

斜纹夜蛾核多角体病毒感染甜菜夜蛾细胞的研究*

余 倩^{1,2}

- (1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东 广州 510225
2. 中山大学有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 研究发现斜纹夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, *Splt*NPV) 不能成功感染同属甜菜夜蛾 (*S. exigua*, *Se*) 昆虫, 为深入研究 *Splt*NPV 在离体 Se301 细胞中的感染进程以及病毒感染失败的原因, 对感染后 Se301 细胞进行 DNA 复制、病毒基因转录以及病毒蛋白表达等检测。结果显示被感染的 Se301 细胞中病毒完成了 DNA 的复制和病毒早、晚期基因转录, 但检测不到极晚期基因多角体基因 (*polyhedrin*) 的表达, 病毒的蛋白表达受阻从而影响了病毒完成复制周期。研究发现病毒蛋白表达受阻是 *Splt*NPV 在 Se301 细胞中无法形成子代病毒, 完成整个病毒复制的主要原因, 这为深入研究其感染失败机理奠定了坚实基础。

关键词: 斜纹夜蛾核多角体病毒; Se301 细胞; 蛋白表达

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2011) 03-0085-05

Se301 Cells Infected by *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus

YU Qian^{1,2}

- (1. College of Light Industry and Food Science, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;
2. State Key Laboratory of Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: *Spodoptera litura* (*Splt*) and *Spodoptera exigua* (*Se*) are both extremely serious agricultural lepidopteran pests and belong to the same family (Noctuidae) and the same genera (*Spodoptera*). *Splt* nucleopolyhedrovirus (*Splt*NPV) and *Se* multiple nucleopolyhedrovirus (*Se*MNPV) are viral pathogens to the two insects, respectively. Comparative analysis of the complete genome sequences of *Splt*NPV and *Se*MNPV show two genomes are very similar. Although both the pathogens and the hosts are closely related, the mechanism of the two baculovirus not infecting the hosts each other is unclear. This study concentrate on investigating the reason of the Se301 cells by *Splt*NPV abortion infection. The replication of virus have completed in *Splt*NPV-infected Se301 cells by testing with dot blotting. The results of RT-PCR analysis displayed that all genes from very early genes to late genes have transcribed in the infected cells. Western blotting analysis revealed that it is no specific POLYHEDRIN with a size of 29 700 when using the POLYHEDRIN antiserum. Collectively, in the Se301 cells infected by *Splt*NPV, the replication of virus and the transcription of all late genes have happened, although it is not detected the expression of very late genes, suggesting that the blocking of *Splt*NPV proteins expression is the main limited factors in viral replication cycle.

Key words: *Splt*NPV; Se301 cell; protein expression

* 收稿日期: 2010-05-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30530540)

作者简介: 余倩 (1979 年生), 女, 博士; E-mail: yuqianchina@126.com

杆状病毒是一类节肢动物专一性的病毒, 它们带有杆状的核衣壳, 基因组是由大小约为 80 ~ 180 kb 双链环状 DNA 所构成^[1]。杆状病毒的宿主范围窄, 大部分杆状病毒只能感染几种昆虫甚至是专一性的一种。

杆状病毒生活周期主要分为以下几步: 进入细胞、早期基因表达、DNA 的复制、晚期基因表达、极晚期基因表达、芽生型病毒 (budded virus, BV) 的组装和释放、核多角体蛋白包含体 (occlusion-derived virus, ODV) 的形成。

斜纹夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, *SpltNPV*) 和甜菜夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus, *SeMNPV*) 的全基因组已完成测序^[2-3], 两者的基因组相似性程度高, 经研究发现两者不能交叉感染各自宿主, *SeMNPV* 感染 *SpLi*-221 细胞会引起细胞凋亡^[4], 而 *SpltNPV* 感染 *Se301* 细胞的研究还未见报导。为了了解 *SpltNPV* 感染 *Se301* 细胞的进程并寻找病毒感染失败的原因, 本研究对 *SpltNPV* 感染后的 *Se301* 细胞进行了生化分析, 发现病毒蛋白表达受阻是 *SpltNPV* 感染 *Se301* 细胞失败的主要原因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 昆虫细胞与病毒 野生型 *SpltNPV* 中山大学分离株 (ZSU strain) 由本实验室保存。SeMNPV-SeUS1 引自美国加州大学 Riverside 分校 B. A. Federici 教授实验室。甜菜夜蛾细胞 *Se301* 由荷兰 Wageningen 大学 J. M. Vlask 教授惠赠, 用 $w = 10\%$ 胎牛血清的 Grace's 培养基 (Invitrogen) 27 °C 培养。

