



昆虫杆状病毒 egt 基因研究进展

沈兴家 张志芳 李奕仁

(农业部家蚕生物技术重点开放实验室 中国农业科学院蚕业研究所 212018)

昆虫杆状病毒基因组中存在一个编码蜕皮甾醇尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶(ecdysteroid UDP-glucosyltransferase, EGT)的基因 egt 。杆状病毒感染昆虫后产生的EGT酶能催化昆虫体内尿苷二磷酸葡萄糖(UDP-glucosyl)中的葡萄糖基转移到蜕皮激素上,使蜕皮激素失活,从而阻碍寄主昆虫的蜕皮和化蛹,延长幼虫的取食时间,以利于病毒自身的大量繁殖;而蜕皮激素是调控昆虫发育变态的最主要物质,因此, egt 基因对于研究宿主昆虫的激素代谢以及激素对昆虫的发育调节作用等具有一定的意义。 egt 基因是病毒复制的非必需基因,其缺失不影响病毒的复制和感染性,可以在 egt 基因启动子下游插入标记基因或有用蛋白质基因等,有利于重组病毒的筛选和表达产物的加工。研究表明,缺失 egt 基因的NPV感染的宿主昆虫死亡时间比感染野生型NPV的短,为研究提高重组杆状病毒杀虫剂的杀虫效果提供一条有效的途径。本文对杆状病毒 egt 基因研究进展作简要综述。

1 昆虫杆状病毒及其基因组概述

昆虫杆状病毒科(Baculoviridae)下设两个亚科:包涵体杆状病毒亚科(Eubaculovirinae),又称真杆状病毒亚科;非包涵体杆状病毒亚科(Nudibaculovirinae)。包涵体杆状病毒亚科分为两个属:核型多角体病毒属(NPV)与颗粒体病毒属(GV)。

昆虫杆状病毒属于有囊膜的双链DNA病毒,其基因组为单分子共价闭合双链环状DNA,分子质量90~230 kb,平均约为130 kb。苜蓿尺蠖核型多角体病毒AcMNPV C6株是最早完成基因组全序列的杆状病毒,全长133 894 bp,其中A+T含量59%,长度大于150bp的开放阅读框(ORF)有337个,均匀分布在两个基因组的链上。随后Ahrens等1997年报道了黄杉毒蛾核型多角体病毒OpMNPV核苷酸全序列。BmNPV是继AcMNPV和OpMNPV后第3种进行全序列分析的杆状病毒,其全长为128 413 bp,A+T含量

为60%,推定的ORF有136个。最近又陆续有多种NPV基因组全序列被测定,例如舞毒蛾NPV(LdMNPV)、甜菜夜蛾NPV(SeMNPV)、棉铃虫NPV(HaSNPV)和褐蓑蛾NPV(MacNPV)。

以杆状病毒DNA复制起始时间为基准,将病毒基因分为两个综合时相,即在DNA复制开始前表达的基因统称为早期基因,在DNA复制开始的同时或以后表达的基因统称为晚期基因。

2 杆状病毒 egt 基因的特点

迄今已经有多种昆虫杆状病毒包括NPV和GV基因组或 egt 基因被鉴定和研究,如AcMNPV、SpliM-NPV、CfMNPV、CfdefMNPV、MbMNPV、OpMNPV、EppopMNPV、LdMNPV、HaSNPV(HearNPV)、BusuNPV、SeMNPV和BmNPV等,以及颗粒体病毒XcGV、PxGV、CpGV等,其中以AcMNPV egt 基因的研究最为深入,可能由于它是多粒包埋核型多角体病毒(MNPV)的代表种,而且是一种最主要的鳞翅目害虫有关。

杆状病毒 egt 基因位于基因组中一个缺失突变高发区内,能够在细胞继代培养中发生缺失突变,属于高度不稳定基因。删除 egt 基因也不影响病毒在细胞中的复制,由此推测杆状病毒 egt 基因可能来自宿主遗传系统。

AcMNPV基因组中, egt 基因位于第11426~12946nt,起始密码ATG符合Kozak规则,上游有加帽位点基序,ATG上游-43核苷酸为转录起始位点,而转录起始位点上游-29~-25nt为TATA盒,-43~-39nt处有一顺式调控元件(cis-regulatory elements)ATTGTGTTA序列,符合早期基因转录起始位点上游保守基序A/CTCGTGTNCT。AcMNPV egt 基因在蛋白质合成抑制剂放线菌酮(cycloheximide)和DNA合成抑制剂aphidicolin存在的条件下其mRNA合成不受影响,即AcMNPV egt 基因的转录不依赖于病毒蛋白合成及病毒DNA复制,属于极早期基因,转录产物为2

