

大蜡螟 (*Galleria mellonella*) 核型

多角体病毒蛋白水解酶的研究

齐义鹏

(武汉大学病毒学系, 武汉)

G. Stainrs

(美国俄亥俄州立大学昆虫学系, 美国)

提 要

用广泛的pH和不同的离子强度、温度研究了大蜡螟核型多角体病毒的多角体降解动力学, 证明在病毒中存在一种蛋白水解酶, 最适pH是8.8。以硫酸铵沉淀和 Sephacryl 柱层析分离纯化, 酶活力提高5倍, 冷冻干燥得白色絮状的纯化酶。层析图谱上得到3个峰。峰1是酶活力主峰, 峰2仅以产生可溶性蛋白、峰3仅以降解多角体为主。由这三个组分的共同作用, 多角体降解, 病毒粒子释放, 感染发生。电泳证明, 降解的多角体产生两条带, P36可能是多角体蛋白的主要结构多肽, 酶的反应速度是酶浓度的函数, 绘图得一级动力学曲线。

用昆虫杆状病毒多角体涂布食物表面饲喂幼虫, 在幼虫中肠中病毒粒子从多角体释放出来。高pH在体外降解多角体和释放感染性病毒粒子是非常有效的。因此, 有人认为病毒粒子在中肠消化液中释放是由于高pH引起^[1]。然而, 许多研究者^[2-6]指出, 包含在多角体晶格蛋白质内的碱性蛋白酶对病毒粒子释放可能起巨大作用。

碱性蛋白酶的最适pH一般认为是9.5, 但也有8.7的报道^[2]而且大蜡螟幼虫中肠的pH环境也只是微碱性^[7]。这些结果都与碱性蛋白酶的最适pH不一致。为了弄清大蜡螟核型多角体病毒(Gm NPV)的蛋白酶及其最适pH以及多角体在幼虫中肠中的降解机制, 我们进行了本研究。

材料和方法

病毒毒株及其增殖: 大蜡螟核型多角体病毒(GmNPV)由美国俄亥俄州立大学昆虫系保存并提供, 用非包含体病毒粒子(NOV)腹腔注射, 感染大蜡螟5龄幼虫, 5—7天收集病毒死虫体^[8]。用差速离心、SDS—胰蛋白酶处理、蔗糖梯度分离纯化多角体, 悬浮在0.7M、pH7.8的磷酸缓冲液(PBS)中^[9]。

多角体降解与酶蛋白测定: 利用不同pH(3.0—11.5)和离子强度(2×10^{-3} — 2×10^{-1} M)的甘氨酸—氢氧化钠(或盐酸)缓冲液测定多角体降解的物理条件。用细菌计数器在处理前后计数, 计算出降解百分率。离心后, 上清液用0.22 μ m滤膜超过滤, 测定蛋白质含量并用0.5饱和度的硫酸铵沉淀多角体蛋白, 透析脱盐。

本文1985年7月26日收到

Sephacryl柱层析: 以Sephacry 1300 (pharmacia产品) 柱层析 (25×600mm) 分离酶蛋白。在4°C上样2ml, 0.2MpH7.2Tris—HCl洗脱, 分部收集, 紫外监测。

酶活力测定: 以加热 100°C10分钟灭活的 GmNPV多角体为底物, 取 0.1ml (含 3.5×10^{11} PB/ml) 和0.2ml洗脱液(酶源)加到 2.0ml0.02MpH8.8的甘氨酸—NaOH 缓冲液中, 40°C2小时, 加1N盐酸1滴终止反应。计算保温前后的多角体数, 过滤除去未降解的多角体和病毒粒子, 测可溶性蛋白。以每毫克酶蛋白在 40°C 1小时内降解多角体产生1毫克可溶性蛋白, 即为1单位酶活力。

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 胶浓10%, 样品用1%SDS和1%巯基乙醇在100°C下反应3分钟, 以含0.1%SDS和0.1%巯基乙醇的0.1MpH7.2PBS作缓冲液, 平板电泳, 电流9 mA, 电泳5小时左右, 考玛斯亮兰R—250染色, 7.5%醋酸和5%甲醇脱色。标准蛋白是牛血清白蛋白。接触酶, 卵清蛋白, 胃蛋白酶, 胰蛋白酶元, 肌红蛋白, RNA 酶。通过相对泳动率和最小二乘法计算未知样品的分子量。

