

粉纹夜蛾核型多角体病毒诱导的胸苷激酶特性研究

王珣章 谢伟东 何代芬 郑晓文·
龙紫新 庞义 蒲蛰龙

(中山大学昆虫学研究所, 广州510275)

提 要

粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 核型多角体病毒 (TnNPV) 感染草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞后能诱导提高胸苷激酶的活性。不论是正常或感染细胞中的胸苷激酶都可将脱氧胞苷磷酸化, 酶活最适 pH 及 Mg^{++} 离子浓度值基本相同, DEAE-纤维素和 Cibacron blue-sepharose 柱层析所得酶活性图谱亦相似。TnNPV 在胸苷激酶缺陷型的草地贪夜蛾细胞中能正常复制, 但被感染细胞不具有胸苷激酶活性。由此可以确定, 经 TnNPV 感染诱导后, 活性有所提高的胸苷激酶不是病毒基因编码的。

关键词 杆状病毒 粉纹夜蛾 胸苷激酶 缺陷型细胞

杆状病毒 (Baculovirus) 基因组为单一分子、大小约 130 kb 的双股环状 DNA。由于它在害虫生物防治中的广泛应用^[1]以及能作为外源基因表达载体^{[2][3]}, 日益受到国内外普遍重视。杆状病毒 A 亚组中, 苜蓿尺蠖 (*Autographa californica*) 核型多角体病毒 AcNPV 与粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 核型多角体病毒 TnNPV 极易在离体培养的草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞中复制, 已成为昆虫杆状病毒分子生物学研究的模型^{[4][5]}。

杆状病毒感染昆虫细胞后能诱导提高细胞内 DNA 多聚酶和胸腺嘧啶脱氧核苷激酶、简称胸苷激酶 (Thymidine kinase, TK) 的活性^{[6][7]}。前文曾报道^[8]在 TnNPV 感染的草地贪夜蛾细胞中, 可分离到一种分子量约 126 KD 的具有 DNA 多聚酶活性的病毒特异性非结构蛋白。最近, AcNPV 诱导的 DNA 多聚酶已证实为病毒编码并已在基因组上精确定位 (Lois K. Miller, 私人通讯)。本文报道我们应用 TnNPV-草地贪夜蛾细胞系统, 进一步研究病毒诱导的 TK 酶特性, 探讨杆状病毒是否具有编码 TK 酶的基因。

本文于1988年9月7日收到。

* 中山大学生物化学专业88届本科毕业生

材料与 方法

病毒和细胞

TnNPV 和草地贪夜蛾细胞引自英国自然环境研究委员会病毒研究所。TnNPV 在草地贪夜蛾细胞的增殖培养条件及空斑试验按常规方法^[10]进行。

胸苷激酶活性的测定

[2-¹⁴C]胸腺嘧啶脱氧核苷、[U-¹⁴C]胞嘧啶脱氧核苷为 Amersham 公司产品, [³H]胸苷为中国科学院上海原子能研究所产品, DEAE 滤纸为 Whatman 公司产品。

除用于 TnNPV 感染 TK 酶缺陷型细胞酶活性试验的胸苷是 ³H 标记外, 其它试验用同位素试剂均为 ¹⁴C 标记。以 [³H]-胸苷为底物测定 TK 酶活性用水洗脱法^[10], 其它则用纸层析法^[11]。检测酶活性用的细胞浆液按前文所述方法^[11]制备。蛋白质含量以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准, Folin-酚法^[12]测定。

DEAE-纤维素柱层析

DEAE-纤维素 (DE52, Whatman) 柱 (1.5×6cm) 先用 EBB 缓冲液 (50mM Tris-HCl pH 9.0, 5mM 巯基乙醇) 平衡。50ml EBB 液洗柱之后, 将 4ml 按上述方法制备的细胞浆液上柱并用 56ml 的 0-0.67MKCl 连续梯度 EBB 液洗脱。每分部收集样品 2ml, 各取 50 μ l 测定酶活性。

Cibacron blue-sapharose 柱层析

Cibacron blue F3G-A 为英国 Ciba-Geigy 公司产品。它和琼脂糖凝胶 (Sephacrose CL-6B) 的交联接 Ghosh 法^[13]进行。柱层析则用 Baxter 方法^[14], 即用 6ml 各含不同浓度的与 Cibacron blue 分子结构相似的 ATP^[13] (2-14mM) 的 EBB 缓冲液依次作阶梯梯度洗脱。每分部收集 3ml, 各取 50 μ l 测定 TK 酶活性。

