

## 异源多角体蛋白对家蚕核型多角体病毒粒子的包装\*

季 平 查新民 张国英 于继彬 顾 维 沈卫德\*\*

(苏州大学生命科学院蚕丝生物技术实验室 苏州 215151)

**摘 要:**利用 PCR 方法从 AcMNPV 基因组 DNA 中分离出多角体蛋白基因,将该扩增片段克隆到转移载体 pBacPAK<sub>8</sub> 中,得到重组转移载体 pOAc。将该质粒 DNA 与线性化的 Bm-BacPAK<sub>8</sub> 病毒基因组 DNA 共感染 BmN 细胞,得到了能形成多角体且不产生蓝色空斑的重组病毒 hp-BmNPV。纯化该重组病毒的多角体颗粒,并对多角体蛋白、病毒核酸及多角体病毒颗粒进行分析,发现 AcMNPV 的多角体蛋白能在家蚕细胞中大量表达且能在细胞内识别家蚕核型多角体病毒并组装成多角体颗粒;病毒基因组 DNA 因部分交换,其酶切行为发生了相应的变化;电镜观察发现经 AcMNPV 多角体蛋白包装的家蚕核型多角体病毒的多角体颗粒大小为  $1.2\mu\text{m} \sim 2.9\mu\text{m}$ ,明显小于野生型家蚕核型多角体病毒的多角体颗粒。

**关键词:** 苜蓿尺蠖核型多角体病毒,多角体蛋白,家蚕核型多角体病毒,异源包装

**中图分类号:** Q812 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2002) 01-0050-06

核型多角体病毒(Nuclear Polyhedrosis Viurs,简称 NPV)是昆虫病毒中发现最早,研究较为详细的一类病毒。因该病毒是在宿主细胞核中形成且能在核内被多角体蛋白所识别并装配成六角体而得名。核型多角体病毒粒子呈杆状,故又称杆状病毒<sup>[1]</sup>。在杆状病毒基因组上有一个高效表达的晚期基因叫多角体蛋白基因,它的缺失不影响病毒的复制。根据这一特性,1983 年构建了杆状病毒载体系统<sup>[2]</sup>,我们可以用外源基因来取代该病毒基因组上的多角体蛋白基因,构建成能大量表达外源蛋白但不形成多角体的重组病毒。但随着研究的深入也发现一些急需改进的方面,如不形成多角体的重组病毒在空斑筛选时费时费力费钱,而且利用杆状病毒研制基因工程病毒杀虫剂时,如果没有多角体的产生,其经口感染效率大大降低。因此人们对多角体蛋白的作用又有了进一步认识,开发了能产生多角体的转移载体,使作为表达载体的 AcMNPV 既能用于外源基因表达又能形成病毒多角体颗粒<sup>[3]</sup>。家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV)在分类上与苜蓿尺蠖核型多角体病毒(*Autorapha californica* nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV)都是杆状病毒科的重要成员。它们在病毒整个发育过程中的生物学特性非常相似,但它们寄生的宿主却完全不同<sup>[4]</sup>。

目前 BmNPV 和 AcMNPV 的基因组序列已进行了测定,其大小分别为 128kb 和 130kb 左右<sup>[5]</sup>,从已发现的基因来看,两者同源性都在 70% 以上,有的高达 98% 以上<sup>[6]</sup>。BmNPV 和 AcMNPV 多角体蛋白基因都编码 245 个氨基酸的多肽,两者之间的核苷酸序列同源性为 78%,氨基酸序列同源性为 87%<sup>[7]</sup>。我们的实验是将 AcMNPV 的多角体蛋白基因引入

\* 江苏省教自然科学基金项目(99KJB180001);苏州大学“211 工程”标志成果项目

\*\* 为通讯作者

作者简介:季 平(1966-),男,博士,副教授,主要从事病毒分子生物学研究。

收稿日期:2001-04-16,修回日期:2001-09-07

BmNPV 基因组内利用反向法筛选重组病毒,一方面提高了识别重组病毒的准确性,同时也为多角体蛋白与病毒粒子的识别和相互作用及基因工程病毒杀虫剂的研制提供了新的手段。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒与菌株:**质粒 pBacPAK<sub>8</sub> 是杆状病毒—昆虫表达载体系统中常用的转移载体,它能利用其 AcMNPV 多角体蛋白基因两侧的同源序列将外源基因引入病毒基因组的三角体蛋白基因部位,并使外源蛋白基因受 AcMNPV 多角体蛋白基因启动子控制,由本实验室保存;实验中所用的菌株为大肠杆菌 TG<sub>1</sub>。

