

## 双基因双重组 AcNPV 的构建及其杀虫活性

裴子飞 肖化忠 齐义鹏\* 王福山 朱 应

(武汉大学病毒研究所 武汉 430072)

**摘 要** 质粒 pAcIEneo 携带杆状病毒极早期基因 IE1 启动子驱动的新霉素抗性基因(*neo*),经酶切回收后插入到质粒 pAc34DZ1 的 *Sac*I 位点上,构建成多角体外膜蛋白基因(*pe*)失活的转移载体 pAc34DZ2。我们曾构建了一个多角体完整(*ocu*<sup>+</sup>)的表达苏云金杆菌(*Bt*)截短 *cryIAb* 基因的重组病毒(1) vAcPhBtT。为了改进这一重组病毒的杀虫效率,将转移载体 pAc34DZ2 与重组病毒(1) vAcPhBtT DNA 共转染 Sf9 细胞,进行第二次同源重组。由于 *neo* 基因的表达,用 G<sub>418</sub> 筛选得到重组病毒(2) vAcPhBtTPE<sup>-</sup>;Southern blot 证明 vAcPhBtTPE<sup>-</sup> 的构建是正确的,经 SDS-PAGE 分析,重组病毒(2)仍然能在昆虫细胞中表达 80kD 的 *Bt* 截短毒蛋白,但不表达 34kD 的多角体外膜蛋白。电镜观察重组病毒(2)无多角体外膜,碱解时病毒粒子释放的速度快于重组病毒(1)。以重组病毒(2)感染甜菜夜蛾三龄幼虫,LC<sub>50</sub>比野生型病毒小了接近 1 倍,LT<sub>50</sub>提前近 2d。

**关键词** 重组杆状病毒,多角体外膜基因,苏云金杆菌截短  $\delta$ -内毒素基因,新霉素抗性基因

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0451-06

目前已发现的杆状病毒有 600 种之多,由于其严格的宿主专一性,并对昆虫自然种群的显著杀灭效果,因而在害虫防治中得到优先选用,并成为绿色农业的重要组成部分。但与化学农药相比,杆状病毒具有潜伏期长,杀虫速度慢,杀虫谱窄以及对高龄害虫需用量大等缺点,其应用受到很大限制。自 80 年代以来,随着对杆状病毒基因组结构与功能研究的不断深入,人们开始尝试对杆状病毒的遗传性状进行各种分子生物学改造,以期获得优良的病毒杀虫剂。近年来这方面的研究已取得可喜的进展,各种工程病毒相继出现,如表达 *Bt* 毒蛋白<sup>[1]</sup>及截短 *Bt* 毒蛋白<sup>[2]</sup>,表达蝎神经毒素<sup>[3]</sup>,表达保幼激素<sup>[4]</sup>,利尿激素<sup>[5]</sup>的重组杆状病毒。尽管这些重组病毒杀虫活性有所提高,但多数是从单一因素出发表达外源基因,并且外源基因的表达又是以破坏亲本病毒原有多角体基因为代价,这样,重组病毒产量下降,口服感染昆虫的能力也很低,难与环境中的野生型病毒竞争。研究表明,构建实用型多功能的重组病毒是可行的。若重组病毒中携带有标记基因则有利于其筛选,插入昆虫特异性的毒素基因,又会提高重组病毒的杀虫活性,保留完整的多角体基因,则不会影响重组病毒的感染能力,特别是使其本身的多

角体外膜基因(*pe*)失活,估计可能加快病毒粒子在昆虫肠中的释放,提高感染速度。

在我们<sup>[2]</sup>以前构建的重组病毒 vAcPhBtT(基因型: *ocu*<sup>+</sup>/*Bt-cryIAbT*<sup>+</sup>)基础上,进行第二次同源重组,插入新霉素抗性基因(*neo*)作报道基因并使其 *pe* 基因失活,获得带有多重特性的新的重组病毒,生物毒力测定超过野生型病毒和亲本重组病毒的杀虫效果。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

