

# 乳糖作为棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白表达 诱导剂的可行性研究\*

董琳茜<sup>1</sup> 张克勤<sup>1\*\*</sup> 邱并生<sup>2</sup>

(云南大学生物资源保护与利用重点实验室 昆明 650091)<sup>1</sup>

(中国科学院微生物研究所分子病毒学开放实验室 北京 100080)<sup>2</sup>

**摘要:**乳糖不仅可以诱导棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白表达,而且表达量与IPTG(异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷)作为诱导剂时相比,并不低于后者,这样大规模生产棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白的成本就可能被降低。乳糖的最适浓度经优化为2.2%~2.5%(W/V)。对乳糖的不同除菌处理表明:0.70 $\times$ 10<sup>5</sup>Pa 15min蒸汽灭菌的乳糖可以诱导此增效蛋白表达,这种处理比滤膜过滤除菌更为方便和经济,因此就为棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白的生产提供了经济实用的前景。

**关键词:** IPTG、乳糖、棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白、T7启动子、lac UV5启动子

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-05-05

---

\* 国家发展计划委员会高技术产业化推进项目 (No. 1999-1699)

\*\* 联系人 E-mail: kqzhang1@yahoo.com.cn

收稿日期: 2003-03-03, 修回日期: 2003-07-25

# EVALUATION OF THE FEASIBILITY OF USING LACTOSE AS THE INDUCER IN PRODUCING THE VIRAL ENHANCING FACTOR FROM *HELICOVERPA ARMIGERA* GRANULOSIS VIRUS IN *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3)\*

DONG Lin-Qian<sup>1</sup> ZHANG Ke-Qin<sup>1\*</sup> QIU Bing-Sheng<sup>2</sup>

(Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Yunnan Province, Kunming 650091)<sup>1</sup>

(Open Laboratory of Molecular Virology and Biotechnology, the Institute of Microbiology,  
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)<sup>2</sup>

**Abstract:** Lactose was shown to no less competent than Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) in inducing the expression of the ENHANCIN coding gene from *Helicoverpa armigera granulosis virus* in *Escherichia coli* BL21 (DE3) regulated by a T7 promoter, since the lactose induction could lead to an ENHANCIN band no smaller than the one in IPTG induction on the SDS-PAGE gel. This would decrease the cost of the large-scale ENHANCIN production. The lactose concentration was optimized at 2.2% ~ 2.5% (w/v). Different treatments on the lactose sterilization showed that lactose steam-sterilized in 116. 5°C for 15min could lead to the ENHANCIN production. The convenience and the relatively low cost in its operation could further decrease the cost of the ENHANCIN production.

**Key words:** Lactose, IPTG, ENHANCIN, T7 promoter, lacUV5 promoter

1959 年 Tanada 发现, 粘虫 (*Pseudaletia unipuncta*) 颗粒体病毒 (granulosis virus, GV) 和核型多角体病毒 (nuclear polyhedrosis virus, NPV) 共同感染虫体时, 颗粒体病毒能提高核型多角体病毒对粘虫的感染率和死亡率, 缩短感染幼虫存活时间, 后来证明在其中起增效作用的因子是颗粒体病毒包涵体中的一种大约 100kD 的蛋白, 这种蛋白单独没有杀虫作用, 当和多角体病毒一起感染虫体时, 才表现出增效作用, Granados 从粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 颗粒体病毒中也发现了具有相同作用的蛋白, 他称其为增效因子 (viral enhancing factor, VEF)。增效因子对苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 也有很高的增效作用<sup>[1]</sup>。核型多角体病毒应用已成为害虫综合防治的一个重要环节, 但其存在着微生物农药共有的缺点, 包括毒力不够高, 致死时间过长及大规模工业化生产困难等。苏云金杆菌杀虫剂在田间使用的主要问题是防效不稳定, 残留期短和杀虫速度慢。病毒增效因子的使用可以为以上的问题提供一种解决方案。生物测定结果表明, 大肠杆菌表达的重组棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 颗粒体病毒增效蛋白可以分别提高棉铃虫核型多角体病毒和苏云金杆菌对 3 龄棉铃虫幼虫致死率 31.7% ~ 34.1%<sup>[2]</sup> 和 20.7% ~ 35.4%<sup>[3]</sup>, 在前者中半致死时间缩短了 1.5 ~ 2.1d。IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, 即异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷) 和乳糖两种诱导剂不仅在价格上有极大的差异, 而且 IPTG 对人体有毒害作用, 而乳糖不仅无毒, 而且可以作为微生物生长的碳源和能源。我们比较了二者对重组棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白的诱导效果, 优化了乳糖的使用浓度, 并比较了不同除菌处理的乳糖的诱导效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、质粒、培养和诱导方法

