维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 4期
2002年11月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(4):326－330
November 2002

TnGV增强蛋白在AcMNPV中的表达和活性分析*

李志广，尹 隽，钟 江**
(复旦大学生命科学学院微生物学与微生物工程系，上海 200433)

Expression of Full Length and N Termial Truncated Enhancin from *Trochoplusia ni granulovirus* in AcMNPV and Analysis of Their Activity

LI Zhi-guang, YIN Jun, ZHONG Jiang**
(*Department of Microbiology and Microbial Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai* 200433, *China*)

Abstract: Enhancin is a group of baculovirus proteins capable of increasing the infectivity of viruses in insect larvae, as well as the insecticidal effect of other biology control agents. In order to study the structure and function of enhancin from *Trichoplusia ni granulovirus*, recombinant baculoviruses were constrcuted to express truncated forms of enhancin with 150, 186 and 250 amino acids deleted from N terminal of native enhancin, respectively. The truncated enhancins were expressed successfully in Tn-5B1-4 cells. *In vitro* peritrophic membrane assay showed that all three truncated enhancin lost their mucin degrading ability, while a full length recombinant enhancin was active in the assay. It is concluded that the N terminal amino acids is essential for the mucin degrading activity of enhancin.

Key words: Baculovirus; Enhancin; Structure and Function; Biological Control

摘要：为了研究杆状病毒增强蛋白的活性基团，本文构建了分别表达三种N端部分缺失的粉纹夜蛾颗粒体病毒增强蛋白的重组杆状病毒，这三种蛋白在N端分别缺失了150，186和250个氨基酸。用重组病毒感染Tn-5B1-4细胞，成功地表达了这三种蛋白，并得到了纯化的蛋白质。通过体外降解围食膜的方法检测这些部分缺失的增强蛋白的活性，结果证实这三种蛋白均失去了增强蛋白的降解围食膜粘蛋白的活性。这一结果表明，增强蛋白的N端对其降解围食膜粘蛋白的功能是必需的。

关键词：杆状病毒；增强蛋白；结构与功能；生物防治
中图分类号：S432.1　**文章标识码**：A　**文章编号**：1003-5125(2002)04-0326-05

增强蛋白(Enhancin)是一类从昆虫杆状病毒(*Baculoviridae*)，主要是颗粒体病毒(*Granulovirus*, GV)中分离的蛋白[1,2]。粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* GV(TnGV)增强蛋白由901个氨基酸组成，分子量约为100kD。研究表明这类蛋白能够降解昆虫中肠围食膜上的一种蛋白质——昆虫肠道粘蛋白，从而影响围食膜对中肠细胞的保护作用，促进病毒和其他病原生物对昆虫的感染[3~5]。例如，TnGV增强蛋白能够明显地提高AcMNPV、苏云金杆菌等对 *T. ni* 的感染能力[6]。增强蛋白的这种辅助杀虫的作用，使之在害虫的生物防治中具有重要的应用前景。

目前已在六种不同的杆状病毒中发现了增强蛋白基因[7~10]，还在数种颗粒体病毒中发现了增强蛋白，但尚未在基因水平进行分析。尽管如此，大多数杆状病毒尚未发现含有这一蛋白，特别是常用于害虫生物防治的核型多角体病毒(*Nucleopolyhedrovirus*, NPV)中，除了舞毒蛾NPV中发现有两个类似增强蛋白的基因外[10]，尚未有其他增强蛋白基因的报道。将增强蛋白引入NPV中可望明显地

收稿日期：2001-02-06，修回日期：2002-04-15
* 基金项目：国家自然科学基金会项目(39870006)
作者简介：李志广(1976－)，男，河南省籍，硕士研究生，病毒学专业。
** 通讯作者：钟 江(1964－)，男，浙江省籍，教授。Correspondence author. Tel:(021)65642806, E-mail:jzhong@fudan.edu.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com

提高它们的杀虫能力。然而,实验表明在NPV中引入TnGV增强蛋白基因后,病毒多角体的形成受到明显的抑制(待发表)。其中的机理还不清楚。为了更好的利用增强蛋白,必须深入认识其结构和功能的关系。

