

棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白基因克隆及在大肠杆菌中表达^{*}

刘相国 杨 恭 邱并生^{**} 田 波

(中国科学院微生物所分子病毒学开放实验室 北京 100080)

摘 要 用 PCR 技术从棉铃虫颗粒体病毒基因组中扩增得到增效蛋白基因 DNA 序列。PCR 产物酶切后克隆至 pBluescript 质粒中,核苷酸序列测定表明,有 8 个核苷酸、5 个氨基酸与 Genbank 发表的序列不同。继而构建了表达质粒 pET-30a-En,诱导后经 SDS-PAGE 和 Western blot 检测,表明获得了增效蛋白基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中包涵体形式的特异表达。生物测定结果表明,初步纯化的重组增效蛋白具有明显的增效活性,可提高棉铃虫核多角体病毒对 3 龄幼虫致死率 31.7% - 34.1%。重组增效蛋白的获得对研究其增效机理及构建新型杀虫剂提供了条件。

关键词 棉铃虫颗粒体病毒,增效蛋白,基因克隆,生物测定

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2000)04-0379-83

1959 年 Tanada 发现,粘虫(*Pseudaletia unipuncta*)颗粒体病毒(granulosis virus, GV)和核多角体病毒(nuclear polyhedrosis virus, NPV)共同感染虫体时,颗粒体病毒能提高核多角体病毒对粘虫的感染率和致死率,缩短感染幼虫存活时间,后来证明在其中起增效作用的因子是颗粒体病毒包涵体中的一种大约 100kD 的蛋白,这种蛋白单独没有杀虫作用,当和多角体病毒一起感染虫体时,才表现出增效作用,Tanada 将 PuGV 中的这种蛋白称为协同因子(synergistic factor, SyF),后来 Granados 从粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)颗粒体病毒中发现了具有相同作用的蛋白,他称其为增效因子(viral enhancing factor, VEF),1993 年 Corsaro 将这类蛋白总称为增效蛋白(ENHANCIN)^[1-3]。目前已在 9 种颗粒体病毒、4 种痘病毒、1 种多角体病毒中发现了增效蛋白基因^[4-7]。增效蛋白对苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)亦有很高的增效作用^[4,8]。增效蛋白的作用机理可能是通过其金属蛋白酶活性,降解围食膜中的肠粘蛋白和糖蛋白,破坏膜的通透性,使病毒更易进入体腔,也可能是作为接触蛋白附着在肠绒毛表面,促进病毒粒子释放^[9,10]。昆虫病毒增效蛋白的这种杀虫增效活性,在农业生产上具有广阔的应用前景。

棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)颗粒体病毒增效蛋白基因开放阅读框为 2706bp,编码 902 个氨基酸,分子量 104kD 左右。本文报道 HaGV 增效蛋白基因在大肠杆菌中的克隆与表达,并对表达产物的增效活性进行了初步测定。

^{*} 中国科学院应用研究与发展重大项目资助(KY951-A1-302-12-11)

^{**} 课题负责人,通讯联系人

作者简介 刘相国(1971-)男,山东泰安人,中国科学院微生物研究所微生物学专业 97 级博士生

收稿日期:1999-09-27,修回日期 2000-03-16

1 材料和方法

1.1 材料

棉铃虫及棉铃虫颗粒体病毒、棉铃虫核多角体病毒、克隆载体 pBluescript KS、表达载体 pET-30a、菌株 DH5α 和 BL21(DE3)为本室保存 ;工具酶类购自 TaKaRa 公司。Expand™ High Fidelity PCR System 购自 Boehringer Mannheim 公司。

1.2 棉铃虫人工饲料饲养

见文献 [11] 棉铃虫颗粒体病毒的分离及病毒基因组 DNA 提取见文献 [9, 12]

1.3 Western Blot 检测

见文献 [13] 电泳回收 HaGV 增效蛋白 ,注射兔子制备抗血清 ,二抗为本实验室制备的辣根过氧化物酶标记蛋白 A ,一抗与二抗均为 1:1000 稀释。

1.4 引物

根据文献 [5] 报道的 HaGV 增效蛋白基因核苷酸序列设计引物 ,由中国科学院微生物研究所技术中心合成。5′-端引物为 :GGAATTCCATATGTCCTTACAACGTTATCGTTCC ,3′-引物为 :GGAATTCTAGAACGCTATCATTTTAAACGTTTC。5′-端引物内含有的大肠杆菌稀有密码子改成了最嗜密码子 ,并加入 EcoRI 和 NdeI 酶切位点 ,3′-端引物加入了 XbaI 位点。

