

密级：

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

BmNPV 和 AcMNPV *egt* 基因启动子特性及家蚕
海藻糖酶基因启动子活性的滞育激素调节研究

**Characterization of *egt* Gene Promoters from BmNPV and
AcMNPV and Regulation of Diapause Hormone on Activity of
Bombyx mori Trehalase Gene Promoter**

博 士 研 究 生：沈兴家

指 导 教 师：李奕仁 张志芳

申 请 学 位 类 别：农学博士

专 业：特种经济动物饲养

研 究 方 向：家蚕遗传育种

培 养 单 位：中国农科院蚕业研究所

提交日期 2004 年 6 月

**Dissertation for the Ph.D. Degree of Chinese Academy of
Agricultural Sciences**

**Characterization of *egt* Gene Promoters from BmNPV and
AcMNPV and Regulation of Diapause Hormone on Activity of
Bombyx mori Trehalase Gene Promoter**

Author : Shen Xing-Jia

Directors : Li Yi-Ren, Zhang Zhi-Fang

Major : Breeding of Special Industrial Animals

**Direction: Genetics and Molecular Biology
of Silkworm**

**The Sericultural Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences**

Jun, 2004

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知,除了文中特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果,也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定,即:中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘,允许论文被查阅和借阅,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

论文评阅人与答辩委员会成员名单

论文评阅人：吕鸿声 研究员 中国农科院植保所

徐俊良 教授 浙江大学

孙崇荣 教授 复旦大学

答辩委员会主席：吴祥甫 研究员 中国科学院上海生化所

答辩委员会成员：沈桂芳 研究员 中国农科院生物技术所

孙崇荣 教授 复旦大学

鲁兴萌 教授 浙江大学

贡成良 教授 苏州大学

郭锡杰 研究员 中国农科院蚕业研究所

何家禄 研究员 中国农科院蚕业研究所

论文答辩日期：2004 年 6 月

目 录

英文缩写说明	
摘要.....	
Abstract	
第一章 昆虫杆状病毒分子生物学研究进展（文献综述）	1
1.1 杆状病毒基因组	1
1.2 杆状病毒基因组 DNA 的复制机构.....	1
1.3 杆状病毒基因表达的调控	4
1.4 杆状病毒表达载体系统	5
1.5 杆状病毒 <i>egt</i> 基因与重组杆状病毒杀虫剂	6
1.6 昆虫激素调控宿主昆虫和杆状病毒相关基因的表达.....	10
第二章 实验设计	14
2.1 实验目的.....	14
2.2 研究意义.....	14
2.3 研究内容和方法.....	15
2.3.1 BmNPV 和 AcMNPV <i>egt</i> 基因启动子的特性分析	15
2.3.2 滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调控.....	16
第三章 实验材料和常用方法.....	17
3.1 实验材料.....	17
3.1.1 病毒株、昆虫细胞系和家蚕品种.....	17
3.1.2 质粒载体和受体菌.....	17
3.1.3 酶和主要试剂.....	17
3.1.4 常用溶液和缓冲液.....	17
3.1.5 其它试剂.....	18

3.1.6	细菌培养基.....	19
3.1.7	昆虫细胞培养基.....	19
3.1.8	主要仪器设备.....	19
3.2	常用实验方法.....	19
3.2.1	细胞的传代与培养.....	19
3.2.2	细胞的冻存.....	19
3.2.3	细胞的复苏.....	20
3.2.4	脂质体介导的功能质粒在昆虫细胞系中的转染与瞬时表达.....	20
3.2.5	功能质粒转染后的病毒反式激活与昆虫激素处理.....	20
3.2.6	家蚕的饲养和功能质粒在家蚕幼虫中的转染与瞬时表达.....	20
3.2.7	细胞计数.....	20
3.2.8	BmNPV 和 AcMNPV 基因组 DNA 的制备.....	21
3.2.9	碱法少量快速抽提质粒 DNA	21
3.2.10	碱法大量制备质粒 DNA.....	21
3.2.11	限制性内切酶反应	22
3.2.12	DNA 片段的分离与回收.....	22
3.2.13	DNA 的连接.....	22
3.2.14	感受态细胞的制备	22
3.2.15	质粒 DNA 的转化.....	23
3.2.16	重组质粒的筛选鉴定	23
3.2.17	病毒滴度的测定	23
3.2.18	病毒多角体的计数	24
3.2.19	细胞抽提物的制备	24
3.2.20	荧光素酶活性分析	25
3.2.21	穿梭载体校正系统 <i>E.coli</i> β -半乳糖苷酶比活性测定	25
3.2.22	DNA 浓度测定.....	25
3.2.23	蛋白质浓度测定	25
3.2.24	DNA 序列测定.....	26
3.2.25	数据统计分析	26

第四章 BmNPV <i>egt</i> 基因启动子特性分析	27
4.1 材料与方法	28
4.2 结果与分析	31
4.2.1 BmNPV <i>egt</i> 基因启动子序列分析	31
4.2.2 病毒因子对 BmNPV <i>egt</i> 基因启动子的反式激活	32
4.2.3 BmNPV <i>egt</i> 启动子控制下的 <i>luc</i> 基因的转录时相.....	33
4.2.4 同源重复序列 <i>hr3</i> 对 <i>egt</i> 基因启动子活力的增强作用	34
4.2.5 BmNPV <i>egt</i> 基因启动子功能区的确定.....	34
4.2.6 昆虫蜕皮激素和保幼激素对 BmNPV <i>egt</i> 基因启动子活力的影响 ...	36
4.2.7 BmNPV <i>egt</i> 基因启动子控制转录的 <i>luc</i> 基因在家蚕体内的表达.....	38
4.3 小结	40
第五章 AcMNPV <i>egt</i> 基因启动子特性分析	42
5.1 材料与方法.....	42
5.1.1 病毒和细胞系.....	42
5.1.2 实验方法.....	42
5.2 结果与分析.....	44
5.2.1 AcMNPV <i>egt</i> 启动子序列分析.....	44
5.2.2 AcMNPV <i>egt</i> 基因启动子需要病毒因子的反式激活	45
5.2.3 AcMNPV <i>egt</i> 基因启动子的转录时相	46
5.2.4 AcMNPV <i>egt</i> 翻译起始位点上游 159 bp 区段具有基本的转录活性...47	
5.2.5 BmNPV <i>hr3</i> 显著增强 AcMNPV <i>egt</i> 基因启动子的活性	48
5.2.6 外源昆虫蜕皮激素对 AcMNPV <i>egt</i> 启动子转录活性的影响.....	49
5.2.7 AcMNPV <i>egt</i> 启动子控制转录的报告质粒在家蚕体内的表达	51
5.3 小结	52
第六章 滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调节.....	53
6.1 材料与方法.....	54
6.1.1 蚕品种与主要试剂	54
6.1.2 实验方法	54

6.2 结果与分析.....	55
6.2.1 家蚕和野桑蚕 <i>trehalase</i> 基因 5' 侧翼区序列.....	55
6.2.2 报告质粒的瞬时表达	55
6.2.3 滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的的调控作用	55
6.3 小结.....	58
第七章 结论与讨论.....	60
7.1 BmNPV 和 AcMNPV <i>egt</i> 基因启动子的特性	60
7.1.1 杆状病毒 <i>egt</i> 基因启动子序列的比较.....	60
7.1.2 BmNPV 和 AcMNPV <i>egt</i> 基因启动子需要病毒因子的反式激活.....	60
7.1.3 BmNPV 和 AcMNPV <i>egt</i> 基因启动子转录时间晚.....	61
7.1.4 ATG 上游-159 ~ -309 bp 存在主要的转录调控顺式元件	62
7.2 BmNPV <i>hr3</i> 对杆状病毒 <i>egt</i> 基因启动子特性的影响	62
7.3 蜕皮激素和保幼激素对杆状病毒 <i>egt</i> 基因启动子活性的调节	62
7.3.1 蜕皮激素的调节作用	62
7.3.2 保幼激素的调节作用	62
7.4 滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调控.....	63
7.4.1 家蚕和野桑蚕海藻糖酶基因启动子的特性	63
7.4.2 滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子转录活性的调控	63
参考文献	65
致谢.....	75
附录.....	76
1 BmNPV <i>egt</i> 启动子测序图	76
2 AcMNPV <i>egt</i> 启动子测序图.....	77
3 <i>Bombyx mori trehalase</i> 5' 侧翼区测序图	78
4 <i>Bombyx mandarina trehalase</i> 5' 侧翼区测序图	80
5 攻读博士期间发表论文.....	82
作者简介	86

英文缩写说明

AcMNPV: <i>Autographa californica</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus	hpi: hours post infection
BEVS: baculovirus expression vector system	<i>ie-1</i> : immediate-early gene-1
Bm: <i>Bombyx mori</i>	JH: juvenile hormone
BmUGT1: <i>Bombyx mori</i> phenol UDP-glucosyltransferase	JHA: juvenile hormone analogue
β -gal : β -galactosidase	LdMNPV: <i>Lymantria dispar</i> multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus
BmNPV : <i>Bombyx mori</i> nucleopolyhedrovirus	<i>luc</i> : luciferase gene
BusuNPV : <i>Buzura suppressaria</i> single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus	Luc: luciferase activity
BV: budded virus	LT ₅₀ : median lethal time
<i>cat</i> : chloramphenicol acetyltransferase gene	MabNPV: <i>Mamestra brassicae</i> nucleopolyhedrovirus
CfMNPV : <i>Choristoneura fumiferana</i> multiple nucleopolyhedrovirus	MacoNPV: <i>Mamestra configurata</i> nucleopolyhedrovirus
CpGV: <i>Cydia pomonella</i> granulovirus	MH: molting hormone
cpm: counts per minute	NPV: nucleopolyhedrovirus
DH : diapause hormone	OpMNPV: <i>Orgyia pseudotsugata</i> multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus
<i>egt</i> : ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene	ORF: open reading frame
EGT: ecdysteroid UDP-glucosyltransferase	OV: occluded virus
EpapGV: <i>Epinotia aporema</i> granulovirus	PBS: phosphate buffered saline
EppoNPV: <i>Epiphyas postvittana</i> nucleopolyhedrovirus	PCR: polymerase chain reaction
FBS: fetal bovine serum	pfu : plaque forming unit
GV: granulovirus	<i>polh</i> : polyhedrin gene
HaSNPV: <i>Helicoverpa armigera</i> single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus	PxGV: <i>Plutella xylostella</i> granulovirus
HearNPV : <i>Haliothis armigera</i> single-nucleocapsid baculovirus	SeMNPV: <i>Spodoptera exigua</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus
<i>hr3</i> : homologous region-3	Sf: <i>Spodoptera frugiperda</i>
	SpliMNPV: <i>Spodoptera littoralis</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus
	XcGV: <i>Xestia c-nigrum</i> granulovirus

摘要

昆虫杆状病毒是潜在的无污染杀虫剂,但是其缓慢的发病致死作用,极大地限制了它作为杀虫剂的应用。杆状病毒的蜕皮甾体尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶(*egt*)基因为病毒复制的非必需基因,缺失*egt*基因的病毒可以加速宿主昆虫的死亡,提高杀虫效果;而且可在*egt*基因启动子下游插入标记基因或有用蛋白质基因,有利于重组病毒的筛选和表达产物的加工。

本文分析了家蚕核型多角体病毒(BmNPV)和苜蓿尺蠖核型多角体病毒(AcMNPV)*egt*启动子及家蚕(*Bombyx mori*)和野桑蚕(*Bombyx mandarina*)海藻糖酶基因(*trehalase*)启动子的特性,研究了蜕皮激素(ecdysone)、保幼激素(JH)和滞育激素(DH)对*egt*基因启动子和*trehalase*基因启动子活性的调控。

1、BmNPV 和 AcMNPV *egt* 启动子的特性

从BmNPV和AcMNPV基因组DNA扩增出不同长度的*egt*启动子区段,构建*egt*启动子控制的荧光素酶基因(*luc*)报告质粒。瞬时表达分析结果表明:BmNPV和AcMNPV*egt*启动子具有相似的特性,其转录活性需要病毒因子的反式激活,而且病毒感染后24 h才检测到转录。

2、BmNPV *hr3* 增强 *egt* 启动子的活性

在BmNPV和AcMNPV*egt*启动子控制的报告基因下游插入BmNPV *hr3*,构建带*hr3*的报告质粒。瞬时表达分析显示,在体外和体内BmNPV *hr3*分别使*egt*启动子活性分别增加1200-1600和130倍,但*egt*启动子活性仍需要病毒因子的反式激活,而且在病毒感染后18 h才检测到。

3、*egt* 基因启动子的功能区

不同长度的BmNPV和AcMNPV*egt*启动子控制的报告基因表达分析表明,*egt*翻译起始位点ATG上游-159 bp区段包含启动子的基本结构,但转录活性接近消失;与病毒因子作用的转录调控顺式元件主要存在于翻译起始位点ATG上游-159~-309区段内。

4、外源昆虫蜕皮激素和保幼激素对 *egt* 基因启动子活性的调控

在体外ecdysone对*egt*启动子活性有负调节作用,

0.5 μ g/ml时作用不明显,而 ≥ 1.0 μ g/ml时明显降低*egt*启动子活性。相反,在体内每头幼虫注射4-8 μ g ecdysone *egt*启动子活性提高约2.6-15倍。JH对*egt*启动子活性有正调节作用,0.5-2.0 μ g/ml培养基或50-150 μ g/ml溶液涂布幼虫体表分别使启动子活性增加0.75-1.5倍和0.76-4.4倍

5、家蚕和野桑蚕海藻糖酶基因启动子特性

家蚕和野桑蚕*trehalase*启动子在Bm5和Sf21细胞中都有很低但明显的转录活性,家蚕*trehalase*启动子在同源的Bm5细胞中的转录活性明显高于在异源的Sf21细胞中的活性。

6、滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调控

在Bm5细胞培养基中,DH浓度13-33 nmol/L范围内都显著增强家蚕*trehalase*启动子的活性,其中以20-27 nmol/L增强作用最大,提高约为1.3倍;浓度为50 nmol/L时无显著的影响。说明DH对家蚕*trehalase*启动子的调控呈现明显的剂量效应,源自家蚕卵巢的Bm5细胞系可能存在着DH的受体。

关键词: 家蚕, 杆状病毒, *egt* 基因, 海藻糖酶基因, 启动子特性分析

Abstract

Baculoviruses are potential insecticides without pollution. However, a primary disadvantage of inability to kill target insects rapidly has strongly limited their use as insecticides. Baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*) genes are non-essential for the replication of viruses. Host insects infected by *egt*-minus baculoviruses succumbed to the viral infection sooner than those infected by wild-type viruses. Thereby the efficiency of recombinant baculoviruses as insecticides can be improved by deletion of *egt* genes. Meanwhile, selective marking genes or valuable protein genes can be cloned downstream the *egt* promoter to facilitate the selection of recombinants and processing of gene expression products.

This article characterized the *egt* gene promoters from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) and *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) and *trehalase* gene promoter of *B. mori*. And the regulatory effects of ecdysone and juvenile hormone (JH) on *egt* promoter activities were investigated as well as diapause hormone (DH) on *trehalase* gene promoter of *B. mori*.

1. Characterization of *egt* gene promoters from BmNPV and AcMNPV

The *egt* gene promoter fragments of different lengths were generated from genomic DNAs of BmNPV strain ZJ-8 and AcMNPV, respectively. Reporter plasmids were constructed with *luciferase* (*luc*) gene as reporter driven by *egt* promoter. Transient expression showed that *egt* promoters from BmNPV and AcMNPV shared similar properties. Their transcriptional activities require the transactivation of viral factor(s) and observed first at 24 hours post infection (hpi) of viruses.

2. Effect of BmNPV *hr3* on *egt* promoter

To investigate the effect of BmNPV homologous region (*hr*) on *egt* promoter, BmNPV *hr3* was cloned into reporter plasmids downstream *luc* gene. Transient expression showed that *hr3* increased *egt* promoter activity by 1200- to 1600-fold *in vitro* and 130-fold *in vivo*. But *egt* promoter activities still required the transactivation of viral factor and transcription occurred at 18 hpi.

3. The functional region of *egt* promoters from BmNPV and AcMNPV

Expression assay of reporter genes driven by different lengths of *egt* promoter fragments was conducted. The results revealed that promoter fragment from *egt* translation initiation ATG to -159 bp upstream contains the basal promoter structure but its transcriptional activity is almost abolished; and the main *cis*-acting elements for viral factors are located in the nucleotide sequence between -159 to -309 bp upstream the translation initiation site.

4. Effects of foreign insect ecdysone and JH on *egt* promoter activity

Foreign insect ecdysone showed negative regulatory effect on *egt* promoter activity *in vitro*. Ecdysone of 0.5 µg/ml showed little effect, but it of over 1.0 µg/ml significantly down regulated *egt* promoter activity. In contrast to *in vitro*, ecdysone increased *egt* promoter activity by 2.6- to 15-fold *in*

vivo when larvae given an ecdysone injection of 4-8 µg per *os*. JHA showed positive regulatory effects on *egt* promoter activity. JHA of 0.5-2.0 µg/ml *in vitro* or 50-150 µg/ml by spreading onto larvae increased promoter activities by 0.76- to 1.46-fold and 0.76- to 4.4-fold, respectively.

5. Characterization of Trehalase promoter from *Bombyx mori* and *Bombyx mandarina*

Trehalase promoters both from *B. mori* and *B. mandarina* revealed low but significant transcriptional activities in Bm5 and Sf21 cells. *B. mori trehalase* promoter activity was higher in homologous Bm5 cells than that in heterologous Sf21 cells.

6. Regulatory effect of diapause hormone on *trehalase* Promoter from *Bombyx mori*

In cell media, DH concentration at the range from 13 to 33 nmol/L enhanced the promoter activity significantly. Of which 20-27 nmol/L increased the most, by about 1.3 times. When DH dose rose to 50 nmol/L, no significant effect was observed. It revealed that DH has a regulatory effect on *B. mori trehalase* promoter activity with a typical dose-dependent pattern *in vitro*. Moreover, there possibly exist DH receptors in the ovary-derived Bm5 cell line.

Keywords: *Bombyx mori*, Baculovirus, *egt* gene, *trehalase* gene, Characterization of gene promoter

第一章 昆虫杆状病毒分子生物学研究进展 (文献综述)

随着分子生物学和基因工程技术等的不断进步,对昆虫杆状病毒的分子生物学研究也不断地深入,多种病毒基因组全序列已被测定,DNA 复制机构、基因转录和表达调控机理等被不断阐明。杆状病毒载体表达系统(BEVS)的改进和完善,为各种具有生物活性的有用蛋白和疫苗的成功表达提供了一条有效的途径。目前 BEVS 作为一个超高效的真核表达系统,已经成为当今四大基因工程表达系统(哺乳动物细胞、酵母、细菌和 BEVS)之一。下面我们就昆虫杆状病毒的分子生物学研究进展进行综述。

1.1 杆状病毒基因组

昆虫杆状病毒基因组是单分子共价闭合双链环状 DNA,其分子质量很大 90~230 kbp,平均约为 130 kbp。1994 年 Ayres 等发表了苜蓿尺蠖 AcMNPV C6 克隆株基因组 DNA 全序列,其全长由 133 894 碱基对组成,A+T 百分含量为 59%,长度大于 50 个核苷酸的开读框(ORF)有 337 个,均匀分布在基因组的两条链上。随后黄杉毒蛾核型多角体病毒 OpMNPV(Ahrens CH 等,1997)和 BmNPV 基因组全序列(Gomi *et al.*,1999)相继发表,BmNPV 基因组 DNA 序列全长为 128 413 bp。比较 AcMNPV 和 BmNPV 已鉴定的各氨基酸序列,发现其同源性高达 84~98%。

近年舞毒蛾核型多角体病毒 LdMNPV(Kuzio *et al.*,1999)甜菜夜蛾核型多角体病毒 SeMNPV(Ijkel *et al.*,1999)棉铃虫核型多角体病毒 HaSNPV(Chen *et al.*,2001)MacoNPV(Li *et al.*,2002)和 EppNPV(Hyink *et al.*,2002)等基因组 DNA 全序列被测定。

根据基因的功能,可将已知的杆状病毒基因分为以下几类:

(1)病毒结构蛋白基因,包括多角体蛋白 *polh* 基因,多角体膜蛋白 *pp34* 基因,*P10* 蛋白基因,DNA 结构蛋白基因 *p6.9*,核衣壳蛋白基因 *p39* 和 *p87*,囊膜糖蛋白基因 *gp64* 等。

(2)病毒 DNA 复制和病毒表达调控基因,包括 DNA 解旋酶基因(*helicase*),DNA 聚合酶基因(*dnapol*),*ie-0*,*ie-1*,*ie-2*,*lef-1*,*lef-2*,*lef-3*,*p35*,*iap*,*sod*,*pe38* 等。

(3)与宿主细胞相互作用的基因,有蜕皮甾体尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶(*ecdysteroid UDP-glucosyltransferase*,*egt*)基因,抗细胞凋亡作用的 *p35*,*iap* 基因,与病毒宿主域有关的解旋酶基因等。

(4)酶蛋白基因,包括蛋白激酶 *pK*,蛋白酪氨酸/丝氨酸磷酸酶基因(*PTPase*),超氧化歧化酶基因(*sod*),碱性外切酶基因(*alk-exe*),几丁质酶基因,组织蛋白酶样的蛋白酶(*a cathapsin L-like proteinase*)基因等。还有与病毒的遗传突变有关的基因 *p25*,与病毒毒力有关的基因 *p74* 等。

1.2 杆状病毒基因组 DNA 的复制机构

拓扑学上呈环状是含 AcMNPV 复制原点的质粒复制的先决条件,线形 DNA 即使含有复制原点也不能复制,这些结果与杆状病毒 DNA 的环状特性一致。因此,推测杆状病毒 DNA 的复制可能具有 θ 结构或者滚环模型(Kool *et al.*,1993)。编码 DNA 解旋酶(*helicase*)DNA 聚合

酶 (DNA polymerase) IE-1、LEF-1、LEF-2 和 LEF-3 的基因时 DNA 复制必需的基因,而编码 P35、IE-2 和 PE38 的基因对 DNA 复制有促进作用 (Kool *et al.*, 1994)。

1.2.1 复制原点

1984 年 Blinov 等最早报道了杆状病毒复制起始原点 (*ori*), 他们根据含病毒 DNA 片段的质粒转染的昆虫细胞 DNA 对大肠杆菌转化能力的测定,发现 GmMNPV 的 *Bam*HI-H 片段带有一个复制起始原点。Cochran 与 Faulkner (1983) 通过 DNA-DNA 杂交技术,首先在 AcMNPV 基因组内发现几个区段具有同源性,分别称为 *hr1*、*hr2*、*hr3*、*hr4R* 和 *hr5*,分布与整个基因组,其大小不等,每个 *hr* 个含 2-8 个 30 bp 不完全回纹序列,每个回纹序列的核心有一个天然的 *Eco*RI 位点,推测这些 *hr* 序列可能用作复制原点。Kool 等 (1993) 的研究不仅肯定了 6 个 *hr* 都有复制原点的功能,而且还发现 AcMNPV 的 *Hind*III-K 片段虽然不含有 *hr* 片段,但也携带 DNA 复制原点。研究表明 *hr* 原点的复制效率比非 *hr* 原点要高 5-19 倍,因此在 AcMNPV 基因组 DNA 复制中起主要作用的是 *hr* 原点。

根据家蚕 BmNPV 基因组 DNA 限制物理图谱分析 (Maeda *et al.*, 1990), 推定其中存在与 AcMNPV *hr* 相似的 *Eco*RI 位点丰富区 (Maeda *et al.*, 1991)。BmNPV ZJ-8 株 *hr3* 也是 BmNPV 基因组复制原点之一 (张志芳等, 1995)。BmNPV ZJ-8 株 *hr3* 有 3 个 30bp 不完全回文序列,每个回文序列的核心有一天然 *Eco*RI 位点,在 30bp 回文序列结构的间隔有一段可以形成茎环结构的 13 bp 完全保守序列 TTTGAAAAACAAA。BmNPV ZJ-8 株 *hr3* 序列中富含 A+T (70%左右),而且重复出现回文结构和茎环结构,具有 DNA 复制起始原点的特征。BmNPV *hr3* 的基本结构单位是以 *Eco*RI 位点为中心的 72 bp 的同感序列 (张志芳等, 1995)。这种同感序列在同种 NPV 不同株之间有差异,但明显小于不同种 NPV 间的差异。

1.2.2 杆状病毒 DNA 聚合酶

杆状病毒 DNA 聚合酶 (DNAP), 是由杆状病毒基因组编码的。杆状病毒 DNA 聚合酶的活动性与真核细胞 DNA 聚合酶相似,具有 3'→5' 核酸外切酶活性,属于 DNAP δ 家族 (吕鸿声, 1998)。

AcMNPV DNA 聚合酶位于基因组 55 281 ~ 52 329 nt (ORF65), ATG 符合 Kozak 规则, 5'上游存在早期启动子与加帽位点,其编码的 DNA 聚合酶有 984 个氨基酸残基,分子量 114.307 ku。AcMNPV DNA 聚合酶在病毒感染后 2 h 内表达, 4~6 h 达到最高水平, 8 h 后表达量逐渐降低。DNA 聚合酶有 2 个转录起始位点,一个位于早期启动子基序 CGTCG 中,另一个转录位点所在序列与晚期启动子基序 ATAAG 相似 (Tomalski *et al.*, 1988)。

家蚕 BmNPV DNA 聚合酶基因是继舞毒蛾 LdMNPV DNA 聚合酶基因之后, 杆状病毒中第 3 个已经克隆并测序的 DNA 聚合酶 (张志芳, 1994; Chaeychomsri *et al.*, 1995)。BmNPV DNA 聚合酶基因包括一个 ORF 编码 988 个氨基酸的多肽,推定分子量 114.65 ku,其氨基酸序列与 AcMNPV DNA 聚合酶和 LdMNPV DNA 聚合酶 ORF 的同源性分别为 96%、45%。BmNPV DNA 聚合酶基因没有典型的 TATA 盒,但是在转录起始区内有一个 G+C 富集区,其表达至少有 7 种不同的转录本,它们具有相同的 3' 末端。BmNPV DNA 聚合酶启动子序列与 AcMNPV 相比,一些特征序列几乎完全相同,已经确定的 AcMNPV 的两个转录起始位点在 BmNPV 相应区段不仅序列相同,而且位置也完全一致。

1.2.3 杆状病毒 DNA 解旋酶

在 DNA 复制、重组与修复过程中,至少瞬时需要单链 DNA 作为中介体,而 DNA 从双链向单链转换的过程是由 DNA 解旋酶催化的 (Lohman, 1993)。AcMNPV 的解旋酶基因 (*helicase*) 已被定位和克隆 (Lu & Carstens, 1991; Liu & Carstens, 1999), 全长 3663 bp, 是杆状病毒中迄今已鉴定的最大基因, 编码 1221 个氨基酸残基的多肽, 分子量 143 ku 左右, 所以又称为 *p143* 基因。AcMNPV 解旋酶基因起始密码子 ATG 符合 Kozak 规则, 上游存在早期与晚期启动子序列, 在上游-80 bp 内有一小顺反子带有符合 Kozak 规则的起始密码子 ATG, 编码的解旋酶内有 NTP 结合功能域基序。AcMNPV 解旋酶基因编码一个多功能蛋白, 在该蛋白的 C-端 320 氨基酸残基中有 7 个保守基序, 这些基序在病毒、细菌和真核生物的所有具有解旋酶功能的蛋白质中都存在, 其中基序 1、2 是 NTP 结合所必需的。在该蛋白的 N-端有一个亮氨酸拉链 (85 ~ 166 位氨基酸), 5 个亮氨酸精确地各相隔 7 个其它氨基酸, 解旋酶或许通过这种结构形成一个二聚体而参与 DNA 的复制 (Crute *et al.*, 1989)。