大肠杆菌 BL21 (DE3) 为本实验室保存, 所用表达质粒为 p ET-30a-VEF。质粒的转化采用氯化钙 (0.1mol/L) 法<sup>[4]</sup>。培养和诱导的温度为 37°C, 摇床 (innova® 4000 INCU-

BATOR SHAKER, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) 的转速为 200r/min。所用培养基为 LB。卡那霉素 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 的最终浓度为 50 $\mu$ g /mL。当转化物在温箱中生长 8h 后, 挑取单菌落于 3 mL LB (25mL 试管装) 中, 培养 12h 后, 以 3% 的接种量接于 5mL LB 中, 培养 2h 后, 加入诱导剂诱导, 4.5h 后取样分析。

1.2 分析方法

1.2.1 菌体浓度测定: 将发酵液稀释 4 倍, 以蒸馏水为对照, 用 721 分光光度计测定 600nm 下的吸光值。

1.2.2 重组增效蛋白表达检测: 取诱导后培养液 1 mL, 12,000g 离心 5min 之后, 在沉淀中加入 0.5 mL 裂解缓冲液 (20mmol/L Tris.Cl pH8, 1mmol/L EDTA), 在超声波细胞破碎仪 (B.Braun ultrasonic cell disrupter, Switzerland) 上进行破碎, 直至菌液呈清亮为止。然后 12,000g 离心 5min (Hermle Z 233M centrifuge, HERMLE-LABORTECHNIK, Germany), 沉淀中各又加入 30 $\mu$ L 的裂解缓冲液和上样缓冲液, 用加样器来回吸打混匀, 接着将样品放入沸水浴中煮 5 min。为了了解到在相同细胞数目的情况下增效蛋白的表达量, 根据上样体积与 OD<sub>600</sub> 的乘积对每个样本进行处理。积层胶和分离胶的浓度分别为 5% 和 10%, 电压分别为 50V 和 85V, 电泳仪为 Mini-PROTEAN 3 System (Bio-Rad Laboratories, Beverly, MA, USA), 方法按参考文献 [4]。凝胶分析采用复日 FR-980 生物电泳图像分析系统, 表达水平以占破碎沉淀蛋白的量表示。与带有 pET-30a 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 一同做的预实验表明增效蛋白总是一条非常清晰的带且位置易于确定, 所以就没有用蛋白质分子量标准。

1.3 乳糖的除菌处理

过滤除菌是用尺寸为 25mm, 孔径为 0.22 $\mu$ m 的国产微孔滤膜进行的。蒸汽灭菌是用国产新华牌 YXQC01 型蒸汽消毒器进行的。

2 结果与讨论

2.1 IPTG 与乳糖诱导效果的比较

如图 1 和表 1 所示, 乳糖可以诱导增效蛋白的表达, 并且增效蛋白的量并不比 IPTG 诱导的少, 所以乳糖可以作为工业化生产中的诱导物。对于这种现象的解释是: IPTG 比起乳糖诱导作用更为迅速, 因为乳糖和 IPTG 均由位于细胞膜上的乳糖透过酶负责装运, 而此酶对 IPTG 的亲合力比对乳糖的高, 并且转运的饱和和速率也要比后者高<sup>[5]</sup>, IPTG 进入细胞后可以直接作用于 lac 启动子, 而乳糖还需要经过  $\beta$ -半乳糖苷酶的作用转化为异乳糖才会起到诱导剂的作用<sup>[6]</sup>, 而 IPTG 与异乳糖具有同样的诱导效果<sup>[7]</sup>。产物的表达必定会与宿主细胞的代谢竞争能量和原材料, 所以前者对后者会有负面的影响, 如细胞生长的提前终止, IPTG 的快速诱导可能导致了这一结果。而乳糖不仅可以作为诱导物, 还可以作为碳源和能源, 而 IPTG 只能作为诱导物, 因此前者的 OD<sub>600</sub> 分别比无诱导对

表 1 诱导剂对增效蛋白表达的影响

诱导剂	OD <sub>600</sub>	表达水平 (%)
未诱导	3.5	未测
0.1mmol/LIPTG	2.72	6.9
0.4mmol/LIPTG	3.16	7.8
1.0mmol/LIPTG	2.92	5.7
2.0mmol/LIPTG	3.05	6.6
0.36% (W/V) 乳糖	4.48	9.4
0.72% (W/V) 乳糖	4.6	9
1.05% (W/V) 乳糖	4.4	6.4
1.37% (W/V) 乳糖	4.72	10.9
1.68% (W/V) 乳糖	4.7	11.3

