

AcMNPV 介导 *BmK* IT 和组织蛋白酶协同表达 对 Sf9 细胞凋亡的分析

赵 洁,梁爱华,付月君

(山西大学 生物技术研究所,化学生物学与分子工程教育部重点实验室,山西 太原 030006)

摘要:为了研究 *BmK* IT 提高 AcMNPV 抗虫活性的作用机制,将 *BmK* IT 基因插入到 AcMNPV 中形成重组病毒。采用重组单价病毒 AcMNPV-*BmK* IT(IE1)、AcMNPV-*BmK* IT(P10)、AcMNPV-*BmK* IT(PH)和一种重组双价病毒 AcMNPV-*BmK* IT(P10)-vcath(PH),通过四唑盐比色法(MTT)和蛋白质印迹法(Western Blot)分析了 *BmK* IT 在 AcMNPV 的 3 个启动子调控下对 Sf9 细胞增殖和细胞凋亡的影响,结果显示,感染病毒 36,48 h *BmK* IT 在不同启动子调控下表达量从高到低依次为 PH、P10、IE1。同时分析了 AcMNPV 介导的 *BmK* IT 与组织蛋白酶的协同表达对昆虫 Sf9 细胞增殖和凋亡的机制,结果表明,AcMNPV-*BmK* IT(P10)-vcath(PH)处理组对 Sf9 细胞抑制率比 AcMNPV-*BmK* IT(P10)处理组平均提高了 14.5%,凋亡相关蛋白 c-Myc、cleaved-Caspase3、Bax 表达量增加,Bcl-2 表达量减少。

关键词:AcMNPV;*BmK* IT;组织蛋白酶;协同作用

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)01-0118-05

doi:10.7668/hbnxb.2015.01.019

Analysis of AcMNPV Mediated Expression of *BmK* IT and Vcath on the Apoptosis of Sf9 Cells

ZHAO Jie, LIANG Ai-hua, FU Yue-jun

(Institute of Biotechnology, Shanxi University, Key Laboratory of Chemical Biology and
Molecular Engineering of Ministry of Education, Taiyuan 030006, China)

Abstract: In order to investigate the mechanism underlying the *BmK* IT mediated insecticidal activity of AcMNPV, an excitatory insect toxin, *BmK* IT gene was inserted into the genome of AcMNPV to construct a recombinant baculovirus. The scorpion insect neurotoxin *BmK* IT and vcath gene were constructed into the genome of AcMNPV using Bac-to-Bac system. Effects of *BmK* IT under these promoters of AcMNPV on Sf9 cells were analyzed and it revealed that the expression level of *BmK* IT was high under the regulation of PH promoter at 36, 48 h after the virus infected. Effects of AcMNPV mediated *BmK* IT and vcath synergism expression on the proliferation of Sf9 cells was also analyzed. Compared to AcMNPV-*BmK* IT(P10), the inhibition rate of AcMNPV-*BmK* IT(P10)-vcath(PH) increased 14.5% averagely, the expression level of c-Myc, cleaved-Caspase3 and Bax was raised and the expression of Bcl-2 was reduced.

Key words: AcMNPV; *BmK* IT; Vcath; Synergy

昆虫杆状病毒主要存在于昆虫体内,是已知昆虫病毒中类群最大、发现最早、研究最多且实用意义较大的昆虫病毒。其中,苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV)是杆状病毒中最重要的一种,其作为

新型生物杀虫剂在害虫的防治中发挥了重要作用。但是在进一步推广和应用中,存在着杀虫速度慢、杀虫谱较窄等不足之处。针对这一问题,研究者已将注意力转向基因工程重组病毒杀虫剂的研究与推广上^[1-4]。基因工程重组病毒杀虫剂是通过异源重组

收稿日期:2014-11-10

基金项目:国家自然科学基金项目(31272100);山西省自然科学基金项目(2014011038-1)

作者简介:赵洁(1989-),女,山西太原人,在读硕士,主要从事重组病毒对昆虫细胞作用机制研究。

通讯作者:付月君(1979-),男,山西侯马人,教授,博士,主要从事蝎毒的功能及应用研究。

构建宿主扩大的重组病毒或通过插入外源毒素基因、增效基因以及修饰自身基因等构建毒力增强的重组病毒。从目前重组病毒的杀虫效果看,神经毒素工程病毒被认为是最有应用前景的一类重组病毒^[5-13]。