AcMNPV 的解旋酶基因的启动子具有早期转录起始位点基序 GTGC 和晚期转录起始位点基序。在转录起始位点上游有 TATA 盒存在, 在无其它病毒因子作用时 *hr* 可以激活并增强启动子活性 15 倍, 并且这种增强作用没有位置与方向性; IE-1 蛋白和另一极早期基因产物 PE-38 也可以激活 AcMNPV 的解旋酶启动子活性 (Lu A. 等, 1993; Liu G. 等, 1999)。

BmNPV 解旋酶基因包含在基因组 DNA 的 *Sma*I-C 片段内, 位于基因 59.2 ~ 62.1 mu 之间。BmNPV 的不同株之间存在一定的限制性内切酶谱的多样性; 对编码 371 ~ 414 位氨基酸的 130 bp 核苷酸序列分析显示, 它与 AcMNPV 解旋酶基因相应部分有 95% 以上的同源性, 该部分氨基酸除第 410 位不同 (BmNPV 为苏氨酸, AcMNPV 为丙氨酸) 以外, 其余全部相同 (张志芳等, 1994)。

利用萤火虫荧光酶素基因作报告基因, 对 BmNPV ZJ-8 解旋酶基因启动子功能进行的分析表明, 在不存在增强子及反式作用因子的情况下, 转染 Sf21 和 Bm 细胞系, 均可检测到荧光素酶的活性。当 BmNPV 同源重复区 *hr3* 位于报告基因下游时, 可增强解旋酶基因启动子活性达数千倍。病毒因子也可反式激活启动子的基础转录 10 ~ 20 倍左右 (肖庆利等, 2001)。

1.2.4 杆状病毒 DNA 复制需要的反式作用因子

采用瞬时互补试验已鉴定出 7 个反式作用的单疱疹病毒 (*herpes simplex virus*) *hsv-1* 基因, 是 *hsv-1 ori* 依赖性质粒 DNA 复制必需的, 这 7 个基因的产物包括 DNA 聚合酶 (UL30)、聚合酶辅助蛋白 (UL42)、单链 DNA 结合蛋白 (UL29)、异源三倍体的解旋酶-引物复合物 (UL5、UL8、UL52)、原点结合蛋白 (UL9) (Gottlieb *et al.*, 1994; Marsden *et al.*, 1997; Barnard *et al.*, 1997)。荷兰瓦格宁根农业大学 Valk 研究组应用以 *DpnI* 为基础的瞬时互补法鉴定 AcMNPV DNA 复制中的反式作用因子, 结果发现基因组 6 个区段中至少 7 个基因是 *ori* 依赖性质粒 DNA 复制所必需的 (Challberg, 1986)。美国乔治亚大学 Miller 研究组用类似方法证实 *ie-1*、*lef-1*、*lef-2*、*lef-3*、*p143* 与 *p35* 等 6 个基因是 AcMNPV DNA 复制的必需基因, 而 *ie-1*、*lef-7* 和 DNA 聚合酶基因具有促进效应 (Lu & Miller, 1995)。

1.3 杆状病毒基因表达的调控

杆状病毒基因在感染细胞内的表达以及 DNA 复制是一种有秩序的级联事件,以病毒 DNA 复制为基准分为两个综合时相:一个是在病毒 DNA 复制开始前的早期,另一个是病毒 DNA 复制开始或开始后的晚期。每个后续时相依赖于前一个时相基因的表达。病毒基因表达的级联是在转录水平上发生的调节,杆状病毒一种时组(temporal class, 时间等级)的基因产物直接或间接地反式激活后一种时组的基因转录。通过代谢抑制、温敏突变系、瞬间表达试验等将 NPV 基因表达分为四个时期:(1) 极早期,又称立即早期(immediate early, α -phase),大约在感染后 0~6 h,此时病毒蛋白(α 蛋白)的合成完全依赖于宿主细胞的表达产物,无需任何病毒基因产物,是在脱衣壳的病毒基因组在细胞核内转录后不久立即合成的。(2) 晚早期,又称延迟早期(delayed early, β -phase) 约在接种后 3~6 h,在此期间合成病毒 DNA 复制所必需 β 蛋白依赖一个或多个 α 蛋白。(3) 晚期(late, γ -phase),大约在接种后 6~10 h,在 DNA 复制开始的同时或随后开始合成另一组蛋白(γ 蛋白),主要是 ECV 装配所必需的结构蛋白。(4) 晚晚期(very late, δ -phase),在接种 10 h 后,此时合成的蛋白对加工 OV 并使之包埋进包涵体是必需的,特点是大量合成 29 kD 多角体蛋白与 p10 蛋白,在细胞将要崩溃前多角体蛋白约占细胞总量的 20% (吕鸿声, 1998)。

早期表达调节基因中一个最重要基因是极早期基因 *ie-1*,它编码一个由 582 氨基酸多肽的 IE-1 蛋白。IE-1 是重要的病毒基因转录的调节子,在促进病毒早期转录中起关键作用,能激活病毒早期基因启动子,并负调控另两个调节基因 *ie-0*, *ie-2*。*ie-1* 有两个转录本,一个为 1.9 kb,在病毒感染过程中稳定表达,另一个为 2.1 kb,只在感染早期表达。IE-1 是一个多功能蛋白,它既是早期基因反式激活因子,又是晚期表达因子。IE-1 为迟早期基因 *et-1*、晚期基因 *vp39* 与晚晚期基因 *polh* 启动子转录所必需;而 *ie-n* 基因只是增强迟早期、晚期、晚晚期基因启动子转录作用;晚期表达因子 2 基因 *lef-2* 则特异地反式调节 *vp39* 与 *polh* 基因表达。

ie-1 cDNA 序列分析,2.1 kb 的转录本包含整个 1.9 kb 的转录本(外显子 1),另在 N 端有一个附加序列(外显子 0),这段序列编码 54 个氨基酸,外显子 0 在病毒基因组上位于外显子 1 上游约 4 kb,这是已知的惟一发生剪接的杆状病毒基因。mRNA 发生剪接的编码 IE-0 蛋白,不发生剪接的编码 IE-1。IE-1 通过直接结合或在基因的 mRNA 起始位点附近与特异的结合基序结合从而与启动区形成复合物(Yao & Forman, 1993)。IE-1 无论增强子 *hr5* 存在与否都能促进 *p39* 基因表达,而 IE-0 只能激活增强子顺式连接的 *p39* 启动子。IE-0 能激活 *ie-1* 的转录,但无自我调节功能(吕鸿声, 1998),而 IE-1 不仅能抑制 *ie-0* 与 *ie-n* 启动子活性,而且还有自我调节功能,促进本身的表达。IE-1 至少有两个结构域,一个位于 N 端的 145 个富含酸性氨基酸残基,对反式激活作用很重要,另一个位于 C 端 437 个氨基酸残基,是抑制作用以及与 DNA 结合所必需的。N 端酸性氨基酸结构域可能在和激活增强子邻近基因必需因子的结合中起重要作用。*ie-2*, *pe38* 是 DNA 复制促进基因,它们是极早期基因,产物具有反式激活作用,*pe38* 可激活杆状病毒解旋酶的表达,而 *ie-2* 则促进 *pe38* 和 *ie-1* 的表达,*ie-2* 并且有自我调节功能(Friesen & Miller, 1986)。

早期表达调节基因还有:*me53* (ORF139, 122 552~121 205 nt),编码 449 个氨基酸多肽,即 53K 蛋白;*pe38* (ORF153, 132 526~133 489 nt),编码 321 个氨基酸多肽 PE38;*ie-2*,编码蛋白的分子质量为 45.6 kD,能反式激活 *ie-1* 和 *ie-0* 基因启动子(Blissard, 1990);*ie-n* (ORF 151, 13 208~130 857 nt),编码 408 氨基酸多肽 IE-N 蛋白,等等。

晚期表达调节基因包括 AcMNPV 基因中已鉴定出的 18 个晚期表达因子基因：*lef-1*, *lef-2*, *lef-3*, *lef-4*, *lef-5*, *lef-6*, *lef-7*, *lef-8*, *lef-9*, *lef-10*, *lef-11*, *ie-1*, *ie-2(n)*, *dnapol*, *p143*, *p35*, *39k*, *p47*。其中 *lef-1*, *lef-2*, *lef-3*, *lef-7*, *ie-1*, *ie-2*, *p35*, *p143*, *dnapol* 等 9 个基因对 DNA 复制起作用，其余 9 个基因在 DNA 复制中不起作用，但在晚期启动子识别和稳定晚期转录本上有功能。

1.4 杆状病毒表达载体系统

昆虫杆状病毒表达载体系统 (BEVS) 创建于 20 世纪 80 年代，1983 年 Summers 研究组首次报道了重组杆状病毒体外表达外源基因的成功 (Smith & Summers 等, 1983)，继而日本前田进博士应用重组 BmNPV 在蚕体内高效表达了人 α -干扰素 (Maeda *et al.*, 1985)，我国也于 1989 年建立了重组 BmNPV-家蚕表达系统并在蚕体内高效表达了人乙型肝炎病毒表面抗原基因 (储瑞银等, 1990)。由于该系统具备独特的优点，已成为生产与研究各种原核和真核蛋白有力而普及的工具，昆虫杆状病毒表达载体系统也成为国内外的研究热点之一。

杆状病毒 NPV 在感染的晚晚期形成由多角体蛋白 (Polh) 组成的多角体，其含量约占感染细胞蛋白总量的 20% (Miller, 1988; Luckow & Summers, 1988)，而 *polh* 基因是杆状病毒复制非必需基因，因此，可以利用其强启动子在昆虫细胞及家蚕体内高效表达外源基因。

昆虫杆状病毒的宿主只限于无脊椎动物，对脊椎动物和植物均无致病性，因而重组杆状病毒是安全的表达载体。利用 NPV 强大的 *polh* 启动子带动目的基因、构建含有目的基因表达结构而缺失 *polh* 基因编码区的重组病毒表达系统，感染昆虫细胞或虫体得到需要表达的蛋白。迄今已用该系统表达了各种各样的蛋白，如干扰素，白介素，人乙型肝炎病毒表面抗原，HCV 核心蛋白，各种生长因子及受体，以及其他人类、动物的活性因子，细胞和病毒癌基因，玉米转座因子 Ac 编码的蛋白等数种植物蛋白，各种类群的数十种病毒蛋白。

1.4.1 表达外源基因的常用启动子

(1) *polh* 基因启动子。如上所述，杆状病毒多角体蛋白基因 *polh* 是高效表达的晚晚期基因，对病毒 DNA 复制及入侵宿主细胞均非必需，而且有一个很强的启动子；缺失 *polh* 突变株感染培养细胞后，产生无包涵体(occ⁻)的空斑，与野生型有多角体(occ⁺)的空斑有明显区别，重组病毒空斑的易于筛选。因此，它是第一个理想候选者。

(2) *P10* 蛋白基因启动子。*P10* 基因与多角体蛋白基因一样，也是晚期高效表达基因，其基因产物是主要存在于感染的细胞核内而病毒非必需的纤维蛋白，其作用是加快细胞死亡后的降解速度。其表达水平比 *polh* 低，但表达略早于 *polh*。

(3) 杆状病毒早期基因启动子

pcna 和 *ie-0* 启动子常用于表达 β -半乳糖苷酶作为重组表达的筛选标记，但它们的活力不高。*ie-1* 启动子也曾用于表达 tPA(tissue plasminogen activator)基因，插入进 Sf-21 细胞的染色体 DNA，尽管产物可分泌到细胞外，但表达效率较低。

(4) 复合(chimeric)和改造的启动子。Thiem 和 Miller (1989) 构建了一个融合启动子，含有部分 *P39* 基因启动子与一部分 *Pn* 启动子，用这一启动子表达外源基因时，表达开始早，水平高。Wang 等 (1991) 根据晚期高效表达的启动子序列设计了人工启动子，也有很好的表达效果，融合启动子融合了早期和晚期启动子，可在感染的早期和晚期表达。

1.4.2 昆虫细胞内重组蛋白的加工与转运

BEVS 不仅表达效率高,而且能够对重组蛋白进行转译或转译后加工。昆虫细胞具备前体蛋白加工酶系,能完成大部分真核细胞转译后的加工修饰。除个别产物的精细结构可能与哺乳动物细胞产物略有不同,而绝大部分重组蛋白的抗原性、免疫原性及酶活性仍与天然产物相同或相似。重组蛋白在昆虫细胞内的加工修饰过程包括信号肽序列的识别与切除,糖基化、磷酸化与酰化作用,还可以形成寡聚体或二聚体,并把成熟蛋白通过质膜分泌到细胞培养基质,或根据蛋白遗传特性输送到细胞的特定部位。

在多数情况下,昆虫细胞内重组蛋白可被转运到预定的亚细胞部位,进入细胞核或留在细胞质中。这些蛋白都含有信号肽,预定要分泌的蛋白以及细胞表面表达蛋白,其信号肽在昆虫细胞内质网内被识别并精确地切除。如人 α 、 β 干扰素,白细胞介素 2 等等重组外源蛋白,在重组杆状病毒感染的昆虫细胞中表达并分泌。而外源核蛋白如所有磷酸蛋白,果蝇 Kruppel 基因产物,SV40 Tag 与小鼠 p53 等被昆虫细胞表达后都定位在细胞核。但是,溶酶体蛋白中有一类蛋白,不能在重组杆状病毒感染的细胞内转运。例如 β -氨基己糖苷酶 (β -hexosaminidase) (Boose *et al.*, 1990),因为没有溶酶体蛋白的导向信号—甘露醇-6-磷酸,而这些信号是在转译后发生的,所以不能被转运。

1.5 杆状病毒 *egt* 基因与重组杆状病毒杀虫剂

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 (O'Reilly & Miller, 1989); 而昆虫血淋巴中蜕皮激素的滴度呈规律性的周期变动,控制着幼虫的蜕皮、化蛹与变态 (吕鸿声, 1998), 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 (O'Reilly & Miller, 1990), 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效果提供一条有效的途径 (O'Reilly *et al.*, 1991; Eldridge, *et al.*, 1992; Flipsen *et al.*, 1995; Treacy *et al.*, 1997; Slavicek *et al.*, 1999)。

1.5.1 杆状病毒 *egt* 基因的特点

自 1989 年从 AcMNPV 基因组中鉴定出 *egt* 基因以来 (O'Reilly & Miller, 1989), 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 SpliMNPV (Faktor *et al.*, 1995; Toister-Achituv & Faktor, 1997) $\backslash$ CfMNPV (Barrett *et al.*, 1995) $\backslash$ MbMNPV (Clarke *et al.*, 1996) $\backslash$ OpMNPV (Ahrens *et al.*, 1997) $\backslash$ EppoMNPV (Caradoc-Davies *et al.*, 2001) $\backslash$ LdMNPV (Riegel *et al.*, 1994) $\backslash$ HaSNPV (HearNPV) (Chen *et al.*, 1997) $\backslash$ BusuNPV (Hu *et al.*, 1997) $\backslash$ SeMNPV (Ijkel *et al.*, 1999) $\backslash$ BmNPV (季平等, 2000) 和 AgMNPV (Rodrigues *et al.*, 2001) 等, 以及颗粒体病毒 XcGV (Hayakawa *et al.*, 1999) $\backslash$ PxGV (Hashimoto *et al.*, 2000) $\backslash$ CpGV (Luque *et al.*, 2001) 和

EpapGV (Manzan *et al.*, 2002) 等, 其中以 AcMNPV *egt* 基因的研究最为深入, 可能由于它是核型多角体病毒属的代表种, 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 (O'Reilly & Miller, 1990)。

AcMNPV 基因组中, *egt* 基因位于第 11426 ~ 12946 nt, 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 ~ -25 nt 为 TATA 盒, -47 ~ -39 nt 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 (O'Reilly and Miller, 1990)。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 (O'Reilly *et al.*, 1992); 成熟 EGT 分子量约 60 kDa (O'Reilly and Miller, 1990)。

SpliMNPV *egt* 基因为 1548 bp, 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 (Faktor *et al.*, 1995)。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 (Toister-Achituv and Faktor, 1997)。用 SpliMNPV 感染 SI-2 细胞, 结果在感染后 3 h 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 8 h 检测到, 之所以在 8 h 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 (Toister-Achituv and Faktor, 1997)。

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 6407~7925 nt (Kuzio *et al.*, 1999); BmNPV ZJ-8 株 *egt* 基因起始密码子 ATG 上游 -89 ~ -81 nt 有一与 AcMNPV 完全相同的潜在的顺式调控元件 ATTGTGTTA 序列, -71 ~ -64 nt 处有一 TATA 盒, 在 -27 ~ -24 nt 和 -22 ~ -19 nt 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 (季平等, 2000)。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 24 h 才检测到 (沈兴家等, 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 ~ 67 bp (Toister-Achituv and Faktor, 1997)。 *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% (Chen *et al.*, 1997)。

1.5.2 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^[1], 天然的 EGT 可能主要以四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 (Evans and O'Reilly, 1999)。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 (O'Reilly and Miller, 1990)。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 (Evans and O'Reilly, 1998), 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 (O'Reilly *et al.*, 1991a)。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 (O'Reilly *et al.*, 1992; Evans and O'Reilly, 1998)。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 (O'Reilly *et al.*, 1992)。

给化蛹第 2 日的家蚕蛹注射 AcMNPV, 可诱导人工滞育蛹的发生 (张志芳等, 1993), 但是 AcMNPV 不能经口感染家蚕幼虫 (Shikata *et al.*, 1998)。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 (Shikata *et al.*, 1998)。

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 (吕鸿声, 1998), 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 (王厚伟等, 2001)。

昆虫蜕皮激素对于昆虫具重要的意义, 其主要功能是控制昆虫的发育和变态 (吕鸿声, 1998)。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 (Smith, 1985), 被病毒感染后其血淋巴中蜕皮激素的滴度发生变化 (Dougherty *et al.*, 1987)。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 (Kelley *et al.*, 1992; Perk *et al.*, 1996)。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 (Park *et al.*, 1993)。

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(王厚伟等,2001);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(Zhou *et al.*, 2002a)。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 (Kiguchi and Agui, 1981)。

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 exigua*)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(Flipsen *et al.*, 1995)。与野生型杆状病毒相比,缺失 *egt* 基因的杆状病毒感染的昆虫死亡率提高,感染致死的时间缩短(O'Reilly & Miller, 1991; Eldridge, *et al.*, 1992; Flipsen *et al.*, 1995; Treacy *et al.*, 1997; Slavicek *et al.*, 1999)。用缺失 *egt* 基因的 BmNPV 感染家蚕幼虫,也可加速家蚕死亡,半死亡时间比野生型缩短 20% (季平等, 2000)。

1.5.3 *egt* 基因与昆虫杆状病毒杀虫剂性能的改进

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(吕鸿声, 1981)。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,迄今已有十多种重组杆状病毒(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,杆状病毒要经过一星期甚至更长的时间日才能杀死宿主昆虫,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(Hammock *et al.*, 1993; Inceoglu *et al.*, 2001)。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(Hammock *et al.*, 1993; Eldridge *et al.*, 1992; Bonning *et al.*, 1992)。利用重组 DNA 技术,已经在基因工程病毒杀虫剂系统中高效表达的外源基因包括昆虫特异性毒素、激素以及酶蛋白基因等,如蝎毒素 BeIt (Carbonell *et al.*, 1988) Aalt (Chen *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2002) 兴奋毒素 LqhIT1 和镇静毒素 LqhIT2 (Gershburg *et al.*, 1998), *Bt δ* 内毒素 (Merryweather *et al.*, 1990), 利尿激素 (Meada, 1989), 保幼激素脂酶 (Hammock *et al.*, 1990), 慈菇蛋白酶抑制剂 B (季平等, 1995)。有些颗粒病毒的增强蛋白 (enhancing protein) 能提高幼虫对病毒的感受性并加速 NPV 发病过程,因此它们在提高病毒杀虫速率方面可能是很有用的。

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 (Kondo and Maeda, 1991; Meada, 1989)。通过 BmNPV 与 AcMNPV 重组,扩大了病毒的宿主

域 (Kondo *et al.*, 1991), 利用 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 (易咏竹等, 2001)。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* 基因为病毒复制的一个非必需的早期表达基因 (O'Reilly & Miller, 1989), 删除 *egt* 基因, 使病毒的毒性更强, 半致死时间缩短 20 ~ 30% (Eldridge *et al.*, 1992; O'Reilly and Miller, 1991b; Treacy *et al.*, 1997)。因此, *egt* 基因可作为杆状病毒杀虫剂遗传操作的侯选基因之一加以研究利用。

感染了 BmNPV 的家蚕幼虫, 龄期延长, 体躯肥大发光, 最后停止取食, 仍不就眠 (吕鸿声, 1981), 这是由于 BmNPV *egt* 基因的表达产生的 EGT 酶, 使蚕体内蜕皮激素失去生理功能 (O'Reilly, 1992)。删除 *AcMNPV* 的 *egt* 基因, 使病毒的毒性更强 (O'Reilly & Miller, 1989, 1990, 1991)。用缺失 *egt* 基因的 *AcMNPV* 感染甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 幼虫时发现马氏管过早被破坏 (Flipsen *et al.*, 1995)。用缺失 *egt* 基因的 *AcNPV* 感染鳞翅目的 *Heliothis virescens* 和 *Trichoplusia* 幼虫, 死亡速度显著快于野生 *AcMNPV* (Treacy *et al.*, 1997)。缺失 *egt* 基因的 BmNPV 感染家蚕幼虫, 也能加速蚕体死亡, 使半数死亡时间比对照缩短 20% (季平等, 2000)。用蝎毒素 *Aalt* 基因取代棉铃虫核型多角体 *HaSNPV* 的 *egt* 基因或缺失 *egt* 基因都可以提高 *HaSNPV* 作为棉铃虫杀虫剂的效果 (Sun *et al.*, 2002)。

1.6 昆虫激素调控宿主昆虫和杆状病毒相关基因的表达

昆虫激素在很大程度上调控昆虫体内蛋白质合成的速度和方向, 昆虫宿主细胞相关蛋白质和 RNA 的合成成为杆状病毒的复制和增殖提供原料蛋白和转录因子, 进而影响杆状病毒基因的转录激活和表达。另一方面, 病毒的复制和增殖又影响了宿主自身的激素调控系统。

昆虫激素按照化学成分可分为 3 大类: 神经肽类 (neuropeptide), 甾体类 (steroid) 和萜类 (terpene)。其中, 神经肽类按其生物功能可分为 2 类: 调节昆虫发育分化的激素, 主要包括促前胸腺素、促咽侧体激素、羽化激素、滞育激素、性外激素激活神经肽等; 另一类是维持昆虫生理状态恒定性的激素, 包括利尿激素、脂质动员激素、促肌激素、FMRF 胺基神经肽等。在昆虫幼虫期发育起主要作用的是蜕皮激素和保幼激素, 它们分别为甾体类和萜类化合物 (图 1-1, 1-2)。

1.6.1 昆虫激素的生物学功能

由于昆虫幼虫的表皮缺乏足够的延伸性, 当幼虫生长到一定大小时就必须蜕去旧表皮, 形成新的更宽大的新表皮, 昆虫才能继续生长。完全变态昆虫, 在发育完成后发生变态蜕皮即在末期幼虫和成虫之间插入了一个蛹期; 不完全变态昆虫, 变态是由末期幼虫直接一步变成成虫。经过变态, 幼虫的大部分细胞死亡, 成虫器官是由在幼虫期就存在的但不显示功能的未分化的小细胞群 (器官芽和成组织细胞) 发育而成的。

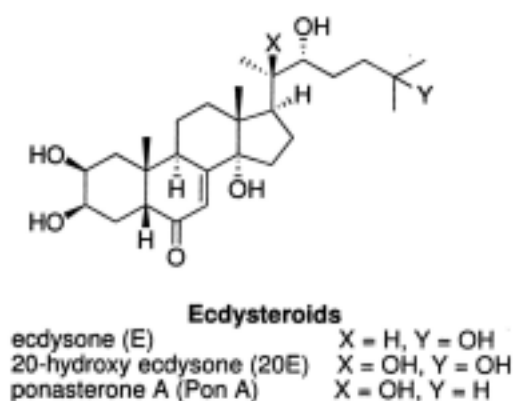


图 1-1 昆虫蜕皮激素的分子结构

Fig. 1-1 Molecular structure of insect ecdysone

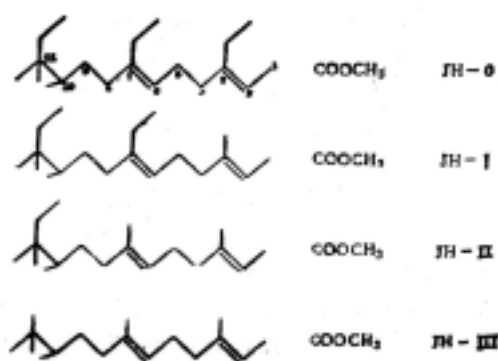


图 1-2 昆虫保幼激素分子结构

Fig. 1-2 Molecular structure of insect juvenile hormone

在蜕皮过程开始时涉及 3 种激素：促前胸激素（PTTH），蜕皮激素（moulting hormone, ecdysone）和保幼激素（juvenile hormone, JH）。PTTH 由脑的神经分泌细胞分泌，并从神经组织释放到心侧体的细胞内，激素刺激前胸腺（PTG）分泌蜕皮激素。然后，蜕皮激素作用于真皮，启动新表皮产生程序。真皮层和老皮层分离（溶离作用，apolysis），蜕皮激素被泵入蜕皮空间。通常，DNA 的合成作用和细胞分裂就发生在这个时期。新表皮的最外层沉积后，蜕皮液内的消化酶被激活并开始降解老皮的内层。重新形成的新表皮类型依赖于咽侧体所分泌的 JH 量，当 JH 浓度高时，产生的是幼虫的新表皮；当咽侧体不起作用时，JH 的滴定度下降，就发生变态蜕皮。蜕皮过程的后期，由羽化激素和催鞣激素进行调节。

在大多数昆虫体内，变态后，咽侧体恢复活动，并再次分泌 JH。在饲养的雌性虫体内，这通常是卵子发生的某个阶段必不可少的。典型的雄虫精子发生是在成虫的发育期，而实际上是随

着成虫的羽化而完成的。但在某些昆虫，雄性附腺的成熟也需要 JH。

昆虫在生长发育过程中，还受到滞育激素（Diapause hormone, DH）等多种激素的控制。家蚕是典型的以卵态滞育的昆虫。家蚕卵的滞育与否，首先是由遗传决定的。家蚕一化性品种的脑对咽下神经节（SG）神经分泌细胞有促进作用（吕鸿声，1958；福田，1962），所有世代都滞育。多化性品种的脑，对 SG 神经分泌细胞有抑制作用（吕鸿声，1958）。而二化性家蚕通过对所处环境的应答决定滞育性，当高温、长日照催青时，脑对 SG 神经分泌细胞有促进作用；反之，接受了低温、短日照催青的卵，脑对 SG 神经分泌细胞有抑制作用（吕鸿声，1958；1981）。现已查明，家蚕滞育激素-性信息素合成激活肽（DH-PBAN）基因在胚胎的中后期开始表达。二化性品种，通过某种未知的机制将环境信号传递到幼虫和蛹期，高温催青的卵 DH-PBAN 基因的表达量明显高于低温催青的卵，在蛹期 3 d 左右大量表达 DH-PBAN，作用于卵巢，决定下一代的卵滞育（Xu *et al.*, 1995）。家蚕滞育激素是由 24 个氨基酸组成的酰胺肽，而棉铃虫滞育激素有 25 个氨基酸组成的酰胺肽（图 1-3），他们的 C-端有一个 FGPR-L-NH₂ 的 5-肽酰胺结构，这是滞育激素的生物活性部位（Xu *et al.*, 1995；Imai *et al.*, 1998）。

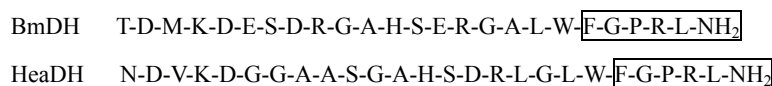


图 1-3 家蚕滞育激素（BmDH）与棉铃虫（HeaDH）滞育激素分子结构

Fig.1-3 Molecular structure of diapause hormone from *Bombyx mori* and *Helicoverpa armigera*