**1.1.2 病毒细胞与家蚕幼虫:**病毒 Bm-BacPAK<sub>6</sub> 是将野生型 BmNPV 多角体蛋白的基因用 *LacZ* 基因取代,并在其两侧各引入一个 *Bsu*36I 酶切位点,而可在体外将病毒基因组线性化,而且该病毒不能形成多角体颗粒却含有蓝色筛选标记,由中国科学院上海生物化学研究所吴祥甫课题组构建;AcMNPV 亦由吴祥甫组保存;家蚕 BmN 细胞用含 10% FBS 的 TC-100 培养基 27℃贴壁培养;家蚕五龄幼虫由本实验室提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 病毒粒子纯化及其基因组 DNA 的提取:**Bm-BacPAK<sub>6</sub> 病毒粒子的纯化是将其感染的 BmN 细胞上清液以 100 000g 超速离心 30min 即可获得,而异源多角体蛋白包装的家蚕核型多角体病毒及野生型的家蚕核型多角体病毒颗粒采用差速离心及 0.5% SDS 清洗而获得。病毒基因组 DNA 的提取参考文献<sup>[8]</sup>进行。

**1.2.2 多角体蛋白基因及其启动子的分离及克隆:**参照分子克隆实验手册<sup>[9]</sup>进行。基因扩增引物 primer1: 5'-CGGATCCTATAAATATGCCGG-3'; primer2: 5'-GCTGCAGTTTAAAT-ACGCCGG-3'由上海生物工程公司合成,PCR 反应体系为 100μL,按 PCR 扩增要求进行,反应条件为 94℃变性 2min 后,设定 94℃变性 45s,55℃退火 1min,72℃延伸 1min,进行 30 个循环。取样电泳鉴定后,用低熔点胶分离纯化目的基因片段,经 Klenow 酶补平后再用 *Bam*HI-*Sma*I 酶切,将该片段克隆到 pBacPAK<sub>8</sub> 的 *Bam*HI-*Sma*I 位点。

**1.2.3 共转染及重组病毒的获得:**参照文献<sup>[10]</sup>进行。病毒 Bm-BacPAK<sub>6</sub> DNA 经 *Bsu*36I 酶切线性化后取 1μg,与 2μg 的重组转移载体溶于 70μL 灭菌水中,再与 30μL Lepofectin 混合均匀 30min 后滴加到生长状态良好、密度适中的无血清培养基清洗后的 BmN 细胞中,4h 后补加胎牛血清到终浓度 10%,4d 后进行空斑纯化重组病毒。

**1.2.4 异源多角体蛋白在家蚕细胞中的表达:**将纯化的重组病毒空斑扩增液 100μL 接种到含 2 × 10<sup>6</sup> BmN 细胞的培养液中,同时用野生的 BmNPV 感染家蚕细胞作对照,感染 3 ~ 4d 后,取出感染细胞液,6 000r/min 离心 10min,将沉淀物用 PBS 重悬,加入等体积 0.1mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和 0.15mol/L NaCl(pH10.5)的反应液中冰浴 30min 裂解多角体,再与 2 × 上样缓冲液混合在沸水中煮 3 ~ 5min 后进行 SDS-PAGE 分析,观察外源产物表达情况。

**1.2.5 重组病毒基因组分析:**重组病毒在 BmN 细胞中扩增后以 5 × 10<sup>5</sup> pfu/蚕的剂量注射接种 5 龄起蚕,接种头数为 50 ~ 100 头,同时设野生 BmNPV 作为对照。24℃饲养 5d 后取

病蚕血淋巴。低速离心将病毒包涵体颗粒沉淀下来,然后用清水洗两次,最后用 0.5% SDS 室温作用 15min, 3000r/min 离心 10min, 沉淀用无菌水洗两次得到纯的多角体颗粒。采用碱裂解抽提病毒基因组 DNA, 经 *Xba*I 酶切后, 进行电泳分析。

**1.2.6 重组病毒多角体颗粒的电镜观察:** 纯化的经 AcMNPV 多角体蛋白包装的家蚕核型多角体病毒多角体颗粒与野生型 BmNPV 多角体颗粒悬浮在无菌水中。利用光密度法, 将两者悬浮液稀释到合适的浓度。光学显微镜下, 用血球计数板测定个数。另各取一份悬浮液经离心后沉淀出多角体颗粒, 经扫描电镜观察, 测定多角体颗粒大小, 比较两者的形态差异。