普通PAG电泳, 除不用SDS和巯基乙醇外, 其余操作相同。

结 果

多角体的降解受离子强度的极大影响(图1)。当pH为9—10.4时, 2×10^{-2} M的离子强度是最有效的。此时, 多角体降解随pH升高平行增加。pH8—11.5 范围的实验结果表明, 多角体降解和蛋白质的产生都有两个高峰一个低谷。(图2,3)即在25°C时, 多角体降解为78% (pH8.8)和80% (pH>10)。在45°C下保温, 结果相似, 仅在低pH部分的降解率较低, 高pH部分, 温度对降解率没有或仅有小的影响。

在多角体降解前, 加热80°C和100°C10分钟灭活, 在 pH10以下, 灭活的多角体几乎不能降解, 但有可测定量的可溶性蛋白产生。pH10以上, 灭活对多角体降解和可溶性蛋白的产生均无影响。

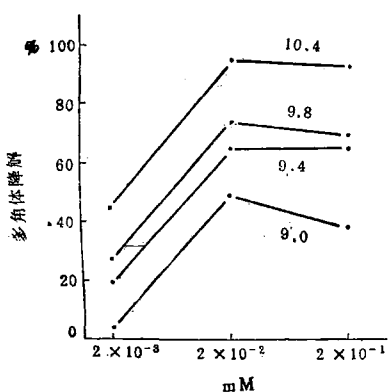


图 1, 离子强度和pH对多角体降解的影响

Fig. 1. Effects of ionic strength and pH on the dissolution of polyhedra

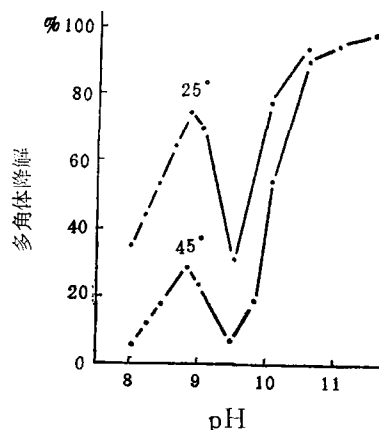


图 2, pH和温度对多角体降解的影响

Fig. 2. Effects of pH and temperature on the dissolution of polyhedra

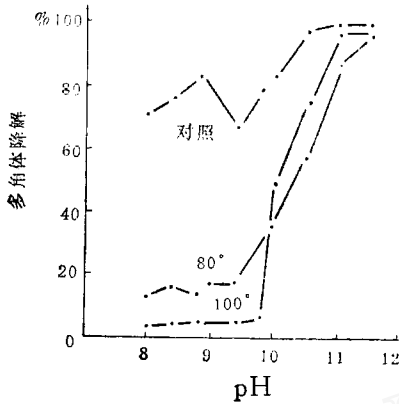


图3, 预加热灭活对多角体降解的影响
Fig. 3. Effect of preheating polyhedra on their dissolution

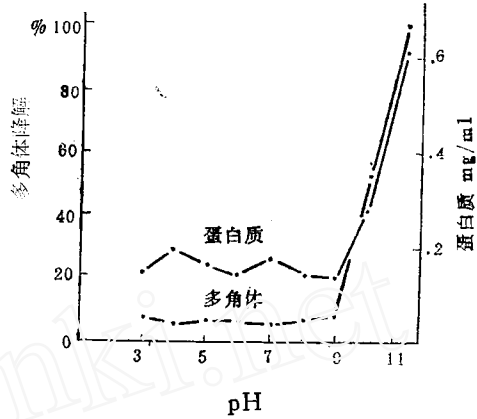


图4, 热处理多角体, 在pH3—11时的降解和可溶性蛋白的释放

Fig. 4. Effects of heating polyhedra at 100°C and exposing them to pH 3 to 11 showing % dissolution and the amount of protein in solution

表1 用电泳测得GmNPV多角体蛋白多肽的分子量

Table 1. Molecular weights of polypeptides from GmNPV polyhedra by SDS-PAGE.

带号	不加热		加热灭活	
	pH 8,8	pH11,0	pH 4,0	pH11,0
1	79,400	79,400	79,400	79,000
2	64,000	64,000	64,000	64,000
3	58,000			
4	53,000	53,000	53,000	53,000
5	49,000			
6	36,000	36,000	36,000	36,000

上述两项实验结果都说明, GmNPV多角体的降解是由两种原因引起, 在低pH时的降解可能受某种生物因素的制约。

PAGE电泳直接证实了上述假设。不管是否预先灭活, 在pH11时, 多角体降解都得到4条带 (P_{79} , P_{64} , P_{53} , P_{36}), 加热灭活的多角体在pH4.0降解也得到同样结果。多角体在pH8.8的降解与是否预加热灭活有密切关系。不灭活的多角体除上述4条带外, 还有 P_{58} , p_{49} 新带, 而一经加热灭活, 多角体则基本上不能降解 (图5表1)。估计, 在GmNPV中存在着水解多角体的蛋白酶。