胸苷激酶缺陷型 (TK⁻) 细胞的感染

TK⁻草地贪夜蛾细胞株为本室按下述方法建立^[10], 用浓度为 5 mg/ml 的甲基磺酸乙酯 (EMS) 处理对数生长期细胞, 处理后去除诱变剂并换加 6-10 倍量的培养基连续培养 7 天, 然后在培养基中加入浓度为 25 μ g/ml 的 5-溴尿嘧啶脱氧核苷 (BrdU), 待细胞长成群体, 再逐级成倍增加 BrdU 的浓度 (即 50、100、200、400 μ g/ml)。每级浓度传代 2 次, 传代时取上层分裂旺盛的细胞转瓶培养, 由此筛选出抗 BrdU 的 TK⁻草地贪夜蛾细胞株。TK⁻细胞的培养及 TnNPV 感染 TK⁻细胞的试验按常规进行^[9]。

结 果

一、正常和感染细胞中 TK 酶的基本特性

正常与感染昆虫细胞中的 TK 酶除了能将胸苷磷酸化之外, 还可用胞嘧啶脱氧核苷作底物。如图 1 所示, 酶促反应最适的 pH 和 Mg⁺⁺ 离子浓度值近乎一致; 1、在反应液中不含有 Mg⁺⁺ 离子时, TK 酶几乎不具活性, 而在 5mM 以上 Mg⁺⁺ 离子浓度下才具有比较大的活性 (虽然将胸苷和脱氧胞苷磷酸化的最适 Mg⁺⁺ 离子浓度不完全相同); 2、不论是用正常或感染细胞的 TK 酶, 还是用胸苷或脱氧胞苷作底物, 反应最适 pH 值在 pH 9.0 至 9.5 范围内且差别不大。

二、胸苷和脱氧胞苷的竞争性试验

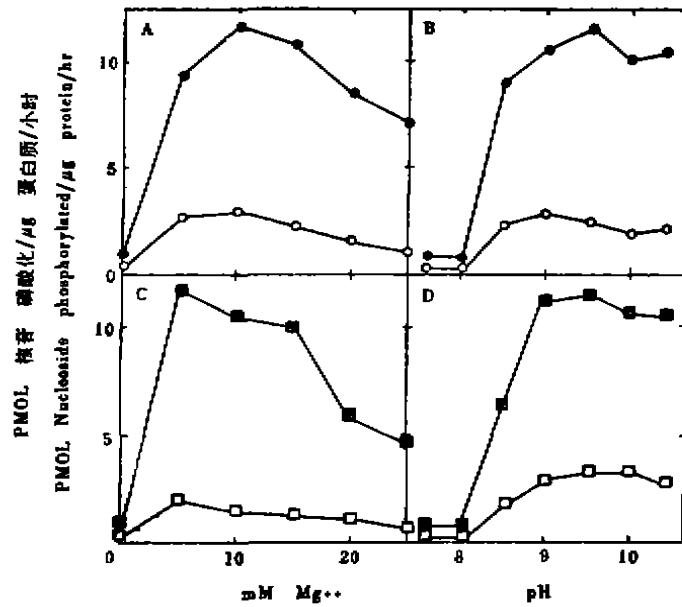


图1. 不同pH及Mg⁺⁺离子浓度值对正常和TnNPV感染草地贪夜蛾细胞中胸苷激酶活性的影响。

图1A和1B为TK酶以胸苷为底物的活性；(○—○)为正常细胞；(●—●)为感染细胞。

图1C和1D为TK酶以脱氧胞苷为底物的活性；(□—□)为正常细胞；(■—■)为感染细胞。

Figure 1. Divalent cation(Mg⁺⁺)and pH requirements of thymidine kinase activities in TnNPV infected and uninfected *S. frugiperda* cells. (A) and (B) phosphorylating thymidine activities: (○—○) uninfected; (●—●) infected. (c) and (D) phosphorylating deoxycytidine activities: (□—□) uninfected; (■—■) infected.

