

韩光杰, 赵 松, 刘 琴, 等. PuGV-Ps 增效蛋白质基因特征及其整合载体的构建[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2): 279-284.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.02.009

## PuGV-Ps 增效蛋白质基因特征及其整合载体的构建

韩光杰<sup>1</sup>, 赵 松<sup>2</sup>, 刘 琴<sup>1</sup>, 李传明<sup>1</sup>, 徐 健<sup>1</sup>

(1. 江苏里下河地区农业科学研究所, 江苏 扬州 225007; 2. 江苏省血吸虫病防治研究所, 江苏 无锡 214064)

**摘要:** 为了明确增效蛋白质基因特性, 获得重组增效苏云金杆菌, 本试验通过生物信息学方法分析了转宿主东方粘虫颗粒体病毒(PuGV-Ps)增效蛋白质基因(*En*)的特征及二级结构, 利用 In-fusion 技术构建了整合载体。基于 PuGV-Ps 增效蛋白质基因进化树显示, 颗粒体病毒与多角体病毒为 2 个明显的分支, 美洲粘虫颗粒体病毒(PuGV)与转宿主东方粘虫颗粒体病毒的增效蛋白质基因遗传距离极小。6 种颗粒体病毒增效蛋白质氨基酸序列比对结果显示, 增效蛋白质 N 端相似性较高, 均含有锌离子结构域(244 位)与催化域(526 ~ 565 位); 增效蛋白质基因二级结构中  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲占整个片段的 73%, 且 N 端以不规则卷曲为主; 利用改进的 In-fusion 技术构建整合载体, 双酶切结果显示增效蛋白质基因连接方向正确, pLTV<sub>1</sub>-*En* 构建成功; 通过高温整合获得重组工程菌 Bt71En。表明, PuGV-Ps 与 PuGV 增效蛋白质基因同源性较高, 其二级结构复杂, 影响载体构建, 通过高温处理连接片段可以明显提高载体的连接效率。

**关键词:** 转宿主粘虫颗粒体病毒; 增效蛋白质; 整合载体

**中图分类号:** S182 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)02-0279-06

## Characteristics of enhancin gene from *Pseudaletia unipuncta* granulovirus-Ps and construction of its integration vector

HAN Guang-jie<sup>1</sup>, ZHAO Song<sup>2</sup>, LIU Qin<sup>1</sup>, LI Chuan-ming<sup>1</sup>, XU Jian<sup>1</sup>

(1. Institute of Agricultural Science of the Lixiahe District in Jiangsu Province, Yangzhou 225007, China; 2. Jiangsu Institute of Parasitic Disease, Wuxi 214064, China)

**Abstract:** The characteristics of enhancin gene from *Pseudaletia unipuncta* granulovirus-Ps (PuGV-Ps) and the influence of secondary structure on construction of integration vector were analyzed by bioinformatics in this study. The granulosis virus and polyhedrosis virus were grouped into two clades based on the structure of enhancin gene, and there was an extremely short genetic distance of enhancin between PuGV-Ps and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus (PuGV), suggestive a high similarity. N-terminal of enhancin gene from different granuloviruses were highly similar, all including zinc-binding domain (244) and catalytic domain (526–565). The alpha helix and random coil in the complete enhancin gene accounted for 73%

收稿日期: 2014-09-25

**基金项目:** 公益性行业(农业)科研专项(201103021); 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(13)5069 ]; 江苏省自然科学基金项目( BK20141283 ); 江苏省农业科技支撑计划项目( BE2014361 ); 江苏省农业三新工程项目[ SXGC(2013)256 ]; 扬州市农业科技攻关项目(2012095)

**作者简介:** 韩光杰(1987-), 男, 安徽桐城人, 硕士, 研究实习员, 主要从事农业害虫生物防治研究。(Tel) 0514-87302019; (E-mail) hanguangjie177@163.com

**通讯作者:** 徐 健, (E-mail) bio-xj@163.com

of the secondary structure, and the random coil dominated N-terminal. The integration vector of pLTV<sub>1</sub>-*En* successfully constructed by improved technology of In-fusion was used to produce recombinant Bt71En, and the connection efficiency could be improved by high temperature.