种具有共同5'末端的mRNA,在病毒感染后期 egt 基因的转录水平下降。AcMNPV egt 基因的翻译初级产物由506个氨基酸,其中N-端有一个由18个氨基酸组成的信号肽,决定EGT向胞外分泌,成熟EGT分子量约60kDa。

SplimNPV egt 基因为1548bp,有两个转录起始位点,分别位于ATG的上游-25(A)和-28(C)核苷酸,即在TATA盒下游25和22位碱基上,而另一个紧挨着TATA盒的ATG不是 egt 基因ORF的一部分;在TATA盒上游也有一个顺式调控元件CACGTG基序。SplimNPV egt 基因的启动子活性低,并且需要病毒极早期基因 $ie-1$ 表达产物IE-1反式激活。用SplimNPV感染SI-2细胞,结果在感染后3h的细胞培养基中检测到EGT酶的活性,但是由 egt 基因转录的mRNA在感染后8h检测到,之所以在8h之前未检测到 egt 基因mRNA可能是由于检测灵敏度不同所致,SplimNPV egt 基因是一个极早期基因。

家蚕核型多角体病毒(BmNPV)是单粒包埋核型多角体病毒(SNPV)的代表种。BmNPV T3株基因组中, egt 基因位于第6407~7925nt;BmNPVZJ-8株 egt 基因起始密码子ATG上游-89~-81nt有一与AcMNPV完全相同的潜在的顺式调控元件ATTGTGTTA序列,-71~-64nt处有一TATA盒,在-27~-24nt和-22~-19nt处各有一潜在的早期转录起始位点CAGT基序;BmNPV egt 基因核苷酸序列与AcMNPV具有95%的同源性。BmNPV egt 基因启动子的活性也需要病毒因子的反式激活,其控制的报告基因的表达最早在病毒感染后24h才检测到(待发表)。

对AcMNPV、SpliMNPV、CfMNPV、CfDEFMNPV、MbMNPV、OpMNPV、HaSNPV (HearNPV)、BusuNPV、SeMNPV和BmNPV等核型多角体病毒 egt 基因启动子序列的比较,发现所有这些 egt 基因启动子都有一个TATA盒(其中CfMNPV为TAAA);在TATA盒的下游有一个或几个CAGT基序或不完全CAGT基序,上游存在潜在顺式作用元件,如SpliMNPV的CACGTG、AcMNPV的ATTGTGTTA、CfMNPV的AAGTGTAC等,但未发现共同的顺式作用元件;TATA盒与转录起始位点之间的距离为44~67bp。 egt 基因核苷酸序列和推定的氨基酸序列的一致性为45%~59%、42%~53%。

3 EGT酶与宿主昆虫的变态

杆状病毒EGT是由病毒 egt 基因编码的,天然的EGT可能主要以4个单体组成的寡聚体形式存在,寡聚体的形成不依赖于糖基的作用。EGT是一种分泌型酶,在细胞内合成后分泌到宿主昆虫的血淋巴中,并在血淋巴中催化糖基转移到蜕皮激素上。EGT能够在细胞外聚集积累,而且在细胞外环境中稳定性高。因此,杆状病毒在宿主体内不需要连续合成EGT,就能控制幼虫的蜕皮与化蛹,这也是为什么 egt 基因转录水平在病毒感染后期下降的原因。EGT在体外几乎能以相同的效率催化尿苷二磷酸葡萄糖(UDP-glucose)或尿苷二磷酸半乳糖(UDP-galactose)的糖基转移到蜕皮甾体化合物,若以蜕皮激素与UDP-glucose为底物,则AcMNPV EGT催化的转移反应产物为蜕皮激素22-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(22-O- β -D-glucoside),从而使蜕皮激素失活。但是,在体内条件下,AcMNPV感染后只形成蜕皮激素半乳糖苷,推测是由于UDP-galactose是病毒在宿主昆虫体内能够获得的最主要的UDP-糖的缘故。杆状病毒通过EGT的作用延长宿主幼虫的取食时间,有利于病毒本身的大量繁殖,这是病毒进化过程中获得的选择优势,对杆状病毒可能有着普遍意义,也是病毒基因在个体水平上调节宿主昆虫的典型。