1.1.2 供试昆虫 斜纹夜蛾、甜菜夜蛾幼虫由本实验室养虫室提供, 为人工饲料饲养的健康幼虫。人工饲料配方见参考资料^[5], 饲养温度 27 ~ 28 °C。

1.2 方法

1.2.1 病毒多角体扩增 将病毒多角体涂布于人工饲料表面喂饲感染 4 龄初的昆虫幼虫, 感染 4 ~ 5 d 后收集呈现典型病毒感染症状的幼虫 (虫体倒挂, 身体肿胀, 呈灰白色), 置室温下静置 2 至 3 天让其自然发酵 (病毒进一步成熟和虫体进一步液化)。用 10 倍的 PBS 悬浮发酵的虫尸, 经四层纱布过滤, 滤液经 3 000 r/min 离心 10 min, 沉淀物重悬于适量 PBS 中, 600 r/min 离心 5 min, 收集上清。如此重复 3 ~ 4 次, 直至多角体悬浮液呈乳白色, 光学显微镜检查在多角体悬液中杂质很少,

即为较纯的病毒多角体。

1.2.2 病虫血淋巴制备 用多角体喂饲感染四龄初昆虫幼虫, 感染 3 d 后经镜检有极少量多角体出现即取血淋巴。用 $\varphi = 70\%$ 乙醇将病虫表面消毒, 剪开腹足, 血淋巴滴入含 $w = 0.1\%$ 苯基硫脲的 Grace's 培养基中, 3 000 r/min 离心 10 min, 除去血淋巴细胞, 取上清经过滤灭菌保存, 供细胞感染用。

1.2.3 在离体培养细胞中增殖病毒 吸尽单层培养细胞中培养液, 按感染复数 (MOI) 大约为 1 的接种量接种病毒血淋巴, 室温吸附 1 h, 吸弃病毒液, 以无抗生素无血清 Grace's 培养基洗 2 次, 然后加入新鲜 Grace's 培养基, 27 °C 培养 72 h ~ 96 h 左右, 收集细胞上清, 4 °C 保存备用。

1.2.4 *SpltNPV* 病毒感染细胞 在 35 mm 培养皿中以 0.5×10^6 个细胞/孔密度接种对数生长期的 *Se301* 细胞; 贴壁 1 h 后, 移出培养基, *SpltNPV* 病毒以 MOI 为 1 感染细胞, 27 °C 培养 1 h 并间隔摇动培养板; 1 h 后弃感染液, 以无抗生素无血清 Grace's 培养基洗 2 次, 然后加入 Grace's 培养基继续培养, 加入病毒即开始计时, 于感染后不同时间收集取样, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 细胞沉淀先放入液氮速冻 30 min, 再放入 -70 °C 保存备用。

1.2.5 Dot Blotting 收取感染后细胞样品提取总 DNA 融于 8 mmol/L NaOH, 调整至终浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 测定吸光度。每个样品取 10 μL , 100 °C 煮 5 min, 冰上迅速冷却。于 Dot Blotting 装置上点样转膜。方法参照 Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus (Bio-Rad, Inc) 操作手册。主要步骤包括: DNA 固定, 探针制备和标记, 地高辛杂交, 杂交后洗膜, 检测和颜色反应。

1.2.6 RT-PCR RT-PCR 反应按 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 操作手册进行。取反应液 5 μL 进行凝胶电泳, 确认反应产物。以 RNA 为模板进行 PCR 扩增, 以检测模板是否存在 DNA 污染。所用引物序列见表 1, 引物由上海英骏生物工程公司合成。

1.2.7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

收集细胞上清, 加等量的 2 × 蛋白上样缓冲液, 于沸水中煮 5 ~ 10 min, 按常规方法在 Bio-Rad 小型蛋白电泳仪上进行恒流电泳。电泳结束后, 用考马斯亮蓝染色后用脱色液进行脱色, 观察蛋白带型。

