

## 表达 GP64 的重组 HaSNPV 的构建研究\*

王舒<sup>1,2</sup>, 王华林<sup>1</sup>, 邓菲<sup>1</sup>, 吴东<sup>1</sup>, 龙钢<sup>1</sup>, 袁丽<sup>1</sup>, 胡志红<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国科学院武汉病毒研究所 无脊椎动物病毒学开放实验室, 中国科学院分子病毒学重点实验室, 湖北武汉 430071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

### Construction of a Recombinant HaSNPV Expressing GP64

WANG Shu<sup>1,2</sup>, WANG Hua-lin<sup>1</sup>, DENG Fei<sup>1</sup>, WU Dong<sup>1</sup>, LONG Gang<sup>1</sup>, YUAN Li<sup>1</sup>, HU Zhi-hong<sup>1\*\*</sup>

(1. Joint Laboratory of Invertebrate Virology and the Key Laboratory of Molecular Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** There are two kinds of membrane fusion proteins encoded by baculovirus: GP64 and F protein. The membrane fusion protein of group I NPV is GP64, while group II NPV is F protein. In this paper, we tried to answer whether GP64 can be expressed and assembled into the BV of Group II NPV. By using Bac-to-Bac system, we successfully constructed recombinant baculoviruses HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> possessing GP64 of AcMNPV and EGFP, and HaSNPVegfp<sup>+</sup> with an EGFP as control. Western blotting analysis indicated that GP64 was expressed in HzAM1 cells infected with HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> and was packaged into progeny BVs.

**Key words:** Baculovirus; Envelope fusion protein (EFP); GP64; F protein

**摘要:** 杆状病毒的出芽病毒具有两类不同的膜融合蛋白, 组 I 类型的杆状病毒利用的是膜融合蛋白 GP64, 而组 II 类型的杆状病毒利用的是膜融合蛋白 F。本文以组 II 类型的 HaSNPV 为研究对象, 研究组 I 类病毒的 GP64 能否在组 II 类病毒中正确表达和包装。利用 Bac-to-Bac 系统, 构建了带有 AcMNPV 膜融合蛋白 GP64 和增强型绿色荧光蛋白的重组病毒 HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup>, 同时构建了仅带有增强型绿色荧光蛋白的对照重组病毒 HaSNPVegfp<sup>+</sup>, 通过对 HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> 感染的 HzAM1 细胞及所产生的子代 BV 的 Western blot 检测, 证明 GP64 可在 HzAM1 中表达, 并被包装入子代 BV。

**关键词:** 杆状病毒; 膜融合蛋白; GP64; F 蛋白

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2005)01-0079-05

病毒膜融合蛋白是病毒的重要结构蛋白, 介导病毒侵入并可能影响或决定病毒的宿主范围。杆状病毒在其生活史中具有两种形态, 包埋型病毒粒子 (也称多角体来源病毒) (Occlusion-derived virus, ODV) 和出芽病毒粒子 (Budded virus, BV)。BV 是病毒感染细胞的早期形成的出芽病毒, 它在从细胞膜上出芽时获得了一种病毒编码的囊膜蛋白, 对病毒粒子在虫体内的传播和在体外增殖体系的细胞间传播中起重要作用。

杆状病毒科包括核多角体病毒属 (*Nucleopolyhedrovirus*, NPV) 和颗粒体病毒属 (*Granulovirus*,

GV), 分子进化研究将 NPV 进一步划分为组 I 和组 II 两个种群<sup>[1,2]</sup>。组 I NPV 包括苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* MNPV, AcMNPV), 家蚕核多角体病毒 (*Bombyx mori* NPV, BmNPV) 和黄杉毒蛾核多角体病毒 (*Orgyia pseudotsugata* MNPV, OpMNPV) 等, 组 II 包括棉铃虫核多角体病毒 (*Helicoverpa armigera* SNPV, HaSNPV), 舞毒蛾核多角体病毒 (*Lymantria dispar* MNPV, LdMNPV), 甜菜夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera exigua* MNPV, SeMNPV) 等。膜融合蛋白是两大种群间的显著差别。杆状病毒编码两

