

251-256  
棉铃虫核型多角体病毒凋亡抑制基因对  
p35 基因失活病毒的功能拯救

王业富 齐义鹏\* 朱应 李小峰 李志达

(武汉大学病毒研究所, 武汉 430072)

**摘要** 野生型苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)能感染棉铃虫细胞,不引起细胞凋亡,用 LacZ 基因使 AcNPV 凋亡抑制基因 p35 插入失活,得到缺陷病毒 Acp35Z 能迅速引起棉铃虫细胞凋亡,但缺陷病毒本身不能复制。用 AcNPV 即早期基因 IE1 启动子带动棉铃虫杆状病毒(HaNPV) p35 基因在棉铃虫细胞中瞬时表达,能拯救 p35 基因失活病毒 Acp35Z 复制。通过 X-gal 显色反应和 dot ELISA 分别检测到了半乳糖苷酶的活性和 p35 基因的表达,证明了所克隆的 HaNPV p35 基因不仅是一个凋亡抑制基因,也是一个与杆状病毒复制相关的基因,它的瞬时表达能支持 Acp35Z 在棉铃虫细胞中复制。

**关键词** 杆状病毒, 凋亡抑制基因 p35, 瞬时表达, 功能拯救

昆虫杆状病毒的复制分为四个时相:即早期、迟早期、晚期、迟晚期。即早期基因表达由宿主 RNA 聚合酶 II 控制,可不受病毒基因调控<sup>[1]</sup>。L. K. Miller 等发现苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(AcNPV)有 18 个基因参与病毒 DNA 复制的调控<sup>[2]</sup>,包括 ie0, ie1, ie2, p35, vp39, p147 等,其中前四个基因是即早期基因。

一般而言,病毒都有诱导宿主细胞凋亡的能力,同时也减少了病毒自身的复制。这种宿主对病毒的反应为一种抗病毒的防御机制。另一方面病毒为了自身生存,在进化中获得了具有凋亡抑制功能的基因(如杆状病毒 p35 基因),以阻止细胞凋亡,有利于病毒复制<sup>[3]</sup>。

AcNPV 的凋亡抑制基因 p35 全长约 1.3 kb,能编码 299 个氨基酸长度的蛋白质<sup>[4]</sup>。早晚期都能表达。已发现它有多种功能,主要功能是抑制病毒感染其允许细胞 Sf-9 引起的细胞凋亡,支持病毒复制。并且它对细胞的凋亡抑制功能具有通用性。瞬时或稳定表达能抑制由多种不良刺激引起的从低等的线虫、果蝇、昆虫到高等哺乳动物细胞的凋亡<sup>[5]</sup>。而 AcNPV p35 基因缺失,或者插入失活的病毒,均不能在 Sf 细胞中复制,子代病毒产量降低 1000 倍以上。此外, P35 作为一个反式作用因子还参与其它早晚期基因的表达与调控,有研究表明 p35 基因影响早期基因 ie1 和晚期基因 p39 的表达。目前已在 AcNPV、家蚕核多角体病毒(BmNPV)<sup>[6]</sup>、粘虫核多角体病毒(LsNPV)<sup>[7]</sup>、粉纹夜蛾核多角体病毒(TnNPV)<sup>[8]</sup>中发现了 p35 基因。序列分析发现,这是一个结构与功能均比较保守的基因。

国外关于杆状病毒 p35 基因与病毒 DNA 复制有关的结论大都是用同源基因研究的。根据 p35 基因的保守性和结构与功能的通用性,我们用异源 p35 基因对凋亡抑制基因缺失的病

收稿日期:1998-02-18, 修回日期:1998-04-10

\* 联系与负责作者

毒进行功能拯救,以便得出 p35 基因与复制有关的确切结论。为此,我们首次从中国棉铃虫核型多角体病毒(HaNPV)中扩增到 p35 基因。进行了序列分析<sup>[9]</sup>,构建了昆虫细胞特异性表达载体,研究了它对凋亡抑制基因失活的 AcNPV 复制的影响。