1.2.8 Western blotting 收集病毒感染后细胞, PBS 缓冲液洗 2 次, 细胞裂解后进行蛋白电泳, 转膜, 蛋白封闭, 以制备的 POLYHEDRIN 多克隆抗体为一抗 1:500 稀释后进行 western blotting 检测,

观察蛋白表达情况。

表 1 PCR 扩增所用引物
Table 1 PCR primers used for application

Primer	Sequence (5' - 3')	Production size/bp
Splt-ie01	TGGAGAAGATGAGAGTGTAGTT	458
Splt-ie02	GATTGTGAGGCGTGTGGAAAA	
Splt-dna polymerase1	TGCTTCTACTACACCACTC	848
Splt-dna polymerase2	TACACACATCTTTCTCGGC	
Splt-chitinase1	GACTGCTGGGTATTTGATT	612
Splt-chitinase2	ACGGGTTAGTGTGTGTGT	

2 结 果

2.1 *Splt*NPV 感染 Se301 细胞后 DNA 复制情况

本实验室研究发现 *Splt*NPV 不能成功感染 Se301 细胞，而是诱导 Se301 细胞产生凋亡（资料未显示）。为研究 *Splt*NPV 在 Se301 凋亡细胞中的感染进程以及病毒感染失败的原因，首先进行 dot blotting 分析检测病毒复制，正常 Se301 样品为阴性对照，*Splt*NPV 感染 SpLi - 221 细胞为阳性对照，杂交探针为 DIG 标记的病毒 *polyhedrin* 基因 (*polyhedrin-dig*)，标准样品 (Marker) 为 *polyhedrin* 的 PCR 产物。检测结果显示：阳性对照样品在感染后 12 h 能检测到有病毒复制，且随着时间的延长病毒量越来越多；*Splt*NPV 感染 Se301 细胞样品中从 12 ~ 72 h 也能检测到病毒复制，但病毒复制的速度明显低于 *Splt*NPV 感染 SpLi - 221 细胞的复制速度，此结果说明 *Splt*NPV 感染 Se301 细胞后完成了病毒的复制但复制速度受到一定影响。

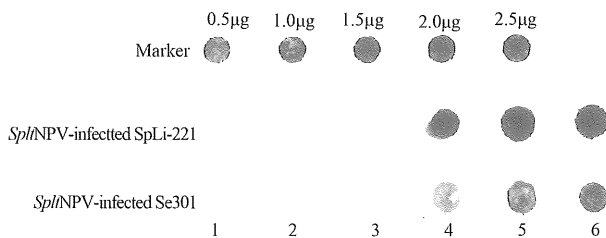


图 1 *Splt*NPV 感染 SpLi - 221 或 Se301 细胞的 Dot blotting 分析

Fig. 1 Dot blotting analysis of the infection of SpLi - 221 cells or Se301 with *Splt*NPV (1: 0 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 24 h; 5: 48 h; 6: 72 h)

2.2 *Splt*NPV 在 Se301 细胞中的转录时相

病毒基因的转录分为极早期、早期、晚期和极

晚期。极早期基因在感染后 1h 就能检测到转录，感染后 6 h 之前转录的基因为早期基因，而感染后 6h 之后转录的基因为晚期基因，且感染后 12 h 之后转录的基因为极晚期基因。*Splt*NPV 病毒在 Se301 细胞中进行了病毒的复制，可以推测病毒的早期基因应该进行了转录表达，下一步需了解病毒的晚期基因是否得到了转录及表达，从而可进一步验证早期基因是否得到了转录和表达，现采取 RT-PCR 分析病毒在 Se301 细胞中的基因转录情况。设计 3 对引物以 *Splt*NPV 基因组为模板进行 PCR 反应，首先需鉴定引物是否正确（图 2），结果显示 3 对引物都能扩增出相应大小的条带，说明设计引物无误。

