

缺失 *p10* 基因的重组棉铃虫病毒导致多角体囊膜包装不完整*

董春升^{1,2}, 邓菲¹, 袁丽¹, 潘小玉^{1,2}, 王华林¹, 胡志红^{1**}

(1. 中国科学院武汉病毒研究所, 病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

Deletion of *p10* From the Genome of HaSNPV Results in a Faulty Polyhedral Envelope

DONG Chun-sheng^{1,2}, DENG Fei¹, YUAN Li¹, PAN Xiao-yu¹, WANG Hua-lin¹, HU Zhi-hong^{1**}

(1. State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China)

Abstract: *p10* is one of the two very late genes that are highly expressed in baculovirus infected cells. We have studied the function of P10 by constructing a *p10* deletion recombinant of the *Helicoverpa armigera* singly-enveloped nucleopolyhedrovirus (HaSNPV). The *p10* gene of HaSNPV bacterial artificial chromosome (HaBacHZ8) was replaced with a DNA fragment containing a chloramphenicol antibiotic gene and a 40bp flanking region using the λ phage Red recombination system in *E. coli* BW25113. *Polyhedrin* and *gfp* genes were then translocated to the *p10* deleted HaBacHZ8 using a Bac-to-Bac system generating the recombinant bacmid HaBac Δ p10-PH-eGFP. Virus growth curves and bioassays indicated that deletion of *p10* did not impair the infectivity of virus *in vitro* and *in vivo*. However, electronic microscopic analysis revealed that deletion of P10 resulted in the fragmentation of polyhedral envelope.

Key words: HaSNPV; *p10* gene; Assembly of polyhedral envelope

摘要: P10蛋白是杆状病毒感染细胞后在极晚期高度表达的两个蛋白之一。本文通过构建*p10*缺失的重组棉铃虫病毒来研究P10的功能。利用 λ 噬菌体Red重组系统介导的同源重组,在大肠杆菌BW25113中,用含有40bp同源臂的氯霉素抗性基因替换了棉铃虫病毒(HaSNPV)细菌人工染色体HaBacHZ8上的*p10*基因,然后利用Bac-to-Bac系统把多角体基因和绿色荧光蛋白基因转移到含有缺失*p10*的HaBacHZ8上,构建了*p10*缺失的重组HaBac Δ p10-PH-eGFP。重组病毒的生长曲线和生物测定结果表明,缺失*p10*基因对病毒复制和毒力无显著影响,但电镜观察结果显示,P10的缺失会影响多角体囊膜的包装。

关键词: 棉铃虫病毒(HaSNPV); *p10* 基因; 多角体囊膜包装

中图分类号: Q7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)06-0594-05

p10 基因存在于多数杆状病毒(Baculovirus)中,据报道,*p10*基因和多角体基因一样是杆状病毒极晚期大量表达的一个基因,编码了约为10kDa左右的蛋白产物,*p10*因此得名^[1,2]。对13种杆状病毒P10蛋白的序列分析表明P10的同源性为15%~59%^[3],但是P10蛋白的二级结构较为保守,包含了N端的七肽重复序列(Heptad repeats)、脯氨酸区域(Proline-rich)和C端的碱性氨基酸区域^[4]。

在AcMNPV中,免疫电镜已经证实被感染的细胞的核和胞质中所出现的片状纤维状结构与P10有关,*p10*基因插入失活不影响病毒的复制^[5,6]。Van Oers等认为,*p10*与病毒感染的细胞的核裂解以及多角体释放有关^[4]。此外,观察到缺失*p10*的突变体产生松散的多角体,暗示了P10蛋白对稳定多角体起到了一定的作用^[7],P10还可能参与多角体囊膜的形成,但是对囊膜形成并非必不可少^[8]。

收稿日期: 2006-06-01, 修回日期: 2006-08-28

* 基金项目: 973项目资助(2003CB114202); 中荷战略联盟计划资助(2004CB720404); 国家自然科学基金资助(30025003)

