

棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白基因 2.6kb 片段的表达*

胡蓉, 孟小林**, 徐进平, 王健, 鲁伟

(武汉大学病毒研究所, 湖北武汉 430072)

Expression of 2.6kb Enhancin Gene Fragment from
Helicoverpa armigera Granulosis Virus

HU Rong, MENG Xiao-Lin**, XU Jin-Ping, WANG Jian, LU Wei

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: The 2.6kb fragment of enhancing gene from *Helicoverpa armigera* granulosis virus was inserted into vector pQE32 and expressed successfully in *E. coli* M15. The synergy of expression product (P_{102}) on *Helicoverpa armigera* nuclear polyhedrosis virus (HaNPV) and Bt against the 2nd instar larvae of *H. armigera* was studied. The results indicated that the accumulated mortality of the larvae increased 6.25% ~ 27.09% on 168h post infection and the median lethal time decrease at least 12.3h in HaNPV + En treated compared with those in HaNPV treated. The accumulated mortality of the larvae increase 28.18% on 72h postinfection and the median lethal time decreased 12.33h in Bt + En treated compared with that in Bt treated.

Key words: *Helicoverpa armigera* Granulosis Virus; Enhancin, Cloning; Expression; Bioassay

摘要: 以棉铃虫颗粒体病毒 (*Helicoverpa armigera* granulosis virus, 简称 HaGV) 基因组的 DNA 为模板设计引物, PCR 扩增病毒增效蛋白 (Enhancin) 基因, 然后经 *Bam*H I/*Pst* I 双酶切消化, 得到近乎全长的约 2.6kb 的增效蛋白基因片段, 再与 pQE32 质粒连接, 构建了重组表达载体 pQE32/En, 转化大肠杆菌 M15 (pREP4), 在 IPTG 诱导下表达出分子量约为 102kD 的融合蛋白并命名为 P_{102} , 纯化的 P_{102} 包涵体显示了明显的增效活性, 在感染后 168h 时统计可提高 HaNPV 对棉铃虫幼虫的感染死亡率 6.25% ~ 27.09%, 缩短 LT_{50} 12.3h 以上; 在感染后 72h 时统计可提高 Bt 对棉铃虫幼虫的感染死亡率 28.18%, 缩短 LT_{50} 12.33h。

关键词: 棉铃虫颗粒体病毒; 增效蛋白基因; 克隆; 表达; 生物活性测定

中图分类号: S435.6623

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2001)04-0364-05

昆虫杆状病毒增效蛋白 (Baculovirus enhancins) 是由病毒基因编码的能增强病毒对昆虫幼虫及体外培养细胞系感染效率的一类蛋白质^[1], 并可增强 Bt 对昆虫幼虫的毒力^[2]。自 1959 年 Tanada 首次发现并分离美洲一星粘虫颗粒体病毒 (*Pseudaletia unipunctata* granulosis virus, PuGv) 的增效蛋白 (En-

hancin)^[3]以来, 已在粉纹夜蛾颗粒体病毒 (TnGV) 等 9 种 GV 和舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) NPV 以及东方粘虫痘病毒 (*Pseudaletia separata* entomopoxvirus) 等 4 种 EPV^[4-7] 共计 14 种昆虫病毒中发现了增效蛋白的存在。关于增效蛋白协同杀虫的作用机理, 一般认为有两种作用方式: 一方面增效蛋白通过介导病毒

收稿日期: 2001-05-28, 修回日期: 2001-06-27

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39570034)

作者简介: 胡蓉 (1976-), 女, 硕士, 研究方向为昆虫病毒分子生物学

** 通讯作者。Correspondence author.

囊膜与中肠细胞质膜的融合产生作用^[8,9];另一方面增效蛋白具有蛋白酶活性,通过降解宿主中肠的肠粘蛋白和糖蛋白而破坏中肠围食膜这道防御性屏障,使病毒粒子更易进入中肠细胞,从而促进病毒的感染^[10]。最近 Granados 及其同事的研究结果表明增效蛋白可以扩大中肠围食膜“孔径”,提高病毒粒子的通透性来实现的^[11]。杆状病毒 Enhancin 的作用机制尚待深入研究,不能排除 Enhancin 是一种多功能蛋白的可能性,其增效作用方式可能是多样的。

