

棉铃虫病毒 HaSNPV *fp25k* 基因的克隆表达及抗体制备*吴 东^{1,2,3}, 邓 菲¹, 胡志红¹, 袁 丽¹, 孙修炼^{1**}

(1. 中国科学院武汉病毒研究所分子病毒学实验室, 湖北武汉 430071; 2. 中国科学院水生生物研究所, 湖北武汉 430072; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

Molecular Cloning and Expression of the *fp25k* Gene of HaSNPV in *E. coli* and Preparation of Its AntiserumWU Dong^{1, 2}, DENG Fei¹, HU Zhi-hong¹, YUAN Li¹, SUN Xiu-lian^{1**}

(1. Laboratory of Molecular Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 3. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The PCR product of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus HaSNPV *fp25k* gene was cloned into a prokaryotic expression vector pProEXHTb. After inducing with IPTG, the *fp25k* gene was successfully expressed in *E. coli* DH5 α . The expression product was 32 kDa. This protein was purified and injected into rabbit to raise polyclonal antiserum. Western blot analysis using this antiserum showed the specific reaction to FP25K protein expressed in both prokaryotic with GST fusion and viral infected insect cells. The antibody made it possible to analysis the function this protein in infected insect cells.**Key words:** HaSNPV; FP25K; Cloning; Expression; polyclonal antiserum.**摘要:** 根据棉铃虫单核衣壳核多角体病毒(*Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, HaSNPV) *fp25k* 基因的序列, 设计引物, 引入适当的酶切位点, 利用 PCR 扩增出基因片段。将该基因片段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 32kDa。纯化蛋白产物免疫家兔制备抗血清。该抗血清可与原核表达的 GST-FP25K 融合蛋白及在感染的昆虫细胞中表达的 FP25K 蛋白发生特异性免疫反应。该抗体的获得为深入研究 FP25K 蛋白的功能提供了基础。**关键词:** 棉铃虫单核衣壳核多角体病毒 (HaSNPV); FP25K; 克隆; 表达; 抗体

中图分类号: S43

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004)04-0380-05

杆状病毒 (Baculovirus) 是一类专性感染节肢动物 (主要是鳞翅目昆虫) 的病毒。目前广泛用于生物防治、真核表达载体和基因治疗研究中。杆状病毒在感染细胞的过程中产生两种形式的病毒粒子: 出芽病毒 (Budded virus, BV) 和包涵体来源病毒 (Occlusion-derived virus, ODV)。BV 在感染早期产生, 核衣壳通过细胞质膜以出芽方式释放到胞外, BV 的囊膜来自细胞质膜。BV 自细胞中释放后,

在细胞间水平传播, 感染其它细胞和组织^[1-3]。ODV 在感染后期产生, 成熟 ODV 从细胞核内释放到胞外。但 ODV 的囊膜并非在穿过核膜时由核膜包被而成, 而是在核内获得囊膜^[4,5]。ODV 产生后被包埋于多角体中, 待虫体死亡液化后被释放到环境中。杆状病毒在细胞水平连续传代中会出现少多角体 (Few polyhedra, FP) 突变^[6]。杆状病毒的一个编码 25kDa 蛋白的基因 (*fp25k*) 被证明与其 FP 表型相

收稿日期: 2004-02-10, 修回日期: 2004-03-11

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30270058、30025003); 973 项目(2003CB114202)

作者简介: 吴 东 (1976-), 男, 博士研究生, 研究方向为杆状病毒学。

** 通讯作者: 孙修炼 (1968-), 男, 副研究员, 研究方向为杆状病毒学。Corresponding Author. Tel: 027-87197327.
E-mail: sunxl@pentium.whiov.ac.cn.

关^[7,8]。*fp25k* 突变的 AcMNPV 感染昆虫细胞后, 每个细胞产生的多角体一般少于 10 个; 多角体中包埋的 ODV 粒子也比野生型少^[9,10]; 但是 BV 的产量比野生型病毒成倍提高, 提高的幅度依不同的病毒而不同^[10-14]。FP25K 蛋白也是 AcMNPV 的 BV 和 ODV 衣壳的组成成分^[15,16], 而且还参与 ODV 囊膜蛋白向核内的运输^[14]。日本学者发现 *fp25k* 基因突变的 BmNPV 感染家蚕幼虫后死虫的液化程度比野生型感染的死虫低, 而且半致死量 (LD₅₀) 是野生型病毒的 1000 倍^[17]。综上所述, 杆状病毒的 *fp25k* 发生突变后将不利于病毒在虫体内的增殖。