本文以TnGV增强蛋白为研究对象,构建了三种N端部分缺失的增强蛋白基因,并用杆状病毒基因表达系统进行了基因表达。分析表达产物的活性表明,N端对于其活性是必需的。

1 材料与方法

1.1 N端部分缺失的增强蛋白基因转移质粒的构建

带有TnGV增强蛋白的质粒p3FVEF由Robert Granados教授惠赠(Boyce Thompson Institute for Plant Research, Cornell University)。增强蛋白基因区域示意图见图1。分别分离*Kpn*I的2.6kb酶切片段,*Bam*H I的2.5kb酶切片段,和*Nsi*I/*Eco*R I双酶切后的2.3kb片段,并将片段插入pBacBlueHis2系列转移质粒(Invitrogen)的相应位点。该系列质粒在外源基因前添加了6×His序列,以便于重组蛋白的分离。质粒的多克隆位点上没有*Nsi*I位点,因此*Nsi*I/*Eco*RI片段利用*Pst*I与*Nsi*I具有相同的粘性末端的特点,克隆到经*Pst*I/*Eco*R I双酶切的质粒上。由于该系列质粒系融合表达质粒,需选择质粒以保证读码框的正确。*Kpn* I片段采用pBacBlueHis2C质粒,而*Bam*H I片段和*Nsi*I/*Eco*R I片段均采用pBacBlueHis2B质粒。得到的重组质粒经酶切电泳检验插入方向正确。

1.2 N端部分缺失的增强蛋白基因在昆虫细胞中的表达

将带有三种部分缺失增强蛋白基因的转移质粒与病毒Bac-N-Blue线性化DNA(Invitrogen)共转染Sf21细胞。转染用Lipofectin(Life Technology)进行。通过空斑测定的方法纯化重组病毒。有关步骤参照文献[11]。经2~3轮纯化后得到不产生多角体而表达β-半乳糖苷酶的纯化重组病毒。用重组病毒感染Tn-5B1-4细胞,72h后收集感染细胞,经磷酸缓冲液漂洗后,用凝胶浓度为10%的SDS-PAGE及考马斯亮蓝染色分析细胞内总蛋白。并经电转移到硝酸纤维素膜后,用抗增强蛋白抗体(Robert Granados教授惠赠)作为第一抗体,碱性磷酸酶标记的羊抗兔IgG抗体(Sigma)作为第二抗体进行免疫印迹试验(Western blot),分析增强蛋白的表达。有关方法参见文献[12]。以用同一系统载体构建的表达全长TnGV增强蛋白的病毒vAcBBH-TnEn感染的Tn-5B1-4细胞作为对照。

1.3 重组蛋白的分离纯化

利用Invitrogen公司的快速纯化试剂盒,参照厂商推荐的方法进行。重组病毒感染的细胞用裂解液(6mol/L盐酸胍,20mmol/L NaH_2PO_4/Na_2HPO_4,500mmol/L NaCl,pH7.8)裂解细胞后,用超声波短暂处理,以破坏DNA长链,再加入事先用裂解液预平衡的ProBond™柱,依次用pH7.8,6.0和5.3的洗涤液(8 mol/L盐酸胍,20 mmol/L NaH_2PO_4/Na_2HPO_4,500mmol/L NaCl)分别洗涤该柱数次,用5mL洗脱液(8mmol/L盐酸胍,20mmol/L NaH_2PO_4/Na_2HPO_4,500 mmol/L NaCl,pH4.0)洗脱,分部收集洗脱液,监测OD_{280}读数,合并洗脱峰,经透析和浓缩可得到纯化的蛋白质。蛋白用SDS-PAGE分析。

