

马尾松毛虫质型多角体病毒多角体蛋白基因的表达与定位

李斗林, 李艳秋, 张珈敏, 杨波, 陈伍国, 周伟东, 胡远扬**

(武汉大学生命科学院, 病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430072)

Expression and Localization of the *Dendrolimus punctatus* Cypovirus

Polyhedrin gene'

LI Dou-lin, LI Yan-qiu, ZHANG Jia-min, YANG Bo, CHENG Wu-guo,
ZHOU Wei-dong, HU Yuan-yang*

(State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract : To express the polyhedrin (the tenth segment, S10) of *Dendrolimus punctatus* Cypovirus (DpCPV) and investigate the localization of the polyhedrin in eukaryote, The polyhedrin gene was amplified from DpCPV by RT-PCR and cloned into pET-28a vector. The polyhedrin was then expressed in bacteria. The purified protein was used to immunized rabbit to produce the antibody. The S10 ORF was also cloned into the baculovirus vector pFASTBAC-HTb. The recombinant plasmid pFASTBACS10 was transformed to *E. coli* containing AcMNPV bacmid to generate the recombinant Bacmid AcS10. AcS10 bacmid DNA transect Sf9 cell and the recombinant baculovirus vAcS10 was produced. After S10 was expressed, the products were detected and analyzed by the SDS-PAGE, Western-blot and Immunofluorescence technique. The polyhedrin expressed in SF-9 cells was mainly located in cytoplasm.

Key words : *Dendrolimus punctatus* cypovirus ; Polyhedrin ; *Spodopetra frugiperda* cell (Sf9)

摘要 : 为了表达马尾松毛虫质型多角体病毒(DpCPV) 多角体蛋白基因 (S10 片段) 并探讨多角体蛋白在真核细胞中的定位, 从 DpCPV 中分离出 S10, 与 pET-28a 载体连接成重组表达质粒 pET28-S10; 将 S10 克隆到杆状病毒转座载体 pFASTBAC HTb 中, 依次筛选出重组转座质粒 pFASTBAC S10, 重组穿梭质粒 Bacmid S10, 重组杆状病毒 Ac S10。多角体蛋白基因表达后, 用 SDS-PAGE、Western-blot 和免疫荧光技术对表达产物进行了检测。结果表明: S10 原核表达质粒、重组杆状病毒成功获得; 在昆虫细胞中表达的质型多角体蛋白主要定位于细胞质, 同时有少量产物定位于细胞核。

关键词 : 马尾松毛虫质型多角体病毒; 多角体蛋白基因; 杆状病毒转座载体; 定位

中图分类号: S 437

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0052-05

质型多角体病毒 (Cytoplasmic polyhedrosis viruses, CPV) 属呼肠孤病毒科质型多角体病毒属, 有 3~5 种结构蛋白, 基因组由 10 或 11 个节段双链 RNA 构成, 能专一性地感染昆虫中肠上皮细胞^[1,2]。马尾松毛虫质型多角体病毒 (*Dendrolimus punctatus* Cytoplasmic polyhedrosis viruses, DpCPV) 是我国

特有的种类, 其基因组由 10 个节段 dsRNA 片段组成^[3], 于 1973 年首次分离到后又陆续在油松毛虫、赤松毛虫、文山松毛虫、德昌松毛虫体内分离到^[4]。对 DpCPV 分子生物学的研究不仅能填补国内该领域的空白, 而且有利于揭示呼肠孤病毒的性质。目前, DpCPV 10 个片段的序列测定已经完成^[5-10]。

收稿日期: 2005-06-16, 修回日期: 2005-11-15

作者简介: 李斗林 (1974-), 男, 湖北省籍, 硕士, 研究方向为昆虫病毒分子生物学。

** 通讯作者: 胡远扬 (1949-), 男, 教授, 研究方向为昆虫病毒分子生物学。Corresponding author. Tel: 027-68756654, E-mail: yyhu@whu.edu.cn

本研究克隆了 DpCPV 的质型多角体蛋白基因, 并分别在原核与真核中进行了表达。用实验室保存的马尾松毛虫质型多角体病毒制备了免抗 DpCPV 的多克隆抗体, 对纯化后的蛋白进行了 Western-blot 检测; 用免疫荧光技术对质型多角体蛋白的定位进行了展示, 为 DpCPV 第 10 片段的进一步研究奠定了初步的技术基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