HaGV 增效蛋白基因的开放阅读框为 2706bp,编码含有 902 个氨基酸,分子量为 104.6kD 的蛋白质。本文对 HaGV 增效蛋白基因 5'端 2.6kb 的片断在大肠杆菌中的克隆与表达,并对表达产物的增效活性作了研究。该项工作对我国在生物防治农林害虫的领域有着积极的理论和应用价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料

质粒 pQE-32、大肠杆菌 M15 (pREP) 购自 QIAGEN 公司,限制性内切酶、T4DNA 连接酶等购自 Gibco 公司,棉铃虫幼虫由武大病毒所基因工程药物及昆虫病毒分子生物学研究室提供,苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 可湿性粉剂,毒力效价 16,000IU/mg,来源于湖北农科院 Bt 研究开发中心。

1.2 实验方法

1.2.1 HaGV-DNA 的提取参照文献^[12]的方法进行。

1.2.2 HaGV-enhancin 基因的 PCR 扩增:据已发表 HaGV-enhancin 基因序列^[5],设计引物为:

(1) 5' ACCGGATCCTGCCTACTACCGTGCTG3' (上游引物,26mer,含有 *Bam*H I 酶切位点)

(2) 5' ATACTGCAGTGTCTCCCACTACTAAT3' (下游引物,27mer,)含有 *Pst* I 酶切位点 0.7% 琼脂糖电泳,紫外灯检测扩增片段。

1.2.3 重组表达质粒 pQE32/En 的构建 利用 *Bam*H I / *Pst* I 双酶切质粒 pQE-32 和 PCR 产物,纯化回收双酶切消化产物,经 T4DNA 连接酶连接后转化感受态细胞 *E. coli* M15 (pREP4), Ampicilin 和 Kanamycin 抗性平板筛选得到阳性转化子。此构建的重组质粒命名为 pQE32/En。

1.2.4 pQE32/En 的酶切鉴定 重组质粒 DNA 分别经过 *Hind* III、*Pst* I 单酶切, *Bam*H I / *Hind* III、*Kpn* I / *Hind* III、*Sac* I / *Pst* I、*Bam*H I / *Pst* I 双酶切鉴定。

1.2.5 HaGV-enhancin 基因的 5'端 2.6kb 片段的表

达 挑取重组子单菌落接种于 5mL 2YT 培养基中 (Ampicillin 100 μ g/mL 和 Kanamycin 25 μ g/mL,下同) 活化过夜。活化菌液以 1:20 稀释接种到 10mL 2YT 中,34 $^{\circ}$ C 培养 3h,加 IPTG 至终浓度 1mmol/L,37 $^{\circ}$ C 诱导,取诱导 2、3、4、5h 和未诱导培养物各 1mL,收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.6 表达产物的初步纯化 离心收集诱导后菌体,加裂解液(含溶菌酶)37 $^{\circ}$ C 1h,冰浴超声波破碎后处理物上蔗糖梯度离心,取出白色包涵体带,洗糖后将包涵体样品稀释后于透射电镜下观察并照相,剩余样品 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.7 生物测定 将 HaNPV 作 10 倍系列稀释并用血球计数板计数。HaNPV 组设 1.0×10^6 , 1.0×10^5 , 1.0×10^4 , 1.0×10^3 PIB/ml 四个浓度, Bt 组设 1:1 000 倍稀释一个浓度。HaNPV + En 组在上述四个浓度 HaNPV 分别添加 P_{102} 1.0×10^6 OB/ml, Bt + En 组中添加 P_{102} 至终浓度为 1.0×10^6 OB/mL,并设单蒸水和 P_{102} 1.0×10^6 OB/mL 的对照。将棉铃虫 2 龄幼虫单头饲于 24 孔养虫盒中,每个处理测试 48 头,2 个重复一共 96 头,每孔添加适量人工饲料,并加 10 μ L 抽吸均匀的上述处理液于人工饲料表面,使之充分吸收,于温度 20 $^{\circ}$ C ~ 25 $^{\circ}$ C 饲养,幼虫取食 48h 后补加足量新鲜人工饲料,逐日记录存活数。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