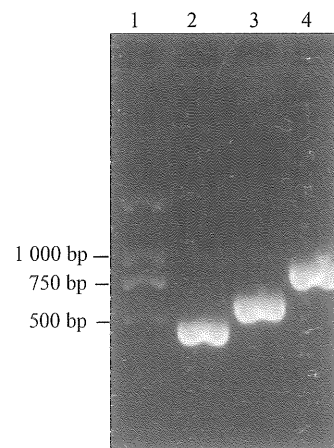


图 2 *ieo*、DNA polymerase、*chitinase* 基因的 PCR 扩增产物
Fig. 2 PCR amplification of *ieo*, DNA polymerase, *chitinase*. (1: DL2000; 2: *ieo*; 3: *chit*; 4: DNA polymerase)

为确定 *Splt*NPV 病毒在 Se301 细胞中是否完成了转录，以及各基因的转录时间与 *Splt*NPV 病毒在受纳细胞 SpLi - 221 细胞中的转录时间是否一致，进行病毒基因的转录时相分析。结果如图 3 显示：*Splt*NPV 感染 Se301 细胞 1 h 后能检测到很微弱的 *ieo* 转录本，从 4 h 至 48 h 均能检测到 *ieo* 的强转录本；DNA polymerase 基因从 6 ~ 48 h 能检测到强转录本；从 8 ~ 48 h 能检测到 *chitinase* 的强转录本。总的来讲，*Splt*NPV 感染 Se301 细胞的基因转录时相与 *Splt*NPV 感染 SpLi - 221 细胞的基因转录时相基本一致，只是极早期基因 *ieo* 至晚期也有转录。

2.3 *Splt*NPV 在 Se301 细胞中的蛋白表达

*Splt*NPV 感染 Se301 细胞后病毒的所有基因都得到了转录，病毒蛋白的表达情况又如何？采取 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析检测病毒感染 Se301 细胞后其蛋白的表达情况。由于光镜观察 *Splt*NPV 感染 Se301 细胞 48 h 时有明显病理症状

(资料未显示), 所以收取 Se301 细胞样品和 *SpltNPV* 感染 Se301 细胞 48 h 样品进行 SDS-PAGE 分析比较; Se301 细胞为 *SpltNPV* 的非受纳细胞, 感染进程可能与 *SpltNPV* 感染受纳细胞 SpLi - 221 不同, 所以收取 *SpltNPV* 感染 SpLi - 221 细胞 24、48 和 72 h (图 4 所示) 样品与 *SpltNPV* 感染 Se301 细胞 48 h 样品进行 SDS-PAGE 分析比较。结果显示: *SpltNPV* 感染 SpLi - 221 细胞无论在 24、48 和 72 h 样品中很明显都有一条 29 700 的 POLYHEDRIN 条带, 且总蛋白表达条带在 24、48 和 72 h 没有明显区别; 而正常的 Se301 细胞和 *SpltNPV* 感染 Se301 细胞 48 h 样品中没有此条带; 对正常 Se301 细胞和 *SpltNPV* 感染 Se301 细胞 48 h 样品的总蛋白带型进行比较, 观察不到蛋白带型明显的区别。所以 *SpltNPV* 感染 Se301 细胞后蛋白表达受到了一定程度的限制, 极晚期基因 *polyhedrin* 的表达受阻。

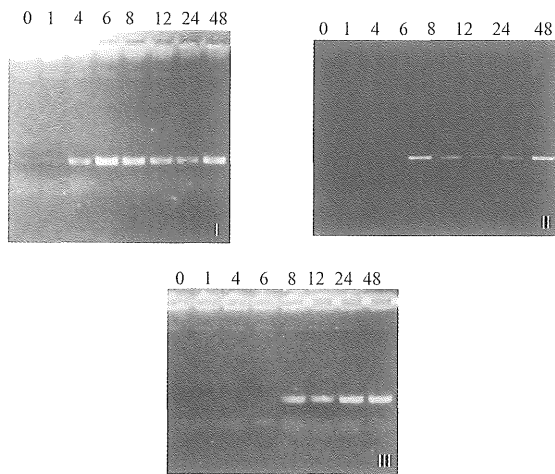


图 3 RT-PCR 分析 *ieo*、DNA polymerase、*chitinase* 基因的转录

Fig. 3 RT-PCR analysis of the transcription of *ieo*, DNA polymerase, *chitinase* genes at time points post infection (p. i.)
(I: *ieo*; II: DNA polymerase;
III: *chitinase*; Numbers above photograph indicate different the time points p. i.)

