

# 重组杆状病毒生物杀虫剂的研究进展

农 广 庞 义

(中山大学生命科学学院生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

目前, 发展安全有效、替代化学农药的生物杀虫剂是害虫防治的主要趋向。杆状病毒是 WHO 推荐的一种生物杀虫剂, 它具有以下优点: 是昆虫的病原体, 对脊椎动物和植物无害; 有专一的寄主范围, 不会危及天敌昆虫; 病毒以粒子存在, 外有包被, 可离开宿主存活相当长的时间; 其杀虫作用具有流行性和持续性, 甚至可长期控制害虫的大规模发生。

许多野生型核型多角体病毒(NPV)已被用于森林、果园等多年生植物的害虫防治, 并取得了较理想的效果, 我国在棉铃虫控制方面, NPV 病毒杀虫剂也投入了商品化应用。然而, 野生型 NPV 杀虫剂在大田的应用并不十分成功, 限制其杀虫效果的主要因素是毒力低、杀虫范围窄、杀虫速度慢而超过经济可承受阈值。这些因素妨碍了病毒杀虫剂的商品化和推广应用。

生物工程改造野生型病毒是改进病毒杀虫剂性能的最有效途径。利用 DNA 重组技术对杆状病毒进行改造的策略主要有三方面: (1) 利用昆虫自身发育过程存在和产生的激素和酶; (2) 表达外源的毒蛋白或酶蛋白; (3) 病毒基因组内基因的重组和修饰。

## 1 整合激素和酶基因的重组病毒

昆虫正常的生理代谢是受自身激素和酶的调控, 重组杆状病毒表达某些激素和酶, 使之处于一个高水平, 从而破坏虫体正常的代谢和调节功能, 致使昆虫停食和加速死亡。

**1.1 利尿激素的表达** 昆虫体内水分平衡的控制是由利尿激素和抗利尿激素来调节, 过量的利尿激素会导致昆虫失水和加速死亡。Maeda 根据烟草天蛾(*Manduca sexta*)利尿激素的氨基酸序列, 人工合成利尿激素基因, 并

在 3'-端加上黑尾果蝇(*Drosophila melanogaster*)编码分泌肽的序列, 再将此人工基因插入到家蚕核型多角体病毒的多角体蛋白基因启动子下游, 获得了无多角体的重组病毒, 经注射感染家蚕幼虫, 杀虫速度有所改进<sup>[1]</sup>。

**1.2 保幼激素酯酶的表达** 保幼激素酯酶能使最后一龄幼虫的保幼激素水解和钝化, 从而导致幼虫停止进食和开始蜕皮。Hammock 等将烟草夜蛾(*Heliothis virescens*)分离到的 JHE 蛋白进行了部分序列分析, 据此人工合成探针, 从烟草夜蛾的 cDNA 文库中克隆到完整的 jhe 基因, 并插入到 AcNPV 的多角体蛋白基因启动子下游, 生物测定显示重组病毒使 1 龄幼虫减少进食和降低生长速度, 但对晚龄幼虫无显著作用<sup>[2]</sup>。用 jhe 基因取代苜蓿丫纹夜蛾(AcNPV)基因组中的 egt 基因, 重组病毒感染 4 龄的幼虫, 其体内 JHE 含量比对照组高 40 倍, 但幼虫的发育和死亡时间与对照没有差别<sup>[3]</sup>。这可能与昆虫自身调节作用有关, 事实上, 感染昆虫可停止合成自身基因组的蛋白而补偿由于感染重组病毒导致的过量表达, 寄主也可增加一种蛋白的合成而抑制相应的激素或酶蛋白的合成<sup>[4]</sup>。

**1.3 表达反义 RNA 的重组病毒** 反义 RNA 在医药和植物抗病方面有大量报道。作为杆状病毒杀虫剂, 可利用反义宿主基因构建重组病毒, 产生抗宿主基因的反义 RNA, 由此引起昆虫代谢异常, 或提高昆虫细胞对杀虫剂的敏感性, 从而达到杀虫的目的。Sivasubramanian 等对 AcNPV 的 gp64 基因 mRNA 的反义

