

表达蝎毒素的重组斜纹夜蛾核型多角体病毒 (SplMNPV) 的构建及毒力

汤欣欣¹ 孙兴鲁² 浦冠勤² 王文兵³ 张传溪⁴ 秦启联⁵ 朱江^{1*}

¹苏州大学医学部基础医学与生物科学研究院, 苏州 215123

²苏州大学金螳螂建筑与城市环境学院, 苏州 215123

³江苏大学生命科学研究院, 镇江 212013

⁴浙江大学昆虫科学研究所, 杭州 310058

⁵中国科学院动物研究所, 北京 100101

摘要: 【目的】开发高毒力的重组斜纹夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus, SplMNPV) 杀虫剂。【方法】构建编码蜕皮激素 UDP-葡萄糖基转移酶 (ecdysteroid UDP-glucosyl transferase gene, *egt*) 基因缺失并插入东亚钳蝎神经毒素 (*B. martensi* Karsch, *BmK ITa1*) 基因的重组转移载体, 重组转移载体与 SplMNPV II 基因组 DNA 共转染斜纹夜蛾细胞, 通过荧光斑法与有限稀释法相结合筛选重组病毒。【结果】成功筛选出缺失 *egt* 基因的、早期启动子 (*ie-1*) 启动的、表达 *BmK ITa1* 成熟肽的重组病毒 SplMNPV- Δegt -*Pph-egfp-ie-1-BmK ITa1*。生物测定结果显示, 重组病毒的杀虫速度 (LT_{50}) 较野生病毒提前 0.7-0.8 d。【结论】通过在 SplMNPV 病毒基因组中插入外源毒素基因可明显增强病毒的杀虫效果, 结果说明开发高毒力 SplMNPV 生物杀虫剂具有可行性。

关键词: 斜纹夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus, SplMNPV), 东亚钳蝎神经毒素基因 (*B. martensi* Karsch, *BmK ITa1*), 蜕皮激素 UDP-葡萄糖基转移酶基因 (ecdysteroid UDP-glucosyl transferase gene, *egt*), 重组杆状病毒

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 11-1502-08

杆状病毒作为一种潜在生物杀虫剂, 已经被成功用于农作物和森林害虫的生物防治。但是野生的杆状病毒杀虫剂杀虫速度慢, 寄主范围窄, 对紫外线敏感, 需要活体增殖等缺点限制了其作为生物防治因子的广泛应用^[1]。通过基因工程方法改造杆状病毒可以增强其杀虫效果^[2]。研究表明, 删除病毒基因组中某些非必需基因如编码蜕皮激素 UDP-

葡萄糖基转移酶 (ecdysteroid UDP-glucosyl transferase gene, *egt*) 基因可提高病毒的杀虫效果。最著名的例子是将苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcNPV) 基因组中 *egt* 基因删除可明显增强重组病毒的杀虫速度^[3-5]。另外, 在病毒基因组中插入外源毒素基因 (如鳞、蝎、蜘蛛及蜂毒的神经毒素基

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070136); 苏州市科技支撑计划项目 (SNG0924)

* 通信作者。Tel: +86-512-65880278; E-mail: zjiang@suda.edu.cn

作者简介: 汤欣欣 (1986-) 女, 江苏连云港人, 硕士研究生, 研究方向: 昆虫病毒分子生物学。E-mail: alicetangsz@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-05-13; 修回日期: 2011-06-29

因) 苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 毒素基因,昆虫激素基因,蛋白酶抑制剂基因,组织蛋白酶基因等,可提高病毒作用速度,加速宿主昆虫死亡或提早停止进食^[6]。Chen^[7]等在棉铃虫核型多角体病毒 (*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, HearNPV) 的 *egt* 位点插入了 AaIT 毒素基因,得到重组病毒 HaCXW2,其对 2 龄棉铃虫幼虫的杀虫速度 (LT_{50}) 提高了 32%。

选择合适的病毒启动子启动外源基因在重组病毒中的表达,对于构建和筛选高毒效、安全的重组基因工程杆状病毒起着重要的作用。现今遗传工程杆状病毒杀虫剂的研制主要利用 *p10*、多角体这些晚期强启动子表达外源基因,具有较高的表达水平并且持续时间长^[8-9]。另外,邓小昭等将新霉素抗性基因 (*neo*) 插入苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcNPV) *ie-1* 基因启动子下游,*neo* 基因在受染细胞内从早期到晚期均可发生转录^[10]。Jarvis 等构建了由 AcNPV 的 *ie-1* 启动子控制的表达 AaIT 的重组病毒,发现在重组病毒感染细胞 4 h 后检测到了 AaIT 蛋白表达。到感染后 24 h, AaIT 累积表达的量 and 由 *p10* 启动子控制的 AaIT 的表达量相当。结果表明, *ie-1* 启动子能够较早的启动外源基因表达,并且表达量较高。生物测定结果显示, *ie-1* 控制的表达 AaIT 的重组病毒杀虫速度较野生病毒快,但比 *p10* 启动子控制的表达 AaIT 的重组病毒慢,但 *ie-1*-AaIT 感染的幼虫比 *p10*-AaIT 感染的幼虫小,表明 *ie-1*-AaIT 重组病毒在虫体内较早的表达毒素蛋白使幼虫提早停止进食^[11]。东亚钳蝎昆虫神经毒素 (*B. martensi* Karsch, *BmK ITa1*) 由 21 个氨基酸组成的信号肽、61 个氨基酸组成的成熟肽以及 C 端 3 个碱基 (GKK) 组成,经酰基化酶激活后对家蚕有较高的杀虫活性。其对昆虫有专一性麻痹致死作用,能专一地作用于昆虫而对动物无害或毒性很小,因此可利用此昆虫特异性的蝎神经毒素来开发新型的生物杀虫剂^[12-13]。

斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*, Spli) 是我国重要的农林害虫,国内各省区均有分布。同时在日本、朝鲜、印度以及东南亚地区经常造成严重危害和巨大经济损失^[14-15]。尽管我国登记的 28 个病毒杀虫剂产品中有斜纹夜蛾核型多角体病毒,但杀虫速度慢、对紫外线敏感、宿主对病毒杀虫剂产生抗性等局限

性在一定程度上制约了生物农药的发展进程和应用范围^[16]。因此,应用 DNA 重组技术,改造野生病毒,增强病毒的杀虫效率,扩大病毒的宿主域已成为病毒杀虫剂研制的热点和方向。Kamiya 等从日本全国各地野外感病的幼虫中采集并分离到了 189 个斜纹夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus, SpltMNPV) 克隆,筛选并鉴定出 3 种基因结构类型 (A、B、C)^[17]。对这 3 种基因结构型病毒 DNA 限制性核酸内切酶的酶切图谱和病毒生物学特性与致病性的比较研究表明, SpltMNPV-C3 株是一种繁殖率和毒力极强的新的病毒变异株。2008 年,李轶女测定并分析了这一病毒株的基因组全序列,现已登录 GenBank (登录号为:NC_011616)^[18]。通过与其他几种代表性杆状病毒基因组的比较,发现它与具有相同宿主来源的中国株 SpltMNPV G2 (SpltMNPV I) 存在着非常显著的差异,却与甜菜夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus, SeMNPV) 比较接近。是一种新的具有重要研究价值的病毒种,故命名为 SpltMNPV II^[18]。因而本研究通过基因工程方法,对野外分离获得的高毒力 SpltMNPV II 进行基因工程改造,在 *egt* 基因位点插入对昆虫特异性的 *BmK ITa1* 基因,以增强野生病毒的杀虫效率,有利于昆虫病毒的应用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂、质粒及菌株: DNA 聚合酶、限制性内切酶、 T_4 DNA 连接酶、核酸分子量标准 Marker 等来源于大连宝生物 (TAKARA) 公司。胎牛血清、TC-100 培养基、脂质体 (Lipofectine) 购自 Invitrogen 公司,低熔点琼脂糖购自 promega 公司。载体质粒 pMD18-*BmK ITa1* 和 pMD18-*egfp* 分别由浙江大学张传溪教授和广东海洋大学农学院刘艳荷博士馈赠,重组转移载体 Psk- Δ *egt*-Pph-*egfp*-Pph-BmK 由本人以前构建^[19], pBacPAK8、转化用宿主菌 *E. coli* Top10 由本科室保存。AcMNPV 的 *ie-1* 启动子基因 (Psk-*ie-1*) 由江苏大学王文兵博士提供。

1.1.2 病毒、细胞和昆虫:本研究所用的病毒株为 SpltMNPV II,由日本岐阜县生物产业技术研究所 Katsumi Kamiya 博士馈赠,斜纹夜蛾 TUAT-Spli221

细胞由日本名古屋大学资源昆虫研究室 Michihiro Kobayashi 教授提供。SpLi 细胞用含 10% 胎牛血清的 TC-100 培养基, 28 °C 培养。实验用斜纹夜蛾 2 龄幼虫以及饲料由中国科学院动物研究所秦启联博士提供。

1.2 病毒感染及基因组 DNA 的提取

实验使用 80 cm² (Corning 公司) 培养瓶培养的单层贴壁细胞 (1 × 10⁶ cells/mL), 除去培养液后接种 1500 μL 病毒液, 感染复数 (MOI: multiplicity of infection) 为 1。室温下用振荡器慢摇 1 h 使病毒吸着细胞, 然后除去病毒接种液, 加入 13 mL TC-100

培养基 (含 10% 胎牛血清), 28 °C 培养 96 h 后收取病毒感染的培养细胞。根据 Wu 等^[20] 的方法从感染的细胞中提取病毒 DNA。

1.3 引物设计

实验所需的引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。根据 GenBank SpltMNPV II 基因组全序列 (NC_011616) 设计 F 蛋白的信号肽 (Signal peptide) 的引物 P1, 根据 AcMNPV 基因组序列设计早期基因 *ie-1* 启动子引物 P3。根据东亚钳蝎毒素 *BmK Ital* 基因序列设计引物 P2。根据 *ie-1*-SP-Bmk 片段序列设计引物 P4。