用极晚期基因 *polyhedrin* 的多克隆抗体对 *SpltNPV* 感染 Se301 细胞 24、48、72 h 样品进行 Western blotting 分析, 结果如图 5 表明细胞被感染 24、48、72 h 极晚期基因 *polyhedrin* 没有表达。总的来讲 *SpltNPV* 感染 Se301 细胞后其蛋白表达受阻, 以至于不能完成整个的病毒复制。

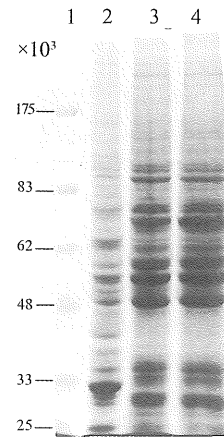


图 4 *SpltNPV* 感染 Se301 细胞 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the Se301 cells infected by *SpltNPV*

(1: marker; 2: *SpltNPV*-infected SpLi - 221 at 72 h;
3: mock Se301; 4: *SpltNPV*-infected Se301 at 48 h)

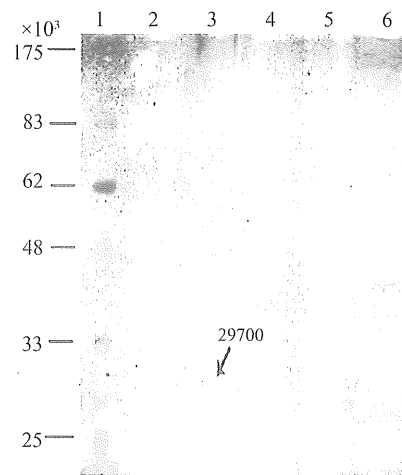


图 5 *SpltNPV* 感染 Se301 细胞 *polyhedrin* 基因 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blotting analysis of *polyhedrin* gene in the Se301 cells infected by *SpltNPV*

(1: marker; 2: mock Se301;
3: *SpltNPV*-infected SpLi - 221 at 48 h;
4 - 6: *SpltNPV*-infected Se301 at 24, 48, 72 h)

3 讨论

SpltNPV 和 *SeMNPV* 基因组相似性很高, 但这两种病毒不能交叉感染各自宿主。先前研究表明细胞凋亡是限制杆状病毒感染昆虫的主要原因之一, 早有关于杆状病毒诱导细胞凋亡从而导致病毒感染失败的报导, 如 *HycuNPV* 诱导的 Ld652Y 细胞凋亡^[6]; *HaSNPV* 诱导的 Hi5 和 s1 - zsu - 1 细胞凋亡^[7-8]; *SeMNPV* 感染 SpLi - 221 细胞会引起细胞

凋亡; *SpltNPV* 感染 Se 昆虫也可诱导昆虫体液细胞凋亡^[9], 且本实验室研究发现 *SpltNPV* 感染 Se301 细胞也诱导了细胞凋亡。

杆状病毒生活周期主要分为以下几步: 进入细胞、早期基因表达、DNA 的复制、晚期基因表达、极晚期基因表达、BV 的组装和释放、核多角体蛋白包含体的形成。*SpltNPV* 不能成功感染 Se301 细胞产生子代病毒, 即 Se301 细胞为 *SpltNPV* 的非受纳细胞。

研究显示 *SpltNPV* 感染 Se301 细胞后病毒完成了整个 DNA 复制过程, 但 DNA 复制量明显低于 *SpltNPV* 感染其原宿主细胞 SpLi - 221 细胞的 DNA 复制量, 分析其原因可能是由于病毒感染其非受纳宿主细胞感染进程受阻。DNA 复制之前是病毒早期基因的表达, 研究证实杆状病毒诱导的凋亡可由感染早期事件所引起^[10], 先前研究表明病毒的极早期基因 *ie1* 能引起由 AcMNPV 诱导的 Sf21 细胞凋亡^[11]。本研究中 *ie0* 基因的表达也可能会引起细胞凋亡, 使得大部分病毒感染失败, 只有少量病毒能完成 DNA 复制, 所以观察到病毒感染受纳和非受纳细胞 DNA 复制速度不同。