不同浓度的非放射性同位素标记的脱氧核苷对同位素标记的胸苷或脱氧胞苷作底物的TK酶酶促反应速度的影响见图2。其结果表明,脱氧胞苷作为底物比胸苷具有更强的竞争性。在相同标准反应条件下,TK酶以胸苷为底物的K_m值、即达到酶促反应最大速度一半时底物浓度值为6.25 μM,比以脱氧胞苷为底物的K_m值2.05 μM大(图未示出)。

三、TK酶的DEAE-纤维素和Cibacron--blue柱层析

DEAE-纤维素柱层析结果如图3A与3B所示。在0.21M KCl洗脱浓度下,正常与感染细胞中TK酶活性都出现峰值,感染细胞TK酶活性峰稍宽一些。图3C与3D是用不连续浓度梯度的ATP洗脱的Cibacron-blue柱层析TK酶活性图谱,酶活性分布为

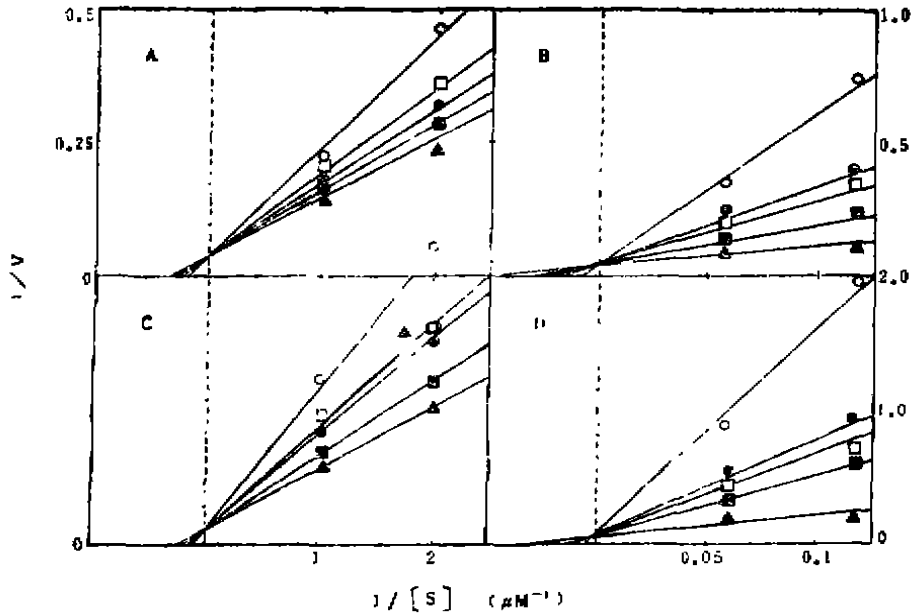


图2 不同浓度的胸苷或脱氧胞苷对正常细胞或ToNPV感染草地贪夜蛾细胞中TK酶促反应速度的影响。Y是每微克细胞蛋白质每小时磷酸化脱氧核苷的量(pmol)；S是底物浓度(μM)。纵坐标为酶促反应速度的倒数；横坐标为底物浓度的倒数。图2A和2B为感染细胞TK酶，图2C和2D为正常细胞TK酶；图2A和2C以脱氧胞苷为底物；图2B和2D以胸苷为底物。(▲—▲)为正常反应；(■—■)在反应液中加入1μM胸苷；(□—□)加1μM脱氧胞苷；(●—●)加2μM胸苷；(○—○)加2μM脱氧胞苷。以胸苷为底物时(图2B和2D)，在反应液中加入胸苷或脱氧胞苷的量都分别比图中所示浓度大10倍。

Figure 2. Inhibition of thymidine kinase activities in ToNPV infected and uninfected *S. frugiperda* cells, (A) and (B) infected; (C) and (D) uninfected, (A) and (C) phosphorylating deoxycytidine activity; (B) and (D) phosphorylating thymidine activity, Y is pmol deoxynucleoside phosphorylated per μg protein per hour, S is the μM substrate concentration, (▲—▲) normal untreated reaction; (■—■) 1μM thymidine; (□—□) 1μM deoxycytidine, (●—●) 2μM thymidine, (○—○) 2μM deoxycytidine in the TK phosphorylating thymidine assays these molarities were increased tenfold.