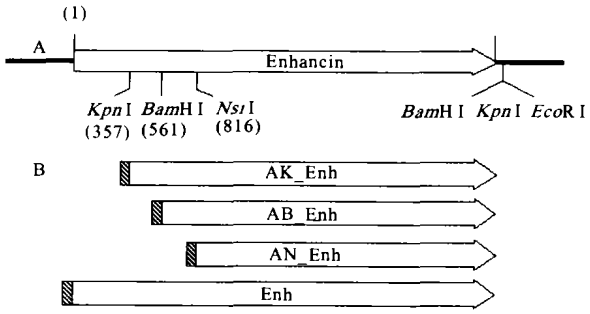

图1　TnGV增强蛋白基因及三种N端部分缺失的增强蛋白基因的构建示意图

A,TnGV增强蛋白基因及有关的限制性内切酶识别位点;B,带有6xHis标签序列的全长及N端部分缺失的重组增强蛋白基因。空白箭头框为增强蛋白编码区,斜线方框为6xHis标签序列。括号中的数字代表其相对位置(以增强蛋白起始密码子ATG的A为1)。

Fig.1　[illegible]am of native TnGV enhancin gene and its truncated forms

A, TnGV enhancin gene with restriction endonuclease recognition sites; B, Recombinant full length and N-terminally truncated enhacin genes with 6xHis tag. The blank arrowed boxes represent enhancin coding sequences, and boxes with slashes represent 6xHis tag sequences. The numbers in bracket represent the relative position of the sites (The A in enhancin gene initiation codon ATG is designated as position 1).

1.4 增强蛋白活性分析

用体外围食膜试验方法[3]进行。取重组病毒感染的细胞(5×10^6细胞),4000 r/min 10min离心沉淀后,用1mL碳酸缓冲液(0.05mol/L Na_2CO_3,

维普资讯 http://www.cqvip.com

pH9.5, 1mmol/L $MgCl_2$)悬浮，在冰浴中用超声波处理1min，再以8 000 r/min离心3min，取上清待用。同时取粉纹夜蛾五龄幼虫的围食膜一条，置于一Eppendorf离心管中，10 000r/min，离心3min，吸去其中的液体，加入上述细胞提取上清液50μL，27℃温育30min。温育后加入等体积样品缓冲液，SDS-PAGE分析粘蛋白的存在。

2 结果

2.1 三种N端部分缺失的增强蛋白基因转移载体及重组病毒的构建

分别用*Kpn*I、*Bam*HI、及*Nsi*I/*Eco*RI等限制性内切酶切割带有TnGV增强蛋白基因的质粒p3FVEF，得到三种N端部分缺失的增强蛋白的基因(图1)，然后将这三个片段分别克隆到pBacBlue-His2系列转移质粒(Invitrogen)的相应位点(详见方法部分)。经酶切检验后得到正确插入的三个转移质粒，它们均由多角体基因启动子分别带动三个N端部分缺失增强蛋白基因，可以表达三种在N端分别缺失了150, 186, 250个氨基酸的重组增强蛋白。在部分缺失的增强蛋白基因N端还融合了6×His的标签序列，以利蛋白的分离和纯化。

三个转移质粒分别与线性化AcMNPV DNA共转染细胞后，经2至3轮空斑分离，反复确认，分别得到三种不产多角体，在含有X-gal培养基中产生蓝色空斑的重组病毒，分别命名为vAcBBH-TnEn-5△K、vAcBBH-TnEn-5△B和vAcBBH-TnEn-5△N。用类似方法构建的表达全长TnGV增强蛋白的重组病毒，称为vAcBBH-TnEn。

2.2 重组部分缺失增强蛋白的表达分析

分别用三种重组病毒感染Tn-5B1-4细胞，SDS-PAGE分析72h p.i.细胞内总蛋白，见图2。可见除了vAcBBH-TnEn-5△K感染的细胞中重组增强蛋白较弱外，其余二种均有明显的新增条带；全长重组增强蛋白也得到有效表达，四者呈阶梯状排列，大小与预测的分子量(包含融合表达的6×His等序列后，全长增强蛋白为108.9kD，部分缺失的三种增强蛋白从大到小依次为91.7, 86.1和82.3kD)基本相当。TnGV中也可见明显的增强蛋白条带，其位置略低于重组融合全长增强蛋白，也与预期结果一致。