**Key words:** *Pseudaletia unipuncta* granulovirus-Ps; enhancin; integration vector

转宿主东方粘虫颗粒体病毒(PuGV-Ps)是由美

洲粘虫颗粒体病毒(*Pseudaletia unipuncta* granulovirus, PuGV)感染东方粘虫幼虫而来<sup>[1]</sup>,其含有的增效蛋白质,具有金属蛋白酶活性,能降解昆虫中肠围食膜肠粘蛋白质<sup>[2-3]</sup>;增加围食膜基质网孔径<sup>[4]</sup>,从而促进其他病毒或毒素蛋白质侵入中肠组织<sup>[5-7]</sup>。随着研究的深入,增效蛋白质在多角体病毒<sup>[8]</sup>、痘病毒<sup>[9]</sup>、共生性病原微生物<sup>[10]</sup>等多种微生物中都有发现,它们共同的特征是含有锌离子结构域,在降解肠粘蛋白质中发挥重要的作用。颗粒体病毒增效蛋白质是基因编码的一类新蛋白质,已有多个增效蛋白质基因被克隆,其表达产物可以显著提高棉铃虫核型多角体病毒,苏云金杆菌<sup>[11]</sup>、阿维菌素<sup>[12]</sup>等作用效果,显示其广泛的应用前景。

pLTV<sub>1</sub>是含有 Tn917 转座子和 pET194Ts 温度敏感复制子的转座载体,在 39 °C 以上质粒不能自主复制<sup>[13]</sup>;该载体具有随机整合功能,对增效蛋白质整合位点选择偏好性的研究具有重要的作用。但由于其质粒偏大(质粒大小为 20 600 bp)且多克隆位点有限,在应用上具有一定的局限性。DNA 的连接效率与 DNA 分子的长度和分子中随机卷曲区段的 DNA 长度是相关的<sup>[14]</sup>,大片段的二级结构,特别是卷曲程度对连接效率具有较大影响。谭德勇等<sup>[15]</sup>提出利用二次连接法提高重组质粒的连接效率具有一定可行性;余健秀等<sup>[16]</sup>从 pLTV<sub>1</sub> 必须区 *tnpA* 基因的序列中选择粘性末端的限制性内切酶酶切位点作为插入位点并成功转座了 *cryIIA* 与 *cytIA* 基因,但转座效率下降。In-fusion HD 试剂盒由 Clontech 公司研发<sup>[17]</sup>,它克服了大片段连接中酶切位点和二级结构的影响;李玲玲等<sup>[18]</sup>利用优化的 In-fusion 连接技术成功构建了  $1 \times 10^4$ 、 $8 \times 10^3$ 、 $4 \times 10^3$  的真核表达载体。本试验在分析粘虫颗粒体病毒增效蛋白质基因特性的基础上,以 pLTV<sub>1</sub> 为转座质粒通过改进的 In-fusion 技术构建 PuGV-Ps 增效蛋白质基因整合载体,为大片段载体的构建提供方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

转宿主东方粘虫颗粒体病毒(PuGV-Ps)的获得:美洲粘虫颗粒体病毒(PuGV)由中国科学院动物研究所提供,室内饲养东方粘虫为宿主转接 PuGV,收集感染死亡幼虫匀浆后经差速离心纯化而获得<sup>[19]</sup>;提取病毒基因组,扩增增效蛋白质基因

(*En*),构建表达载体 pET15b-*En*<sup>[11]</sup>;苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis* subsp. *kustaki*) Bt2671 为江苏里下河地区农业科学研究所生物农药研究室保存菌种。

质粒提取试剂盒, *Taq* 酶购自 Promega 公司;内切酶购自 Fermentas 公司;In-flusion 试剂盒购自 TaKaRa 公司;质粒 pLTV<sub>1</sub> 购自美国,保存于枯草芽孢杆菌<sup>[13]</sup>,其大小为 20 600 bp,结构如图 1。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 PuGV-Ps 增效蛋白质基因的克隆与分析

PuGV-Ps 增效蛋白质基因的克隆见文献[11],利用 GeneDoc 软件比对分析增效蛋白质序列,利用 MEGA5.0 分析增效蛋白质进化关系,利用 GOR([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_gor4.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html))在线分析增效蛋白质二级结构。

