

甜菜夜蛾核多角体病毒 *sod* 基因的克隆及原核表达

张海元, 牛国栋, 洪靖君, 张忠信**

中国科学院武汉病毒研究所分子病毒学重点实验室, 湖北武汉, 430071

Cloning and Expression of Superoxide Dismutase Gene Encoded

by *Spodoptera exigua* Multi Nucleopolyhedrovirus

ZHANG Hai-yuan, NIU Guo-dong, HONG Jing-jun, ZHANG Zhong-xin

(Key Laboratory of Molecular Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China.)

Abstract: Superoxide dismutases scavenge superoxide radicals and protect cells from oxidative stress. A *sod* gene of *Spodoptera exigua* Multi Nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) from China has been cloned and expressed in *E. coli* with the activity of SOD being 291.19U/mL. DNA sequence analysis showed that *sod* gene of SeMNPV encoded 151 amino acids. The sequences homology between SeMNPV *sod* gene and human *sod1* gene was 50%, and 64% between SeMNPV and LdNPV, 63% between SeMNPV and HaSNPV, HcNPV, BmNPV, 65% between SeMNPV and AcNPV.

Key words: Superoxide dismutase; *Spodoptera exigua* multi nucleopolyhedrovirus (SeMNPV); Clone; Expression

摘要: 甜菜夜蛾核型多角体病毒中国株 (*Spodoptera exigua* MNPV-Z) 超氧化物歧化酶基因 (*sod*) 业已被克隆及在大肠杆菌中进行了表达, 证明了 SeMNPV-Z 的 *sod* 基因产物确有 SOD 活性, 其活力单位约为 291.19U/mL 培养液。DNA 测序结果表明 SeMNPV-Z 的 *sod* 基因编码 151 个氨基酸, 与人的 *sod1* 基因的核苷酸的同源性为 50%, 与 LdNPV、HaSNPV、HcNPV、AcNPV 和 BmNPV 的 *sod* 基因的同源性分别为 64%、63%、63%、65%、63%。

关键词: 甜菜夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera exigua* multi nucleopolyhedrovirus, SeMNPV) 中国株; 超氧化物歧化酶; 基因表达

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2003)06-0576-05

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 是由美国学者 McCord 和 Fridovich 于 1969 年首先发现的一种金属酶^[1], 是一种重要的氧自由基清除剂, 它能催化超氧阴离子 (Superoxide anions, O_2^-) 歧化反应^[2], 具有抗衰老、抗辐射、抗癌等重要生理功能^[3,4]。由于 SOD 的存在与细胞的需氧代谢密切相关, 在所有需氧细胞中, 包括最简单的微生物都可能含有 SOD。迄今为止, 已从几十种不同的细菌、真菌、藻类、原生动物, 高等植物和哺乳动物等生物体中分离到 SOD, 其大体可分为三种类型^[5], 分别为 Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD。 *sod* 基因

不仅在细胞生物中存在, 而且在一些大分子 DNA 病毒, 如痘病毒 (Vaccinia virus) 和杆状病毒中也广泛存在^[6,7]。杆状病毒 *sod* 基因通常编码 Cu/Zn-SOD, 其氨基酸序列与细胞生物的 SOD 高度保守, 在病毒增殖及病毒与宿主细胞的相互作用中都可能具有重要功能。杆状病毒 *sod* 基因的结构与功能研究已受到国内外学者的广泛重视, 国内一些学者也先后完成了家蚕核多角体病毒 (*Bombyx mori* NPV, BmNPV) 和美国白蛾核多角体病毒 (*Hyphantria cunea* NPV, HcNPV) *sod* 基因的克隆和表达^[8,9]。将 *sod* 基因用来转化大肠杆菌, 酵母, 以及培养的

收稿日期: 2003-05-12, 修回日期: 2003-07-18

* 基金项目: 国家 863 项目 (2001AA246014); 中国科学院农办重大项目 (NK 十五-B-07-04)

作者简介: 张海元 (1974-), 男, 湖北鄂州籍, 硕士生, 主要从事病毒分子生物学研究。

** 通讯作者: 张忠信 (1957-), 男, 山西运城籍, 主要从事昆虫病毒学研究。

Corresponding author. E-mail: Zhangzx@pentium.whiov.ac.cn.

