

棉铃虫单核衣壳核多角体病毒几丁质酶基因的克隆与表达*

吴东, 王华林, 邓菲, 陈新文, 彭辉银, 胡志红**

(中国科学院武汉病毒研究所无脊椎动物病毒学联合实验室, 湖北武汉 430071)

Molecular Cloning and Expression of the Chitinase Gene from *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus in *E. coli*

WU Dong, WANG Hua-lin, DENG Fei, CHEN Xin-wen, PENG Hui-yin, HU Zhi-hong**

(Joint-lab of Invertebrate Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: The PCR product of the HaSNPV chitinase gene, which was without the N-terminal signal peptide and the C-terminal endoplasmic reticulum location signal, was cloned into a prokaryotic expression vector pProEXHTb. After the induction of IPTG, the chitinase gene was successfully expressed in *Eschechia coli* DH5 α . The expression product shown a molecular weight of 60 kDa, and it covered about 40% of the total protein in *E. coli*. Western blot analysis using an antibody derived from AcMNPV chitinase confirmed the expression product was a homologue of baculoviral chitinase.

Key words: *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus; Chitinase; Cloning; Expression

摘要: 根据棉铃虫单核衣壳核多角体病毒(HaSNPV)几丁质酶基因的序列,设计引物,引入适当的酶切位点,利用PCR扩增出不含N末端信号肽以及C末端内质网定位肽的几丁质酶基因片段。将该基因片断克隆至原核表达载体pProEXHTb,经IPTG诱导,在大肠杆菌DH5 α 中获得了高效表达,表达产物的大小为60kD,含量占菌体总蛋白量的40%。利用来源于AcMNPV几丁质酶的抗体对表达蛋白进行检测,获得特异性的显色信号,证实所获原核表达产物与杆状病毒的几丁质酶具有同源性。

关键词: 棉铃虫单核衣壳核多角体病毒;几丁质酶;克隆;表达

中图分类号:S433 文章标识码:A 文章编号:1003-5125(2002)04-0331-05

几丁质酶是一类具有生物催化活性的水解酶,它能特异性地水解几丁质。几丁质酶可分为内切几丁质酶和外切几丁质酶。内切几丁质酶可从内部随机打断几丁质,产生可溶的、小分子量的几丁四糖、几丁三糖和几丁二糖等产物。外切几丁质酶从几丁质的非还原末端降解几丁质,产物为N-乙酰葡萄糖胺。

在真菌的细胞壁和昆虫的内外表皮、呼吸道、肠腔等组织中,几丁质是其主要成分^[1]。几丁质是昆

虫杀虫剂作用的一个极具吸引力的潜在靶目标。通过将几丁质酶导入昆虫体内来破坏其正常的组织结构,协助细菌或病毒侵入目标害虫体内,可以达到抑杀害虫的目的。例如以几丁质酶作辅剂与Bt菌剂一起施用可提高Bt菌剂对柞蚕卷叶蛾(*Choristoneura fumiferana*)的杀虫效果^[2~6]。Shapiro等人发现几丁质酶能显著增强杆状病毒LdMNPV对舞毒蛾的致死作用^[7]。Gopalakrisnan等将烟草天蛾的几丁质酶基因插入AcMNPV的基因组中,重

收稿日期:2002-03-01,修回日期:2002-04-01

* 基金项目:国家自然科学基金(39980001,30070034);国家杰出青年基金(3002503);中国科学院创新工程重要方向性项目Kscx2-1-02, Kscx2-sw-301-09);转基因植物专项(J00-A-003);中科院百人计划、青年科学家小组资助项目;863项目(101-06-10-01;2001AA214031)。

作者简介:吴东(1976-),男,陕西省西安市籍,博士研究生,研究方向为分子生物学。

** 通讯作者:胡志红(1966-),女,湖北武汉籍,研究员,研究方向为分子生物学与基因工程。Correspondence author.

组病毒对草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 的半致死时间 LT_{50} 从 88h 下降到 65h^[8]。重组大肠杆菌表达的粘质沙雷氏菌几丁质酶在体内、体外均能使夜蛾科幼虫的围食膜穿孔^[9]。