1.2.2 含增效蛋白质基因转座载体的构建 通过对增效蛋白质基因酶切位点与转座载体多克隆位点对分析发现,仅有 *Sma* I 酶切位点可用。利用 In-Fusion 方法构建转座载体,设计引物 infusion\_1: 5'-AGAATTTCGAGCTCGGTACC CGGG ATGTCGTACAAAGT GATTGTACCCGCT-3', infusion\_2: 5'-GTCCGACTCTA GAGGATCCCC GGG TGAACGTTATTAGAACGCTATCAT T-3',斜体部分为融合片段接头端 20 bp 序列,下划线为 *Sma* I 酶切位点。以 pET15b-*En* 为模板扩增转座增效蛋白质基因(*En*),提取质粒 pLTV<sub>1</sub> 并使用 *Sma* I 单酶切(图 1),将 *En* 与酶切过的 pLTV<sub>1</sub> 以 10:1 (质量比)的比例混合,65 °C 处理 10 min,冰浴 1 min 后加入 2  $\mu$ l 5X In-Fusion HD Enzyme Premix 混合均匀,50 °C 反应 15 min。将连接反应液转化大肠杆菌 Top10,37 °C 培养过夜后检测转化子。

1.2.3 转座载体 pLTV1-*En* 电击转化苏云金杆菌 Bt2671 苏云金杆菌感受态的制备与电击转化参照文献[20],红霉素使用浓度为 15  $\mu$ g/ml。电穿孔仪为 Bio-Rad 的 Gene pulserXcell,电脉冲杯为 Bio-Rad 产品。

1.2.4 转座整合 将转化成功菌株转移至无抗 LB 培养基中,提高生长温度至 42 °C,以消除重组质粒,每生长 8 h 转接 1 次,共转接 3 次。稀释涂无抗 LB 培养基上,将单菌落分别点种在四环素与红霉素平板上,选择对四环素敏感且对红霉素抗性的菌落,即为发生转座整合的重组子。

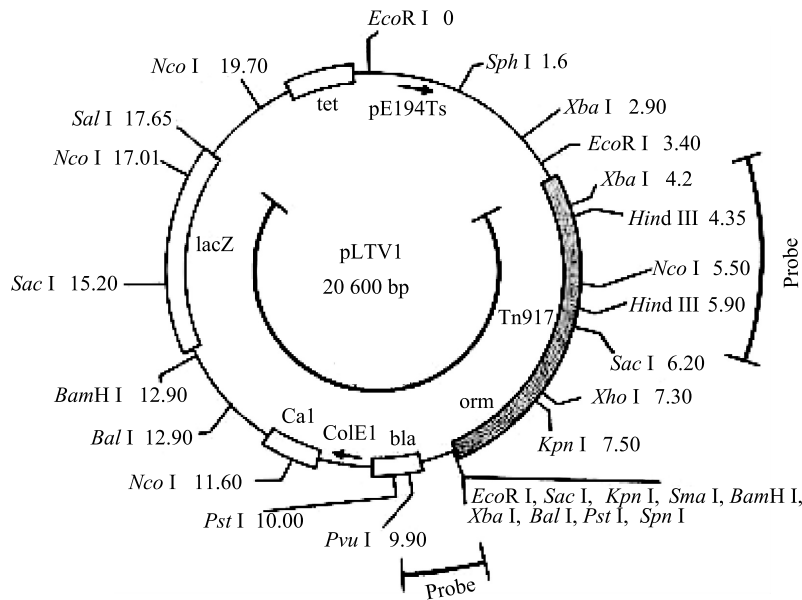


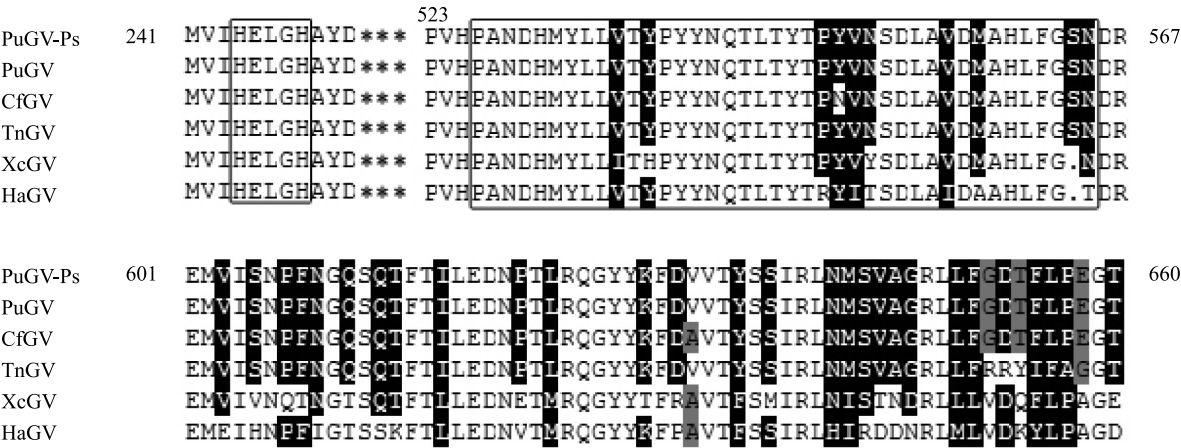
图 1 质粒 pLTV1 酶切图谱  
Fig.1 Restriction map of plasmid pLTV1