给化蛹第2日的家蚕蛹注射AcMNPV,可诱导人工滞育蛹的发生,但是AcMNPV不能经口感染家蚕幼虫。分别用野生型AcMNPV、 egt 缺失的突变体AcMNPV和含 egt 启动子控制的 $lacZ$ 基因的重组AcMNPV感染家蚕幼虫和BmN培养细胞,结果重组AcMNPV中 egt 启动子控制下的 $lacZ$ 基因在培养细胞中得到表达(用X-Gal染色后进行细胞计数),但表达的细胞比例与用于感染的重组病毒的剂量相等,可能病毒只是随机感染,表达只在最初感染的BmN4细胞中发生;用野生型AcMNPV接种家蚕4龄幼虫后,引起非靶标的家蚕幼虫龄期延长或龄期跳跃及蛹的提前成熟,这是由于AcMNPV egt 基因在蚕体内表达产生EGT的缘故,而用缺失 egt 基因的AcMNPV感染家蚕后未改变家蚕的变态。

感染了BmNPV的家蚕幼虫,在未感染蚕(对照)就眠后继续生长,龄期延长,体躯肥大发光,最后停止取食,仍不就眠,这是由于BmNPV egt 基因的表达使蚕体内蜕皮激素失去生理功能,为了维持体内激素平衡,前胸腺一直处于分泌状态,从而促进前胸

腺的发育,使个体明显增大。

昆虫蜕皮激素对于昆虫具有重要的意义,其主要功能是控制昆虫的发育和变态。在昆虫的各个发育阶段,血淋巴中蜕皮激素的滴度严格控制在特定的水平上,被病毒感染后其血淋巴中蜕皮激素的滴度发生变化。实际上杆状病毒感染后,昆虫体内的蜕皮激素不仅没有减少,反而引起浓度升高。用LdMNPV感染吉普赛蛾,其幼虫血淋巴中蜕皮激素的浓度高于对照;前胸腺离体培养检测发现,病毒感染的吉普赛蛾前胸腺一直维持高于对照区的分泌活性,直到病毒感染的最后阶段,病毒的感染可能改变了脑对前胸腺的控制功能,结果使前胸腺一直维持在高水平的分泌状态。但高浓度的蜕皮激素被病毒产生的EGT糖基化,成为一种不具有生物活性的糖基化蜕皮酮,使蜕皮激素的滴度下降。

昆虫激素对病毒的复制和基因的表达有间接影响。给接种病毒的家蚕5龄幼虫添食或体喷蜕皮激素或保幼激素,可使杆状病毒载体表达系统的报告基因的表达量明显提高,促进病毒的复制增殖;对杆状病毒感染的宿主施用外源昆虫激素,可能部分恢复宿主体内的生理平衡。烟草角蛾添食NPV后24~28 h内每头幼虫注射蜕皮甾酮1 μg ,有明显延长发病的现象,发病死亡时间推迟2 d。

*egt*基因的缺失可以导致被感染昆虫的致死时间的缩短。当用缺失*egt*基因的AcMNPV感染甜菜夜蛾(*Spodoptera extigua*)幼虫时发现马氏管被过早破坏,而野生型病毒感染的幼虫马氏管没有变化。与野生型AcMNPV相比,缺失*egt*基因的AcMNPV感染的苜蓿尺蠖夜蛾死亡率提高。用缺失*egt*基因的BmNPV感染家蚕幼虫,可加速家蚕死亡,半死亡时间比野生型缩短20%。

4 *egt*基因对改进昆虫杆状病毒杀虫剂性能的意义

为了防治有害昆虫对农作物的危害而大量地施用化学杀虫剂,不仅导致昆虫的抗药性,而且已经成为环境污染的最主要原因之一,直接威胁着人类的健康和生存。杆状病毒具有宿主专一性和不污染环境的优点,其宿主域仅限于少数几种节肢动物,主要是昆虫,已报道被杆状病毒感染的昆虫有600多种,包括鳞翅目、膜翅目、双翅目、鞘翅目、脉翅目与毛翅目等,而对脊椎动物和除节肢动物以外的无脊椎动物、微生物及植物都无病原性。因此,昆