两个峰，分别由4mM及8mMATP洗脱。经病毒感染细胞后所得8mM峰明显升高。用DEAE-纤维素柱层析初提纯的TK酶再上Cibacron-blue柱所得结果见图3E与3F。柱层析酶活性图谱与图3C和3D相似。图3A、3B、3C和3D柱层析结果还表明，不论用胸苷或脱氧胞苷为底物，TK酶活性峰基本重叠。

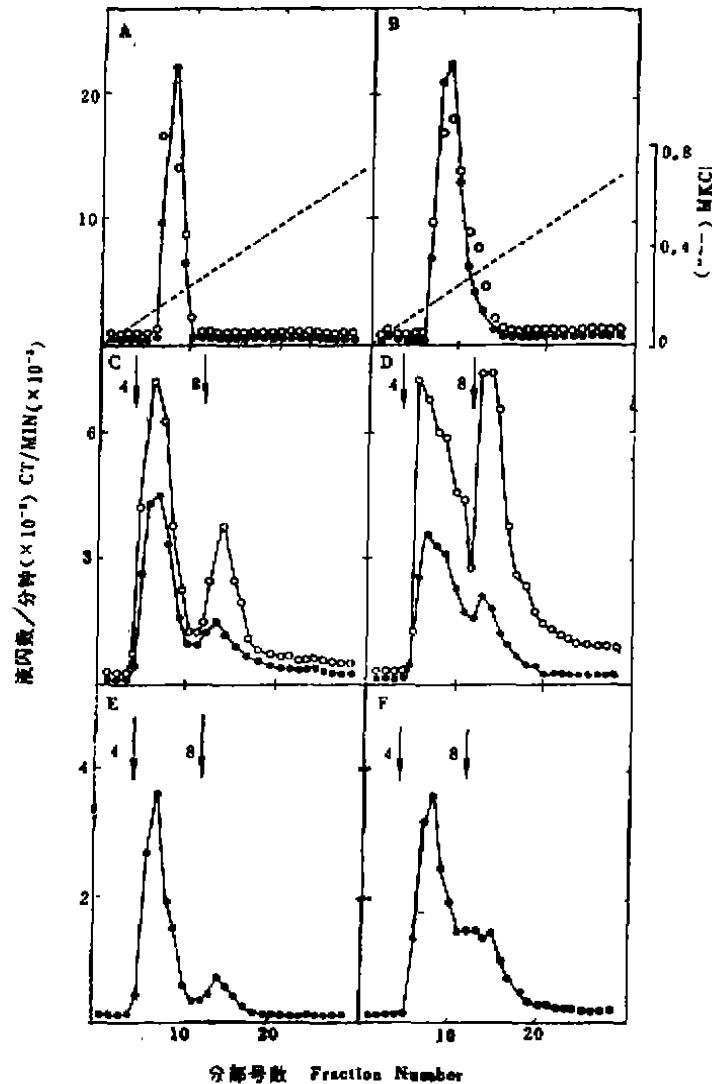


图3 TK酶的DEAE-纤维素柱层析(图3A和3B)及Cibacron blue-sepharose柱层析(图3C、3D、3E和3F)酶活性图谱。

图3A、3C和3E为正常细胞,图3B、3D和3F为感染细胞。(●—●)以胸苷为底物(○—○)以脱氧胞苷为底物。图3E和3F是将TK酶经DEAE-纤维素初提纯后再上Cibacron-blue柱层析所得图谱。-----为KCl连续梯度浓度;↓为KCl阶梯梯度洗脱浓度。

Figure 3. Chromatography of thymidine kinase activities present in TaNPV-infected and uninfected *S. frugiperda* cells on DEAE-cellulose(A)(B) and Cibacron-blue sepharose (C)(D)(E)(F) columns. (A), (C) and (E) uninfected, (B), (D) and (F) infected. (●—●) phosphorylating thymidine activity, (○—○) phosphorylating deoxycytidine activity. (E) and (F) semipurified thymidine kinase activities, from DEAE-cellulose chromatography on Cibacron-blue sepharose. ---, KCl concentration gradient; ↓, KCl concentration stepwise elution.