2 结果与分析

2.1 增效蛋白质氨基酸序列分析

根据 PuGV-Ps 增效蛋白质基因的测序结果显示,发现其与美洲粘虫颗粒体病毒增效蛋白质基因同源性达 99.59%,主要突变发生在 N 端 500 bp 以内<sup>[11]</sup>。通过与云杉卷叶蛾颗粒体病毒 (CfGV)、棉

铃虫颗粒体病毒 (HaGV)、美洲粘虫颗粒体病毒 (PuGV)、粉纹夜蛾颗粒体病毒 (TnGV)、八字地老虎颗粒体病毒 (XcGV) 增效蛋白质序列比对结果 (图 2) 发现,其锌离子结构域 244 位完全相同;锌离子催化域在 526 ~ 565 位。增效蛋白质前 600 位的氨基酸变异较少,在 600 位以后,不同病毒的氨基酸位点变异频率较大。



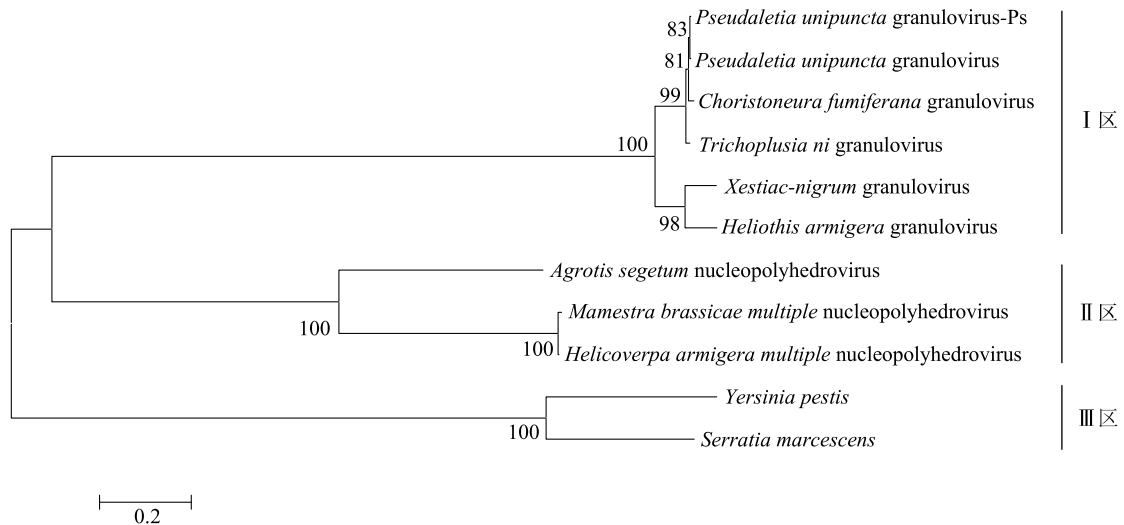
PuGV-Ps:转宿主东方粘虫颗粒体病毒;PuGV:美洲粘虫颗粒体病毒;CfGV:云杉卷叶蛾颗粒体病毒;TnGV:粉纹夜蛾颗粒体病毒;XcGV:八字地老虎颗粒体病毒;HaGV:棉铃虫颗粒体病毒。长方形框分别代表锌离子结构域(244 ~ 248 位)和催化域(526 ~ 565 位)。