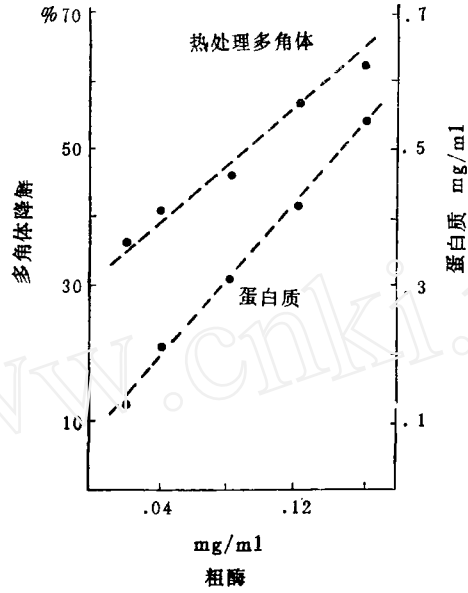


图 6.粗酶对热处理多角体的降解动力学

Fig. 6. Disolution kinetics of heat treated polyhedra by the crude enzyme.

70%和0.4mg/ml; 峰 2 (56管) 具有产生可溶性蛋白的活力, 但降解多角体的活力 很低; 峰 3 (78管)相反, 其降解多角体的活力与峰 1 相似, 但只有微弱的产生可溶性蛋白的活力, 三次实验得到相似的结果。

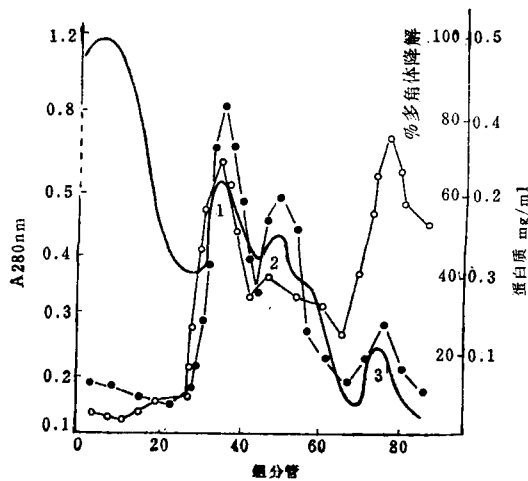


图 7. Gm NPV蛋白酶的sephacryl 300柱层析及酶活

力测定。—A_{280nm} ●●● 蛋白质 ○○○ 多角体降解%, 1、2、3. 峰蛋白峰

Fig. 7. Fractionation of Gm NPV protease on Sephacryl 300 and enzyme activation. —Absorbance at 280nm, ●●●Protein, ○○○Polyhedra dissolved %, 1, 2, 3, peak of the enzymes

收集峰1，冷冻真空干燥得白色絮状沉淀，质量很轻，与溶菌酶外形相似，此即纯化的蛋白酶。

PAG 电泳测定可溶性蛋白和检测酶纯度的结果见图8。峰1仅为一条带，分子量 14,000 (P14)。纯化酶降解多角体得到2条带 (P65, P36)。不加酶的多角体蛋白不进胶,当加酶

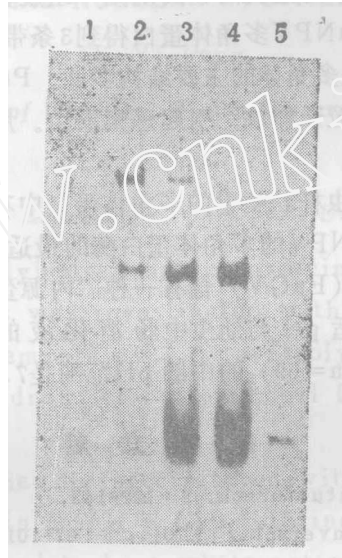


图8.GmNPV蛋白酶消化热处理多角体底物的PAG电泳图谱

- | | |
|---------------|----------------|
| 1, 底物, 无酶 | 4.底物+酶0.1mg |
| 2, 底物+酶0.01mg | 5.酶0.01mg, 无底物 |
| 3, 底物+酶0.05mg | |

Fig. 8. PAGF pattern of digestion to heat-treated polyhedra as a substrate by GmNPV protease. 1, Substrate, no enzyme, 2. Substrate+enzyme 0.01mg, 3. Substrate+enzyme 0.05 mg, 4. Substrate+enzyme 0.1 mg, 5. Enzyme 0.01, no substrate.