家蚕雌蛹的 SG 的 12 个神经分泌细胞表达滞育激素基因、合成 DH，家蚕 DH 释放到血淋巴，然后与卵巢内膜上的受体结合，使卵巢内的 cGMP 水平下降，激活了海藻糖酶的活性。海藻糖酶把血淋巴中的海藻糖分解成葡萄糖，葡萄糖进一步转化成为糖原，诱发了滞育。糖原在糖原磷酸化酶的作用下，分解产生山梨醇和甘油，蚕卵开始滞育。山梨醇在山梨醇脱氢酶作用下还原成果糖，果糖再进一步转化成糖原，滞育解除（Yamashita，1996）。DH 可以诱导糖原含量的上升，但是，单纯碳水化合物的变化，还不能完全解释滞育的机制。当把海藻糖酶抑制剂（Trehazolin）和 DH 一起注入多化性蚕蛹中，产卵数减少一半，仅 5% 的卵能孵化，但这些卵都是糖原含量很低的滞育卵（Katagiri, *et al.*, 1998）。说明碳水化合物可以增强抗逆性，但与卵滞育的形成没有直接联系。

1.6.2 昆虫激素对昆虫相关基因表达的调控

激素可通过调节某些特异性基因的表达而起作用，因此激素具有细胞间通讯的能力，对高等真核生物代谢及生长发育极其重要。在导致基因表达起始的连锁事件中，首先需要激素与特异性受体结合，这个复合物再与 TATA 盒附近的位点结合，从而激活基因表达。特异性受体只存在于激素起反应的那些细胞内，所以激素只能在特定的细胞内激活基因表达。

昆虫蜕皮激素是甾体类激素，能与染色质内特异性基因序列结合并诱导染色体蓬松，激活基因转录，调节昆虫的生长发育。激素一旦进入细胞并与细胞内相应受体结合，诱导构象发生改变，这种改变可促使受体-配体复合物与特异性 DNA 序列的结合，这种特异性 DNA 序列被称为激素

应答元件或激素效应元件(hormone response element, HRE), HRE 具有增强子的性质, 能够影响启动子的转录活性, 而且这种影响与 HRE 距启动子的距离及方向无关。

昆虫蜕皮激素可作为一种潜在的诱导剂, 调控基因在哺乳动物细胞中的表达。在哺乳动物细胞中表达昆虫蜕皮激素受体基因 (*EcR*) 和超气门基因 (*USP*) 时, 两种基因产物在蜕皮激素的参与下形成功能性蜕皮激素-受体的二聚体, 该功能性复合体作用于蜕皮激素响应启动子的 HRE 上, 使蜕皮激素响应启动子活化, 进而激活由该启动子控制下的目的基因的转录表达 (Yao *et al.*, 1993)。蜕皮激素在诱导基因表达时只起开关作用, 对哺乳动物细胞本身几乎没有生理影响 (Jaenisch, 1988)。它是一种亲脂性化合物, 能够渗透到所有动物组织中。因此, 通过选择组织特异性启动子控制 *USP* 和 *EcR* 基因的表达, 可将蜕皮激素引起的应答反应局限在特定的组织部位, 使蜕皮激素成为一种高效低毒诱导剂, 精确调控目的基因的表达。这对于研究动物的发育和生理过程具有重要意义, 特别是在诱导基因的转录起始、毒性畸形基因的超量表达、反义 RNA 的表达和基因治疗等方面有重要的应用价值 (No *et al.*, 1996)。

保幼激素为类萜类激素, 能在 DNA 水平上调节蛋白质合成, 但调节方式和蜕皮激素 MH 有所不同 (Kiguchi, 1986; Kiguchi and Agui, 1981)。由咽侧体分泌的亲脂性 JH 在昆虫的体液中与载体蛋白 I 形成二元复合物一起被运输, 载体蛋白与激素的结合可以阻止 JH 与其他蛋白或亲脂性表面发生非特异性结合, 同时将 JH 输送给亲和力比载体蛋白还要高的受体, 使 JH 具有识别靶细胞的功能 (吕鸿声, 1991)。

1.6.3 由杆状病毒介导的宿主与激素之间的相互影响

杆状病毒的复制除了受自身发病机制的影响外, 来自宿主体内的昆虫激素对病毒的增殖有间接影响。例如在烟草角蛾幼虫添食 NPV 后 24~28 h 内, 注射蜕皮甾酮有明显延迟发病的现象, 一般使发病死亡时间推迟 2 天 (Kiguchi and Agui, 1981)。在 5 龄幼虫后期喂食高剂量的蜕皮激素, 使感染 NPV 的家蚕幼虫改变发病进程。AcMNPV 感染的家蚕蛹可导致人工诱导的滞育蛹发生 (张志芳等, 1993)。

在不同的发育阶段, 昆虫血淋巴中蜕皮激素的滴度被严格控制在特定的水平上 (Smith, 1985), 病毒的侵染使宿主的生长发育不再完全受自身激素调节系统的控制, 感染病毒后血淋巴中蜕皮激素的滴度和变化模式发生改变, 更有利于病毒的复制和增殖 (Dougherty *et al.*, 1987)。

正如前面所说, 杆状病毒能够通过 *egt* 基因的表达, 使蜕皮激素失活, 进而延长宿主昆虫的取食时间, 有利于病毒自身的增殖 (O'Reilly and Miller, 1989)。因此, 对感染病毒的宿主昆虫添食昆虫蜕皮激素, 可以部分恢复其生理平衡 (Zhou *et al.*, 2002a)。

第二章 实验设计

2.1 实验目的

(1) 通过分析家蚕核型多角体病毒 (BmNPV) 核苜蓿尺蠖型多角体病毒 (AcMNPV) *egt* 基因启动子的特性, 以及昆虫激素对 *egt* 基因启动子活性的调节, 以期阐明宿主昆虫的激素代谢以及激素对昆虫的发育调节作用提供依据;

(2) 研究家蚕和野桑蚕海藻糖酶基因启动子的特性, 考察滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调控作用, 为从分子水平上阐明家蚕滞育机理积累资料。

2.2 研究意义

2.2.1 昆虫杆状病毒 *egt* 基因启动子特性分析

昆虫杆状病毒 *egt* 基因编码的蜕皮甾体尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶 (ecdysteroid UDP-glucosyltransferase, EGT), 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, 从而阻碍被感染昆虫的蜕皮和化蛹变态, 以延长幼虫的取食时间, 有利于病毒自身的大量繁殖。同时, *egt* 基因是杆状病毒中迄今发现的唯一能够影响宿主昆虫激素代谢的病毒基因。因此, 深入研究杆状病毒 *egt* 基因, 对于研究阐明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重要意义。

杆状病毒具有宿主专一性的优点, 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源性。因此, 昆虫杆状病毒具有作为环保型无污染杀虫剂的潜能, 研究开发杆状病毒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) HzNPV 作为商品制剂注册登记以来, 迄今已有十多种重组杆状病毒 (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, 杆状病毒要经过一星期甚至更长的时间才能杀死宿主昆虫, 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。目前杆状病毒杀虫剂, 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。因此, 杆状病毒杀虫剂研究主要集中于解决改进宿主域狭窄和致死速度慢两大问题。

研究表明, 杆状病毒 *egt* 基因为病毒复制的非必需基因, 它的缺失不影响病毒的复制和感染性。与野生型 NPV 相比, 缺失 *egt* 基因的 NPV 感染的宿主昆虫死亡时间缩短, 可以减少害虫的取食时间, 从而提高重组杆状病毒杀虫剂的效果提供一条有效的途径。而且, 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。

丝绸因其华贵舒适而受到人们的普遍欢迎, 因而生产蚕茧的家蚕成为一种最广泛饲养的经济昆虫。家蚕核型多角体病 (*Bombyx mori* nucleopolyhedrosis) 是蚕茧生产中最主要的病毒病, 它是由家蚕核型多角体病毒 BmNPV 引起的。研究 BmNPV 不仅对家蚕病害防治具有重要的意义,

其分子生物学方面的研究更为重组 BmNPV 表达载体系统的创建和体外表达外源基因的成功提供了理论依据和技术手段。重组杆状病毒表达载体系统具有高效、安全和表达产物加工完全等独特优点,已成为生产与研究各种原核和真核蛋白有力而普及的工具,昆虫杆状病毒表达载体体系也成为国内外科学工作者的研究热点。

因此,杆状病毒 *egt* 基因的研究和基因工程病毒的开发,不仅在农作物和森林害虫生物防治上有实际意义,而且有助于阐明宿主昆虫激素代谢和激素对昆虫发育变态的调节作用。农业部家蚕生物技术重点实验室已对 BmNPV *egt* 基因的结构和功能进行了分析(季平等,2000),本试验主要研究 BmNPV 和苜蓿尺蠖核型多角体病毒(*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) *egt* 基因启动子的特性,并考察 BmNPV 同源重复序列 *hr3* 对 *egt* 基因启动子特性的影响,以及外源昆虫激素 *egt* 基因启动子转录活性的调节。

2.2.2 家蚕、野桑蚕海藻糖酶基因启动子及其滞育激素调控研究

海藻糖广泛存在于细菌、酵母、植物和无脊椎动物体内,是昆虫的主要血糖。海藻糖酶水解海藻糖为各种组织器官提供葡萄糖。家蚕海藻糖酶基因的表达受滞育激素(Diapause hormone, DH)的诱导调控(Yamashita *et al.*, 1972)。

家蚕雌蛹的咽下神经节(SG)的12个神经分泌细胞表达滞育激素基因、合成滞育激素,经由心侧体-咽侧体释放到血淋巴中。滞育激素作用于卵黄旺盛形成期的卵巢,使海藻糖酶等基因激活,位于卵巢内膜的海藻糖酶活性提高,将血液中的海藻糖降解成葡萄糖,被卵母细胞摄取,最后合成糖原,卵内的糖原增加,从而导致该卵巢产生的卵滞育。因此,研究家蚕和野桑蚕海藻糖酶基因有助与从分子水平上解明家蚕滞育机理。

2.3 研究内容和方法

2.3.1 BmNPV 和 AcMNPV *egt* 基因启动子的特性分析

- (1) 从家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)和苜蓿尺蠖核型多角体病毒(*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)抽提基因组 DNA;
- (2) 根据已发表的 BmNPV 和 AcMNPV *egt* 基因及其上游序列,设计 PCR 引物;
- (3) 分别 BmNPV 和 AcMNPV 基因组 DNA 扩增 *egt* 基因启动子序列,亚克隆到质粒载体 pGEM-3Z 中,构建成重组质粒 pBme_{egt} 或 pAce_{egt},并进行酶切鉴定和测序;
- (4) 分析 BmNPV 和 AcMNPV *egt* 基因启动子序列;
- (5) 从 pUL220-*luc* 中酶解分离 *luciferase* (*luc*) 基因,连接到 *egt* 基因启动子下游,构建 *egt* 基因启动子控制转录的荧光素酶报告质粒 pBme_{egt-luc} 或 pAce_{egt-luc};
- (6) 利用昆虫细胞和家蚕瞬时表达分析系统,进行报告质粒的体内、体外(*in vivo/in vitro*)瞬时表达,研究 BmNPV 和 AcMNPV *egt* 基因启动子的特性;
- (7) 通过启动子长度删减,构建不同长度 *egt* 基因启动子控制转录的荧光素酶报告质粒,确定 BmNPV 和 AcMNPV *egt* 基因启动子的主要功能区域。
- (8) 从 pSK-*hr3* 酶解分离 *hr3*,并插入报告质粒 pBme_{egt-luc} 或 pAce_{egt-luc} 的 *luc* 基因下游,构建成 *hr3* 增强的报告质粒,考察 BmNPV *hr3* 对 *egt* 基因启动子转录特性等的影响;

- (9) 调查外源昆虫蜕皮激素和保幼激素对 *egt* 基因启动子转录活性等的影响。

2.3.2 滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调控

- (1) 从幼虫后部丝腺提取野桑蚕、家蚕基因组 DNA；
- (2) PCR 扩增野桑蚕、家蚕海藻糖酶基因 5'侧翼区片段 并分别亚克隆到质粒载体 pGEM-3Z 中，进行酶切鉴定和测序；
- (3) 将报告基因 *luc* 克隆到重组质粒 p3Z-BmandTre、pSK-BmTre 的 *trehalase* 启动子下游，构建报告质粒 p3Z-BmTre-*luc* 和 p3Z-BmandTre-*luc*；
- (4) 通过报告质粒在体外的瞬时表达，分析桑蚕、家蚕海藻糖酶基因启动子的特性；
考察滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调控。

第三章 实验材料和常用方法

3.1 实验材料

3.1.1 病毒株、昆虫细胞和家蚕品种

野生型苜蓿尺蠖核型多角体病毒 (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 和野生型家蚕核型多角体病毒镇江株 (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV ZJ8), 昆虫细胞系 Sf21 和 Bm5, 家蚕杆状病毒高表达载体系统蚕品种 JY-1 均由农业部家蚕生物技术重点实验室保存。

3.1.2 质粒载体和受体菌

质粒 pGEM-3Z 购自 Promega 公司。pSK-*hr3* (含 BmNPV ZJ8 *hr3*, 张志芳等, 1995) 和 pUL220-*luc* (含 *luc* 基因, 雷向东等, 1993) 均为农业部家蚕生物技术重点实验室保存。校正质粒 pSK-*hsp70-lacZ-hr3* 含家蚕 *hsp70* 基因启动子控制的 β -半乳糖苷酶基因 (β -*gal*), 为本实验室构建 (Zhou, *et al.*, 2003)。

3.1.3 酶和主要试剂

各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶及其配套缓冲液, 昆虫细胞培养基 TC-100、脂质体 (Lipofectin) 等试剂为 Invitrogen 公司产品。RNaseA 为上海丽珠东风生物技术有限公司产品。GeneCleaner 试剂盒、细胞抽提及荧光素酶检测试剂盒 (E4030) 为 Promega 公司产品。

3.1.4 常用溶液和缓冲液

1) TE Buffer

pH7.4 : 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.4), 1 mmol/L EDTA (pH8.0)

pH7.6 : 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.6), 1 mmol/L EDTA (pH8.0)

pH8.0 : 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1 mmol/L EDTA (pH8.0)

2) 碱法质粒抽提液

溶液 (Sol.): 50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA (pH8.0)

溶液 (Sol.): 0.2 mol/L NaOH, 1% SDS

溶液 (Sol.): 4V 5 mol/L KAc : 1V 10 mol/L HAc

3) PPT Buffer

22V 异丙醇 : 1V 5 mol/L KAc : 2V ddH₂O (双蒸水)

4) New Wash

20 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 1 mmol/L EDTA 及 100 mmol/L NaCl 与等体积的无水乙醇配制而成。

5) 6 mol/L NaI 溶液

将 0.75 g Na_2SO_3 溶于 40 ml 双蒸水中, 加入 45 g NaI 并搅拌至完全溶解。用 Whatman 滤纸或 NC 膜过滤, 在暗处保存。

6) Gene cleaner 试剂 (Glassmilk)

100 mg/mL 的 Silica (Sigma S-5631)。将 10 g Silica 溶于 100 ml 1×PBS 中, 沉淀 2 h, 弃上清, 重复该步骤 2~3 次; 2 000 g 离心 2 min, 将沉淀物溶于 3 mol/L 的 NaI 中, 终浓度为 100 mg/ml, 4℃ 避光保存。

7) 1×PBS (不含 Mg^{2+} 和 Ca^{2+})

137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.4 mmol/L KH_2PO_4 , pH 7.3。

8) 50×电泳缓冲液 (TAE)

242 g Tris, 57.1 ml 冰乙酸, 100 ml 0.5 mol/L EDTA (pH8.0), 定容至 1 000 ml。电泳时用蒸馏水稀释 100 倍, 即用 0.5×TAE。

9) 凝胶上样缓冲液

25%甘油或 40%蔗糖, 0.25%溴酚蓝, 0.25%二甲苯青 FF。

10) 标准蛋白试剂

牛血清白蛋白(BSA)溶液: 用 0.15 mol/L NaCl 配制成 0.5 mg/ml, 作为标准蛋白。

11) TER

0.1×TE 缓冲液中加入适量的经 100℃ 15min 处理的胰蛋白酶 (Rnase A), 使中浓度达到 10 mg/ml。

12) ONPG (邻硝基- β -D-半乳糖苷)

溶于 0.1 mol/L 磷酸钠 (pH7.5) 的 4 mg/ml ONPG 溶液。

13) 100× Mg^{2+} 溶液

0.1 mol/L MgCl_2 , 4.5 mol/L β -巯基乙醇。17) 0.1 mol/L 磷酸钠

混合 41 ml 0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9 ml 0.2 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 50 ml 水配制而成。

14) 脂质体

DDAB/DOPE (Invitrogen 公司产品) 脂质体 (摩尔比为 1:2), 按如下方法制备: 6.6 $\mu\text{mol/L}$ DDAB 和 13.4 $\mu\text{mol/L}$ DOPE 溶解在 1 ml 无水乙醇中, 取 142 μl 在旋涡振荡的情况下迅速注入到 858 μl 灭过菌的双蒸水中。终浓度为 2 mg/ml。该脂质体在 4℃ 下可以稳定保存 6 个月以上。

15) 昆虫激素

蜕皮激素 (ecdysone) 为 20- β -羟基蜕皮酮, 由中国农业科学院蚕业研究所配制。

16) 保幼激素类似物

保幼激素类似物 (JHA) 为 ZR512, 由山东农业大学崔为正教授惠赠。

17) 家蚕滞育激素

由中国科技大学徐卫华教授提供。

3.1.5 其它试剂

TC-100 昆虫细胞培养基、胎牛血清(FBS); 琼脂糖为 Serva 公司产品; SDS 为 BDH 公司产品; Tris 购自 Sigma 公司; 蛋白胨、酵母抽提物购自 OXOID 公司; 溴化乙锭(EB)、考马斯亮兰 G250、R250 均购自 Fluka 公司; dNTPs、10 kD protein ladder 为 GIBCO-BRL 公司产品; 牛血清

白蛋白购自东风丽珠公司； λ DNA/HindIII 标准分子量购自华美生物工程公司；丙烯酰胺、 N,N' -甲叉双丙烯酰胺为 Aldrich 化学有限公司产品；琼脂粉为日本进口分装；Sephacrose 2B 购自 Pharmacia 公司；阳离子脂质 DDAB 及中性辅助脂质 DOPE 购自 Sigma 公司。各种寡核苷酸引物均由上海生物工程公司合成。细胞培养用的无机试剂如 NaCl、KOH、 $NaHCO_3$ 等购自 GIBCO-BRL 公司。细胞培养用抗生素等购自华北制药股份有限公司。

其它试剂为进口或国产分析纯级。

3.1.6 细菌培养基

LB 液体培养基的配制：10 g 蛋白胨，5 g 酵母抽提物，10 g 氯化钠，加去离子水溶解，用 NaOH 调 pH 至 7.0~7.5，定容至 1 000 mL，分装后高压灭菌。

LB 平板：LB 液体培养基中加入 1.5% 琼脂粉。

3.1.7 昆虫细胞培养基

1 $\times$ TC-100 培养基的配制按产品说明书进行。将 1 个包装 (1 $\times$ 1 L) TC-100 粉剂边搅拌边加到双蒸水中，加 0.35 g $NaHCO_3$ ，缓慢用 5 N KOH 调整 pH 至 6.1~6.2，补加 1.1 g NaCl 调节渗透压，补加双蒸水至 900 mL，0.22 μ m 滤膜过滤除菌。使用前添加 10% 经 56 $^{\circ}C$ 30 min 灭活的胎牛血清、终浓度 100 μ g/ml 链霉素和终浓度 100 U/mL 青霉素 G 钠盐。

3.1.8 主要仪器设备

SANYO 细胞培养箱，无菌操作台，Milli-Q 超纯水装置 (Millipore 公司)，加压不锈钢过滤灭菌装置，Olympus 倒置显微镜，PTC-100TC 型 PCR 仪 (MJ Research Inc., USA)，Beckman L5-65B 超速离心机，日立低温高速离心机，Beckman LS-6000TA 液体闪烁计数器，岛津 UV-260 双光束紫外分光光度计，电泳凝胶干燥系统，多功能电泳图谱数据处理系统，Kodak DC120 数码成像分析系统，高性能计算机及 DNASTAR 软件、Statistical Analysis System (SAS) 软件和 Sigma Plot 软件等。

3.2 常用实验方法

3.2.1 昆虫细胞的传代与培养

细胞的传代、冻存和复苏操作均参照 Summers 和 Smith (1987) 操作手册进行。

将培养于 12 cm^2 方瓶中的待传代细胞，倾去旧培养基，加入新鲜培养基，用弯头吸管吹打贴壁细胞，使其脱落，根据细胞密度按照 1:2~2.5 瓶的比例将细胞悬浮液转移至新培养瓶中，补加新鲜的 TC-100 完全培养基使终体积为 3 mL，27 $^{\circ}C$ 恒温培养。

3.2.2 细胞的冻存

取对数生长期的细胞 (存活率 97~98%)，用弯头吸管吹打贴壁细胞，转移入 15 mL 离心管中，3 000 g 离心 5~6 min，弃上清，加入一定体积的 TC-100 培养基重新悬细胞，用血球计数板计数，使细胞密度达到 $0.5\sim 1.0 \times 10^7$ /mL，加入等体积的用于冻存的新鲜培养基 (经过滤除菌

的含 20% DMSO 的完全培养基,使 DMSO 的终浓度为 10%),冰上操作。将细胞悬浮液转移至冻存管中(通常为每管 1 mL),然后将冻存管置于塑料泡沫盒中,缓慢冷冻细胞:先放入-20 冰箱中 2~3 h,再转移至-80 冰箱中过夜,最后将冻存管置于液氮罐中。

3.2.3 细胞的复苏

迅速取出液氮中冻存的细胞,置于 37℃ 水浴中,轻轻摇动,待冻存液完全融化后,酒精棉消毒冻存管外壁,将解冻的细胞转移入至少 5 倍体积的预先加入 12 cm² 培养瓶中的新鲜的冷(4℃)的 TC-100 完全培养基中,整个操作在 2 min 内完成。让细胞在室温下贴壁 1 h,再将之置于 27℃ 培养箱中培养 2~3 h,待细胞贴壁后,更换培养基。根据细胞生长状况,进行换液或传代。

3.2.4 脂质体介导的功能质粒在昆虫细胞系中的转染与瞬时表达

接种约 5×10^5 细胞于 12 cm² 培养瓶中,贴壁培养过夜。除去含 FBS 的培养基,用无血清培养基洗细胞二次,再加 1 mL 无血清培养基。事先在 50 μ L 反应体系中加入 1 μ g 质粒 DNA 和适量的 Lipofectin,用 ddH₂O 补足体积,轻轻混匀,27℃ 温育 15 min 使 DNA 被脂质体包埋,制成转染液。将转染液逐滴加入培养瓶中,并轻轻转动混匀。转染 4~5 h 后倾去含转染液的无血清培养基,补加 3 mL 含 FBS 培养基,27℃ 培养适当时间用于瞬时表达分析。以 pUL220-luc 转染的细胞为空白对照。除昆虫激素处理外,每个转染试验均以 HSP70 启动子控制的 β -gal 表达质粒作穿梭质粒,在制备转染液时,加入 0.5 μ g 穿梭质粒 DNA 混合,每组试验至少重复 3 次。

3.2.5 功能质粒转染后的病毒反式激活与昆虫激素处理

在功能质粒转染细胞 4~5 小时后,在培养基中加入病毒母液(MOI = 0.5),感染 1 h。然后倾去旧培养基,加入 3 mL 含血清的完全培养基,再 27℃ 培养 48 h 或规定时间,收集细胞。设置无病毒感染的细胞为对照。

昆虫激素处理区,在病毒感染更换培养基时,加入预定量的昆虫激素,再按上述方法进行细胞培养。

3.2.6 家蚕的饲养和功能质粒在家蚕幼虫中的转染与瞬时表达

家蚕品种 JY-1 在 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 下用新鲜桑叶饲养,5 龄蜕皮后 24 h 每头段注射 20 μ L 含 5 μ L 脂质体和 1 μ g 质粒 DNA 的转染液,使质粒能被脂质体导入蚕的血淋巴细胞。2 h 后每头蚕再注射 5 μ L 含大约 1×10^5 pfu BmNPV 病毒粒子的无血清培养基稀释液,以感染家蚕幼虫。饲养一定时间后收集血液,制备细胞抽提物。

3.2.7 细胞计数

用血球计数板作细胞记数,根据细胞密度决定是否用 PBS 稀释,如先稀释,计算时应乘以稀释倍数。取细胞悬液 0.4 mL,加 0.1 mL 台盼蓝染液(0.2%),混合均匀后在 2 min 内将样品加

到血球计数板上,记录计数板上四个大方格内活细胞数和死细胞数。活细胞透明发亮,而死细胞则被染成蓝色。

3.2.8 BmNPV 和 AcMNPV 基因组 DNA 的制备

- 1) 用 BmNPV 游离病毒穿刺接种 5 龄家蚕,待蚕发病(4~5 d)后收集蚕血于 1.5 ml Eppendorf 管;或 AcMNPV 感染 Sf21 细胞,4 d 后收集多角体。
- 2) 5 000 g 4 离心 10 min,弃上清,沉淀用 500 μ l 的 0.1% SDS 重悬,室温 30 min。离心后用 0.1% 的 SDS 和 ddH₂O 反复洗涤多角体至乳白色为止。
- 3) 将沉淀悬浮于 200 μ l 1 $\times$ TE (pH8.0) 中,加入等体积 0.1 mol/L Na₂CO₃ 和 0.15 mol/L NaCl 缓冲液(pH10.5), 37 作用 30 min 以裂解多角体。
- 4) 加入 2% SDS 至终浓度 0.5%,冰浴 10 min 至溶液变清;用饱和酚、氯仿/异戊醇(24:1)各抽提一次,12 000 g 4 离心 5 min,取上清。
- 5) 加入 2 倍体积的无水冷乙醇(或 2.5 倍 95% 的无水冷乙醇),DNA 呈絮状沉淀。
- 6) 12 000 g 4 离心 10 min,沉淀用 70% 冷乙醇洗一次,稍晾干,溶于 200 μ l 0.1 $\times$ TE (pH8.0) 中,4 放置备用。

3.2.9 碱法少量快速抽提质粒 DNA

- 1) 挑取单菌落接种于含 Amp (80 μ g/ml) 的 3 ml LB 培养基中,37 振荡培养过夜。
- 2) 取 1.5 ml 过夜培养物于 Eppendorf 管内,5 000 g 离心 5 min,弃上清,收集菌体(沉淀)。
- 3) 用 150 μ l Sol 充分悬浮沉淀,室温下放置 15 min。
- 4) 加 300 μ l Sol ,轻轻倒转混匀,再加入 150 μ l 氯仿,混匀后冰浴 5 min。
- 5) 加 450 μ l Sol ,充分混匀后冰浴 10 min,12 000 g 4 离心 10 min,取上清。
- 6) 加 0.6 倍体积异丙醇,混匀后于 4 放置 20 min。12 000 g 4 离心 10 min,弃上清。
- 7) 沉淀溶于 250 μ l TER (含 20 μ g/ml RnaseA 的 TE) 中,37 消化 20 min。
- 8) 加入 300 μ l PPT 沉淀 Buffer,混匀后置 4 20 min;12 000 g 4 离心 10 min,弃上清,用 70% 冷乙醇洗沉淀一次,真空干燥。
- 9) 用 100 μ l 0.1 $\times$ TE (pH 8.0) 溶解,-20 保存备用。

3.2.10 碱法大量制备质粒 DNA

- 1) 单菌落接种于 3 ml LB 培养基,37 振荡培养过夜,取培养液 100 μ l 接种于 100 mL LB 培养基中(含 150 μ g/ml Amp),37 振荡培养过夜。
- 2) 将细菌培养液置 50 ml 离心管中,5 000 g 离心 5 min,弃上清,收集菌体(沉淀)。加 3 ml Sol I,充分振荡悬浮沉淀,冰浴 30 min。
- 3) 加 6 mL Sol II 轻轻倒转混匀,再加 800 μ l 氯仿,冰浴 20 min。
- 4) 加 9 ml Sol III 混匀,冰浴 30 min。12 000 g 4 离心 10 min,取上清。
- 5) 加 0.6 倍体积异丙醇混匀,于 4 放置 30 min 以上,12 000 g 4 离心 10 min。
- 6) 沉淀用 1 ml TER (含 20 μ g/ml RnaseA) 溶解,37 消化 20~30 min。
- 7) 用 Sepharose 2B 柱纯化质粒 DNA,在 260 nm 处收集第一吸收峰处的样品。
- 8) 用等体积的苯酚:氯仿:异戊醇=25:24:1 和氯仿,各抽提一次过柱后的 DNA 样品。