表 1 用于 PCR 扩增的引物

Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

Construct	Primer sequence (5'→3')	Restriction site	
Signal peptide	P1 up	GCGCTCGAGATGTCGTGCTTCAAAGTGAT	<i>Xho</i> I
	P1 down	ACGGGTACCTTGCAGGATATCTTCGGCGG	<i>Kpn</i> I
<i>BmK Ital</i>	P2 up	CGGGTACCATGGATGGATATATAAGAGGAAG	<i>Kpn</i> I
	P2 down	AGAGCGGCCGCTTACTTTTTTCCACCGCATG	<i>Not</i> I
<i>ie-1</i> promotor	P3 up	TCTGGATCCGATTTGCAGTTCGGGACATA	<i>Bam</i> H I
	P3 down	GTCCTCGAGTGTGCGCCCAATGTCA	<i>Xho</i> I
<i>ie-1</i> -SP-Bmk	P4 up	TCTCCGGGGATTGTCAGTTCGGGACATA	<i>Sma</i> I
	P4 down	AGAGCGGCCGCTTACTTTTTTCCACCGCATG	<i>Not</i> I
<i>egfp</i>	P5 up	GCGAAGCTT ATGGTGAGCAAGGGCGAGG	<i>Hind</i> III
	P5 down	ACGCCGGGTTACTTGTACAGCTGTCC	<i>Sma</i> I

1.4 重组转移载体 Psk-Δ*egt*-Pph-*egfp-ie-1*-*BmK Ital1* 的构建

在 Psk-Δ*egt-egfp-BmK Ital1* 的基础上构建重组转移载体 Psk-Δ*egt-Pph-egfp-ie-1-BmK Ital1* (图 1)。以 SpltMNPV II DNA 为模板, 用引物 P1 扩增出 F 蛋白的信号肽序列, 经 *Xho* I / *Kpn* I 酶切后连接到载体 pBacPAK8 上, 得到 pBacPAK8-SP。以 pMD18-*BmK Ital1* 为模板, 用引物 P2 PCR 扩增出 *BmK Ital1* 基因, 经 *Kpn* I / *Not* I 双酶切后连接到 pBacPAK8-SP 上, 得到中间产物 pBacPAK8-SP-Bmk。以 Psk-*ie-1* 为模板, 用 *ie-1* 引物 PCR 出早期基因 *ie-1* 启动子序列, 经 *Bam*H I / *Xho* I 双酶切后插入到中间产物 pBacPAK8-SP-Bmk 中, 得到 pBacPAK8-*ie-1*-SP-Bmk。以 pBacPAK8-*ie-1*-SP-Bmk 为载体, 用引物 P4 PCR 扩增出 *ie-1*-SP-*BmK Ital1* 片段, 目的片段回收纯化后, 用 *Sma* I / *Xba* I 双酶切, 同时将载体 Psk-Δ*egt-egfp-BmK Ital1* 进行 *Sma* I / *Xba* I 双酶切, 将目的片断插入到载体中, 得到 Psk-Δ*egt-Pph-egfp-ie-1-BmK Ital1*。

1.5 脂质体介导的共转染及重组病毒的筛选

将 1 × 10⁴ 个 SpLi 细胞接种于 35 mm 培养皿中, 培养 16 - 20 h, 待细胞生长至 70% 丰度, 用无血清 TC-100 培养基洗细胞 3 次待用。根据 Lipofectine 试剂说明, 共转染按照胡兆丽等方法进行^[20]。共转染 72 h, 采用倒置荧光显微镜观察细胞。通过有限稀释法和荧光斑法相结合筛选重组病毒。

1.6 生物学活性测定

刚蜕皮进入 3 龄的斜纹夜蛾幼虫饥饿过夜。准备直径约 3.5 cm、厚度 2 mm 大小的饲料, 根据每条虫喂食 10 μL 病毒液的量, 将 5 个浓度梯度的重组病毒和野生型病毒 (10⁹、10⁸、10⁷、10⁶、10⁵ polyhedra / mL) 分别均匀地滴到 10 块大小相同的饲料上, 每块饲料滴加 400 μL 病毒液。空白对照组滴加相同体积的 ddH₂O。稍加晾干后, 将 3 龄幼虫放入 (每块饲料投放 40 头幼虫) 27 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后, 将幼虫转入 24 孔养虫盒中, 加入新鲜饲料, 27 °C 恒温培养箱继续培养。每天计算死亡的虫体数, 直到虫子全部死亡或化蛹。用 DPS 软件计算 LT₅₀ 和 LD₅₀。