病毒转录时相分析结果表明病毒的所有基因都完成了转录, 且早期基因和晚期基因的转录时相与 *SpltNPV* 感染其原宿主的转录时相一致, 符合杆状病毒感染其原宿主的一般转录时相规律, 但实验中发现极早期基因 *ie0* 的转录在 1 h 时较正常原宿主感染量弱, 且基因转录延迟到了感染后期即 24 h 以后。一般的极早期基因转录只在感染的早期出现, 到感染后期没有极早期基因的转录, 可能由于病毒感染进程不一致, 导致一部分病毒进入感染晚期而一部分病毒还处于其它感染阶段。

经检测 Se301 细胞与 *SpltNPV* 感染 Se301 细胞的总蛋白表达情况没有明显不同, 且与 *SpltNPV* 感染 SpLi - 221 细胞总蛋白表达进行比较, 发现 *SpltNPV* 感染 Se301 细胞中无极晚期 POLYHEDRIN 蛋白的表达, Western blotting 检测结果与上述结果一致, 说明病毒的蛋白表达受到了一定程度的限制, 极晚期基因的表达受阻。

综合以上分析结果, 病毒进入细胞首先进行早期基因表达, 可能因为早期基因的表达诱导了细胞凋亡, 所以大部分病毒感染失败, 只有少量病毒进行 DNA 复制和转录, DNA 复制后病毒随即进行晚期或极晚期基因表达^[12], 由于某种未知原因, 也可能是其它因素诱导了细胞发生凋亡, 病毒晚期基因的表达受到抑制以至不能完成 BV 的装配和产生

子代病毒。总的来说, 病毒蛋白表达受阻是 *SpltNPV* 在 Se301 细胞中无法形成子代病毒, 完成整个病毒复制的主要原因, 本研究为深入研究其感染失败机理奠定了坚实基础。

致谢 本研究在中山大学庞义教授和杨凯教授的指导和帮助下完成, 谨以感谢。

参考文献:

- [1] HERNIOU E A, OLSZEWSKI J A, CORY J S, et al. The genome sequence and evolution of baculoviruses [J]. *Annu Rev Entomol*, 2003, 48: 211 - 234.
- [2] PANG Y, YU J, WANG L, et al. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome [J]. *Virology*, 2001, 287: 391 - 404.
- [3] IJIKEL W F, VAN STRIEN E A, HELDENS J G, et al. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80(12): 3289 - 3304.
- [4] YANASE T, YASUNAGA C, KAWARABATA T. Replication of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus in permissive and non-permissive lepidopteran cell lines [J]. *Acta Virol*, 1998, 42: 293 - 298.
- [5] O'REILLY D R, MILLER L K, LUCKOW V A. *Baculovirus Expression Vectors: a Laboratory Manual* [M]. New York: W H Freeman, 1992: 256 - 258.
- [6] ISHIKAWA H, IKEDA M, YANAGIMOTO K, et al. Induction of apoptosis in an insect cell line, IPLB - Ld652Y, infected with nucleopolyhedroviruses [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84: 705 - 714.
- [7] DAI X, SHI X, PANG Y, et al. Prevention of baculovirus-induced apoptosis of BTI-Tn-5B1 - 4 (Hi5) cells by the *p35* gene of *Trichoplusia ni* multicapsid nucleopolyhedrovirus [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80(7): 1841 - 1845.
- [8] 庞义, 代小江, 施先宗, 等. 两种昆虫杆状病毒诱导的细胞凋亡 [J]. *中山大学学报: 自然科学版*, 1998, 37(3): 1 - 6.
- [9] FENG G, YU Q, HU C, et al. Apoptosis is induced in the haemolymph and fat body of *Spodoptera exigua* larvae upon oral inoculation with *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus [J]. *J Gen Virol*, 2007, 88: 2185 - 2193.
- [10] LACOUNT D J, FRIESEN P D. Role of early and late replication events in induction of apoptosis by baculoviruses [J]. *J Virol*, 1997, 71: 1530 - 1537.
- [11] PRIKHODKO E A, MILLER L K. Induction of apoptosis by baculovirus transactivator IE1 [J]. *J Virol*, 1996, 70: 7116 - 7124.
- [12] THIEM S M, MILLER L K. Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus [J]. *J Virol*, 1989, 63: 2008 - 2018.