经电泳检测,得到单一的长约 2.6kb 的 HaGV-enhancin 基因片段,而阴性对照组中无扩增的特异带型,只有前端的引物带型如图 1。

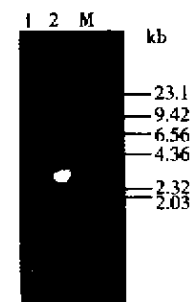


图 1 HaGV-En 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR product of HaGV-En gene
1, H₂O control; M, λ /Hind III marker;
2, PCR product of HaGV-En gene.

2.2 重组表达质粒 pQE32/En 的构建与酶切鉴定

根据已报道的 HaGV 增效基因序列,重组表达

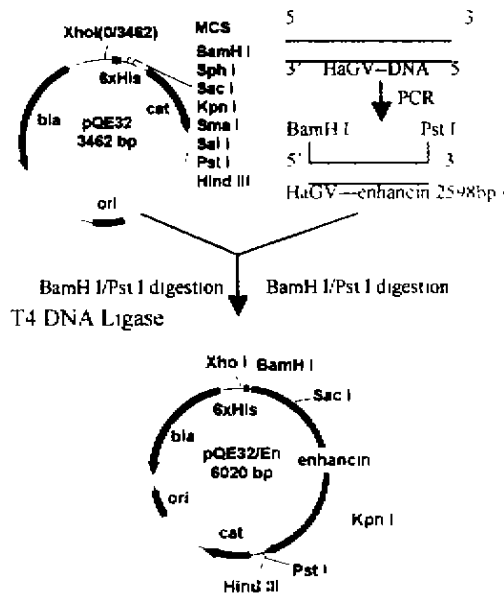


图2 重组表达质粒 pQE32/En 的构建

Fig.2 Construction of recombinant plasmid pQE32/En

质粒 pQE32/En 的构建过程如图 2。在插入片段的 485bp 处有一 Sac I 位点, 170bp 处有一 Kpn I 位点。宿主菌自身携带质粒 pREP4(3.7kb)上无 BamH I、Sac I、Kpn I 的酶切位点。当用 BamH I/Pst I 双酶切时, pQE32/En 得到 2.6kb 的外源片段和 3.4kb 的 pQE32 载体, pREP4 Pst I 的两个识别位点得到 2.8kb 和 0.9kb 的片段。当用 Sac I/Pst I 双酶切时, 从 pQE32/En 得到 3.9kb 和 2.1kb 的片段, pREP4 经 Pst I 酶切得到 2.8kb 和 0.9kb 的片段; 用 Kpn I/Hind III 双酶切时, 插入片段的 1670bp 处有一 Kpn I 位点, 因此 pQE32/En 形成 5.1kb 和 0.9kb 的片段, pREP4 上单一的 Hind III 识别位点得 3.7kb 的片段; 当用 Pst I 单酶切时, pQE32/En 应得 6.0kb 的片段, pREP4 得到 2.8kb 和 0.9kb 片段; 当用 BamH I/Hind III 双酶切时, pQE32/En 得到 2.6kb 的外源片段和 3.4kb 的 pQE32 载体, 而 pREP4 得 3.7kb 的片段; 当用 Hind III 单酶切时, pQE32/En 和 pREP4 上均有单一的 Hind III 酶切位点, 分别得到 6.0kb, 3.7kb 的带型; 凝胶电泳结果与预期相符。结果如图 3 所示。