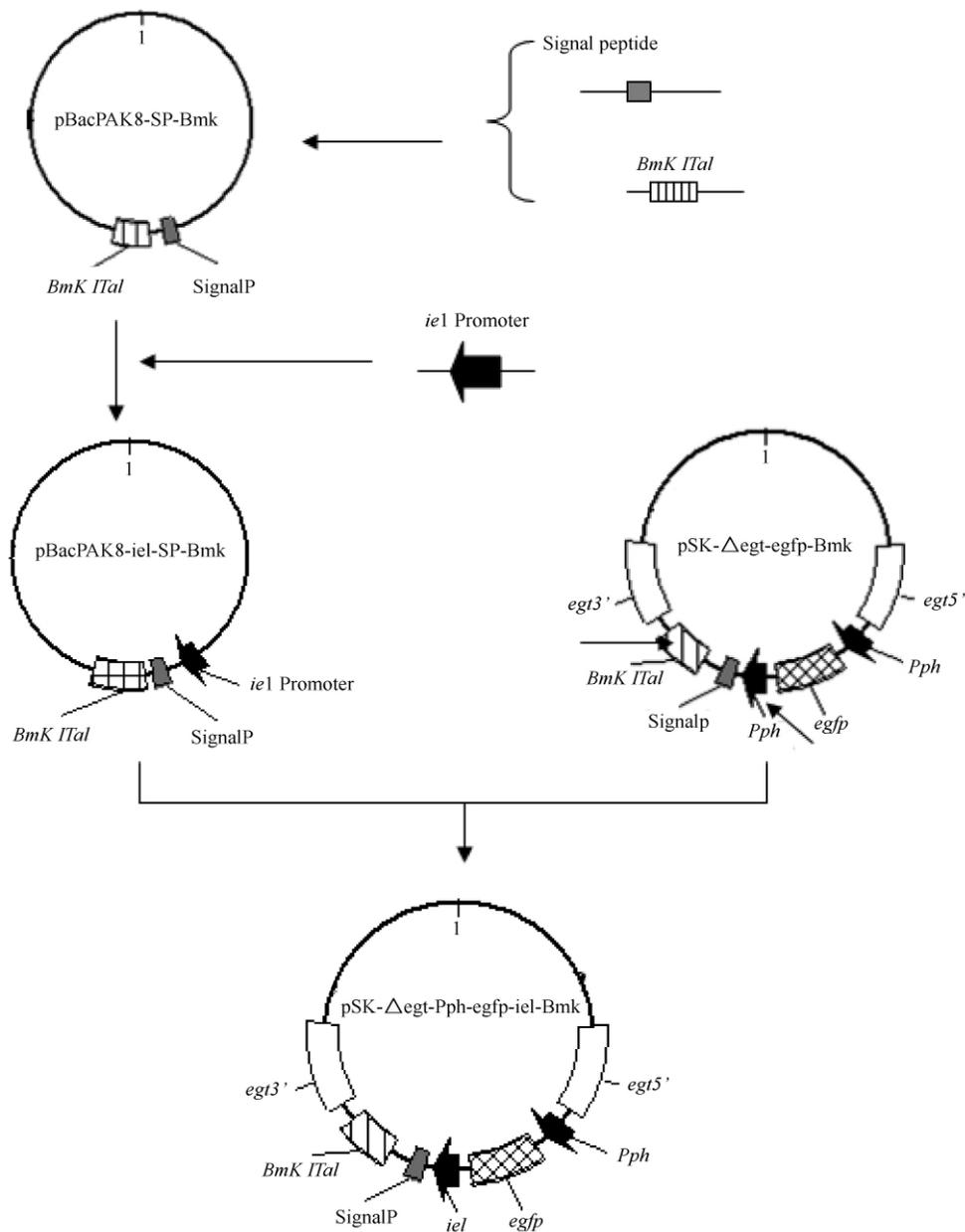


图 1 重组转移载体 *Psk-Δegt-Pph-egfp-ie1-BmK ITa1* 的构建策略

Fig. 1 Construction of the recombinant transfer vector *Psk-Δegt-Pph-egfp-ie1-BmK ITa1*.

2 结果和分析

2.1 重组转移载体的鉴定

以 *pBacPAK8-ie1-SP-BmKITA1* 为模板,用引物 P4 PCR 扩增得到 *ie1-SP-BmKITA1* 片段,经琼脂糖凝胶电泳鉴定,扩增片段与预期大小一致。重组质粒 *Psk-Δegt-Pph-egfp-ie1-BmK ITa1* 分别经 *Sma I/Not I* 双酶切、*Xho I* 单酶切、*Kpn I* 单酶

切后分别切下 *ie1-SP-BmKITA1* 片段、*Pph-egfp-ie1* 片段和 *egt5'-Pph-egfp-ie1-SignalP* 片段。经琼脂糖凝胶电泳鉴定,酶切的目的片段与预期大小一致(图略)。测序结果表明,重组转移载体包含了预期的 DNA 片段,而且克隆方向正确。上述结果证明该重组转移载体构建成功。

2.2 重组病毒的鉴定

2.2.1 重组病毒的筛选:重组转移载体 *Psk-Δegt-Pph-egfp-ie1-BmK ITa1* 与 WT-SplMNPV II DNA 共

转染 SpLi 细胞,72 h后用倒置荧光显微镜可观察到细胞内有荧光,由于同源重组的概率只有 0.1% - 1%,所以须经荧光斑法和 96 孔板有限稀释法反复筛选才能获得单个阳性重组病毒。经多轮筛选,获得较纯的重组病毒 SpltMNPV- Δegt -Pph-egfp-*ie-1*-BmK *ITa1*(图 2)。