TOP10 菌株, BL21 菌株, 表达质粒 pET-28a, 马尾松毛虫质型多角体病毒 Sf9 细胞, BAC TO BAC 杆状病毒载体表达系统 (包括转座载体 pFASTBAC HTb、大肠杆菌 DH10BAC 等), 相关培养基等为本实验室保存。

*Bam*H I 和 *Hind* III、T4 DNA 连接酶、dNTP 均为 MBI 公司产品。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。酶免疫反应的一抗为免抗 DpCPV 多克隆抗体(实验室制得), 二抗为碱性磷酸酶 (AP) 标记的羊抗兔 IgG, 购于晶美公司。lipofection 为 GibcoBRL 公司产品;

1.2 构建表达质粒 pET28-S10

参考 Arella 等人的方法^[11] 纯化病毒粒子, 提取 dsRNA。将纯化的 DpCPV dsRNA 经低熔点琼脂糖凝胶电泳分离, 回收纯化。

全长双链 cDNA 的合成参考胡建芳^[7]的方法, 略有改动。取 1 μ g 的 S10 样品 98 $^{\circ}$ C 热变性 8min, 冰浴 30min, 再与合成的引物 1 5'-PO₄-CCCGATC CGTCGACGAATTCTTT-NH₂-3' 在 T4 RNA 连接酶的作用下 4 $^{\circ}$ C 反应 16h, 37 $^{\circ}$ C 复性 10min, 得到 3' 端带有引物 1 的 dsRNA。将得到的 dsRNA 98 $^{\circ}$ C 变性 15min, 以引物 2 5'-AAAGAATTCGTCGACG GATCCGGG-3' 在 M-MLV 逆转录酶的作用下 42 $^{\circ}$ C 反应 1h, 合成 cDNA 第一链, 65 $^{\circ}$ C 退火 16h 形成双链 cDNA, 以 Taq 酶补齐形成全长双链 cDNA。

以全长双链 cDNA 为模板, 正向引物: 5' -ATGTAAGGATCCATGGCAGACGTAGCAGG-3', 反向引物 5'- GTTGCACAAGCTTTACTGATGGTT ACTC-3' (划线部分为 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点), 进行 PCR 扩增并回收纯化; 将纯化产物与 PMD18-T 连接, 构建重组质粒 pT-S10; 将重组质粒 pT-S10 与 pET28a 质粒均用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 分别回收后连接, 构建成表达质粒 pET28-

S10, 进行 PCR、酶切、测序鉴定。

1.3 重组转座质粒的构建

以重组质粒 pET28-S10 为模板, 用常规 PCR 方法扩出质型多角体蛋白基因 (S10)。上游引物为 5'-ATGTAAGGATCCATGGCAGACGTAGCAG G-3', 下游引物为 5'- GTTGCACAAGCTTTACTG ATGGTTACTC-3' (划线部分分别为 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点)。将所得片段 (S10) 经低熔点琼脂糖凝胶电泳分离, 回收纯化。用 *Bam*H I 与 *Hind* III 同时消化所得片段与 pFASTBAC HTb, 再次分离纯化后用 T4 ligase 连接, 转化 DH5 α 菌株。通过 PCR 与双酶切鉴定重组转座质粒 pFASTBAC S10。

1.4 重组杆状病毒穿梭质粒的构建

将 pFASTBAC S10 转化大肠杆菌 DH10BAC 感受态细胞后, 分别涂布含有 50 μ g/mL 卡那霉素、7 μ g/mL 庆大霉素、10 μ g/mL 四环素以及 100 μ g/mL X-gal 和 20 μ g/mL IPTG 的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h 后, 挑选白色菌落, 接种含有三抗的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇振 (250 r/min) 培养 24 h, 提取重组穿梭质粒作鉴定, 获得重组杆状病毒穿梭质粒 Bacmid S10。

1.5 Sf9 细胞的转染和重组杆状病毒的获取

将状态良好的 Sf9 细胞用新鲜培养基悬浮后, 接种于孔径为 35 mm 的 6 孔细胞培养板上, 每孔 9×10^5 个细胞, 27 $^{\circ}$ C 培养, 待细胞贴壁后, 采用 lipofectin 将重组穿梭质粒 Bacmid S10 转染进 Sf9 细胞。显微镜下观察病变, 培养 120 h 后收集细胞上清, 得到重组杆状病毒原液, 4 $^{\circ}$ C 保存。继续扩增并获得重组杆状病毒 Ac S10。