1.5 HaGV 增效蛋白基因的 PCR 扩增

按试剂盒说明操作。反应条件 :94℃ ,2min ; 94℃ ,30s ,50℃ ,45s ,72℃ ,2.5min ,5cycles ; 94℃ ,30s ,60℃ ,45s ,72℃ ,2.5min ,25 cycles ; 72℃ ,10min。

1.6 HaGV 增效蛋白基因的克隆及测序

PCR 产物及 pBluescript KS 质粒经 XbaI 和 EcoRI 酶切后 ,分别回收 ,连接 ,转化 DH5α ,蓝白斑筛选阳性克隆 ,质粒经酶切鉴定 ,获重组质粒 pBlue-En ,选合适的酶切位点构建 7 个亚克隆 ,分别用双脱氧末端终止法测序。

1.7 表达质粒 pET-30a-En 的构建及诱导表达

NdeI、NotI 和 ScaI 酶切 pBlue-En ,回收 2.7kb 片段 ,与 NdeI、NotI 酶切的 pET-30a 连接 ,转化 DH5α ,质粒经酶切鉴定 ,获重组质粒 pET-30a-En。将此质粒转入 BL21 (DE3) ,在含 100μg/mL 卡那霉素的 LB 培养液中 ,37℃ 培养过夜 ,按 1:100 放大培养至 OD₆₀₀ = 0.6~0.7 时 ,加 IPTG 至终浓度 2mmol/L ,37℃ 诱导 8h。SDS-PAGE 检测。

1.8 包涵体的破碎及纯化

收集诱导表达的菌液 ,5000g 离心 5min ,弃上清 ,适量水重悬后超声波破碎 ,12000g 离心 10min ,2mol/L NaCl 洗涤沉淀 ,重悬 30min ,12000g 离心 10min ,0.5% TritonX-100 及 4mol/L 尿素同上洗涤 ,重悬于适量水中。

1.9 生物测定^[11]

将 HaNPV 和表达产物(命名为 En)做 10 倍系列稀释后用血球计数板计数。设(1)为 N₄ :即 HaNPV 2.0×10^4 PIBs/mL (polyhedra inclusion body ,多角体) (2)为 N₆ :即 HaNPV 2.0×10^6 PIBs/mL (3)为 N₄En :即 HaNPV 2.0×10^4 PIBs/mL + En 4.4×10^7 IBs/mL (inclusion body ,包涵体) (4)为 N₆En :即 HaNPV 2.0×10^6 PIBs/mL + En 4.4×10^7 IBs/mL

mL 4 个处理。另设单蒸水对照和 $En4.4 \times 10^7$ IBs/mL 对照。将棉铃虫 3 龄初幼虫单头饲养于 12 孔 COSTAR 细胞培养皿中,每孔加少许人工饲料,并加 $10\mu\text{L}$ 上述各处理液于饲料上。幼虫取食 24h 后补加足量新鲜人工饲料。每个处理 20 头幼虫,重复三次。每天观察并记录死亡和存活虫数。增效效果用联合计算法 $(Me - Mt) = Me - [P_1 + P_2(1 - P_1)]$ 公式计算。查表将死亡率换算成机率值,与感染后天数建立回归方程,计算 LT_{50} 值。

2 实验结果

2.1 PCR 产物与质粒 pBlue-En 的鉴定

如图 1 所示,PCR 产物电泳结果显示在 2.7kb 附近出现特异的单一 DNA 条带。酶切回收后的 PCR 产物与酶切的克隆载体 pBluescript 连接,转化 DH5 α ,X-gal 筛选,挑取白斑,重组质粒用 *Xba*I 和 *Eco*RI 酶切,显示有 2.7kb 的片段插入。

2.2 DNA 序列分析

7 个亚克隆测序拼接后 DNA 序列与已发表序列相比较不同的核苷酸及改变的氨基酸见表 1,除 PCR 引物内改变的核苷酸序列外,我们从中国本土的棉铃虫颗粒体病毒中克隆的增效蛋白基因 DNA 序列中有 8 个核苷酸与 Genbank(D28558)已发表的来自美国棉铃虫颗粒病毒的增效蛋白基因不同,相对应的,有 5 个氨基酸与之不同。这表明,增效蛋白基因存在着一定的变异。

表 1 中国棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白基因与美国的相比不同的碱基及改变的氨基酸

Table 1 Different bases and amino acids between HaGV enhancin gene from China and that from USA