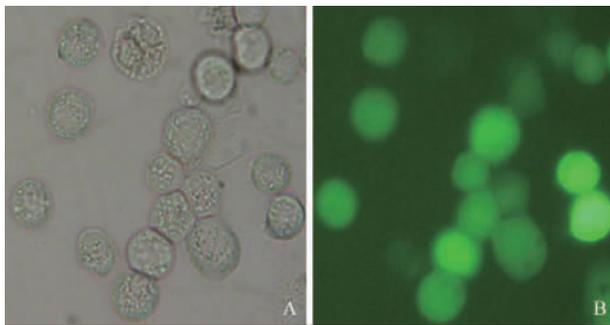


图 2 多轮筛选后重组病毒感染的 SpLi 细胞

Fig.2 The SpLi cells infected with recombinant virus after several rounds purification. A: The light microscopy of infected SpLi cells; B: The fluorescence microscopy of infected SpLi cells.

2.2.2 重组病毒 SpltMNPV- Δegt -Pph-egfp-*ie-1*-BmK *ITa1* 的 PCR 鉴定:重组杆状病毒 SpltMNPV- Δegt -Pph-egfp-*ie-1*-BmK *ITa1* 感染 SpLi 细胞,5-6 d后收集细胞,抽提该病毒基因组 DNA,分别用 BmK *ITa1* 引物 P2 和 egfp 引物 P5 进行 PCR,琼脂糖凝胶电泳显示 BmK *ITa1* 片段和 egfp 片段均被扩增出来(200 bp和720 bp)。结果表明:共转染后经多轮荧光斑法结合有限稀释法筛选,得到重组病毒 SpltMNPV- Δegt -Pph-egfp-*ie-1*-BmK *ITa1*。

2.2.3 BmK *ITa1* 在 SpLi 细胞和斜纹夜蛾中的表达:重组病毒 SpltMNPV- Δegt -Pph-egfp-*ie-1*-BmK *ITa1* 分别感染 SpLi 细胞和斜纹夜蛾 4 龄幼虫,48 h后收集细胞和幼虫,提取 RNA 进行逆转录 PCR,以未感染细胞、野生病毒感染的细胞和幼虫作为阴性对照。在重组病毒感染的细胞和幼虫中均扩增出约 200 bp 的特异性条带,说明 BmK *ITa1* 基因在斜纹夜

蛾虫体和细胞中均得到了转录和表达(图略)。荧光显微镜下也可观察到重组病毒感染的细胞呈绿色荧光,且在可见光下可观察到多角体颗粒(图 2)。另外,幼虫感染重组病毒 48 h 后出现明显的抽搐现象(图 3-A),而感染野生病毒无此现象(图 3-B),结果进一步表明了 BmK *ITa1* 基因在虫体内得到了表达。

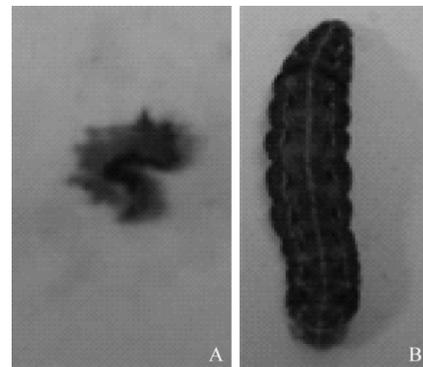


图 3 斜纹夜蛾幼虫感染病毒 48 h 后症状

Fig.3 Infected larvae were examined after 48h. A: Larvae infected by recombinant virus; B: Larvae infected by wild-type virus.

2.3 生物学活性测定

分别以 5 个浓度梯度的多角体病毒液 (10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 polyhedra/larva) 喂食斜纹夜蛾 3 龄幼虫。生物测定结果显示:重组病毒的 LD₅₀ 和野生型病毒没有明显区别,但其杀虫速度(LT₅₀)明显提高(表 2,3)。在病毒浓度为 10^5 polyhedra/larva 时,重组病毒的 LT₅₀ 比野生病毒提前 0.68 d,重组病毒感染幼虫的累计死亡率在第 3 天后较野生病毒明显高;在病毒浓度为 10^6 polyhedra/larva 时,重组病毒的 LT₅₀ 比野生病毒提前 0.75 d,重组病毒感染幼虫的累计死亡率第 1 天后明显较野生病毒高;在病毒浓度为 10^7 polyhedra/larva 时,重组病毒的 LT₅₀ 比野生病毒提前 0.77 d。重组病毒感染幼虫的累计死亡率较野生病毒高,特别是在低浓度时(10^5 、 10^6 polyhedra/larva)可以明显增强杀虫活性(图 4)。

表 2 SpltMNPV、SpltMNPV- Δegt -*ie-1*-BmK *ITa1* 对 3 龄斜纹夜蛾的半致死浓度(LD₅₀)