收稿日期: 2004-06-11, 修回日期: 2004-06-19

\* 基金项目: 973 项目资助 (2003CB114202), 国家自然科学基金资助 (30025003), 中国科学院知识创新工程项目资助 (Kscx2-1-02, kscx2-SW-301-09); 武汉市晨光计划资助 (20045006071-1); 国防科技合作重点项目资助 (2004CB720404)

作者简介: 王舒, (1978-), 男, 从事杆状病毒研究。

\*\* 通讯作者. Corresponding author. Tel: 027-87197180, E-mail: huzh@wh.jov.cn

种 BV 的膜融合蛋白: GP64 和 F 蛋白。组 I NPV 的 BV 使用 GP64 作为其膜融合蛋白, 该蛋白对 BV 有效出芽和病毒感染的传播是必需的<sup>[3]</sup>。而组 II NPV 和 GV 没有 GP64, 却使用另一类称为 F 蛋白的包膜融合蛋白, 如 HaSNPV 的 HA133<sup>[4]</sup>, LdMNPV 的 LD130<sup>[5]</sup>, SeMNPV 的 SE8<sup>[6]</sup> 等。F 蛋白与 GP64 具有不同的结构。F 蛋白的同源序列在所有已测序的杆状病毒基因组中均有发现, 包括具有 GP64 的组 I NPV 病毒。从序列保守性来看, F 蛋白家族分歧较大而 GP64 高度保守, 有假说认为 GP64 是一个在系统发生中较晚获得的蛋白, 而 F 家族可能更为原始, GP64 在较晚时期并入组 I 杆状病毒基因组, 取代了 F 的膜融合功能并促进 F 膜融合功能的丧失, 而 F 同源蛋白却由于其它重要的功能被保留<sup>[5]</sup>。

本文中我们拟研究组 I 的 gp64 基因能否在组 II NPV 中正确表达和包装, 从而为深入研究两种膜融合蛋白的功能及其相关性奠定基础。我们利用 Bac-to-Bac 系统, 将 AcMNPV 的 gp64 基因和增强型绿色荧光蛋白基因 egfp 转入组 II HaSNPV, 构建了重组病毒 HaBacgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup>, 同时构建了插入增强型绿色荧光蛋白基因的 HaBacegfp<sup>+</sup> 作为对照, 通过对重组病毒感染的 HzAM1 细胞及所产生的子代 BV 的 Western blot 检测, 研究 GP64 在组 II NPV 中的表达和包装。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

HaSNPV 的细菌人工染色体 (Bacmid) HaBac HZ8 和转移载体 pHaFastBac1 由本室王汉中等构建<sup>[7]</sup>。p166AcV5 由本实验室保存, pKSegfp<sup>+</sup>Ha133 由本室构建, pGEM-T-Easy 载体购自 Promega 公司。核酸内切酶、T4 连接酶、Klenow 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。Lipofectin 购自 GIBCO-BRL 公司。GP64 的小鼠单克隆抗体 B12D5 由 Volkman 教授惠赠。碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗和碱性磷酸酶显色试剂盒为华美公司产品。昆虫细胞 HzAM1 适宜于 HaSNPV 的体外增殖及 HaSNPV DNA 的转染, Sf21 适宜于 AcMNPV 的增殖, 均由本室保存。HaSNPV G4 株是 HaSNPV 的一个虫体克隆株<sup>[8]</sup>, 其基因组序列已报道<sup>[4]</sup>, 由本室保存。AcMNPV 多角体由本室保存。

### 1.2 从多角体中提取 AcMNPV 基因组

从多角体病毒中提取病毒基因组的方法参考孙

修炼等<sup>[9]</sup>。

### 1.3 AcMNPV gp64 基因的克隆和序列测定

gp64 的全长基因通过 PCR 方法获得。正向引物 gp64F: 5'-AA GCTTGCCTCAATGCTACTAGTAAATC-3'; 反向引物 gp64R: 5'-AA GCTTGTGAGTTCAAGTCTCGCC-3'。PCR 扩增条件为: 94 变性 5 后开始循环, 94 变性 50, 53 退火 50, 72 延伸 2, 30 个循环, 最后延伸 10。产物克隆至 pGEM-T-Easy 载体, 质粒名为 pT-gp64, 由博亚公司进行序列测定。