在杆状病毒病毒的基因组中也存在着编码几丁质酶的基因。1995 年 Hawtin 在 AcMNPV 中发现了第一个杆状病毒几丁质酶基因, 研究表明它是一个晚期基因^[10]。AcMNPV 的几丁质酶同时具有内切和外切几丁质酶活性。AcMNPV 的几丁质酶在 pH 4.0-9.0 范围内都能保持或接近最大酶活, 且在强碱性条件下仍具活性, 这不同于大部分微生物几丁质酶的活性范围(最适 pH 值为 4.0-5.0)^[11]。研究显示, 昆虫病毒几丁质酶对受感染幼虫虫体的液化是必需的^[11]。在病毒感染的 *S. frugiperda* 细胞内, AcMNPV 的几丁质酶表达后定位于内质网上^[12]。该酶 N 端的真核细胞信号肽可能通过与内质网的结合而有助于几丁质酶进入分泌途径, 而 C 末端的内质网定位结构 (KDEL) 则阻止几丁质酶在病毒感染早期的分泌, 因此只有在感染的晚期细胞裂解后, 几丁质酶才会行使其功能使宿主液化。这一有趣的分泌过程可通过延迟虫体的液化而使多角体产量达到最高值, 从而对病毒的增殖有利^[12]。

我们前期的研究表明, 棉铃虫单核衣壳核多角体病毒的几丁质酶基因编码区全长 1713bp, 推测编码一个 63.5kD 的蛋白质; 在起始密码子 ATG 上游 -24nt 处有一个典型的杆状病毒晚期基因启动子元件 ATAAG, -17nt 和 -29nt 处各有一个 TATA box。在病毒感染细胞 18h 后检测到几丁质酶基因的 mRNA, 因此确定 HaSNPV 几丁质酶基因为一个晚期基因, 氨基酸序列比较分析发现在第 308-317 个氨基酸残基含有几丁质酶第 18 家族的催化活性位点 (Wang, *et al.*, 待发表)。本研究报道 HaSNPV 几丁质酶基因在大肠杆菌中的克隆与表达, 这将为该基因的深入研究和 HaSNPV 的遗传改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *E. coli* DH5 α 菌株、质粒 pUC19 及 pTZ19R 由本室保存; 原核表达载体 pProEXHTb 为 GIBCO BRL 公司产品。含 HaSNPV 几丁质酶基因的基因组文库质粒 pCXW125 由本室构建^[13]。

1.1.2 棉铃虫细胞系 HzAM1^[14] 由本室保存; Grace's 昆虫细胞培养基和胎牛血清为 GIBCO BRL 公司产品。棉铃虫单核衣壳核多角体病毒 G4 株分离于湖北省罹病幼虫^[15]。

1.1.3 PCR 引物由上海 Sangon 生物技术公司合成。

1.1.4 酶及试剂 各种工具酶购自日本 TaKaRa (大连) 生物工程公司。Taq 酶为加拿大 Biostar 公司产品。1kb DNA Ladder 购自 GIBCO BRL 公司。蛋白质分子量标准购于 New England BioLabs。Glassmilk 凝胶回收试剂盒为加拿大 BioStar 产品。IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷) 为 Promega 公司产品。抗几丁质酶抗体由英国剑桥病毒学与环境微生物学研究所 (Natural Environment Research Council) 的 Robert D. Possee 教授惠赠。碱性磷酸酶标记的羊抗豚鼠二抗购于 Sigma 公司。碱性磷酸酶显色试剂盒购于华美公司。

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体的构建 选择含 HaSNPV 几丁质酶基因的文库质粒 pCXW125 为模版, 根据 HaSNPV 几丁质酶基因的序列, 设计一对引物, 删除 N 端 20 个氨基酸的信号肽和 C 端 4 个氨基酸的内质网定位序列, 引物序列如下:

上游引物: 5' GGGGGATCCGCTCCACCCG-GCGTTCCC-3', 5' 端含有 *Bam*H I 位点, 后 18nt 与 HaSNPV 基因组 37333nt-37350nt 互补;

下游引物: 5' GGGCTGCAG TTA AATCAATCTACTGTTTGTACC-3', 5' 端含有 *Pst*I 位点, 后 21nt 位于 HaSNPV 基因组 35713nt-35733nt。

PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 45s, 55 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 90s 为一个循环, 进行 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, Glassmilk 凝胶回收纯化试剂盒回收和纯化 PCR 产物, 用 *Bam*H I 和 *Pst*I 酶切, 再次回收, 与同样处理的 pUC19 质粒连接。连接产物转化大肠杆菌, 挑白斑, 酶切鉴定阳性克隆子, 命名为 pUC19/ChiA。利用 pUC19 通用引物对 pUC19/ChiA 进行测序, 序列比较显示扩增的片断与基因组的序列相同后, 从 pUC19/ChiA 质粒中用 *Bam*H I 和 *Pst*I 酶切下目的基因片段, 亚克隆至表达载体 pProEXHTb, 酶切鉴定阳性克隆子, 命名为 pPro-ChiA。

1.2.2 基因的诱导表达 挑阳性单克隆子接种于

3mL LB 培养基中 (Ampicillin 50 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。取上述培养物 1% 体积接种于新鲜 LB 培养基中 (Ampicillin 50 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD_{600nm} 为 0.6, 加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 继续培养。在 IPTG 诱导后 0、1、2、3、4 和 5h 分别取 1mL 培养物, 离心收集菌体, 重悬于 200 μ L 磷酸盐缓冲液, 加入 50 μ L 的 5 \times 上样缓冲液, 置于沸水浴中加热 5min, 取 20 μ L 上样, 进行 SDS-PAGE 分析。含有空载体的大肠杆菌为阴性对照。

1.2.3 HaSNPV 几丁质酶的 Western blot 检测

如上所述, 诱导含克隆子 pPro-ChiA 及空载体的大肠杆菌, 取诱导后 4h 的菌体总蛋白进行 SDS-PAGE。取野生型 HaSNPV 感染的细胞蛋白作阳性对照, 其方法为: 野生型 HaSNPV 以 5 MOI 感染 1 \times 10⁶ 个 HzAM1 细胞, 感染后 72h 收集细胞, PBS 溶液洗 3 次, 重悬于 400 μ L PBS 溶液中, 加入 80 μ L 的 5 \times 上样缓冲液, 置于沸水浴中加热 5min, 取 10 μ L 作为对照样品上样, 进行 SDS-PAGE。电泳完毕后, 用 BIO-RAD 半干转膜仪将蛋白转移至醋酸纤维素膜。3% BSA 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。TBS-T 缓冲液 (50mmol/L Tris-Cl, 200mmol/L NaCl, 0.1% Tween20, pH7.5) 洗膜 10min。一抗为抗 AcMNPV 几丁质酶的豚鼠抗血清, 用 0.3% BSA 稀释 1000 倍。将膜浸入一抗稀释液中, 室温放置 1h。TBS-T 缓冲液洗膜 3 次, 每次 15min。二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗豚鼠 IgG, 0.3% BSA 稀释 5000 倍。将膜浸入二抗稀释液中, 室温放置 1h。TBS-T 缓冲液洗膜 3 次, 每次 20min。显色操作参照说明书进行。

2 结果

2.1 HaSNPV 几丁质酶基因的 PCR 扩增及表达载体的酶切鉴定

HaSNPV 几丁质酶基因编码区全长 1713bp, 除去 N 端编码信号肽的 60bp 和 C 端的内质网定位肽的序列 12bp 后, 剩余序列长 1641bp。电泳结果显示 PCR 扩增产物片段大小约为 1.6kb, 与实际长度相符。图 1 为含有几丁质酶基因的表达载体 pPro-ChiA 用 BamHI 和 PstI 酶切后的电泳结果, 显示 1.6kb 的目的条带。

2.2 几丁质酶的诱导表达和 SDS-PAGE 分析

收集含有重组质粒 pPro-chiA 和空载体 pProEXHTb 的菌体, 进行 SDS-PAGE 分析, 以检

测几丁质酶的表达, 图 2 显示, 在诱导后的菌体总蛋白中重组子明显比空载体菌增加一条分子量约为 60kD 的染色带。几丁质酶在去除 N 端信号肽和 C 端定位信号后, 在 ProEXHTb 载体中表达的蛋白预计分子量为 64kD。表达时相显示诱导 3h 后表达产物的量达到高峰。经凝胶扫描分析, 在诱导 4h 后, 诱导表达的蛋白约占菌体总蛋白量的 40%。

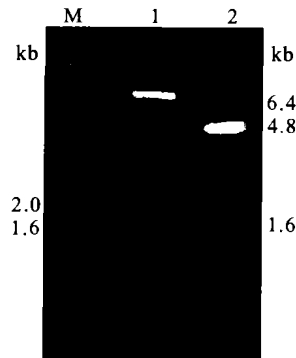


图 1 原核表达载体 pPro-chiA 酶切检测

Fig. 1 Restriction endonuclease analysis of the expression vector pPro-chiA

M, 1kb DNA Ladder; 1, Hind III digestion of pPro-ChiA, 2, BamHI + PstI digestion of pPro-ChiA.