RNA进行了研究,发现gp64mRNA及其反义RNA均在DNA同一区域转录,反义RNA对mRNA有阻遏作用。实验结果显示了表达反义RNA的杆状病毒的应用潜能。Shotkoski和Fallon在反义RNA杀虫能力方面进行了尝试,首先将二氢叶酸还原酶(DHFR)的反义RNA与一个热休克基因启动子融合,转染蚊虫细胞系,在28℃时反义RNA不表达,经34℃温和热刺激,反义RNA开始表达,结果阻遏了DHFR mRNA的转录,使DNA合成受阻而导致死亡<sup>[5]</sup>。由于反义RNA直接在转录阶段起作用,避免了基因表达过程中蛋白质转译水平上合成和加工过程中可能产生的障碍,因而能迅速有效地起作用,反义RNA重组病毒正日益引起人们的重视。

## 2 整合外源基因的重组病毒

在杆状病毒中插入外源基因,表达毒蛋白或酶蛋白,直接、迅速地起到杀虫作用,克服了与昆虫代谢调节有关的问题,有效地提高杀虫能力。

**2.1 苏云金杆菌 $\delta$ -内毒素的表达** 苏云金杆菌是目前广泛应用的生物杀虫剂,将 $\delta$ -内毒素基因插入到杆状病毒,构成复合杀虫效价的生物杀虫剂,已有不少研究报道。

Merryweather等将全长的*kurstaki*亚种的cryIA(c)基因插入到AcNPV的p10启动子下游,在感染细胞内产生全长的原毒素,但对AcNPV的杀虫效果没有增强,原毒素经饲喂能杀死寄主幼虫<sup>[6]</sup>。Martens等将全长的cryIA(b)基因插入到AcNPV的多角体蛋白基因编码区,重组病毒在感染细胞内表达并产生大晶体,重组病毒杀虫效果没有改进,只是所产生的晶体饲喂试验证实表现出细菌晶体毒素的杀虫作用<sup>[7]</sup>。庞义等将全长的cryIVD插入到AcNPV多角体蛋白基因启动子下游,得到与Martens相似的结果<sup>[8]</sup>。分析认为这与 $\delta$ -内毒素的杀虫机制有关,因为昆虫在感染细胞内产生全长基因编码的原毒素,而胞内不具备昆虫中肠的碱性环境和特异蛋白酶,以使原毒素降解成有活性的毒性肽,并且胞内缺乏毒蛋白结

合的膜受体,这些因素都限制了产物毒力的作用。庞义等将截短的cryIVD基因同样构建到多角体基因启动子下游,测到了CryIVD蛋白的表达,但产物没有杀虫毒性<sup>[8]</sup>,推测基因截短后,产物丧失毒性。这里牵涉到活性毒性肽段的精确定位问题,但理论上表达毒性肽段的重组病毒是可能的。

上述研究表明,利用苏云金杆菌 $\delta$ -内毒素构建重组病毒,面临着两大难题:一是如何产生有毒性的毒素多肽,同时,若有毒力的多肽在胞内表达,则会迅速杀死寄主,那重组病毒的生产 and 积累又成了另一个严重的问题。为此,研究在特定条件下(如温度或药物敏感)不表达毒素基因的重组病毒,可能是一种较好的解决途径。

**2.2 昆虫专性神经毒素的表达** 表达昆虫专性神经毒素的重组病毒是迄今最为成功的重组病毒杀虫剂。自然界中某些种类的蝎子、蟾和蜘蛛能产生神经毒素,通过影响神经元的钠离子传导,产生突触前兴奋而迅速麻痹昆虫,使之停止进食而不为害作物,但并不影响病毒在虫体中增殖,并最终杀死寄主。神经毒素使害虫迅速麻痹并停止进食,能有效地减少害虫对农作物的破坏。

Stewart等根据北非蝎子(*Androctonus australis*)的昆虫专性神经毒素蛋白序列,人工合成毒素基因,并将AcNPV的膜蛋白gp64分泌性信号肽编码区加到毒素基因5'一端,然后插入到AcNPV基因组中表达,免疫标记证实神经毒素分泌到感染细胞外起作用。生物测定显示,半致死剂量(LD<sub>50</sub>)有不太大但明显的降低,而存活50%的时间(ST<sub>50</sub>)比对照组降低25%;在甘蓝叶试验发现,叶子损失比野生型病毒对照组减少50%<sup>[9]</sup>。Maeda等也作了近似的研究报道<sup>[10]</sup>。

国内姚斌等同样利用蝎子神经毒素融合gp67蛋白信号肽,根据多角体基因及植物基因对密码子的偏爱性进行优化而构建人工基因,以提高毒素的表达效率,将人工基因插入到TnNPV的p10启动子下游表达,测得重组病毒毒素表达量占p10表达量的70%,半致死时