## 2 结果

### 2.1 重组转移载体 pOAc 的构建

利用 AcMNPV 病毒基因组 DNA 作为模板, 以 primer1 和 primer2 作引物, 扩增出特异的 AcMNPV 多角体蛋白基因, 片段大小约 750bp, 经低熔点胶分离纯化该片段, 再经 klenow 酶补平, *Bam*HI 酶切后, 与经 *Bam*HI-*Sma*I 酶切的 pBacPAK<sub>8</sub> 连接、转化 TG<sub>1</sub>, 筛选到插入 AcMNPV 多角体蛋白基因的重组转移载体 pOAc。其构建过程见图 1。

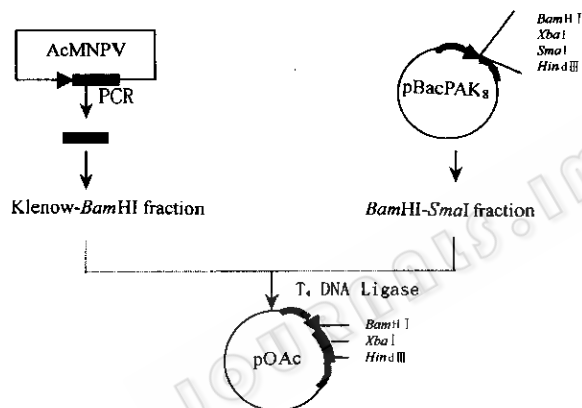


图 1 重组转移载体 pOAc 的构建

Fig. 1 Construction of the recombinant transfer vector pOAc

### 2.2 重组病毒的筛选及纯化

Bm-BacPAK<sub>6</sub> 病毒基因组 DNA 经 *Bsu*36I 酶切后使之线性化, 然后与重组转移载体 pOAc 一起用 Lepofectin 混合共转染 BmN 细胞, 在细胞内进行同源重组, 使线性化病毒重新环化而再生, 不发生重组的线性化病毒在细胞内不能增殖而被排除。27℃ 培养 4d 后, 取其共转染上清液进行空斑分析, 挑取能形成多角体且不含蓝色的空斑,

反复纯化 2~3 次, 最终得到纯化的重组病毒 hp-BmNPV, 经扩增后的病毒感染上清液作为重组病毒母液, 4℃ 保存备用。

### 2.3 异源多角体蛋白在家蚕细胞中的表达

重组病毒母液 100μL, 接种到含  $2 \times 10^6$  细胞的培养瓶中, 用野生型家蚕核型多角体病毒感染 BmN 细胞作对照, 取病毒感染液 6000r/min 离心 10min, 将细胞沉淀用原培养液 1% 的体积 PBS 重悬, 碱液裂解后再与等体积的  $2 \times$  上样缓冲液 (100mol/L Tris·HCl pH6.8, 200mmol/L DTT, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油) 混合煮沸 3~5min 后, 8000r/min 离心 10min 后, 取 10μL 上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析, 发现异源多角体蛋白在家蚕细胞中得到了较高表达, 分子量约为 31kD, 而对照的野生型家蚕核型多角体蛋白分子量为 30kD (图 2)。

## 2.4 重组病毒基因组 DNA 的酶切分析

将接种重组病毒 hp-BmNPV 后的 5 龄家蚕幼虫用新鲜桑叶在 24℃ 饲养 5d, 家蚕陆续发病。收取病蚕血淋巴低速离心, 将沉淀用无菌水洗两次, 再用 0.5% SDS 作用 30min 后再离心除上清液, 沉淀用无菌水洗两次, 即得纯化的重组病毒多角体颗粒。同时设野生型的 BmNPV 作对照。提取病毒基因组 DNA, 由于 AcMNPV 的多角体蛋白基因上有一 *Xba*I 酶切位点而家蚕核型多角体蛋白基因上无此位点, 故用 *Xba*I 酶切分析, 发现重组病毒的基因组 DNA 比野生型的 BmNPV 病毒基因组多一条带, 而其它电泳条带完全相同(图 3), 说明构建过程中带有 *Xba*I 酶切位点的 AcMNPV 多角体蛋白基因正确引入病毒基因组中。

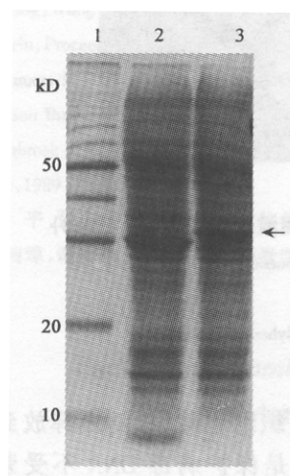


图 2 异源多角体蛋白在家蚕细胞中的表达

Fig. 2 Expression of heterologous polyhedrin protein in BmN cells

1. 10kD Marker; 2. Wild-type BmNPV in cells;
3. Extracellular fluid of hp-BmNPV-infected cells.