2.3 增效蛋白基因的表达

表达产物的 10% SDS-PAGE 如图 4。结果表明, HaGV 增效蛋白基因 2.6kb 片段在 E. coli M15 菌中受 TS 启动子区动, 表达了含该增效蛋白 N-端 866 个氨基酸, 含载体 14 个氨基酸, 总长 880 个氨基酸的

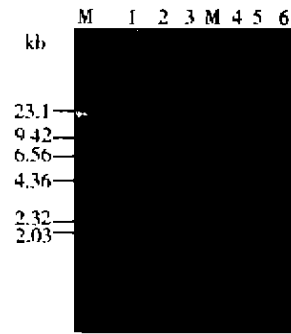


图3 pQE32/En 的酶切鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pQE32/En

M, λ /Hind III; 1, pQE32/En + BamH I/Pst I; 2, pQE32/EN + Sac I/Pst I; 3, pQE32/En + Kpn I/Hind III; 4, pQE32/En + Pst I; 5, pQE32/En + BamH I/Hind III; 6, pQE32/En + Hind III.

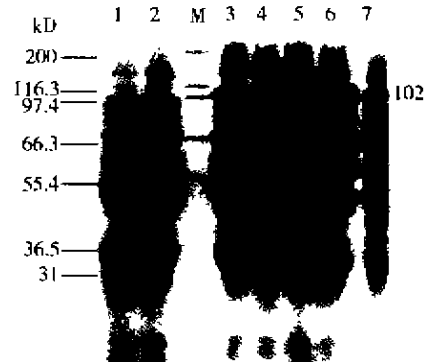


图4 pQE32/En 在大肠杆菌中的表达

Fig.4 Expression of pQE32/En in E. coli

1-2, Bacterial Protein; 3, induced 2h; 4, induced 3h; 5, induced 4h; 6, induced 5h; 7, purified occlusion body; M, Protein marker.

融合蛋白, 推算出融合蛋白的分子量为 102kD(命名为 P₁₀₂), 电泳结果与预计相符。外源蛋白在大肠杆菌中高水平表达, 常导致形成包涵体。溶菌酶-超声波处理诱导表达菌体, 经蔗糖梯度离心得白色包涵体带, 洗糖离心后得初步纯化的包涵体, 在透射电镜下可见形状不规则的包涵体。(图 5)

2.4 P102 的增效活性测定

结果如表 1、表 2。在观察期限内清水对照和 P120 对照的棉铃虫幼虫的死亡率为 0, 表明在该浓度下 P₁₀₂ 自身不具备对棉铃虫幼虫的致死效应, 且各处理组的死亡率不必校正。从表 1 得, Bt + En 组在 72h 统计时比 Bt 单剂死亡率提高了 28.18%, LT₅₀ 缩短了 12.33h。表 2 显示, 在 168h 统计时, HaNPV 10⁶ + En 组比单独的 HaNPV 10⁶ 组死亡率提高了 6.25%, LT₅₀ 缩短了 12.3h; HaNPV 10⁵ + En 组比单独的 HaNPV 10⁵ 组的死亡率提高了 27.09%, LT₅₀ 缩短了 20.51h。当 HaNPV 的浓度为 10⁴ 和 10³ 时, HaN-

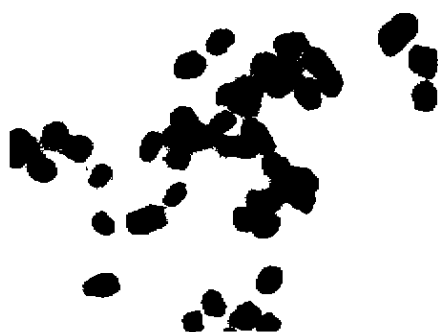


图5 pQE32/En在大肠杆菌中表达形成的包涵体

Fig.5 Occlusion body formed by pQE32/En in *E. coli*

PV + En 组的死亡率分别提高了10.38%和12.5%, HaNPV + En 组的 LD_{50} 为 $1.46 \times 10^4 \pm 0.27 \times 10^4$ PIB/ml, 单独 HaNPV 组的 LD_{50} 为 $5.76 \times 10^4 \pm 1.07 \times 10^4$ PIB/ml, HaNPV + En 复剂对 HaNPV 单剂的共毒系数 $CTC = 394.52$, 体现了明显的协同杀虫作用。