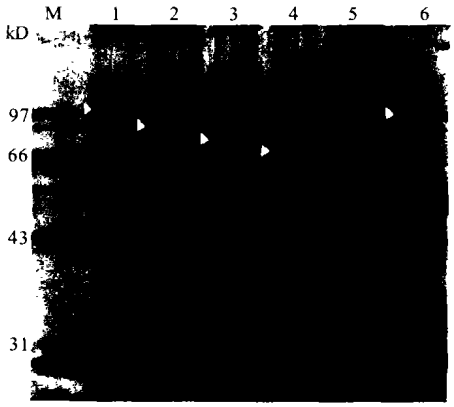

图2 SDS-PAGE分析重组增强蛋白在Tn-5B1-4细胞中的表达

M，蛋白分子量标准；1-4，病毒感染的Tn-51B4细胞；其中1，vAcBBH-TnEn；2，vAcBBH-TnEn-5△K；3，vAcBBH-TnEn-5△B；4，vAcBBH-TnEn-5△N；5，未感染的Tn-5B1-4细胞；6，TnGV(三角所指为增强蛋白条带)。

Fig.2 SDS-PAGE analysis of recombinant enhancin expression in Tn-5B1-4 cells

M, Protein molecular weight marker; 1-4, recombinant virus infected cell; 1, vAcBBH-TnEn; 2, vAcBBH-TnEn-5△K; 3, vAcBBH-TnEn-5△B; 4, vAcBBH-TnEn-5△N; 5, uninfected cells; 6, TnGV (Triangles point to the enhancin bands).

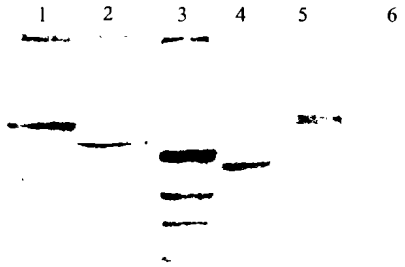

图3 重组病毒感染细胞的Western Blot分析

1，TnGV；2-5，病毒感染的Tn-51B4细胞；其中2，vAcBBH-TnEn-5△K；3，vAcBBH-TnEn-5△B；4，vAcBBH-TnEn-5△N；5，vAcBBH-TnEn；6，未感染细胞。

Fig.3 Western blot analysis of recombinant virus infected cells with anti enhancin anitbody

1, TnGV; 2-4, recombinant virus infected Tn-5B1-4 cell; 2, vAcBBH-TnEn-5△K; 3, vAcBBH-TnEn-5△B; 4, vAcBBH-TnEn-5△N; 5, vAcBBH-TnEn; 6, uninfected cell.

用抗增强蛋白的抗血清进行免疫印迹试验发现，未感染的细胞中没有与抗体反应的条带，TnGV及四种表达全长和部分缺失增强蛋白的重组病毒感染的细胞中的新增条带带均能被抗血清识别，证明

维普资讯 http://www.cqvip.com

增强蛋白均得到正确的表达(图 3)。除了主带外,抗血清还能与 vAcBBH-TnEn-5△B 感染的细胞中一些分子量较小的条带发生反应。由于抗血清与未感染细胞,及野生型 AcMNPV 感染的细胞均没有任何反应,因此,这些分子量较小的条带应是增强蛋白被细胞内蛋白酶降解的产物。

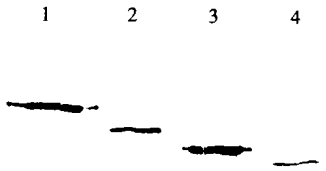

图 4　纯化的重组增强蛋白的 SDS-PAGE

1-4,重组病毒感染细胞中纯化的全长和部分缺失的增强蛋白:1, vAcBBH-TnEn; 2, vAcBBH-TnEn-5△K; 3, vAcBBH-TnEn-5△B; 4, vAcBBH-TnEn-5△N。

Fig.4　SDS-PAGE of purified recombinant enhancin

1-4, Full length and truncated enhancin purified from recombinant virus infected cells: 1, vAcBBH-TnEn; 2, vAcBBH-TnEn-5△K; 3, vAcBBH-TnEn-5△B; 4, vAcBBH-TnEn-5△N.