杆状病毒具有多个启动子,其常用的启动子有 IE1、PH、P10、P6.9、ETL,可用于外源基因的表达,这些启动子的特点各不相同。同一目的基因在不同启动子控制下,表达水平会有很大差异^[14-15]。

山西大学梁爱华课题组前期利用 Bac-to-Bac 载体系统,将东亚钳蝎昆虫毒素 *BmK IT* 和杆状病毒组织蛋白酶 (*Vcath*) 基因构建到 AcMNPV 基因组中,构建了一系列重组单价病毒 AcMNPV-*BmK IT* (IE1)、AcMNPV-*BmK IT* (P10)、AcMNPV-*BmK IT* (PH) 和一种重组双价病毒 AcMNPV-*BmK IT* (P10)-*vcath* (PH),*BmK IT* 并分别受极早期启动子 IE1、多角体蛋白启动子 (PH) 和 P10 蛋白启动子 (P10) 调控表达。

本研究通过 MTT 和 Western Blot 分析了 *BmK IT* 在 AcMNPV 的 3 个启动子调控下对 Sf9 细胞增殖和对细胞凋亡的影响。同时分析了 AcMNPV 介导的 *BmK IT* 与组织蛋白酶的协同表达对昆虫 Sf9 细胞增殖和凋亡的机制,为重组病毒生物杀虫剂的研发及作用机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

草地贪夜蛾卵巢细胞 Sf9 (*Spodoptera frugiperda* 9) 由山西大学生物技术研究所细胞分子生物学实验室培养;野生型 AcMNPV 及重组病毒 AcMNPV-*BmK IT* (IE1)、AcMNPV-*vcath* (PH)、AcMNPV-*BmK IT* (PH)、AcMNPV-*BmK IT* (P10) 和 AcMNPV-*BmK IT* (P10)-*vcath* (PH) 由山西大学梁爱华课题组构建;昆虫细胞干粉培养基 (TNM-FH) 购自 Sigma 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;一抗 c-Myc 购自北京全式金生物技术有限公司;一抗 Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase3 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司;一抗 β -actin 购自武汉博士德生物工程有限公司;辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗购自 Invitrogen 公司;噻唑兰 (MTT) 购自 Amresco 公司;二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Sigma 公司。

1.2 主要试剂

PBS: 6.5 mmol/L Na_2HPO_4 , 2.9 mmol/L NaH_2PO_4 ,

141 mmol/L NaCl (pH 值 7.2); Western Blot 电转缓冲液: 0.025 mmol/L Tris, 0.2 mol/L 甘氨酸, 20% (V/V) 甲醇; PBST 缓冲液: PBS + 0.1% Tween 20 (V/V); 封闭液: PBST + 5% (m/V) 脱脂奶粉。

1.3 试验方法

1.3.1 Sf9 细胞的复苏及培养 从液氮中取出冻存的细胞,立即放于 37 °C 水浴中,并不断摇晃冻存管,注意水不要接触到管口,以免染菌,使细胞溶液在 1 min 之内融化;向 4 mL 离心管加入 3 mL 无血清培养基,再将冻存液加入,吸打混匀,1 100 r/min 离心 5 min,弃去上清。向离心管加入 2 mL 培养基吹打悬浮细胞,转移至培养面积为 25 cm² 的细胞培养瓶中,再向细胞培养瓶加 3 mL 培养基和 1 mL 血清。将培养瓶中的细胞吹打混匀,封好管口,放入 27 °C 培养箱中继续培养。

1.3.2 MTT 检测 细胞种板: 细胞培养瓶中细胞铺满后弃去旧培养基,再加入 5 mL 无血清的昆虫培养基 (TNM-FH) 后用弯头吸管吹打细胞使贴壁细胞悬浮,用无血清的昆虫培养基 (TNM-FH) 稀释细胞到 5×10^5 个/mL,再加入 2 mL 血清,吹打混匀,加入到 96 孔板中,每孔加入 100 μL (约为 5×10^4 个细胞), 27 °C 培养箱过夜培养。