The sites of changed bases and amino acids	456	766	838	1081	1153	1338	2206	2565
		(256)	(280)	(361)	(385)		(736)	
HaGV enhancin (USA)	G	T(V)	A(T)	T(L)	T(I)	C	A(D)	T
HaGV enhancin (CHINA)	C	(A)	(A)	(S)	(T)	G	(G)	G

2.3 原核表达质粒 pET-30a-En 的鉴定

将测序证实的质粒 pBlue-En 经 *Nde*I、*Not*I 和 *Sca*I 酶切后回收 2.7kb 片段,定向插入 pET-30a 多克隆位点 *Nde*I 和 *Not*I 之间,转化 DH5 α ,重组质粒用 *Nde*I 和 *Not*I 酶切,可获得 2.7kb 的插入片段(图 1)。

2.4 重组增效蛋白基因的表达式与 SDS-PAGE 鉴定

将酶切证实的表达质粒 pET-30a-En 转入大肠杆菌 BL21(DE3)中,挑选转化子进行诱导表达。由于蛋白较大,表达量较低,蛋白表达带不是很明显,超声波破碎处理后发现

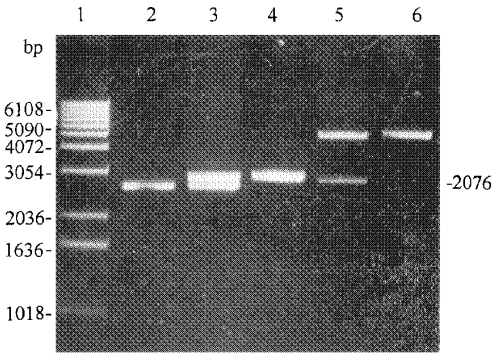


图 1 PCR 产物及重组质粒鉴定

Fig. 1 Identification of PCR product and recombinant plasmids

1. 1kb DNA ladder marker ; 2. PCR product of enhancin DNA ; 3. pBlue-En cut with *Xba*I and *Eco*RI ; 4. pBluescript KS cut with *Eco*RI ; 5. pET-30a-En cut with *Nde*I and *Not*I ; 6. pET-30a cut with *Nde*I.

含重组质粒的菌株有包涵体出现 ,而含空质粒的对照菌株没有包涵体出现(未显示), SDS-PAGE 分析及 Western blot 表明 ,含重组质粒的菌株形成的包涵体正是重组增效蛋白基因的诱导表达产物(见图 2 及 3)。

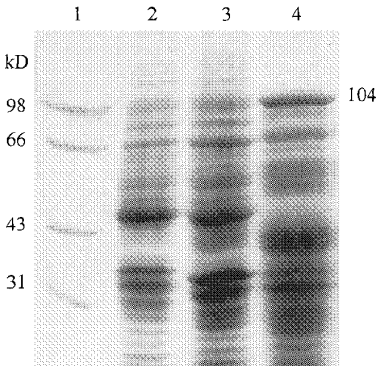


图 2 HaGV 增效蛋白基因在大肠杆菌中的表达及 SDS-PAGE 分析

Fig.2 Expression of HaGV enhancin gene in *E. coli* and SDS-PAGE analysis

1. Protein marker ; 2. Induced pET-30a/BL21(DE3) ;
3. Induced pET-30a-En/BL21(DE3) 4. Inclusion body from broken induced pET-30a-En/BL21(DE3).

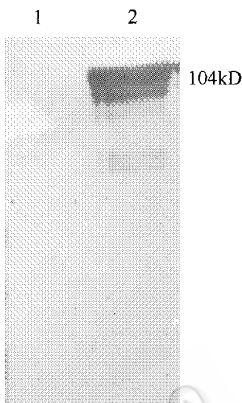


图 3 大肠杆菌诱导表达的 HaGV 增效蛋白包涵体的 Western Blot 分析

Fig.3 Western Blot of HaGV enhancin inclusion body from induced pET-30a-En/BL21(DE3)

1. Induced pET-30a/BL21(DE3) ; 2. Inclusion body from broken induced pET-30a-En/BL21(DE3).

2.5 重组增效蛋白基因表达产物的生物测定

结果如表 2 ,尽管增效蛋白自身未对幼虫产生致死效应 ,但可提高 HaNPV 对棉铃虫 3 龄幼虫死亡率 31.7% ~ 34.1%。由死亡机率值方程 ,得到 N4En 处理的 LT₅₀为 5.5d , N6En 处理的 LT₅₀为 4.9d ,而 7d 时 N4 及 N6 处理的累积死亡率小于 50% ,因此 ,在这两个 HaNPV 浓度下 ,增效蛋白可分别缩短 LT₅₀ 1.5d 和 2.1d。