四、TaNPV感染TK⁻草地贪夜蛾细胞试验

TnNPV 感染 TK⁻ 细胞后, 虽然病毒多角体的出现要慢一天左右, 但不论是 TK⁺ 或 TK⁻ 细胞, 感染后期 (72小时) 百分之八十以上的细胞都有清晰可见的多角体。TK⁺ 细胞受感染12小时后, TK 酶活性开始上升, 至24小时达峰值, 随后缓慢下降; 而 TK⁻ 细胞受感染后自始至终 TK 酶活性与对照背景值相同 (图 4)。

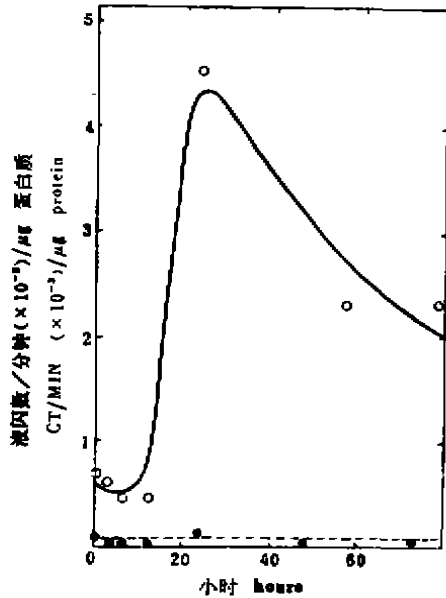


图 4 TnNPV 感染的 TK⁺ 或 TK⁻ 草地贪夜蛾细胞中胸苷激酶的活性。(O—O) 为感染 TK⁺ 细胞中 TK 酶活性; (●—●) 为感染 TK⁻ 细胞中 TK 酶活性。

Figure 4. Thymidine kinase activities in normal or TK-deficient *Spodoptera frugiperda* cells infected with TnNPV. (O—O) infected TK⁺ cells; (●—●) infected TK⁻ cells.

讨 论

TnNPV 感染草地贪夜蛾细胞后能提高细胞内 TK 酶的活性。TK 酶以胸苷为底物的 Km 值 ($6.25\mu\text{M}$) 比用脱氧胞苷的 Km 值 ($2.05\mu\text{M}$) 大, 说明 TK 酶磷酸化脱氧胞苷的能力比胸苷强。两种脱氧核苷的竞争性试验也证实了这点。从 TK 酶磷酸化两种底物的最适 pH 和 Mg^{++} 离子浓度值以及柱层析酶活性峰重叠的结果看, 磷酸化胸苷和脱氧胞苷的酶应是同一种, 确切地说是嘧啶脱氧核苷激酶 (Pyrimidine Deoxyribonucleoside Kinase)。

试验结果还表明, 正常和感染细胞中 TK 酶活性的最适反应特性相似。我们用 DEAE-纤维素和 Cibacron-blue 柱层析的方法无法将细胞内原有的 TK 酶和病毒感染细胞后诱导提高活性的 TK 酶分离开。感染细胞中 TK 酶活性峰稍宽 (DEAE-纤维素柱层析) 或稍高一些 (Cibacron-blue 柱层析), 估计是病毒感染细胞后 TK 酶特性有些改变或单纯是酶分子数量的增加所致。TnNPV 诱导的 TK 酶和疱疹病毒 (Herpesvirus)、痘病毒 (Poxvirus) 诱导的 TK 酶 (已证实是病毒基因编码的^{[16][18]}) 以及 TnNPV (或 AcNPV) 本身诱导的 DNA 多聚酶不一样, 后二类与细胞内原有的酶都可用柱层析方法分离开, 酶的其他性质, 包括对某些药物的特异性作用和原有的酶有很大的不同^{[8][11][17][18]}。TnNPV 诱导的 TK 酶除了如前所述的特性和细胞 TK 酶类似之外, 它还对那些抗杆状病毒 DNA 合成抑制物、如溴乙稀基脱氧尿苷的磷酸化程度亦和细胞

TK 酶无多大差别^[18]。

某些 DNA 病毒如乳多空病毒 (Papovavirus) 感染细胞后能提高细胞内有关 DNA 合成的酶的活性, 但不具有编码这些酶的基因^[19]。为进一步探讨 TnNPV 是否具有编码 TK 的基因, 我们用 TnNPV 感染 TK⁻ 草地贪夜蛾细胞。感染试验结果表明, TnNPV 虽可在 TK⁻ 细胞中正常复制, 细胞自始至终不具有 TK 酶活性。另外, 我们还用自己构建的带标记的 AcNPV 多角体转移载体质粒^[20], 将疱疹病毒 TK 基因插入杆状病毒基因组中多角体启动子下游区, 由此重组的病毒感染 TK⁻ 草地贪夜蛾细胞, 在细胞中可检测出 TK 酶活性 (另文发表)。这说明杆状病毒若具有编码 TK 酶的基因, 是会在 TK⁻ 细胞中表达的。