病毒感染: 各处理组病毒分别稀释至 1.52×10^{10} , 1.9×10^{10} , 2.5×10^{10} , 3.8×10^{10} vp/mL, 用所需浓度病毒感染细胞 12, 24, 36, 48 h。

MTT 分析病毒对 Sf9 细胞的增殖抑制影响: Sf9 细胞经病毒处理后,弃去培养基,每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL, 即 0.5% MTT), 80 μL 新鲜细胞培养基继续培养 4 h。小心吸去孔内液体,每孔加入 100 μL 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,使甲瓚充分溶解。酶标仪 OD_{490nm} 处测量各孔的吸光值。重复 3 次,

抑制率 (IR) = (1 - 试验组吸光度值/对照组平均吸光度值) $\times 100\%$ 。

1.3.3 Western Blot 分析凋亡相关蛋白的表达 细胞种板: 细胞培养瓶中细胞铺满后弃去旧培养基,再加入 5 mL 无血清的昆虫培养基 (TNM-FH), 用弯头吸管吹打细胞使贴壁细胞悬浮,用无血清的昆虫培养基 (TNM-FH) 稀释细胞至 1×10^6 个/mL,再加入 2 mL 血清,吹打混匀,加入到 6 孔板中,每孔加入 2 mL, 27 °C 培养箱过夜培养。

病毒感染: 各处理组病毒分别稀释至 1.52×10^{10} , 1.9×10^{10} , 2.5×10^{10} , 3.8×10^{10} vp/mL, 用所需浓度病毒感染细胞 12, 48 h。

总蛋白提取及浓度测定: 将细胞用培养基吹打,

吸入离心管中,1 500 r/min 离心 4 min。移去上清,加 40 μ L 裂解液吹打,置冰上 3 ~ 5 min,12 000 r/min 离心 2 min,吸取上清即为总蛋白。吸 5 μ L 上清到 96 孔板中,加入蛋白显色液,放置 10 min,测吸光值,根据吸光值算蛋白相对浓度,以确定上样量,3 次重复。

Western Blot 转膜: SDS-PAGE 电泳完毕切去浓缩胶,将胶放在电转移缓冲液中平衡 5 min。将滤纸、垫子及 NC 膜在电转缓冲液中平衡 2 min。转膜夹子的黑色板上依次放好垫子、滤纸、SDS-PAGE 胶、NC 膜和滤纸。夹好后插入转膜槽中,将电泳槽内注满电转缓冲液,冰浴,在 100 V 电压下转膜 1.5 h。

抗体孵育: 转印完毕,将 NC 膜用 PBST 暂洗一下,在封闭液中封闭 1 h,缓慢摇动。封闭后,比对目的蛋白与 Marker 大小,确定所需目的蛋白位置,剪下所需的膜,将膜用塑料膜封好,留下一小口以便加一抗。分别稀释一抗 c-Myc、Bcl-2、Bax、cleaved-Caspase3 和 β -actin,将一抗从小口中加入,封好,置 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。再用 PBST 洗去未结合的一抗,每次 10 min,洗涤 3 次。将膜在二抗中孵育 1 h,再用 PBST 洗去未结合的二抗,每次 10 min,洗涤 3 次。

显色曝光: 在暗室内吸取 0.5 mL ECL 试剂盒 A 液与 0.5 mL B 液混合后,用枪头吹打 NC 膜 5 min 后将 NC 膜与胶片同置于暗盒内曝光 30 s,胶片放入显影液中,缓慢摇动 30 s,放入水中暂洗一下,之后立即放入定影液中,终止反应,最后蒸馏水冲洗胶片。

2 结果与分析

2.1 *BmK* IT 在 AcMNPV 不同启动子调控下对 Sf9 细胞增殖的影响

用 4 种病毒 AcMNPV、AcMNPV-*BmK* IT(IE1)、AcMNPV-*BmK* IT(P10) 和 AcMNPV-*BmK* IT(PH) 感染 Sf9 细胞 12, 24, 36, 48 h 后外源蝎毒表达量及对 Sf9 细胞的抑制率见图 1。由图可知,在感染早期阶段 IE1 启动子调控外源蝎毒表达量要大于 P10 和 PH 启动子;在感染晚期阶段 IE1 启动子调控外源蝎毒表达量要小于 P10 和 PH 启动子。从图 1 还可以看出在 12, 24 h, AcMNPV-*BmK* IT(IE1) 对细胞的抑制率要高于 AcMNPV-*BmK* IT(P10) 和 AcMNPV-*BmK* IT(PH); 在 36, 48 h AcMNPV-*BmK* IT(P10) 和 AcMNPV-*BmK* IT(PH) 对细胞的抑制率要高于 AcMNPV-*BmK* IT(IE1), 其中, AcMNPV-*BmK* IT(PH)