作者简介: 董春升(1978-),男,浙江省籍,博士研究生,研究方向分子病毒学。

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

HaSNPV作为中国棉铃虫的专一性病原体, 在我国, 自上世纪70年代初就应用于棉铃虫的生物防治, 本室于2001年已经测定了HaSNPV G4株全序列^[9]。为了更好的将HaSNPV应用于重组病毒生物杀虫剂, 本研究报道了HaSNPV *p10* 基因缺失的重组病毒的构建及初步功能分析。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

美洲棉铃虫细胞系 HzAM1 来源于美洲棉铃虫蛹期卵巢管组织^[10], 由本室保存, 用 Grace's 培养基加 10%胎牛血清(GIBCO BRL 产品)于 28℃恒温培养。既含有 HaSNPV bacmid, 又能表达 λ噬菌体 Red 重组酶的大肠杆菌菌株 BW25113 (pKD46, HaBacHZ8)、分别含有 HaSNPV 多角体基因及绿色荧光蛋白基因的转座质粒 pFastBac- PH-eGFP、以及对对照病毒 HaBac-PXY1(即 HaBacHZ8-PH-eGFP)均由本室构建, HaSNPV *p10* 抗兔血清由本室制备, 质粒 pKD3 由美国 Purdue 大学 Dr.Wanner 提供。

各种工具酶均购自 TaKaRa 生物工程公司, Taq 酶为加拿大 Biostar 公司产品。dNTPs 为 Pharmacia 产品。蛋白质分子量标准购于晶美公司。PCR 产物及胶回收试剂盒为 Omega 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。Lipofectin 转染试剂购于 Invitrogen 公司。

1.2 缺失 *p10* 基因的 Bacmid 的构建

设计用于扩增线性同源片段的引物:

HP1:5'-attggacacttttcgattgacgttggaacaacttcacatg
aatatcctccttag-3'

HP2:5'-gtgtcacaacattctattgtgtatcagcgaagatattgtgta
ggctggagctgcttgcg-3'

每条引物 5'端 40nt 是 *p10* 基因的同源序列, 3'端 20nt 是 pKD3 质粒上氯霉素基因 (Cm^R) 序列。然后以 pKD3 为模板, 用 HP1 和 HP2 引物做 PCR, 扩增得到 1.1kb 两端带有 *p10* 同源片段的 Cm^R 基因线性同源片段, 0.7% agarose 胶分离 PCR 线性同源片段, 使用 Omega 公司的 E.Z.N.A.TM 纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化。

将 BW25113 (pKD46, HaBacmidHZ8)在 LB 培养液振荡培养。当 OD₆₀₀ 达到 0.4 时, 加入阿拉伯糖溶液(L-arabinose)至终浓度为 1mmol/mL。30℃继续培养 2~3h 后, 迅速转移至 4℃制备感受态细胞。离心沉淀细胞, 用 10%的冷甘油悬浮细胞。然后重复离心悬浮 3 次后, 每 3mL 细胞沉淀用 50μL 10%

的冷甘油重悬。

取 5μl 经过柱纯化的线性片段(~100ng/μL)与 80μL 感受态细胞混合后, 在电转化仪(Bio-Rad)上以 1.8KV 进行电击转化, 然后立即加入 1mL SOC 培养基。转化产物经 30℃, 200r/min 振荡培养 2h 后, 离心收集细胞, 将所有细胞涂布在含 25μg/mL 卡那霉素, 17μg/mL 氯霉素的 LB 琼脂平板上, 37℃恒温培养, 2-3d 后鉴定平板上氯霉素抗性转化子, 将正确的重组子命名为 HaBacDC1。线性片段的 PCR 扩增以及在 Bw25113 (pKD46, HaBacHz8)内的同源重组, 详见参考文献 Hou 等^[11]。