1.6 多克隆抗体的制备

将实验室保存的纯化的多角体病毒同弗氏完全佐剂一起注射家兔, 以后每间隔一月注射一次 (第一次后用弗氏不完全佐剂)。三个月后取血, 得到含 DpCPV 各结构蛋白抗体的血清 (其中含多角体蛋白抗体), 分装, 保存。

1.7 多角体蛋白的表达与检测

将含表达质粒 pET28-S10 的 BL21 菌株于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8 后, 加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L 诱导表达; 将重组杆状病毒 Ac S10 以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 5 感染 Sf9 细胞, 27 $^{\circ}$ C 培养 72 h 后, 吹打吸出细胞悬液, 离心分别收集细胞沉淀和上清, 每孔细胞加 50 μ L 蛋白裂解缓冲液裂解细胞, -20 $^{\circ}$ C 保存。

产物经 SDS-PAGE 电泳后, 染色、扫描。以制备的免抗 DpCPV 多克隆抗体进行 Western Blot 鉴定。

间接免疫荧光试验检测：细胞感染重组杆状病毒72h后，吸去细胞上清，用-20℃预冷的丙酮乙醇固定5min，用含0.1%Triton-X100的PBS液洗涤3次，每次15分钟，干燥后加1:100稀释的多抗血清，37℃作用30min后，PBS液洗去未结合的非多角体蛋白抗体，加1:1000稀释的FITC-羊抗兔IgG荧光抗体与多角体蛋白抗体结合，37℃作用30min，PBS液洗涤3次，每次15分钟，置激光共聚焦显微镜下观察并照相。

2 结果

2.1 重组表达质粒 pET28-S10 的构建

从纯化的病毒粒子中提取 dsRNA，回收纯化后合成全长双链 cDNA，用 PCR 扩增出目的片段。将目的片段与 PMD18-T 连接组成重组质粒 pT-S10；将质粒 pT-S10 扩增后与 pET28a 质粒通过酶切、连接构建表达质粒 pET28-S10。将表达质粒 pET28-S10 以 PCR、双酶切、测序进行鉴定（见图1）。测序结果与 GenBank（登录号 AY 248699）的序列一致。

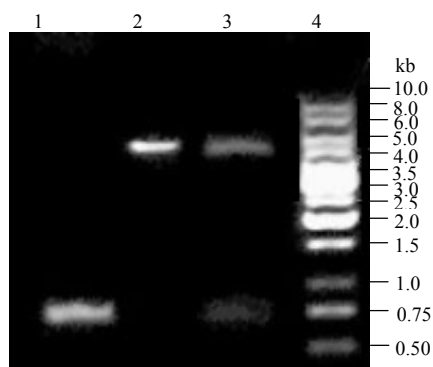


图1 pET28-S10 的 PCR 和双酶切鉴定

Fig.1 Identification of pET28-S10 by enzyme digestion and PCR
1, Amplification of target gene fragment from pET28-S10; 2, pET28 digested by *Bam*H I and *Hind* III; 3, pET28-S10 digested by *Bam*H I and *Hind* III; 4, DNA ladder.

2.2 重组转座质粒 pFASTBAC S10 的构建

将长约 740bp 的 S10 从重组质粒 pET28-S10 上扩增出，酶切后定向克隆到相应转座载体 pFASTBAC HTb 上；对 S10 分析发现，在+664处（以起始密码子 ATG 的 A 为+1）有一单一的 *Hind* II 酶切位点。故选用 *Hind* II 酶切位点辅以转座载体中多克隆位点对重组转座质粒进行组合酶切，确定 S10 基因的连接方向。对重组转座质粒 pFASTBAC S10 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切、*Bam*H I 和 *Hind* II 双酶切；酶切片段的大小与预期结果相符（图2）。

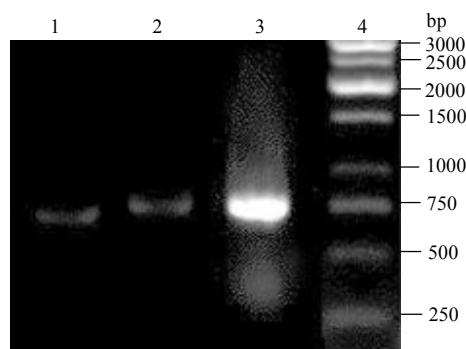


图2 重组转座质粒 pFASTBAC S10 的 PCR 和双酶切鉴定
Fig.2 Identification of pFASTBAC S10 by enzyme digestion and PCR

1, pFASTBAC S10 digested by *Bam*H I 和 *Hind* II; 2, pFASTBAC S10 digested by *Bam*H I 和 *Hind* III; 3, Amplification of target gene fragment from pFASTBAC S10; 4, 1kb DNA ladder.