### 1.4 重组转座载体的构建

转移载体 pFB-Op166-gp64-egfp 的构建如流程图 1 所示。

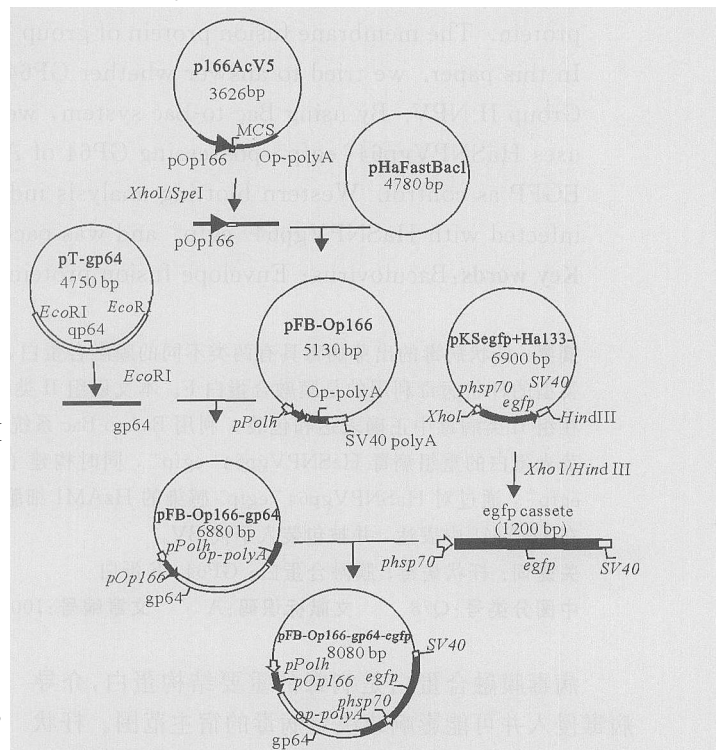


图 1 pFB-Op166-gp64-egfp 构建示意图

Fig. 1 Flow chart of construction of pFB-Op166-gp64-egfp

### 1.5 两个重组 Bacmid 的构建与检测

取 100ng 上述构建的转座载体 pFB-Op166-gp64-egfp, 电转化至含 HaBac HZ8 和 Helper 质粒的大肠杆菌 DH10Bac 感受态细胞, 通过转座获得重组 Bacmid 命名为 HaBacgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup>。取 100ng pFB-Op166-egfp, 电转化至相同感受态细胞, 获得另一重组 Bacmid 命名为 HaBacegfp<sup>+</sup>。二者均采用 Op166 启动子的内部引物 Op166F 与 M13R 引物进行阳性重组子的 PCR 鉴定。Op166F: 5'-GATAAA GTCACGTGGGCACCC-3'; M13R: 5'-AGCGGA TAACAA TTTACACA GG -3'。PCR

扩增条件:94 变性 5 后开始循环,94 变性 50,57 退火 50,72 延伸 3,27 个循环,终延伸 10。HaBacgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> 的阳性重组子将扩增出 3.83kb 的带,HaBacegfp<sup>+</sup> 的阳性重组子将扩增出 2.1 kb 的带,而未发生转座的蓝斑对照将没有扩增带。通过再次转化 DH10Bac 消除 Helper 质粒,紫外测定 DNA 的浓度。

### 1.6 重组 Bacmid 的转染

HaBacgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> 与 HaBacegfp<sup>+</sup> 用于转染 HzAM1 细胞。按照 GIBCOBRL 公司 Lipofectin 试剂的转染说明书进行操作,4 天后在荧光显微镜下观察。收集成功转染细胞培养的上清,低速离心(2000 ×g, 4 )10min,去除细胞碎片,以上清(第一代重组病毒 BV)感染 HzAM1 细胞系,经两次扩增,测定滴度。获得的重组病毒分别命名为 HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> 和 HaSNPVegfp<sup>+</sup>。