图 2 不同颗粒体病毒增效蛋白质序列比对  
Fig.2 Alignment of enhancin from granulosis viruses

## 2.2 PuGV-Ps 增效蛋白质进化树分析

通过 NCBI 查找部分微生物增效蛋白基因, 利用 MEGA 5.0 软件分析其进化关系。结果(图 3)显示, 颗粒体病毒增效蛋白质都聚在 I 区, 多角体病毒增效蛋白质聚在 II 区, 鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)与粘氏沙雷氏菌(*Serratia*

*marcescens*) 聚在 III 区, 说明颗粒体病毒与多角体病毒增效蛋白质存在一定的差异, 但其内部差异较小; 美洲粘虫颗粒体病毒与转宿主东方粘虫颗粒体病毒增效蛋白质聚在一起, 且遗传距离极小。



*Pseudaletia unipuncta granulovirus-Ps*: 转宿主东方粘虫颗粒体病毒; *Pseudaletia unipuncta granulovirus*: 美洲粘虫颗粒体病毒; *Choristoneura fumiferana granulovirus*: 云杉卷叶蛾颗粒体病毒; *Trichoplusia ni granulovirus*: 粉纹夜蛾颗粒体病毒; *Xestia-nigrum granulovirus*: 八字地老虎颗粒体病毒; *Heliothis armigera granulovirus*: 棉铃虫颗粒体病毒; *Agrotis segetum nucleopolyhedrovirus*: 黄地老虎核型多角体病毒; *Mamestra brassicae multiple nucleopolyhedrovirus*: 甘蓝夜蛾核型多角体病毒; *Helicoverpa armigera multiple nucleopolyhedrovirus*: 棉铃虫核型多角体病毒; *Yersinia pestis*: 鼠疫耶尔森氏菌; *Serratia marcescens*: 粘氏沙雷氏菌。

图 3 基于增效蛋白质基因的微生物进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of animalcules based on the enhancin gene

## 2.3 PuGV-Ps 增效蛋白质基因的二级结构

对增效蛋白质基因的二级结构进行分析, 结果发现增效蛋白质基因  $\alpha$  螺旋占 20.4%,  $\beta$  折叠占 27.0%, 无规则卷曲占 52.6%,  $\alpha$  螺旋与无规则卷曲已经占整个片段的 73%, 同时在增效蛋白质基因的 N 端均以  $\alpha$  螺旋与不规则卷曲存在。

## 2.4 In-fusion 技术构建增效整合载体

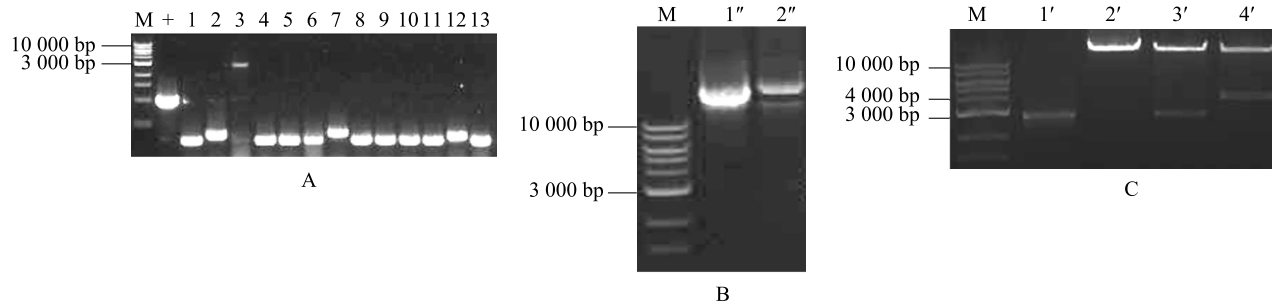
In-fusion 克隆技术利用插入的目的 DNA 片段与载体末端的 15 个同源碱基序列的定向融合, 进行无缝克隆, 不受限制性内切酶酶切位点的限制。利用该技术, 将连接产物转化大肠杆菌 Top10, 在 Top10-3 转化子中, 成功扩增到目的基因(图 4A)。通过转接提取该菌株质粒, 发现其比原始质粒略大(图 4B), 利用 *Sma* I 内切酶酶切

质粒, 2 条片段的大小分别与原始质粒 pLTV1 和增效蛋白质基因大小吻合, 利用 *Xho* I-*Nhe* I 双酶切, 重组质粒可被切成 2 条带(图 4C), 说明连接的片段大小与方向均正确, 整合载体 pLTV1-*En* 构建成功。