棉铃虫单核衣壳核多角体病毒 (*Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, HaSNPV) 是棉铃虫的专一性病原体, 自上世纪 70 年代起就已在我国应用于棉铃虫的生物防治。本实验室已测定了 HaSNPV G4 株的全基因组序列^[18]。经核酸和氨基酸序列同源性比较分析在基因组序列中发现了 AcMNPV *fp25k* 基因的同源序列。野生型 HaSNPV 以 0.5 个 MOI 在 HzAM1 细胞系传代, 连续传 6 代后病毒全部变为 FP 表型, 而且 FP 表型病毒感染的细胞核中形成的多角体少且决大多数不包涵 ODV 粒子; 经空斑纯化的不同 FP 表型其 *fp25k* 基因序列中都只是在不同位置上的单个核苷酸的突变, 插入或缺失^[19]。本研究报道了 *Ha-fp25k* 基因的克隆和在原核细胞中的表达及抗血清的制备。

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌株和质粒: 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 菌株由本室保存; T-easy 载体为 Promega 产品; 原核表达载体 pProEXHTb 为 His-Tag 融合表达载体, GIBCO BRL 公司产品; pGEX-KG 为谷胱甘肽巯基转移酶 (GST) 蛋白融合表达载体, 由本室保存。

细胞系: 棉铃虫细胞系 HzAM1^[20] 由本室保存, 用 Grace's 培养基加 10% 胎牛血清 (GIBCO BRL 产品) 于 28℃ 培养。HaSNPV G4 株分离于湖北省霍病幼虫^[21]。病毒经感染 4 龄棉铃虫幼虫进行增殖。多角体用差速离心纯化, 于 -20℃ 保存。用被病毒感染的幼虫血淋巴感染 HzAM1 细胞, 96h 后收集培养上清作为 BV 储存液, 用终点稀释法^[22]测定滴度后保存于 4℃。病毒 DNA 依照孙修炼的方法从病毒多角体中提取^[23]。

酶及试剂: 各种工具酶均购自 TaKaRa (大连) 生物工程公司。Taq 酶为加拿大 Biostar 公司产品。dNTPs 为 Pharmacia 产品。1kb DNA Ladder 购自

GIBCO BRL 公司。蛋白质分子量标准购于晶美公司。PCR 产物回收试剂盒及凝胶回收试剂盒为 Omega 产品。IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷) 为 Promega 公司产品。弗氏佐剂为 GIBCO BRL 产品。碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗购于晶美公司。碱性磷酸酶显色试剂盒购于华美公司。引物合成及 DNA 测序由上海博亚生物技术公司完成。

1.2 重组表达载体的构建

以病毒基因组 DNA 为模版, 根据 HaSNPV *fp25k* 基因的序列, 设计一对引物, 序列如下: 引物 1: 5'-GGCGAATTCAAATGGAACTGATCTAATTAATG-3', 5'端含有 *EcoR* I 位点; 引物 2: 5'-GGCGCGGCCGCTATGACGGGCAAGGGGGC G-3', 5'端含有 *Not* I 位点。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 45s, 55℃ 45s, 72℃ 60s 为一个循环, 进行 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 5min。反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 用 PCR 回收纯化试剂盒纯化和回收 PCR 产物, 与 pGEM-T easy 载体连接。连接产物转化大肠杆菌, 挑取白斑接入 3mL LB 培养基 (Ampicillin, 50 μ g/mL) 中振荡培养过夜。小量提取质粒酶切鉴定阳性克隆子, 命名为 pT-FP。利用 M13 通用引物对 pT-FP 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 pT-FP 质粒上用 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切目的基因片段, 分别亚克隆至表达载体 pProEXHTb 和 pGEX-KG, 酶切鉴定阳性克隆子, 命名为 pPro-FP 和 pKG-FP。

1.3 基因的诱导表达

挑取 7 个 pPro-FP 阳性单菌落接种于 3mL LB 培养基 (Ampicillin 50 μ g/mL) 中, 37℃ 振荡培养过夜。取过夜培养物 1% 体积接种于 10mL 新鲜 LB 培养基 (Ampicillin 50 μ g/mL) 中, 37℃ 振荡培养至 OD_{600nm} 为 0.6, 加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 37℃ 继续培养。在 IPTG 诱导 4h 后分别取 1mL 培养物, 离心收集菌体, 重悬于 200 μ L PBS 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。