- 9) 加 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH 6.5) 和 2 倍体积的无水乙醇, -20℃ 沉淀 DNA 1 h 以上。
- 10) 12 000 g 4℃ 离心 10 min, 用 70% 乙醇洗涤沉淀一次, 真空干燥, 溶于 300~500 μ l TE 中。
- 11) 用蛋白-核酸仪测定 DNA 样品的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值, 并计算 DNA 的浓度, -20℃ 保存备用。

3.2.11 限制性内切酶反应

参照产品目录中各种酶的推荐条件, 反应体系包含质粒 DNA 1~2 μ g, 1/10 体积的 10 $\times$ 酶反应缓冲液, 酶量为 2~4 U/ μ g DNA, 反应体积一般为 20 μ l。在合适条件下 (除非特别说明, 一般为 37℃), 反应 1.5~2 h, 按照酶解后 DNA 片段分子量的大小用不同浓度的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

3.2.12 DNA 片段的分离与回收

1) 冻融法回收 DNA 片段

根据 DNA 片段大小, 选择适当浓度的琼脂糖凝胶进行电泳, 当准备回收的 DNA 片段与其它片段分开后, 在紫外灯下用手术刀切下所需条带, 放入小 Eppendorf 管中, 置于 -70℃ 中 30 min, 然后于 37℃ 温育 10 min 使凝胶融化。重复 1~3 次, 12 000 g 离心 10 min, 吸出上清于 -20℃ 保存。

2) 低熔点胶回收 DNA 片段

选择合适的低熔点凝胶电泳 (3~5 V/cm), 切下含目的 DNA 片段的条带, 置于 Eppendorf 管中; 加入 3 倍体积的 TE, 65℃ 温育 10 min 使胶融化; 加入等体积的 37℃ 预热的饱和酚抽提一次, 上清再用酚/氯仿、氯仿各抽提一次; 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 6.5), 再加 2 倍体积无水乙醇沉淀回收 DNA。

3) Glassmilk 纯化回收 DNA 片段

用普通琼脂糖凝胶进行电泳, 切下所需 DNA 条带, 称重后放入 Eppendorf 管中, 加入 3 倍体积 (v/w) 的 6 mol/L NaI, 65℃ 1~2 min 使凝胶充分溶解, 再加入 10 μ l glassmilk 吸附 DNA, 冰上放置 10 min, 中间摇动 2~3 次, 12 000 g 离心 15 sec, 去上清, 沉淀用 0.5 ml New Wash 溶液洗涤 3 次, 37℃ 置 10~15 min 晾干后, 用适量的 0.1 $\times$ TE 溶解 DNA, 离心后用 Tip 头吸取上清 (DNA), 保存于 -20℃ 备用。

3.2.13 DNA 的连接

连接总体积为 10 μ l, 5 $\times$ T4 DNA 连接缓冲液 2 μ l, 外源 DNA 片段与载体的摩尔比一般为 2~3:1, 若为粘末端连接, 加 1 μ l T4 DNA 连接酶, 12~14℃ 连接 8~12 h; 若是平头连接, 则加 2 μ l T4 DNA 连接酶, 18~22℃ 连接过夜。

3.2.14 感受态细胞的制备

- 1) 将 -20℃ 冻藏的 TG1 甘油菌, 用接种针在 LB 平板上划线, 37℃ 培养过夜复苏。
- 2) 用灭菌牙签从 LB 平板上挑取单菌落, 放入 3 ml LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养过夜。
- 3) 取 50 μ l 过夜培养物接种到另一新的 3 ml LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养 2.5~3.0 h, 使 OD 值在 0.6 左右。5 000 g 4℃ 离心 4 min 收集菌体。

- 4) 将菌体重悬于 800 μl 75 mmol/L 冷 CaCl_2 中, 冰浴 30 min, 5 000 g 离心 4 min, 弃上清, 加入 200 μl 75 mmol/L 冷 CaCl_2 , 轻轻敲打管壁, 使混合均匀, 冰上放 2 h 以后用于转化, 2d 内使用。

3.2.15 质粒 DNA 的转化

- 1) 质粒 DNA 20 ~ 100 ng 或连接混合物 5 μl 加到 200 μl 上述制备的感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰浴 30 min。
- 2) 42 °C 热休克 90 sec, 迅速置冰上 1 ~ 2 min, 加入 1 ml 已温育至 37 °C 的 LB 液体培养基, 37 °C 振荡培养 45 ~ 60 min, 稍离心, 移去部分上清后悬起细菌, 涂布于含 80 $\mu\text{g/ml}$ Amp 的 LB 平板上, 37 °C 倒置培养过夜。

3.2.16 重组质粒的筛选鉴定

1) 快速细胞破碎法

利用构建后的质粒与原来质粒分子量的差别, 检出重组子。分别挑取多个单菌落转化子接种于 3 ml 含 80 $\mu\text{g/ml}$ Amp 的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养过夜 (10 ~ 16 h)。取 500 μl 菌液于 Eppendorf 管中, 12 000 g 离心 15 秒, 弃上清, 加入 30 μl 快抽缓冲液 (6% 蔗糖, 0.1% 溴酚蓝), 再加入 20 μl 1:1 (V/V) 的酚/氯仿, 将菌体弹起, 充分振荡, 12 000 g 离心 8 min, 取上清直接上样电泳, 观察结果。

2) 酶切鉴定法

从转化的平板上分别挑取多个单菌落转化子, 接种于 3 ml 含 80 $\mu\text{g/ml}$ Amp 的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养过夜 (10 ~ 16 h)。按照 2.2.9 的方法快速抽提 DNA, 利用合适的限制性内切酶进行酶切反应, 进行琼脂糖凝胶电泳, 鉴定 DNA 片段大小。

3.2.17 病毒滴度的测定

病毒的滴度是指具有感染能力的芽生病毒粒子 BV 的浓度, 而不等同于病毒粒子的浓度, 因为不是所有的病毒粒子均具有感染能力。病毒滴度测定方法主要有空斑试验 (Plaque method) 和终点法 (End-point method), 本实验采用 Reed-Muench 终点法测定病毒样品的感染滴度。具体步骤如下:

- 1) 处于对数生长期的细胞做成细胞悬浮液, 密度控制在 $2.0 \sim 3.0 \times 10^5$ cells/ml;
- 2) 取 8 个无菌小园瓶标号 1~8 置于超净工作台上, 每瓶加入 900 μl 的培养基;
- 3) 向 1 号瓶加入 100 μl 的待测病毒样品, 混匀后吸出 100 μl 加入到 2 号瓶, 以此类推, 得到稀释度分别为 $10^{-1} \sim 10^{-8}$ 的病毒样品;
- 4) 向 1~7 号瓶中各加入 900 μl 的细胞悬浮液, 8 号瓶加入 1 000 μl 的细胞悬液;
- 5) 取无菌的 96 孔板, 1~8 号瓶分别对应 A~H 孔, 每排 10 孔, 每孔加 100 μl , 其余 16 孔加入用培养基稀释一倍的细胞悬液作对比观察。
- 6) 盖好盖子, 用封条封好, 作标记, 27 °C 下培养;
- 7) 从第三天开始观察孔板内细胞被感染的情况, 第五天记录结果, 每孔内只要有一个细胞被感染, 即记为 “+”。

8) 典型结果如表 2-1 所示。

按公式 $\lg TCID_{50} = \lg B + \frac{b-50}{b-a} d$ 进行计算。其中 B 指引起高于 50% 效果剂量, b 指 B 剂量效果%(>50), a 指 A 剂量效果%(<50), d 指两个相邻剂量的对数差, $\frac{b-50}{b-a} d$ 是插值。本实验按 10 倍稀释, 则插值为: $\frac{63.6-50}{63.6-7.1} \lg 10^{-1} = -0.241$ 。

在 10^{-6} 稀释度时, $\lg B = \lg 10^{-6} = -6$, 所以, $\lg TCID_{50} = -6 + (-0.241) = -6.241$ 。由于每孔 100 μl 样品中病毒稀释液和细胞悬液各占 50 μl , 即 0.05 ml $10^{-6.241}$ 病毒稀释液 = $TCID_{50}$, 因此, 每毫升病毒原液的 $TCID_{50} = 1/(0.05 \times 10^{-6.241}) = 3.48 \times 10^7$; 若将 $TCID_{50}$ 转换成 PFU/ml, 则 $PFU/ml = TCID_{50}/ml \times 0.693$, 故每毫升病毒原液的滴度 = $3.48 \times 10^7 \times 0.693 = 2.4 \times 10^7$ PFU/ml。

表 2-1 病毒滴度稀释结果

Table 2-1 Results of titer dilution of virus

病毒 稀释度	正常培 养孔数	病变 孔数	累 积 数		病变孔数 感染孔总数	病变孔数 (%)
			正常孔数	病变孔数		
10^{-5}	0	10	0	17	17/17	100
10^{-6}	4	6	4	7	7/11	63.6
10^{-7}	9	1	13	1	1/14	7.1
10^{-8}	10	0	23	0	0/23	0

3.2.18 病毒多角体的计数

病毒多角体由于有多角体蛋白的保护, 所以在环境中相对稳定, 超声波破碎细胞后, 多角体还能存在。

细胞破碎通常是采用超声波均质机, 由于探头需插入细胞悬浮液中, 因而样品量要求大于 5 ml, 不适于小样品量的分析。据此, 我们采用超声波振荡器破碎感染细胞, 由于对样品量无量的要求, 因此适于实验室规模的病毒多角体计数。具体方法如下:

- 1) 感染细胞充分吹打脱离贴附层;
- 2) 用超声波振荡器(SONIPREP 150, England)振荡破碎细胞, 时间 10 min, 冰上操作;
- 3) 将破碎后的多角体悬液滴一滴在血球计数板上, 计中间 25 个小方格中四角及中央 5 个方格中的多角体个数。
- 4) 最终多角体个数按公式 (1) 计算:

$$PIB/ml = (5 \text{ 个方格中多角体总数}/5) \times 0.25 \times 10^6 \times \text{稀释倍数} \quad (1)$$

[公式推导如下: 若计数板中央大格划分为 25 个小格, 则每小格的长宽均为 $1/5 = 0.2 \text{ mm}$, 深为 0.1 mm, 每小格体积为: $0.2 \times 0.2 \times 0.1 = 4 \times 10^{-3} (\text{mm}^3) = 4 \times 10^{-6} (\text{cm}^3)$, 所以 $PIB/ml = (5 \text{ 个方格中多角体总数}/5) / (4 \times 10^{-6}) = (5 \text{ 个方格中多角体总数}/5) \times 0.25 \times 10^6$ 。]

3.2.19 细胞抽提物的制备

用含报告质粒 DNA 的转染液转染细胞 4~5 h, 用病毒感染 1 h, 再经 48 h 或规定时间在

冰上收集细胞, 转移到 1.5 ml 离心管中, 4℃ 以 9 000 g 离心 5 min, 去上清, 沉淀用 4℃ 1×PBS 洗涤两次后, 加入 400 μl 裂解缓冲液(E4030 kit, Promega 公司产品), -20℃ 冷冻 4 h 以上。室温融化以充分裂解细胞, 4℃ 以 9 000 g 离心 5 min, 取上清测定荧光素酶活力。

报告质粒在家蚕幼虫进行表达时, 用含报告质粒 DNA 的转染液注射蚕体, 2 h 后接种 BmNPV 进行感染, 经 48 h 或规定时间在冰上收集蚕血淋巴, 每 3~5 头蚕合并为 1 个样品, 并按照上述方法制备细胞抽提物。

3.2.20 荧光素酶活性分析

取 50 μl 荧光素酶分析试剂于测定管中, 将上述制备的细胞抽提物用无质粒转染的细胞抽提液或细胞裂解液作适当稀释后, 取一定体积放入测定管中, 用 Tip 头快速抽吸 2~3 次使之混匀, 置于液体闪烁仪中测定 cpm 值。测定温度为 24~25℃, 荧光素酶活性以 15 sec 内所释放的光亮子数表示。

3.2.21 穿梭载体校正系统 *E. coli* β-半乳糖苷酶比活性测定

- 1) 取 96 孔点样板 1 块, 1 个孔作为调零孔, 其余为待测样品孔 (根据样品数量)。
- 2) 在每个孔中加入 10×Mg²⁺溶液 7 μl, 1×ONPG (邻硝基-β-D-半乳糖苷) 5 μl。
- 3) 在调零孔中加入 ddH₂O 58 μl, 样品孔中加入细胞提取物 58 μl。
- 4) 用 Parafilm 或保鲜膜覆盖, 以免蒸发, 置 37℃ 温育 30 min 以上或出现淡黄色。
- 5) 用岛津 UV-260 双光束紫外分光光度计在 420 nm 波长下读取反应混合液的光密度 (OD) 值。

β-半乳糖苷酶比活由公式 (2) 计算:

$$\beta\text{-半乳糖苷酶比活} = \frac{\text{OD}_{420} \times 380}{\text{min at } 28^{\circ}\text{C} \times \text{ml hemolymph in reaction}} \quad (2)$$

一个单位的酶定义为: 在 28℃ 每分钟水解 10⁻⁹ 摩尔 ONPG 的酶量。380 是将 OD₄₂₀ 转换为酶单位的转换常数。

3.2.22 DNA 浓度测定

DNA 定量时, 在 260 nm 和 280 nm 两个波长下读数。在 260 nm 的读数用于计算样品中的核酸浓度, OD 值为 1 相当于大约 50 μg/ml 双链 DNA 或 20 μg/ml 的单链寡核苷酸。根据其在 260 nm 以及 280 nm 的读数间的比值 (OD₂₆₀/OD₂₈₀) 估计核酸的纯度。DNA 纯品的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.8, 如果样品中污染有蛋白质或酚, 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 将明显低于此值, 此时无法对样品中的核酸进行精确定量。

3.2.23 蛋白质浓度测定

将牛血清白蛋白配制成标准浓度的蛋白质 (0.5 mg/ml), 用酶标仪进行蛋白质定量。

- 1) 取 96 孔点样板 1 块, 按照 1 个孔调零孔, 2 个孔标准蛋白孔, 每个待测样品占 2 个孔, 计算所需要的孔数, 每个孔 G-250 染料 50 μl。
- 2) 在孔调零孔中加入 20 μl 0.15M NaCl, 每个标准蛋白孔中加入 20 μl 标准蛋白溶液

(0.5 μ g/ μ l), 每个样品孔中加入 20 μ l 细胞抽提物样品, 每次加入后用 Tip 头抽吸 2-3 下混匀。

3) 用 DG3022A 型酶联检测仪在 590nm 下测定蛋白质含量。

3.2.24 DNA 序列测定

将质粒转化的大肠杆菌培养液直接寄送上海基康生物技术有限公司, 用通用引物 T3 或 T7 引物进行测序。测序结果在 DNA Star 和 MatInspector 软件上分析检索。

3.2.25 数据统计分析

数据显著性测定分析采用 Statistical Analysis System (SAS) 统计软件; 作图采用 Sigma Plot 软件。

第四章 BmNPV *egt* 基因启动子特性分析

昆虫杆状病毒 *egt* 基因编码蜕皮甾醇尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶 (ecdysteroid UDP-glucosyltransferase, EGT) (O'Reilly and Miller, 1989)。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 (O'Reilly and Miller, 1990), 主要以 3-5 个单体组成的寡聚体形式存在 (Evans and O'Reilly, 1999)。病毒通过 EGT 酶控制宿主的蜕皮和变态, 延长宿主幼虫的取食时间, 有利于病毒自身的大量繁殖 (O'Reilly and Miller, 1989)。*egt* 基因为病毒 DNA 复制非必需基因, 删除苜蓿尺蠖核型多角体病毒 (AcMNPV) *egt* 基因不影响病毒在细胞中的复制 (O'Reilly and Miller, 1991a)。EGT 酶能催化尿苷二磷酸糖的糖基转移到蜕皮甾醇分子上 (O'Reilly *et al.*, 1992)。在体外以蜕皮激素为底物时, EGT 酶对尿苷二磷酸葡萄糖 (UDP-glucose) 或尿苷二磷酸半乳糖 (UDP-galactose) 有几乎相同的催化效率 (Evans and O'Reilly, 1998), 若以蜕皮激素和 UDP-glucose 为底物, 则转移反应的产物为蜕皮激素 22-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 (22-O- β -D-glucoside) (O'Reilly *et al.*, 1991b)。但在体内条件下, 由于 UDP-galactose 是能获得的最主要 UDP-糖, 所以 AcMNPV 感染后只产生蜕皮激素半乳糖苷 (O'Reilly *et al.*, 1992; Evans and O'Reilly, 1998)。

杆状病毒基因的表达可划分为 2 个综合时相, 即病毒 DNA 复制开始前的早期和病毒 DNA 复制开始时或开始后的晚期 (吕鸿声, 1998)。*egt* 基因的转录产物为 2 种具有共同 5' 末端的 mRNA (O'Reilly and Miller, 1990)。在蛋白质合成抑制剂放线菌酮 (cycloheximide) 和 DNA 合成抑制剂 aphidicolin 存在的情况下, AcMNPV *egt* 基因的 2 种转录本 mRNA 的合成不受影响, 即 AcMNPV *egt* 基因的转录不依赖于病毒蛋白合成及病毒 DNA 复制, 在病毒感染细胞后 3 h 可以在细胞及胞外液体中检测到 EGT 酶的活力, 因此认为 AcMNPV *egt* 基因属于极早期基因, 在病毒感染后期 *egt* 基因的转录水平下降 (O'Reilly and Miller, 1990)。而 *Spodoptera littoralis* 核型多角体病毒 (SpliMNPV) *egt* 基因的启动子转录活性需要病毒极早期基因 *ie-1* 表达产物 IE-1 反式激活, 在 SpliMNPV 病毒感染昆虫培养细胞后 8 小时才检测到 *egt* 基因的转录本 mRNA, 但是在病毒感染 3 h 后细胞培养基中检测到了 EGT 酶的活性 (Toister-Achituv and Faktor, 1997)。舞毒蛾核型多角体病毒 (LdMNPV) *egt* 基因迟早期基因, 在病毒感染后约 12~48 h 转录, 16 h 时转录本 mRNA 达到最大量, 其转录不受 DNA 合成抑制剂 aphidicolin 的影响, 但是蛋白质合成抑制剂 cycloheximide 可抑制转录 (Riegel *et al.*, 1994; Slavicek *et al.*, 1999)。由此说明杆状病毒 *egt* 基因特性存在差异。

家蚕核型多角体病毒 (BmNPV) *egt* 基因位于基因组 6407~7925 bp (Gomi *et al.*, 1999), BmNPV ZJ-8 株 *egt* 基因核苷酸序列与 AcMNPV (Ayres *et al.*, 1994) 具有 95% 的同源性 (季平等, 2000)。用野生型 AcMNPV 感染化蛹后不久的家蚕蛹, 诱导成为人工滞育蛹 (张志芳等, 1993), 证明 AcMNPV *egt* 基因在蚕体内表达产生的 EGT 酶发挥了作用从而改变家蚕的变态 (Shikata *et al.*, 1998)。

昆虫保幼激素和蜕皮激素的平衡, 控制昆虫的发育和变态 (Himura *et al.*, 1999)。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 (Kiguchi and Agui, 1981; Smith, 1985)。杆状病毒感染昆虫后, 昆虫体内的蜕皮激素浓度不仅没有下降反而升高, 但是

蜕皮激素的滴度下降(Dougherty et al. ,1987),这是由于病毒产生的 EGT 酶使蜕皮激素糖基化,成为一种不具有生物活力的糖基化蜕皮酮,从而反馈调节昆虫蜕皮激素的合成(Park et al. ,1993)。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(Park et al. ,1996)。给接种病毒后的 5 龄家蚕幼虫添食或体喷蜕皮激素或保幼激素,使杆状病毒载体携带的外源基因的表达量明显提高,并促进病毒的复制增殖(王厚伟等,2000),部分恢复宿主体内的生理平衡(Zhou et al. ,2002a)。

家蚕核型多角体病是蚕业生产的最主要病害之一,研究 BmNPV *egt* 基因启动子的结构和功能,以及外源昆虫激素等生物活性物质对启动子功能的调节影响,对于进一步研究和改进杆状病毒载体表达系统、提高杆状病毒杀虫剂效果和研究病毒和昆虫激素作用机理等具有重要的意义,目前这方面的研究尚未见报道。本实验以荧光素酶基因(*luciferase*)为报告基因,研究 BmNPV *egt* 基因启动子的转录特性、BmNPV 同源重复区 *hr3*、蜕皮激素和保幼激素等对 *egt* 基因启动子活力的调节影响以及启动子主要功能区等。

4.1 材料与方法

4.1.1 实验材料

BmNPV ZJ-8 株、家蚕细胞 Bm5 系、受体菌 *E.coli* TG1、质粒载体 pSK-*hr3*(含 BmNPV ZJ-8 *hr3*)(张志芳等,1995)、pUL220-*luc* (雷向东等,1993 ;1994) 和家蚕杆状病毒高表达载体系统蚕品种 JY-1 均为农业部家蚕生物技术重点实验室保存。穿梭质粒校正系统 pSK-*hsp70-LacZ-hr3* [含 *hsp70* 启动子控制的 β -半乳糖苷酶基因(*β -gal*)和 BmNPV ZJ-8 *hr3* 增强子]为实验室先前构建(周亚竟,2002 ;Zhou et al. ,2003a)。pGEM-3Z 载体为 Promega 公司产品。

实验中使用的各种酶及缓冲液、昆虫细胞培养基 TC-100、FBS、Lipofectin 试剂等均为 Invitrogen 公司产品。荧光素酶检测试剂盒(E4030)为 Promega 公司产品。蜕皮激素 20- β -羟基蜕皮酮为中国农业科学院蚕业研究所生产,保幼激素类似物 ZR512 由山东农业大学崔为正教授馈赠。其它试剂均为 Sigma 公司产品。荧光素酶活性(*Luc*)在 Beckman LS-6000TA 液体闪烁仪上测定。

4.1.2 实验方法

1) BmNPV ZJ-8 株基因组 DNA 的提取

按照 3.2.8 提取 BmNPV ZJ-8 株基因组 DNA (Summers and Smith, 1987)。

2) PCR 引物设计

根据 BmNPV T3 株基因组(GenBank Accession Number: L33180)和 ZJ8 株 *egt* 基因序列 Gomi et al. ,1999, 季平等,2000),设计上游引物 1 (FP₁) 5' -TCGAATTCCTTGTACCGATGCACGCGAA-3',对应于 T3 株 *egt* 基因翻译起始位点 ATG 上游-544~-524 nt,5' 端含 *EcoRI* 限制位点;下游引物 1 (RP₁) 5' -AAGGATCCAATTTTGCTTCAACCCGAATAACTG-3',互补于 ZJ8 株 *egt* 基因翻译起始位点 ATG 及其上游-22 ~ +2 nt,ATG 突变为 ATT,5' 端含 *BamHI* 限制位点。

为了分析确定 BmNPV *egt* 基因启动子的功能区,又在其翻译起始位点 ATG 上游设计上游引物 2 (FP₂) 5' -CCGAATTCACGTTTGACGTGCA-3',对应于 BmNPV T3 株 *egt* 基因翻译起始位点 ATG 上游-309 ~ -291 nt,5' 端含 *EcoRI* 限制位点;和上游引物 3 (FP₃): 5'

-ATGAAATTCACATCATGTCGACG- 3', 对应于 BmNPV T3 株 *egt* 基因-159 ~ -141 nt, 5' 端含 *EcoRI* 限制位点。

3) *egt* 启动子序列的扩增

以 BmNPV ZJ-8 基因组 DNA 为模板, 用上游引物 FP₁、FP₂ 和 FP₃ 分别与下游引物 RP1 配对, 进行 PCR 扩增。在 50 μ l 反应体系中加入:

ddH ₂ O	32.5 μ l
10 $\times$ PCR Buffer (Mg ²⁺ free)	5 μ l
25 mM MgCl ₂	3 μ l
2.5 mM dNTP	4 μ l
上游引物 (FP ₁ /FP ₂ /FP ₃)	1 μ l (约 50 p mol)
下游引物 RP ₁	1 μ l (约 50 p mol)
BmNPV ZJ-8 DNA	2 μ l
Taq DNA 聚合酶	0.5 μ l (1U)
总体积	50 μ l

PCR 反应条件: 在加入 Taq DNA 聚合酶前对基因组 DNA 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 加入 Taq DNA 聚合酶, 94 $^{\circ}$ C 变性 1.5 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环 35 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

4) PCR 产物的分离纯化与亚克隆

扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 回收含目的 DNA 片段的凝胶, 按照 3.2.12 中的玻璃奶法进行纯化, 获得含酶切位点的 542 bp 的 *egt* 基因启动子片段。

用 *EcoRI*-*Bam*HI 分别酶解纯化后的 PCR 产物和载体 pGEM-3Z 按照 3.2.13-3.1.15 将 542 bp *egt* 基因启动子片段与载体 pGEM-3Z 连接 转化 *E. coli* TG1。按照 2.2.16 筛选重组子 pBmeg₅₄₂, 委托上海基康生物技术有限公司进行测序。

5) 报告质粒的构建

用 *Bam*HI 酶解 pUL220-*luc* 分离 *luc* 片段, 与 *Bam*HI 酶解的 pBmeg₅₄₂ 连接, 将 *luc* 基因置于 *egt* 基因启动子下游, 构建成报告质粒 pBmeg_{542-luc} (图 4-1)。

再用 *Pst*I 酶解 pSK-*hr3* 分离出 *hr3* 片段 (Genbank Accession Number: U51238), 亚克隆到 pBmeg_{542-luc} 的 *luc* 基因下游, 构建 BmNPV *hr3* 增强的报告质粒 pBmeg_{542-luc-hr3} (图 4-1)。

6) 细胞转染与报告基因的表达

按照 3.2.4 的方法, 50 μ L 反应体系中加入 ddH₂O 40.5 μ l、报告质粒 DNA 2 μ l (1 μ g) 穿梭质粒 1 μ l (0.5 μ g) 和 7.5 μ l Lipofectin 混匀, 27 $^{\circ}$ C 温育 15 min 使 DNA 被脂质体包埋, 制成转染液。将转染液逐滴加入培养瓶中, 同时轻轻转动培养瓶混匀, 转染 4 ~ 5 h 后倾去含转染液的无血清培养基, 补加 3 ml 含 FBS 培养基, 27 $^{\circ}$ C 培养适当时间用于瞬时表达分析。病毒反式激活按照 2.2.5 进行, 以报告质粒转染但无病毒感染的细胞为阳性对照。全部试验以 pUL220-*luc* 转染的细胞为空白对照, 每组试验至少重复 3 次。