未使用高温处理连接片段, 连接后涂布平板, 有 13 个转化子, 通过 PCR 检测, 只有 1 个阳性克隆子; 使用 65 °C 处理后, 共有 162 个转化子, 挑取其中 30 个转化子, 检测到 18 个阳性克隆。

将质粒 pLTV1-*En* 电击转化 Bt 感受态, 在 15  $\mu$ g/ml 红霉素抗性压力下, 成功筛选到转化子 Bt71*En*, 将 Bt71*En* 菌株在 42 °C、250 r/min 摇床内进行质粒重组, 筛选到多株对红霉素抗性而对四环素敏感的重组子。





A:转化子的筛选;B:质粒的检测;C:转座载体的验证。M:Marker;+:*cryIA* 基因(阳性对照);1~13:单菌落(其中3为转化子 Top-3);1'':pLTV1;2'':pLTV1-*En*;1':*En*;2':*Sma* I 单酶切 pLTV1;3':*Sma* I 单酶切 pLTV1-*En*;4':*Xho* I-*Nhe* I 双酶切 pLTV1-*En*。

图4 转座载体的构建及检测

Fig.4 Construction of transposon vector and its detection

### 3 讨论

转宿主粘虫颗粒体病毒增效蛋白编码 901 个氨基酸,表达蛋白质分子量为 104 400。与美洲粘虫颗粒体病毒增效蛋白质相比,仅在 N 端上游有 4 个突变,相似率达 99.6%<sup>[11]</sup>,进化树分析也显示两者遗传距离极小,其宿主病毒的增效蛋白未发生明显变异。通过与其他颗粒体病毒增效蛋白质序列比对发现,它们都含有锌离子结合域与催化域,N 端变异较小。另有研究结果表明,增效蛋白质不仅具有金属蛋白质酶活性<sup>[2]</sup>,还有可能具有介导病毒粒子侵袭的作用<sup>[8]</sup>。

众多研究者均已证明,增效蛋白质的表达产物<sup>[1,6,12]</sup>,或截短优化片段的表达产物<sup>[21-22]</sup>都具有一定的增效作用。将增效蛋白质基因整合到苏云金杆菌基因组,对增效蛋白质插入位点偏好性的研究具有重要作用。本研究利用 Tn917 转座子载体 pLTV<sub>1</sub> 作为整合载体,以随机转座的方式筛选可以正常表达增效蛋白质的重组工程菌,提高原始菌株毒力水平。由于 pLTV<sub>1</sub> 载体质粒偏大,且酶切位点有限,选用的 *Sma* I 为平末端限制性内切酶,给整合载体的构建带来一定的困难。利用二次连接法构建载体也并未成功,但是一次连接的电泳分析发现,虽然增效蛋白质基因未能与载体连接,但其大小发生一定的变化,很有可能连接反应液使增效蛋白质基因的二级结构发生了改变,这种不稳定因素给载体构建也带来了不可预知性。DNA 的连接效率与 DNA 分子的长度和分子中随机卷曲区段的 DNA 长度是相关的<sup>[14]</sup>,基于 GOR 方法<sup>[23]</sup>,本试验分析了

增效蛋白质基因的二级结构,发现其  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲占整个片段的 73%,特别是 N 端的长距离卷曲对载体的构建具有很大影响,如此多的不规则卷曲很有可能在连接反应液中继续发生,从而增加二级结构的复杂性。

In-fusion 作为定向融合技术,不受限制性内切酶酶切位点的限制,连接效率高而被广泛应用<sup>[17-18]</sup>。它对于大质粒大片段的构建具有一定优势,但受二级结构的影响,其连接效率仍然较低且错配率较大。本研究通过增加融合片段引物长度至 20 bp,使用 65 °C 预处理载体和片段,其连接效率提升了 10 倍。同时,本研究室其他实验中还发现多片段克隆技术稳定性不够,我们尝试过使用多片段克隆技术构建整合载体 PSK,未能成功。利用普通连接法将其他片段连接到载体 PSK 后,在利用 In-fusion 技术连接增效蛋白质基因,可以成功构建整合载体。