质粒 pAc34DZ1 带有苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)的多角体外膜基因(*pe*),由荷兰农业大学 Zuidema 博士赠送;携带 AcNPV 极早期基因 IE1 启动子/*neo* 抗性基因表达盒的质粒 pAcIEneo,由本室朱反修等<sup>[6]</sup>构建;pAcPhBtT 带有 *Bt* 截短 *cryIAb* 基因,由本室王福山等<sup>[2]</sup>构建;Sf9 细胞由美国加州大学 Federici 教授赠送;Grace's 培养基、胎牛血清、Lipofectin Reagent 等购自 GIBCO/BRL 公司;限制性核酸酶、T4DNA 连接酶、随机引物标记试剂盒均购于 Promega 公司;甜菜夜蛾幼虫由湖北省农科院提供。

收稿日期:1999-05-06,修回日期:2000-02-14。

基金项目:国家九五攻关课题(96-001-02-04-03)。

\* 联系与负责作者。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取、消化以及连接、转化、杂交鉴定：DNA 的提取、消化以及连接、转化、杂交鉴定等分子生物学操作按常规方法或试剂盒说明书进行。

1.2.2 Sf9 细胞的共转染：待 Sf9 细胞长至单层，倒掉旧培养液，用载体和受体病毒 DNA 与 Lipofectin 复合物覆盖细胞，27℃ 吸附 6~8h，倒出 DNA 与 Lipofectin 复合物，加入新鲜 Grace's 培养基（含 0.035% NaHCO<sub>3</sub>、0.33% 水解乳蛋白、0.33% 酵母提取物、8% 胎牛血清，pH6.2），置 27℃ 培养 7d。

1.2.3 重组病毒的富集纯化：按朱反修等<sup>[6]</sup>叙述的方法用 G<sub>418</sub> 富集重组病毒，即在 25mL 培养瓶中接种 10<sup>6</sup>Sf9 细胞，室温吸附使细胞完全贴壁，按 10<sup>-3</sup>量接种共转染液，加 1mL 新鲜 Crace's 培养基，G<sub>418</sub> 终浓度为 1mg/mL，置 27℃ 培养 4d，逐轮筛选 5 次，最后一轮培养液用于梯度稀释法纯化重组病毒，即将经 G<sub>418</sub> 富集后的重组病毒培养液按 10 倍梯度

稀释至 10<sup>-10</sup>，从 10<sup>-4</sup>稀释度到 10<sup>-10</sup>稀释度依次接种 24 孔培养板中的 Sf9 细胞，置 27℃ 培养 6d。取最后一个有明显 CPE 培养孔中的培养液，再进行如上稀释，重复 3 次，将最后一轮纯化的重组病毒大量接种 Sf9 细胞，获得纯化的重组病毒备用。

1.2.4 Southern blot 和蛋白质的 SDS-PAGE 电泳：用 BglII 分别消化重组病毒(1)和(2)的 DNA，电泳并转膜。按 Promega 公司随机引物标记试剂盒说明书，用 50μci α-<sup>32</sup>PdCTP 标记 1.8kb neo 基因(2μg/mL)为 DNA 探针进行 Southern blot。反复冻融破碎病毒感染细胞，采用 SDS-PAGE 法分析表达蛋白。

1.2.5 多角体碱解及电镜观察：滴加纯化的重组病毒(1)vAcPhBtT 和重组病毒(2)vAcPhBtTPE<sup>-</sup> 的多角体至铜网上，用弱碱(0.1mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>，pH9.9)碱解 0、2、3、5min，电镜观察病毒粒子的释放，同时观察多角体外膜的存在。