### 1.7 出芽病毒的扩增和纯化

将 HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup>, HaSNPVegfp<sup>+</sup>, HaSNPV G4 以 MOI 1.0 感染 HzAM1 细胞系,AcMNPV 以 MOI 1.0 感染 Sf21 细胞系,第四天收集培养基上清,通过低速离心(2000 ×g, 10min),沉淀并收集细胞和细胞碎片,PBS 清洗三次,备用。再用孔径为 0.45μm 的滤器过滤细胞培养基上清。出芽病毒粒子在超速离心的条件下(4,100000 ×g, 90min)穿透含 25%(W/V)蔗糖的 0.1 倍 TE 溶液沉淀在超速离心管底部。超速离心后将所得沉淀(BV)用 TE 溶液 4 重悬过夜。

### 1.8 Western Blot 检测 GP64 的表达

把纯化的野生型 AcMNPV 的 BV、HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> 的 BV、野生型 HaSNPV 的 BV、HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> 感染的 HzAM1 细胞、HaSNPV 感染的 HzAM1 细胞、健康的 HzAM1 细胞等样品在沸水浴中处理 5min,然后用 12% 的 SDS-PAGE 进行电泳分离,电泳后电转移至硝酸纤维素膜上;放入含有 5% 脱脂奶粉的 TBS 封闭缓冲液中于 4 封闭过夜。然后将 NC 膜转移至含有 1:1000 稀释的 GP64 单抗 B12D5 的封闭缓冲液中,室温温育 2h;再用含 0.1% Tween20 的 TBS 溶液洗 NC 膜三次,每次 20min;用碱性磷酸酶标记的 1:1000 稀释的兔抗鼠二抗与 NC 膜在室温下温育 1h,用含 0.1% Tween20 的 TBS 溶液洗 NC 膜三次,每次 15min;最后将 NC 膜转移到 10mL 含 66μLNBT 溶液和 33μLBCTP 溶液的碱性磷酸酶反应缓冲液中显色,当颜色明显后终止反应。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组转座载体的鉴定

重组转座载体 pFB-Op166-egfp, pFB-Op166-gp64-egfp 经酶切检测所获得的片段与预期的大小相符,说明重组转座载体构建正确(图 2 所示)。

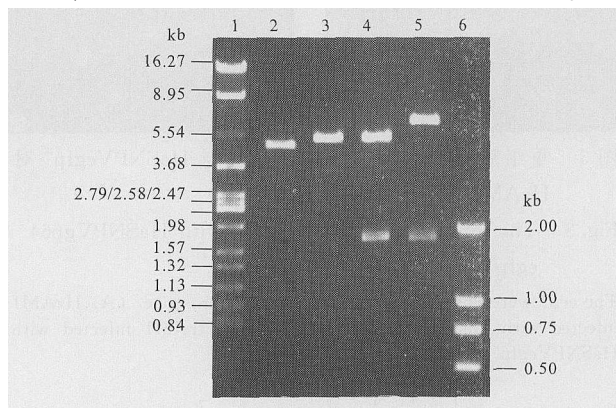


图 2 重组转座载体的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pFB-Op166, pFB-Op166-gp64, and pFB-Op166-gp64-egfp

1/6, DNA Marker; 2, pHaFastBac1 digested by EcoRV; 3, pFB-Op166 digested by EcoRV; 4, pFB-Op166-gp64 digested by EcoRV; 5, pFB-Op166-gp64-egfp digested by EcoRV; 6, pFB-Op166-gp64-egfp digested by EcoRI.

### 2.2 重组 Bacmid 的鉴定

随机挑取 5 个白色菌落,并挑取一蓝色菌落为阴性对照,PCR 进行阳性重组子的鉴定。HaBacgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> 与 HaBacegfp<sup>+</sup> 的鉴定均采用 Op166F/M13R 引物对,前者扩增出 3.91 kb 的片段(结果未显示),后者扩增出 2.15kb 的片段(结果未显示),获得阳性重组子。

### 2.3 重组病毒感染 HzAM1 细胞后的荧光观察

两种 Bacmid 都成功地进行了转染,观察到绿色荧光(结果未显示),取转染上清感染 HzAM1,在感染细胞中出现了绿色荧光(图 3),得到 HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> 与 HaSNPVegfp<sup>+</sup> 重组病毒。经过两次扩增,终点稀释法测定病毒滴度。

