

棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白基因 5'端截短 片段的表达及增效活性测定*

刘相国¹ 杨 恭¹ 邱并生^{1**} 张克勤² 田 波¹

(¹ 中国科学院微生物研究所分子病毒学和生物工程开放实验室 北京 100080)

(² 云南大学工业微生物重点实验室 昆明 650091)

摘 要:将带有棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白(HaGV enhancin)基因的重组表达载体 pET-30a-En 分别用 *Bal* I 和 *Dra* I 酶切后连接,构建重组表达载体 pET-30a-Ben 和 pET-30a-Den,其外源基因的开放阅读框分别为 HaGV 增效蛋白基因 5'端的 1.7kb 和 2.2kb。IPTG 诱导表达产生 66.7kD 和 85.1kD 的多肽并命名为 Ben 和 Den。初步纯化的 Ben 和 Den 显示了对棉铃虫核多角体病毒(HaNPV)及 Bt 的增效活性。Ben 可对棉铃虫核多角体病毒增效 10.5%~26.5%,LT₅₀缩短 0.9d,Den 增效 10.2%~33.0%,LT₅₀缩短 1.2d~1.9d。重组增效蛋白可对 Bt(1:2500 稀释)增效 20.7%~35.4%,Den 增效 16.7%~31.5%,Ben 增效 11.7%~27.4%。这为进一步研制抗虫工程菌打下了良好的基础。

关键词:棉铃虫颗粒体病毒, 增效蛋白, HaNPV, Bt, 增效活性

中图分类号:S432.4 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2001)02-0167-06

杆状病毒是病毒粒子为杆状、有囊膜的双链 DNA 病毒,是昆虫病毒中最大的一类。主要感染鳞翅目、双翅目和膜翅目昆虫。核型多角体病毒属于杆状病毒的 A 亚组,颗粒体病毒属于杆状病毒的 B 亚组。杆状病毒可作为极有潜力的昆虫病毒杀虫剂应用于害虫生物防治,并可作为基因工程高效表达载体表达外源基因,因而愈来愈受到人们重视。

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, Corsaro 等将这类蛋白称为增效蛋白(enhancin)^[1~3]。增效蛋白对苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)也有增效作用^[4]。后来又陆续在其他一些昆虫病毒基因组中发现了增效蛋白的同源基因^[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,使病毒更容易进入体腔;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^[9~13]。昆虫病毒增效蛋白的这种杀虫增效活性,在农业生产上有着广阔的应用前景,如利用体外高效表达体系表达增效基因作为杀虫增效剂或在植物中直接表达后在病毒的作用下提高幼虫感染率和致死率。研究棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)颗

* 国家自然科学基金(939970503)和云南省计委高技术项目(1699-262)资助

** 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:2000-06-19,修回日期:2000-09-19

粒体病毒包涵体中的增效蛋白增效机理对于寻找新的抗虫源和新的抗虫策略具有一定的理论意义和应用价值。HaGV 增效蛋白基因 ORF 为 2706bp, 编码 902 个氨基酸, 分子量 104kD 左右, 属晚期表达基因^[5]。我们克隆了该基因并在大肠杆菌中成功表达^[14]。为研究该基因一级结构和蛋白功能的关系, 寻找该蛋白的功能域, 本文报导该基因 5' 端的两个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进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

含 HaGV 全长增效蛋白基因的带 T7 启动子的重组质粒 pET-30a-En 由本实验室构建; 棉铃虫及棉铃虫颗粒体病毒、棉铃虫核多角体病毒、菌株 DH5 α 和 BL21(DE3) 为本室保存; 工具酶类购自 TaKaRa 公司。苏芸金杆菌制剂(Bt)由赵长生老师惠赠。

1.2 棉铃虫人工饲料饲养见文献[15]

1.3 表达质粒 pET-30a-Ben 及 pET-30a-Den 的构建及诱导表达

质粒分别经 *Bal* I 和 *Dra* I 酶切, 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收大片段, 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 质粒经酶切鉴定, 获重组质粒 pET-30a-Ben 和 pET-30a-Den。将这两个质粒分别转入 BL21(DE3)。挑取单菌落在含 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 按 1:100 放大培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.7$ 时, 加 IPTG 至终浓度 2mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导 6h, SDS-PAGE 检测。