3 讨论

本文报道的 HaGV 增效蛋白基因 5' 端 2.6kb 片段的表达产物 P_{102} 对 HaNPV 和 Bt 均显示了明显的增效作用。 P_{102} 对不同浓度的 HaNPV 增效幅度不一样, 在高致死因子浓度下, 增效蛋白的作用可能被掩盖, 而在中高浓度条件下, 增效作用相对显著, 这一结果与袁哲明的报道相类似^[13]。 P_{102} 对 HaNPV10⁵ 这组浓度增效作用最为显著, 在 168h 统计时死亡率

提高了 27.09%, LT_{50} 缩短了 20.51h, 虽然在高浓度如 HaNPV10⁶ 条件下, HaNPV10⁶ + En 组比单独的 HaNPV10⁶ 组死亡率提高了 6.25%, 但是 LT_{50} 缩短了 12.3h, 仍然较明显的提高了感染效率。HaNPV10⁴ + En 组和 HaNPV10³ + En 组的死亡率均低于 50%, 在实践中一般不会使用该浓度。NPV 与增效蛋白复配使用显著提高了 NPV 的杀虫效率, 并且可降低 NPV 的用量, 降低成本, 为 NPV 杀虫剂防治棉铃虫危害提供了新思路。

昆虫病毒增效蛋白主要是通过破坏昆虫围食膜这一抵抗病原微生物入侵的天然屏障而发挥作用, 因此理论上增效蛋白对任何一种经昆虫消化道而起作用的杀虫活性成分如病毒、Bt、阿微菌素均有增效活性, 这是增效蛋白存在广谱作用的理论基础, 并由本研究中 P_{102} 对 HaNPV 和 Bt 的增效活性所证实。由本室克隆和表达的另一棉铃虫增效蛋白基因片段 2.1kb 的表达产物 P_{78} 也显示了明显的增效活性, 在感染 IId 统计时, 可提高 AcMNPV 对小菜蛾幼虫的死亡率 27.88% ~ 32.92%^[14]。

表1 P_{102} 对 Bt 感染棉铃虫幼虫的增效活性Table 1 The synergy of P_{102} on Bt against the larvae of *Heliooverpa armigera*

Treatment	0h	24h	48h	72h	Total Mortality	LT_{50} (h)
Bt(1:1000)	96	94	80	49	48.96	72.77
Bt(1:1000) + En	96	90	76	22	77.08	60.44
Water Control	96	96	96	96	0	

表2 P_{102} 对 HaNPV 感染棉铃虫幼虫的增效活性测定Table 1 The synergy of P_{102} on HaNPV against the larvae of *Heliooverpa armigera*

Treatment (PIB/mL)	0h	72h	96h	120h	144h	168h	Total Mortality	LT_{50} (h)
HaNPV10 ⁶	96	94	92	74	28	6	93.75	133.56
HaNPV10 ⁵	96	94	90	84	64	46	52.08	165.33
HaNPV10 ⁴	96	92	88	88	80	78	18.75	
HaNPV10 ³	96	96	96	92	90	88	8.33	
HaNPV10 ⁶ + En*	96	88	82	50	12	0	100	121.26
HaNPV10 ⁵ + En*	96	88	86	74	49	20	79.17	144.82
HaNPV10 ⁴ + En*	96	96	92	90	88	68	29.17	
HaNPV10 ³ + En*	96	96	94	92	87	76	20.83	
En*Control	96	96	96	96	96	96	0	
Water Control	96	96	96	96	96	96	0	
HaNPV	Regressive Equation		Y = 0.3868 + 0.9690X			LD50 = $5.76 \times 10^4 \pm 1.07 \times 10^4$ PIB/mL		
HaNPV + En	Regressive Equation		Y = 0.8965 + 0.9854X			LD50 = $1.46 \times 10^4 \pm 0.24 \times 10^4$ PIB/mL		

