



昆虫核型多角体病毒遗传学研究现状

马延高 卢文筠

(武汉大学病毒学研究所)

前 言

1973年, Hink 等^[1]建立了昆虫核型多角体病毒(Nuclear polyhedrosis virus, 简称 NPV)的空斑纯化分析技术。自此, NPV 的研究进展十分迅速。其主要原因还在于应用了传统的遗传学研究方法, 如随机突变、点突变、突变体的分离、互补分析和现代遗传学及分子遗传学的研究方法, 如 DNA 重组、分子杂交和体外表达等。由于昆虫在生物群体中的特殊地位和 NPV 自身结构和生命活动的特点, 因此有关 NPV 的研究成果具有重大的理论和应用价值。引起了国内外学者和实业界的广泛重视。

至今, NPV 遗传学研究的成就主要是利用苜蓿银纹夜蛾(*Autographa Californica*)的 NPV (AcNPV) 为研究材料取得的。与此密切相关的鳞翅目(Lepidopteran)昆虫, 如粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)、大蜡螟(*Galleria mellonella*)以及一种尺蠖(*Rachiplusia ou*)的 NPV (分别简称为 TnNPV, GmNPV 和 RoNPV)也是研究的重要对象。

突变及突变体

(一) 自发突变

1. 自发突变体的产生 所谓自发突变, 就是在宿主细胞内通过连续多次传代而逐渐产生的突变, 又称连续传代突变。1973年, Hink 和 Vail^[2]第一次报道了由 ENOV (细胞外非包埋病毒— extracellular Non-occluded virus) 连续数代感染粉纹夜蛾 (*T. ni*) 细胞而获得的一种突变体 FP (few polyhedra, 即一个包埋体内含有少量病毒粒子), 野生型的病毒为 MP (many polyhedra, 即一个包埋体内含有许多个病毒粒子)。他们认为 FP 和 MP 在昆虫体内可以按某种方式迅速地自发地相互转变。此后, 其他作者也先后证实了传代过程中 FP 的出现。

2. 自发突变体的性质 1980年, Wood^[13]用 ³⁵S-甲硫氨酸脉冲标记为 FP 感染不同时期诱导的蛋白质, 而后以 SDS PAGE 分析, 发现 FP 诱导出 55、42、38、16、15、6、14 以及 13 千道尔顿的 7 种蛋白质, 而 MP 却不能。因此, 他认为: “FP 比 MP 更能有效地减少宿主蛋白质的合成”。他们还注意到 68 千道尔顿蛋

白质在 FP 和 MP 中诱导时间是不同的, 即为 FP 感染的细胞经 2 小时后即可检出, 而为 MP 感染的细胞则待 12 小时后方可检出。同年, Potter 和 Miller^[11]利用限制性内切酶分析在 *T. ni* 细胞中, 经 25 代传代产生的 FP 突变体的基因型变化的情况, 在 5 个 FP 突变株中发现有 2 株的酶切图型, 与 MP 的明显不同。

(二) 诱发突变

所谓诱发突变即在人为条件下, 使 NPV 发生的一系列突变。由于所使用的诱变条件不同, 因此诱发突变可以产生许多突变型。主要诱变法有:

1. 化学诱变 常用的化学诱变剂是 NTG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 及 BrdV (5-bromodeoxyuridine)。这些诱变剂均能不定向地使 NPV 发生突变。如果随后用温度作为突变体选择的条件, 则可得到所谓温度敏感突变株 (ts)。ts 是病毒遗传学研究的经典而有效的常用材料。