动植物细胞, 利用高效表达启动子进行超量表达, 并尝试将 *sod* 基因转化到叶绿体和线粒体中, 使之进行“三空间”同步表达以及 SOD 对包涵体病毒粒子(OV)的作用机制的研究是目前需要解决的问题。

甜菜夜蛾是世界性害虫, 对我国的蔬菜危害严重^[10]。近年来随着对化学农药的抗性迅速发展, 甜菜夜蛾已成为蔬菜上最难防治的主要害虫。甜菜夜蛾核型多角体病毒 (Spotoptera exigua multinucleopolyhedrovirus, SeMNPV) 杀虫剂具有杀虫效果好, 不污染环境, 不伤害天敌, 无有害残留, 不易导致害虫产生抗性等优点, 是防治抗性甜菜夜蛾的良好生物制剂^[11]。我们在甜菜夜蛾核多角体病毒的研究中, 对甜菜夜蛾核型多角体病毒中国株 (SeMNPV-Z) 的 *sod* 基因进行了克隆和原核表达, 进一步完善杆状病毒 *sod* 基因的结构及功能的研究, 并为 SeMNPV SOD 作为甜菜夜蛾核型多角体病毒杀虫剂的保护剂的研究作准备。现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

SeMNPV 中国分离株由中国科学院武汉病毒所分离^[12], 大肠杆菌 BI21(DE3)及质粒 pET-28a 由本所侯松旺博士馈赠, 大肠杆菌 DH5a 由本实验室保存。Taq DNA 聚合酶, T₄ DNA 连接酶, 限制性内切酶及其它试剂均购自 TakaRa 公司

1.2 引物设计

根据已公布的 SeNPV 全序列设计 SOD 基因的上游引物和下游引物 P₁ 和 P₂, 并在上, 下游引物前分别加上 *Bam*HI 及 *Hind* III 两个酶切位点。

P₁: 5' GGATCCATGAAAGCGATCTGTGTGTT3',

其中 GGATCC 为 *Bam*HI 酶切位点

P₂: 5' AAGCTTCGGAGGAGCCATTCTACGT3', 其中 AAGCTT 为 *Hind* III 酶切位点。

1.3 eNPV 多角体的纯化及其 DNA 的提取

病毒的提纯和病毒 DNA 的提取参考文献^[12]进行。

1.4 PCR 扩增反应

以 SeNPV-Z 基因组 DNA 为模板, 分别以 P₁、P₂ 为上、下游引物, 反应条件为: 94℃ 45s, 54℃ 50s, 72℃ 1min, 30 个循环。其中第一个循环的变性时间为 5min, 最后一个循环的延伸时间延长至 10min。

1.5 PCR 产物的鉴定和克隆

将 PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳鉴定回收后,

克隆到 pGEM-T 载体上, 此重组质粒命名为 pGEM-*sod*, 其连接反应参照 pGEM-T 连接试剂盒 (Promega 公司)。感受态细胞的制备和转化实验参照文献^[13]进行。

1.6 融合基因表达载体的构建

用 *Bam*HI 和 *Hind*III 从 pGEM-*sod* 双酶切切下 *sod* 基因片段, 与同样双酶切的 pET-28a 相连, 连接反应及转化实验均参照文献^[13], 重组表达质粒命名为 pET-*sod*, 上海博亚公司对其中插入 DNA 片段进行测序。

1.7 融合基因在大肠杆菌中进行表达

带重组质粒的 BI21 菌经活化后, 以 1% 的菌液加入到 LB 培养基中, 37℃/min 震荡养至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.6h, 加入终浓度为 0.5mmol/L 的 IPTG 诱导, 同时加入 1mmol/L CuSO₄ 和 0.5mmol/L ZnSO₄, 3h 后收集菌体, 菌体溶于 3mL TE 中, 加入溶菌酶 (2mg/mL) 溶解 30min 后, 超声波破碎包涵体, 溶液直接用于检测 SOD 活性。

1.8 SOD 活性的测定

参照谢卫华等的联苯三酚自氧化法测定 SOD 活性^[14]。测定系统为: pH 8.2, 50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 4.49mL, 其中含 1mmol/L EDTA, 在 25℃ 预保温 10min, 最后加入 50mmol/L 的联苯三酚 (配于 10mmol/L HCl 中) 约 10μL, 使反应总体积为 4.5mL, 计时, 自氧化速率变化在 4min 内有效, 控制联苯三酚量, 使其在 325nm 波长处自氧化速率变化在 0.070A/min 在同样量的联苯三酚中加入 SOD 酶液, 使加入的酶液量恰好能抑制联苯三酚自氧化速率为 0.035A/min 左右。根据公式计算 SOD 酶液的活性^[14]。以未诱导的菌液为对照, 其差值为 SOD 基因的活性值。为使未诱导的与诱导的菌液的终浓度一致, 采用不同的稀释倍数。