1.4 细胞的破碎及蛋白的纯化

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, 12 000g 离心 10min, 2mol/L NaCl 洗涤沉淀, 重悬 30min, 12 000g 离心 10min, 0.5% TritonX-100 及 4mol/L 尿素同上洗涤, 蒸馏水洗涤后重悬于适量水中。

1.5 Western Blot 见文献[16]

电泳回收 HaGV 增效蛋白, 常规方法免疫兔子制备抗血清, 辣根过氧化物酶标记的蛋白 A 为本实验室制备^[17], 一抗与 HRP 标记蛋白 A 均为 1:1000 稀释。

1.6 对棉铃虫核多角体病毒(HaNPV)增效的生物测定

将 HaNPV 和表达产物(分别命名为 Ben 和 Den)做 10 倍系列稀释后用血球计数板计数。设 N4 为 HaNPV 2.0×10^4 PIBs/mL (polyhedra inclusion body, 多角体) N6 为 HaNPV 2.0×10^6 PIBs/mL。Ben6 为 Ben 4.0×10^6 IBs/mL (inclusion body, 包涵体) (Ben7, Ben8, Den6, Den7, Den8 与之类似)。组合 N4Ben6 为 HaNPV 2.0×10^4 PIBs/mL + Ben 4.0×10^6 IBs/mL (其余的 Ben、Den 与 HaNPV 的组合与之类似)。另设蒸馏水对照和 Ben 和 Den 对照。将棉铃虫 3 龄初幼虫单头饲养于 12 或 24 孔 COSTARTM 细胞培养皿中, 每孔加少许人工饲料, 并加 10 μ L 上述各处理液于饲料上。幼虫取食 24 小时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 $(Me-Mt) = Me \cdot [P_1 + P_2(1-P_1)]$ 公式计算^[15]。

1.7 对 Bt 增效的生物测定

Bt 商品制剂以 1:2500 稀释。BtEn6 (En 即重组全长 HaGV Enhancin) 为 Bt + En 4.0×10^6 IBs/mL。 (其余的 En、Ben、Den 与 Bt 的组合与之类似)。另设蒸馏水及 Bt 对照。将棉铃

虫 3 龄初幼虫单头饲养于 24 孔 COSTAR 细胞培养皿中,每孔加少许人工饲料,并加 10μL 上述各处理液于饲料上。每个处理 30 头幼虫,重复三次。48 小时后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^[15]。

2 结果和分析

2.1 原核表达质粒 pET-30a-Ben 和 pET-30a-Den 的鉴定

pET-30a 质粒上没有 *Bal* I 和 *Dra* I 位点。棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白基因在 1705bp 和 2495bp 处有两个 *Bal* I 酶切位点,*Bal* I 酶切去 790bp,连接之后的序列长 1916bp,但由于 3' 端发生移码,1707bp 后又编码 5 个与增效蛋白基因不一致的氨基酸之后,出现了终止子 TAA,因此该截短基因的 ORF 实际编码 573 个氨基酸,蛋白分子量 66.7kD。增效蛋白基因在 2180bp 和 2690bp 处有两个 *Dra* I 酶切位点,*Dra* I 酶切切去 510bp,连接之后的序列长 2196bp,由于密码子没有发生移码,因而该截短基因的 ORF 编码 732 个氨基酸,相当于缺失掉 729~898 氨基酸,蛋白分子量 85.1kD。pET-30a-Ben 和 pET-30a-Den 用 *Nde* I 和 *Not* I 酶切,可分别切出 1.9kb 和 2.2kb 的片段,表明这两个质粒构建正确(图 1)。

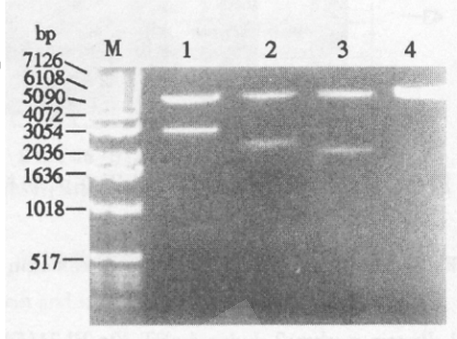


图 1 重组质粒 *Nde*I 和 *Not*I 酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmids

pET-30a-Den and pET-30a-Ben cut with *Nde* I and *Not* I

1. pET-30a-Ben; 2. pET-30a-Den; 3. pET-30a-Ben; 4. pET-30a.