按照突变体在限制温度条件下产生或不产生 ENOV 和(或) OV (即包埋型正常的病毒), st 可划分为三个广泛的类型, 即 ENOV⁻-OV⁻、ENOV⁺-OV⁻ 和 ENOV⁻-OV⁺。区分它们的表现型的最简单的方法是在限制温度条件下从空斑的形态去确定, 是否是属于突变体。ENOV⁻-OV⁻ 不形成空斑; ENOV⁺-OV⁻ 形成缺少 OV 的空斑; ENOV⁻-OV⁺ 形成无 ENOV 的空斑。此外, 1981年 Wood 等^[13]利用 α -氨基嘌呤诱导, 在 20°C 下选择, 从 300 个空斑中发现有一个 HOB (OV overproducer)。该 HOB 感染的细胞中有非常多数量的 OV, 但相对于其亲本讲, 其 LT-50 并无不同, 只是 HOB 感染的幼虫的体重比用野生型病毒感染的显著地减小。这就意味着用 HOB 感染的幼虫中 OV/mg 的比重大大地增加了。因此, Wood 等认为用化学诱变剂处理可望获得更具高毒力的毒株。

2. 位点诱变 在人为条件下有意识地造成 NPV 基因组的特定部位的缺失或插入, 是研究这一部位功能的好方法。1983年, Smith 等^[12]第一次获得了

Ma Yangao et al.: Present Aspect of Genetic Research for Nuclear Polyhedrosis Virus of Insect

本文于 1986 年 12 月 11 日收到。

AcNPV 这样的突变体。其作法是在 AcNPV DNA *EcoRI*-I 片段中 *Kpn* I 位点附近引入突变,把这种缺失了的片段与野生型环状的 AcNPV DNA 共感染,通过双杂交或基因转换事件,使在细胞内发生同源片段的等位交换,最后选择这种经交换过的缺失突变体(即 OV^-)。这种方法具有普遍意义,如果把 *EcoRI*-I 片段换成另外的片段则会得到另一种表现型或生理特性不同的突变体。所谓 NPV 的分子工程,就是在此思想指导下的一种大有可为的应用形式。

突变的分子基础

突变是生物体中遗传物质变异的结果。NPV 也是一样。但是综观迄今研究 NPV 基因组和其它生物遗传物质突变结果不同点,发现似乎 NPV 基因组的突变主要是基因组内片段的缺失或插入。虽然 Carstens 等^[2] 1982 年也报道过突变体 M5 中,因一个碱基对的改变使脯氨酸密码(CCT)变为亮氨酸的密码(CTT),但这种情况是不多见的。还有人提出杆状病毒中可能存在着所谓 UV 抗性因子(Miller, L. K. 个人谈话)。

(一) 由 MP 变为 FP 是由宿主 DNA 可转移元件的插入诱导的

1982 年, Miller 等^[3] 对经 25 代连续感染而由 MP 获得的 FP 进行了详细的研究,发现其中有一个突变分离株,即 FP-D 的基因组中有一个突变分离株插入片段。FP-D 有两种情况,即 FP-DS 和 FP-DL,其实是因为所插入的片段不等长造成的,前者为 0.27Kb(LTR) 后者为 7.3Kb,前者是后者的两端重复序列,整个插入序列类似于果蝇 *copia* 转移元件。他们还证实这种插入片段来源于宿主 DNA,并且测出草地贪夜蛾(*podoptera frugiperda*) 细胞基因组中含有大约 50 个的这种拷贝(L. K. Miller 未发表的资料)。

FP-DS 和 FP-DL 插入的直接效果是在很大程度上改变了插入部位 DNA 的生理功能,如在降低 α 期转录水平以后可诱导出 4 种新 RNA。这 4 种新 RNA 均起始于插入元件的 LTR 内,但是转录方向却不同(L. K. Miller 待发表的报告)。