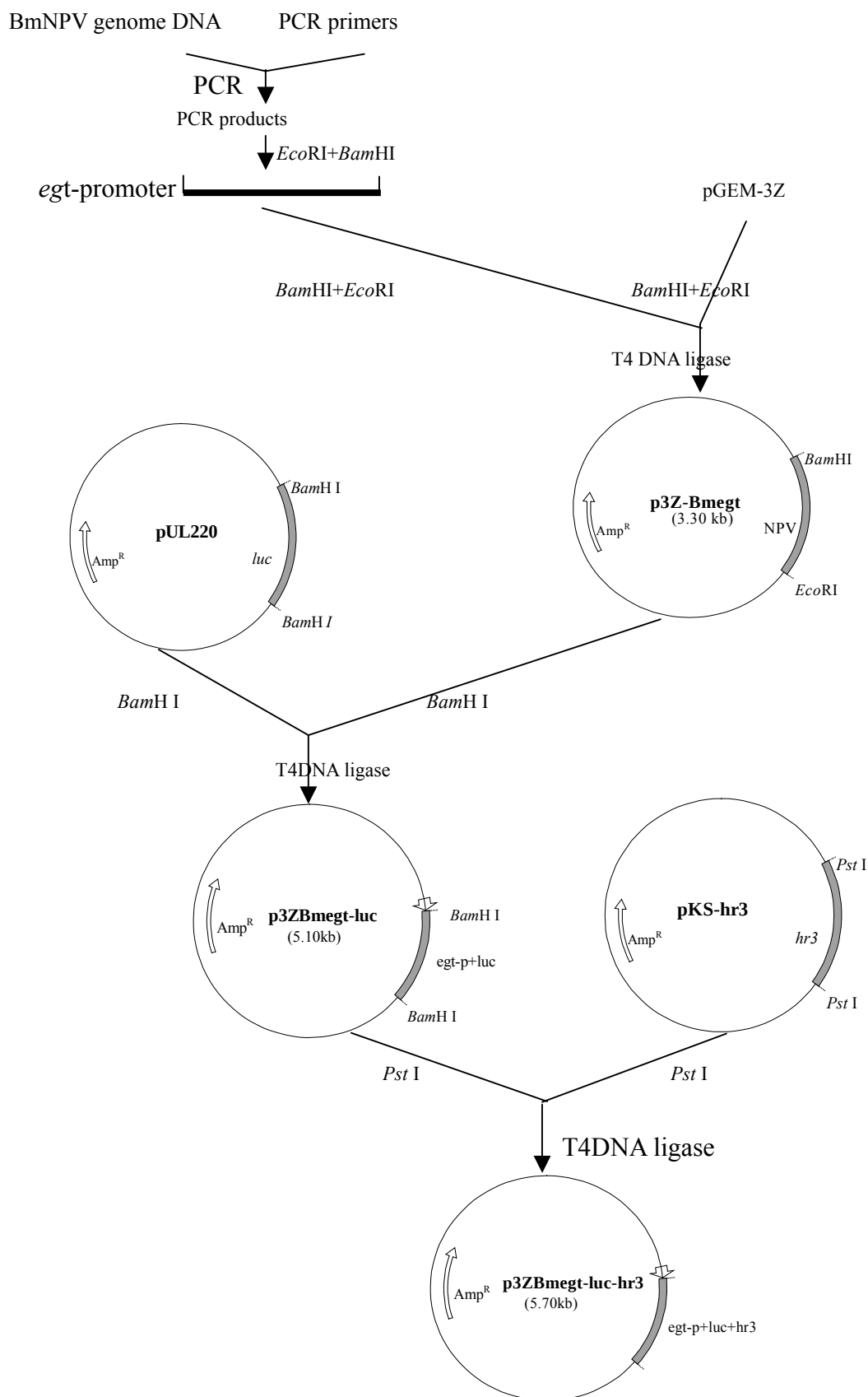


图 4-1 报告质粒的构建

Fig. 4-1 Construction of functional report plasmids

7) 报告质粒在家蚕幼虫中的转染与表达

按照常规方法在 25 ± 1 °C 下,用新鲜桑叶饲养家蚕幼虫。5 龄第 2 天用 20 μ L 含 1 μ g 质粒 DNA 和 5 μ L Lipofectin 的转染液注入家蚕幼虫体腔,对照区以 pUL220-*luc* 代替报告质粒进行转染;2 h 后注射接种 1×10^6 pfu 的野生型 BmNPV,并开始计时,分别在不同时间收集血淋巴,3~5 头蚕合并为 1 个样,设 3 个重复。

8) BmNPV *egt* 基因启动子缺失分析

类似地,按照上述 542 bp *egt* 基因启动子扩增的方法,又分别从 BmNPV 基因组中 PCR 扩增出 310 bp 和 159 bp 长度的 BmNPV *egt* 基因启动子片段 构建不同长度 *egt* 基因启动子控制转录的 *luc* 报告质粒 pBme gt 310-*luc* 和 pBme gt 159-*luc*,进行瞬时表达分析。

9) 外源昆虫蜕皮激素和保幼激素处理

为了调查外源昆虫激素对 BmNPV *egt* 基因启动子活性的影响,在报告质粒转染细胞 4-5 h 并经病毒感染后更换培养基时,加入预定量的昆虫蜕皮激素或报告幼激素类似物,使终浓度达到 0.5、1.0 和 2.0 μ g/ml,以报告质粒转染但不加激素的细胞为阳性对照,未转染细胞为空白对照。48 小时后收集细胞,测定 Luc 的活力。

体内表达分析时,取 5 龄食桑 24 h 的家蚕幼虫,每头注射一定量的蜕皮激素,或者用一定浓度 JHA 溶液浸渍 10 sec。12 h 后每头幼虫注射 20 μ L 转染液(含 1 μ g 质粒 DNA 和 10 μ g Lipofectin 和约 1×10^6 pfu 野生型 BmNPV),48 h 收集血淋巴。

10) 细胞抽提物的制备与荧光素酶活性的测定

更换细胞培养基或病毒感染后 48 h,或指定时间,按照 3.2.19 和 3.2.20 收集细胞,制备细胞抽提物,进行荧光素酶活性分析。

11) 穿梭质粒 β -gal 比活性和蛋白质含量测定

分别按照 3.2.21 和 3.2.23 进行。

4.2 结果与分析

4.2.1 BmNPV *egt* 基因启动子序列分析

以 BmNPV 基因组为模板,用上述 FP1 和 RP1 引物进行 PCR 扩增,电泳鉴定获得约 0.5 kb 的扩增片段。分离纯化并酶解后亚克隆到载体 pGEM3Z/ BamHI,转化 *E. coli* TG1,筛选到 2 个重组子,对其中的 1 个进行了序列测定,结果克隆片段为 542 bp。

用 DNA Star 软件分析显示:克隆片段与报道的 BmNPV ZJ-8 *egt* 上游启动子序列一致(季平等,2000),与 BmNPV T3 *egt* 启动子相应核苷酸序列的同源性达 99.3%,证明从 BmNPV ZJ-8 基因组 DNA 扩增到 *egt* 基因启动子片段。在 BmNPV *egt* 基因翻译起始位点上游-71~-68 nt 有 1 个 TATA 盒;在-89~-81 有 1 个类似于其他病毒早期基因 *a/ctcGTGTnct* 基序的 ATTGTGTA 序列(Tomalski *et al.*, 1988; Nissen & Friesen, 1989);而在-27~-24 nt 和-22~-19 nt 处各有 1 个潜在的早期转录起始位点 CAGT 基序(Toister-Achituv and Faktor, 1997; Chen *et al.*, 1997),但是未发现类似于 GTAAG 晚期转录启动子基序(Smith and Goodale, 1998)(图 4-2;附录 1)。

ZJ-8	CCTTGTACCG	ATGCACGCGA	ACATTTTGAG	CGGACGTGAT	TTTAAACTTG	TCGGTGAATT	60
T3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	60
ZJ-8	TTAACCACAA	GTGAAATCCA	CGGTTGCCGG	TATACATGAC	TCTTGACACG	TTCTCTTCCG	120
T3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	120
ZJ-8	TGTAAACAA	CAAAACGCC	GTGGCGCCCA	TGTAAATTTT	CGGCATTAAA	TCGTGTTTCGT	180
T3	-----	-----	-----A-	-----	-A-----	-----	180
ZJ-8	CAACATAATT	CTTGTAATCG	GCGTCTACAA	CCCATTCCCT	GCCGCCACCG	TCGTCCAACG	240
T3	-----	-----	-----G-	-----	-----G--	-----	240
ZJ-8	GTTTGACGTG	CACGTCGGAC	ACTTTGTTTT	GCACAATGTA	ACTATACAAT	TGTGCGGCGG	300
T3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	300
ZJ-8	TATCGAAATA	TTTGTGCGCG	TGAATCCAGC	GCGCGTTGAC	CGTCATGAAC	GCGTACTTGC	360
T3	----A-----	-----	-----	-----	-----	-----	360
ZJ-8	GGCTGTCGTT	GTACGCAATC	GCGTCCCACA	TCATGTCGAC	GCGCTTCTGT	GTATAATTGC	420
T3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	420
ZJ-8	ACAATAACAT	GCTGCCCTTT	GAAGTCGACC	TCTATTGTGT	TAATTTTGG	TATATAAAAA	480
T3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	480
ZJ-8	GTTGCCCTTT	AAAATTTGTT	ACATAACCAA	ATTAC[CAGT]A	[CAGT]TATTCG	GGTTGAAGCA	AA 542
T3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-- 542

图 4-2 BmNPV ZJ-8 株（本文作者）与 T3 株（Genbank L33180）*egt* 基因启动子片段序列

注：短线（-）表示碱基相同。

Fig. 4-2 Nucleotide sequences of *egt* gene promoter fragments from BmNPV strain ZJ-8 (the author) and T3 (GenBank L33180)

Note : The short bars (-) mean the same base as above.

4.2.2 病毒因子对 BmNPV *egt* 基因启动子的反式激活

用经 Lipofectin 包埋的 pBmegt542-luc 转染 Bm5 细胞 4-5 h，在更换 10%FBS 培养基后 48h 分别收集细胞，分析荧光素酶的活性。结果显示，报告质粒 pBmegt542-luc 转染的细胞和 pUL220-luc 转染的细胞（空白对照）的荧光素酶活性绝对值分别为 24.0 ± 14.4 、 18.7 ± 6.1 光子/分钟（cpm），两者没有明显的差异。说明细胞抽提物中无报告基因的表达产物——荧光素酶活性，即在没有病毒因子存在时 BmNPV *egt* 基因启动子控制的荧光素酶基因未被转录。

某些病毒因子能够影响病毒早期基因的转录，并为病毒复制所必需，如极早期基因 *ie-1* 的表达产物 IE-1 在病毒复制级联事件中起着重要的作用（Kovacs, *et al.*, 1992）。LdMNPV 和 SliMNPV *egt* 基因启动子的活性都需要病毒因子的反式激活（Riegel *et al.*, 1994；Toister-Achituv and Faktor, 1997），是否 BmNPV *egt* 基因启动子也需要病毒因子的反式激活呢？

为此，我们在报告质粒转染细胞 4-5 h 后，用野生型 BmNPV 病毒感染细胞 1 h，然后更换含 10%FBS 的 TC-100 培养基。在病毒感染后 48 h 收集细胞，以报告质粒转染但无病毒感染的细胞做对照、pUL220-luc 转染的细胞作空白对照。结果在 pBmegt542-luc 转染的 BmN 细胞中检测到了荧光素酶活性，经空白对照、校正质粒 β -gal 比活性和蛋白质含量校准后为每微克细胞抽提物 11706 ± 1498.5 cpm。由此说明 BmNPV *egt* 基因启动子的活性需要病毒因子的反式激活。

4.2.3 BmNPV *egt* 启动子控制下的 *luc* 基因的转录时相

O'Reill 等 (1991) 和 Toister Achituv M 等 (1997), 分别认为 AcMNPV 和 SpliMNPV *egt* 基因为早期基因。本试验以 *luc* 为报告基因, 分析 BmNPV *egt* 启动子的转录时相。

用 pBmegt542-*luc* 转染 Bm5 细胞, 并用野生型 BmNPV 病毒感染, 以 pUL220-*luc* 转染的细胞为空白对照。在病毒感染并更换含 10%FBS 的 TC-100 培养基后 2、6、12、18、24、48 和 60 h 分别收集细胞, 测定荧光素酶的活性。结果显示, 最早在病毒感染后 24 h 才能检测到微弱的 *Luc* 活性, 并随时间经过而升高, 48 h 接近最高值 (表 4-1, 图 4-3)。

表 4-1 BmNPV *egt* 启动子控制下 *luc* 基因的转录时相

Table 4-1 Temporal transcription of *luciferase* gene driven by BmNPV *egt* promoter

感染后时间 (h) Time post infection	2	6	12	18	24	36	48	60
荧光素酶活性(cpm) Luciferase activity	0	0	0	0	22.7 ± 16.1	2084.2 ± 605.4	19708.5 ± 1941.4	20687.7 ± 2299.3

注：表中数据为经空白对照、 β -半乳糖苷酶比活性和蛋白质含量校正后的 3 次重复的平均值。

The data showed the average luciferase activities of three separate treatments after deduction of blank and modification of β -gal activity of normalization plasmid and protein of cell extract.

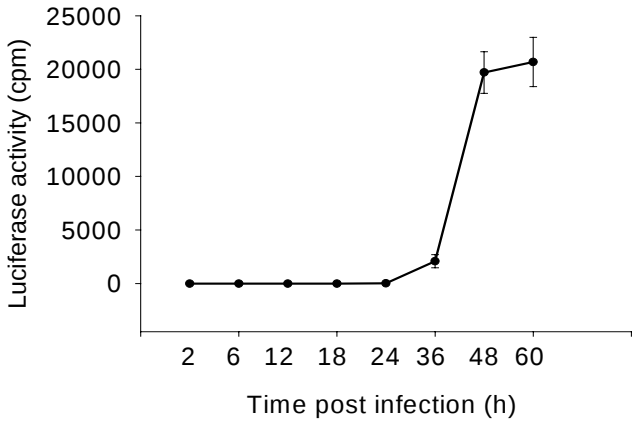


图 4-3 BmNPV *egt* 启动子的荧光素酶基因的转录时相

X 轴表示细胞收获时间, Y 轴表示荧光素酶活性。数据为 3 次重复平均值, 并经空白对照、 β -galactosidase 比活性和蛋白质含量校准。最早在病毒感染后 24 h 检测到荧光素酶活性。

Fig. 4-3 Temporal transcription of *luciferase* gene driven by BmNPV *egt* promoter

The harvesting time post infection is indicated on the X-axis. The luciferase activities are indicated on the Y-axis. The figure shows the average luciferase activities of three separate treatments after deduction of blank and modification of β -galactosidase activity of normalization plasmid and protein of extract (mean $\pm$ S.D.). Luciferase activity was first detected at 24 hpi.

4.2.4 同源重复序列 *hr3* 对 *egt* 基因启动子活性的增强作用

BmNPV 同源重复区 *hr* 不仅具有 DNA 复制原点的功能,而且能显著增强基因的转录 (Pearson, *et al.*, 1992; Cocharn & Faulkner, 1993; Rodems *et al.*, 1993; 张志芳等, 1995; Lu, *et al.*, 1997)。而在 BmNPV 基因组中, *egt* 基因启动子上游约 11 kb 左右处有一增强子 *hr1*。为了确证 *hr* 序列对 *egt* 启动子活性的影响,我们用报告基因 *luc* 下游接 *hr3* 的质粒 pBmegt542-*luc*-*hr3* DNA 转染 Bm5 细胞,以 pBmegt542-*luc* 为对照质粒、pUL220-*luc* 转染的细胞为空白对照。设置病毒感染和不感染两种处理。在病毒感染并更换培养基后 48 h 收集细胞,制备细胞抽提物,测定 Luc 的活性。经校正后携带增强子 *hr3* 的报告质粒 Luc 活性达到每微克细胞抽提物 $3.20 \times 10^7 \pm 1.92 \times 10^6$ cpm,比质粒 pBmegt542-*luc* 转染的细胞 (19731.8 ± 5395.2 cpm) 提高 1600 多倍,表明 BmNPV *hr3* 对 *egt* 基因启动子活性具有明显的增强作用。

但是,在无病毒感染时,携带 *hr3* 的报告质粒转染的细胞中也未检测到 Luc 活性,这进一步证明 BmNPV *egt* 基因启动子的转录活性需要病毒因子的反式激活。

那么 BmNPV *hr3* 作为增强子在增强 *egt* 基因启动子的转录活性的同时,是否也能促使 *egt* 启动子的提前转录呢?为此,对 pBmegt542-*luc*-*hr3* 报告质粒中 *luc* 基因的转录时相也进行了分析。在报告质粒 DNA 转染 Bm5 细胞和病毒感染并更换培养基后 2、6、12、18 和 24 h 分别收集细胞,制备细胞抽提物,检测 Luc 活力。结果最早在病毒感染后 18 h 检测到较弱的 Luc 活性(表 4-2)。表明 BmNPV *hr3* 在增强 BmNPV *egt* 基因启动子活性时,并未明显改变 *egt* 基因启动子需要病毒因子反式激活的特性。

表 4-2 BmNPV *hr3* 对 BmNPV *egt* 基因启动子转录时相的影响

Table 4-2 Effect of BmNPV *hr3* on transcriptional activity of BmNPV *egt* promoter

转染后时间 (h)	2	6	12	18	24
Time post intection					
荧光素酶活性 (cpm)	0.8 ± 2.3	0.8 ± 1.1	4.7 ± 4.7	176.0 ± 13.6	653.2 ± 22.1
Luciferase activity					

注:表中数据为经空白对照、 β -半乳糖苷酶比活性和蛋白质含量校正的 3 次重复的平均值。

The data shows the average luciferase activities of three separate treatments after deduction of blank and modification of β -gal activity of normalization plasmid and protein of extract.

4.2.5 BmNPV *egt* 基因启动子功能区的确定

为了确定 BmNPV *egt* 启动子的主要功能区序列,在构建报告质粒 pBmegt542-*luc* 的基础上,又按照同样的方法分别构建 309 bp 和 159 bp 长度 BmNPV *egt* 启动子区段控制转录 *luc* 基因转录的报告质粒 pBmegt309-*luc* 和 pBmegt159-*luc*。酶切鉴定结果显示构建的报告质粒正确(图 3-4)。

按照前述方法,分别用报告质粒 pBmegt542-*luc*、pBmegt309-*luc* 和 pBmegt159-*luc* 转染 Bm5 细胞进行瞬时表达,每种报告质粒设置无 BmNPV 感染的阳性对照,以 pUL220-*luc* 转染的细胞为空白对照。在报告质粒转染并经病毒感染并更换培养基后 48 小时收集细胞,测定 Luc 的活力。

荧光素酶活性分析结果:无 BmNPV 感染区,3 种质粒的 *luc* 基因均未在转染细胞中表达;而 BmNPV 感染区 3 种质粒转染细胞的抽提物都能检测到 Luc 的活性,其中 pBmegt542-*luc*

(542bp) pBmegt309-luc (309 bp) 转染后细胞中 Luc 的活性高 , 而且两者活性接近 ; 而 pBmegt159-luc(159 bp)转染后 , 只能检测到微弱的 Luc 活性 , 不及前者的 1%(表 4-3 , 图 4-5)。试验结果表明 , 翻译起始位点 ATG 上游约-159 bp 区段内包括了该启动子的最基本结构 , 而 ATG 上游-159 ~ -309bp 之间可能存在着与病毒反式因子作用的主要转录调控顺式元件。

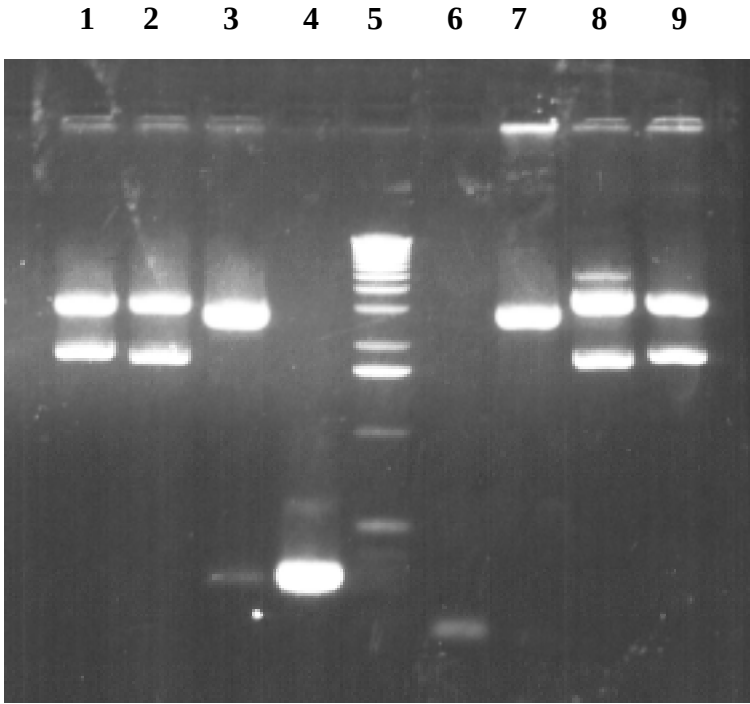


图 4-4. 不同长度 BmNPV egt 启动子区段控制转录的报告质粒的酶切鉴定

Fig 4-4. Identification of reporter plasmids with luciferase gene controlled by different fragment lengths of BmNPV egt promoter

1. pBmegt159-luc/BamHI; 2. pBmegt159-luc/XbaI; 3. pBmegt159-luc/EcoRI-BamHI; 4. 159 bp fragment of BmNPV egt promoter; 5. DNA mark (λDNA/ Hind - EcoRI; 6. 309 bp fragment of BmNPV egt promoter; 7. pBmegt309-luc/EcoRI-BamHI; 8. pBmegt309-luc/XbaI; 9. pBmegt309-luc/BamHI

表 4-3 不同长度 BmNPV egt 启动子区段的转录活性分析

Table 4-3 Transcriptional activities of different fragment lengths of BmNPV egt promoter				
egt 启动子区段长度 (bp)		542	309	159
Length of egt promoter fragment		(pBmegt542-luc)	(pBmegt309-luc)	(pBmegt159-luc)
荧光素酶活性	实测(cpm)	11000.3 ± 1173.4	10401.3 ± 780.3	43.2 ± 9.4
Luciferase activity	指数(%)	100 ± 10.7	94.6 ± 7.1	0.39 ± 0.10

注：表中数据为经空白对照、β-半乳糖苷酶比活性和蛋白质含量校正的 3 次重复平均值。

The data showed the average luciferase activities of three separate treatments after deduction of blank and being normalized by β-gal activity of normalization plasmid and protein of extract.

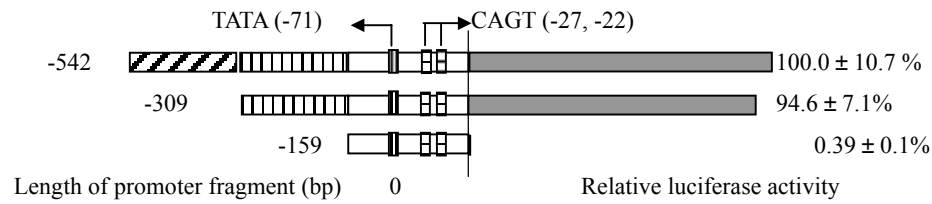


图 4-5. 不同长度 BmNPV *egt* 启动子控制转录的荧光素酶基因的表达

Fig 4-5. Expression of *luciferase* gene driven by BmNPV *egt* promoters of different lengths

4.2.6 昆虫蜕皮激素和保幼激素对 BmNPV *egt* 基因启动子活力的影响

蜕皮激素（ecdysone）具有促进幼虫发育和变态的作用，是 EGT 酶的底物；与蜕皮激素相反，保幼激素（JH）具有使昆虫保持幼虫特性的作用，保幼激素与蜕皮激素的平衡控制着家蚕的发育与变态。为了考察蜕皮激素和保幼激素对 *egt* 启动子活性的影响，在质粒 pBme_{egt}542-*luc* DNA 转染 Bm5 细胞并用病毒感染更换培养基后，加入蜕皮激素 20-β-羟基蜕皮酮（中国农业科学院蚕业研究所产品）或保幼激素类似物（ZR215），使终浓度分别达到 0.5、1.0 和 2.0 μg/ml，以转染而不加激素的细胞为阳性对照，pUL220-*luc* 转染的细胞为空白对照。48 h 后收集细胞，进行荧光素酶活性分析。

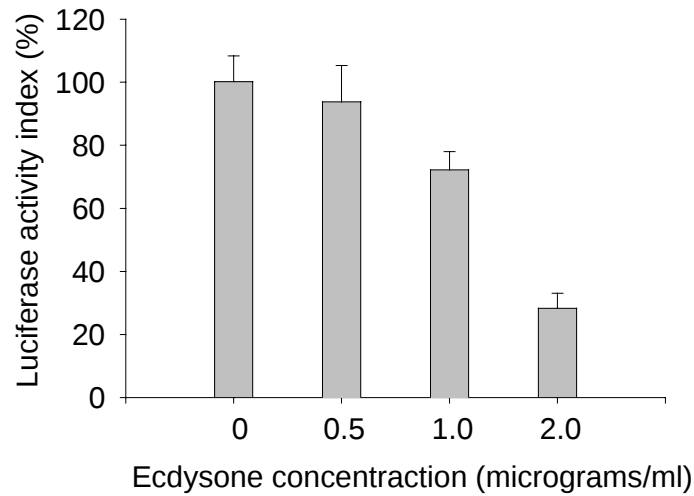
蜕皮激素处理结果如表 3-4 所示。0.5、1.0 和 2.0 μg/mL 处理区，*egt* 基因启动子活性分别为阳性对照区（无 ecdysone）的（93.8 ± 11.5）%，（72.2 ± 5.8）%和（28.3 ± 4.8）%（图 4-6），说明低浓度的 ecdysone（0.5 μg/ml）对 *egt* 基因启动子的活性影响不明显，而较高浓度 ecdysone（2.0 μg/ml）使 *egt* 基因启动子活性显著下降。较高浓度 ecdysone 引起 *egt* 基因启动子活性下降的原因，可能是由于较高浓度的底物（ecdysone）负反馈抑制了 *egt* 基因启动子的活性。

表 4-4 外源昆虫蜕皮激素对 BmNPV *egt* 基因启动子活性的影响

Table 4-4 Effects of foreign insect ecdysone on the activity of BmNPV <i>egt</i> promoter				
蜕皮激素浓度(μg/ml)	0			
Concentration of ecdysone	(Control)	0.5	1.0	2.0
荧光素酶活性(cpm)	8426.0 ± 709.9	7901.4 ± 972.4	6082.5 ± 487.2	2383.5 ± 403.8
Luciferase activity				

注：表中数据为经空白对照和蛋白质含量校正后的 3 次重复的平均值。以 pUL220-*luc* 转染的细胞为空白对照。

The data represents the average of three replicates after deduction of blank and modification of protein of extract. The pUL220-*luc* transfected cells were served as blank.

图 4-6. 蜕皮激素对 BmNPV *egt* 基因启动子活性的影响Fig 4-6. Effects of ecdysone on the activity of BmNPV *egt* promoter

X 轴表示蜕皮激素的浓度, Y 轴表示报告质粒 pBmegt542-*luc* 在 Bm5 细胞中表达的荧光素酶活性指数。数据为经空白对照和蛋白质含量校正的 3 个重复平均值 (平均值 ± 标准差)。以无蜕皮激素处理细胞为 100%, 则蜕皮激素浓度 0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 处理区的荧光素酶活性分别为 (93.8 ± 11.5) %, (72.2 ± 5.8) % 和 (28.3 ± 4.8) %。

The ecdysone concentrations ($\mu\text{g/ml}$) are showed on the X-axis. The luciferase activity indexes of pBmegt542-*luc* in Bm5 cells are indicated on the Y-axis. The data showed the average luciferase activities of three separate treatments, relative to non-hormone treatment serving as 100%, after deduction of pUL220-*luc* transfected blank and modification of protein of extract (mean ± S.D.). Those of 0.5, 1.0 and 2.0 $\mu\text{g/ml}$ ecdysone treated cells were 93.8 ± 11.5%, 72.2 ± 5.8% and (28.3 ± 4.8) %, respectively.

表 4-5. 保幼激素对 BmNPV *egt* 基因启动子活性的影响Table 4-5. Effects of juvenile hormone analogue on the activity of BmNPV *egt* promoter

保幼激素浓度	0	0.5	1.0	2.0
JHA concentration ($\mu\text{g/ml}$)	(Control)			
荧光素酶活性	11449.9 ±	28146.6 ±	24753.1 ±	20120.7 ±
Luciferase activity (cpm)	3673.7	7057.1	1906.6	2070.1

注：表中数据为经空白对照和蛋白质含量校正后的 3 次重复的平均值。

Note: The data represents the average of three replicates after deduction of blank and being normalized by protein of extract. The pUL220-*luc* transfected cells were served as blank.

