

## 昆虫保幼激素促进家蚕杆状病毒系统的基因表达

王厚伟<sup>1,2</sup> 张志芳<sup>1,\*</sup> 肖庆利<sup>1</sup> 李卫国<sup>2</sup> 何家禄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(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,镇江 212018)

<sup>2</sup>(山东农业大学蚕学系,泰安 271018)

关键词 家蚕,保幼激素,杆状病毒表达系统,表达效率

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)05-0590-04

杆状病毒表达载体系统(Baculovirus Expression Vector System, BEVS)的一个最大优点是外源基因的高效表达(Hyperexpression)。但是,不同的外源基因在 BEVS 系统中的表达水平相差很大,较低的如  $\alpha$ -干扰素,表达量为 1~5mg/L 培养细胞;高的如  $\beta$ -半乳糖苷酶,表达量可达 600mg/L 培养细胞。外源基因在 BEVS 系统中表达量受到诸多因素的影响,如细胞的类型与质量,外源基因蛋白的性质,启动子序列的完整性,是否为融合蛋白等<sup>[1]</sup>。如何使外源基因在 BEVS 系统中高效表达,是近年来该领域中研究最活跃的方向之一。已证实家蚕杆状病毒的表达量受宿主遗传型的影响,最低和最高的遗传型相差达 7 倍以上<sup>[2]</sup>。林水中等发现家蚕饲料中添加适当浓度的硫酸铜可提高外源基因单位表达量 10% 左右<sup>[3]</sup>。杆状病毒在复制循环中表现出两种类型:芽生病毒和包涵体病毒,其中芽生病毒引起宿主体内不同组织间的感染,包涵体病毒则引起宿主之间感染<sup>[1]</sup>。杆状病毒基因组中蜕皮激素尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶(*egt*)基因影响激素在宿主体内的平衡<sup>[4]</sup>, *egt* 基因通过糖基化作用使蜕皮激素失活,打破宿主体内的激素平衡,延长幼虫期,以利于病毒的增殖<sup>[5]</sup>。家蚕血淋巴中保幼激素(Juvenile hormone, JH)的滴度同样决定着幼虫发育的进程<sup>[6]</sup>, 本文通过体表使用保幼激素,以研究保幼激素对家蚕核型多角体病毒和宿主之间的相互关系及对外源基因表达量的影响。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 家蚕与病毒

供试蚕品种:本实验室保存的高表达家蚕品种 JY1。除特别说明外,家蚕 5 龄幼虫平均饲养温度为 25~27℃。

重组病毒:本实验室构建的由多角体蛋白基因启动子控制植酸酶基因表达的重组家蚕核型多角体病毒(Bm-Phy)<sup>[7]</sup>。

野生型病毒:本实验室保存的野生型家蚕核型多角体病毒镇江株(BmNPV ZJ-8)。

#### 1.2 病毒感染与保幼激素处理

在五龄饲食后 48h,用微量注射器向每头家蚕接种  $5.0 \times 10^5$  pfu 病毒,常规饲养,按照不同实验要求体喷保幼激素类似物 ZR-515<sup>[8]</sup>(山东农业大学崔为正博士馈赠),调查不同时间的家蚕体重。

#### 1.3 植酸酶活力测定与多角体的计数

每种处理设 3 次重复(3×15 头健康的平均体重相近的 5 龄幼虫),至发病呈濒死状态时收集病蚕血淋巴, -20℃ 保存待用,用于植酸酶活力测定和多角体计数。植酸酶活力测定:稀释后的血样 0.1mL,加入 0.9mL 的底物(1mmol/L 植酸钠,0.25mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液, pH5.5), 37℃ 水浴 30min, 加入 10% TCA 终止反应,加入 2mL 铁钼蓝染料染色 5min,测定波长为 750nm 处酶液的吸光度。用磷标准液(磷酸二氢钠或磷酸二氢钾)测定标准曲线。1 个酶活标准国际单位(u)定义为指定温度(37℃)反应时每分钟释放出 1 $\mu$ mol 无机磷所需的酶量<sup>[7]</sup>。

经超声波破碎过的血样稀释一定倍数,用血球计数板在显微镜下计数每毫升血淋巴中多角体数目。

### 2 结果与分析

#### 2.1 JH 浓度对植酸酶基因在家蚕中表达量的影响

植酸酶基因在家蚕五龄幼虫血淋巴中的表达量高低由每头家蚕血淋巴含量和单位血淋巴中植酸酶活力的大小决定。在家蚕 5 龄幼虫起蚕后 48h 注射重组杆状病毒,接种 24h 后体喷 50ppm、100ppm、150ppm 的保幼激素,调查病蚕体重,收集血样,测定植酸酶的活力。