间(LT<sub>50</sub>)降低了50%<sup>[11]</sup>。

此外, Tomalski 和 Miller 从蒲氏螨(*Pyemotes tritici*)的cDNA文库中分离到神经毒素基因 Txp-1, 再插入到多角体蛋白基因编码区内, 得到不产多角体的重组病毒, 对5龄的大蜡螟幼虫(*Galleria mellonella*)注射感染, 2d内引起麻痹和停食, 但死亡时间与野生型对照组相同; 另外, 同时构建了产包含体的重组病毒, 经饲喂幼虫, 3d后有60%麻痹, 而野生型仅5%, 6d后两组幼虫皆死亡<sup>[12]</sup>。这是第一株在应用上表现成功的重组病毒。

但是有的研究报道显示, 并不是所有神经毒素重组病毒都能够达到预期目的。Carbonell 等将蝎子(*Buthus epeus*)的昆虫专性麻痹神经毒素 BeIT 基因插入到 AcNPV 多角体蛋白基因的启动子下游, 毒素基因在胞内有高水平转录, 但只检测到少量的基因表达产物, 并且感染细胞的提取物无致瘫活性<sup>[13]</sup>。推测其原因可能是与翻译效率不高和产物不稳定有关。庞义等在 AcNPV 基因组中插入昆虫专性的蜘蛛神经毒素基因, 也表现出类似结果(个人通讯)。

还有报道利用外源的蛋白酶基因在 NPV 中表达。某些颗粒体病毒的毒力增强因子是包含体中的一种蛋白, 能引起昆虫细胞间围食膜的结构性糖蛋白降解, 造成暂时性的膜结构破坏, 因而可大大地增强病毒的侵染。在1990年第五届国际无脊椎动物病理学和微生物防治进展研讨会上, Ganados 等提出了将 vef 基因插入到 NPV 基因组改造杀虫能力的设想, 有研究者也开展了将粉纹夜蛾(*T. ni*)颗粒体病毒 vef 基因重组到 AcNPV 的研究。另外, Gopalakrishnan 等在美国化学学会 205 次会议上报告利用几丁质酶基因, 将其插入到多角体蛋白基因启动子下游, 在感染细胞中得到表达。几丁质酶与毒力增强因子有类似的作用, 能降解昆虫围食膜, 但研究没有进一步的杀虫试验报道。

### 3 异源重组病毒

杆状病毒基因组之间存在许多同源序列,

在其感染的 DNA 复制过程中, 常可发生交换重组, 产生新的重组特性, 从而可影响杀虫毒力和寄主范围。

Groizier 等用 AcNPV 和 RoNPV 共感染大蜡螟幼虫, 得到不同于两个亲本的重组病毒, 共感染 Tn-368 细胞, 发现有7%病毒发生重组。而用病毒的 DNA 酶切片段与完整的病毒 DNA 共感染细胞, 可获得更高频率的重组<sup>[14]</sup>。Gonzalez 等以多角体缺陷的 AcNPV 为亲本病毒, 经共转染插入了草地夜蛾核型多角体病毒(SfNPV)的多角体基因, 所得的 AcNPV / SfNPV 杂交株病毒产生的多角体比两个亲本的多角体都小, 表现出新的重组特性<sup>[15]</sup>。Kondo 和 Maeda 用 SINPV 的三个株系及 AcNPV 的一个变异株分别与 BmNPV 共转染非复制允许的细胞系, 得到了扩大杀虫谱的重组病毒<sup>[16]</sup>。

Mori 等用 BmNPV DNA 的 BamHI 酶切片段, 与 AcNPV 一起转染 Sf 细胞, 然后再感染 BmNPV 的寄主细胞, 得到了杀虫谱扩大的重组 AcNPV<sup>[17]</sup>。Maeda 等进一步研究发现, 杀虫谱扩大与 AcNPV 整合了一个 BmNPV 的 0.6kb 片段有关, 并证实该片段为 BmNPV 解旋酶基因编码区的一部分<sup>[18]</sup>。Croizier 等发现, 在 0.6kb 片段, 位于 p143 解旋酶基因中的 79 个核苷酸序列具有扩大 AcNPV 杀虫谱的能力; 比较 BmNPV 和 AcNPV 这 79 个核苷酸区段, 只有 6 个核苷位置不同, 并引起 4 个氨基酸替换<sup>[19]</sup>。