昆虫杆状病毒的复制规律和其它大的动物 DNA 病毒、如与杆状病毒基因组大小相近的疱疹病毒等相似^[4]。它们都能在细胞内诱导合成许多病毒特异性蛋白多肽, 且这些蛋白多肽是以级联方式调控的 (cascade regulation)^{[9][21]}。感染细胞中都有病毒特异性非结构蛋白的合成^[4]。杆状病毒感染细胞后能诱导提高 TK 酶的活性, 而又不像疱疹病毒或痘病毒那样具有编码 TK 的基因, 在这方面, 杆状病毒又像小的动物 DNA 病毒、如基因组比杆状病毒小几十倍的乳多空病毒。这些结果对研究杆状病毒在病毒学中的分类及其进化有一定意义。了解受杆状病毒感染后细胞中的 TK 酶的特性亦对今后筛选治疗益虫杆状病毒病的药物设计提供了基础。昆虫杆状病毒不含有编码 TK 的基因, 就能人为在多角体基因编码区插入 TK、如疱疹病毒 TK 基因。像痘病毒载体体系那样, 利用 TK 基因插入失活机理^[22], 我们就可建立起一种简便的 5'—溴—2'—脱氧尿苷筛选重组杆状病毒的系统, 这无疑是将为昆虫杆状病毒载体体系的建立又增加了一条新途径。

参 考 文 献

- [1] 潘懿龙, 1984, 害虫生物防治的原理和方法, P.221--257, 科学出版社。
- [2] Miller, L.K., 1988, In "Annual Reviews of Microbiology" 42: 177—199
- [3] Luckow, V.A. and Summers, M.D., 1988, *Bio/Technology* 6: 47—55
- [4] Kelly, D.C., 1982, *J.Gen. Virol.* 63: 1—13.
- [5] 庞义等, 1987, 中山大学学报 (自照科学版) 2: 104—106.
- [6] Kelly, D.C., 1981, *J. Gen. Virol.* 52: 313—319.
- [7] Miller, L.K. et al., 1981, *J. Virol.* 40: 305—308.
- [8] Wang, X. and Kelly, D.C., 1983, *J.Gen. Virol.* 64: 2229—2236
- [9] Kelly, D.C. and Lescott, T., 1981, *Microbiologica* 4: 35—57.
- [10] 谢伟东等, 1989, 中山大学学报 (自然科学版), 发表中。
- [11] Wang X. et al., 1983, *J. Gen. Virol.*, 64: 1221—1227.
- [12] Lowry, O. H. et al., 1951, *J.Biol. Chem.* 193: 265—275.
- [13] Ghosh, A. et al., 1972, *J.Chromat.* 69: 202—208.
- [14] Baxter, A. et al., 1978, *Biochem. J.* 173: 1005—1008.
- [15] Mcknight, S.L., 1980, *Nucl. Acids. Res.* 8: 5949—5964.
- [16] Boyle, D. B., et al., 1987, *Virology* 156: 355—365.
- [17] Allaudeen, H. S. et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2698—2702
- [18] Hruby, D. et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3411—3415.

- [19] Luria, S.E. *et al.* (ed), 1978, In "General Virology", P 349—360, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- [20] 王珣章等, 1989, 中山大学学报(自然科学版), 4: 114—116.
- [21] Carsten, E. B. *et al.*, 1979, *Virology*, 99: 386—398.
- [22] Maskett, M. *et al.*, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7415—7419

Characterization of Thymidine Kinase Activity Associated with the Replication of *Trichoplusia ni* Nuclear Polyhedrosis Virus

Wang Xun-zhang Xie Wei-dong He Dai-feng
Zheng Xiao-wen Long Qing-xing Pang Yi
Pu Zhe-long

(Institute of Entomology, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Trichoplusia ni nuclear polyhedrosis virus (TnNPV) stimulated thymidine kinase (TK) activities in infected *Spodoptera frugiperda* cells. TK activities both in infected and uninfected cells are similar in their pH, Mg⁺⁺ optima for assays and elution patterns on DEAE—cellulose and Cibacron—blue sepharose chromatography.

The facts that TnNPV could replicate in TK⁻ *S. frugiperda* cells but no TK activity was detected in the infected cells implies that the virus-stimulated activity was not contributed by the virus-coded enzyme.

Key words: Baculovirus *Trichoplusia ni* Thymidine Kinase(TK)
TK-deficient cells