JHA 处理结果如表 4-5 所示。在 JHA 终浓度 0.5 ~ 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 培养基范围内, 各处理区 *egt* 基因启动子活性比不施用 JHA 的提高 75% ~ 145%, 但随着 JHA 浓度的升高, 提高幅度呈下降趋势(图 4-7)。在家蚕幼虫体内, 保幼激素的主要功能是维持组织器官和细胞的结构与功能, 阻止幼虫的变态和阻止器官及细胞的解离, 从而延长蛋白质的合成时间(吕鸿声, 1991)。因此, 当相对较低浓度的 JHA 处理时, 荧光素酶活性增加。另一方面, JHA 能够增强 BmNPV 在细胞中的复制(Zhou *et al.*, 2002a), 当 JHA 浓度达到某一值时, 由于复制的病毒增加而一定程度上阻碍了细胞的正常生理, 甚至导致了部分细胞的解离, 从而部分抵消由于 JHA 作用引起的荧光素酶活性的提高, 出现了增幅下降的现象。

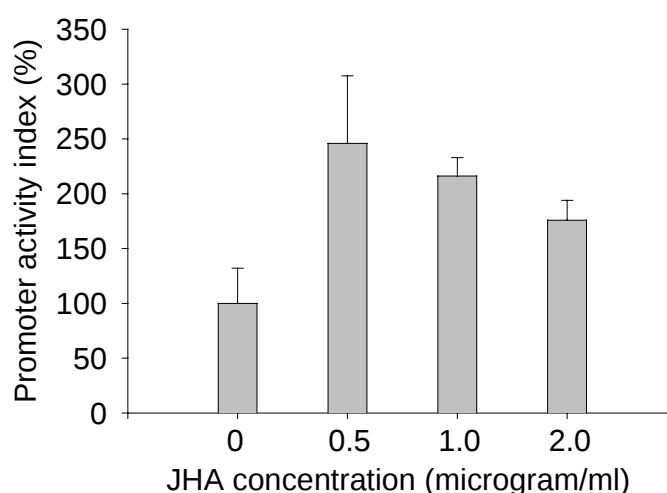


图 4-7. 保幼激素对 BmNPV *egt* 基因启动子活性的影响

Fig 4-7. Effects of juvenile hormone analogue on the activity of BmNPV *egt* promoter

X 轴表示保幼激素的浓度, Y 轴表示报告质粒 pBmegt542-*luc* 在 Bm5 细胞中表达的荧光素酶活性指数。数据为经空白对照、 β -半乳糖苷酶比活性和蛋白质含量的校正的 3 个重复平均值(平均值 $\pm$ 标准差)。以无蜕皮激素处理细胞为 100%, 则保幼激素 0.5, 1.0 and 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 处理区荧光素酶活性指数分别为 $245.8 \pm 61.6\%$ 、 $216.2 \pm 16.7\%$ 、 $175.7 \pm 18.1\%$ 。

The JHA concentrations ($\mu\text{g/ml}$) are showed on the X-axis. The luciferase activity indexes of pBmegt542-*luc* in Bm5 cells are indicated on the Y-axis. The data showed the average luciferase activities of three separate treatments, relative to non-hormone treatment serving as 100%, after deduction of pUL220-*luc* transfected blank and modification of β -gal activity of normalization plasmid and protein of extract (mean $\pm$ S.D.). Those of 0.5, 1.0 and 2.0 $\mu\text{g/ml}$ JHA treated cells were $245.8 \pm 61.6\%$, $216.2 \pm 16.7\%$ and $175.7 \pm 18.1\%$, respectively.

4.2.7 BmNPV *egt* 基因启动子控制转录的 *luc* 基因在家蚕体内的表达

以 pBmegt542-*luc* 和带增强子 *hr3* 的 pBmegt-*luc*-*hr3* 报告质粒, 分别转染 5 龄期家蚕幼虫,

进行体内瞬时表达分析。5 龄饲食 24 h 后,用含有 1 μ g 质粒 DNA 和 5 μ l Lipofectin 的 20 μ l 转染液注射到每头家蚕幼虫体腔,转染 2 h 后注射 1×10^6 pfu 野生型 BmNPV,以报告质粒转染但无病毒感染的幼虫为阳性对照,pUL220-*luc* 转染的幼虫为空白对照区,饲养温度为 25 ± 1 。在接种病毒后 8、12、18、24 和 36 h 分别收集血淋巴,制备细胞抽提物,测定 Luc 的活性。

(1) BmNPV *egt* 基因启动子在体内的转录时相

荧光素酶瞬时表达分析结果显示:报告质粒 pBmegt542-*luc* 转染后,不接种病毒的家蚕幼虫中未检测到报告基因的表达;在报告转染后,接种病毒的幼虫中,18 h 之前都未检测到报告基因的表达,一直到 24 h 才检测到极微弱的表达(每微克细胞抽提物 13.8 ± 3.4 cpm),以后逐步上升(表 4-6)。这一结果与报告质粒在家蚕 Bm5 细胞系中的结果一致,说明在体内条件下 BmNPV *egt* 基因启动子的转录仍较晚。

表 4-6 BmNPV *egt* 基因启动子控制转录的 *luc* 基因在家蚕体内的表达 (cpm)

Table 4-6 Expression of luciferase gene under controlling of BmNPV *egt* promoter (cpm)

感染后时间 (h)	8	12	18	24	36
Time post infection					
pBmegt542- <i>luc</i>	0	0	0	13.8 ± 3.4	26.9 ± 3.2
pBmegt- <i>luc-hr3</i>	0	0	28.2 ± 6.8	1913.8 ± 133.5	3713.0 ± 599.0

注:表中数据为经空白对照和蛋白质含量校正后的 3 次重复平均值。

Note: The data represents the average of three replicates after modification of blank and protein of cell extract. The pUL220-*luc* transfected cells were served as blank.

(2) BmNPV *hr3* 对 *egt* 基因启动子在体内的转录活性和时相的影响

以带增强子 BmNPV *hr3* 的 pBmegt-*luc-hr3* 报告质粒转染家蚕幼虫,在病毒感染后 12 h 仍未检测到报告基因的表达,直到 18 h 才检测到微弱的表达(每微克细胞抽提物 28.2 ± 6.8 cpm),以后迅速上升,到 24 h 每微克细胞抽提物 1913.8 ± 133.5 cpm,并继续上升。

与 pBmegt542-*luc* 相比,pBmegt-*luc-hr3* 转染的家蚕幼虫中,表达量增加约 130 多倍;但是当无病毒感染时,pBmegt-*luc-hr3* 转染的幼虫中也未检测到荧光素酶的活性,说明 BmNPV *hr3* 在个体水平上仍具有增强基因转录的功能。

(3) 昆虫激素对 *egt* 基因启动子活性的调节

给 5 龄食桑 24 h 的家蚕幼虫,每头分别注射 4、6、8 μ g 蜕皮激素,或者用浓度为 50、100 和 150 μ g/ml 的 JHA 溶液浸渍 10 sec。12 h 后每头幼虫注射 20 μ l 转染液(含 1 μ g 报告质粒 pBmegt-*luc-hr3*、5 μ l Lipofectin 和 1×10^6 pfu BmNPV),48 h 收集血淋巴制备细胞抽提物,进行荧光素酶活性分析,结果如表 4-7、4-8 所示。

从表 3-7 可以看出,在体内条件下,外源 ecdysone 的作用与在 Bm5 细胞系的情况相反,外源 ecdysone 对 BmNPV *egt* 基因启动子的转录活性有正向调节作用。每头分别注射 4、6、8 μ g ecdysone 处理区,荧光素酶活性分别提高约 2.6、5.3 和 15 倍;在试验的 4-8.0 μ g/头剂量范围内,提高幅度随 ecdysone 剂量的增加而上升,其原因有待于进一步研究。由于 5 龄前期家蚕幼虫体内的 ecdysone 含量极低,当体腔注射 ecdysone 后体内的蜕皮激素响应元件(hormone response

element, HRE) 系统发挥作用, 新陈代谢加快, 与变态有关的部分基因的转录加强, 蛋白质合成加速 (Yao *et al.*, 1993), 从而使报告基因的表达量增加。

从表 4-8 可以看出, 用 50-150 $\mu\text{g/ml}$ JHA 溶液浸渍家蚕幼虫, BmNPV *egt* 启动子的转录活性约提高 76%-107%, 在试验的浓度范围内提高幅度随 JHA 浓度的增加而增大。这一结果与在 Bm5 细胞系的情况一致。

表 4-7 昆虫蜕皮激素对 BmNPV *egt* 基因启动子在蚕体内活性的影响

Table 4-7 Effects of ecdysone on the activity of BmNPV *egt* promoter *in vivo*

蜕皮激素剂量 ($\mu\text{g per os}$)		0	4	6	8
Ecdysone dose		(Control)			
荧光素酶活性 Luciferase activity	实数(cpm)	$1.70 \times 10^4 \pm$	$6.17 \times 10^4 \pm$	$1.07 \times 10^5 \pm$	$2.76 \times 10^5 \pm$
		1.08×10^3	1.12×10^4	3.61×10^4	9.89×10^4
	指数(%)	100 ± 6.3	362.2 ± 65.5	626.6 ± 211.7	$1618.2 \pm$
					580.8

注: 报告质粒为 pBmegt-*luc-hr3*, 数据为经空白对照和蛋白质含量校正的 3 次重复平均值。

Note: reporter plasmid was pBmegt-*luc-hr3*. The data represents the average of three replicates after modification of blank and protein of cell extract. The pUL220-*luc* transfected cells serving as blank.

表 4-8 昆虫保幼激素对 BmNPV *egt* 基因启动子在蚕体内活性的影响

Table 3-8 Effects of juvenile hormone analogue on the activity of BmNPV *egt* promoter *in vivo*

JHA 浓度 ($\mu\text{g/ml}$) Dose		0	50	100	150
of Juvenile hormone analogue		(Control)			
荧光素酶活性 Luciferase activity	实数(cpm)	$1.73 \times 10^4 \pm$	$3.04 \times 10^4 \pm$	$3.13 \times 10^4 \pm$	$3.33 \times 10^5 \pm$
		1.32×10^3	7.85×10^2	3.76×10^3	4.25×10^3
	指数 (%)	100 ± 7.7	176.2 ± 4.5	181.1 ± 21.8	207.5 ± 15.4

注: 报告质粒为 pBmegt-*luc-hr3*, 数据为经空白对照和蛋白质含量校正的 3 次重复平均值。

Note: reporter plasmid was pBmegt-*luc-hr3*. The data represents the average of three replicates after modification of blank and protein of cell extract. The pUL220-*luc* transfected cells were served as blank.

4.3 小结

(1) BmNPV *egt* 基因启动子的特性

本试验用 PCR 方法, 从 BmNPV ZJ-8 基因组扩增不同长度的 *egt* 基因启动子, 以 pGEM3Z 为载体构建 BmNPV *egt* 启动子控制转录的 *luc* 基因报告质粒, 利用昆虫细胞瞬时表达分析系统分析 BmNPV *egt* 启动子的特性。试验表明, BmNPV *egt* 启动子的活性需要病毒因子的反式作用, 而且转录时间较晚, 在病毒感染细胞 24 h 才能检测到报告基因的表达。报告质粒在家蚕幼虫体内表达试验得到类似的结果。

(2) BmNPV *hr3* 增强 BmNPV *egt* 启动子的转录

BmNPV *hr3* 作为基因转录增强子, 使 BmNPV *egt* 基因启动子的转录活性显著增加 (Bm5 中 1600 多倍, 幼虫体内 130 多倍), 转录时相略有提早, 但也要到病毒感染后 18 h 才检测到报告基因的表达, 而且启动子活性仍然需要病毒因子的反式激活。

(3) 昆虫蜕皮激素和保幼激素对 *egt* 基因启动子活性的影响

外源昆虫蜕皮激素和保幼激素对 *egt* 基因启动子的活性有一定的影响。在 Bm5 细胞系中, 蜕皮激素浓度为 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 培养基时影响较小, 浓度较高时 *egt* 启动子的转录活性明显下降; 但是在家蚕幼虫体内, 每头注射 4-8 μg 蜕皮激素, 使 *egt* 基因启动子的活性提高 2.6-15 倍。

保幼激素, 不论在体外 (0.5-2.0 $\mu\text{g/ml}$ 培养基) 还是在体内 (50-150 $\mu\text{g/ml}$), 在实验的剂量范围内都能增强 *egt* 启动子的活性。

(4) *egt* 基因启动子功能区

对不同长度的 BmNPV *egt* 启动子长度的活性分析比较结果显示 *egt* 基因翻译起始位点 ATG 上游 159 bp 区段具有基本的转录活性, 但转录活性已经几乎消失, 表明该区段只包含 *egt* 基因启动子的基本元件。

长度为 309 bp 区段的启动子活性基本接近于 542 bp 区段的启动子, 比长度为 159 bp 的启动子要高 200 倍以上。说明在 *egt* 基因翻译起始位点 ATG 上游 -159 ~ -309 bp 启动子区段内, 存在与病毒因子反式作用的主要转录调控顺式元件。

第五章 AcMNPV *egt* 基因启动子特性分析

苜蓿尺蠖核型多角体病毒 (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) *egt* 基因是第一个在杆状病毒中克隆和进行了深入分析研究的 *egt* 基因 (O' Reilly & Miller, 1989)。AcMNPV *egt* 属于早期表达基因, 其转录不依赖于病毒蛋白合成及病毒 DNA 复制 (O' Reilly & Miller, 1990), 转录产物为 2 种具有共同 5'-端的 mRNA, 病毒感染细胞后 3 h 在细胞及胞外液体中检测到 EGT 酶的活力, 感染后期转录水平下降 (O' Reilly & Miller, 1990; O' Reilly *et al.*, 1991)。AcMNPV 为 BmNPV 的近缘种 (van Regenmortel *et al.*, 2000), 用野生型 AcMNPV 接种化蛹不久的家蚕蛹 (*Bombyx mori*) 诱导成为人工滞育蛹 (张志芳等, 1993), 并且证明 AcMNPV 改变非靶标的家蚕的变态是由于 *egt* 基因的表达引起的 (Shikata *et al.*, 1998)。

但是 Toister-Achituv 和 Faktor (1997) 的研究发现病毒极早期蛋白 IE-1 能激活 *Spodoptera littoralis* 核型多角体病毒 (SpliMNPV) 和 AcMNPV *egt* 基因启动子的活力。SpliMNPV 感染细胞后 3 h 在培养基中检测到了 EGT 酶的活性, 但是 *egt* 基因的转录本 mRNA 在病毒感染后 8 h 才检测到。舞毒蛾核型多角体病毒 (LdMNPV) *egt* 基因在病毒感染后 16 h 才检测到转录本 mRNA, 一直持续到 48 h p.i. (Slavicek *et al.*, 1999), 其转录不受 DNA 合成抑制剂 aphidicolin 的影响, 但是蛋白质合成抑制剂 cycloheximide 可抑制转录, 因此 LdMNPV *egt* 基因被认为是迟早期基因 (Riegel *et al.*, 1994)。在 *Lacanobi oleracea* 颗粒病毒中, *egt* 基因主要通过晚期基因启动子基序 GTAAG 转录 (Smith and Goodale, 1998)。

由于杆状病毒在生物防治上的重要性, 而 *egt* 基因是杆状病毒中迄今发现的唯一能够影响宿主昆虫激素代谢的病毒基因, 在不同的杆状病毒中 *egt* 基因呈现不同的转录特性, 所以杆状病毒 *egt* 基因的研究成为近年的一个研究热点之一。

本试验参照第三章的方法, 构建了 AcMNPV *egt* 基因启动子控制的荧光素酶基因报告质粒, 利用昆虫细胞瞬时表达系统分析了其启动子的特性, 考察了增强子 BmNPV *hr3* 序列及 EGT 的底物蜕皮激素 (ecdysone) 对 AcMNPV *egt* 基因启动子活性的影响, 并确定了 *egt* 基因启动子的功能区。

5.1 材料与方法

5.1.1 病毒和细胞系

苜蓿尺蠖核型多角体病毒 AcMNPV、昆虫 Sf21 细胞系由农业部家蚕生物技术重点实验室保存。其它材料和试剂同第四章。

5.1.2 实验方法

(1) AcMNPV 基因组 DNA 的提取

参照 Summers and Smith (1987) 的方法 (见 3.2.8) 提取 AcMNPV 基因组 DNA。

(2) PCR 引物设计

根据 AcMNPV 基因组 DNA 序列 (Ayres *et al.*, 1994; GenBank Accession No: NC001623), 设计下列 3 条正向引物和 1 条与之匹配的反向引物。

Acegt542 (forward primer-1): 5'-TCGAATTCCTTGTACCGATGCACGCGAA-3' ;

Acegt309 (forward primer-2): 5'-CCGAATTCCAACGGTTTGACGTGCA-3' ;

Acegt159 (forward primer-3): 5'-ATGAATTCACATCATGTCGACG- 3'.

分别对应于 *egt* 基因翻译起始位点上游-542 ~ -522 nt、-309 ~ -291 nt 和-159 ~ -141 nt , 5' 端均含 *EcoR* I 位点。

Acegt (reverse primer-1): 5'-AGGGATCCAATTTTGCTTCAAACCGAATAACTG-3' , 对应于 *egt* 基因翻译起始位点至其上游-22 nt , 5' 端含 *Bam*HI 位点。

(3) AcMNPV *egt* 启动子序列的扩增

以 AcMNPV 基因组 DNA 为模板 ,用上游引物 fp-1、fp-2 和 fp-3 分别与下游引物 rp-1 配对 , 进行 PCR 扩增。反应体系如下 :

ddH ₂ O	32.5 μl
10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ free)	5 μl
25 mM MgCl ₂	3 μl
2.5 mM dNTP	4 μl
上游引物 (fp-1/fp-2/fp-3)	1 μl (约 50 p mol)
下游引物 rp-1	1 μl (约 50 p mol)
BmNPV ZJ-8 DNA	2 μl
Taq DNA 聚合酶	0.5 μl (1U)
总体积	50 μl

PCR 反应条件 :在加入 *Taq* DNA 聚合酶前对基因组 DNA 94 ° 预变性 10 min ,加入 *Taq* DNA 聚合酶 , 94 ° 变性 1.5 min , 55 ° 退火 1 min , 72 ° 延伸 2 min , 循环 30 次 ; 72 ° 延伸 7 min。

(4) PCR 产物的分离纯化与亚克隆

按照第四章的方法 ,对 PCR 产物进行分离纯化 ,分别获得长度为 542、309 和 159 bp 的 AcMNPV *egt* 启动子片段。按照 Sambrook (1989) 的方法进行克隆 ,用 *Eco*RI-*Bam*HI 分别酶解 *egt* 启动子片段和质粒载体 pGEM-3Z ,经 T4 DNA 酶连接后转化大肠杆菌 *E.coli* TG1 ,用快速细胞破碎法 (3.2.16) 筛选出重组质粒 p*Acegt542*、p*Acegt309* 和 p*Acegt159* ,进行测序鉴定后用于构建报告质粒。

(5) 报告质粒的构建

报告质粒的构建方法同 3.1.2 的 pB*me*gt542-*luc* 等。用 *Bam*HI 分别酶解上述构建的质粒 p*Acegt542*、p*Acegt309* 和 p*Acegt159* ; 将从 pUL220-*luc* 切出的 *luc*/*Bam*HI 片段 , 分别亚克隆到 *egt* 启动子下游 , 构建成由不同长度 *egt* 启动子控制转录的报告质粒 p*Acegt542-luc*、p*Acegt309-luc* 和 p*Acegt159-luc*。

再用 *Pst*I 酶解 pSK-*hr3* 分离 *hr3* 片段 (Genbank Accession Number: U51238) , 亚克隆到报告质粒 p*Acegt542-luc* 的 *luc* 基因下游 , 构建成由 *egt* 启动子控制转录的含增强子 BmNPV *hr3* 的报告质粒 p*Acegt542-luc-hr3* (参见图 4-1)。

(6) 细胞转染与报告基因的表达

按照 3.2.4 的方法 , 50 μL 反应体系中加入 ddH₂O 40.5 μL、报告质粒 DNA 2 μL (1 μg) 穿梭质粒 1 μL (0.5 μg) 和 7.5 μL Lipofectin 混匀 , 27 ° 温育 15 min 使 DNA 被脂质体包埋 , 制成转染液。

将转染液逐滴加入培养瓶中,同时轻轻转动培养瓶混匀,转染 4~5 h 后倾去含转染液的无血清培养基,补加 3 ml 含 FBS 培养基,27℃ 培养适当时间用于瞬时表达分析。病毒反式激活按照 2.2.5 进行,以报告质粒转染但无病毒感染的细胞为阳性对照。全部试验以 pUL220-*luc* 转染的细胞为空白对照,每组试验至少重复 3 次。

(7) 报告质粒在家蚕幼虫中的转染与表达

按照常规方法在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下,用新鲜桑叶饲养家蚕幼虫。5 龄第 2 天用 20 μL 含 1 μg 质粒 DNA 和 5 μL Lipofectin 的转染液注入家蚕幼虫体腔,对照区以 pUL220-*luc* 代替报告质粒进行转染;2 h 后注射接种 1×10^6 pfu 的野生型 BmNPV,并开始计时,分别在不同时间收集血淋巴,3~5 头蚕合并为 1 个样,设 3 个重复。

(8) AcMNPV *egt* 基因启动子缺失分析

为了分析确定 AcMNPV *egt* 基因启动子的功能区,分别用上述构建的由不同长度启动子区段控制转录的报告质粒 pA*cegt*542-*luc*、pA*cegt*309-*luc* 和 pA*cegt*159-*luc* 转染 Sf21 细胞,进行瞬时表达分析,比较不同长度启动子区段转录活性的差异,从而确定启动子的功能区。

(9) 外源昆虫蜕皮激素和保幼激素处理

为了调查外源昆虫激素对 AcMNPV *egt* 基因启动子活性的影响,在报告质粒转染 Sf21 细胞 4-5 h 并经病毒感染后更换培养基时,加入预定量的昆虫蜕皮激素或报告幼激素类似物,使终浓度达到 0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$,以报告质粒转染但不加激素的细胞为阳性对照,未转染细胞为空白对照。48 小时后收集细胞,测定 Luc 的活力。

体内表达分析时,取 5 龄食桑 24 h 的家蚕幼虫,每头注射一定量的蜕皮激素,或者用一定浓度 JHA 溶液浸渍 10 sec。12 h 后每头幼虫注射 20 μL 转染液(含 1 μg 质粒 DNA 和 10 μg Lipofectin 和约 1×10^6 pfu 野生型 BmNPV),48 h 收集血淋巴。

(10) 细胞抽提物的制备与荧光素酶活性的测定

更换细胞培养基或病毒感染后 48 h,或指定时间,按照 2.2.19 和 2.2.20 收集细胞,制备细胞抽提物,进行荧光素酶活性分析。

(11) 穿梭质粒 β -半乳糖苷酶比活性和蛋白质含量测定

分别按照 3.2.21 和 3.2.23 进行。

5.2 结果与分析

5.2.1 AcMNPV *egt* 启动子序列分析

对克隆的 AcMNPV *egt* 启动子片段进行了酶切鉴定(图 5-1)和测序,并与发表的 AcMNPV *egt* 启动子序列(GenBank Access Number: NC-001623)及克隆的 BmNPV *egt* 启动子序列进行了同源性比较(图 5-2)。结果表明:本试验克隆到了 AcMNPV *egt* 启动子片段,它与 GenBank 发表的 AcMNPV *egt* 启动子相应序列的同源性达 99.8%,两者仅在 *egt* 基因翻译起始位点上游 -420 nt 有 1 个碱基的差异;而与 BmNPV *egt* 启动子相应序列的同源性为 95.6%。

不论是 AcMNPV 还是 BmNPV,其 *egt* 基因翻译起始位点上游 -71~-68 nt 有 1 个 TATA 盒;89~-81 有 1 个类似于其他病毒早期基因 a/ctcGTGTnct 基序的 ATTGTGTA 序列(Tomalski *et al.*, 1988; Nissen & Friesen, 1989);-27~-24 nt 和 -22~-19 nt 处各有 1 个潜在的早期转录起始位点 CAGT 基序(Toister-Achituv and Faktor, 1997; Chen *et al.*, 1997)(图 5-2;附录 2)。

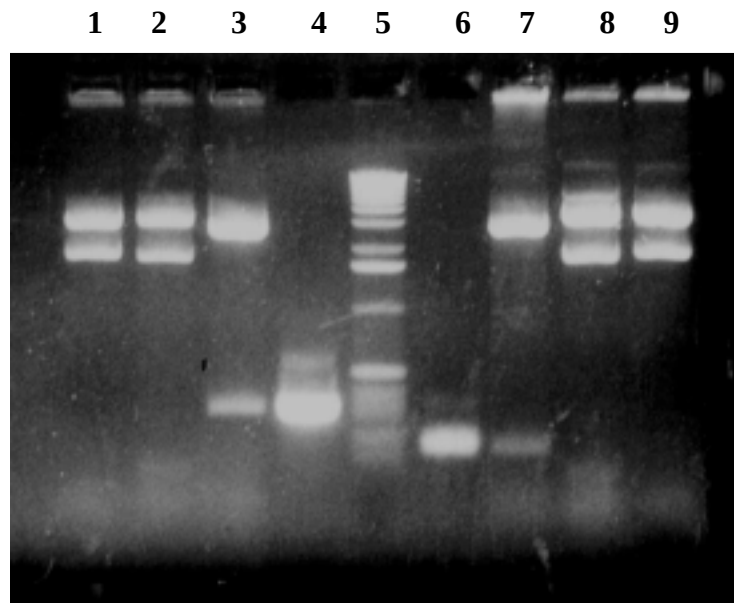


图 5-1 不同长度 AcMNPV *egt* 启动子区段控制转录的报告质粒的酶切鉴定

Fig.5-1 Identification of reporter plasmids with *luciferase* gene controlled by different fragment lengths of AcMNPV *egt* promoter

1. pAcept159-*luc*/BamHI; 2. pAcept159-*luc*/XbaI; 3. pAcept159-*luc*/EcoRI-BamHI; 4. 159 bp fragment of AcMNPV *egt* promoter; 5. DNA mark (λ DNA/ *Hind* - *Eco*RI; 6. 309 bp fragment of BmNPV *egt* promoter; 7. pAcept309-*luc*/EcoRI-BamHI; 8. pAcept309-*luc*/XbaI; 9. pAcept309-*luc*/BamHI

5.2.2 AcMNPV *egt* 基因启动子需要病毒因子的反式激活

将 Lipofectin 与报告质粒 pAcept542-*luc* 混合后转染 Sf21 细胞。4-5 h 后更换含 10%FBS 的 TC-100 培养基, 48 h 后收集细胞, 进行荧光素酶的活性分析。分析结果显示, 报告质粒转染的细胞和 pUL220-*luc* 转染的细胞 (空白对照) 的荧光素酶活性分别为 24.0 ± 14.4 、 18.7 ± 6.1 光子/分钟 (cpm), 两者没有明显的差异。说明在无病毒因子存在时报告质粒 pAcept542-*luc* 转染细胞的中报告基因未被转录和表达。

但是, 在报告质粒 pAcept542-*luc* 转染细胞 4-5 h 后, 再用野生型 AcMNPV 病毒感染细胞 1 h, 再更换含 10%FBS 的 TC-100 培养基, 48 h 后收集细胞, 以报告质粒转染但无病毒感染的细胞做对照、pUL220-*luc* 转染的细胞作空白对照。结果在 pAcept542-*luc* 转染的 Sf21 细胞中检测到了荧光素酶活性, 减去空白对照并经校正质粒 β -gal 比活性和总蛋白质含量校准后, 细胞抽提物的荧光素酶活性分别为 19772 ± 1637.7 cpm。

上述结果说明, AcMNPV *egt* 启动子的活性和 BmNPV *egt* 启动子一样, 都需要病毒因子的反式激活, 无病毒因子作用时检测不到其转录活性。

G-Ac	CCTTGTACCG	ATGCACGCGA	ACATTTTGAG	CGGACGTGAT	TTTAAACTTG	TCGGTGAATT	60
C-Ac	-----	-----	-----	-----	-----	-----	60
ZJ-8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	60
G-Ac	TTAACCACAA	ATGAAATCCA	CGGTTGCCGG	TATACATGAC	TCTTGACACG	TTCTCTTCCG	120
C-Ac	-----	A-----	-----	-----	-----	-----	120
ZJ-8	-----	G-----	-----	-----	-----	-----	120
G-Ac	TGTAACAA	CAGAAACGCC	GTGGCGCCAA	TGTAAATTTT	CAGCATTAAA	TCGTGTTCGT	180
C-Ac	--C-----	--G-----	-----A-	-----	-A-----	-----	180
ZJ-8	--T-----	--A-----	-----C-	-----	-G-----	-----	180
G-Ac	CAACATAATT	TTTGTAAATCG	GCGTCTACGA	CCCATTCCCT	GCCGCCGCCG	TCGTCCAACG	240
C-Ac	-----	T-----	-----G-	-----	-----G---	-----	240
ZJ-8	-----	C-----	-----A-	-----	-----A---	-----	240
G-Ac	GTTTGACGTG	CACGTCGGAC	ACTTTGTTTT	GCACAATATA	ACTATACAAT	TGTGCGGAGG	300
C-Ac	-----	-----	-----	-----	-----	-----A--	300
ZJ-8	-----	-----	-----	-----	-----	-----C--	300
G-Ac	TATCAAAATA	TCTGTCGGCG	TGAATCCAGC	GCGCGTTGAC	CGTCATGAAC	GCGTACTTGC	360
C-Ac	----A-----	-C-----G	-----	-----	-----C	-----	360
ZJ-8	----G-----	-T-----C	-----	-----	-----T	-----	360
G-Ac	GGCTGTCGTT	GTACGCAATG	GCGTCCCACA	TCATGTCGAC	GCGCTTCTGC	GTATAATTGC	420
C-Ac	-----	-----	-----	-----	-----	-----	420
ZJ-8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	420
G-Ac	ACACTAACAT	GTTGCCCTTT	GAAGTTGACC	TCGATTGTGT	TAATTTTGG	CATATAAAAAG	480
C-Ac	---C-----	-T-----	-----T----	--G-----	-----	C-----G	480
ZJ-8	---A-----	-C-----	-----C----	--T-----	-----	T-----A	480
G-Ac	GTCACCTTT	AAAATTTGTT	ACATAATCAA	ATTACAGTAA	CAGTTATTTCG	GTTTGAAGCA	AA 542
C-Ac	--CA-----	-----	-----T---	-----	-----	-T-----	-- 542
ZJ-8	--TG-----	-----	-----C---	-----	-----	-G-----	-- 542

图 5-2 AcMNPV *egt* 启动子与 GenBank 发表的序列及 BmNPV ZJ-8 *egt* 启动子序列的比较
G-Ac : GenBank 发表的 AcMNPV *egt* 启动子序列 ; C-Ac : 本文作者克隆的 AcMNPV *egt* 启动子序列 ; ZJ-8 : 本文作者克隆的 BmNPV ZJ-8 *egt* 启动子序列。

Fig. 5-2 Comparison of nucleotide sequences of *egt* promoters from AcMNPV and BmNPV ZJ-8
G-Ac : AcMNPV *egt* promoter sequence from GenBank ; C-Ac : AcMNPV *egt* promoter sequence cloned by the author ; ZJ-8 : BmNPV ZJ-8 *egt* promoter sequence cloned by the author.