2.2 重组截短形式增效蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 鉴定

将酶切证实的表达质粒 pET-30a-Ben 及 pET-30a-Den 转入大肠杆菌 BL21(DE3)中,挑选转化子进行诱导表达。诱导后的菌体经超声波破碎处理后发现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 电泳分析及 Western blot 表明,含重组质粒的菌株形成的包涵体正是重组截短形式增效蛋白基因的诱导表达产物(见图 2 及 3)。Gijzen 等从 TnGV 中分离增效蛋白时发现降解现象发生^[8],从图 3 中可看出,Den 和 Ben 蛋白亦有部分降解。

2.3 重组截短形式增效蛋白基因表达产物对 HaNPV 的增效活性

见图 4,尽管重组截短形式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。Ben 和 Den 在一定的核多角体病毒浓度下,不同施用量的效果有差别。在 N4 浓度下,Ben6、Ben7 与 Ben8 可分别提高幼虫死亡率 10.5%、11.4% 和 14.1%;Den6、Den7 与 Den8 可分别提高幼虫死亡率 12.2%、28.2% 和 33.0% ($P < 0.05$);在 N6 浓度下 Ben6、Ben7 与 Ben8 可分别提高幼虫死亡率 10.1%、20.3% 和 26.5%;Den6、Den7 与 Den8 可分别提高幼虫死亡率 10.2%、25.3% 和 30.6% ($P < 0.05$)。由死亡机率值方程,得到 N6Ben7 处理的 LT_{50} 为 6.1d,N6 处理的 LT_{50} 为 7.0d,因此,在 N6 浓度下,Ben 可缩短 LT_{50} 0.9d;N4Den7 处理的 LT_{50} 为 5.8d,N6Den7 处理的 LT_{50} 为 5.1d,N6 处理的 LT_{50} 为 7.0d,而 N4 处理在 7.0d 时累积死亡率小于 50%,因此,

在 N4 和 N6 浓度下,Den 可分别缩短 LT_{50} 1.2d 和 1.9d。

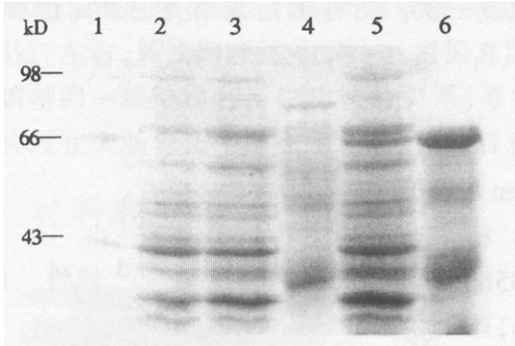


图 2 HaGV enhancin 截短基因在大肠杆菌中的表达

Fig.2 Expression of HaGV truncated enhancin gene in *E. coli*

1. Protein marker;2. Induced pET-30a/BL21(DE3);
3. Induced pET-30a-Den/BL21(DE3);4. Inclusion body from induced pET-30a-Den/BL21(DE3);
5. induced pET-30a-Ben/BL21(DE3);6. inclusion body from induced pET-30a-ben/BL21(DE3).

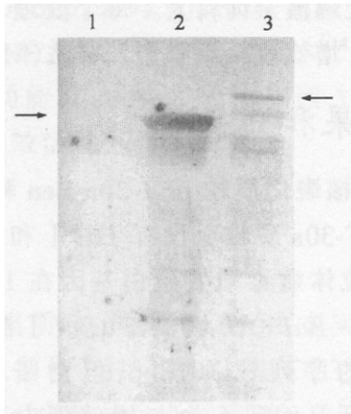


图 3 大肠杆菌诱导表达的 Ben 和 Den 包涵体的 Western Blot 分析

Fig.3 Western Blot analysis of Den and Ben inclusion body from induced *E. coli*

1. induced pET-30a/BL21(DE3);
2. inclusion body from induced pET-30a-Den/BL21(DE3);
3. inclusion body from induced pET-30a-Ben/BL21(DE3).