使用不同浓度外源性昆虫 JH 后,经差异显著性检验,可以显著提高感染重组病毒的家蚕 5 龄幼虫体重,而且提高了植酸酶基因在家蚕幼虫血淋巴单位体积的表达量。图 1 以对照的体重和单位血淋巴中植酸酶活力为指数,比较了 JH 浓度对表达量的影响。在低浓度 JH 区,随着 JH 浓度的增

收稿日期:2001-01-16,修回日期:2001-05-24。

基金项目:国家自然科学基金(39970571)和高技术研究发展计划项目。

\* 通讯作者。Tel:86-511-5616659; Fax:86-511-5615044; E-mail: zjsbsri@public.zj.js.cn

加,病蚕体重和植酸酶的表达量均逐渐升高,当 JH 浓度为 100ppm 时,二者均达最大值,此后,随着 JH 浓度的增加,病蚕体重和表达量反而逐渐降低。方差分析和显著性测验结果表明,100ppm 的 JH 处理无论病蚕体重,还是单位血淋巴体积的植酸酶表达量均显著高于对照。由图 1 可知:经 100ppm 的 JH 处理后,病蚕的体重增加了 12.4%,每毫升家蚕血淋巴中植酸酶的活力单位增加了 16.4%。由于 5 龄家蚕血淋巴的含量占蚕体重比例较为稳定,约为 25%。由此可以推算出每条蚕的平均表达量比对照高出 30.86%。

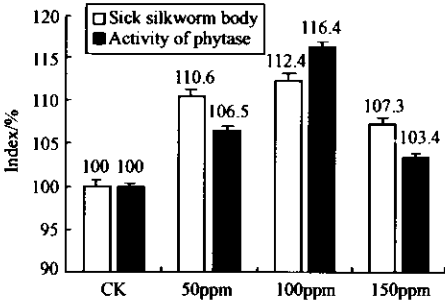


图 1 JH 浓度对植酸酶基因在家蚕中表达的影响  
Fig.1 Effect of different JH concentration on the expression of phytase gene in silkworm

2.2 不同发育阶段使用 JH 对植酸酶基因在家蚕中表达量及病蚕半致死时间的影响

从 5 龄起蚕后开始,每隔 24h 用 100ppm 的 JH 体喷饲食后 48h 感染重组杆状病毒的家蚕,对照区只注射病毒,不做 JH 处理,充分发病后调查病蚕体重;收集血样,测植酸酶的活力;并调查各 JH 处理时间对病蚕半致死时间的影响。

表 1 JH 不同使用时间对感染重组植酸酶病毒的家蚕幼虫体重和表达量的影响

Table 1 Effect of JH on the weight and expression level of silkworm infected with recombinant baculovirus containing phytase gene at different treating time

Time of using JH/h	Mean weight of sick silkworm/g	Index	Mean activity / (u/mL)	Index
CK	3.85d	100	177.18a	100
0	4.26a	110.65	235.18b	132.74
24	4.06c	105.45	225.80b	127.44
48	4.08bc	105.57	225.16b	127.08
72	4.21ab	109.35	224.21b	126.54
96	3.98cd	103.38	218.65b	123.41
120	3.88d	100.78	207.21b	116.55

Note: Small letter means 5% remarkable level; Capital letter means 1% extremely remarkable level

0~72h 使用 JH,病蚕体重均显著高于对照;96h 后使用,则与对照之间没有明显差异。其中,起蚕和起蚕后 72h 使用 JH,病蚕体重较大,极显著高于对照。

不同 JH 使用时间对重组杆状病毒外源植酸酶基因在 5 龄家蚕幼虫血淋巴中的表达量影响差异不显著,但均显著高于不使用 JH 的对照。

从重组病毒感染后 96h 开始,调查每种处理的病蚕死亡率。试验结果表明(表 2):JH 的使用可明显延长病蚕的半致死时间,24h 与 72h 使用 JH 可使病蚕发病时间较对照延长 4h 以上;其他时间使用 JH 均使发病时间延长 2~3h 左右。

综合以上试验结果,JH 的不同时间使用均可不同程度使病蚕体重增加和延长基因表达时间,与对照相比均可提高外源基因表达量,但相互之间差异不显著,综合以上试验结果认为,在家蚕 5 龄幼虫起蚕或起蚕后 72h 使用外源性昆虫保幼激素,对重组杆状病毒外源基因表达量提高的效果最佳,但从家蚕饲养要求考虑,认为以起蚕后 72h 使用为好。