Fraser 等^[3,4,5] 研究了 GmNPV 的突变体 GmFP-1 和 GmFP-3,证明在 NPV 基因组中尚存在着另一类型的可转移元件。他们发现这两个突变体是由于 GmNPV DNA 的 *HindIII*-J 片段上的两个相邻部位有插入的结果。GmFP-3 插入有源于宿主细胞(*T. ni*-TN-368) 基因组的一种可转移元件。该元件插入病毒基因组导致 4bp 靶病毒 DNA 序列的加倍。该插入序列长 750bp,在每端带有 7bp 的反向重复序列。GmFR-1 与 GmFP-3 不同,没有插入的两端加倍的病毒序列,也不带两个末端自身重复的结构。由于 GmFP-3 直接可从 FP 表现型中分离得到,而且这种插入序列的丢失会导致由 FP 回复突变为 MP,说明 GmFP-3 的插入序列

直接与 FP-MP 两种表现型互变有关。这就第一次证实了作为媒介的转座突变因子可以改变一种动物病毒的表现型,而且说明 FP 突变的空斑形态学可以被有效用来寻找病毒宿主 DNA 的插入突变体。

(二) 标志拯救技术的广泛使用说明 ts 是基因组局部变化引起的

标志拯救技术是 1981 年由 L. K. Miller^[6] 首先用于研究 NPV 基因组位点突变的一种技术。其原理是利用野生型 NPV DNA 的限制酶切片段使突变型转变成野生型。这个转变过程可能是一种普通的遗传学同源重组或基因转变,在遗传学上又称为等位取代。在图谱 ts 突变位点时,把突变体的 DNA 分别与许多野生型病毒 DNA 限制性片段共转染,其中将会有有一个片段“拯救”该突变体(即使该 ts 突变为野生型)。因此,在限制温度条件下就会形成野生型的空斑。能“拯救”一个 ts 的片段就是该 ts 的突变位点。用此方法 Miller 已精确地把 7 个 ts 突变位点找了出来。

标志拯救法目前已是研究 NPV 遗传学的重要手段之一,它的使用范围已不局限于图谱 ts 的突变位点,而被广泛地用于研究 NPV 基因组的遗传变异中。正如前面已述及,1983 年 Fraser 等^[5] 用此法已证实了 Gm FP-3 的突变实质,而且还确定其插入突变发生在 AcNPV DNA *HindIII*-J 片段之内。

NPV 的分子工程

图 1^[5] 归纳了迄今人们所知道的 NPV 基因组突变的情况,说明 NPV 基因组具有多变的特性,而且这些变化多是由于在该基因组某些部位插入或缺失一定大小 DNA 片段引起的。

研究 NPV 的突变体发现,许多突变对于它本身虽不一定有益,但也无害。生物化学和分子生物学研究还发现,在有些突变体的生活周期中,各种蛋白质的合成时序, DNA 复制的时间与野生型的 NPV 便无明显的不同。这些特性使人产生一种思想,即在不改变 NPV 正常生理功能的情况下,是否可以利用这些突变体。

根据以上发现和推理,人们提出了 NPV DNA “分子工程”的设想。这一设想还根据如下事实,即对于人工 OV^- 突变体讲: ① ENOV 产生的比率感染大约 20—30 小时后减少; ② 病毒囊膜在核中从头合成或获得; ③ 粒中纤维状物质的形成; ④ AcNPV 感染细胞特异蛋白质的合成。在由 OV^- 突变体感染的细胞中发生的这些事件和进程均以类似于由野生型 AcNPV 感染的细胞中发生的方式进行。这说明多角体蛋白质基因的缺失与否,对病毒的生存与繁殖是不重要的,因为多角体蛋白质对 NPV 来讲,只起保护和垂直传播作用,而细胞间的水平传播则是由 ENOV 来完成的。因此,就可以在多角体蛋白质基因处插入外源 DNA 以形