## 材料与方法

### 1 细胞、病毒和质粒

粉纹夜蛾 Tn368 细胞来自武汉大学典型培养物保藏中心,AcNPV 和 Sf9 细胞由美国加州大学 Federici 教授惠赠,棉铃虫核型多角体病毒 HaNPV 购于湖北省国营蒋湖农场。AcNPV 的缺陷型病毒 Acp35Z、棉铃虫 Ha 细胞和 AcNPV P35 抗体均由武汉大学杜全胜博士赠送。其中 Acp35Z 的 p35 基因已由大肠杆菌 LacZ 基因插入失活,用其感染允许细胞 Sf9,诱导细胞迅速凋亡,病毒不能复制,但当用它感染 Tn368 细胞时,此病毒能复制,并由多角体基因启动子驱动 LacZ 基因表达,而使细胞培养液染成蓝色。质粒 pIEneo 由美国加州大学 Jarvis 和 Guarino 教授惠赠,它是带有 AcNPV 即早期基因 IE1 启动子驱动新霉素抗性基因(neo)表达的重组质粒。pGEM7Z 购于 PROMEGA 公司,大肠杆菌 TG1 为本室保存。

### 2 HaNPV p35 基因与 P35 蛋白抗体制备

HaNPV p35 基因是用 PCR 方法从纯化的棉铃虫核型多角体病毒 DNA 中扩增得到的 p35 基因完整编码区 DNA。引物合成、PCR 扩增和基因测序与鉴定见文献<sup>[9]</sup>。在起始密码子 ATG 前加有 Pvu II 位点,终止密码子后 93 位有 EcoRI 切点。将克隆得到的该基因插入到原核表达质粒中,在大肠杆菌中表达 HaNPV p35 基因,然后用特制的 NiSO<sub>4</sub> 柱,纯化 p35 蛋白(纯度约为 70%),用这种纯化蛋白作抗原,混以完全弗氏佐剂,分三次(间隔一周)分别静脉、皮下、肌肉注射家兔,一个月后杀兔取血,分离血清,并与 AcNPV p35 基因抗体对照检测,确证所获抗体为 P35 抗体。

### 3 DNA 的提取与连接、转化

质粒 DNA 的提取、酶切、回收、连接、采用常规 DNA 操作,重组质粒的转化采用常规 CaCl<sub>2</sub> 法,在氨苄青霉素平板上用蓝白斑筛选阳性菌落。

### 4 细胞培养与杆状病毒增殖

Tn368 细胞采用 Gibco 公司生产的 Grace 培养基 + 10% 胎牛血清(FBS)进行培养;Ha 细胞是在普通昆虫培养基上将 pH 值上调至 6.5,静置于 27℃ 培养。病毒增殖是待传代细胞贴壁完全、铺满单层后,用病毒粒子悬液 50 μL 感染,培养 3 天,当 90% 以上细胞出现病变即可收获备用。

### 5 质粒 DNA 与杆状病毒对昆虫细胞的转化与感染

取对数生长期的昆虫细胞,倾出培养液以磷酸钙共沉淀法转化质粒 DNA(10 g),静置吸附 8 h,弃转染混合液,再用病毒粒子悬液 50 μL 感染,培养 24 h 和 48 h 后分别观察细胞病变。

### 6 p35 基因瞬时表达和病毒复制的检测

当 Acp35Z 感染预先用质粒 pIEp35 转化的昆虫细胞 1h 后,加入 X-gal 40 μL 继续培养 2 d,观察培养基颜色,取感染后 72 h 的细胞培养液,用 ELISA 仪检测吸光度的变化,以 LacZ 基因的表达表示 Acp35Z 的复制。同时采用 dot ELISA 法检测 HaNPV p35 基因在棉铃虫细胞中的瞬时表达,收获细胞,用超声波破碎,然后用点样器分别将此瞬时表达的抗原点在 ELISA 板的小孔中,室温吸附 80 min,加 1% BSA(胎牛血清)封闭,加 P35 蛋白抗体,酶标羊抗兔 IgG(PBS-T 稀释 1000 倍),37℃ 孵育 1h,洗涤 3 × 10 min,加用 4-氯乙酰胺临时配制底物,显色 5~10 min,水洗终止反应。