Table 2 LD₅₀ of *S. litura* larvae infected with wild-type SpltMNPV and SpltMNPV- Δegt -*ie-1*-BmK *ITa1*

Virus tested	Number	SE	r	LD ₅₀ (polyhedra/larva)	95% confident limit
Wt-SpltMNPV	200	0.0797	0.8109	2.91×10^4	0.71×10^4 - 8.11×10^4
SpltMNPV- Δegt - <i>ie-1</i> -BmK	200	0.1158	0.9654	1.69×10^4	0.73×10^4 - 3.18×10^4

表 3 SplMNPV、SplMNPV $\Delta egt-ie-1-BmK ITa1$ 对 3 龄斜纹夜蛾的半致死时间 (LT_{50})Table 3 LT_{50} of *S. litura* larvae infected with wild-type SplMNPV and SplMNPV $\Delta egt-ie-1-BmK ITa1$

Virus tested	LT_{50} (days)		
	10^5 polyhedra/larva	10^6 polyhedra/larva	10^7 polyhedra/larva
Wt-SplMNPV	4.97	4.1	3.3
SplMNPV $\Delta egt-ie-1-BmK$	4.29	3.35	2.53

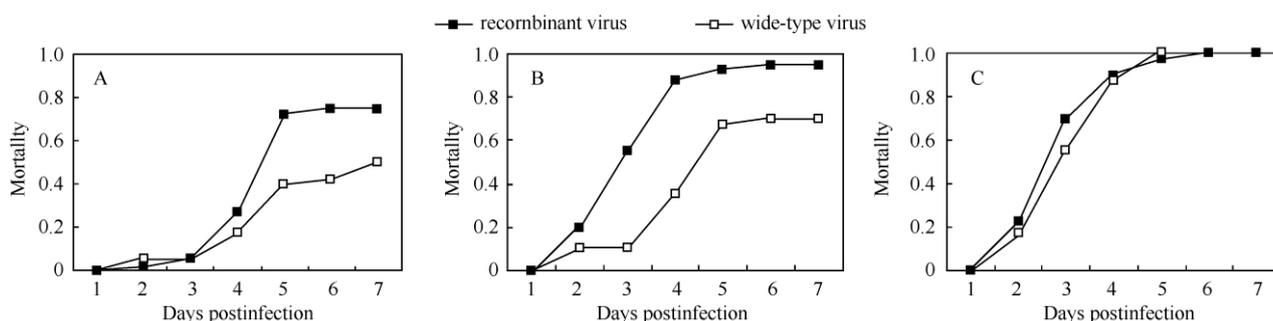


图 4 斜纹夜蛾幼虫口服感染野生病毒和重组病毒的累计死亡率

Fig. 4 Cumulative mortality of *S. litura* larvae oral infected with wild type SplMNPV and recombinant virus. A: At the concentrate of 10^5 polyhedra/larva; B: At the concentrate of 10^6 polyhedra/larva; C: At the concentrate of 10^7 polyhedra/larva.

3 讨论

为了开发杆状病毒杀虫剂用于控制斜纹夜蛾的发生与为害, 科学家们从日本、中国、越南、印度、菲律宾等地搜集斜纹夜蛾核型多角体病毒, 并通过生物比较从中挑选毒性较强的病毒株来控制害虫^[21-22]。SplMNPV II 是 Kamiya 等从日本全国各地野外感病幼虫收集、分离到 189 个 SplMNPV 克隆中繁殖率和毒力极强的一种新型病毒株^[17]。本研究在 SplMNPV II 的基础上, 成功构建并筛选了删除 *egt* 基因, 并在 *egt* 基因位点上引入由 AcMNPV 的早期启动子 (*ie-1*) 控制的 *BmK ITa1* 成熟肽基因的重组病毒 SplMNPV $\Delta egt-Pph-egfp-ie-1-BmK ITa1$ 。同时在重组病毒的 *BmK ITa1* 基因前引入了 AcMNPV BV 膜融合蛋白 GP64 的同系物, SplMNPV II F (Fusion) 蛋白的信号肽序列, 便于东亚钳蝎毒素的分泌表达。另外采用 *egfp* 作为标记基因, 通过绿色荧光这种直观的标记进行重组病毒的筛选与纯化, 可大大减少筛选的工作量和时间。

生物测定结果显示, 重组病毒 SplMNPV $\Delta egt-Pph-egfp-ie-1-BmK ITa1$ 的 LD_{50} 较野生病毒有所降低, 但不明显。据报道, 在 HearNPV 的 *egt* 位点插入 AaIT 的重组病毒降低了 LC_{50} 值^[23], 表达 BmK IT 的重组 AcMNPV 的 LC_{50} 较野生病毒低^[17], 但不明显。