### 2.4 Western Blot 检测 GP64 的表达

图 4 显示 GP64 的 Western Blot 检测。以纯化的 AcMNPV 出芽病毒为阳性对照(lane 2),以纯化的 HaSNPV 出芽病毒(lane 5)及其感染的 HzAM1 细胞(lane 6)和健康 HzAM1 细胞(lane 7)为阴性对照,用 GP64 的小鼠单克隆抗体 B12D5 对纯化的 HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> BV(lane 3)和 HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> BV 感染的 HzAM1 细胞(lane 4)进行 Western Blot 杂交,结果中分子量约为 64kDa 的特异性杂交信号表明 Op166 启动子驱动的 GP64 可在

HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup>BV 感染的 HzAM1 细胞中表达,并且可被正确地包装到子代 BV 中。

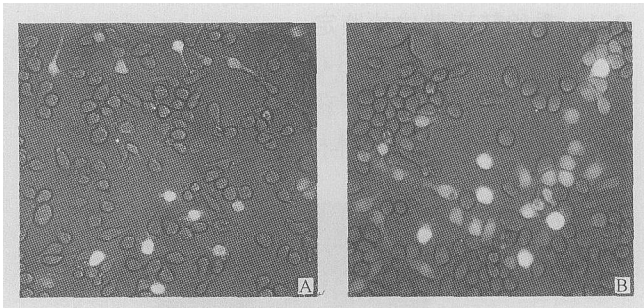


图 3 重组病毒 HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> 与 HaSNPVegfp<sup>+</sup> 对 HzAM1 细胞的感染

Fig. 3 The infection of HzAM1 cells with HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> and HaSNPVegfp<sup>+</sup>

The cells were observed under fluorescent microscope. (A) HzAM1 infected with HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup>. (B) HzAM1 infected with HaSNPVegfp<sup>+</sup>.

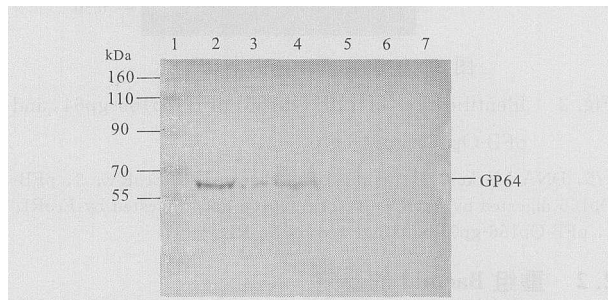


图 4 GP64 表达的 Western blot 分析

Fig. 4 Western blot analysis of the expression of GP64

1, Marker; 2, Wt AcMNPV BV; 3, HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> BV; 4, HzAM1 cells infected by HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup>; 5, HaSNPV BV; 6, HzAM1 cells infected by HaSNPV BV; 7, Healthy HzAM1 cells. The specific antibody used for Western blot was monoclonal antibody B12D5 against GP64.

### 3 讨论

本实验中,我们将组 I NPV 的膜融合蛋白 gp64 基因成功重组到组 II NPV 的 HaSNPV 的基因组中,实验结果表明,GP64 获得了正确表达,并被装在出芽病毒粒子中,说明 HaSNPV-HzAM1 系统能够正确识别 Op166 启动子介导的 gp64 基因的表达。

Javis 等人的研究表明,在 AcMNPV 的 GP64 上有 4 个有功能的 N-糖基化位点,其中任何一个位点的突变都会导致 GP64 电泳迁移率的改变<sup>[10]</sup>。本研究表明,HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup>BV 中 GP64 的泳动率与在野生 AcMNPV 中 GP64 一致,表明 GP64 在 HaSNPV-HzAM1 系统中的糖基化与在 AcMNPV-Sf 细胞中的类似。由于 N-糖基化对 GP64 的运转、病毒粒子的出芽和 GP64 介导的膜融合都是必

需的<sup>[11]</sup>,因此 HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> 所表达的 GP64 可能是有功能的 GP64。