1.4 FP25 蛋白的抗血清制备

如上所述, IPTG 诱导含 pPro-FP 的大肠杆菌。诱导 4h 后离心收集菌体, PBS 洗涤菌体; 每 10mL 原培养液菌体洗涤后重悬于 1mL PBS 中, 超声波破碎菌体。超声裂解液经 10,000r/min 离心 10min, 转移上清, 用含有 1% 脱氧胆酸钠、0.1% Triton-X 100 的 PBS 洗涤包涵体沉淀。SDS-PAGE 检测裂解上清和沉淀中目的蛋白的纯度。将包涵体蛋白进行

SDS-PAGE; 电泳结束后, 将凝胶浸入冰冷的 0.1mol/L KCl 溶液中缓慢摇动, 待白色蛋白条带显现后, 切下目的条带并装入透析袋中; 将透析袋浸入蛋白电泳缓冲液中, 50V 电压进行水平电泳, 12h 后取出透析袋; 透析袋内溶液对 PBS 进行透析, 每隔 8h 换一次液, 连续透析 48h。透析后的溶液用紫外分光光度计测定蛋白浓度。每次取 100 μ g 纯化蛋白与弗氏佐剂混合后注射家兔鼠蹊部淋巴结。首次免疫使用完全佐剂, 加强免疫使用不完全佐剂。间隔 3 周注射一次, 共注射 3 次后采血, 收集血清。

1.5 FP25K 蛋白的 Western Blot 检测

诱导含 pKG-FP 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 的 BV 以 5 个 MOI 感染 1×10^6 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 SDS 上样缓冲液, 置于沸水浴中加热 10min, 取 10 μ L 上样进行 SDS-PAGE。电泳完毕后, 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% Tween 20, pH7.5) 室温洗膜 5min。抗 FP25K 蛋白的抗体用 0.3% BSA 稀释 2000 倍。将膜浸入抗体稀释液中, 37 $^{\circ}$ C 温浴 1h。TBS-T 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10min。二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG, 用 0.3% BSA 稀释 3000 倍。将膜浸入二抗稀释液中, 37 $^{\circ}$ C 温浴 1h。TBS-T 缓冲液洗膜 4 次, 每次 10min。显色操作参照说明书进行。

2 结果

2.1 *fp25k* 基因的克隆及重组表达载体的酶切鉴定

HaSNPV *fp25k* 基因编码区全长 654bp。PCR 产物经电泳检测长度为 706bp, 与预计长度相符。PCR 产物与 pGEM-T easy 载体连接后, 用 M13 引物测序证实扩增序列与原序列相同 (数据未显示)。用 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切 pT/FP 质粒, 回收目的片断分别亚克隆至载体 pProEXHTb 和 pGEX-KG, *EcoR* I 和 *Not* I 酶切鉴定阳性克隆子, 分别命名为 pPro-FP 和 pKG-FP。

2.2 重组表达载体的诱导表达和 SDS-PAGE 分析

经 IPTG 诱导 4 h 后, 收集含有重组质粒和空载体的菌体, 进行 SDS-PAGE 分析, 以检测 FP25K 蛋白的表达, 图 1 显示, 在诱导后的 pPro-FP 菌体总蛋白中 7 个阳性重组子明显比对照菌增加了一条分子量约为 32kDa 的染色带; 图 2 中 pKG-FP 菌体

总蛋白中比对照菌体多一条分子量约为 54kDa 的染色带。说明 *fp25k* 基因在两个载体中均获得了表达。

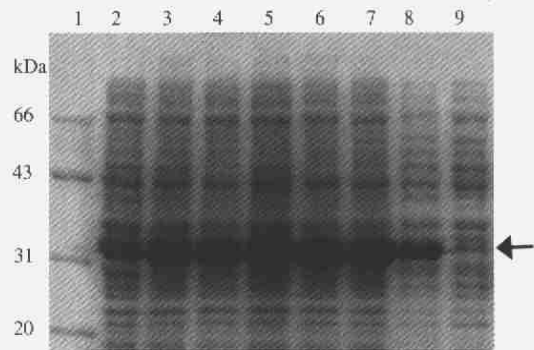


图 1 pPro-FP 诱导表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE of induced expression of FP25K protein from pPro-FP

1. Protein molecular weight standard; 2-8, Seven positive clones of pPro-FP 4 h induction; 9, *E. coli* (pProEXHTb) 4 h induction.