同时表达 *cry1-5* 和 AaIT 的重组 AcMNPV 的 LD_{50} 值和野生型病毒没有区别^[24]。但重组病毒 SplMNPV $\Delta egt-Pph-egfp-ie-1-BmK ITa1$ 杀虫速度 (LT_{50}) 在 10^6 polyhedra/larva 和 10^7 polyhedra/larva 浓度时分别较野生病毒缩短 0.75 d 和 0.77 d, 即重组病毒的 LT_{50} 比野生病毒分别降低了 18.3% 和 23.3%。删除病毒基因组中某些非必需基因如 *egt* 基因可提高病毒的杀虫效果, 但通过这种方法提高杀虫效果的程度有限, 已有很多学者将 AaIT、BmK IT、Lqh α IT 等蝎毒素基因应用到杆状病毒生物杀虫剂中, 产生良好的效果。Fan X 等将东亚钳蝎毒素 *BmK IT* 重组到 AcMNPV 基因组中, 并得到表达, 重组 AcMNPV *BmK IT* 的 LT_{50} 比野生病毒降低了 13.2% (1×10^7 PIBs/ML)^[7]。Jarvis 等发现早期启动子 *ie-1* 能够较早地启动目的基因的表达, 且其控制的表达量不比 *p10* 启动子控制的表达量低^[11]。图 7 显示早期启动子控制的表达蝎毒素的重组病毒在低浓度时 (10^5 、 10^6 polyhedra/larva) 可以明显增强杀虫活性。而在高浓度时 (10^7 polyhedra/larva) 不明显。我们推测在低浓度 (10^5 、 10^6 polyhedra/larva) 时, 早期启动子控制的蝎毒素可以较早的累积, 达到一定浓度时, 能够快速杀死害虫。但早期启动子是弱启动子, 故在高浓度 (10^7 polyhedra/larva) 时, 其作用并不明显。之前, 本实验室成功构建并筛选了重组病毒 SplMNPV $\Delta egt-Pph-egfp-Pph-BmK ITa1$ ^[19],

其杀虫时间明显较野生型病毒缩短。为了能够更早地杀死害虫,我们将晚期启动子多角体启动子更换成早期启动子 *ie-1* 启动子,得到 SpltMNPV- Δ *egt*-*Pph-egfp-ie-1-BmK ITa1*,然而生物测定结果表明,这两株重组病毒的 LT_{50} 没有明显区别。

昆虫杆状病毒作为无公害生物杀虫剂近年来备受关注,并得到广泛应用。本研究中筛选出的重组病毒可明显缩短杀虫时间,具有良好的应用前景。在该重组病毒中插入了外源基因,并且删除了 *egt* 基因,因此在进入田间前,重组病毒的多角体增值情况、在田间适应性情况以及其安全性问题有待于进一步研究。新的重组生物杀虫剂的研制和广泛应用,将大幅度降低化学农药的使用频次和使用量,减少化学农药对环境的污染,保护生态环境和城乡人民的身体健康,促进人与自然的和谐发展。

参考文献

- [1] 惠丰立,夏敏,梁子安. 杆状病毒杀虫剂研究进展. 植物保护 (*Plant Protection*), 2003, 29(3): 9-11.
- [2] 蒋洪,韩亚娟,胡柳,张珈敏,胡远扬. 重组病毒杀虫剂应用研究进展. 昆虫学报 (*Acta Entomologica Sinica*), 2008, 51(3): 322-327.
- [3] O'Reilly DR, Miller LK. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene. *Biotechnology*, 1991, 1086-1089.
- [4] Pinedo FJR, Moscardi F, Luque T, Olszewski JA, Ribeiro BM. Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. *Biological Control*, 2003, 27: 336-344.
- [5] Georgievska L, Hoover K, Werf W, Muñoz D, Caballero P, Cory JS, Vlask JM. Dose dependency of time to death in single and mixed infections with a wildtype and *egt* deletion strain of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 104: 44-50.
- [6] 李坚,王敦. 生物防治杆状病毒基因工程研究进展. 生物技术通讯 (*Letters in Biotechnology*), 2009, 20(4): 587-593.
- [7] Fan XJ, Zheng B, Fu YJ, Sun Y, Liang AH. Baculovirus-mediated expression of a Chinese scorpion neurotoxin improves insecticidal efficacy. *Chinese Science Bulletin*, 2008, 53(12): 1855-1860.
- [8] 付月君,梁爱华. 三种强启动子和 *egt* 基因缺陷在重组核型多角体病毒杀虫剂研发中的意义. 植物保护 (*Plant Protection*), 2003, 29(1): 11-13.
- [9] 马志明,石晓燕,曹广力,薛仁宇,何毅,贡成良. 家蚕核型多角体病毒 *IE-1* 基因启动子的克隆和序列分析. 江苏蚕业 (*Jiangsu Sericulture*) 2001, 3: 1-6.
- [10] 邓小昭,朱反修,刁振宇,高健,齐一鹏. 杆状病毒早期启动子载体的构建及报道基因的表达. 医学研究生学报 (*Journal of Medical Postgraduates*), 2001, 14(3): 200-206.
- [11] Jarvis DL, Reilly LM, Hoover K, Schultz C, Hammock BD, Guarino LA. Construction and Characterization of Immediate Early Baculovirus Pesticides. *Biological Control*, 1996, 2(7): 228-235.
- [12] Liu Z, Yang GZ, Chi W, Wu XF. Cloning and High-Level Expression of Scorpion Toxin *Bmkita1* in *Escherichia Coli* and Insect Cells. *Protein and peptide letters*, 2002, 9: 419-426.
- [13] Liu Z, Yang G, Li B, Chi C, Wu XF. Cloning, co-expression with an amidating enzyme and activity of the scorpion toxin *BmK ITa1* cDNA in insect cells. *Molecular biotechnology*, 2003, 24: 21-26.
- [14] 秦厚国,汪笃栋,丁建,黄荣华,叶正襄. 斜纹夜蛾寄主植物名录. 江西农业学报 (*Acta Agriculturae Jiangxi*). 2006, 18(5): 51-58.
- [15] 黄冠辉,丁翠. 斜纹夜蛾核型多角体病毒的研究. 昆虫学报 (*Acta Entomologica Sinica*), 1975, 18(1): 17-13.5.
- [16] 刘永平,王方海,苏志坚,李广宏. 昆虫杆状病毒杀虫剂研制与应用进展. 中国生物防治 (*Chinese Journal of Biological Control*), 2006, 22(1): 1-5.
- [17] Kamiya K, Zhu J, Murata M, Laviña-Caoili BA, Ikeda M, Kobayashi M, Kawamura S. Cloning and comparative characterization of three distinct nucleopolyhedroviruses isolated from the common cutworm, *spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Japan. *Biological Control*, 2004, 31: 38-48.
- [18] 李轶女. 东方粘虫颗粒体病毒和斜纹夜蛾核型多角体病毒 II 基因组全序列分析. 中国农业科学院的博士学位论文, 2008.
- [19] Tang XX, Sun XL, Pu GQ, Wang WB, Zhuang CX, Zhu J. Expression of a neurotoxin gene improves the insecticidal activity of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SpltNPV). *Virus Research*, 2011, 51-56.
- [20] Wu F, Laviña B, Ikeda M, Shirata N, Cai YX, Pan SX,