照和 IPTG 的高大约 19% 和 50% (见表 1), 这与有关文献的报道一致<sup>[8]</sup>。另外, 在无诱导对照中, 可以看到一条增效蛋白的带, 说明可能有一些 T7RNA 聚合酶的基本水平的表达, 这与有关文献报道结果一致<sup>[9]</sup>。电泳图中的未诱导对照整体背景与有诱导的有差异, 这可能是由于各个带所代表的蛋白表达量不一致。与 IPTG 相比, 利用乳糖作为诱导剂其诱导过程更为复杂, 也正因为如此, 迄今为止仅有少量利用乳糖作为诱导剂诱导重组产物表达的研究报道。

## 2.2 乳糖使用浓度的优化

如图 2 和表 2 所示, 2.2% 和 2.5% (过滤除菌) 两个浓度可以诱导最高的表达量, 即分别为破碎沉淀总蛋白的 8.1% 和 7.9%。对于本文所用的表达系统而言, 对 lac 启动子起阻遏作用的因子是由位于宿主染色体上的 lacI 编码的蛋白, 对于一定量的宿主而言, 此蛋白的量应该是一定的, 而相应的诱导物 (通过与此蛋白结合而使其发生构象变化, 从而解除对 lac 启动子的阻遏作用) 的量也应该是一定的, 所以在一定的条件下, 并不是诱导物的浓度越高越好, 对于乳糖这样一种又可以做碳源和能源的诱导剂来说, 有一部分会被菌体代谢利用, Gombertd 等人利用同样的表达系统, 就曾发现没有被菌体利用完的残留乳糖的浓度对诱导是有重要影响的, 并提出乳糖的最适浓度为 20-55g/L<sup>[10]</sup>, 而本文中此浓度约为 22~25 g/L。另外, 对于诱导之前不同的菌体浓度而言, 应该都存在一个诱导物的最适浓度, 高于它则诱导物的转运, 转化以及产物的快速表达对菌体生长或产物表达都有抑制作用, 而低于它则不足以引起充分的诱导和表达。另外, 最适浓度还与培养基的成分, 培养温度, 采取的发酵方式 (如一次补料或分批补料) 以及诱导物的添加方式等有关。

表 2 乳糖浓度对增效蛋白表达的影响

乳糖浓度 (%)	OD <sub>600</sub>	表达水平 (%)
0	3.18	未测
0.71	4.20	8.2
1.05	4.36	7.2
1.40	4.28	7.5
1.68	4.24	6.4
1.88	4.20	7.4
2.20	4.36	8.1
2.51	4.10	7.9
2.83	4	7.2

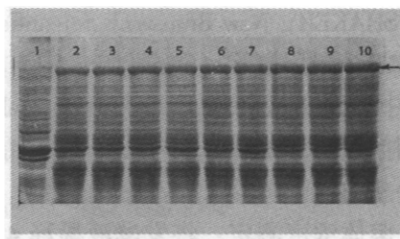


图 1 乳糖 (过滤除菌) 或 IPTG 诱导增效蛋白表达的 SDS-PAGE

1 未诱导的对照, 2~5 IPTG 终浓度分别为 0.1, 0.4, 1.0, 2.0mmol/L, 6~10 乳糖终浓度分别为 0.36, 0.72, 1.05, 1.37, 1.68% (W/V)

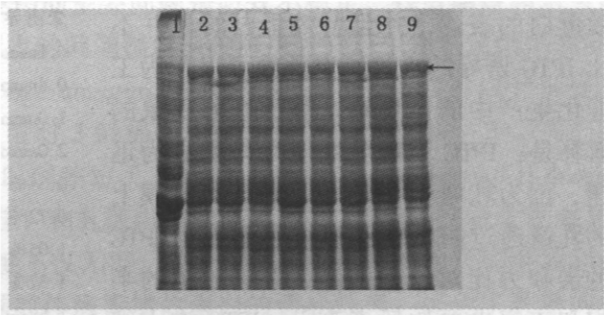


图 2 不同浓度的乳糖 (过滤除菌) 诱导增效蛋白表达的 SDS-PAGE

1 未诱导的对照, 2~9 乳糖终浓度分别为 0.71, 1.05, 1.40, 1.68, 1.88, 2.20, 2.51, 2.83% (W/V)

## 2.3 不同除菌处理的乳糖的诱导效果的比较

如图 3 和表 3 所示, 蒸汽灭菌的乳糖可以诱导增效蛋白的表达。所有蒸汽灭菌处理

中, 116.15min 的表达量最高, 加入和未加入卡那霉素时分别为 11.8% 和 10.8%, 尽管过滤除菌的分别比之高 4.3% 和 2.7%, 但由于蒸汽灭菌更为经济和方便, 所以发酵工业上最适处理为蒸汽灭菌  $0.70 \times 10^5 \text{ Pa}$  15min。