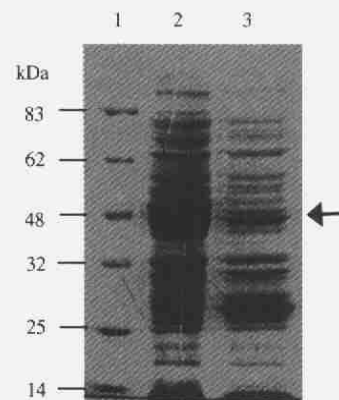


图 2 pKG-FP 诱导表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE of induced expression of FP25K protein from pKG-FP

1. Protein molecular weight standard; 2, *E. coli* (pKG-FP) 4 h induction; 3, *E. coli* (pGEX-KG) 4 h induction.

2.3 FP25K 蛋白抗血清的制备

经 IPTG 诱导 4 h 后, 收集含有重组质粒 pPro-FP 的菌体, 经超声波破碎菌体, 取离心后的上清和沉淀进行 SDS-PAGE。图 3 显示在沉淀中含有大量目的蛋白, 含量在 90% 以上。大量培养 pPro-FP 的菌体, 从超声波破碎的沉淀中纯化目的蛋白免疫家兔。

2.4 FP25K 蛋白抗血清检测

诱导含有 pKG-FP 的大肠杆菌, 将菌体总蛋白以及野生型病毒感染细胞后 72 h 的细胞总蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析。凝胶经半干转膜后, 以 FP25K 兔抗血清为一抗, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔

IgG 为二抗进行 Western blot 分析(图 4)。在 pKG-FP 的诱导样品中在 54kDa 位置有一条特异的显色带; 在感染的细胞样品中出现 2 条显色带, 分别为 26kDa 和 23kDa。

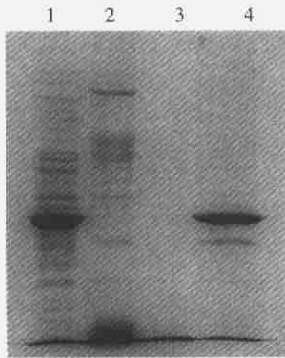


图 3 FP25 蛋白的纯化检测

Fig. 3 Analysis of purified FP25K protein

1, Total protein of *E. coli* (pPro-FP), 4 h induction; 2, The supernatant after sonication; 3, Supernatant of washed pellet after sonication; 4, Washed pellet after sonication.

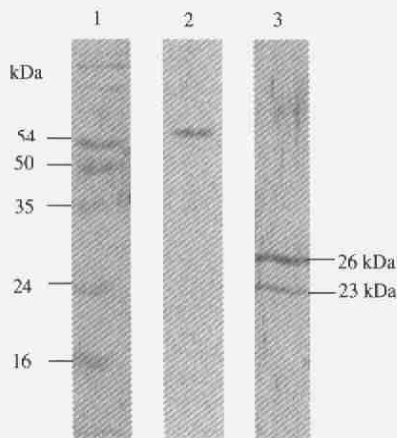


图 4 FP25 蛋白的 western blot 检测

Fig. 4 Western blot analysis of FP25K protein

1, Prestained protein molecular weight standard; 2, *E. coli* (pKG-FP), 4h induction; 3, Infected HaAM1 cells with wild type virus, 72 hpi.

3 讨论

本研究利用 PCR 技术将 HaSNPV *fp25k* 基因克隆至原核表达载体 pProEXHTb 和 pGEX-KG 中, 构建重组表达载体 pPro-FP 和 pKG-FP。在 IPTG 诱导下, FP25K 蛋白和 GST-FP25K 融合蛋白均获得高效表达。GST-FP 融合蛋白可用于 GST pull-down 技术, 研究感染病毒的昆虫细胞中与 FP25K 相互作用的蛋白。纯化 pPro-FP 表达的 FP25K 蛋白免疫家兔

制备了抗 FP25K 蛋白的抗体。该抗体可与原核表达产物 GST-FP25K 和感染病毒的昆虫细胞中的 FP25K 蛋白产生特异性抗原抗体反应。该抗体的获得为进一步研究该蛋白的功能奠定了基础。

pPro-FP 在原核细胞中表达的 FP25K 蛋白分子量为 32kDa, 略大于理论计算值是由于 pProEXHT 载体是一种 N 端带有 His-Tag 的融合表达载体。经 IPTG 诱导, 目的蛋白可获得高效表达; 大量表达的蛋白在细菌细胞内形成包涵体。菌体经超声波破碎、离心后, 可以较容易地纯化包涵体, 进而获得纯的目的蛋白。在 Western blot 检测中, 抗体在感染的细胞样品中杂交产生分子量为 26kDa 和 23kDa 两条带。Braunagel 等研究发现苜蓿银纹夜蛾核多角病毒(*Autographa californica multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV)感染的昆虫细胞 sf9 中, FP25K 蛋白有 25kDa 和 23kDa 两种形式, 他们认为 23kDa 蛋白是从起始子密码 ATG 下游的 ATG 密码子开始翻译产生的蛋白^[16]。在 FP25K 基因起始子密码 ATG 下游 78 个核苷酸处也有一个 ATG 密码子, 因此 HaSNPV FP25K 的 23kDa 分子也可能是从 mRNA 内部的 AUG 开始翻译的产物。23kDa 分子是否有其特殊的生物学功能还需进一步研究。利用 FP25K 抗体进行 western blot 可检测该蛋白在被感染的细胞中的表达时相; 纯化的抗体可用于 FP25K 蛋白在感染细胞中的定位及利用免疫共沉淀分析感染细胞内与 FP25K 相互作用的蛋白。这些将为准确揭示 FP25K 的功能提供重要数据。

