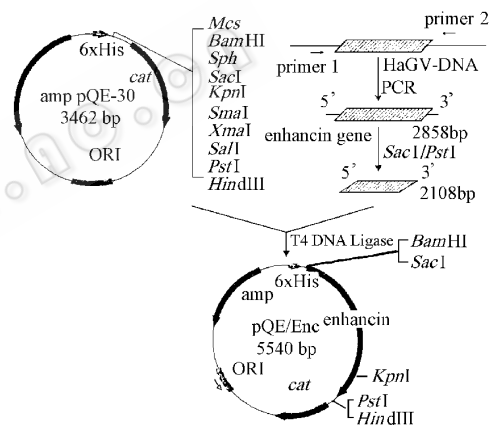


图 1 重组表达质粒 pQE/EnC 的构建
Fig.1 Construction of the recombinant plasmid pQE/EnC

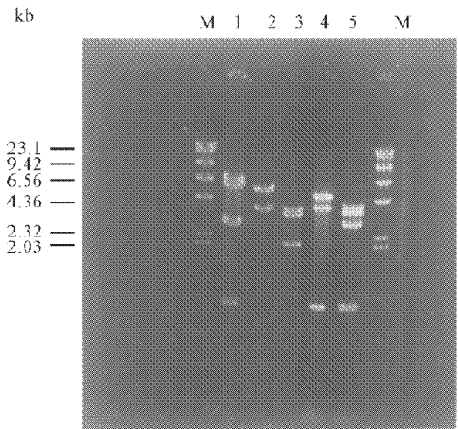


图 2 pQE/EnC 的酶切鉴定
Fig.2 Identification of recombinant plasmid pQE/EnC with restriction enzyme digestion
M λ /HindIII marker ;1. pQE/EnC + *PstI* ;
2. pQE/EnC + *SacI* ;3. pQE/EnC + *BamHI*/*HindIII* ;
4. pQE/EnC + *KpnI*/*HindIII* ;5. pQE/EnC + *PstI* ;
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.2 增效基因的表达及表达产物的纯化

表达产物的 10% SDS-PAGE 如图 3。结果表明,含重组质粒的 *E. coli* M15 菌表达了含增效蛋白 C-端 702 个氨基酸,共 720 个氨基酸的融合蛋白。根据氨基酸序列推算的融合蛋白分子量为 78.17×10^3 D(命名为 P78),SDS-PAGE 结果显示融合蛋白的分子量约为 78kD,电泳结果与预计的相符。

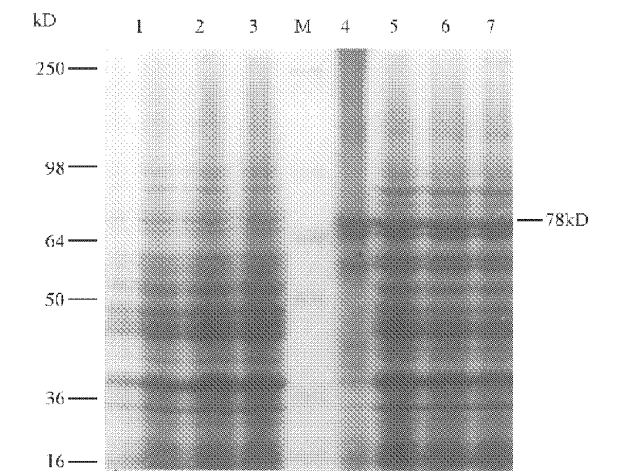


图 3 pQE/EnC 在大肠杆菌中表达及纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant plasmid pQE/EnC expression and purified product in *E. coli* M15 (pREP4) strain
M Protein marker ;1、2、3, Bacterial protein ;
4. Purified occlusion body ;5、6、7. IPTG induced 5h

外源蛋白在大肠杆菌中高水平表达,常导致形成包涵体。溶菌酶-超声波处理诱导表达菌体,经蔗糖梯度离心得白色包涵体带,洗糖离心得纯净的包涵体,在透射电镜下可见形状不规则的包涵体(图 4)。



图 4 P78 形成的包涵体

Fig.4 Occlusion body formed by P78(17k×200M×2)

2.3 P78 对 AcNPV 的增效活性

结果如表 1。未诱导菌体蛋白 + AcNPV 混合感染小菜蛾幼虫,并未提高 AcNPV 对小菜蛾的感染死亡率。AcNPV(2.43×10^6 PIB/mL)分别与 1.2×10^3 OB/mL, 1.2×10^4 OB/mL 的包涵体混合感染,可提高 AcNPV 对小菜蛾幼虫感染率 27.88% ~ 32.92%。从表 1 中可以看出 AcNPV 对菜蛾幼虫感染率并不随包涵体浓度的提高而提高,这一结果与刘平的报道^[12]相类似。包涵体的浓度与杀虫效率之间量比关系如何有待于进一步的研究。