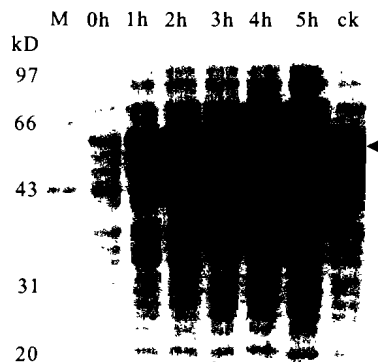


图 2 pPro-chiA 在大肠杆菌中的表达时相分析

Fig. 2 Time courses of induced expression of pPro-chiA in *E. coli*

M, Molecular Marker; 0h-5h, Total proteins of *E. coli* containing pPro-ChiA at 0h-5h after IPTG induction; CK: Total proteins of *E. coli* containing pProEXHTb at 5h after IPTG induction.

2.3 Western blot 鉴定表达产物

为鉴定表达产物, 将含重组子 pPro-ChiA、空载体 pProEXHTb 的菌体蛋白以及野生型病毒感染细胞后 72h 的细胞总蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析 (图 3)。凝胶经半干转膜后, 以豚鼠抗几丁质酶抗体为一抗, 碱性磷酸酶标记的羊抗豚鼠 IgG 为二抗

进行 Western blot 分析,与空载体相比,重组子在 60kD 处有一条特异的显色带(图 4)。野生型 HaSNPV 感染的昆虫细胞中显色信号显示的条带大小为 66kD。含有 pPro-chiA 的菌体在 50kD 和 35kD 处还有两条微弱的显色带出现,其中 35kD 的带在含空载体 pProEXHT 的大肠杆菌细胞中同样出现。

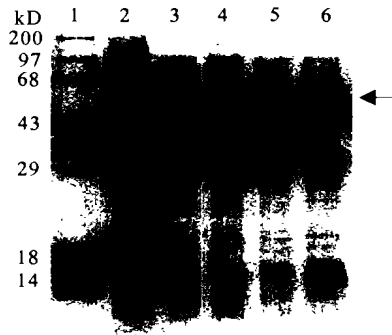


图3 pPro-chiA 在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of induced expression of pPro-chiA in *E. coli*. Lane 1, Protein molecular ladder; 2, Infected HzAM1 cells with HaSNPV; 3 & 4, Uninduced and induced *E. coli* containing pProEXHTb; 5 & 6, Uninduced and induced *E. coli* containing pPro-chiA.

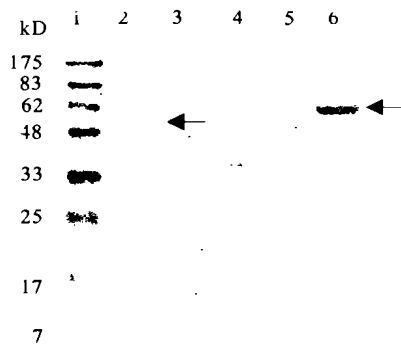


图4 pPro-chiA 在大肠杆菌中表达的 Western blot 检测

Fig. 4 Western blot analysis of induced expression of pPro-chiA in *E. coli*

Lane 1, Prestained protein molecular mass standard; 2, Infected HzAM1 cells with HaSNPV; 3, 4, Uninduced and induced *E. coli* containing pProEXHTb; 5, 6, Uninduced and induced *E. coli* containing pPro-chiA.

3 讨论

本研究将缺失 N 端信号肽和 C 端内质网定位信号的 HaSNPV 的几丁质酶基因克隆至原核表达载体 pProEXHT 中;获得了在 *E. coli* DH5 α 中的高

效表达,表达蛋白可占菌体总蛋白量的 40%。表达产物可被杆状病毒几丁质酶的特异性抗体所识别,表明表达产物确为 HaSNPV 的几丁质酶;同时也表明 HaSNPV 的几丁质酶与 AcMNPV 的几丁质酶具有抗原交叉反应。

研究中发现,在大肠杆菌中表达的几丁质酶分子量约为 60kD,略小于预期的 64kD,且表达产物没有检测到几丁质酶的活性。本研究中表达产物的分子量小于预期的分子量,且表达产物没有几丁质酶的活性可能是表达蛋白在 *E. coli* 中没有经过后修饰所造成的。