- Kobayashi M. Cloning and biological characterization of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in nucleopolyhedrovirus isolated from China. *Journal of Sericulture Science of Japan*, 2000, 69(3): 177-189.
- [21] Lavia B, Padua L, Wu FQ, Shirata N, Ikeda M, Kobayashi M. Biological characterization of a nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) isolated from the Philippines. *Biological Control*, 2001, 20, 39-47.
- [22] Takatsuka J, Okuno S, Nakai M, Kunimi Y. Genetic and biological comparisons of ten geographic isolates of a nucleopolyhedrovirus that infects *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control*, 2003, 6, 32-39.
- [23] Chen X, Sun X, Hu Z, Li M, O'Reilly DR, Zuidema D, Vlak JM. Genetic engineering of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus as an improved pesticide. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2000, 76(2): 140-146.
- [24] Shim HJ, Choi JY, Li MS, Wang Y, Roh JY, Woo SD, Jin BR, Je YH. A novel recombinant baculovirus expressing insect neurotoxin and producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* Cry toxin. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2009, 12: 217-2.

Construction and toxicity the recombinant SpltMNPV expressing the scorpion toxin gene

Xinxin Tang¹, Xinglu Sun², Guanqin Pu², Wenbing Wang³, Chuanxi Zhang⁴, Qilian Qin⁵, Jiang Zhu^{1*}

¹ School of Biology and Basic Medical Science, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China

² Golden Mantis School of Architecture and Urban Environment, Soochow University, Suzhou 215123, China

³ Institute of Life Sciences Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

⁴ Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

⁵ Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: [Objective] To develop a high toxic recombinant *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus (SpltMNPV) insecticide. [Methods] We constructed a recombinant transfer vector that was characterized by disrupting of ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*) gene and expressing the mature peptide of the Chinese scorpion, *B. martensi* Karsch (*BmK ITa1*) gene at the control of *ie-1* promoter. The transfer vector and the SpltMNPV II DNA co-transfected the SpLi cells. Recombinant viruses were purified by the end point dilution and fluorescent spot purification. [Results] We successfully screened the recombinant SpltMNPV- Δegt -*Pph-egfp-ie-1-BmK ITa1* of which the *egt* gene was knocked out and expressed the mature peptide of the *BmK ITa1* gene at the control of *ie-1* promoter. Bioassays showed that, compared to the wide-type SpltMNPV, the speed of the recombinant virus killing the *S. litura* (LT_{50}) increased by 0.7-0.8 days. [Conclusion] The insecticidal effect of SpltMNPV could be increased by inserting the foreign gene, which provided a further opportunity to develop the SpltMNPV into commercially viable products to control the *S. litura*.

Keywords: *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus (SpltMNPV), *B. martensi* Karsch (*BmK ITa1*), ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*), recombinant baculovirus

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Science Foundation of China(31070136) and by the Suzhou Science and Technology Support Program(SNG0924)

* Corresponding author. Tel: +86-512-65880278; E-mail: zjiang@suda.edu.cn

Received: 13 May 2011 / Revised: 29 June 2011