表 2 重组增效蛋白对 HaNPV 感染棉铃虫的增效活性

Table 2 The synergy of recombinant enhancin on HaNPV against the larvae of *Helicoverpa armigera*

	water	En	N4	N6	N4En	N6En
Number of treated larvae	24	24	60	55	60	58
Number of dead larvae in 7 post-infection days	0	0	20	22	39*	43*
Mortality/ %	0	0	33.3	40.0	65.0	74.1

* P<0.01

3 讨论

尽管 HaGV 增效蛋白和 TnGV 增效蛋白都有 12 个可能的糖基化位点 ,但 TnGV 增效蛋白天然蛋白的含糖量很少 ,低于糖蛋白染色检出限^[3]。真核基因在原核细胞表达时一般是不能进行翻译后的糖基化修饰的 ,我们在大肠杆菌中表达的 HaGV 增效蛋白显示了较强的增效活性 ,暗示该基因翻译后是否糖基化修饰不是影响该蛋白生物活性的决定因素。增效蛋白具有金属蛋白酶活性^[10] ,体外实验证明可以降解宿主中肠围食膜上的一种粘蛋白^[14]和三种高分子量的结构糖蛋白 ,其糖基化位点可能与其对围食膜上粘蛋白和

糖蛋白的结合及降解有关^[15]。

大肠杆菌表达系统生产工艺简单,成本低,表达产物形成的包涵体稳定易纯化,对紫外线的抗性较高,可以与病毒或 Bt 混用,因而有望成为无公害的安全高效的生物防治增效剂。基因改造和提高表达量的工作正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] Tanada Y. *J Insect Pathol* ,1959, **1** 215~231.
- [2] Corsaro B G, Gijzen M R, Wang P, *et al.* (Beckage N E ed). *Parasites and pathogens of Insects*. New York : Academic press, 1993. 127~145.
- [3] 刘 强, 丁 翠, 蔡秀玉. *病毒学报*, 1998, **14**(4) 352~358.
- [4] Hashimoto Y, Corsaro B G, Granados R R. *J Gen Virol* ,1991, **72** 2645~2651.
- [5] Roelvink P W, Corsaro B G, Granados R R, *et al.* *J Gen Virol* , 1995, **76** 2693~2705.
- [6] Hayakawa T, Xu J H, Hukuhara T. *Gene* ,1996, **177** 269~270.
- [7] Bischoff D S, Slavicek J M. *J Virol* ,1997, **71** 8133~8140.
- [8] Yunovitz H, Sneh B, Schuster S *et al.* *J Invertebr Pathol* ,1986, **48** 223~231.
- [9] Gijzen M, Roelvink P, Granados R. *J Invertebr Pathol* ,1995, **65** 289~294.
- [10] Lepire L S, Roelvink P R, Granados R R. *J Invertebr Pathol* ,1996, **68** 131~140.
- [11] 陈年春. *农药生物测定技术*. 北京 北京农业大学出版社, 1991. 10~27.
- [12] Gallo L G, Corsaro B G, Hughes P R, *et al.* *J Invertebr Pathol* ,1991, **58** 203~210.
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, (金冬雁等译). *分子克隆实验指南*. 第二版. 北京 科学出版社, 1992. 891~898.
- [14] Wang P, Granados R R. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1997, **94** 6977~6982.
- [15] Derksen A G, Granados R R. *Virology* ,1988, **167** 242~250.

MOLECULAR CLONING OF ENHANCIN GENE FROM *HELICOVERPA ARMIGERA* GRANULOSIS VIRUS AND ITS EXPRESSION IN *E. COLI* *

Liu Xiangguo Yang Gong Qiu Bingsheng* * Tian Po

(Dept. of Molecular Virology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract : In order to provide recombinant enhancin for studying its mechanism of increasing the mortality of larvae infected by HaNPV and creating new insecticide, enhancin gene from *Helicoverpa armigera* granulosis virus was amplified by PCR technique. 2.7kb fragment of enhancin gene was cloned into *EcoRI/XbaI* site of plasmid pBluescript KS. Sequence analysis revealed that enhancin gene was similar with that reported in the literature except eight nucleotides and five amino acids. Thereby enhancin gene was inserted into vector pET-30a and expressed successfully in *Escherichia coli* BL21(DE3). The preliminary bioassay of expressed product and HaNPV indicated that mortality of larvae increased 31.7%~34.1% in 7 post-infection days and the LT₅₀ decreased at least 1.5~2.1 days.

Key words : *Helicoverpa armigera* granulosis virus, Enhancin, Molecular cloning, Bioassay

* Supported by great application research and development project, CAS.

** Author for correspondence.