将鉴定正确的同源重组子 HaBacDC1 重新转入含有 helper 质粒的 DH10B 菌中, 以 pFastBac-PH-eGFP 为转移载体, 按照 Invitrogen 公司 Bac-to-Bac 操作手册, 把 HaSNPV 多角体基因和 *gfp* 标记基因转座到 HaBacDC1 上, 得到 *p10* 基因缺失带有多角体基因和 *gfp* 标记基因的 HaBacΔ*p10*-PH-eGFP bacmid。重组病毒经 PCR 和酶切鉴定。

1.3 重组病毒的转染、扩增和滴度测定

参照操作手册, 将 1μg 左右的 HaBacΔ*p10*-PH-eGFP DNA 和 12μL lipofectcin 混合后, 加入到约含有 6×10⁵ 个 HzAm1 细胞的培养皿内。转染 7d 后观察细胞荧光。将转染得到的重组病毒 HaBacΔ*p10*-PH-eGFP 用 HzAM1 细胞增殖, 经扩增后获得的病毒用 96 孔板按照梯度稀释法进行滴度测定。

1.4 重组病毒生长曲线的测定

将 HaBac-PXY1 和 HaBacΔ*p10*-PH-eGFP 病毒以 MOI 5 感染 HzAM1 细胞, 分别在感染后 0、12、24、36、48、72、92h 收集感染上清, 测定 BV 滴度。感染及滴度测定重复 3 次, 计算平均值, 并以 Log(TCID₅₀/mL)对感染时间做生长曲线。

1.5 重组病毒的生物测定

经鉴定的重组病毒在虫体内扩增 1 次后, 收集多角体, 经初步纯化后计数^[12], 以 HaBac-PXY1 病毒为对照, 进行生物测定。挑选大小均一的二龄末棉铃虫幼虫, 置于无菌的 24 孔板中, 28℃恒温光照培养箱内饥饿培养 16h, 分别以浓度为 1×10⁶ PIBs/mL、3×10⁵ PIBs/mL、1×10⁵ PIBs/mL、3×10⁴ PIBs/mL、1×10⁴ PIBs/mL 的病毒悬液喂食饥饿后的三龄初棉铃虫幼虫^[13], 每个浓度的幼虫数为 48 头。每天观察其死亡率, 用 SPSS 软件计算病毒的半致死浓度 LC₅₀。

1.6 重组病毒多角体的电镜观察

分别用浓度为 1×10⁶ PIBs/mL 的重组病毒 HaBacΔ*p10*-PH-eGFP 和对照病毒 HaBac-PXY1 喂

食二龄末棉铃虫幼虫，收集虫尸，提纯多角体，进行电镜切片观察。

2 结果

2.1 重组 HaSNPV Bacmid 的鉴定

图 1 所示是构建缺失 *p10* Bacmid 的过程。我们设计了引物 HP1 和 HP2，并以 pKD3 质粒为模板扩增编码氯霉素抗性的线性片断。线性片断两侧各带有同源重组所需的 40bp 的同源臂，线性片断在大肠杆菌 BW 25113 中，并在 λ 噬菌体 Red 重组酶的