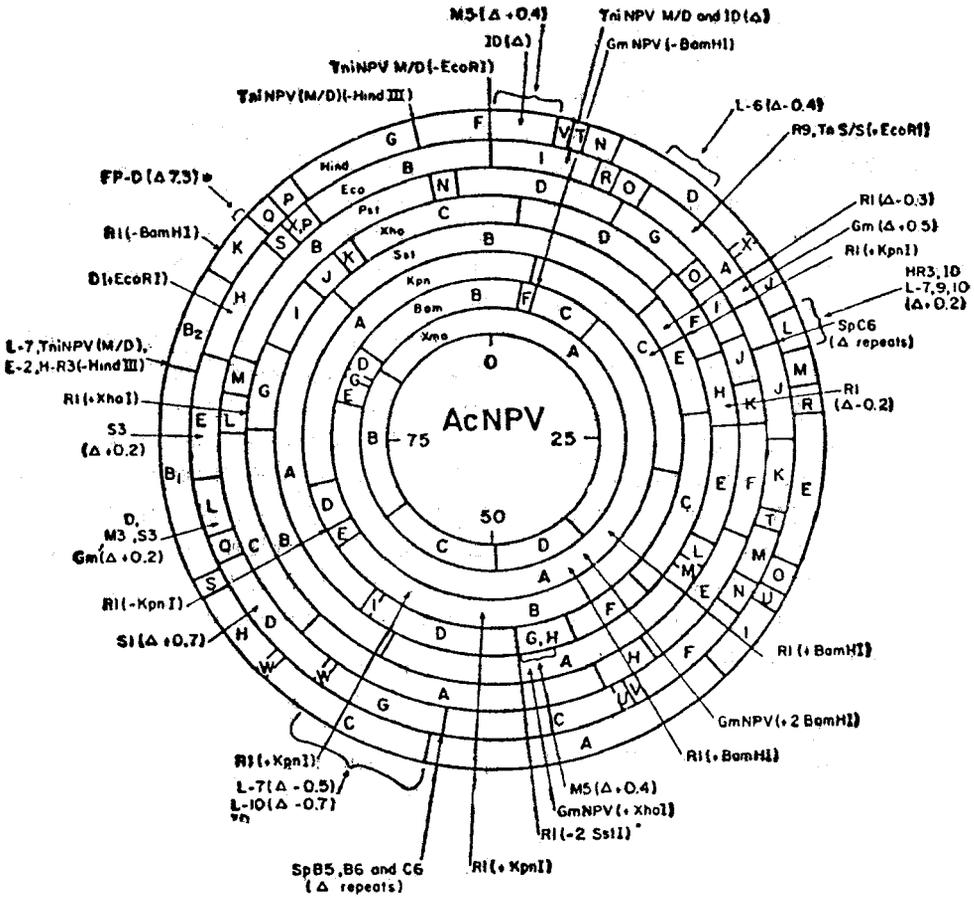


图1 AcNPV L-1 DNA 的物理图谱和已发现的与此密切相关变异病毒株, 突变体的突变位置

所观察到的变异包括限制性位点的缺失(如 $-HindIII$)、额外位点的增加(如 $+BamHI$)、DNA 片段的缺失(如 -0.4 表明 0.4kb DNA 的缺失)或增加(如 $+0.5$ 意味着增加 0.5kb DNA)。AcNPV DNA 基因组变异似乎蔓延于整个 DNA 基因组。

成多角体蛋白质基因的插入或融合的突变体。如果这种插入的外源 DNA 是一种具生物活性(如干扰素、生长激素或细胞毒性蛋白质)的基因,那么就可以借助多角体蛋白质基因的强大的启动子来高比率地生产这些物质。这种方法就是当今风行世界的基因工程,只是在一个全新的系统中,用了一个新的、更具实用潜力的基因载体。

利用 NPV 的多角体蛋白质基因启动子的基因工程的基本程序是: ① 测定多角体蛋白质的基因在 NPV DNA 物理图谱中的位置; ② 在 *E. coli* 中借用某种质粒克隆 NPV 基因组的适当区域; ③ 用目的基因取代质粒中多角体蛋白质基因; ④ 用野生型 NPV DNA 与重组质粒 DNA 共转染, 通过宿主细胞的酶等位交换, 把目的基因引入病毒基因组。