对细胞的抑制率最高。经 *t* 检验,同一时间各处理组之间 *P* 值小于 0.01, 差异达极显著水平。

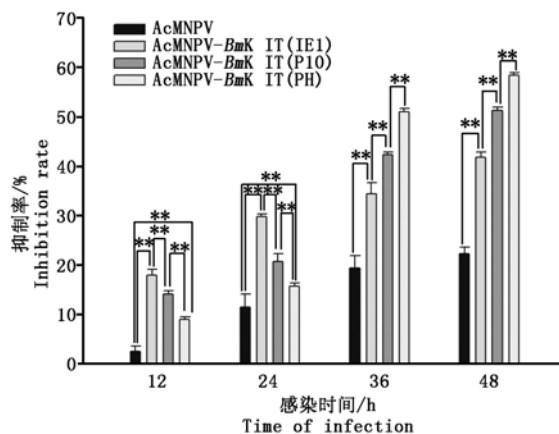


图 1 MTT 分析 *BmK* IT 在 AcMNPV 的 3 种启动子调控下对 Sf9 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of *BmK* IT under three promoters of AcMNPV on proliferation of Sf9 cells by MTT assay

为了进一步证明以上结果,用 4 种病毒 AcMNPV、AcMNPV-*BmK* IT(IE1)、AcMNPV-*BmK* IT(P10) 和 AcMNPV-*BmK* IT(PH) 感染 Sf9 细胞 12 h 后,应用 Western Blot 法分析 Sf9 细胞凋亡相关蛋白的表达量变化,结果(图 2)表明,AcMNPV-*BmK* IT(IE1) 处理组 c-Myc、cleaved-Caspase3、Bax 表达量要高于 AcMNPV-*BmK* IT(P10) 和 AcMNPV-*BmK* IT(PH) 处理组,而 Bcl-2 表达量则与之相反。说明在病毒感染早期,AcMNPV-*BmK* IT(IE1) 促进细胞凋亡的能力要高于 AcMNPV-*BmK* IT(P10) 和 AcMNPV-*BmK* IT(PH)。

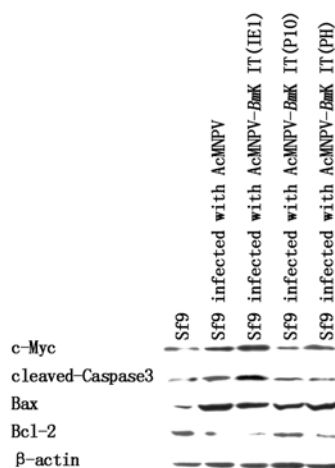


图 2 Western Blot 分析 *BmK* IT 在 AcMNPV 的 3 种启动子调控下对 Sf9 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of *BmK* IT under three promoters of AcMNPV on apoptosis related proteins of Sf9 cells by Western Blot assay

2.2 AcMNPV 介导的 *BmK* IT 与组织蛋白酶协同作用对 Sf9 细胞增殖的影响

由图 3 可知,不同浓度的野生型病毒 AcMNPV,

重组单价病毒 AcMNPV-*BmK IT* (P10)、AcMNPV-*vcath* (PH) 和重组双价病毒 AcMNPV-*BmK IT* (P10)-*vcath* (PH) 感染 Sf9 细胞 48 h 后,经 MTT 法检测结果表明,对同种病毒而言,随着病毒浓度的增加,对 Sf9 细胞的抑制率提高;对同一浓度不同病毒而言,对细胞抑制率从大到小依次为 AcMNPV-*BmK IT* (P10)-*vcath* (PH)、AcMNPV-*BmK IT* (P10)、AcMNPV-*vcath* (PH)、AcMNPV。AcMNPV-*BmK IT* (P10)-*vcath* (PH) 处理组对 Sf9 细胞抑制率比 AcMNPV-*BmK IT* (P10) 处理组平均提高了 14.5%。经 *t* 检验可知,同一浓度各处理组之间 *P* 值小于 0.01,差异达极显著水平。