2 结果和分析

2.1 *sod* 基因的克隆和鉴定

根据已公布的 SeMNPV 全序列设计 *sod* 基因的上游引物和下游引物 P₁ 及 P₂, 经 PCR 扩增出一条 640bp 左右的片段。将这条片段克隆到 pGEM-T 载体上, 酶切鉴定其分子量大小正确, 酶切结果见图 1。

2.2 *sod* 基因核苷酸序列及推测氨基酸序列的同源性比较

根据测序结果, SeMNPV-Z *sod* 基因编码区的核苷酸数为 456bp, 与甜菜夜蛾核多角体病毒美国株 (SeNPV-M) 的 *sod* 仅有 5 个核苷酸的差异。该序列与舞毒蛾核多角体病毒 (*Lymantria dispar*

MNPV, LdMNPV, AF081810)、棉铃虫核多角体病毒 (*Heliothis armigera* SNPV, HaSNPV, AF303045)、美国白蛾核多角体病毒 (*Hyphantria cunea* NPV, HcNPV, AY162328)、苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* NPV, AcNPV, L22858)、家蚕核多角体病毒 (*Bombyx mori* NPV, BmNPV, L33180) 等杆状病毒 *sod* 基因和人 *sod1* 的 cDNA 序列相比较, 核苷酸的同源性分别为 64%、63%、63%、65%、63%、50%。根据核苷酸序列, 推测 SeMNPV-Z *sod* 基因编码的 151 个氨基酸, 其序列与 SeNPV-M SOD 的氨基酸序列完全相同。SeNPV SOD 与 LdNPV、HaNPV、AcNPV、HcNPV、BmNPV 等 5 种杆状病毒 SOD 及人的 SOD1 相比较, 氨基酸序列同源性分别为 64%、66%、65%、65%、65% 和 51% (图 2)。

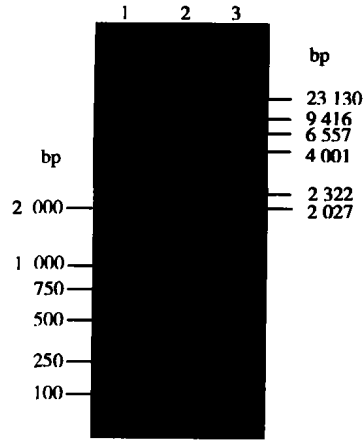


图 1 重组测序质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction detection of recominant clone vector

1, DNA Marker DL2,000; 2, pGEM-sod digest by *Bam*HI and *Hind* III; 3, DNA Marker.