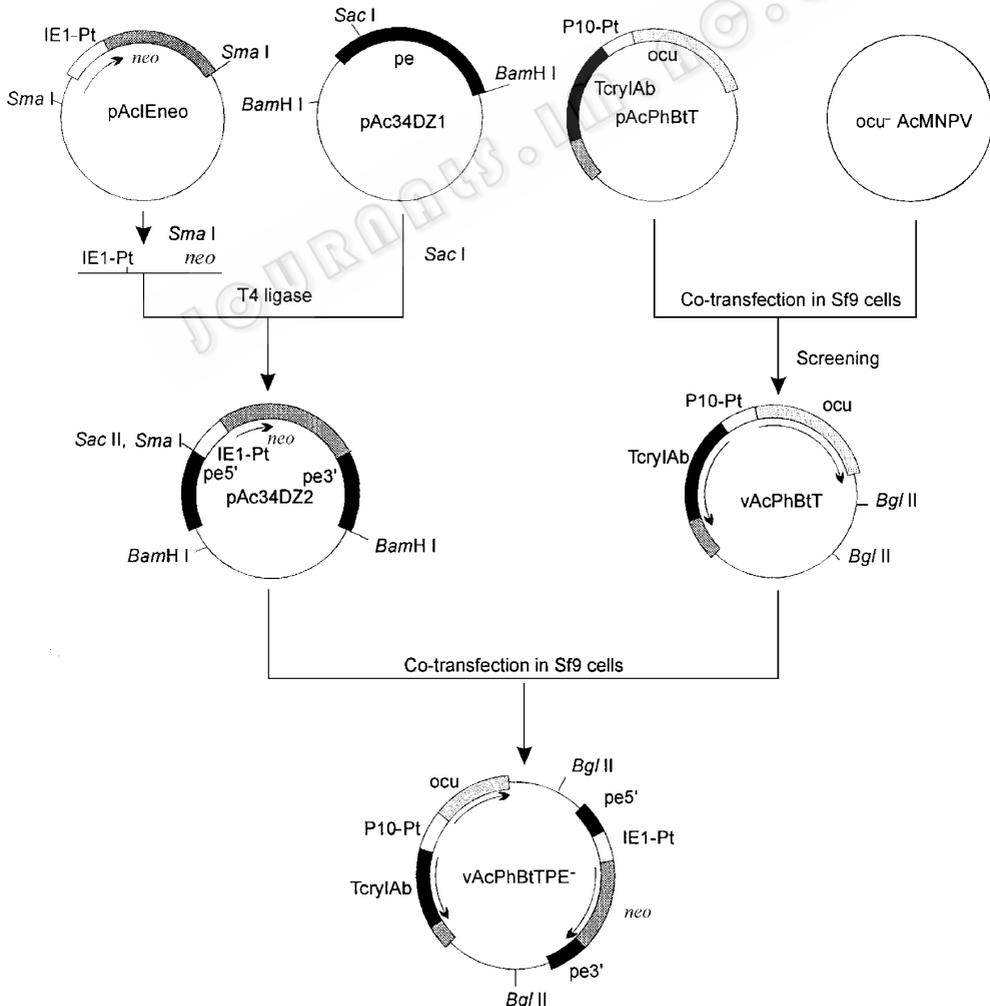


图 1 转移载体和重组病毒的构建

**1.2.6 重组病毒毒力的生物测定：**将重组病毒(2) vAcPhBtTPE<sup>-</sup> 与野生型 AcNPV 的多角体悬液分别混入人工饲料,使两种病毒多角体浓度成如下梯度:  $2 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^2$ ,  $2 \times 10$  PIB/g, 分组饲养 3 龄甜菜夜蛾幼虫。从感染后 3d 起,每天检查病毒感染死亡率,非病毒死亡幼虫不计在内,感染后 9d 结束试验。