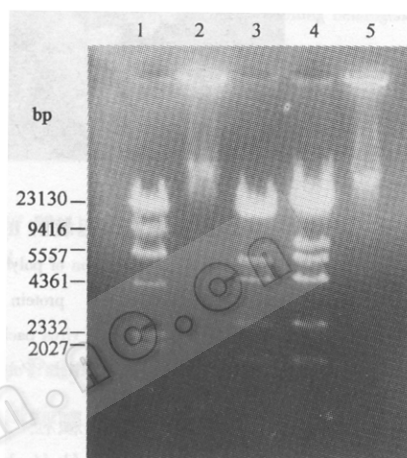


图 3 重组病毒基因组 DNA 的 *Xba*I 酶切分析

Fig. 3 Enzyme analysis of hp-BmNPV DNA by *Xba*I

1.  $\lambda$ DNA/*Hind*III; 2. hp-BmNPV DNA;
3. hp-BmNPV DNA/*Xba*I;
4. BmNPV DNA/*Xba*I; 5. BmNPV DNA.

## 2.5 重组病毒多角体颗粒的电镜观察

将纯化的重组病毒多角体用无菌水悬浮, 同时设野生的 BmNPV 多角体做对照, 测定 280nm 和 260nm 的光吸收值, 以  $OD_{260}$  作为标准, 用无菌水适当稀释将两者调整到相同的  $OD_{260}$  值, 发现在相同  $OD_{260}$  的情况下两者的多角体数目有明显的差异, 前者为  $3.32 \times 10^9$  PIB/mL, 而对照的为  $2.53 \times 10^9$  PIB/mL。同时在光学显微镜下发现前者颗粒匀整细小, 后者颗粒较大且不均匀。电镜观察发现经 AcMNPV 多角体蛋白包装的多角体颗粒大小为  $1.2\mu\text{m} \sim 2.9\mu\text{m}$ (图 4 右), 而野生型的 BmNPV 多角体颗粒大小为  $2.0\mu\text{m} \sim 4.0\mu\text{m}$ (图 4 左)。

## 3 讨论

家蚕核型多角体病毒(BmNPV)和苜蓿尺蠖核型多角体病毒(AcMNPV)基因组都是双链环状 DNA 大分子, 在宿主体内整个发育过程中会产生两种表型的病毒粒子, 芽生病毒(BV)和多角体衍生病毒(PDV), 其中的芽生病毒能作为二次感染源, 在同一个体内能引起细胞到细胞、组织到组织之间的传播, 而多角体衍生病毒是在细胞核内被病毒自身表达的

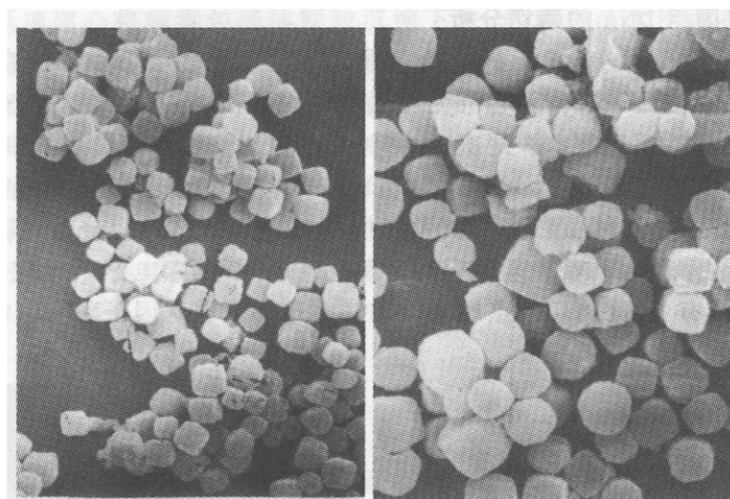


图 4 异源多角体蛋白包装的 hp-BmNPV 的多角体颗粒的电镜观察(X3000)

Fig.4 Observation of polyhedra packaged by heterogoneous polyhedrin protein by electron microscopy

Left: Polyhedra of virus packaged by heterogeneous polyhedrin protein;

Right: Polyhedra of wild-type virus.