## 结 果

### 1 真核表达载体 pIEp35 的构建

用 PvuII 和 EcoRI 双酶切 PCR 扩增的 HaNPV p35 基因片段,用 BamHI 和 Hinc II 双酶消

化质粒 pAcIEneo DNA, 回收 IE1 启动子片段, 用 BamHI 和 EcoRI 完全酶切载体 pGEM7Z DNA, 然后将 3 kb 的载体 DNA、1 kb 的 p35 基因编码序列、0.6 kb 的 IE1 启动子三组份一起于 16 °C 温育, 连接 6 h, 转化感受态大肠杆菌 TG1, 涂氨苄青霉素抗性平板, 加入 IPTG 4 μL, X-gal 30 μL。挑取白色菌落, 其中含有真核表达载体 pIEp35(图 1)。

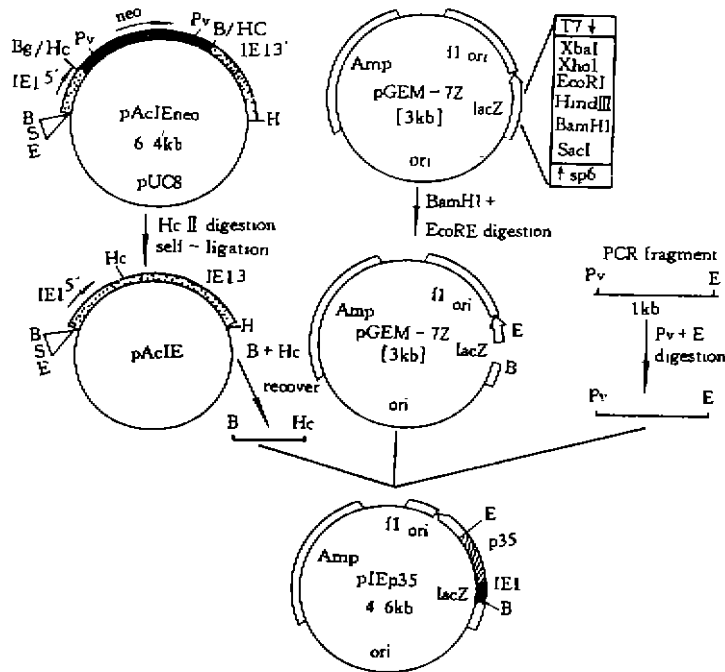


图 1 重组质粒的克隆策略

Fig 1 Cloning strategy of recombinant plasmid pIEp35

B - BamHI; E - EcoRI; pv - PvuII; Hc - HincII; Bg - BglII; S - SmaI

## 2 重组质粒的酶切鉴定

将可能的阳性重组质粒 DNA 分别用 BamHI、EcoRI、PvuII、HincII 单酶切, 用 BamHI + EcoRI、BamHI + XbaI 双酶切(图 2)。从图 2 可见单酶切将质粒切成 4.6 kb 的线形 DNA(c, d, e), 双酶切得到 1.6 kb 的插入片段和 3 kb 的载体片段。这是因为 0.6 kb IE1 启动子片段和 p35 基因通过平端酶(HincII 和 PvuII)而被连接成一个 1.6 kb 的片段, 证明构建过程是成功的。

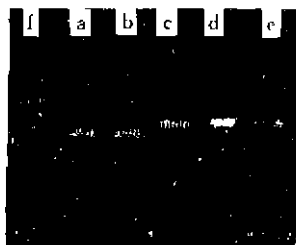


图 2 质粒 pIEp35 的酶切图谱分析

Fig 2 Identification of pIEp35 digested by enzymes

a - BamHI + EcoRI; b - BamHI + XbaI; c - EcoRI; d - BamHI; e - XbaI  
f - λDNA HindIII/EcoRI Marker

### 3 p35 基因失活诱导的昆虫细胞凋亡

取 p35 基因失活的病毒 Acp35Z 病毒粒子  $2 \mu\text{L}$ , 感染对数生长期的 Tn 368 细胞, 细胞产生明显病变, 72 h 后收获病毒悬液。另取棉铃虫细胞三瓶, 用 Acp35Z 感染, 并用 HaNPV 和 AcNPV 感染作对照, 36 h 后用光学显微镜下观察。从图 3a 可见, Acp35Z 使棉铃虫细胞发生凋亡, 细胞变成大小基本一致的囊泡样凋亡小体。而用 HaNPV 感染的细胞产生典型的病变特征, 即细胞膨大, 直径比正常细胞增加 25% ~ 50%, 细胞核占细胞体积的三分之二以上, 将细胞质挤向一边, 细胞内可见许多折光性强的 HaNPV 子代多角体颗粒(图 3b)。