不同的杆状病毒中 GP64 或 F 蛋白的表达时相不尽一致。在 AcMNPV 中,GP64 在感染后的 8h 和 24h 分别达到两个高峰,这是由于 AcMNPV 的 gp64 具有早期和晚期两个启动子<sup>[11]</sup>。在本研究中,我们利用的是 OpMNPV 的膜融合蛋白基因 Op166 的启动子来启动 GP64 在 HaSNPV/HzAM1 中的表达。在 OpMNPV 中,Op166 的翻译合成从感染后的 2h 开始,到感染后 24h 达到蛋白量的峰值<sup>[12]</sup>,这与组 I 核型多角体病毒 BV 生长曲线相一致。有报道组 II LdMNPV 的膜融合蛋白基因 Ld130 在感染后 24h 只有少量的转录产物,到感染后的 48h 才有大量的转录产物产生<sup>[5]</sup>,而对 HA133 的研究也发现与 LD130 类似的情况(龙刚等,未发表)。有研究表明,LdMNPV 的感染循环比 OpMNPV 的感染循环要慢<sup>[13]</sup>,HaSNPV 的感染循环也较慢<sup>[7]</sup>。即使如此,pOp166 驱动表达的 GP64 仍被有效地包装到了 HaSNPV 的 BV 中。在今后的实验中我们可以通过 HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> 与 HaSNPVegfp<sup>+</sup> 生长曲线的比较,揭示膜蛋白的表达时相对 BV 的生长周期的影响。

膜融合蛋白在杆状病毒宿主域决定中的作用一直没有定论。已知 AcMNPV 有很广的宿主域,甚至可进入哺乳动物细胞而 HaSNPV 的宿主范围极窄,下一步我们将在不同的细胞系上检测 HaSNPVgp64<sup>+</sup>egfp<sup>+</sup> 的感染性,希望能对了解膜融合蛋白在杆状病毒宿主域中的作用提供一定的参考。

致谢:感谢加州大学 Berkeley 分校的 Loy Volkman 教授提供的 GP64 的小鼠单克隆抗体 B12D5。

### 参考文献

- [1] Zanotto P M D A, Sampaio M J A, Johnson D W, et al. The *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene region: sequence analysis, gene product and structural comparisons[J]. J Gen Virol, 1992, 73: 1 049-1 056.
- [2] Herniou E A, Luque T, Chen X, et al. Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny [J]. J Virol, 2001, 75: 8 117-8 126.
- [3] Monsma S A, Oomens A G, Blissard G W. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection [J]. J Virol, 1996, 70: 4 607-4 616.
- [4] Chen X, Ijkel W F J, Tarchini R, et al. The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome [J]. J Gen Virol, 2001, 82: 241-257.

- [5] Pearson M N, Groten C, Rohrmann G F. Identification of the *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus envelope fusion protein provides evidence for a phylogenetic division of the Baculoviridae[J]. J Virol, 2000, 74: 6 126-6 131.
- [6] Ijkel W F, Westenberg M, Goldbach R W, et al. A novel baculovirus envelope fusion protein with a proprotein convertase cleavage site[J]. Virology, 2000, 275: 30-41.
- [7] Wang H, Deng F, Pijlman G P, et al. Cloning of biologically active genomes from a *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus isolate by using a bacterial artificial chromosome[J]. Virus Research, 2003, 97: 57-63.
- [8] 孙修炼, 张光裕, 张忠信等. 中国棉铃虫核型多角体病毒不同基因型的虫体克隆[J]. 中国病毒学, 1998, 3(1): 83-88.
- [9] 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.
- [10] Jarvis D L, Wills L, Burow G, et al. Mutational analysis of the N-linked glycans on *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus gp64[J]. J Virol, 1998, 72: 9 459-9 469.
- [11] Jarvis D L, Garcia A Jr. Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp64 protein[J]. Virology, 1994, 205: 300-313.
- [12] Blissard G W, Rohrmann G F. Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus[J]. Virology, 1989, 70: 527-555.
- [13] Riegel C I, Slavicek J M. Characterization of the replication cycle of the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus[J]. Virus Res, 1997, 51: 9-17.