虫杆状病毒作为杀虫剂具有重要的经济和生态意义。自1973年美国批准美国棉铃虫(玉米夜蛾)NPV(HzNPV)作为商品制剂注册登记以来,迄今已有10多种重组杆状病毒(NPV和GV)杀虫剂研究报道,一些商品病毒杀虫剂已先后在许多国家注册并推广应用,以防治苜蓿尺蠖、斜纹夜蛾、棉铃虫、红铃虫和玉米螟等。但是目前作为杀虫剂的绝大多数工程杆状病毒的表达是在强的晚期启动子如*p10*或多角体蛋白启动子*polh*控制下,杆状病毒要经过1星期甚至更长的时间才能杀死宿主昆虫,所以杆状病毒杀虫剂主要应用于能忍耐一定程度的叶子损害而不造成明显经济损失的那些作物。过高的宿主特异性和缓慢的发病致死作用两大缺陷,使杆状病毒作为农业杀虫剂的应用受到很大的限制。因此,昆虫病毒基因工程主要集中于解决改进宿主域狭窄和致死速度慢两大问题。

利用病毒早期转录表达基因启动子,构建具有早期启动子控制的昆虫特异性毒蛋白的重组杆状病毒,在病毒感染的早期表达杀虫蛋白,可能极大地缩短昆虫的致死时间;或者表达昆虫保幼激素酯酶,减少昆虫的取食量,从而改进杆状病毒杀虫剂的性能。另一方面,可以利用杆状病毒种间遗传交换决定宿主域的DNA区段,改变病毒的宿主域。通过BmNPV解旋酶基因与AcMNPV DNA进行基因重组,获得了对家蚕细胞和Sf-21细胞都有感染性的杂交型病毒HyNPV。因此,利用对杆状病毒的遗传修饰可能加速病毒对宿主昆虫的致死效应,并扩大病毒的宿主域,从而增强杆状病毒作为杀虫剂的效率。而杆状病毒*egt*基因因为病毒复制的一个非必需的早期表达基因,删除*egt*基因,使病毒的毒性更强,半致死时间缩短20%~30%。因此,*egt*基因可作为杆状病毒杀虫剂遗传操作的候选基因之一加以研究利用。

参 考 文 献

- 1 O' Reilly DR, Miller LK. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Science*. 1998. 245(4922):1110 ~ 1112
- 2 Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Ferber ML, Possee RD. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 1994, 202:586 ~ 605
- 3 Ahrens CH, Russell RL, Funk CJ, Evans JT, Harwood SH, Rohrmann GF. The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multi-nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology*. 1997.