图 3a p35 基因缺失病毒感染棉铃虫细胞诱发的凋亡现象(400 倍)

图 3b 病毒正常感染棉铃虫细胞后的细胞病变观察(400 倍)

Fig 3a Checking of the apoptosis of Ha cells induced by Acp35Z infection( $\times 400$ )

Fig 3b Pathematological examination of virus infection by wild type HaNPV( $\times 400$ )

### 4 dot-ELISA 检测 p35 基因在棉铃虫细胞中的瞬时表达

为了证实 HaNPV p35 基因在棉铃虫细胞中的瞬时表达, 我们用 dot ELISA 分别测定了 pIEp35 + Acp35Z 共感染、仅用质粒 pIEp35 感染和仅用 Acp35Z 感染的棉铃虫细胞, 结果见图 4。从图 4 看出, 用 pIEp35 质粒单独或共转染的细胞均有显色反应(a, b), 而对照细胞为阴性(c, d), 证明了质粒 pIEp35 在棉铃虫细胞中, 由于杆状病毒即早期基因 IE1 启动子驱动 p35 基因得到了瞬时表达。

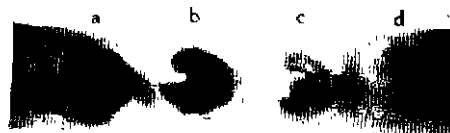


图 4 HaNPV p35 基因瞬时表达的 dot ELISA 检测

a pIEp35 + Acp35Z 共转染细胞; b. pIEp35 转化的细胞; c. Acp35Z 感染的细胞; d. 对照细胞

Fig 4 Examination of the transient expression of p35 gene from HaNPV whith dot ELISA

a. pIEp35 + Acp35Z co-transfected Ha cells; b. pIEp35 transfected cells; c. Acp35Z infected cells; d. Ha cells. (control)

### 5 HaNPV p35 基因对 Acp35Z 病毒复制的拯救

取 3 瓶生长良好的 Ha 细胞,其中一瓶用质粒 pIEp35 转化和 Acp35Z 病毒粒子感染,另二瓶分别转化质粒 pIEp35 和感染 Acp35Z 作对照,加入 X-gal,48 h 后观察,从图 5a 可以看出,只有共转染细胞变成了蓝色,两瓶对照细胞均未出现蓝色。说明 Acp35Z 中的 lacZ 基因得到了表达,经吸光度测定,其 OD 值分别为 0.65 和 0.35。显微镜下观察到蓝色细胞有典型的病理效应和 Acp35Z 的子代多角体颗粒(图 5b)。证明了 HaNPV p35 基因的瞬时表达拯救了 p35 基因缺失的 Acp35Z 在棉铃虫细胞中的复制。

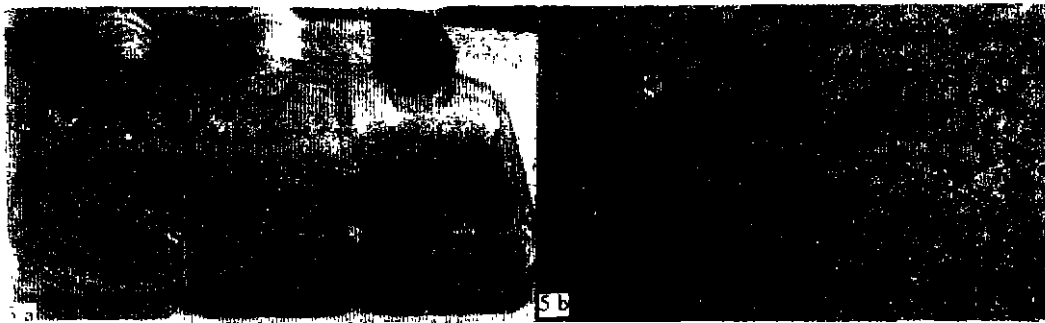


图 5 p35 基因在棉铃虫细胞中的瞬时表达和 Acp35Z 的复制

a. pIEp35 + Acp35Z 转染;b. pIEp35 转化;c. Acp35Z 感染;d. pIEp35 + Acp35Z 共转染细胞的显微镜观察(310 倍)。

Fig 5 Transient expression of P35 gene in Ha cells and replication of Acp35Z

a. Cotransfected blue cells;b. only transformed with pIEP35;c. only infected by Acp35Z;d. pIEp35 + Acp35Z cotransfected cells on the microscopy