表达产物的 Western blot 分析所用的一抗为抗 AcMNPV 几丁质酶的抗体,该几丁质酶蛋白的氨基酸序列与 HaSNPV 几丁质酶的同源性为 61.57%。Western blot 分析显示,除了预期的表达产物外,在重组子中还出现两条微弱的显色带,一条约 50kD,另一条约 35kD,其中 35kD 的条带在含空载体的菌中也存在。分析原因可能有两种:1) 菌体中存在某种 35kD 的蛋白,该蛋白与几丁质酶蛋白具有一段相似的氨基酸序列,因此具有相同的免疫源性;2) 一抗特异性不高,出现非特异性杂交。本研究为制备 HaSNPV 几丁质酶的特异性抗体、从而对该酶进行深入的功能研究奠定了基础。

致谢:感谢英国剑桥病毒学与环境微生物学研究所(Natural Environment Research Council)的 Robert D. Possee 教授惠赠本研究中所用到的抗 AcMNPV 几丁质酶的抗血清。

参考文献

- [1] Kramer K J, Muthukrishnan S. Insect Chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides [J]. *Insect Biochem Molec Biol*, 1998, 27: 887-900.
- [2] Smirnov W A. Results of test with *Bacillus thuringiensis* and chitinase on larvae of spruce bud worm [J]. *J Invertebr Pathol*, 1973, 21: 116-118.
- [3] Smirnov W. The symptoms of infection by *Bacillus thuringiensis* + Chitinase formulation in larvae of *Choristoneura fumiferana* [J]. *J Invertebr Pathol*, 1974, 23: 397-399.
- [4] Smirnov W A. Three years of aerial field experiments with *Bacillus thuringiensis* plus chitinase formulation against the spruce budworm [J]. *J Invertebr Pathol*, 1974, 24: 344-348.
- [5] Lysenko O. Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to insects [J]. *J Invertebr Pathol*, 1976, 27: 385-386.
- [6] Morris O N. A 2-year study of the efficacy of *Bacillus thuringiensis* - chitinase combinations in spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) [J]. *J Invertebr Pathol*, 1977, 28: 385-386.

- ristoneura fumiferana*) control[J]. *Can Entomol*, 1976, 108: 3225 - 3233.
- [7] Sharpiro M, Preisler H K, Robertson J L. Enhancement of baculovirus activity on gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) by chitinase[J]. *J Econ Entomol*, 1987, 80:1113 - 1116.
- [8] Gopalakrishnan B, Muthukrishnan S, Kramer K J. Baculovirus - mediated expression of a *Manduca Sexta* chitinase gene: properties of the recombinant protein[J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 1995, 25:255 - 265.
- [9] Regev A, Keller M, Strizhov N, *et al.* Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta - endotoxin and a bacterial endo-chitinase against *Spodoptera littoralis* larvae[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62:3581 - 3586.
- [10] Hawtin R E, Arnold K, Ayres M D, *et al.* Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome[J]. *Virology* 1995, 212:673 - 685.
- [11] Hawtin R E, Zarkowska T, Arnold K, *et al.* Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus - infected insects is dependent on the integrity of virus - encoded chitinase and cathepsin genes[J]. *Virology* 1997, 238:243 - 253.
- [12] Thomas C J, Brown H L, Hawes C R, *et al.* Localization of a baculovirus - induced chitinase in the insect cell endoplasmic reticulum[J]. *J Virol*, 1998, 72:10207 - 10212.
- [13] Chen X, Li M, Sun X, *et al.* Genomic organization of *Helicoverpa armigera* single - nucleocapsid nucleopolyhedrovirus [J]. *Arch Virol*, 2000, 145: 2539 - 2555.
- [14] McIntosh A H, Ignoffo C M. Characterization of 5 cell lines established from species of *Heliothis*[J]. *Appl Entomol Zool*, 1983, 18:262 - 269.
- [15] 孙修炼, 张光裕. 棉铃虫核型多角体病毒四个分离株的比较研究[J]. *中国病毒学*, 1994, 9:309 - 318.
- [16] Venegas A, Goldstein J C, Beauregard K, *et al.* Expression of recombinant microfilarial chitinase and analysis of domain function[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 1996, 78:149 - 159.