### 3 结论

乳糖是一种天然的 lac 启动子的诱导物, 具有无毒, 价廉的优点。然而由于乳糖的转运和转化比起 IPTG 来复杂, 同时它还可以作为碳源和能源, 因此宿主细胞在利用它作为诱导物时, 在生理代谢方面会有一系列复杂的变化, 需要对菌体生长及诱导条件乳

表 3 乳糖灭菌对增效蛋白表达的影响

灭菌处理	OD <sub>600</sub>	表达水平(%)
过滤除菌(加有卡那霉素)	4.64	16.1
过滤除菌(无卡那霉素)	4.64	13.5
$1 \times 10^5 \text{ Pa}$ 30min(加有卡那霉素)	4.32	11.4
$1 \times 10^5 \text{ Pa}$ 30min(无卡那霉素)	4.58	7.8
$0.70 \times 10^5 \text{ Pa}$ 30min(加有卡那霉素)	4.46	8.1
$0.70 \times 10^5 \text{ Pa}$ 30min(无卡那霉素)	4.46	11.4
$0.70 \times 10^5 \text{ Pa}$ 20min(加有卡那霉素)	4.46	8.3
$0.70 \times 10^5 \text{ Pa}$ 20min(无卡那霉素)	4.48	11.5
$0.70 \times 10^5 \text{ Pa}$ 15 min(加有卡那霉素)	4.46	11.8
116.5℃ 15 min(无卡那霉素)	4.48	10.8

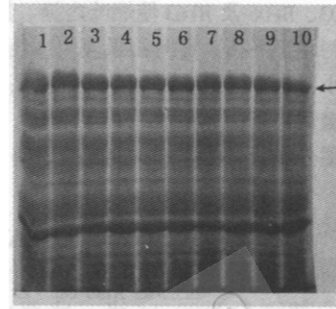


图 3 不同除菌处理的乳糖诱导增效蛋白表达的 SDS-PAGE

糖浓度为 2.2% (W/V), 奇数处理加有卡那霉素, 偶数则无, 1 和 2 过滤除菌, 3 和 4 蒸汽灭菌  $1 \times 10^5 \text{ Pa}$  30min, 5 和 6  $0.70 \times 10^5 \text{ Pa}$  30mins, 7 和 8  $0.70 \times 10^5 \text{ Pa}$  20min, 9 和 10  $0.70 \times 10^5 \text{ Pa}$  15 min

进行更为精细的研究和优化。本文比较了乳糖和 IPTG 的诱导效果, 实验证明乳糖可以诱导棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白在大肠杆菌中的表达量与 IPTG 作为诱导剂相比, 并不低于后者, 因此使用大肠杆菌大规模生产棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白的成本可以大大降低。乳糖诱导的最适浓度经优化测定为 2.2% ~ 2.5% (W/V)。对乳糖的不同除菌处理表明:  $0.70 \times 10^5 \text{ Pa}$  15min 蒸汽灭菌的乳糖可以最有效诱导增效蛋白表达, 这种处理比滤膜过滤除菌更为方便和经济, 这为棉铃虫颗粒体病毒增效蛋白的生产提供了经济实用的前景。

### 参考文献

- [1] Hashimoto Y, Corsaro B G, Granados R R. J Gen Virol, 1991, 72: 2645 ~ 2651.
- [2] 刘相国, 杨 恭, 邱并生, 等. 微生物学报, 2000, 40 (4): 379 ~ 383.
- [3] 刘相国, 杨 恭, 邱并生, 等. 微生物学报, 2001, 41 (2): 167 ~ 172.
- [4] J 萨姆布鲁克, E F 费里奇, T 曼尼阿蒂斯编著. 分子克隆实验指南 (第二版). 北京: 科学出版社, 1993.
- [5] Laffend L, Shuler M L. Biotechnol Bioeng, 1994, 43: 399 ~ 410.
- [6] Jobe A, Bourgeois S. J Mol Biol, 1072, 69: 397 ~ 408.
- [7] Mattanovich D, Kramer W, Littich C, et al. Biotechnol Bioeng, 1998, 58: 296 ~ 298.
- [8] Donovan R S, Robinson C W, Click B R. Can J Microbiol, 2000, 46: 532 ~ 541.
- [9] Studier F W, Moffatt B A. J Mol Biol, 1986, 189: 113 ~ 130.
- [10] Gombert A K, Kilikian B V. J Biotechnol, 1998, 60: 47 ~ 54.