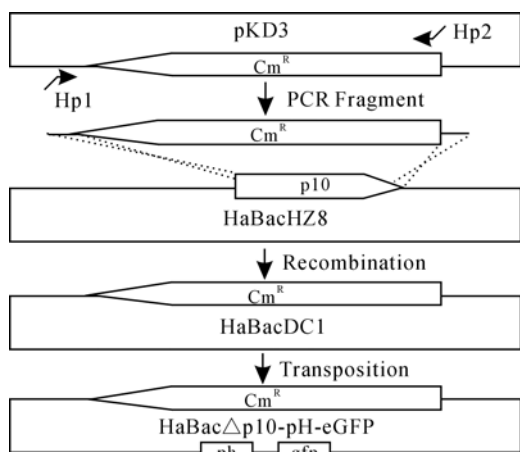


图 1 HaBac Δ p10-PH-eGFP 的构建示意图

Fig.1 The schematic representation of construction of HaBac Δ -p10-PH-eGFP

介导下与 HaBacHZ8 发生同源重组，随机挑选几个阳性克隆子，用 *p10* 的上下游引物 p10F 和 p10R 鉴定 (图 2, A)，证实 *p10* 基因已经被 1.1 kb 大小的 Cm^R 替换，得到缺失 *p10* 的 bacmid HaBacDC1。用 *Hind* III 酶切分析基因组 DNA，发现 *Hind* III C 片段变大，和预期 *Hind* III C 由 14.4kb 变为 15.6kb 的结果一致 (图 2, B)。鉴定正确之后的 HaBacDC1 的转座用 M13 引物 PCR 检测，显示多角体基因和 *egfp* 基因已经全部转到 HaBacDC1 上，得到转座子 HaBac Δ p10-PH-eGFP (图 2, C)。

2.2 重组 Bacmid 转染 HzAM1 细胞

提取的重组 Bacmid DNA 转染对数生长期的 HzAM1 细胞。转染后第 7 天用荧光显微镜观察，细胞出现绿色荧光。取转染上清感染 HzAM1 细胞以大量增殖病毒，并进行滴度测定以获得病毒的滴度。

2.3 HaBac Δ p10-PH-eGFP 和 HaBac-PXY1 的一步生长曲线的比较

HaBac Δ p10-PH-eGFP 和 HaBac-PXY1 分别以 5 个 MOI 感染 HzAM1 细胞。感染后不同时间测定上清的滴度。如图 4 所示，在复制上，HaBac Δ p10-PH-eGFP 和 HaBac-PXY1 具有类似的 BV 生长曲线，感染 48h 后，BV 的复制达到平台期，随后仅有微弱增加。由此可见，*p10* 基因的缺失不影响病毒的复制。

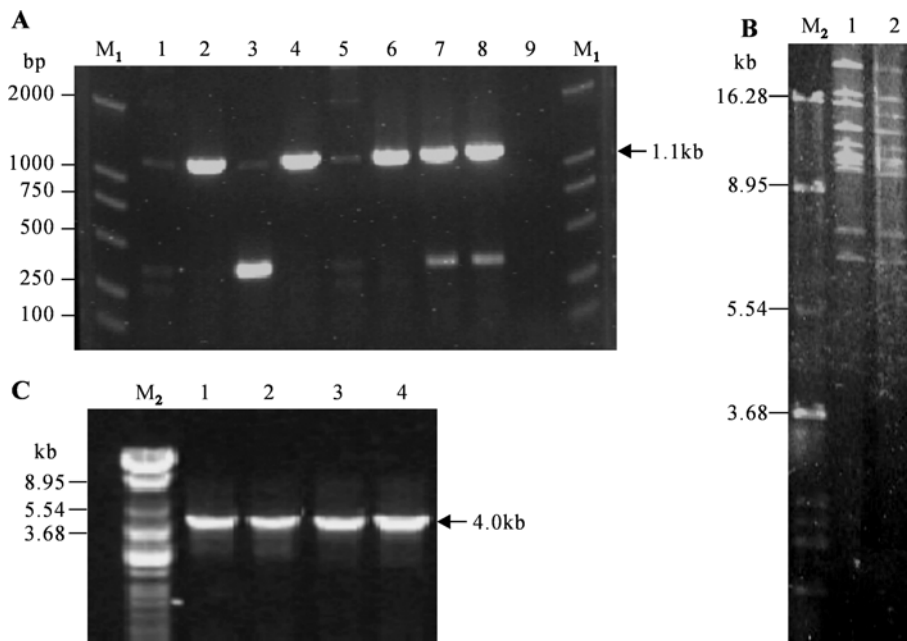


图 2 重组 Bacmids 的检测

Fig.2 Detection of recombinant bacmids

A: Identification of HaBacDC1 by PCR using HaSNPV p10 primers. Lane 1- 8 were different clones and 2, 4, 6 were verified clones, 9 was blank control. B: Identification of HaBacDC1 by *Hind* III digestion. Lane1: HaBacDC1; Lane2: HaBacHZ8. * indicated differential bands. C: Identification of transposition of HaBac Δ p10-PH-eGFP by PCR using M13 primers. Lane1-4 were verified clones. M₁:DL2000 DNA ladder, M₂: λ phage DNA digested by three enzymes:

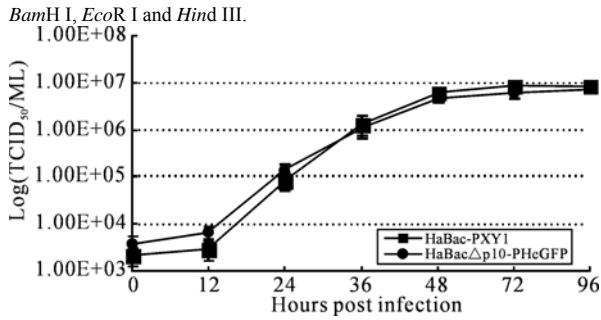


图4 重组病毒的一步生长曲线

Fig.4 One-step growth curves of recombinant viruses. The infections with HaBacΔp10-PH-eGFP and HaBac-PXY1 were performed at MOI of 5 in HzAM1 cells. The supernatants of infections were collected at different time points and assayed by end point dilution assay.

2.4 重组病毒的生物测定

用经过一次虫体扩增的 HaBacΔp10 和 HaBac-PXY1 的多角体进行生物测定, 结果显示 HaBacΔp10-PH-eGFP 对 3 龄幼虫的 LC_{50} 与 HaBac-PXY1 是基本一致的。Z 值统计这两个病毒 LC_{50} 的差异,

$$Z = \frac{(dose1-dose2)}{\sqrt{SE1^2+SE2^2}}, \quad SE=(upper-lower)/(2*1.96), \quad Z$$

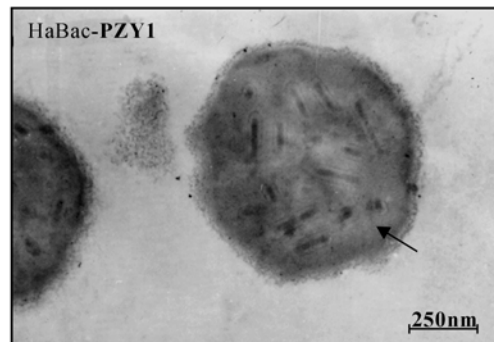
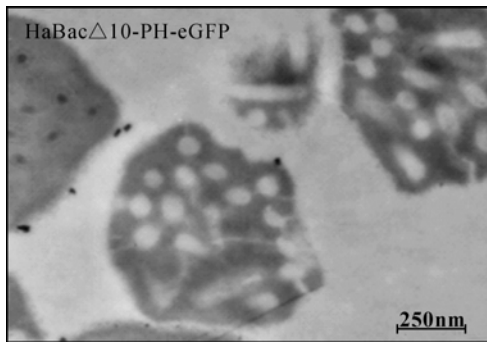


图5 HaBacΔp10-PH-eGFP和HaBac-PXY1的多角体电镜切片

Fig.5 Electron microscope images of HaBacΔp10-PH-eGFP and HaBac-PXY1 and polyhedra

Late second-instar *H. armigera* larvae were fed with polyhedra of HaBac-PXY1 and HaBacΔp10-PH-eGFP with the concentration of 1×10^7 PIBs/mL. Polyhedra were purified from the cadavers and fixed for electron microscopy. Arrow indicated the electron-dense region of the polyhedra envelope.