## 2 结果及分析

### 2.1 转移载体 pAc34DZ2 的构建

质粒 pAc34DZ1 带有 AcNPV 基因组中 3.45kb 的 *Bam*HI-D 片段,该片段含有多角体外膜蛋白基因(*pe*),在 *pe* 基因内插入了 *LacZ* 片段。用 *Sac*I (切点位于 *LacZ* 片段内)酶切质粒 pAc34DZ1 并用 *E. coli* DNA pol Klenow 片段补平 5'端,用 *Sma*I 酶切质粒 pAcIEneo 并回收 1.8kb 的  $P_{IE1/neo}$  表达盒,与补平 5'端的 pAc34DZ1 连接,得到 12.7kb 的转移载体 pAc34DZ2(图 1)。经酶切证明,重组质粒 pAc34DZ2 比 pAc34DZ1 长 1.8kb(图 2)。

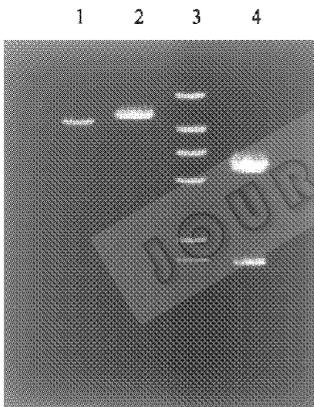


图 2 重组质粒的酶切分析

Fig. 2 Analysis of recombinant plasmid by restriction digestion

1. pAc34DZ1/*Sac*I; 2. pAc34DZ2/*Sma*I  
3.  $\lambda$ DNA/*Hind*III; 4. pAcIEneo/*Sma*I

### 2.2 *pe* 基因失活的重组病毒(2)的构建和鉴定

转移载体 pAc34DZ2 与重组病毒(1) vAcPhBtT DNA 共转染 Sf9 细胞,通过 *pe* 基因 5'端和 3'端的边界序列与重组病毒(1) *pe* 基因区进行第二次同源重组,导致  $P_{IE1/neo}$  表达盒整合到重组病毒基因组中而 *pe* 基因被插入失活,得到 *pe*<sup>-</sup> 的重组病毒(2)(图 1)。用  $G_{418}$  富集及梯度稀释纯化筛选到 vAcPhBtTPE<sup>-</sup>,测得重组病毒(2)的滴度为  $1.25 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL,  $8.63 \times 10^7$  pfu/mL。 *Bgl*II 消化重

组病毒(2)DNA 和 Southern blot 证明,重组病毒(2) DNA 比 vAcPhBtT DNA 少一条 10.5kb 的 *Bgl*II-E 片段。因为这一片段中有外源片段(*neo*-1.8kb、*LacZ*-3.0kb)的插入而加长到 15.3kb,并与 15.2kb 的 *Bgl*II-C 片段相重叠(图 3)。

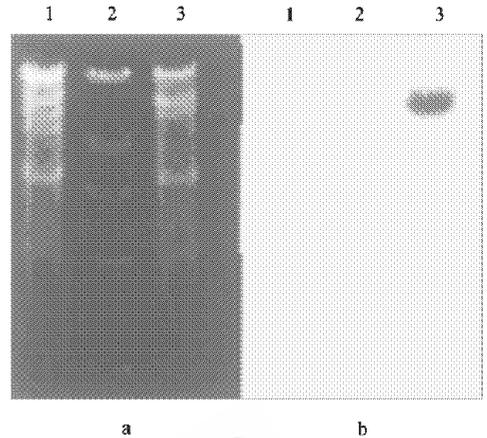


图 3 重组病毒 vAcPhBtTPE<sup>-</sup> 的 DNA 分析

Fig. 3 DNA analysis of recombinant virus vAcPhBtTPE<sup>-</sup>  
a. Analysis of recombinant virus DNA by restriction digestion.

b. Restriction digestion with *Bgl*II and Southern blotting of vAcPhBtTPE<sup>-</sup>

1. vAcPhBtT DNA/*Bgl*II; 2.  $\lambda$ DNA/*Hind*III;