刘彦文等将斜纹夜蛾多角体病毒(SINPV)粒子与甜菜夜蛾多角体病毒(SeNPV) DNA 的 BamHI 酶切片段, 以及 SeNPV 病毒粒子与 SINPV DNA 的 BamHI 酶切片段, 分别进行共转染, 获得了各自扩大寄主范围的重组病毒, 对重组病毒 DNA 的酶切分析, 发现缺失了亲本病毒的一个片段, 对该片段进一步的基因分析正在进行之中(刘彦文等: 第六届全国杀虫微生物学术讨论会论文摘要, 1995)。

### 4 病毒基因组中的基因修饰

在杆状病毒基因组中, 某些基因决定着病

毒的寄主专一性,入侵作用和复制过程,有的基因产物可影响寄主的正常代谢,随着对病毒基因组结构和功能的深入研究,修饰病毒基因组本身的基因也可达到改变杀虫谱,增强杀虫效能的目的。

杆状病毒 P34 基因是病毒复制的非必要区,编码一个 34Ku 的多角体外膜蛋白, Vlak 报告了利用插入失活,使病毒多角体失去外膜结构,提高了病毒的感染能力(学术报告)。病毒的 *egt* 基因 (ecdysteroid UDP-glycosyl transferase) 的产物使蜕皮激素糖化而失活,从而阻碍寄主正常蜕皮。O'Reilly 和 Miller 在 AcNPV 的基因组中使 *egt* 基因缺失而加速了感染幼虫的死亡<sup>[20]</sup>。

此外, Rabindra 等利用传统的化学诱变方法对 NPV 基因组进行诱变,获得了 AcNPV 的突变株系,能在感染细胞中产生大量的包含体,表现出比亲本高得多的毒性。

综上所述,重组病毒虽然大多处在实验室研究阶段,但可以看到 DNA 重组技术在改造杆状病毒杀虫能力方面展现出了广阔的前景。整合外源基因,尤其是具昆虫专性神经毒素的重组病毒改造表现较为成功,显示出生产上的实用性。值得注意的是,目前所有这些重组病毒的改良,往往只是进行单因素的改造,几乎没有从多方面因素进行考虑,以构成二重、三重因子的复合重组病毒,让多个因子协同作用,也许能更有效地提高杀虫能力。需要一提的是重组病毒的安全性问题,迄今为止,释放到自然环境中的重组病毒经研究证实它们是安全的,与野生型病毒的表现一致。因此,充分利用和发挥重组病毒杀虫剂的作用,将能更多地造福于人

类。

## 参 考 文 献

- [1] Maeda S. Biochem Biophys Res Commun, 1989, 165: 1177~1183.
- [2] Hammock B D, Bonning B C, Possee R D, *et al.* Nature, 1990, 344: 458~461.
- [3] Eldridge R, O'Reilly D R, Hammock B D, *et al.* Appl Env Microbiol, 1992, 58: 1583~1591.
- [4] Tobe S S, Stay B. Adv Insect Physiol, 1985, 18: 305~342.
- [5] Shotkoshi F A, Fallon A M. Am J Trop Med Hyg, 1994, 50: 433~439.
- [6] Merryweather A T, Weyer U, Harris M P G, *et al.* J Gen Virol, 1990, 71: 1535~1544.
- [7] Martens J W M, Honce G, Zuidema D, *et al.* Appl Env Microbiol, 1990, 56: 2764~2770.
- [8] Yi Pang, Frutos R, Federici B A. J Gen Virol, 1992, 73: 89~101.
- [9] Stewart L M D, Hirst M, Lopez-Ferber M, *et al.* Nature, 1991, 352: 85~88.
- [10] Maeda S, Volrath S L, Hanzlik T N, *et al.* Virology, 1991, 184: 777~780.
- [11] 姚斌, 范云六, 赵荣敏等, 中国科学B辑, 1995(待刊).
- [12] Tomalski M D, Miller L K. Nature, 1991, 352: 82~85.
- [13] Carbonell L F, Hodge M R, Tomalski M D, *et al.* Gené, 1988, 73: 409~418.
- [14] Croizier G, Croizier L, Quiot J M, *et al.* J Gen Virol, 1988, 69: 177~185.
- [15] Gonzalez M A, Smith G Z, Summers M D. Virology, 1989, 170: 160~175.
- [16] Kondo A, Maeda S. J Virol, 1991, 65: 3625~3632.
- [17] Mori H, Nakazawa H, Shirai N, *et al.* J Gen Virol, 1992, 73: 1877~1880.
- [18] Maeda S, Kamita S G, Kondo A. J Virol, 1993, 67: 6234~6238.
- [19] Croizier G, Croizier L, Argaud O, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 48~52.
- [20] O'Reilly D R, Miller L K. Bio / Tech, 1992, 9: 1086~1089.