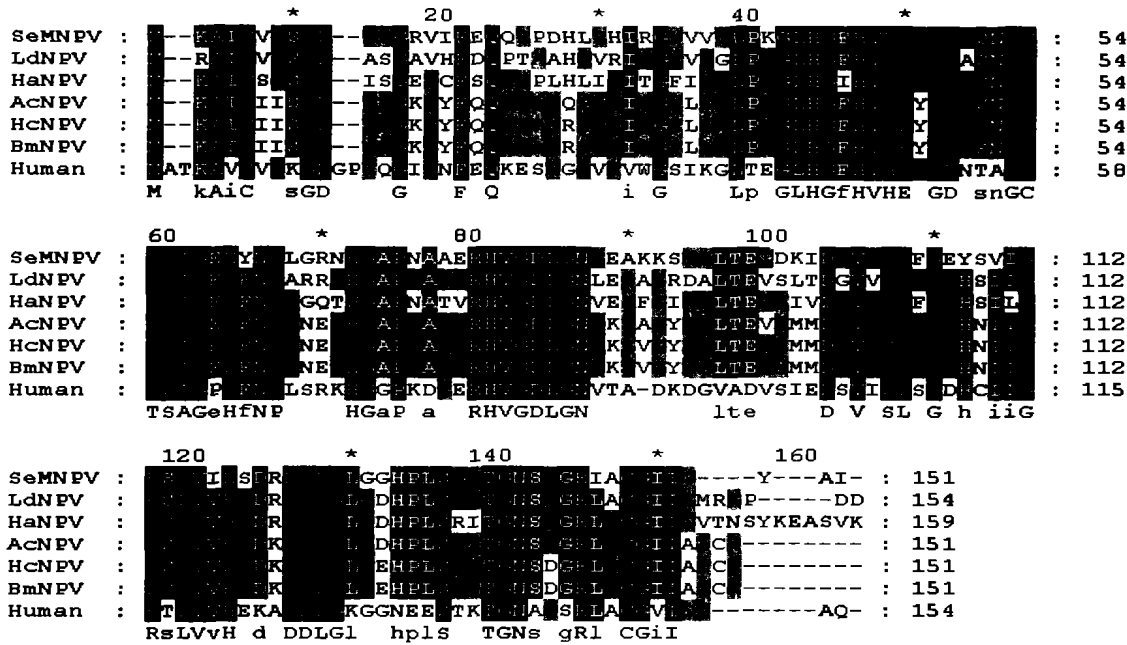


图 2 SeNPV SOD 与其它 6 种 SOD 的氨基酸同源性序列比较

Fig. 2 The alignment of 7 SOD amino acid sequences

SeMNPV(*Spodopetera exigua* MNPV), LdMNPV (*Lymantria dispar* MNPV), HaSNPV (*Heariothis armigera* SNPV), AcNPV (*Autographa californica* MNPV), HcNPV (*Hyphantria cunea* NPV), BmNPV(*Bombyx mori* NPV).

对氨基酸序列分析的结果表明, 像其它杆状病毒一样, SeNPV *sod* 可能编码一种 Cu/ZnSOD。SeNPV SOD 中的 Cu 离子结合位点 His40、43、60、118 及 Zn 离子结合位点 His68、77、Asp80^[15, 16] 等氨基酸残基, 与其它 6 种杆状病毒 SOD 及人类 Cu/Zn SOD SOD1 完全相同。Cu/ZnSOD 内二硫键由分子内的 Cys54、144 形成, SeNPV SOD 的这两

个氨基酸残基保守。以前的一些研究结果显示, Gly41、His43 和 Arg141 对 SOD1 的酶活性发挥着关键作用^[17, 18], 这三个氨基酸残基在 SeNPV SOD 中也完全保守。这些氨基酸序列分析结果预示, 虽然 SeNPV SOD 与人类 Cu/Zn SOD 的氨基酸同源性仅为 51%, 但由于其结构和活性必需氨基酸残基均保守, 它可能具有 Cu/ZnSOD 酶活性。

2.3 融合基因表达载体的构建

用 *Bam*HI 和 *Hind* III 从 pGEM-*sod* 双酶切切下 *sod* 基因片段, 连接到 pET-28a 表达载体上, 用 *Bam*HI 和 *Hind* III 酶切鉴定分子量大小正确 (如图 3)。

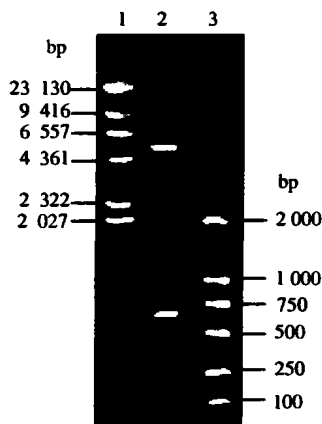


图 3 重组表达质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Restriction detection of recombinant expression vector 1, DNA Marker λ -*Hind*III digest; 2, pET-*sod* induced by IPTG and digest by *Hind* III and *Bam*HI; 3, DNA Marker DL2,000.

2.4 SOD 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

用 0.5mmol/L 的 IPTG 诱导 3h, 加入终浓度为 2mg/mL 的溶菌酶及用超声波破碎包涵体后, 进行诱导表达 (如图 4), 在 21kDa 附近有一条明显的表达带。

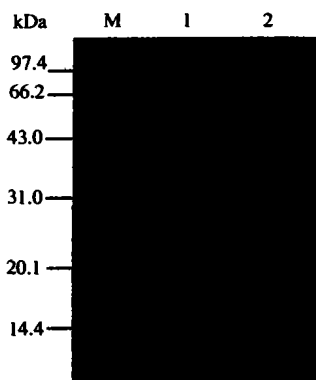


图 4 SeNPV *sod* 基因在原核中的表达

Fig. 4 Expression of *sod* gene of SeNPV in *E. coli* 1, pET-SOD induced by IPTG; 2, pET-28a induced by IPTG; M, protein marker

2.5 SOD 活性的检测

我们用联苯三酚自氧化法测定了 SOD 的活性, 未诱导菌株的酶活性为 12.86U/mL, 而诱导菌株其活性值为 291.19U/mL, 证明了该基因产物确实有

SOD 活性。

3 讨论

超氧化物歧化酶基因在真核细胞中普遍存在, 在许多 NPV 病毒中也报道有 *sod* 基因存在, 但是在 NPV 病毒中, 对 *sod* 基因的研究还不是很深入, 本文对 SeNPV 的 *sod* 基因从氨基酸序列分析、原核表达及酶活测定都做了系统的研究。