1983 年, Smith 等^[13]在 AcNPV 多角体蛋白质基因启动子控制下, 在昆虫细胞中有效地表达了人 β -干扰素基因 (IFN- β)。为了把 IFN- β 基因引入该病毒基因组的多角体蛋白基因的邻近部位, 他们首先构建

出传递载体。这种载体在多角体蛋白启动子附近有一 *BamHI* 克隆位点和与 *E. coli* 质粒 Puc 8 相连的两侧病毒 DNA 序列。AcNPV DNA 的 *EcoRI*-I 片段首先被插入到 Puc 8 的 *EcoRI* 位点, 在此质粒中有三个 *BamHI* 位点, 其中有一个位于多角体蛋白基因的 +175 处, 其他两个 *BamHI* 位点用酶消化去掉, 则获得传递载体 Pac101。由多角体蛋白和干扰素基因的核苷酸序列, 就可以断定 IFN- β 蛋白编码序列。当 IFN- β 基因被插入到 Pac101 上唯一的 *BamHI* 克隆位点时, 则转录阅读框架将以多角体蛋白基因转录的相同方式进行。

为了考查多角体蛋白基因序列在表达 IFN- β 中的作用, 他们对重组质粒 Pac101 近于多角体的 5' 端的 *BamHI* 位点进行了修饰, 即让 Pac101 多角体蛋白基因的 +175 的天然 *BamHI* 位点和多角体蛋白启动子之间的核苷酸序列不同程度的缺失, 并使一个含有 *BamHI* 识别位点的合成的寡核苷酸填入其缺失部位。分别获得了由多角体蛋白转录开始位点下游 +35,

+ 34 含有 *Bam* HI 位点的 PAc 311 和 PAc 360 质粒。而质粒 PAc 380 在位点 -59 处有一个 *Bam* HI 克隆位点, 这个位点正好是多角体蛋白 mRNA 的可能的帽子化位点。人工 IFN- β 的核苷酸序列和转录, 转译信号是已知的, 把含有完整的 IFN- β 蛋白编码序列和调控系列的 IFN- β 基因片段 (767 个核苷酸) 的两侧分别装上 *Bam* HI 人工接头 (linker), 并插入 PAc101、PAc311、PAc360 和 PAc380, 便分别获得了 PAc101-IFN- β 、PAc311-IFN- β 、PAc360-IFN- β 和 PAc380-IFN- β 表达质粒。

通过野生型 AcNPV DNA 和表达质粒的共转染, Smith 等以倾斜照明技术选择 OV^- 的空斑, 得到大约 0.5% 的 OV^- 空斑。这些重组病毒含有适当的插入物, ENOU 达到了正常的滴度 ($Ca 5 \times 10^6$ pfu/ml)。除见到感染细胞的溶解开始于感染 50—60 小时之外, 未见到对重组病毒的复制有什么影响。

干扰素活性分析表明, 所有上述四种重组病毒均可产生干扰素。但是以 PAc380-IFN- β 共感染获得的重组病毒产生的干扰素的能力最强 (5.17×10^6 U/ml)。 β -干扰素的合成以多角体蛋白表达的相同方式进行, 即有明显的时序调控, 感染 20 小时后开始出现干扰素, 42 小时之内迅速增加, 糖基化和非糖基化的干扰素在感染细胞内均被检出。

由其它几个质粒共转染获得的重组病毒产生干扰素的能力均较低。Smith 等认为可能与在某些情况下干扰素基因的表达只能由干扰素基因的 AUG 启动而不能由干扰素-多角体蛋白质的基因的融合产物的 AUG 启动有关。