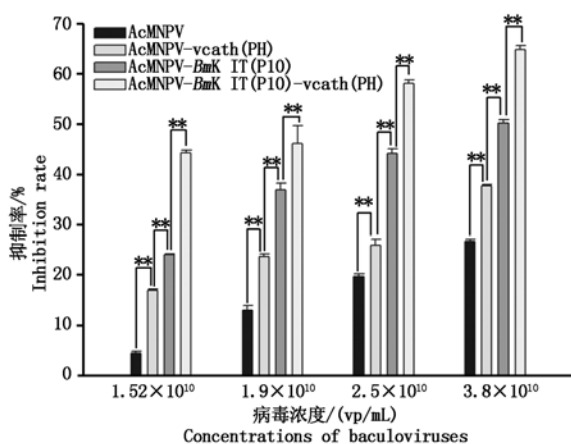


图3 MTT 分析 AcMNPV 介导的 *BmK IT* 与组织蛋白酶协同作用对 Sf9 细胞增殖的影响

Fig. 3 Effects of AcMNPV mediated *BmK IT* and *vcath* synergism expression on proliferation of Sf9 cells by MTT assay

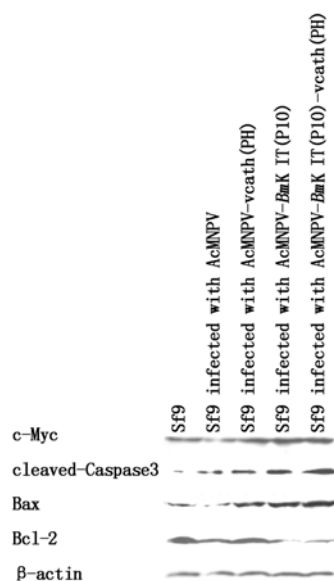


图4 AcMNPV 介导的 *BmK IT* 与组织蛋白酶协同作用对 Sf9 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of AcMNPV mediated *BmK IT* and *vcath* synergism expression on the apoptosis related proteins of Sf9 cells by Western Blot assay

由图 4 可知,相同浓度的 AcMNPV、AcMNPV-*BmK IT* (P10)、AcMNPV-*vcath* (PH) 和 AcMNPV-*BmK IT* (P10)-*vcath* (PH) 病毒感染 Sf9 细胞 48 h 后,经 Western Blot 法检测结果发现,与对照组相比,经 AcMNPV、AcMNPV-*BmK IT* (P10)、AcMNPV-*vcath* (PH) 和 AcMNPV-*BmK IT* (P10)-*vcath* (PH) 病毒感染的 Sf9 细胞, c-Myc、cleaved-Caspase3、Bax 表达量依次增加, Bcl-2 表达量依次减少。表明 *BmK IT* 与组织蛋白酶有协同作用,诱导细胞凋亡能力大于单价病毒。

3 结论与讨论

强启动子是构建高效的重组病毒杀虫剂的研究重点。本研究同时研究了 2 个外源基因 *BmK IT* 和 *vcath* 分别受强启动子 P10 和 PH 调控的情况,使其获得高效表达并分析其协同效应。引入 *vcath* 基因主要是因为构建重组病毒引入外源基因时要考虑到安全性问题,而这里引入杆状病毒自身的基因,提高其拷贝数和表达量,可以有效避免这个问题。山西大学梁爱华课题组之前的抗虫试验结果表明,重组双价 AcMNPV-*BmK IT*-*vcath* 对 5 龄棉铃虫幼虫的半致死剂量和半致死时间明显低于野生型病毒,说明在虫体试验中,AcMNPV 介导的蝎昆虫神经毒素与组织蛋白酶的协同作用比单独的蝎昆虫神经毒素的抗虫活性高^[16-17]。