5.2.3 AcMNPV *egt* 基因启动子的转录时相

用 pA_{cegt}542-*luc* 转染 Sf21 细胞并用野生型病毒感染 , 以 pUL220-*luc* 转染的细胞为空白对照 , 在感染后 6、12、18、24、36 和 48 h 分别收集细胞 , 测定荧光素酶活性。结果 pA_{cegt}542-*luc* 转染的 Sf21 细胞 , 最早在病毒感染后 24 h 才检测到荧光素酶活性(每微克细胞抽提物 32.9 ± 5.9 cpm), 48 h 内随着时间经过荧光素酶活性增加 (图 5-3)。

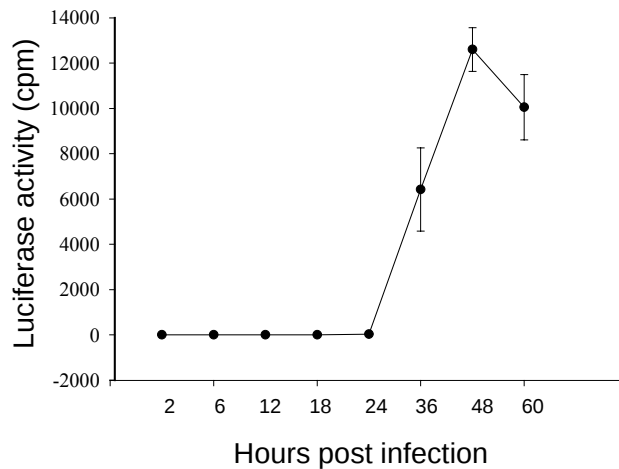


图 5-3 AcMNPV *egt* 基因启动子控制的 *luc* 基因的转录时相

X 轴表示病毒感染后的经过时间 (h), Y 轴表示荧光素酶活性 (光子数/min, cpm)。图中数据为经空白对照、校正质粒 β -gal 比活性和总蛋白校正的 3 次重复的平均值。

Fig.5-3 Time-course expression of luciferase gene driven by AcMNPV *egt* promoter

The luciferase activities of pAcept542-luc in Sf21 cells are indicated on the Y axis. The harvest time post infection (hpi) is indicated on the X axis. The data are average luciferase activities of three separate treatments normalized by β -galactosidase activity of normalization plasmid and per microgram protein of extract. Luciferase activity was first detected at 24 hpi and the maximum was at about 48 hpi.

5.2.4 AcMNPV *egt* 翻译起始位点上游 159 bp 区段具有基本的转录活性

用上述不同长度 AcMNPV *egt* 基因启动子控制 *luc* 基因转录的报告质粒 pAcept542-luc (542bp)、pAcept309-luc (309 bp) 和 pAcept159-luc (159 bp) 分别转染 Sf21 细胞进行瞬时表达, 以无 AcMNPV 感染的细胞为对照、pUL220-luc 转染的细胞为空白对照。病毒感染更换培养基后 48 h 收集细胞。荧光素酶的活性分析显示: 报告质粒转染+病毒感染的细胞抽提物中都检测到荧光素酶的活性, 其中以 pAcept542-luc 转染的活性最高, 其次是 pAcept309-luc 转染的细胞, 与 pAcept542-luc 接近, 而 pAcept159-luc 转染细胞种只能检测到微弱的活性 (仅为前者的 0.2%), 三者经校正质后每微克细胞抽提物荧光素酶的活性分别为 11438.6 ± 879.2 、 9783.5 ± 840.1 和 22.9 ± 2.8 cpm。以 542 bp 启动子区段控制转录的荧光素酶活性为 100% ($100 \pm 7.7\%$), 则 309 和 159 bp 启动子区段控制转录的荧光素酶活性分别为 $85.5 \pm 7.3\%$ 、 $0.20 \pm 0.02\%$ (图 5-4)。在经报告质粒转染而无 NPV 感染的细胞中, 则未检测到任何荧光素酶活性。由此说明 AcMNPV *egt* 基因翻译起始位点至上游-159 bp 区段内包括了 *egt* 启动子的基本结构, 但是其转录活性已接近消失; 而与病毒因子作用的主要转录调控顺式元件可能存在于 ATG 上游-159 ~ -309bp 之间。

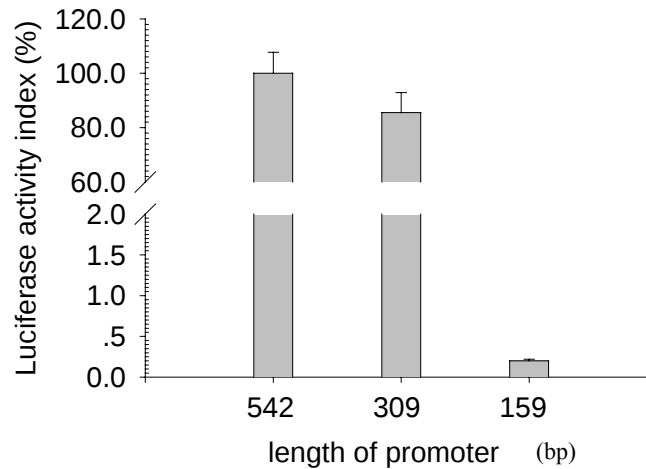


图 5-4 不同长度 AcMNPV *egt* 启动子区段的转录活性比较

X 轴表示 *egt* 启动子长度 (bp), Y 轴表示荧光素酶活性指数 (%). 图中数据为经空白对照、校正质粒 β -gal 比活性和总蛋白校正的 3 次重复平均数, 以 542 bp 启动子的活性为 100% ($100 \pm 7.7\%$), 则 309 和 159 bp 启动子区段控制的荧光素酶活性分别为 $85.5 \pm 7.3\%$ 、 $0.20 \pm 0.02\%$ 。

Fig.5-4 Transcriptional activities of AcMNPV *egt* promoter of different lengths

The lengths of promoter regions are indicated on the X-axis. Promoter activities are indicated on the Y-axis. The data showed the average luciferase activities of three separate treatments, relative to pAc*egt*542-*luc* serving as 100%, after deduction of pUL220-*luc* transfected blank and being normalized by β -gal activity of normalization plasmid and protein of extract (mean $\pm$ S.D.). The luciferase activities of 309 bp and 159 bp promoters are $85.5 \pm 7.3\%$ and $0.20 \pm 0.02\%$ respectively.

5.2.5 BmNPV *hr3* 显著增强 AcMNPV *egt* 基因启动子的活性

在上述时相试验中, AcMNPV *egt* 基因启动子的转录活性不仅需要病毒因子的反式激活, 而且在病毒感染后 24 h 才检测到。但是, 在 AcMNPV 病毒感染 Sf21 的细胞中 3 h 就检测到由病毒 *egt* 基因编码的转移酶 EGT 活性 (O'Reilly & Miller, 1990)。在 AcMNPV 基因组中, 存在着一些同源重复序列 *hrs* (Cocharn *et al.*, 1993), 它们不仅具有 DNA 复制原点的功能, 而且能显著增强基因的转录 (Pearson, *et al.*, 1992; Rodems *et al.*, 1993; 张志芳等, 1995; Lu, *et al.*, 1997)。

为了分析 *hr* 对 *egt* 基因启动子活性的影响, 本试验在报告基因 *luc* 下游插入 BmNPV *hr3* 构建报告表达质粒 pAc*egt*542-*luc*-*hr3*, 转染 Sf21 细胞进行瞬时表达, 并以 pAc*egt*542-*luc* 转染的细胞为对照、pUL220-*luc* 转染的细胞为空白对照, 设置病毒感染和无病毒感染两种处理。病毒感染后 2、6、12、18、24 和 48 h 分别收集细胞测定荧光素酶活性。

结果分析显示, 病毒感染区 pAc*egt*542-*luc*-*hr3* 转染的 Sf21 细胞中最早在病毒感染后 18 h 检测到微弱的荧光素酶活性, 扣除空白对照并经校正质粒 β -gal 比活性和总蛋白质含量校准后每微克细胞抽提物 24.0 ± 8.5 cpm, 以后随时间经过荧光素酶活性增强, 24 h 时为 150.4 ± 10.2 cpm, 48 h 达到 $1.35 \times 10^7 \pm 1.31 \times 10^6$ cpm, 比对照 pAc*egt*542-*luc* 48 h 的 12601.8 ± 967.7 cpm 提高 1000

多倍。而无病毒感染区, pA*cegt542-luc-hr3*、pA*cegt542-luc* 和 pUL220-*luc* 转染的细胞, 荧光素酶活性分别为 16.0 ± 6.9 、 17.0 ± 2.3 、 20.0 ± 4.0 cpm (未经校正), 无显著差异。

上述结果说明, 虽然 BmNPV *hr3* 使 AcMNPV *egt* 基因启动子的转录活性明显增强, 转录时相略有提早, 但是并没有明显改变 *egt* 基因启动子需要病毒因子反式激活的性质。

5.2.6 外源昆虫激素对 AcMNPV *egt* 启动子转录活性的影响

(1) 蜕皮激素对 AcMNPV *egt* 基因启动子活性的影响

昆虫蜕皮激素 (ecdysone) 具有促进昆虫幼虫发育和变态的作用, 同时也是 EGT 酶的底物。用质粒 pA*cegt542-luc* 转染 Sf21 细胞并用病毒感染, 在更换培养基后立即加入一定量的 ecdysone, 使终浓度分别达到 0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{g/ml}$, 以报告质粒转染但不加激素的细胞为对照、pUL220-*luc* 转染的细胞为空白对照, 48 小时后收集细胞。

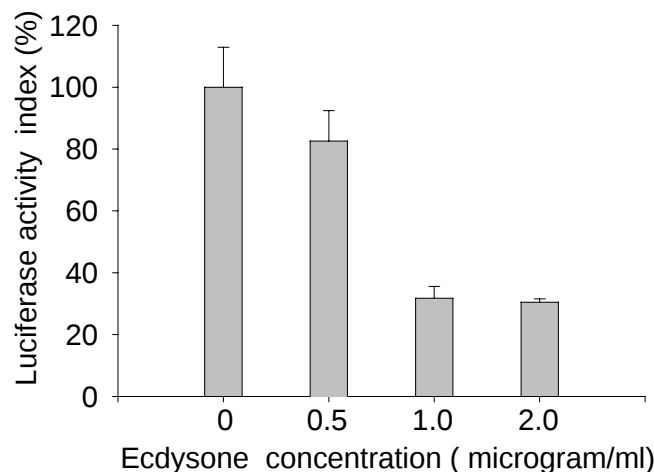


图 5-5 蜕皮激素对 AcMNPV *egt* 基因启动子活性的影响

X 轴表示蜕皮激素的终浓度 ($\mu\text{g/mL}$), Y 轴表示荧光素酶活性指数。图中数据为经空白对照、校正质粒 β -gal 比活性和蛋白校正的 3 次重复的平均值, 以无蜕皮激素处理 (对照) 荧光素酶活性为 100% ($100 \pm 12.88\%$), 则蜕皮激素浓度为 0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 处理区的荧光素酶活性分别为 $82.58 \pm 9.85\%$ 、 $36.73 \pm 9.02\%$ 和 $35.27 \pm 8.32\%$ 。

Fig. 5-5 Effects of foreign insect ecdysone on the activity of AcMNPV *egt* promoter

The ecdysone concentrations ($\mu\text{g/ml}$) are showed on the X-axis. The luciferase activity indexes are indicated on the Y-axis. The data showed the average luciferase activities of three separate treatments after being normalized by blank, β -gal activity of normalization plasmid and protein of extract, relative to non-hormone treatment serving as 100% ($100 \pm 12.88\%$) (mean $\pm$ S.D.). Those of 0.5, 1.0 and 2.0 $\mu\text{g/ml}$ ecdysone are $82.58 \pm 9.85\%$, $36.73 \pm 9.02\%$ and $35.27 \pm 8.32\%$ respectively.

荧光素酶活性分析结果显示(图 5-5),cdysone 对 AcMNPV *egt* 基因启动子的活性有负调控作用,0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{g/mL}$ ecdysone 处理区,*egt* 基因启动子活性分别为阳性对照区(ecdysone=0)的 $(82.58 \pm 9.85)\%$ 、 $(36.73 \pm 9.02)\%$ 和 $(35.27 \pm 8.32)\%$ 。说明低浓度的 ecdysone 对 *egt* 基因启动子的活性影响较小,而 1.0-2 $\mu\text{g/ml}$ ecdysone 使 *egt* 基因启动子活性明显下降。

(2) 保幼激素对 AcMNPV *egt* 基因启动子活性的影响

与蜕皮激素相反,保幼激素(JH)具有使昆虫保持幼虫特性的作用,保幼激素与蜕皮激素的平衡控制着家蚕的发育与变态。为了考察 JH 对 *egt* 基因启动子活性的影响,在质粒 pBmeg-*luc* DNA 转染 Sf21 细胞并用病毒感染更换培养基后,立即加入一定量的保幼激素类似物(JHA),使终浓度分别达到 0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{g/mL}$,以报告质粒转染但不加激素的细胞为对照、pUL220-*luc* 转染的细胞为空白对照,48 小时后收集细胞,测定荧光素酶的活性。结果显示,在浓度 0.5 ~ 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 培养基范围内,各 JHA 处理区 *egt* 启动子活性比不施用 JHA 的高,提高幅度为 37.9% ~ 74.8%,但提高幅度随着 JHA 浓度的升高而下降(图 5-6)。

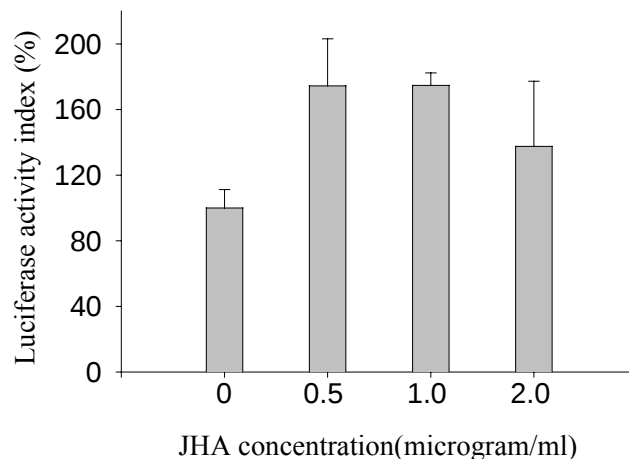


图 5-6 保幼激素类似物对 AcMNPV *egt* 基因启动子活性的影响

X 轴表示保幼激素类似物浓度($\mu\text{g/mL}$),Y 轴表示荧光素酶活性指数(%)。数据为经空白对照、校正质粒的 β -gal 比活性和蛋白校正的 3 次重复平均值,以无激素处理区荧光素酶活性指数为 100% ($100 \pm 11.3\%$),则 0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 保幼激素类似物处理区的荧光素酶活性分别为 $174.4 \pm 28.8\%$ 、 $174.8 \pm 7.6\%$ 和 $137.5 \pm 39.8\%$ 。

Fig. 5-6 Effects of foreign insect ecdysone on the activity of AcMNPV *egt* promoter
The ecdysone concentrations ($\mu\text{g/ml}$) are showed on the X-axis. The luciferase activity indexes are indicated on the Y-axis. The data showed the average luciferase activities of three separate treatments after being normalized by blank, β -gal activity of normalization plasmid and protein of extract, relative to non-hormone treatment serving as 100% ($100 \pm 12.88\%$) (mean $\pm$ S.D.). Those of 0.5, 1.0 and 2.0 $\mu\text{g/ml}$ ecdysone were $174.4 \pm 28.8\%$, $174.8 \pm 7.6\%$ and $137.5 \pm 39.8\%$, respectively.

5.2.7 AcMNPV *egt* 启动子控制转录的报告质粒在家蚕体内的表达

AcMNPV 为 BmNPV 的近缘种 (van Regenmortel *et al.*, 2000), 用野生型 AcMNPV 接种化蛹不久的家蚕蛹诱导成为人工滞育蛹 (张志芳等, 1993), 并且证明 AcMNPV 改变家蚕的变态是由 *egt* 基因表达引起的 (Shikata *et al.*, 1998)。本试验利用 AcMNPV 的非允许宿主——家蚕, 研究体内条件下 BmNPV *hr3* 对 AcMNPV *egt* 基因启动子特性的影响及昆虫激素对转录活性的调控。

(1) 报告质粒的表达

分别以 pAc*egt-luc* 和 BmNPV *hr3* 带增强子的 pAc*egt-luc-hr3* 报告质粒转染家蚕 5 龄期幼虫, 进行体内瞬时表达。5 龄幼虫 24 h 后用含 1 μ g 质粒 DNA 和 5 μ l Lipofectin 的 20 μ l 转染液注射家蚕幼虫进行转染, 2 h 后每头幼虫注射 1×10^6 pfu 野生型 BmNPV, 设置无病毒感染的阳性对照区, 以 pUL220-*luc* 转染的幼虫为空白对照。在接种病毒后 8、12、18、24 h 分别收集血淋巴, 测定血淋巴细胞抽提物中 Luc 的活性 (表 5-1)。

表 5-1 AcMNPV *egt* 基因启动子控制转录的 *luc* 基因在家蚕体内的表达 (cpm)

Table 5-1 Expression of luciferase gene under controlling of AcMNPV *egt* promoter (cpm)

感染后时间 (h)	8	12	18	24
Time post infection				
pAc <i>egt542-luc</i>	0	0	0	23.8 $\pm$ 6.9
pAc <i>egt-luc-hr3</i>	0	0	13082.2 $\pm$ 1020.8	23770.5 $\pm$ 487.2

注: 表中数据为经空白对照和蛋白质含量校正后的 3 次重复的平均值。

The data represents the average of three replicates after deduction of blank and modification of protein of cell extract. The pUL220-*luc* transfected cells were served as blank.

报告质粒 pAc*egt-luc-hr3* DNA 转染的家蚕幼虫, 在病毒感染后 12 h 仍检测不到明显的 Luc 活性, 但到 18 h 迅速上升。而报告质粒 pAc*egt-luc* 转染的家蚕幼虫, 在病毒感染后 24 h 才检测到微弱的 Luc 活性。在无病毒感染的对照区, 未检测到 Luc 活性。试验结果说明, AcMNPV *egt* 基因启动子在家蚕幼虫体内仍需要病毒因子的反式激活, 而 BmNPV *hr3* 序列在个体水平仍具有增强子功能。

(2) 外源昆虫激素的影响

用 100 μ g/ml 的 JHA 溶液涂布 5 龄第 1 日蚕的背面和侧面; 或每头蚕注射 2、4 μ g ecdysone。12 h 后按照上述方法用经脂质体包埋的 pAc*egt-luc-hr3* 报告质粒转染家蚕并用野生性 BmNPV 感染, 48 h 后收集蚕血淋巴, 制备细胞抽提物用于测定 Luc 的活力, 结果如表 5-2 所示。

结果表明, 100 μ g/ml JHA 处理的家蚕血淋巴抽提物中, AcMNPV *egt* 启动子控制转录的报告基因 *luc* 的表达量比对照提高 (37.9 $\pm$ 26.4)%, 这一结果与 JHA 在培养细胞的作用结果相似, 也与 JHA 对 BmNPV *egt* 启动子的作用一致。

体内条件下, ecdysone 对 AcMNPV *egt* 启动子的活性也表现为正向调控作用, 并呈现剂量效应, 每头注射 2、4 μ g 处理区的荧光素酶活性分别比对照提高约 1.5 和 4.4 倍, 与 ecdysone 对 BmNPV *egt* 启动子的作用相同 (4.2.7)。

表 5-2 体内条件下蜕皮激素和保幼激素对 AcMNPV *egt* 基因启动子活性的影响Table 5-2 Effects of ecdysone and JHA on AcMNPV *egt* promoter activity

处理 Treatments	JHA (100 $\mu\text{g/ml}$)	Ecdysone		对照 Control
		2 $\mu\text{g per os}$	4 $\mu\text{g per os}$	
荧光素酶活性指数 (%) Luciferase activity index	137.9 $\pm$ 26.4	246.5 $\pm$ 30.5	542.4 $\pm$ 52.4	100 $\pm$ 30.9

注：表中数据为经空白对照和蛋白质含量校正后的 3 次重复的平均值。

The data represents the average of three replicates after deduction of blank and modification of protein of cell extract. The pUL220-*luc* transfected cells were served as blank.

5.3 小结

本试验按照第三章研究 BmNPV *egt* 启动子的方法,对 AcMNPV *egt* 基因启动子特性进行了分析。试验表明, AcMNPV *egt* 基因启动子与 BmNPV *egt* 启动子相似,其转录活性需要病毒因子的反式作用,而且要在病毒感染细胞 24 h 才能检测到报告基因的表达。AcMNPV *egt* 基因启动子控制的报告质粒在非允许的家蚕幼虫体内的表达试验,得到类似于在昆虫 Sf21 细胞中的结果。

BmNPV *hr3* 作为基因转录增强子,使 AcMNPV *egt* 基因启动子的转录活性增加 1200 多倍,但并不明显改变 *egt* 基因启动子的性质,仍然需要病毒因子的反式激活。

激素处理试验结果显示,外源昆虫蜕皮激素和保幼激素对 AcMNPV *egt* 基因启动子的活性有一定的影响。在 Sf21 细胞系中,蜕皮激素对 AcMNPV *egt* 启动子有负调控作用,浓度为 0.5-2.0 $\mu\text{g/ml}$ 培养基范围内,*egt* 启动子的转录活性都呈下降趋势;而在家蚕幼虫体内,每头注射 4-8 μg 蜕皮激素,*egt* 基因启动子的活性提高 1.5-4.4 倍。保幼激素对 AcMNPV *egt* 启动子有正向调控作用,不论是在体外 (0.5-2.0 $\mu\text{g/ml}$ 培养基) 还是在体内 (50-150 $\mu\text{g/ml}$), 都能增强 *egt* 启动子的活性。

对不同长度的 BmNPV *egt* 启动子长度的活性分析比较结果显示, AcMNPV *egt* 基因翻译起始位点 ATG 上游-159 bp 区段具有基本的转录活性,表明该区段包含了 *egt* 基因启动子的基本元件,但转录活性已经几乎消失;长度为 309 bp 区段的启动子活性基本接近于 542 bp 区段的启动子,比长度为 159 bp 的启动子要高 400 倍以上。说明在-159 ~ -309 区段内可能存在与病毒因子反式作用的主要转录调控顺式元件。

第六章 滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调节

前 言

海藻糖是由 2 个葡萄糖分子组成的双糖,广泛存在于微生物 (Hey and Elbein,1968; Vijayakumar *et al.*, 1978)、植物 (Huston and Manners, 1965; Alexander,1973)、无脊椎动物 (Saito, 1960; Talbot and Huber, 1975) 和脊椎动物体内 (Sacktor, 1968; Nakano *et al.*, 1977; Galand, 1984), 是昆虫的主要血糖,具有供给能量和提供生物大分子合成的底物等功能 (Ikeda *et al.*, 1993; Su *et al.*, 1997; Su *et al.*, 1994), 因此,海藻糖在昆虫中扮演着关键的角色。由于昆虫体内海藻糖酶 (α -glucoside-1-glucosylhydrolase, E.C. 3.2.1.28) 是一种端基异构体-转换 ($\alpha \rightarrow \beta$) 糖苷酶 ($\alpha \rightarrow \beta$ anomer-inverting glucosidase), 具有高度的底物专一性,在天然糖类中只能催化水解 α , α -海藻糖释放 β -葡萄糖 (Hehre, *et al.*, 1982)。海藻糖的功能必须通过海藻糖酶的作用才能实现,通过海藻糖酶水解海藻糖,为各种组织器官提供葡萄糖。果蝇 (*Drosophila*)、蝗虫 (*Locusta*) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 等昆虫中海藻糖酶有两种类型,它们是由同一基因表达而形成的两种不同产物,一种为可溶型 (soluble-type), 另一种为膜固定型 (bound-type), 膜固定型酶存在于卵巢等多种组织的向血液面的膜内。

海藻糖酶由海藻糖酶基因 (*trehalase*) 编码,在单倍体家蚕基因组中 *trehalase* 为单拷贝基因。通过核苷酸序列分析,许多种生物的海藻糖酶的氨基酸序列被揭示,如大肠杆菌 *E. coli* (Gutierrez *et al.*, 1989)、家兔小肠 (Ruf *et al.*, 1990) 和家蚕中肠 (Su *et al.*, 1993) 等。编码家蚕 *trehalase* 基因的 cDNA 为 3143 bp, 编码 579 个氨基酸 (GenBank Accession No. D86212), 包含 1 个剪接信号序列和 5 个潜在的 N-糖基化位点 (Su *et al.*, 1994)。昆虫体内几乎所有的组织都存在海藻糖酶。家蚕 *trehalase* 基因在卵巢、马氏管、肌肉、体壁和神经系统中都有转录,蛹期中肠中 *trehalase* 基因转录数量约为卵巢中的 60 倍 (Su *et al.*, 1993)。