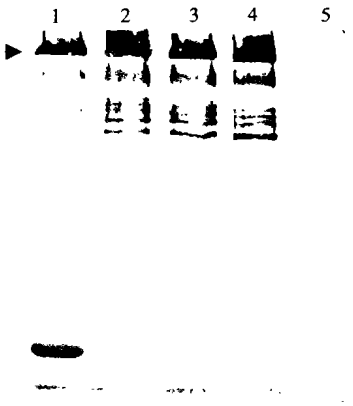

图 5　增强蛋白活性的体外围食膜试验

粉纹夜蛾围食膜用病毒感染细胞裂解物处理后进行 SDS-PAGE 分析,其中:1, AcMNPV; 2, vAcBBH-TnEn-5△K; 3, vAcBBH-TnEn-5△B; 4, vAcBBH-TnEn-5△N; 5, vAcBBH-TnEn。

Fig.5　*In vitro* peritrophic membrane assay of enhancin activity

Trichoplusia ni peritrophic membrane treated with infected cell lysate and analyzed with SDS-PAGE: 1, AcMNPV; 2, vAcBBH-TnEn-5△K; 3, vAcBBH-TnEn-5△B; 4, vAcBBH-TnEn-5△N; 5, vAcBBH-TnEn.

2.3　增强蛋白的分离纯化

利用在重组蛋白 N 端加上的 6×His 序列,对表达的三种 N 端部分缺失的增强蛋白进行了纯化。由于增强蛋白表达高效后在细胞中形成聚集,不易用一般的方法提取,采用了盐酸胍变性法,使细胞内蛋白充分溶解,与带有 Ni^{2+} 的基质结合,用低 pH 的洗脱液洗脱,得到纯度相当高的重组蛋白(见图 4)。

2.4　增强蛋白降解围食膜粘蛋白的活性检测

粉纹夜蛾幼虫围食膜用 vAcBBH-TnEn、vAcBBH-TnEn-5△K、vAcBBH-TnEn-5△B、vAcBBH-5△N 及不带有增强蛋白基因野生型 AcMNPV 感染的细胞裂解液处理,进行 SDS-PAGE 分析,结果见图 5。可见围食膜中有一高分子量的蛋白,系粉纹夜蛾肠道粘蛋白[5]。仅表达全长 TnGV 增强蛋白的重组病毒感染的细胞裂解液能基本降解该蛋白(图 5),三种表达 N 端部分缺失的增强蛋白的重组病毒感染细胞的裂解液均不能降解它。野生型 AcMNPV 感染的细胞的裂解液也不能降解它。

3　讨论

用重组 AcMNPV 成功地表达了三种 N 端部分缺失的 TnGV 增强蛋白。除了 vAcBBH-TnEn-5ΔK 表达水平略低外,其余二种重组病毒,vAcBBH-TnEn-5△B 和 vAcBBH-TnEn-5△N 所表达的重组蛋白产物水平均较高,在 SDS-PAGE 中均显示较强的条带。三种重组病毒的表达产物经免疫印迹试验(Western blot)证明均能与抗增强蛋白的抗体反应,表明重组病毒的构建和表达的正确性。利用重组增强蛋白所带有的 6×His"标签"序列的结合金属离子的特性,成功的分离纯化了四种重组增强蛋白。重组增强蛋白在细胞内有不同程度的降解,尤以 vAcBBH-TnEn-5△成 B 为甚。这可能与 N 端改变影响了蛋白的稳定性有关。在大量制备重组病毒时有必要采取抑制细胞蛋白酶的措施。

用体外围食膜降解试验,分析了 N 端部分缺失的重组增强蛋白的功能,发现所有三种 N 端部分缺失的增强蛋白均不能降解粉纹夜蛾围食膜上的昆虫肠道粘蛋白,而全长的重组增强蛋白则能够降解这种蛋白。这表明增强蛋白的 N 端对于蛋白的降解功能是必须的。三种 N 端部分缺失的增强蛋白在它们的 N 末端均有一段天然增强蛋白所没有的序列,来自于 pBacBlueHis2 系列质粒,包括了上述 6×His 序列、蛋白酶识别位点,以及质粒的多克隆位点所带来的部分氨基酸序列。本研究中的对照病毒,表达全长粉纹夜蛾增强蛋白的 vAcBBH-TnEn,也是用同一系统构建的,带有同样的外源 N 末端,而这种重组蛋白仍然具有降解围食膜粘蛋白的活力。因