3. vAcPhBtTPE<sup>-</sup> DNA/*Bgl*II

### 2.3 重组病毒表达产物分析

SDS-PAGE 分析重组病毒(2)表达产物,发现在凝胶上 vAcPhBtTPE<sup>-</sup> 缺少 34kD 的多角体外膜蛋白带,而重组病毒(1)和 wt-AcNPV 则能产生此外膜蛋白。*neo* 基因表达产物大小为 29kD<sup>[8]</sup>,重叠于 29kD 的多角体蛋白带内(图 4),用  $G_{418}$  筛选重组病毒时,也可证实重组病毒有 *neo* 产物的表达。

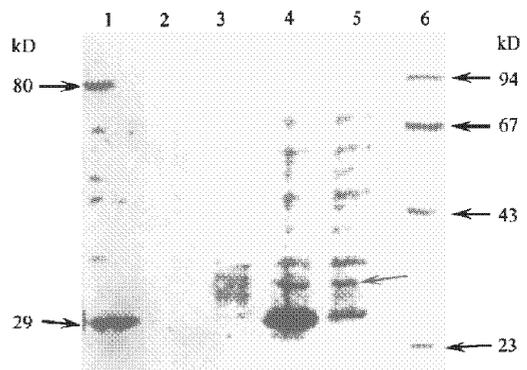


图 4 重组病毒 vAcPhBtTPE<sup>-</sup> 在 Sf9 细胞中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE of the expression product of recombinant baculovirus vAcPhBtTPE<sup>-</sup> in Sf9 cells

1. vAcPhBtTPE<sup>-</sup>; 2~3. Normal cells; 4. wt-AcNPV 5. *ocu*<sup>-</sup> AcNPV;

## 2.4 重组病毒(2)多角体的碱解与病毒粒子释放

通过镜检,发现重组病毒(2)与重组病毒(1)多角体的大小、形态无差别,碱解到 3min 便有病毒粒子从多角体中释放,当碱解至 5min 时已看不见重组病毒(2)的多角体,而此时重组病毒(1)的多角体轮廓开始模糊,逐渐释放病毒粒子(图 5)。因此,在

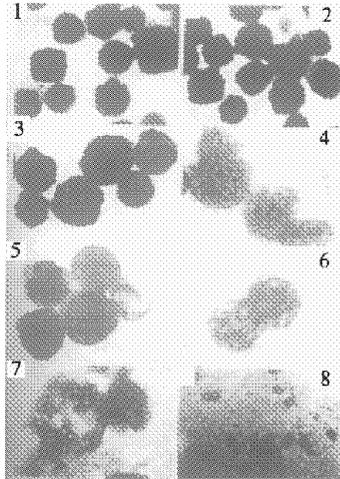


图 5 多角体碱解敏感性分析

Fig. 5 Susceptibility of the Polyhedron to Alkaline

Alkaline lysis of polyhedra at 0 2 3 5 minutes,  
1. 3. 5. 7 for vAcPhBtT 2. 4. 6. 8 for vAcPhBtTPE<sup>-</sup>

同等条件下重组病毒(2)的碱解与病毒粒子释放显著快于重组病毒(1)。将两种重组病毒多角体制片,电镜观察,发现 vAcPhBtT 多角体外围有一层明显的外膜,而 vAcPhBtTPE<sup>-</sup> 无此外膜(图 6)。这是重组病毒(2)碱解和病毒粒子释放加快的直接原因。

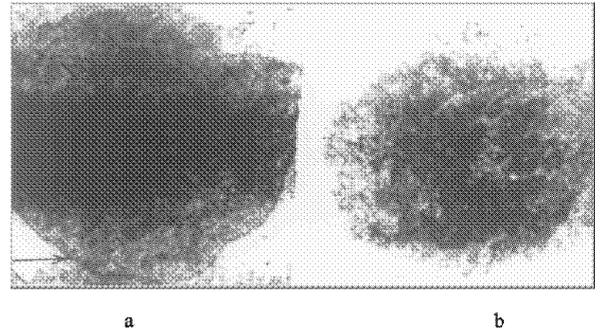


图 6 多角体外膜的电镜观察

Fig. 6 Envelopes of Polyhedra Under Electron Microscope

a. vAcPhBtT (with envelope)

b. vAcPhBtTPE<sup>-</sup> (without envelope)