2.3 重组杆状病毒穿梭质粒 Bacmid S10 的构建

将重组转座质粒 pFASTBAC S10 转化进大肠杆菌 DH10BAC 感受态细胞，挑取阳性菌落，提取质粒 DNA，分别用 *Bam*H I、*Hind* III 和 *Bam*H I、*Hind* II 双酶切；同时分别以 Bacmid S10 为模板进行 PCR 扩增。所得片段大小与预期相符，证明 S10 已成功插入相应载体中（图3）。

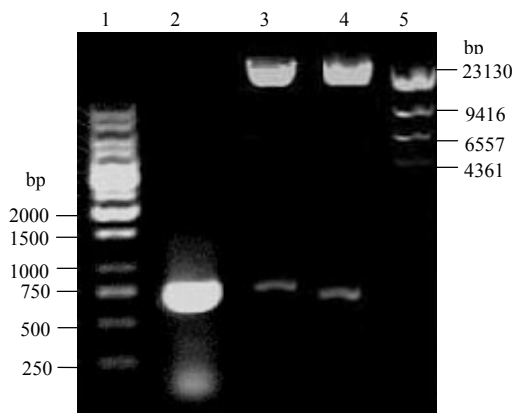


图3 穿梭质粒 Bacmid S10 的 PCR 和双酶切鉴定

Fig.3 Identification of Bacmid S10 by enzyme digestion and PCR
1, 1kb DNA ladder; 2, Amplification of target gene fragment from Bacmid S10; 3, Bacmid S10 digested by *Bam*H I 和 *Hind* II; 4, Bacmid S10 digested by *Bam*H I 和 *Hind* III; 5, λ DNA /*Hind* III Marker.

2.4 Sf9 细胞的感染

将重组病毒和野生型杆状病毒感染 Sf9 细胞。72 h 后，开始出现明显病变，细胞膨胀，核肿大，胞内有形态不规则的透明颗粒。96 h 后细胞开始死亡，1 周后大部分细胞相继裂解。

2.5 多角体蛋白的表达与检测

将含重组质粒 pET28a-S10 的 BL21 细菌以最佳 IPTG 诱导浓度、时间诱导表达，4 离心后收集细

菌；将重组病毒和野生型杆状病毒感染 Sf9 细胞，待出现明显病变后收集细胞，加入蛋白裂解缓冲液待用。

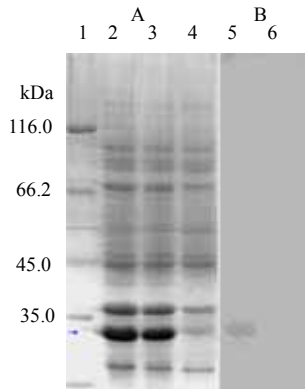


图 4 pET28-S10 表达产物的 SDS-PAGE (A) 与 Western Blot 检测 (B)

Fig.4 Analysis of the expression product of pET28-S10 by SDS-PAGE (A) and Western Blotting (B)

1, Protein marker; 2, pET28-S10 transformed strain induced with IPTG after four hours; 3, pET28-S10 transformed strain induced with IPTG after one hour; 4, pET28-S10 transformed strain induced without IPTG; 5, pET28-S10-transformed strain induced with IPTG; 6, pET28a-transformed strain induced with IPTG.