3 讨论

p10 基因是杆状病毒极晚期大量表达的基因之一, 其表达与被感染细胞内出现的片状纤维结构有关^[9]。本研究以 HaSNPV 的 *p10* 为研究对象, 构建了缺失 *p10* 的 HaSNPV 重组病毒 HaBacΔp10-PH-eGFP, 并对其生物学活性进行了初步分析。

Vlak 通过在 AcMNPV *p10* 中插入 β -半乳糖酶基因, 构建了 *p10* 缺失的重组病毒, AcMNPV 中 *p10* 的缺失并不影响病毒的复制, 但是发现 *p10* 缺失的重组病毒多角体的感染性略微增加^[5], 后来 Bianchi 对 AcMNPV *p10* 缺失病毒的生物测定结果显示, 缺失病毒对 2 龄和 4 龄甜菜夜蛾幼虫的半致死剂量和野生型病毒没有差别^[13]。这里我们利用 HaSNPV bacmid 构

表 1 重组病毒 HaBacΔp10-PH-eGFP 和病毒 HaBac-PXY1 对 3 龄初幼虫的生测结果

Table.1 Results of bioassay of recombinant HaBacΔp10-PH-eGFP and HaBac-PXY1 using early third-instar *H. armigera* larvae

Virus	LC_{50}	95% confidence limits (PIB/mL)	
		lower	upper
HaBacΔp10-PH-eGFP	3.2×10^4	2.3×10^4	4.4×10^4
HaBac-PXY1	4.8×10^4	3.5×10^4	6.5×10^4

值为 1.64, 小于 1.92 ($P < 0.05$), 表明这两个病毒的 LC_{50} 没有显著性差异(表 1)。

2.5 HaBacΔp10-PH-eGFP 和 HaBac-PXY1 病毒多角体形态的电镜观察

提纯的多角体经超薄切片电镜观察, 结果显示, 多数 HaBacΔp10-PH-eGFP 的多角体边缘电子致密区域囊膜缺失或不完整, 且多角体多有破碎, 内部空化。而 HaBac-PXY1 病毒的多角体周缘囊膜完整, 内部包埋 ODV 病毒粒子(图 5)。以上情况说明, P10 可能参与多角体囊膜蛋白的包装, 使多角体在不良的自然环境中更趋稳定, 不易被降解。

建了 *p10* 基因缺失的重组病毒, 通过生长曲线分析, 发现缺失 *p10* 基因的病毒 HaBacΔp10-PH-eGFP 感染细胞后与对照病毒 HaBac-PXY1 在病毒出芽复制方面没有显著差异(图 4)。生物活性测定结果表明, 缺失了 P10 的多角体与对照多角体在虫体的感染性上无显著差异(表 1), 这与在 AcMNPV 中的报道一致, 同时也预示了 *p10* 并非为口服感染途径所必需。

利用电镜观察病毒感染棉铃虫后提取的多角体切片发现, 缺失 *p10* 基因的病毒多角体囊膜不完整或缺失, 多角体易碎, 其中含有多个空孔, 但没有 ODV 存在。而对照病毒 HaBac-PXY1, 其多角体周边有电子致密的多角体膜蛋白包裹, 多角体完整, 内含 ODV 颗粒。有报道表明在弱碱环境中, 囊

膜蛋白缺失的AcMNPV多角体感染性比野生型多角体高^[14,15], 这部分增加的感染性可能是缺少了囊膜的多角体在碱性环境中更容易释放 ODV, 而 Bianchi 同时对AcMNPV pp34缺失的重组病毒和野生病毒的生物活性进行了比较, 发现两者没有显著差别^[13], 说明囊膜蛋白不是影响多角体中肠感染效率的重要因子。我们认为多角体囊膜在保护多角体抵御外界环境中起作用, 而在HaSNPV中, p10的缺失会影响多角体囊膜的包装, 导致多角体囊膜的缺失或不完整, 可能不利于多角体抵抗外界环境的变化。