## 2.5 重组病毒毒力的生物测定

用甜菜夜蛾幼虫测定重组病毒(2) vAcPhBtTPE<sup>-</sup> 及野生型 wt-AcNPV 的毒力结果见表 1。

表 1 重组病毒(2)毒力的生物测定

Table 1 Bioassay of the toxicity of recombinant baculovirus(II)

| Concentration ( PIB/g ) |                 | Larvae number |      | Mortality / % |      | Adjusted mortality / % |      |
|-------------------------|-----------------|---------------|------|---------------|------|------------------------|------|
| rvAc                    | wtAc            | rvAc          | wtAc | rvAc          | wtAc | rvAc                   | wtAc |
| $2 \times 10^5$         | $2 \times 10^5$ | 60            | 60   | 86.4          | 85.0 | 86.0                   | 84.5 |
| $2 \times 10^4$         | $2 \times 10^4$ | 60            | 60   | 67.4          | 59.0 | 64.3                   | 57.7 |
| $2 \times 10^3$         | $2 \times 10^3$ | 60            | 60   | 51.7          | 49.8 | 50.2                   | 48.3 |
| $2 \times 10^2$         | $2 \times 10^2$ | 60            | 60   | 32.0          | 24.3 | 29.9                   | 25.1 |
| $2 \times 10$           | $2 \times 10$   | 60            | 60   | 18.9          | 14.7 | 16.4                   | 12.9 |
| 0                       |                 | 80            |      | 3.0           |      |                        |      |

rvAc : Recombinant baculovirus ; wtAc : wt-AcNPV

根据表 1 数据计算重组病毒(2)与野生型病毒的  $LC_{50}$  结果见图 7。

从图 7 得到的重组病毒(2)的  $LC_{50}$  为 2055 PIB/g 其 95% 置信范围 982 ~ 4302 PIB/g, 野生型病毒的  $LC_{50}$  为 3673 PIB/g, 其 95% 置信范围 1817 ~ 7440 PIB/g; 根据表 1 进行关于不同浓度与不同病毒杀虫剂下死亡数的双因素方差分析, 结果表明不仅不同浓度间存在极显著差异, 而且不同病毒间亦具有显著性差异 ( $p = 0.05$ )。

当感染剂量为  $2 \times 10^4$  PIB/g 时, 重组病毒(2)与野生型 wt-AcNPV 病毒的死亡历程见表 2。

表 2  $2 \times 10^4$  PIB/g 感染时幼虫的死亡率 (%)

Table 2 Mortality rate of larva under  $2 \times 10^4$  PIB/g %

| Date                    | Third | Fourth | Fifth | Sixth | Seventh | Eighth | Ninth |
|-------------------------|-------|--------|-------|-------|---------|--------|-------|
| VacPhBtTPE <sup>-</sup> | 21.7  | 38.3   | 51.7  | 53.5  | 58.3    | 63.3   | 67.4  |
| wt-Ac NPV               | 0.0   | 10.0   | 25.0  | 45.7  | 51.7    | 53.3   | 59.0  |

据表 2 计算  $LT_{50}$  的结果见图 8, 重组病毒(2)的

LT<sub>50</sub>为 5.6d,其 95% 置信范围为 4.9~6.4d,野生型病毒的 LT<sub>50</sub>为 7.3d,其 95% 置信范围为 7.0~7.6d,根据表 2 进行关于不同日期与不同病毒下死亡数的双因素的方差分析,其结果也表明不同病毒

间有显著性差异( $p=0.05$ )。因此,重组病毒(2)由于截短 *cryIAb* 基因的表达和 *pe* 基因的失活,其对甜菜夜蛾幼虫的毒力比 wt-AcNPV 明显提高,杀虫速度明显加快。