当细胞受外源异物侵入或受电离辐射时会产生大量的超氧离子, 超氧离子的存在, 可以破坏膜的通透性, 降解染色体及其他具有生物功能的物质, 促使细胞死亡, 保护机体免受进一步侵害, 这可以看作是机体的自卫反应。*sod* 基因在 NPV 的转录时相上属于晚期基因^[19], 即病毒 DNA 复制起始后才转录和表达, 因此推测 NPV 中 *sod* 基因表达与病毒 DNA 的保护有关, 并可能与抗细胞凋亡因子 P35 (NPV 的早期基因表达产物) 相似, 具有在病毒感染的不同时期抑制细胞凋亡的作用, 从而达到增殖更多病毒粒子的目的。SOD 清除超氧离子, 形成 H_2O_2 , H_2O_2 能与超氧离子形成毒性更强的 HO, 而过氧化物酶 (peroxidase, POD) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 具有分解 H_2O_2 的功能, 因此, 清除自由基的过程是这些酶的级联反应过程, 它们构成一个完整的处理系统。既然在 NPV 中存在 *sod* 基因, 也有可能存在编码 CAT 和 (或) POD 的基因, 或者病毒某些基因的产物能激活细胞内这两种酶的活性, 但这些都还有待于进一步的深入研究。

参考文献

- [1] McCord J M, Irwin F. Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocyte[J]. *J Bio Chem*, 1969, 244: 6049-6055.
- [2] Susan S P, Edward D H. Regulation of Cu,Zn superoxide dismutase with copper[J]. *Biochem J*, 1991, 274: 153-158.
- [3] 杨 芬. 鸭血 SOD 的纯化及性质研究[J]. *生物化学杂志*, 1989, (2): 169.
- [4] 翁其亮. 自由基 (O₂⁻) 与人的血癌-O₂⁻ 相对含量的间接测定[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1986, 3: 51.
- [5] 曾庆平, 郭 勇. SOD 基因的组织结构、表达与分子克隆[J]. *药物生物技术*, 1995, 2(2): 46-51.
- [6] Goebel S P, Johnson G P, Paoletti E, et al. The complete DNA sequence of vaccinia virus[J]. *Virology*, 1990, 179: 247-266.
- [7] Tomalski M D, Eldridge R, Millar L K. A baculovirus homology of a Cu/Zn superoxide Dismutase gene[J]. *Virology*, 1991, 184: 149-161.
- [8] 王文兵, 季 平, 吴 峻, 等. 家蚕 NPV SOD 基因序列和在大肠杆菌中表达[J]. *生物化学与生物物理学报*, 1999, 31: 405-408.

- [9] 曹广力, 薛仁宇, 朱越雄, 等. 美国白蛾核型多角体病毒超氧化物歧化酶基因的序列分析和表达[J]. 微生物学报, 2001, 41(2): 173-180.
- [10] 苏建亚. 甜菜夜蛾的迁飞及在我国的发生[J]. 昆虫知识, 1998, 35: 55-57.
- [11] 刘悦秋, 江幸福. 甜菜夜蛾的生物防治[J]. 植物保护, 2002, 28: 54-56.
- [12] 张俊杰, 张友清. 甜菜夜蛾核型多角体病毒中国株的分离鉴定及毒力测定[J]. 中国病毒学, 2001, 16: 361-363.
- [13] 金东雁. 分子克隆实验指南[M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1992.
- [14] 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 联苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的改进[J]. 医药工业, 1988, 19(5): 217-219.
- [15] Richardson D C. The three-dimensional structure of Cu,Zn superoxide dismutase. In "superoxide and superoxide dismutase"[M]. pp217-223, London: Academic Press, 1977.
- [16] Richardson J S, Thomas K A. Crystal structure of bovine Cu,Zn superoxide dismutase at 3 Angstrom resolution : Chain tracing and metal ligands[J]. Proc Natl Acad Sci USA 1975, 72, 1349-1353.
- [17] Malinowski D P, Fridovich I. Chemical modification of arginine at the active site of the bovine erythrocyte superoxide dismutase[J]. Biochemistry, 1979, 18: 5909-5917.
- [18] Abernethy J L, Steinman N H M, Hill R L. Bovine erythrocyte superoxide dismutase:Subunit structure and sequence location of the intrasubunit disulfide bond[J]. J. Biol. Chem. 1974, 249: 7339-7347.
- [19] Junichi F j, Theingi M. Characterization of wild-type and amyotrophic lateral sclerosis-related mutant Cu, Zn superoxide dismutase overproduced in baculovirus-infected insect cells[J]. Neurochem, 1995, 64: 1456-1461.