另外有报道, AcMNPV 的P10 蛋白可直接与感染细胞的微管结合^[16], 免疫学研究结果显示, 抗OpMNPV P10 的抗体与未被病毒感染的昆虫细胞和鼠成纤维细胞的细胞骨架结构有很强的抗性反应^[17], 可能P10蛋白与细胞骨架的成份有结构的同源性。综上, HaSNPV p10的缺失不影响病毒的感染性和毒力, 但是, p10 基因在杆状病毒的进化过程中得以保存并被大量表达, 说明其具有一定的功能, 可能这种功能在实验室条件并不明显, 或许在自然环境中对病毒的传播十分有利, 其具体功能尚待进一步研究。

致谢: 感谢孙新城在生物测定实验中的帮助以及病毒所测试中心在电镜实验中所做的工作。

References

- [1] Smith G E, Vlak J M, Summers M D. *In vitro* translation of *Autographa Californica* nuclearpolyedrosis virus early and late mRNAs [J]. J Virol, 1982, 44: 199-208.
- [2] Smith G E, Vlak J M, Summers M D. Physical analysis of *Autographa californica* nuclearpolyedrosis virus transcripts for polyhedron and 10, 000-molecular-weight protein [J]. J Virol, 1983, 45: 215-225.
- [3] Wang H L, Chen X W (王华林, 陈新文), Vlak J M, *et al.* Sequence and transcriptional analysis of the p10 gene of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedro virus [J]. Chin J Virol (病毒学报), 2001, 17(1): 81-86.
- [4] van Oers M M, Flipsen J T, Reusken C B, *et al* Functional domains of the p10 protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus [J]. J Gen Virol. 1993, 74, 563-574.
- [5] Vlak J M, Klinkenberg F A, Zaal K J, Usmany M, *et al.* Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-beta-galactosidase fusion gene [J]. J Gen Virol 1988, 69: 765-776.
- [6] Williams G V, Rohel D Z, Kuzio Z, *et al.* A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants [J]. J Gen Virol. 1989, 70: 187-202.
- [7] Rohrmann G F. Baculovirus structural proteins [J]. J Gen Virol, 1992, 73: 749-761.
- [8] Gross C H, Russell R L, Rohrmann G F. The *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: Analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure [J]. J Gen Virol, 75: 1115-1123.
- [9] 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.
- [10] McIntosh A H, Ignoffo C M. Characterization of 5 cell lines established from species of *Heliothis* [J]. Appl Entomol Zool, 1983, 18: 262-269.
- [11] Hou S W, Chen X W, Wang H Z (侯松旺, 陈新文, 王汉中), *et al.* A method to construct the recombinant baculovirus directly by using PCR product [J]. Science in China (中国科学) Series C, 2003, 33(2): 169-174.
- [12] Sun X L., Zhang G Y (孙修炼, 张光裕). A comparison of four wide type isolates of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus [J]. Virologica Sinica (中国病毒学), 1994, 9 (4): 309-318.
- [13] Bianchi F J J A, Snoeiijing I, Van der werf W, *et al.* Biological activity of SeMNPV, AcMNPV, and three AcMNPV deletion mutants against *Spodoptera exigua* larvae (Lepidoptera: octuidae) [J]. J Invert Pathol, 2000, 75: 28-35.
- [14] Zuidema D, Klinge-Roode E C, van Lent J W M, *et al.* Construction and analysis of an *Autographa Californica* nuclear polyhedrosis virus mutant lacking the polyhedral envelope [J]. Virology, 989, 70: 187-202.
- [15] Ignoffo C M, Carcia C, Zuidema D, *et al.* Relative *in vivo* activity and simulated sunlight-UV stability of inclusion bodies of a wild-type and an engineered polyhedral envelope negative isolate of the nucleopolyhedrosis virus of *Autographa californica* [J]. J. Invertebr Pathol, 1995, 66: 212-213.
- [16] Volkman L E, Zaal K J M. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, microtubules and replication [J]. Virology, 1990, 175: 292-302.
- [17] Quant-Russell R L, Pearson M N, Rohrmann G F, *et al.* Characterization of baculovirus p10 synthesis using monoclonal antibodies [J]. Virology, 1987, 160: 9-19.