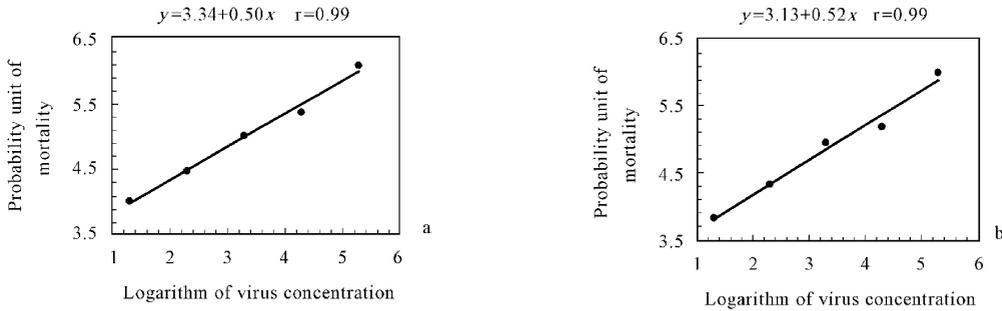


图 7 LC<sub>50</sub>的计算

Fig. 7 Calculate of LC<sub>50</sub>

a. vAcPhBtTPE<sup>-</sup> b. wt-AcNPV

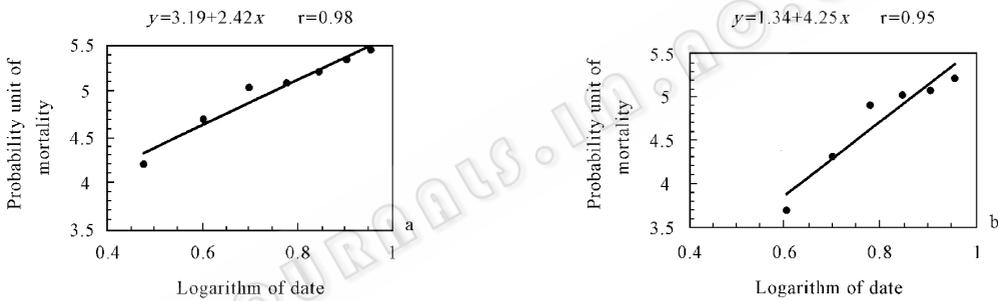


图 8 LT<sub>50</sub>的计算

Fig. 8 Calculate of LT<sub>50</sub>

a. vAcPhBtTPE<sup>-</sup> b. wt-AcNPV

### 3 讨 论

构建集几方面优点于一体的重组病毒,从而提高其杀虫效果,扩大其杀虫谱,代表着当今生物杀虫剂研究的新方向。vAcPhBtT 是我们<sup>[2]</sup>以前构建的一个携带 Bt *cryIAB* 截短基因的重组病毒(1)。实验证明,它既能表达 C-半端(651~1180aa)截短又保留 N-半端(1~650aa)毒性区的毒蛋白,又能产生多角体,便于口服感染害虫。毒力测定表明,vAcPhBtT 对甜菜夜蛾的致死率明显高于 wt-AcNPV。为了进一步提高杀虫速度,我们构建了一个转移载体 pAc34DZ2,其中在多角体外膜基因(*pe*)内的 *LacZ* 基因区域插入了一个由极早期基因 *IE1* 启动子驱动新霉素抗性基因(*neo*)的表达盒,经与重组病毒(1)第二次共转染,在 *pe* 基因位相发生第二次同