3 讨 论

原核系统表达增效蛋白而言有如下优点:①成本低,产量高,增效蛋白作为辅助剂应用于病毒生物防治,可降低病毒用量。②增效蛋白在大肠杆菌中高效表达,形成包涵体,通过离心从粗制细胞裂解液中可分离纯化,而且包涵体较稳定,易于保存。③拓宽病毒杀虫谱。构建携带增效蛋白基因的重组病毒,该病毒本身具有一定的宿主范围,只有在其宿主内增殖并表达增效蛋白,才起到协助 NPV 感染的作用,限制了重组病毒的应用范围,而增效蛋白无此局限性。ZHONG J^[11]等构建了携带 TnGV-enhancin

表 1 P78 对 AcNPV 感染小菜蛾的增效活性

Table 1 The synergy of P78 on AcNPV against the larvae of *Plutella xylostella*

	NPV(10^6)	NPV(10^6) + OH(10^3)	NPV(10^6) + OH(10^4)	NPV(10^6) + Bacterial protein($1\mu\text{g}$)	Water control
Number of larvae treated	33	39	30	36	36
Correct mortality on the 11 th day post-infection/%	50.30	83.22	78.18	51.87	8.33

基因的 AcMNPV 重组病毒株,他们的研究发现当 Enhancin gene 在 AcMNPV 中大量表达时,重组病毒 AcMNPV 多角体产量大为降低,形态上也比野

生型病毒多角体小得多,Enhancin gene 的表达干扰了多角体的正常形成。

Biscoff^[9]等对 PuGV-H, HaGV, TnGV 和 LdM-

NPV 的增效蛋白氨基酸序列进行了同源性比较分析,发现有 4 个区域氨基酸相同性大于 50%,而总的氨基酸相同性仅有 29%。我们在 *E. coli* M15 中表达的融合蛋白含有 HaGV-En 蛋白 C-端 702 个氨基酸,表达的外源蛋白含有 HaGV-En 蛋白的 3 个相对保守区。生物活性测定结果表明该外源蛋白可促进 AcMNPV 感染小菜蛾,实验中设置了未诱导菌体蛋白和 AcMNPV 混合感染对照,此对照的感染后 10 d 校正死亡率与单独的 AcMNPV 感染校正死亡率基本一致,表明菌体蛋白并无干扰协同杀虫作用。

增效蛋白可增强苏云金杆菌伴孢晶对幼虫的毒力^[3]。目前我国正在大力推广转基因棉种植,将 Bt 伴孢晶体蛋白基因转入产棉植株,早期植株分泌 Bt

毒素能力旺盛,可有效抑制棉铃虫,但后期植株分泌 Bt 毒素能力下降,对棉铃虫的杀虫效果也随之降低。棉铃虫增效蛋白的研究工作可望用于弥补转基因棉后期分泌 Bt 毒素不足的缺陷,提高棉株抗虫能力。将棉铃虫增效蛋白与棉铃虫 NPV 防治棉铃虫的研究工作相结合,提高 HaNPV 杀虫效率,将开辟一条防治棉铃虫危害的新路径。

增效蛋白不仅能提高杆状病毒杀虫效率,而且在拓宽害虫综合防治的领域方面显示出诱人的前景。研制和开发无公害的高效生物杀虫剂以逐步减少化学农药用量,是今后农林害虫综合防治的发展趋势,增效蛋白的作用特点,将在这方面显示出积极的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] Lepore L S, Roelvink P R, Granados R R. *J Invertebr Pathol*. 1996, **68**(2):131~140
- [2] Tanada Y, Hess R T, Omi E M *et al.* *Microbio*. 1983, **37**:87~93
- [3] Corsaro B G, Guzen M R, Wang P *et al.* *Parasites and pathogens of insects*, Vol 2. Academic Press. 1993, pp. 127~145
- [4] Tanada Y. *J Invertebr Pathol*. 1959, **1**:215~231
- [5] Hashimoto Y, Corsaro B G, Granados R R. *J Gen Virol*. 1991, **72**:2645~2651
- [6] Roelvink P W, Corsaro B G, Granados R R. *J Gen Virol*. 1995, **76**:2693~2705
- [7] Bischoff D S, Slavicek J M. *J Virol*. 1997, **71**:8133~8140
- [8] Hayakawa T, Xu J H, Hukuhara T. *Gene*. 1996, **177**:269~270
- [9] WANG P, Hammer A D, Granados R R. *J Gen Virol*. 1997, **78**(12):3081~3089
- [10] 孟小林, 叶林柏. 武汉大学学报(自然科学版), 1996, **42**(4):519~522
- [11] ZHONG J, Granados R R VIIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control IVth International Conference on *Bacillus thuringiensis*. 1998
- [12] 刘平, 孟小林. 中国生物防治, 1999, **15**(4):188~189

Expression of 2.1kb Enhancin Gene Fragment from *Helicoverpa armigera* Granulosis Virus in *Escherichia coli*

OU Yang MENG Xiao-Lin XU Jin-Ping

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract The 2.1kb fragment of enhancin gene from *Helicoverpa armigera* granulosis virus was inserted into vector pQE-30 and expressed successfully in *E. coli* M15(pREP4). The synergy of expression product(P78) on AcMNPV against the larvae of *Plutella xylostella* was also studied. The results indicated that the percentage of correct mortality of the larvae increased 27.88%~32.92% in 10 post-infection days.

Key words *Helicoverpa armigera* Granulosis Virus, enhancin, cloning, expression, bioassay