本试验通过 MTT 和 Western Blot 技术,从细胞和分子水平分析了 *BmK IT* 在 AcMNPV 不同启动子调控下对 Sf9 细胞的影响,结果表明,同一目的基因在不同启动子控制下,表达水平有很大差异。同时,揭示了由 AcMNPV 介导的 *BmK IT* 与组织蛋白酶协同表达作用的机制,解释了重组单、双价病毒的抗虫试验结果。以上结果为筛选活性高、安全性好、广谱性强的抗虫基因奠定了基础,同时也为生物杀虫剂的应用和推广提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Szewczyk B, Hoyos-Carvajal L, Paluszczek M, et al. Baculoviruses re-emerging biopesticides [J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(2): 143 - 160.
- [2] Wudayagiri R, Inceoglu B, Herrmann R, et al. Isolation and characterization of a novel lepidopteran-selective toxin from the venom of South Indian red scorpion, *Mesobuthus tamulus* [J]. *BMC Biochemistry*, 2001, 2: 16 - 23.
- [3] Tuan S J, Hou R J, Kao S S, et al. Improved plant protective efficacy of a baculovirus using an early promoter to

- drive insect-specific neurotoxin expression [J]. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 2005, 46(1): 11–20.
- [4] Heinz K M, McCutchen B F, Herrmann R, *et al.* Direct effects of recombinant nuclear polyhedrosis viruses on selected nontarget organisms [J]. Journal of Economic Entomology, 1995, 88(2): 259–264.
- [5] 张俊杰, 张友清. 重组杆状病毒杀虫剂的研究进展 [J]. 中国生物防治, 2001, 17(4): 179–183.
- [6] 李辉, 汤历, 陈其津. 昆虫病毒的研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2007, 13(13): 150–152.
- [7] 孙修炼, 胡志红. 我国昆虫病毒杀虫剂的研究与应用进展 [J]. 中国农业科技导报, 2006, 8(6): 33–37.
- [8] 刘永平, 王方海, 苏志坚, 等. 昆虫杆状病毒杀虫剂研制与应用进展 [J]. 中国生物防治, 2006, 22(1): 1–5.
- [9] Inceoglu A B, Kamita S G, Hammock B D. Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook [J]. Advances in Virus Research, 2006, 68: 323–360.
- [10] Bonning B C, Hammock B D. Development of recombinant baculoviruses for insect control [J]. Annual Review of Entomology, 1996, 41: 191–210.
- [11] Cory J S, Hirst M L, William S T, *et al.* Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide [J]. Nature, 1994, 370: 138–140.
- [12] 范晓军, 曹建斌, 许成钢, 等. 重组杆状病毒 (AcMNPV-BmK IT-Chi) 的杀虫活性和安全性初步研究 [J]. 华北农学报, 2007, 22(5): 161–164.
- [13] 杨利艳, 孙毅, 崔贵梅. 转双价基因抗虫杨抑制美国白蛾的作用机理研究 [J]. 华北农学报, 2008, 23(5): 157–160.
- [14] DiFalco M R, Bakopanos E, Patricelli M, *et al.* The influence of various insect cell lines, p10 and polyhedrin promoters in the production of secreted insulin-like growth factor-interleukin-3 chimeras in the baculovirus expression system [J]. Journal of Biotechnology, 1997, 56(1): 49–56.
- [15] 王煜. 不同启动子在昆虫杆状病毒表达系统中的活性研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.
- [16] 曹建斌. 重组杆状病毒 (AcMNPV-BmK IT-vcath) 的构建及活性测定 [D]. 太原: 山西大学, 2008.
- [17] 曹建斌, 范晓军, 付月君, 等. 紫外线对重组杆状病毒 (AcMNPV-BmK IT-Chi) 稳定性的影响 [J]. 山西农业科学, 2009, 37(4): 43–65.

欢迎订阅 2015 年《山西农业科学》

《山西农业科学》是山西省农业科学院主办的大农业学术性期刊(中国科技核心期刊), 主要栏目有: 宏观农业、调查研究、生物技术、遗传育种、耕作栽培、生理生化、资源与环境、植物保护、畜牧兽医、水产渔业、贮藏与加工、信息技术、文献综述等。主要读者对象为: 农业研究机构科研人员、农业院校师生、涉农部门农业技术推广工作者。

本刊为月刊, 大 16 开本, 96 页码。每期定价 8.00 元, 全年 96.00 元。国内统一刊号 CN14–1113/S, 邮发代号 22–24。

欢迎订阅, 欢迎投稿!

地址: 太原市长风街 2 号

邮编: 030006

电话: 0351–7089783

E-mail: sxnykx@126.com