源重组,使 *pe* 基因和 *LacZ* 基因被插入失活。由于 *neo* 基因表达可用 G<sub>418</sub> 富集与筛选<sup>[8]</sup>,多代有限稀释得到重组病毒(2)vAcPhBtTPE<sup>-</sup>。*Pe* 基因是杆状病毒复制的非必需基因<sup>[9]</sup>,缺失 *pe* 基因的杆状病毒仍能复制,但形成的多角体无外膜,以这样的重组病毒感染昆虫,在昆虫中肠的碱性环境中病毒粒子释放速度加快,我们用体外碱解多角体很好地证明了这一点,电镜观察发现,vAcPhBtTPE<sup>-</sup>的多角体的确无外膜。以重组病毒(2)vAcPhBtTPE<sup>-</sup>口服感染三龄甜菜夜蛾幼虫,其 LC<sub>50</sub>(2056PIB/g)比 wt-AcNPV 低了接近 1 倍,LT<sub>50</sub> 提早近 2d,因此 vAcPhBtTPE<sup>-</sup> 的较高毒力即是截短 *cryIAb* 基因表达的结果,显然也与多角体外膜缺失造成的病毒粒子快速释放有关。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Qi Y P ,Huang Y X ,Shen Y *et al.* *Chinese Science Bulletin* ,1994 ,**39**( 5 ) :424~429
- [ 2 ] 王福山 ,黄永秀 ,齐义鹏等. *科学通报* ,1995 ,**40**( 20 ) :1896~1900
- [ 3 ] Nor Chejanovsky ,Noam Zilberberg ,Hadasah Rivkin *et al.* *FEBS Letter* ,1995 ,**376** :181~184
- [ 4 ] Hammock B D ,Bonning B C ,Possee R D *et al.* *Nature* ,1990 ,**334** :458~461
- [ 5 ] Maeda S. *Biochem Biophys Res Commun* ,1989 ,**165** :1177~1183
- [ 6 ] 朱反修 ,黄永秀 ,齐义鹏. *微生物学报* ,1995 ,**35**( 3 ) :155~160
- [ 7 ] Mark A. Cochran ,Eric B. Carstens ,Bryan Y. Eaton *et al.* *Journal of Virology* ,1982 ,**41**( 3 ) :940~946
- [ 8 ] Jarvis D L ,Fleming J O ,Kovacs C R *et al.* *Bio/Technology* ,1990 ,**8**( 2 ) :950~955
- [ 9 ] Zuidema D ,Klinge-roode E ,Jan W M. *Virology* ,1989 ,**173** :98~108

## Construction and Bioassay of Secondary Recombinant Baculovirus with Two Foreign Gene

PEI Zi-Fei XIAO Hua-Zhong QI Yi-Peng WANG Fu-Shan ZHU Ying  
( *Institute of Virology ,Wuhan University ,Wuhan 430072* )

**Abstract** Plasmid pAcLEneo which bears neomycin gene driven by the baculovirus IE1 promotor was digested and the gene was harvested. A transfer vector pAc34DZ2 in which the polyhedrin envelope gene has been inactivated by insertion of expression cassette of P<sub>IE1/neo</sub> was constructed by inserting the neo cassette into the Sac I site of plasmid pAc34DZ1. We have constructed the polyhedrin positive recombinant virus( I ) vAcPhBtT which was able to express Bt truncated endotoxin gene. In order to improve the insecticide efficiency of recombinant virus( I ) ,an anti-neomycin recombinant virus( II ) vAcPhBtTPE<sup>-</sup> was obtained by second co-transfection into the Sf9 cells with pAc34DZ2 and recombinant virus( I ) DNA. Southern blot and SDS-PAGE analysis indicated that the recombinant virus( II ) was still able to express the 80kD Bt truncated  $\delta$ -endotoxin but did not express the 34kD polyhedrin envelope protein. The recombinant virus( II ) without envelope released virion faster than recombinant virus( I ) after alkaline lysis. Bioassay was carried out using *Spodoptera exigua* . LC<sub>50</sub> of the recombinant virus( II ) was about half of wild type virus and LT<sub>50</sub> reduced about two days.

**Key words** Recombinant baculovirus ,polyhedrin envelope gene ,Bt truncated  $\delta$ -endotoxin gene ,neomycin gene