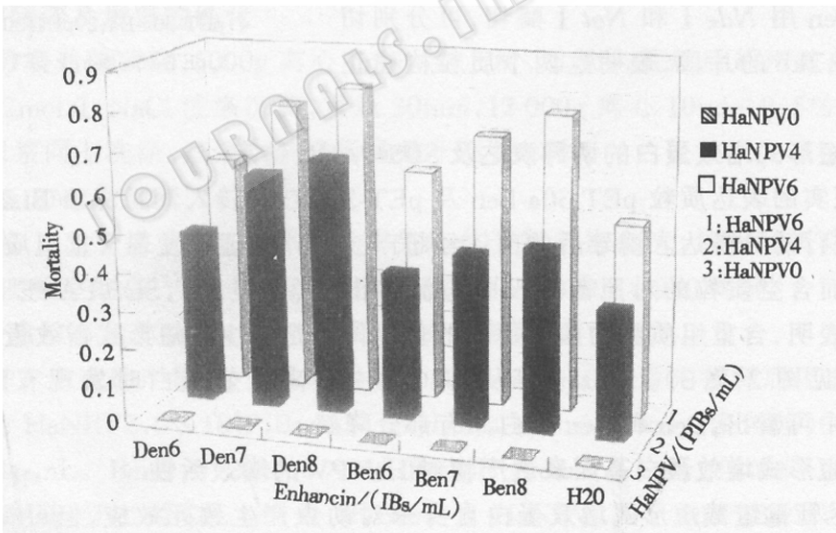


图 4 截短增效蛋白对 HaNPV 的增效活性

Fig.4 Synergistic activity of the truncated HaGV enhancin against HaNPV

2.4 重组增效蛋白及其截短形式基因表达产物对 Bt 的增效活性测定

重组增效蛋白及其截短形式对 Bt 的增效作用见图 5,En(重组全长增效蛋白^[14])、Ben 和 Den 在一定的 Bt 浓度(1:2500 稀释)下,不同施用量的效果有差别。BtEn6、En7、BtEn8 可分别提高幼虫死亡率 20.7%、31.0% 和 35.4%;BtDen6、BtDen7、BtDen8 可分别提高幼虫死亡率 16.7%、25.0% 和 31.5%;BtBen6、BtBen7、BtBen8 可分别提高幼虫死亡率 11.7%、21.2% 和 27.4%,由此可见,增效活性与施用的增效蛋白的量呈正相关。

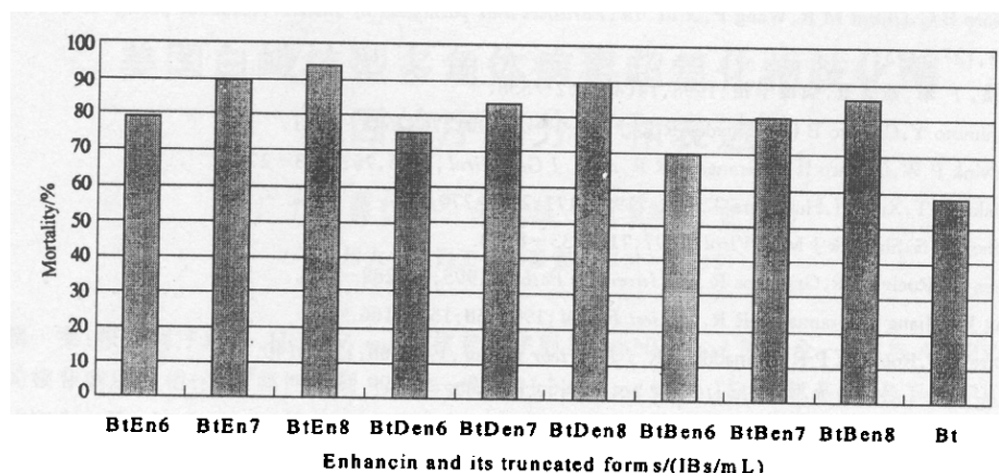


图5 全长及截短增效蛋白对 Bt 的增效活性

Fig. 5 Synergistic activity of the recombinant HaGV enhancin and its truncated forms against Bt

3 讨论

不同增效蛋白的氨基酸序列在不同区域其同源性存在着较大差异, TnGV(粉纹夜蛾颗粒体病毒)、PuGV(粘虫颗粒体病毒)、HaGV 三种颗粒体病毒的增效蛋白氨基酸序列 1~550 的同源性为 89%, 551~901 的同源性为 69%^[4~5], XcGV 增效蛋白与 HaGV 增效蛋白前 260 个氨基酸序列相比, 只有 9 个不同。这表明, 增效蛋白 N 端的氨基酸对其生物学活性比 C 端的重要, 其功能域很可能在高同源性的 N 端, 我们的实验结果与此猜测相符。刘平等将粉纹夜蛾颗粒体病毒增效蛋白 C-端 2.2kb 片段在大肠杆菌中得到了以包涵体形式的表达, 包涵体与核型多角体病毒混合进行生物测定, 表达产物可对核型多角体病毒增效 37.3%^[18], 这似乎说明增效蛋白的 N 端一部分区域对增效活性并不是绝对必需的, 由于粉纹夜蛾颗粒体病毒增效蛋白和棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白的氨基酸序列存在一定的差异, HaGV 增效蛋白缺失 N 端部分序列后增效活性是否仍然保留, 尚需实验验证。总之, 增效蛋白功能域的研究对寻找新的抗虫源和新的抗虫策略具有重要的理论和实践意义。