Smith 等^[13]的结果还表明, 一个对哺乳动物细胞有毒性的基因在无脊椎动物细胞中用 AcNPV 为载体, 在不影响该病毒复制的情况下能高效地表达。这一点是特别有意义的, 而且这种毒性蛋白由被感染细胞中分泌出来并被糖基化。达到 IFN- β 活性的最高水平是这个基因被插入在正常的转译位点而不是转录位点这一点也是令人非常有兴趣的。

1984 年, Pennock 等^[10]以上述类似的方式用 AcNPV 成功地表达了 β -半乳糖苷酶基因。他们以 PBR322 为基础质粒组建出含有 AcNPV 基因组 0—8.7 图谱单位的 DNA 区域的重组质粒, 这个区域在多角体蛋白基因内也有一个 *Bam* HI 位点。他们在 *E. coli* β -半乳糖苷酶基因框架内与多角体蛋白基因的第 58 个密码子相融合, 其表达产物为上述二种蛋白质的融合体。

1985 年, Susumu Macda 等^[14]以家蚕 NPV (Bm

NPV) 为载体, 用相似方法表达了人 α -干扰素。这种表达最后不是在昆虫细胞而在昆虫幼体内完成的。据报道, 由 10ml 感染幼体血淋巴中 (250mg 蛋白质) 可获得 0.3mg 干扰素。其比活 (Umg⁻¹ 蛋白质) 由 2.7×10^7 增加到 1.0×10^8 , 得率高 50%。分析结果还证实在家蚕幼体中, 产生的干扰素与用哺乳动物细胞生产的没有什么差别。它们的多肽序列也可以在哺乳动物细胞中的相同方式去掉, 干扰素的纯化程序也一样简单。

1985 年, Carbonell 等^[11]为了扩大 AcNPV 的宿主范围, 构建了一种重组杆状病毒, 该病毒含有置于 Rous 肉瘤病毒长末端重复序列启动子控制之下的 *E. coli* 氯霉素乙酰化转移酶 (CAT) 基因以及置于 AcNPV 多角体蛋白基因启动子控制之下的 *E. coli* β -半乳糖苷酶基因。用它去感染双翅目的果蝇和哺乳动物的老鼠细胞, 结果发现这种病毒不仅能进入感染细胞, 而且还有不同程度的表达。这就扩大了 AcNPV 的宿主范围, 有助于了解杆状病毒作为生物杀虫剂的安全性。

参 考 文 献

- [1] Carbonell, L. F. et al.: 1985 *J. Virol.*, 56: 153—160.
- [2] Carstens, E. B.: 1982. *J. Virol.*, 43(3): 809—812.
- [3] Fraser, M. J. et al.: 1985. *Virology*, 145: 356—361.
- [4] Fraser, M. J. et al.: 1983. *J. Virol.*, 47(2) 287—294.
- [5] Friesen, P. D. and L. K. Miller: 1985. *J. Virol.*, 54: 392—400.
- [6] Hink, W. F. and P. V. Vail: 1973. *J. Invert. Path.*, 22: 168—172.
- [7] Miller, D. W. and L. K. Miller: 1982. *Nature*, 299: 562—564.
- [8] Miller, L. K.: 1981. *J. Virol.*, 39(3): 973—982.
- [9] Miller, L. K.: 1984. *Methods in virology*, vol. VII: 227—258.
- [10] Pennock, G. D. et al.: 1984. *Molecular and cellular Biology*, 4: 399—406.
- [11] Potter, K. N. and L. K. Miller.: 1980. *Animal Virus Genetics*, Academic press, Inc. pp. 71.
- [12] Smith, G. E. et al.: 1983. *J. Virol.*, 46(2) 584—588.
- [13] Smith, G. E. et al.: 1983. *Molecular and cellular Biology*, 3: 2156—2165.
- [14] Susumu Macda et al.: 1985. *Nature*, 315: 592—594.
- [15] Wood, H. A.: 1980. *Virology*, 105: 338—342.
- [16] Wood, H. A., et al.: 1981. *J. Invert. Path.*, 38: 42.