SDS-PAGE 结果显示(图 4A),诱导后的 BL21 细菌在相对分子质量为 30 kDa 处附近有 1 条明显条带,目的蛋白表达量随着诱导时间延长而增加, IPTG 诱导表达 4h 时表达量最大。将感染了 Ac S10 和野生型杆状病毒的 Sf9 细胞裂解后,进行 SDS-PAGE。经染色脱色后,发现感染重组杆状病毒 Ac S10 的细胞裂解液中有一明显的分子量约为 30kDa 的蛋白条带,大小与理论值相符合。感染野生型杆

状病毒的 Sf9 细胞裂解液中未见此条带(图 5A)。

将电泳产物转移至 PVDF 膜上,进行 Western Blot 检测。结果显示:含重组质粒 pET28a-S10 的 BL21 细菌中出现了一条约 30 kDa 的目的条带,阴性对照则没有(图 4B)。感染 Ac S10 的 Sf9 细胞中有一条与估计值相符的蛋白条带(30 kDa),而感染野生型杆状病毒的 Sf9 细胞没有相应条带(图 5B);

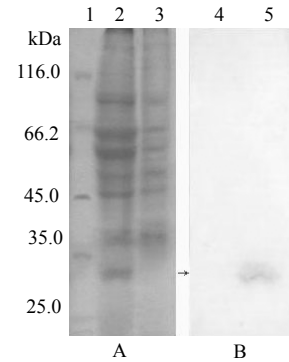


图 5 重组杆状病毒 Ac S10 表达产物的 SDS-PAGE 检测(A) 及 Western Blot 检测(B)

Fig.4 Analysis of the expression product of the recombinant baculovirus Ac S10 by 10%SDS-PAGE (A) and Western Blot(B)

1, Protein marker; 2, SF9 cell infected with Ac S10 at 72 hours; 3, SF9 cell infected with the wild virus at 72 hours; 4, SF9 cell infected with the wild virus at 72 hours; 5, SF9 cell infected with Ac S10 at 72 hours.

将重组杆状病毒 Ac S10 感染正常的 Sf9 细胞作免疫荧光实验。结果表明,感染重组杆状病毒的细胞整体呈现非常明显的绿色荧光,产物主要定位于细胞质,同时有少量产物定位于细胞核。(图 5)

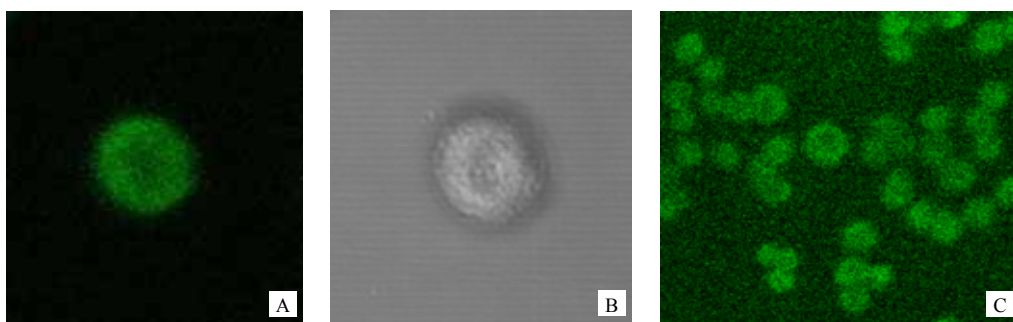


图 6 免疫荧光检测

Fig.6 Immunofluorescence Assay

A, SF9 cell infected with Ac S10 at 72 ; B, The same SF9 cell infected with Ac S10 at 72 without the fluorescence activation ; C, SF9 cells infected with Ac S10 at 72 hours.

3 讨论

质型多角体病毒的基因组由 10 个等分子数的

dsRNA 片段组成,根据在琼脂糖凝胶电泳上的迁移图谱,可分为 14 个类型^[11]。就三种 1 型 CPV (BmCPV-1, LdCPV-1, DpCPV-1), 三种 5 型 CPV

(OpCPV-5, HaCPV-5, EsCPV-5) 和一种 13 型 CPV (CfCPV-13) 的全序列分析显示: 同型 CPV 多角体蛋白基因高度相似, 而不同型的 CPV 之间多角体蛋白几乎没有同源性。同家蚕质型多角体病毒^[12]一样, 马尾松毛虫质型多角体病毒的 10 个片断之间也有共同的末端序列。这可能与基因组的复制、翻译以及病毒粒子的正确装配, 相关位点的识别有关。

位于马尾松毛虫质型多角体病毒表面的质型多角体蛋白为六角形二十面体, 其基因的 ORF 长约 740bp, 编码 248 个氨基酸。在本实验中, S10 基因的原核表达产物虽然尝试了低温培养、慢诱导等方法, 仍得不到可溶性蛋白; 在 SF9 细胞中, 产物的可溶性得到了较大的提高。究其原因, 可能由于 pET28a 表达载体采用了 T7 噬菌体启动子表达系统, 容易使细胞合成和加工系统超载; 而质型多角体蛋白在昆虫细胞中经翻译后加工, 使其结构和功能接近于天然蛋白, 大大提高了可溶性。