0.01mg, 0.05mg和0.1mg时，带P65的浓度逐渐减少，带P36的浓度逐渐增加，它们之间有较好的消长关系。显然，P36是由P65降解而来，并且是GmNPV多角体的主要结构多肽，也说明P65可能是P36的二聚体。P14是酶蛋白带，它在用酶时出现，不用时消失，随着用酶量的增加，其染色强度增加。这些结果与用完整多角体作酶源的电泳结果是一致的。

讨 论

在GmNPV多角体蛋白质中，至少存在两种因子，一个是抗热的，一个是热敏感的。后者有降解多角体释放病毒粒子的功能，pH8.8时活性最强。抗热因子在pH3—9范围内，引起少量蛋白质从多角体释放，但不能降解多角体。在pH11和pH8.8时，GmNPV多角体的降解和可溶性蛋白的产生十分显著，但原因不同。由于在酸 (pH4.0) 和碱 (pH 11) 时，多角体的降解不受温度 (25°C和45°C) 和灭活与否(加热和不加热)的影响，说明酸碱对多

角体的降解是化学水解作用；相反，在pH8.8时，温度（25℃和45℃）与是否灭活，直接影响着多角体的降解和可溶性蛋白的产生，显然，这是多角体降解的酶催化反应。

0.5饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀多角体蛋白，酶蛋白回收率为36%，用Sephacryl300柱层析，回收率可达92.7%。在层析图谱上得到3个洗脱峰，峰1是酶蛋白主峰，峰2和峰3分别仅具有降解多角体和产生可溶性蛋白的活力，与用完整多角体作酶源得到的结果相同，说明存在于GmNPV多角体蛋白中的这类酶，的确是一组复合酶系。

电泳证明，纯化酶水解GmNPV多角体蛋白得到3条带，随着用酶量增加，多肽P36增加，多肽P65减少，可见P36是多角体的主要结构多肽，P65是P36的二聚体。P36一经被水解出来，多角体就破裂，病毒粒子释放，引起感染发生。用完整多角体作酶源也得到类似结果。

许多作者^[3-6]报道，在昆虫杆状病毒的多角体蛋白中存在一种碱性蛋白酶，最适pH为9.5左右。本文报道的GmNPV的多角体蛋白酶的最适pH是8.8。Langridge^[2]等证明，*Estigmene aerea*颗粒体病毒（EaGV）含有一种“内源蛋白酶”，最适pH为8.7。与我们的结果相同。而且偏碱性的最适pH与幼虫中肠消化液的pH非常一致。例如，Stainrs（1963）^[7]指出，大蜡螟幼虫（ $n=69$ ）的中肠pH范围是7.3—9.3，平均是8.04。

参 考 文 献

- [1] Bergold G.H., 1974, *Z. Naturforsch.*, 2: 122-143.
- [2] Rozlov E. et al, 1975, *J. Inverteb. Pathol.*, 25: 97-101.
- [3] Langridge W.H.R. & Balter K., 1981, *Virology*, 114: 595-600.
- [4] Polson R.R.A., 1980, *Intervirolgy*, 19, 16-25.
- [5] Scharnhorst D. & Weaver R., 1980, *Virology*, 102, 468-472.
- [6] Payne O. & Kalmakoff J., 1978, *J. Virology*, 26, 84-92.
- [7] Maeda S, et al, 1983, *J. Inverteb. Pathol.*, 42, 376-383.
- [8] Stainrs G. 1963, L. Dissertation, McGill Univer. Montr.,
- [9] Stainrs G, & Ellis B, 1971, *J. Inverteb. Pathol.*, 17: 350-353.
- [10] 刘年翠等, 1981, 武汉大学学报, 自然科学版, 2, 49—60页。

**STUDY OF PROTEOLYTIC ENZYME ASSOCIATED
WITH THE POLYHEDRAL PROTEIN OF
Galleria mellonella NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS**

Qi Yi-Peng

(Dept of Virology, Wuhan University)

G. Steiner

(Dept of Entomology, Ohio State Univer.)

Dissolve kinetics for polyhedral matrix protein of *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus was investigated with wide range of pH, different ionic strength and temperature. A proteolytic enzyme was confirmed with the viral polyhedron. Its optimum pH for dissolved polyhedron is 8.8.

The enzymes were purified by precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and chromatograph with Sephacryl in result a five fold increase of relative enzyme activity. It was lyophilized to be a white cotton-form. Three different active peaks were found on chromatograph map. Enzyme activity for producing dissolved polypeptide and dissolving polyhedra seems to be associated with each of these fractions but peak 1 is the main one, hence polyhedra are dissolved and virions are released.

Dissolved polypeptide produced two bands by PAG electrophoresis. One of them, the P36, perhaps is major structure polypeptide of the polyhedra. The reactive velocity of the enzyme to substrate is the function of enzyme concentration, so that it is plotted to obtain a curve with first-order kinetics.