多角体蛋白识别并装配成多角体颗粒<sup>[1]</sup>,在宿主死亡后组织细胞破裂,随之释放到环境中引起个体之间的垂直传播。多角体的主要功能一般认为是保护病毒 DNA 不受紫外线辐射及核酸酶降解的影响,对病毒粒子的结构组分起保护作用,使病毒粒子在环境中保持稳定,以利于病毒在昆虫个体之间或世代之间传播扩散。然而基因工程技术的发展对多角体蛋白的功能研究提供了更多的方法和手段,增强了我们对多角体蛋白功能的认识。多角体蛋白基因缺失的重组病毒,其经口感染的效率要降低 1000 ~ 10000 倍<sup>[11]</sup>,这从一个侧面也说明了多角体蛋白与病毒的口服感染有密切关系。这对基因工程病毒杀虫剂的研究提供了一个非常重要的信息,重组病毒杀虫剂必须要有多角体蛋白基因,多角体蛋白是病毒经口感染所必需的。

家蚕 BmNPV 多角体蛋白基因由 245 个氨基酸组成,富含疏水性氨基酸、二羧酸及酰胺,分别占 50% 与 23%,多角体蛋白一级结构很具特色,高度保守序列与反复易变序列并存。根据一级结构及各区段理化性质的研究可将多角体蛋白肽链分成四个功能区<sup>[4]</sup>。1 ~ 88 为蛋白-核酸互作区,89 ~ 118 为蛋白-蛋白互作区,119 ~ 186 为蛋白-酶互作区,187 ~ 245 为蛋白-蛋白互作区。我们将具有一定同源性的 AcMNPV 的多角体蛋白基因引入缺失自身多角体蛋白基因的家蚕核型多角体病毒基因组中,发现了异源多角体蛋白能识别 BmNPV 病毒粒子并装配成含病毒的多角体颗粒,其颗粒大小为  $1.2\mu\text{m} \sim 2.9\mu\text{m}$ ,介于野生型 AcMNPV(大小为  $0.8\mu\text{m} \sim 1.8\mu\text{m}$ )和 BmNPV(大小为  $2.0\mu\text{m} \sim 4.5\mu\text{m}$ )之间。这说明多角体的大小和形态取决于多角体蛋白的一级结构,多角体蛋白的构象调节病毒粒子的包埋过程。此外我们也发现了多角体蛋白的种类也与病毒经口感染的特性有密切关系<sup>[7]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] 吕鸿声.昆虫病毒与昆虫病毒病.北京:科学出版社,1982.
- [2] Smith G E, Summers M D, Fraser M J. *Molecular and Cellular Biology*, 1983, 3: 2156 ~ 2165.
- [3] Wang X, Voi B G, Miller L K. *Gene*, 1991, 110: 131 ~ 137.
- [4] 吕鸿声.昆虫病毒分子生物学.北京:中国农业科学技术出版社,1998.
- [5] Ayres M D, Howard S C, Kuzio J, et al. *Virology*, 1994, 202: 586 ~ 605.
- [6] Majima K S, Meeda S. Complete nucleotide sequence of the 128413 bp-long genome of baculovirus BmNPV. Genbank accession No. L33180, 1996.
- [7] Ji Ping, Wang Wenbing, He Jialu, et al. Infectivity of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus containing heterogeneous polyhedrin. Proceedings Vectors and CISC-174-177, 2000.
- [8] Summers M D, Smith G E. A manual of methods for baculovirus insect cell culture procedures. Texas: Agriculture Experimental Station Bulletin, 1989. 1555.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [10] 季 平, 张志芳, 何家禄, 等. 生物化学与生物物理学报, 1997, 29, (1): 17 ~ 23.
- [11] 王珣璋, 谢伟东, 苏德明, 等. 病毒学报, 1991, 7(3): 253 ~ 261.

## Package of *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus with Heterogeneous Polyhedring Protein

Ji Ping   Zha Xinmin   Zhang Guoying   Yu Jibin   Gu Wei   Shen Weide

(College of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215151)

**Abstract:** Cloning the segment of polyhedrin gene which was separated from AcMNPV genome DNA by PCR method into transfer vector pBacPAK<sub>8</sub>, we got recombinant transfer vector pOAc, then cotransfecting BmN cells with the vector and linear virus Bm-BacPAK6, harvested recombinant virus hp-BmNPV which can produce polyhedrin but no blue plaques. Analysing of recombinant virus from polyhedrin, recombinant viral DNA and polyhedra, we confirmed that polyhedring of AcMNPV can be not only high-level expressed in BmN cells, But can recognize recombinant BmNPV DNA and assemble them to polyhedra. We observed that the pattern of restriction enzyme changed due to DNA recombination, the size of recombinant viral polyhedron (1.2—2.9 $\mu$ m) was obviously smaller than those of wild-type BmNPV by electron microscopy.

**Key words:** *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, Polyhedring, *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, Heterogeneous package