在本实验中, 用实验室保存的纯化的病毒注射兔子, 制备成兔抗 DpCPV 多克隆抗体, 进行了 Western Blot 分析。通过 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测表明, 在被重组杆状病毒 Ac S10 感染的 Sf9 细胞中出现了分子量约为 30kDa 的质型多角体蛋白, 而且无其它马尾松毛虫质型多角体病毒蛋白成分存在, 这表明质型多角体蛋白的自我装配不需要质型多角体病毒的其它蛋白成分辅助。借助免疫荧光检测我们还发现, 质型多角体蛋白不仅定位于细胞质而且定位于细胞核, 而在 DpCPV 的 S10 中并没有发现典型的核定位信号 (NLS), 所以本实验为 S10 定位机制的研究作出了铺垫。对于 DpCPV 质型多角体蛋白的大分子装配和定位机制的进一步研究有待继续深入。

References

- [1] Payne C C, Mertens P P C. Cytoplasmic polyhedrosis virus[A]. The Reoviridae[C]. New York: Academic Press, 1983. 425-504.
- [2] Belloncik S. Cytoplasmic polyhedrosis virus-Reoviridae[J]. *Advances in Virus Research*, 1989, 36: 173-209.
- [3] Academy of Forestry in GuangDong(广东省林业科学研究所). A Primary Study on *Dendrolimus punctatus cytoplasmic polyhedrosis viruses*[J] communication of Forestry academy(林业科技通信), 1974, 10: 13 (Ch).
- [4] Cheng Ch J(陈昌杰). The compositive regulation of lappets[M]. BeiJing: Forestry Press(林业出版社), 1990. 282- 300. (Ch)
- [5] Zhao S L, Liang C Y, Hong J J, *et al.* Genomic sequence analyses of segments 1 to 6 of *Dendrolimus punctatus cytoplasmic polyhedrosis virus*[J]. *Arch Virol*, 2003, 148(7): 1357-68.
- [6] Zhao S L, Liang C Y, Hong J J, *et al.* Molecular characterization of segments 7-10 of *Dendrolimus punctatus cytoplasmic polyhedrosis virus* provides the complete genome[J]. *Virus Res*, 2003, 94(1): 17- 23.
- [7] Hu J f, Zhang J M, Yang J, (胡建芳, 张珈敏, 杨娟) *et al.* Molecular Cloning *Dendrolimus punctatus Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (DpCPV) Segment 8* by Single Primer Amplification and Sequence Analysis[J]. *Virologica Sinica(中国病毒学)*, 2003, 18 (1) :39-43 (Ch) .
- [8] Du J Y, Zhang J M, Guo H T, (杜建宇, 张珈敏, 郭海涛) *et al.* Molecular Cloning Sequencing of *Dendrolimus punctatus Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (DpCPV) Polyhedrin Gene*[J]. *Virologica Sinica(中国病毒学)*, 2001, 16 (4): 350-354(Ch) .
- [9] Wen L, Zhang J M, Wang Q, (文力, 张珈敏, 王琼) *et al.* Molecular Cloning and Sequence Analysis of *Dendrolimus punctatus Cytoplasmic Polyhedrosis Virus NS5 Protein Gene*[J]. *Virologica Sinica (中国病毒学)*, 2003, 18 (1): 49-53 (Ch) .
- [10] Wang Y, Zhang J M, Li Y, (汪洋, 张珈敏, 李杨) *et al.* Molecular Cloning and Sequence Analysis of *Dendrolimus punctatus Cytoplasmic Polyhedrosis Virus 7th segment*[J]. *J. Wuhan Univ. (Nat. Sci. Ed.) [武汉大学学报 (理学版)]*, 2004, 50 (2): 216- 222(Ch).
- [11] Belloncik S, Liu J, Su D, *et al.* Identification and characterizations of a new cyovirus type 14, isolated from *Heliothis armigera* [J]. *J Invert Pathology*, 1996, 67: 41-47.
- [12] Yoshiyuki K, Susumu N, Robert E S. Homologous Terminal Sequence in the Double-Stranded RNA Genome segments of Cytoplasmic Polyhedrosis Virus of the Silkworm *Bombyx Mori*[J]. *J Virol*, 1982, 44: 538-543.