- 229(2):381 ~ 399
- 4 Gomi S, Kei Majima and Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol*, 1999, 80:1323 ~ 1337
 - 5 Kuzio J, Pearson MN, Harwood SH, Funk CJ, Evans JT, Slavicek JM, Rohrmann GF. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology*. 1999, 253(1):17 ~ 34
 - 6 Ijkel WF, van Strien EA, Heldens JG, Broer R, Zuidema D, Goldbach RW, Vlak JM. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol*, 1999, 80(12):3289 ~ 3304
 - 7 X Chen, Ijkel WF, Tarchini R, Sun X, Sandbrink H, Wang H, Peters S, Zuidema D, Lankhorst RK, Vlak JM, Hu Z. The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol*, 2001, 82(1):241 ~ 257
 - 8 Q Li, Donly C, L Li, Willis LC, Theilmann DA, Erlandson M. Sequence and organization of the *Manestra configurata* nucleopolyhedrovirus genome. *Virology*. 2002, 294(1):106 ~ 121
 - 9 O'Reilly DR, Miller LK. Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene. *J Virol*, 1990, 64:1321 ~ 1328
 - 10 O'Reilly DR, Brows MR, Miller LK. Alteration of ecdysteroid metabolism due to baculovirus infection of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: host ecdysteroids are conjugated with galactose. *Insect Biochem Mol Biol*, 1992, 22:313 ~ 320
 - 11 Faktor O, Toister-Achituv M, Kamensky B. Identification and nucleotide sequence of an ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Spodoptera littoralis* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virus Genes*, 1995, 11(1):47 ~ 52
 - 12 Toister-Achituv M and Faktor O. Transcriptional analysis and promoter activity of the *Spodoptera littoralis* multicapsid nucleopolyhedrovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene. *Journal of Virology*, 1997, 78:487 ~ 491
 - 13 季平, 何家禄, 吕鸿声, 吴祥甫. 家蚕核型多角体病毒 egt 基因的结构和功能分析. *病毒学报*, 2000, 16:54 ~ 58
 - 14 Xinwen Chen, Zhihong Hu, Johannes A. Jehle, Youqing Zhang and Just M. Vlak. Analysis of the Ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase gene of *Haliotis armigera* single-nucleocapsid baculovirus. *Virus Genes*, 1997, 15(3):219 ~ 225
 - 15 Evans OP, O'Reilly DR. Expression and structural characterization of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *J Gen Virol*, 1999, 80:485 ~ 492
 - 16 Evans, OP, O'Reilly DR. Purification and Kinetic analysis of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Biochemical Journal*, 1998, 330:1265 ~ 1270
 - 17 O'Reilly DR, Howarth OW, Rees HH, Miller LK. Structure of the ecdysone glucoside formed by a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Insect Biochem*, 1991a, 21:795 ~ 801
 - 18 张志芳, 何家禄, 周乃明, 华刚, 吴祥甫. 苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒在家蚕蛹体内的复制及重组病毒外源基因的表达. *蚕业科学*, 1993, 19(4):203 ~ 207
 - 19 Shikata M, Sibata H, Sakurai M, Sano Y, Hashimoto Y and Matsumoto T. The ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus alters the moulting and metamorphosis of a non-traget insect, the silkworm, *Bombyx mori* (*Lepidoptera, Bombycidae*). *J Gen Virol*, 1998, 79:1547 ~ 1551
 - 20 吕鸿声. 昆虫病毒与昆虫病毒病. 科学出版社, 1981, 263 ~ 265
 - 21 王厚伟, 张志芳, 肖庆利, 李卫国, 何家禄. 昆虫保幼激素促进家蚕杆状病毒系统的基因表达. *生物工程学报*, 2001, 17(5):590 ~ 593
 - 22 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学. 中国农业科技出版社, 1998, 162, 611 ~ 642
 - 23 Smith SL. Regulation of ecdysteroid titer synthesis. In: Kerkutu G A, Gilbert L L (eds). *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Oxford Pergamon Press. 1985, 7:295 ~ 341
 - 24 Dougherty EM, Kelley TJ, Rochford R et al. Effects of infection with a granulosis virus on larvae growth, development and ecdysteroid production in the cabbage looper *Trichophisia ni*. *Physiol Entomol*, 1987, 12:23 ~ 30
 - 25 Kelley T J, Masler E P, Thyagaraja B S, et al. Development of an in vitro assay for prothoracicotropic hormone of the gypsy moth *Lymantria dispar* following studies on the identification titers and synthesis of ecdysteroids in last-instar females. *J Comparative Physiol B*, 1992, 162:581 ~ 587
 - 26 Perk E J, Yin C M, Burand J P. Baculovirus replication alters hormone-regulated host development. *J Gen Virol*, 1996, 77:547 ~ 554
 - 27 Park EJ, Burand JP, Yin CM. The effect of baculovirus infection on ecdysteroid titer in gypsy moth larvae. *J Insect Physiology*, 1993, 39:791 ~ 796
 - 28 Yajing Zhou, Yong Zhu Yi, Qing Li Xiao, Zhi Fang Zhang, Jia Lu He, Yuan Xing Zhang. Effects of insect hormones on the replication of nucleopolyhedrovirus. *International Journal of Industrial Entomology*, 2002, 4(2):137 ~ 141
 - 29 Kinguchi K, Agui N. Ecdysteroid levels and developmental events during larval molting in the silkworm. *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, 1981, 27:805 ~ 812
 - 30 Flipsen JTM. Deletion of the baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene induces early degeneration of Malpighian tubules on infected insects. *J Virol*, 1995, 69:4529 ~ 4532
 - 31 易咏竹, 张志芳, 肖庆利, 何家禄. 宿主域扩大的苜蓿尺蠖核多角体杂交型病毒. *蚕业科学*, 2001, 27(1):75 ~ 76
 - 32 O'Reilly D R, Miller L K. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the egt gene. *Biotechnology*, 1991b, 9:1086 ~ 1089