## 讨 论

杆状病毒即早期基因可以不依靠病毒自身 RNA 多聚酶,而由宿主 RNA 聚合酶 II 进行转录,然后转移到细胞内质网上翻译。本研究用以 AcNPV 的即早期基因 IE1 启动子与 HaNPV p35 基因组成表达盒,构建表达质粒 pIEp35。由于昆虫细胞的 RNA 聚合酶能特异性的识别 IE1 启动子,故质粒 pIEp35 能在昆虫细胞中瞬时表达具有凋亡抑制功能的 P35 蛋白。

Acp35Z 是一个在其凋亡抑制基因 p35 中插入了由多角体蛋白基因启动子带动 lacZ 基因并使 p35 基因失活的缺陷病毒。该病毒的感染迅速引起棉铃虫细胞凋亡,病毒 DNA 不能复制,lacZ 基因不能表达。而 Acp35Z 与质粒 pIEp35 共转染后的细胞则使 LacZ 正常表达(细胞液呈蓝色),Acp35Z 能正常复制,并装配成多角体颗粒,说明 HaNPV p35 基因的瞬时表达能拯救 p35 基因失活病毒在棉铃虫细胞中复制。为了进一步证实 LacZ 基因的表达和 Acp35Z 的复制确为 p35 基因的瞬时表达所致,用 dot ELISA 测定了 p35 蛋白的抗原抗体反应,取得了阳性结果,因而证明了本实验所克隆的 p35 基因是一个有功能的凋亡抑制基因。

## 参 考 文 献

- 1 Dickson JA, Friesen PD. Identification of upstream promoter elements mediating early transcription from 35,000 - molecular weight protein gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1991, 65(8):4006 - 4016
- 2 Todd J W, Passarelli AL, Miller L K. Eighteen baculovirus genes, including lef-11, p35, 39k, and p47, support late gene expression. *J Virol*, 1995, 69:968 - 974
- 3 彭艳华. 粘虫核型多角体病毒凋亡抑制基因的研究. [博士论文]. 武汉: 武汉大学, 1995
- 4 Clem R J, Miller L K. Apoptosis reduces both the *in vitro* replication and *in vivo* infectivity of baculovirus. *Virology*, 1993, 67: 3730 - 3738
- 5 施先宗. 粉纹夜蛾核型多角体病毒 p35 基因功能的研究. [博士论文]. 广州: 中山大学, 1995
- 6 Hershberger P A, Dickson JA, Friesen P D. Site - specific mutagenesis of the 35 - kilodalton protein gene encoded by *Autographa californica* polyhedrosis virus: cell line - specific effects on virus replication. *J Virol*, 1992, 66(9):5525 - 5533.
- 7 Robertson N M, Zhangrilli J, Fernandes - Alntrri T *et al* . Baculovirus p35 inhibits the glucocorticoid - mediated pathway of cell death. *Cancer Res*, 1997, 57:43 - 47
- 8 Shizuo G K, Majima K, Maeda S. Identification and characterization of the p35 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevent viral - induced apoptosis. *J Virol*, 1993, 67(1):455 - 463
- 9 王业富, 齐义鹏, 李志达等. 棉铃虫核型多角体病毒 p35 基因的 PCR 扩增、克隆及其在原核细胞中的表达. *病毒学报* (待发表)

### An Antiapoptosis p35 Gene from *Heliothis armigera* Polyhedrosis Virus Rescues Acp35Z Replication in Non-permissible Cell Line

Wang Yefu    Qi Yipeng\*    Zhu Ying    Li Xiaofong    Li Zhida

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract** p35 gene from baculovirus is an antiapoptosis gene which can sustain virus multiplication when infected by baculovirus. Both p35 deleted and inserting inactivated AcNPV can not replicate in Sf cell lines and Ha cell line. It is almost the same in BmNPV. Acp35Z which generated from AcNPV inserted LacZ gene within p35 gene causes apoptosis in Ha cell line, but the abortion replication can be rescued by transient expression of HaNPV p35 gene driven by AcNPV IE1 promotor. The result was reconfirmed with X-gal manifest and Dot-ELISA.

**Key words** Baculovirus, Antiapoptosis gene p35, Rescue, Transient expression