维普资讯 http://www.cqvip.com

此,这一外源N端末端对于增强蛋白的活性的影响是有限的。

分析各种已知的增强蛋白氨基酸序列,发现它们都有HXXEH的5个氨基酸核心序列,这一位点是金属蛋白酶所共有的锌离子结合位点,据推测与增强蛋白的功能有密切的关系[3]。在TnGV增强蛋白中,该位点位于*Kpn*I和*Bam*HI位点之后,*Nsi*I位点之前(图1)。因此在三种部分缺失的增强蛋白中,TnEn-5△K和TnEn-5△B带有该序列,而TnEn-5ΔN和TnEn-5ΔN不带有该序列。虽然HXXEH序列对于增强蛋白活性的作用尚待实验证据验证,本文的结果表明,除了这一序列外,N端的其它序列对于增强蛋白的降解围食膜粘蛋白的活性也是不可缺少的。

刘平等[13],袁哲明等[14],欧洋等[15]分别用大肠杆菌高水平表达了TnGV增强蛋白(增效因子)基因3′端2.2kb,2.5kb,和HaGV增强蛋白5′端2.1kb的片段。他们用所得到的蛋白包涵体与AcMNPV或HaNPV一起感染银纹夜蛾、棉铃虫或小菜蛾,观察到包涵体能够不同程度的提高病毒感染昆虫的感染率。本文的结果似乎与之不一致。其中的原因有待深入探讨。但上述研究是直接测定重组蛋白在虫体内提高病毒感染性,而本文着重讨论体外围食膜试验中部分序列缺失对增强蛋白降解围食膜粘蛋白这一特定功能的影响。昆虫肠道极为复杂,除了高pH外,还有大量的蛋白酶、几丁质酶,而且肠道不断的蠕动,这些都可能对体内体外的结果造成差别。这方面的深入探讨,对于很好的弄清增强蛋白的作用机理,更好地利用这一辅助杀虫蛋白具有重要意义。

参考文献

[1] 廖洁玲,彭建新,洪华珠.昆虫病毒增强蛋白研究新进展[J].中国生物防治,1999,15:41-44.

[2] 马永平,欧 洋,孟小林,等.杆状病毒增效蛋白研究进展[J].中国病毒学,1998,14:185-189.

[3] Lepore L S, Roelvink P R, Granados R R. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease [J]. J Invertebr Pathol, 1996, 68: 131-140.

[4] Peng J, Zhong J, Granados R R. The baculovirus enhancin increases the permeability of insect peritrophic matrix[J]. J Insect Physiol, 1999, 4:159-166.

[5] Wang P, Granados R R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin[J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1997, 94:6977-6982.

[6] Granados R R, Fu Y, Corsaro B, *et al*. Enhancement of Bacillus thuringiensis toxicity to lepidopterous species with the enhancin from Trichoplusia ni granulovirus[J]. Biological Control, 2001, 20: 153-159.

[7] 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 virus [J]. J Gen Virol, 1991, 72:2645-2651.

[8] Roelvink P W, Corsaro B G, Granados R R. Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancin genes [J]. J Gen Virol 1995, 76: 2693-2705.

[9] Hayakawa T, Ko R, Okano K, *et al*. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome[J]. Virology, 1999, 262: 277-297.

[10] Kuzio J, Pearson M N, Harwood S H, *et al*. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*[J]. J Virology 1999, 253: 17-34.

[11] O'Reilly D R, Miller L K, Luckow V A. Baculovirus expression vectors[M]. New York: WH Freeman and Company, 1992.

[12] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al*. Short proptocols in molecular biology. [M]. 3rd ed., New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995.

[13] 刘 平,孟小林,徐进平,等.粉纹夜蛾颗粒体病毒增效因子C-末端片段的克隆表达及其生物活性初步测定[J].中国生物防治, 1999, 15:188-189.

[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,2000,16:595-598.

[15] 袁哲明,孟小林,刘树生.粉纹夜蛾颗粒体病毒增效基因3′端2.5kb片段在大肠杆菌中的表达[J].昆虫学报, 2001, 44: 155-160.