重组 HaGV 增效蛋白对苏芸金杆菌制剂具有增效活性, 这对生物防治具有重要的实际意义, Bt 制剂的应用已经相当广泛, 但存在着耐药性的问题, 增效蛋白与 Bt 制剂联合施用, 可以提高抗虫效果。同时, 我们一方面可以构建具有双价抗虫效果的苏芸金杆菌工程菌, 另一方面可以将 Bt 毒素基因和增效蛋白基因同时转到植物中以提高转 Bt 基因植物的抗虫效果。

重组 HaGV 增效蛋白以包涵体的形式饲喂棉铃虫就能有生物学活性, 其机理很可能与鳞翅目幼虫中肠碱性 pH(7.8~9.5)生理环境能够打开包涵体有关, 这在生产上具有极大的应用价值。进一步研究可能对寻找新的抗虫源和新的抗虫策略提供有益的思路。

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.* In: *Parasites and pathogens of Insects*. Academic press, vol. 2. *Pathogens*. 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, 76: 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] Gijzen M, Roelvink P, Granados R R. *J Invertebr Pathol*, 1995, 65: 289~294.
- [9] Peng J X, Jiang Z, Granados R R. *J Insect Pathol*, 1996, 68: 159~166.
- [10] Lepire L S, Roelvink P R, Granados R R. *J Invertebr Pathol*, 1996, 68: 131~140.
- [11] Wang P, Granados R R. *Proc Natl Acad USA*, 1997, 94: 6977~6982.
- [12] Wang P, Granados R R. *J Invertebr Pathol*, 1998, 72: 57~62.
- [13] Derksen A G, Granados R R. *Virology*, 1988, 167: 242~250.
- [14] 刘相国, 杨恭, 邱并生, 田波. 微生物学报, 2000, 40(4).
- [15] 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
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. (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.
- [17] 徐宜为. 免疫检测技术. 第二版, 北京: 科学出版社, 1997. 167~169.
- [18] 刘平, 孟小林, 徐近平, 等. 中国生物防治. 1999, 15(4): 188~189.

EXPRESSION OF TWO TRUNCATED ENHANCIN GENE FROM HELICOVERPA ARMIGERA GRANULOSIS VIRUS IN E. COLI AND ITS RELIMINARY BIOASSAY*

Liu Xiangguo¹ Yang Gong¹ Qiu Bingsheng^{1**} Zhang Keqin² Tian Po¹

(¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

(² The Provincial Key Lab. on industrial microbiology of Yunnan Province, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: The plasmids pET-30a-Ben and pET-30a-Den which included 1.7kd and 2.2kb fragments of 5'-terminal of HaGV enhancin gene were obtained by cutting recombinant plasmid pET-30a-En with *Bal* I and *Dra* I respectively. Two fragments were expressed in *E. coli* successfully and the products were named Ben and Den respectively. The enhancement, which Ben and Den enhance the infectivity of HaNPV and Bt in 3rd larvae of *Helicoverpa armigera*, was studied. The results indicated that there was increase of the mortality of 10.5%~26.5% and the LT₅₀ decrease of 0.9d causes by adding Ben, while Den could increase the mortality by 10.2%~33.0% and decrease the LT₅₀ by 1.2d~1.9d. The preliminary bioassay on Bt against *Helicoverpa armigera* indicated the recombinant enhancin could increase the mortality of larvae by 20.7%~35.4%, Den by 16.7%~31.5%, Ben by 11.7%~27.4%.

Key words: *Helicoverpa armigera* granulosis virus, Enhancin, HaNPV, Bt, Enhancing activity

* Project of Chinese National Natural Science Fund(939970503) and Project of Planning Committee of Yunnan Province for High Technology(1699-262)

** Author for correspondence