### 参考文献:

- [1] 刘强,丁翠. 粘虫颗粒体病毒及其增效因子对粘虫核型多角体病毒的增效作用[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5 (3):300-304.
- [2] WANG P, GRANADOS R R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94: 6977-6982.
- [3] TOPRAK U, HARRIS S, BALDWIN D, et al. Role of enhancer in *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus virulence: selective degradation of host peritrophic matrix proteins[J]. Journal of General Virology, 2012, 93: 744-753.
- [4] PENG J, ZHONG J, GRANADOS R. A baculovirus enhancer al-

- ters the permeability of a mucosal midgutperitrophic matrix from lepidopteranlarvae[J]. Journal of Insect Physiology, 1999, 45: 159-166.
- [5] 刘 琴,马谈斌,祁建杭,等. 苏云金杆菌毒素蛋白和粘虫颗粒体病毒对甜菜夜蛾中肠围食膜的破坏作用[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(2):182-187.
- [6] 丁 翠,邓 塔,蔡秀玉. 粘虫颗粒体病毒的增效因子提高杆状病毒的感染[J]. 昆虫学报, 1995, 38(4):407-413.
- [7] WANG P, HAMMER D, GRANADOS R. Interaction of *Trichoplusia* granulosis virus-encoded enhancin with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteraninsects[J]. Journal of General Virology, 1994, 75:1961-1967.
- [8] HOOVER K, HUMPHRIES M, GENDRON A, et al. Impact of viral enhancin genes on potency of *Lymantriadispar* multiple nucleopolyhedrovirus in *L. dispar* following disruption of the peritrophic-matrix[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2010, 104: 150-152.
- [9] MITSUHASHI W, KAWAKITA H, MURAKAMI R, et al. Spindles of an entomopoxvirus facilitate its infection of the host insect by disrupting the peritrophicmembrane[J]. Journal of Virology, 2007, 81(8): 4235-4243.
- [10] NAKJANG S, NDEH D A, WIPAT A, et al. A novel extracellular metallopeptidase domain shared by animal host-associated mutualistic and pathogenic microbes [J]. Plos One, 2012, 7(1): e30287.
- [11] 徐 健,赵 松,刘 琴,等. 转宿主粘虫颗粒体病毒(PuGV-Ps)增效蛋白基因的克隆表达及活性[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(3): 389-394.
- [12] 袁哲明,孟小林,刘树生. 昆虫病毒重组增效蛋白的广谱增效活性[J]. 中国生物防治, 2004, 20(1): 31-33.
- [13] YOUNGMAN P J, PERKINS J B, LOSICK R. Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon Tn917[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1983, 80(8): 2305-2309.
- [14] SAMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆试验指南[M]. 3 版. 黄培堂,译. 北京: 科学出版社, 2006:25-107.
- [15] 谭德勇,邓双胜,孟 玲,等. 改善大分子质粒 DNA 重组效率的新方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(3):281-283.
- [16] 余健秀,庞 义,李建华,等. 利用转座子 Tn917 构建杀虫 Bt 工程菌[J]. 中山大学学报, 1999, 38(4):52-57.
- [17] 刘 超,汤 斌,曾 杨,等. In-Fusion 技术构建 I 型钠通道与红色荧光蛋白共表达载体及其突变载体[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(11):1908-1910.
- [18] 李玲玲,张 伟,宋玲珍,等. In-fusion 连接技术优化及其在大片段重组载体构建中的应用[J]. 动物医学进展, 2014, 35(5):1-7.
- [19] 刘 强,丁 翠. 粘虫颗粒体病毒及其增效因子对粘虫核型多角体病毒的增效作用[J]. 应用与环境生物学报, 1999, 5(3):300-304.
- [20] 乐超银,孙 明,陈守文,等. 利用整合载体构建苏云金芽孢杆菌杀虫工程菌[J]. 遗传学报, 2003, 30(8):737-742.
- [21] 欧 洋,孟小林,徐进平. 棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白基因 2.1 kb 片段在大肠杆菌中的表达[J]. 生物工程学报, 2000, 16(5):595-597.
- [22] 刘 平,孟小林,徐进平,等. 粉纹夜蛾颗粒体病毒增效因子 C-末端片段的克隆表达及其生物活性初步测定[J]. 中国生物防治, 1999, 15(4):188-189.
- [23] QIAN N, SEJNOWSKI T. Predicting the secondary structure of globular proteins using neural network models[J]. Journal of Molecular Biology, 1988, 202:865-884.

(责任编辑:袁 伟)