参考文献

- [1] Summers M D. Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during the infection of the midgut cell of *Trichoplusia ni*[J]. *J Ultrastruct Res*, 1971, 35: 606-625.
- [2] Granados R R, Williams K A. *In novo* infection and replication of baculovirus[A]. In "The Biology of Baculoviruses"[M]. New York. CRC Press, 1986.
- [3] Keddie B A, Aponte G W, Volkman L E. The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host[J]. *Science*, 1989, 243: 1728-1730.
- [4] Braunagel S C, Elton D M, Summers M D. Identification and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56[J]. *Virology*, 1996a, 217: 97-110.
- [5] Braunagel S C, He H, Ramamurthy P. Transcription, translation and cellular localization of three *Autographa californica* nuclear polyhe-

- drosis virus structural protein: ODV-E18, ODV-E35 and ODV-EC27 [J]. *Virology*, 1996b, 222: 100-114.
- [6] Hink W F, Vail P V. A plaque assay for titration of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus in a cabbage looper (TN-368) cell line[J]. *J Invert Pathol*, 1973, 22: 168-174.
- [7] Fraser M J, Smith G E, Summers M D. Acquisition of host cell DNA sequence by baculoviruses: relationship between host DNA insertions and FP mutant of *Autographa californica* and *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus[J]. *J Virol*, 1983, 47: 287-300.
- [8] Beames B, Summers M D. Location and nucleotide sequence of the 25K protein missing from baculovirus few polyhedra (FP) mutants[J]. *Virology*, 1989, 168: 344-353.
- [9] Potter K N, Faulkner P, MacKinnon E A. Strain selection during passage of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus[J]. *J Virol*, 1976, 18: 1040-1050.
- [10] Fraser M J, Hink W F. The isolation and characterization of the MP and FP plaque variants of *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus[J]. *Virology*, 1982, 117: 366-378.
- [11] Potter K N, Jaques R P, Faulkner P. Modification of *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus passaged *in vivo*[J]. *Intervirology*, 1978, 9: 76-85.
- [12] Harrison R L and Summers M D. Biosynthesis and localization of the *Autographa californica nuclear* polyhedrosis virus 25K gene product [J]. *Virology*, 1995, 208: 279-288.
- [13] Lua L H, Pedrini M R, Reid S, *et al.* Phenotypic and genotypic analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus serially passaged in cell culture[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 945-55.
- [14] Lua L H, Reid S. Effect of time of harvest of budded virus on the selection of baculovirus F P mutants in cell culture[J]. *Biotechnol Prog*, 2003, 19: 238-242.
- [15] Goh D K. Identification and immunocharacterization of a 25K structural protein in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) [J]. *Virus Research*, 1993, 28: 141-152.
- [16] Braunagel S C, Burks J K, Rosas-Acosta G, *et al.* Mutations within the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus FP25K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport [J]. *J Virol*, 1999, 73: 8559-8570.
- [17] Katsuma S, Noguchi Y, Zhou C L, *et al.* Characterization of the 25K FP gene of the baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: implications for post-mortem host degradation[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 783-791.
- [18] Chen X, IJkel W F, Tarchini R, *et al.* The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82: 241-257.
- [19] Lua L H L, Pedrini M R S, Reid S, *et al.* Phenotypic and genotypic analysis of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus serially passaged in cell culture[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83, 945-955.
- [20] McIntosh A H, Ignoffo C M. Characterization of 5 cell lines established from species of *Heliothis*[J]. *Appl Entomol Zool*, 1983, 18: 262-269.
- [21] 张光裕, 张友清. 棉铃虫核型多角体病毒的生产方法及其在生物防治中的应用[J]. *植物保护学报*, 1981, 24: 336-340.
- [22] O'Reilly D R, Miller L K, Luckow V A. *Baculovirus expression vector: a laboratory manual*[M]. New York: W.H. Freeman and Company, 1992.
- [23] 孙修炼, 张光裕. 棉铃虫 (*Heliothis* spp) 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(4): 309-318.