注: En* 表示增效蛋白(En)终浓度为 1.0×10^6 OB/mL。

将增效蛋白与其它杀虫剂复配使用,在实践中也是切实可行的。利用大肠杆菌表达增效蛋白具有如下优点:成本低、产量高、工艺简单;增效蛋白能在大肠杆菌中高效表达,形成不溶性包涵体,易于分离纯化,并且性质稳定,易于保存,具有较长的货架寿命。增效蛋白良好的协同杀虫作用的特点与原核表达系统的优点相结合,显示出极大的应用潜力和市场前景。

对于增效蛋白的研究在理论上也具有重要意义。病毒、增效蛋白与昆虫宿主是探索病原体与宿主相互关系和相互作用的良好模型系统,对其增效机理及功能区域的研究会进一步加深和丰富我们对病毒宿主相互关系的认识。随着这种认识的不断深入,将有助于新型生物杀虫剂的面世,制定出更有效的生物综合防治农林害虫的战略和对策。

参考文献

- [1] Tanada Y. A synopsis of studies on the synergistic property of an insect baculovirus[J]. *J Invertebr Pathol*, 1985, 45(2): 125 - 138.
- [2] Granados R R, Yan Fu. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* toxicity to Lepidopteran species with the enhancing from *Trichoplusia ni* granulovirus[J]. *Biological Control*, 2001, 20: 153 - 159.
- [3] Tanada Y. Synergism between two viruses of the armyworm *Pseudaletia unipuncta* [J]. *J Invertebr Pathol*, 1959, 1: 215 - 237.
- [4] Hashimoto Y, Corsaro B G, Granados R R. Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis[J]. *J Gen Virol*, 1991, 72(11): 2645 - 2651.
- [5] Roelvink P W, Corsaro B G, Granados R R. Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancing genes[J]. *J Gen Virol*, 1995, 76(11): 2693 - 2705.
- [6] Bischoff D S, Slavicek J M. Molecular analysis of an enhancing gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus [J]. *Virology*, 1997, 71(11): 8133 - 8140.
- [7] Hayakawa T, Xu J H, Hukubara T. Cloning and sequencing of the gene for an enhancing factor from *Pseudaletia separata* entomopox virus[J]. *Gene*, 1996, 177(2): 269 - 170.
- [8] Uchimak Egerter D E, Tanada Y. Synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm *Pseudaletia unipuncta*: Its uptake and enhancement of virus infection in vitro [J]. *J Invertebr Pathol*, 1989, 54(2): 156 - 164.
- [9] Uchimak, Harvery J P, Orni E M, et al. Binding sites on the midgut cell membrane for the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm [J]. *Insect Biochem*, 1988, 18(7): 645 - 650.
- [10] Wang P, Granados R R. An intestinal mucin is the target for a baculovirus enhancing [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(14): 6977 - 6982.
- [11] Peng J, Zhong J, Granados R R. Abaculovirus enhancing alters the permeability of mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae [J]. *J Insect Physiol*, 1999, 45: 159 - 166.
- [12] 孟小林, 叶林柏. 小菜蛾颗粒体病毒增效因子的研究 [J]. *武汉大学学报(自然科学版)* 1996, 42(4): 519 - 522.
- [13] 袁哲明, 孟小林. 粉纹夜蛾颗粒体病毒增效基因在大肠杆菌中的表达及其功能域初步分析 [D]. 杭州: 浙江大学, 2000.
- [14] 欧洋, 孟小林, 徐进平. 棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白基因 2.1kb 片段在大肠杆菌中的表达 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16(5): 595 - 598.