表 2 JH 使用时间对感染重组杆状病毒五龄家蚕幼虫半致死时间的影响  
Table 2 Effect of JH on the LT<sub>50</sub> of 5th instar silkworm infected with recombinant baculovirus at different treating time

Time of using JH/h	Death rate of the different time of using JH/%			
	116h	120h	124h	LT <sub>50</sub>
0	25.86	51.72	75.86	119.77
24	13.46	40.38	82.69	120.91
48	20	70.9	89.09	118.6
72	21.05	47.37	82.47	120.30
96	16.67	60	85	119.08
120	29.31	65.51	87.93	118.29
CK	42.58	78.25	94	116.83

2.3 JH 处理下的植酸酶基因表达时相

在家蚕 5 龄幼虫起蚕后 48h 注射重组植酸酶病毒,病毒感染后 24h 体喷 100ppm 的 JH,从起蚕后 60h 开始每 12h 调查病蚕体重,并测定植酸酶活力。

由图 2 可见:病毒感染后 84h 之前,JH 处理病蚕的体重低于对照;之后,JH 处理开始高于对照;此时对照区已开始发病,病蚕体重下降,至感染后 108h 对照病蚕已完全充分发病,而经 JH 处理则推迟 6h。最终充分发病时病蚕体重 JH 处理较对照高 7% 左右。

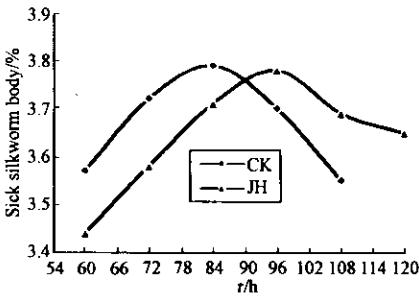


图 2 JH 在重组病毒感染后不同时间对病蚕体重的影响  
Fig.2 Effect of JH on the sick silkworm body at different time of infection

由图 3 可见:病毒感染的前 96h,JH 处理与对照之间植酸酶基因的表达量差异不显著,甚至 JH 处理的表达量略低于对照,96h 以后,JH 处理的表达量开始明显高于对照区,至

- [7] WANG W B(王文兵) Structure and function of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus sod gene and studies on application of BmNPV-silkworm expression system. *Doctor Thesis of Postgraduate College of Chinese Academy of Agricultural Sciences* (中国农业科学院研究生院博士论文), 1999, 5
- [8] MU Z M(牟志美), CUI W Z(崔为正), ZHANG Y Y(张友英). Effect of united application of juvenile hormone and ecdysone on the micro-structure of post silk gland of silkworm. *Acta Sericologica Sinica* (蚕业科学), 1996, 22(2): 125 ~ 127
- [9] Kool M, Ahrens C, Vlak J, et al. Replication of baculovirus DNA. *J Gen Virol*. 1995, 76: 2103 ~ 2118
- [10] Research Department of Physiology and Pathology of Jiangsu Sericulture Institute(江苏省蚕业研究所生理病理研究室) et al. *Acta Entomologica Sinica* (昆虫学报), 1974, 17(3): 290 ~ 302

## Insect Juvenile Hormone Enhancing Gene Expression in Silkworm Baculovirus Vector System

WANG Hou-Wei<sup>1,2</sup> ZHANG Zhi-Fang<sup>1\*</sup> XIAO Qing-Li<sup>1</sup> LI Wei-Guo<sup>2</sup> HE Jia-Lu

<sup>1</sup> (Key Laboratory of Silkworm Biotechnology, Ministry of Agriculture; The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China)

<sup>2</sup> (Department of Sericultural of Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract** 5th instar silkworms were infected with recombinant baculovirus containing phytase gene or wild type BmNPV at 48hr after ecdysis, then treated with 100ppm Juvenile hormone. It showed that the expression level of phytase gene and polyhedrin gene per silkworm was increased by 30% and 40%, respectively. The LT<sub>50</sub> was lengthened for more than 4h, and the average weight of sick silkworm was increased by 10%. The results indicated that the improvement of expression efficiency of phytase gene and polyhedrin gene was mainly caused by longer time of virus replication in silkworm after the treatment of Juvenile hormone.

**Key words** silkworm, Juvenile hormone, baculovirus expression system, expression efficiency

Received: January 16, 2001

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China(39970571) and by Project of Programs for High Technology Research and Development.

\* Corresponding author. Tel: 86-511-5616659; Fax: 86-511-5615044; E-mail: zjsbsri@public.china.net.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>