昆虫激素对海藻糖酶基因有调节作用。保幼激素 (juvenile hormone, JH) 增强雌性蜚蠊 (cockroach, *Periplaneta americana*) 附腺 *trehalase* 基因表达; 蜕皮激素 (ecdysone) 诱导粉虫 (mealworm) 雄性附腺 *trehalase* 基因表达 (Su *et al.*, 1994)。但是, JH 和 ecdysone 需要经过数日才能对海藻糖酶基因产生作用,而 DH 只需经过 2 h 即可增强海藻糖酶的活性 (Ikeda *et al.*, 1993)。家蚕海藻糖酶基因的表达受滞育激素 (Diapause hormone, DH) 的诱导调控 (Yamashita *et al.*, 1972)。虽然家蚕 *trehalase* 基因在卵巢、马氏管、肌肉、体壁和神经系统中都有转录,但是不论是体内还是器官离体培养试验, DH 只对卵巢的海藻糖酶基因起调节作用,使 mRNA 增加约 7 倍,而不改变其它组织的海藻糖酶基因的转录 (Su *et al.*, 1994)。

家蚕滞育激素-性信息素合成激活肽 (DH-PBAN) 基因在基因组中为单拷贝,家蚕滞育激素是由 24 个氨基酸组成的酰胺肽 (T-D-M-K-D-E-S-D-R-G-A-H-S-E-R-G-A-L-W-F-G-P-R-L-NH₂), C-端有一个 FGPR-L-NH₂ 的 5-肽酰胺结构,是滞育激素的生物活性部位 (Xu *et al.*, 1995; Imai *et al.*, 1998)。二化性蚕品种,通过某种未知的机制将环境信号传递到幼虫和蛹期,高温催青的卵 DH-PBAN 基因的表达量明显高于低温催青的卵, DH-PBAN 在蛹期 3 d 左右大量表达 (Xu *et al.*, 1995), 经由心测体-咽测体释放到血淋巴中,作用于卵黄旺盛形成期的卵巢,与卵巢内膜上的

受体结合,使卵巢内的 cGMP 水平下降,激活海藻糖酶等基因。位于卵巢内膜的海藻糖酶活性提高,将血液中的海藻糖降解成葡萄糖,被卵母细胞摄取,最后合成糖原,卵内的糖原增加,这是滞育的诱发过程。糖原在糖原磷酸化酶的作用下,分解产生山梨醇和甘油,蚕卵开始滞育。山梨醇在山梨醇脱氢酶作用下还原成果糖,果糖再进一步转化成糖原,滞育解除 (Yamashita *et al.*, 1996; Ikeda *et al.*, 1993; Su *et al.*, 1997; Su *et al.*, 1994; 黄君霆, 2003)。

DH 可以诱导糖原含量的上升,但是,单纯碳水化合物变化,还不能完全解释滞育的机制。当把海藻糖酶抑制剂 (Trehazolin) 和 DH 一起注入多化性蚕蛹中,产卵数减少一半,仅 5% 的卵能孵化,但这些卵都是糖原含量很低的滞育卵 (Katagiri, *et al.*, 1998)。说明碳水化合物可以增强抗逆性,但与卵滞育的形成没有直接联系。

研究家蚕和野桑蚕 (*Bombyx mandarina*) 海藻糖酶基因有助与从分子水平上阐明家蚕滞育机理。本试验以荧光素酶基因 (*luciferase*, *luc*) 为报告基因,将从家蚕苏·菊×明·虎、野桑蚕基因组中扩增的包含海藻糖酶基因核心启动子的 5' 侧翼区 (赵巧玲等, 2003) 分别克隆到质粒载体 pGEM-3Z 上,构建了海藻糖酶基因启动子控制的 *luc* 基因报告质粒,利用昆虫细胞瞬时表达系统进行启动子特性分析,并初步研究了滞育激素对海藻糖酶基因启动子转录活性的调控作用。

6.1 材料与方法

6.1.1 蚕品种与主要试剂

瞬时表达系统用来自家蚕卵巢的 Bm5 细胞和秋粘虫胚胎的 Sf21 细胞,由农业部家蚕生物技术重点实验室保存。pUL220-*luc* (含 *luciferase*) 由中国科学院生物化学和细胞生物学研究所提供 (雷向东等, 1994)。TC-100 昆虫细胞培养基、FBS、Lipofectin 试剂等均为 Invitrogen 公司产品。荧光素酶 (Luc) 检测试剂盒 (E4030) 为 Promega 公司产品。家蚕滞育激素类似物 (DH) 由中国科学技术大学徐卫华教授馈赠。含家蚕“苏·菊×明·虎”、野桑蚕 (镇江) *trehalase* 基因 5' 侧翼片段的重组质粒 p3Z-BmTre、p3Z-BmandTre (赵巧玲等, 2003), 穿梭质粒 pSK-hsp70-LacZ 由农业部家蚕生物技术重点实验室先前构建并保存 (Zhou *et al.*, 2002b; Zhou *et al.*, 2003a; Tang *et al.*, 2003)。

荧光素酶活性、总蛋白含量分别在 Beckman LS-6000TA 液体闪烁仪和 DG3022A 型酶联免疫检测仪上测定。

6.1.2 实验方法

(1) 报告质粒的构建

将上述重组质粒 p3Z-BmTre (苏·菊×明·虎)、p3Z-BmandTre (野桑蚕) (赵巧玲等, 2003) 经酶切鉴定和序列验证后 (图 6-1), 按照 Sambrook (1989) 等的方法 (Sambrook *et al.*, 1989) 进行克隆。

用 BamHI 酶解含荧光素酶基因 (*luc*) 的 pUL220-*luc* 以分离 *luc* 基因片段, 分别再亚克隆到重组质粒 p3Z-BmTre 和 p3Z-BmandTre 的 *trehalase* 基因启动子下游, 构建成报告质粒 p3Z-BmTre-*luc* 和 p3Z-BmandTre-*luc* 用于瞬时表达分析。

(2) 细胞的培养与转染

昆虫细胞的常规培养参照 Summers 的方法进行 (Summers and Smith, 1987), 细胞转染参照 Tang 等 (Zhou *et al.*, 2002b; Zhou *et al.*, 2003a; Tang *et al.*, 2003) 等的方法进行。以 5×10^5 mL⁻¹ 密度将 Bm5 细胞接种于 12 cm² 的瓶中, 27℃ 培养过夜。

在 50 μ L 反应体系中, 用 7.5 μ L Lipofectin、1 μ g 报告质粒 DNA 和 0.5 μ g 穿梭质粒 pSK-*hsp70-LacZ* 混合制成转染液。倾去旧培养基, 用无血清 TC-100 培养基洗细胞 2 次, 再加 1 mL 无血清 TC-100 培养基, 逐滴加入转染液, 4-5 h 后用 3 mL 含 10%FBS 的 TC-100 培养基替换旧培养基。以 pUL220-*luc* 转染的细胞为空白对照, 每个处理重复 3~4 次。

(3) 滞育激素处理

滞育激素 (DH) 处理试验中, 在更换细胞培养基后立即在每瓶 (3 mL 培养基) 中加入一定量的 20 μ mol/L 的 DH, 以不加 DH 处理为阳性对照、pUL220-*luc* 转染的细胞为空白对照, 每个处理重复 3~4 次。

(4) 细胞抽提物的制备及荧光素酶活力的测定

在更换培养基后 48 h, 4℃、9 000 g 离心 5 min 收集细胞, 用试剂盒 (E4030, Promega) 制备细胞液裂解, -20℃ 和室温下冻融 1 次, 4℃ 离心除去细胞碎片。荧光素酶活力按照 Idahl 等 (Idahl *et al.*, 1986) β -半乳糖苷酶 (β -gal) 比活性和总蛋白含量按照 Zhou 等 (Zhou *et al.*, 2002b; Zhou *et al.*, 2003a; Tang *et al.*, 2003) 的方法进行测定。

荧光素酶活力经总蛋白含量和穿梭质粒 β -gal 比活校正后, 取平均值。数据分析和作图分别在 Statistical Analysis System (SAS) 和 Sigma Plot 软件上完成。

6.2 结果与分析

6.2.1 家蚕和野桑蚕 *trehalase* 基因 5' 侧翼区序列

测序结果显示, 克隆的野桑蚕和家蚕苏·菊×明·虎的 *trehalase* 基因 5' 侧翼区片段长度分别为 1857 bp、1853 bp (图 6-1), 涵盖了第一外显子和启动子区。两者的同源性和家蚕朝·日×东·海 *Trehalase* 基因相应序列 (GenBank Accession No. D86212) 的同源性分别为 93.3%、98.9%。家蚕与野桑蚕之间差异主要来源于长度为 3-4 个碱基片段缺失和单个碱基替换, 而家蚕苏·菊×明·虎与朝·日×东·海两品种之间的差异来源于单个碱基替换。*trehalase* 基因 5' 侧翼区可能存在 2 个 GATA 基序、2 个 SP1 和 1 个 TBP 等顺式作用元件, 有两个典型的 TATA 盒 (赵巧玲, 2003)。

6.2.2 报告质粒的瞬时表达

分别用报告质粒 p3Z-B α mandTre-*luc* 和 p3Z-BmTre-*luc* 转染 Bm5、Sf21 细胞进行瞬时表达, 48 hr 后收集细胞, 测定细胞抽提物荧光素酶的活性。

结果如表 6-1 所示。两种报告质粒在来源家蚕卵巢的 Bm5 和秋粘虫胚胎的 Sf21 细胞中都有荧光素酶基因表达, 说明家蚕、野蚕海藻糖酶基因启动子在 Bm5 和 Sf 21 细胞中都有转录活性, 但活性都比较低。

6.2.3 滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的的调控作用

为了考察滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调控作用,在报告质粒 pSK-*BmTre-luc* DNA 转染 Bm5 细胞 4-5 h 并更换培养基后,每瓶细胞 (3mL) 中分别加入 2、3、4、5 μ L 的 20 μ mol/L DH 溶液 (终浓度分别为 13、20、27、33 和 50 nmol/L) 进行瞬时表达分析。试验以报告质粒转染而无 DH 处理的细胞为阳性对照、pUL220-*luc* 转染且无 DH 处理的细胞为空白对照。

结果显示 (图 6-2), DH 浓度在 13 ~ 27 nmol/L 范围内荧光素酶活性随 DH 剂量增高而增加,以对照区 (DH=0) 为 100 活性指数标准,则 DH 浓度为 13、20 和 27 nmol/L 处理区的荧光素酶活性指数分别为 139.7 ± 24.2 、 230.9 ± 49.2 、 231.4 ± 77.6 , 显著或极显著高于对照区 ($F=302.82$, $P=0.0001 < 0.01$; $F=42.29$, $P=0.0029 < 0.01$; $F=17.16$, $P=0.0144 < 0.05$)。但是当 DH 浓度升高至 33 nmol/L 时,荧光素酶活性指数为 123.5 ± 25.0 , 增加不显著 ($F=5.27$, $P=0.0834 > 0.05$); DH 浓度为 50 nmol/L 时,荧光素酶的活性指数为 $98.0 \pm 16.6\%$, 无显著变化 ($F=0.08$, $P=0.79 > 0.05$)。说明 DH 对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调节呈现明显的剂量效应,浓度在 13 ~ 27 nmol/L 范围内对海藻糖酶启动子活性有显著的增强作用。

表 6-1 家蚕、野蚕海藻糖酶基因启动子控制的荧光素酶基因的瞬时表达

Table 6-1 Expression of *luc* gene driven by *trehalase* promoter from *Bombyx mori* or *Bombyx mandarina*

报告质粒 Reporter plasmids	pSK- <i>BmTre-luc</i>		p3Z- <i>BmandTre-luc</i>	
细胞系 Cell lines	Bm5	Sf21	Bm5	Sf21
荧光素酶活性 Luciferase activities (cpm)	188.0 ± 22.6	73.3 ± 1.9	61.3 ± 1.9	50.0 ± 2.0

注:表中数据为经空白对照、 β -半乳糖苷酶比活性和蛋白质校正的 3 次独立试验的平均值。pUL220-*luc* 转染的 Bm5 和 Sf21 细胞 (空白对照) 荧光素酶活性分别为 15.7 ± 4.0 cpm 和 13.3 ± 6.1 cpm。

The data shown in the table are the average of three separate experiments after being normalized by blank control, β -gal activities and total protein of cell extract. Luciferase activity of pUL220-*luc* transfected Bm5 cells and Sf21 cells (blank) were 15.7 ± 4.0 cpm and 13.3 ± 6.1 cpm, respectively.

1	S	AATTCTTCCA	TTGCCCAAG	TAGGCCATCG	GTGACCTACA	TGCCTGTCAA	CTCTTTCACT	AGTGGACATG	TTCATTGACA
1	M						T		
81	S	ATTTTCAGAGG	CACAGGCTTC	TTAGACTCGC	ACATTATGCA	GTACCGTGGT	TTTC ^{SP1} GTGGAGTCGGAGTGGT	GGAACCCGAT	
80	M		G						
81	T								
161	S	GGGTTTTAGT	CGGTAGTCGG	TTTT ^{SP1} CGGGGACGGGTCCTTCG	GTGGCTGACG	CCGTGCAGCG	TCTGGCGCGC	CTTTCTCAAG	
160	M								
161	T								
241	S	GCAAAGTCTT	CCGGCAGGAA	TTGGAAGAAG	AATGGAACCT	CGGTTTTCTG	CCTCTTCTCC	TCTGGAGGCA	CCAGAGTCCG
240	M				G		T		A·A
241	T	C.....							
321	S	ACATAGCCCG	GTCTGCTACC	CCTCTCGACC	GAGTATCCGT	AAACGGATTG	CCTAGCGTTA	AAAAAAAGGG	TCCTTAGGCT
320	M								C
321	T								
401	S	GCTTTTCTTT	CAGGTTGCTT	TCCATAAAGT	ATTGACGATA	GAGCGCTCTC	CCTTAAAAAC	ATTGTTGCGT	CATGGACATT
400	M					T·T			
401	T								
481	S	TCCTGAAATA	TTTTAGCCGC	ATCAACAGGT	TCTGGGCCAC	AGTTTACCAC	GACCTCTCTA	ACATGCCATT	AGTGATACGA
480	M			T				G	AT
481	T								
561	S	ACTAACTTAG	CTGCGGTGAT	TGTCTATGTC	AATAAGCGAC	GGAGATCGGA	TTTGAGATCA	AGTGGGTCGC	GACACAAGGT
560	M								
561	T								
641	S	CAACAAGAAC	TGAATTAATA	TTCGTAGCTC	TGAATACGCA	CACGTATGAA	ATTGCACTTT	ATTTATTAT	TTATTTATTT
640	M	G							
641	T								
721	S	AAACTTTCCA	CAGGAGATGC	GCTTAAAGAC	GCATAAAGTC	AACAGGCCGA	CGGAGATTGC	TAGCGCACAC	CAGCTCTTTC
719	M								
721	T								
801	S	GCTTGGAAT	^{GATA-1} AGATAAGGAC	TAGTTTAATA	ATAATAACTG	GGAACGAATC	CGGCACGGTC	ATCCGGCCCC	ATCATTTCG
799	M					T			
801	T								
881	S	GTATAGGCAG	CGGCTTGCTT	CTGCGAA ^{LTR} TGA	AGTCCATGGG	CGACGGTAAC	CACCTACCAT	CAGGTGGGCC	GTATGCTCGT
879	M			C		A			
881	T								
961	S	CTGCTACAA	GGGCAGTAAA	AAAAAGGAAG	GATAAACACA	CTTACATAGT	TACGTTTAAA	TATCTACATT	AATAGATAAT
959	M	T	A		G	T			
961	T								
1041	S	AAACATCCAA	ACAAAGAGCA	AACAAA--G	TTATCACAAA	ATGTTTTCCC	GATGTGGGAA	TCGAACCCAC	GACTCTCAGC
1039	M	T		CTT		A·G			G
1041	T								
1118	S	GCAACAGTTA	GGGCCGTTAA	CCACTGCACC	ACGGAGTCAG	TCAA-TTTGT	ATTAGATGGT	TAATCTCCAG	TATACTAGAG
1118	M					G		G	
1118	T			C					
1197	S	GCACTTAAAG	AACTTGCTTT	GGTTTCGCTT	GCTACTGAAC	TTCA--CAG	AATTACGCGC	TAAGTCTGTC	TGAGGGTTTG
1194	M	T			T	TCA	C		
1197	T								
1274	S	TTTAAATTT	AATAGATTTT	GGCTAGCCCC	CTGCGGAATC	TATAAGGAAC	ATACAAATTT	TATATCGACA	AGTATATAAC
1274	M					C	C·T	G	
1274	T								
1354	S	TCTAGTAGAA	GCATATATGA	AAAGAAAATG	GAACAACAAA	TTGTTTTATA	AGCAAAGGTC	TTAATACGTA	GCATAGACGT
1354	M	G·A	G		C·C	G			
1354	T						C		
1434	S	AACAATTACT	AATTCTATTG	TAAGGTTTAA	TTTCGTTTTT	TTTT-GACAT	AAAATTATTT	TCGGAACGCT	TTAAAGTTTC
1434	M		G			T			
1434	T								
1513	S	CGTGGTGACG	AACGACAGAG	TCTGAAACTC	GGGAAAACG	AACTGAATAA	CAATACGTGT	TATAACAAAA	TAAATTAATC
1513	M								
1514	T	C						C	
1593	S	ATCCGAATTT	^{GATA-1} TCCTGATAAG	AAATAT--AG	^{TATA box} GTGTATAAAT	ACAGCCTTCG	GTAAACTGGA	ACTGACATTC	GCGTCAGAAC
1593	M			TAT					
1594	T								
1670	S	GATCGAGTCG	GACGTACGCG	ATTATAATCG	^{TBP} ATAAAAAA	A-TGACAAT	^{TATA box} CGAATTATAA	AATTATTTTG	TCTTTAAAT
1673	M		G			A			
1671	T				AA				
1748	S	AAACAGTTTA	GTTACTTACT	TAGTACTAGA	GTTTAGTACT	TAGTGTAACG	GAATTGTTAT	CATTATTATA	TTTGTTTTTG
1752	M				C		C	T	
1751	T								
1828	S	TAAGTGAACG	TTGATCGTCT	TCACGG					
1832	M								
1831	T								

图 6-1 家蚕苏菊 × 明虎 (S) 朝日 × 东海 (T) (GenBank D861212) 及野桑蚕 (M) 海藻糖酶基因 5'侧翼区序列比较

短线 (-) 表示缺失, 园点 (·) 表示相同。

Fig 6-1 Comparison on sequences of flanking regions of *trehalase* genes from *Bombyx mori* varieties Su-Ju×Ming-Hu (S) and Tokai×Asahi (T) (GenBank D861212) and *B. mandarina* ZJ strain (M)

The short bars (-) mean lack of bases and dots (·) represent the same base as above.

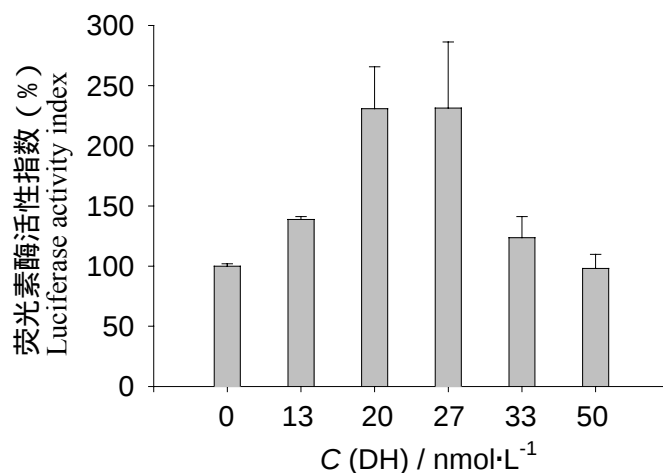


图 6-2 家蚕滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调控作用

X 轴为滞育激素 (DH) 浓度, Y 轴为荧光素酶活性指数 (%)。图中显示在各 DH 浓度下荧光素酶活性与对照 (100%) 的相对值, 线段表示标准差(S.D.)。

Fig. 6-2 Regulation of diapause hormone on the promoter activity of *trehalase* from *Bombyx mori*. Concentrations of the diapause hormone (DH) are showed on the X-axis (nmol·L⁻¹). Luciferase activity indexes of reporter plasmid pSK-*BmTre-luc* expressed in Bm5 cells are indicated on the Y-axis. The data showed the average luciferase activities of three separate treatments relative to the control (DH=0) serving as 100%. The bar indicates the standard deviation from three separate treatments of each concentration.

6.3 小结

本试验所用的家蚕苏·菊×明·虎、野桑蚕海藻糖酶基因启动子为其 5' 侧翼区涵盖第一外显子和启动子区的片段 (赵巧玲等, 2003), 其中的启动子区各有 2 个潜在的 TATA 盒和 2 个潜在的 GATA 基序 (Zhu *et al.*, 1995; Fang *et al.*, 2001)。以 pGEM-3Z 为载体, 分别构建家蚕苏·菊×明·虎、野桑蚕海藻糖酶基因启动子控制的荧光素酶基因报告质粒, 利用昆虫细胞瞬时表达系统进行了启动子特性分析, 并对家蚕滞育激素对海藻糖酶基因启动子转录活性的调节作用进行了初步研究。

家蚕和野桑蚕海藻糖酶基因启动子, 在异源的 Sf21 细胞系中的转录活性非常相近且都很低。家蚕海藻糖酶基因启动子在同源的源自家蚕卵巢的 Bm5 细胞系中的转录活性明显高于其在异源的源自秋粘虫胚胎的 Sf21 细胞系中的转录活性, 或许可归咎于来源于秋粘虫胚胎的 Sf21 细胞环境 (CONTEXT) 更不适于表达海藻糖酶基因。而野桑蚕海藻糖酶基因启动子的转录活性在 Bm5 细胞中仍然很低, 这可能是由于野桑蚕海藻糖酶基因启动子核苷酸序列与家蚕之间仍

存在着一定的差异(同源性 94.2%),即对于野桑蚕海藻糖酶基因启动子来说,Bm5 细胞仍属异源细胞。

家蚕是典型的以卵滞育的昆虫。家蚕卵的滞育与否,首先是由遗传决定的。一化性家蚕所有世代都滞育,而二化性家蚕通过对所处环境的应答决定滞育性,多化性家蚕完全不滞育(吕鸿声,1958;黄君霆,2003)。家蚕滞育激素是由 24 个氨基酸组成的酰胺肽,它的 C-端有一个 FGPR_L-NH₂ 的 5-肽酰胺结构,这是滞育激素的生物活性部位(Xu *et al.*, 1995; Imai *et al.*, 1998)。家蚕卵巢是家蚕 DH 的靶器官。在家蚕体内由咽下神经节的神经分泌细胞合成的 DH,通过心侧体、咽侧体释放到血淋巴中,诱导卵巢中海藻糖酶基因的表达,从而导致蚕卵的滞育(Su *et al.*, 1997; Yamashita, 1996; 徐卫华等, 1998)。

在 Bm5 细胞中,滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子调控作用并呈现剂量效应,在 DH 浓度 13-33 nmol/L 范围内都有显著的增强调节作用,其中以 20-27 nmol/L 增强作用最大,使海藻糖酶基因启动子转录活性增加约 1.3 倍;当 DH 浓度上升到 50 nmol/L 时,调节作用不明显。表明适当浓度的滞育激素可能主要通过增加海藻糖酶基因的转录而提高其表达量。

在蚕体内海藻糖酶的表达量是较高的,而总体来说家蚕和野蚕海藻糖酶基因启动子活性在卵巢来源的家蚕 Bm5 细胞和胚子来源的 Sf21 细胞中表达活性均不高,可能缘于某些反式因子在继代培养细胞系中缺失或除滞育激素外还有一些血液因子诱导海藻糖酶基因启动子的表达,有待于进一步研究。

第七章 结论与讨论

杆状病毒 *egt* 基因最早是从 AcMNPV 中鉴定出来 (O'Reilly & Miller, 1989), 至今已经对许多种杆状病毒如 LdMNPV (Riegel *et al.*, 1994), SpliMNPV (Faktor *et al.*, 1995; Toister-Achituv & Faktor, 1997), MabNPV (Clarke *et al.*, 1996), HearNPV (Chen *et al.*, 1997), BusuNPV (Hu *et al.*, 1997), EppoNPV (Caradoc-Davies *et al.*, 2001) 等的 *egt* 基因特性进行了分析。一般认为杆状病毒 *egt* 基因源自于其昆虫宿主。在 *Drosophila melanogaster*、*Manduca sexta* 和家蚕等昆虫中存在着一类与病毒 *egt* 基因有同源性的尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶基因 (*ugt*) (Ahmad and Hopkins, 1993; Rausell *et al.*, 1997; Luque *et al.*, 2002)。家蚕 *ugt1* 基因编码的 BmUGT1 分布于 5 龄家蚕幼虫的许多组织细胞中, 虽然 BmUGT1 不能以蜕皮激素 (ecdysone) 为转移反应的底物, 但它可以催化酚醛、苯酚和苯酚衍生物等的糖基化 (Luque *et al.*, 2002)。

7.1 BmNPV 和 AcMNPV *egt* 基因启动子特性

7.1.1 杆状病毒 *egt* 基因启动子序列的比较

从 BmNPV ZJ-8 株基因组中克隆的 *egt* 基因启动子序列分析表明, BmNPV *egt* 基因翻译起始位点 ATG 上游 -89 ~ -81 nt 有一与 AcMNPV 完全相同的潜在的顺式调控元件 ATTGTGTTA 序列, -71 ~ -64 nt 处有一 TATA 盒, 在 -27 ~ -24 nt 和 -22 ~ -19 nt 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 (季平等, 2000)。

AcMNPV *egt* 基因位于基因组 DNA 第 11 426 ~ 12 946 nt, 起始密码 ATG 符合 Kozak 规则, 上游有加帽位点基序, 转录产物存在信号肽基序。其 *egt* 基因由 506 个密码子构成, 编码 57.01 kD 的碱性蛋白 (等电点 Ph 9.83)。ATG 上游 -43 核苷酸为转录起始位点, 而转录起始位点上游 -29 ~ -25 核苷酸为 TATA 盒, -47 ~ -39 bp 处有一顺式调控元件 ATTGTGTTA 序列。

对杆状病毒 AcMNPV、SpliMNPV、CfMNPV、CfDEFMNPV、MbMNPV 和 OpMNPV 等的 *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 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 ~ 67 bp (M. Toister-Achituv & Faktor, 1997) (图 7-1)。这些 CAGT 基序为杆状病毒基因的转录起始元件 (Steven *et al.*, 2001)。

7.1.2 BmNPV 和 AcMNPV *egt* 基因启动子需要病毒因子的反式激活

杆状病毒极早期基因 *ie-1* 具有与真核生物相似的启动子元件, 在病毒感染宿主后借助宿主细胞的转录翻译系统就能表达而不需相关病毒因子的参与, 其产物 IE-1 能反式调节迟早期、晚期、晚晚期基因的表达 (Kovacs, *et al.*, 1992)。

IE-1 能够极大地促进 AcMNPV *egt* 基因启动子的活性 (Toister-Achituv and Faktor, 1997)。本实验以 *luc* 为报告基因分析了 BmNPV *egt* 基因启动子的特性, 发现在无病毒感染时, 其控制

转录的报告基因不被表达；当在报告质粒转染后用野生型病毒感染细胞或家蚕幼虫，即可在细胞抽提物中检测到报告基因的表达，说明其转录活性需要病毒因子的反式激活。而 BmNPV 是 AcMNPV 近缘种(van Regenmortel *et al.*, 2000) 两者 *egt* 基因启动子的同源性达到 95.6%(5.2.1)，因此，推测激活 BmNPV *egt* 基因启动子的可能也是 IE-1。

```

BmNPV   TCTATTGTGTTAATTTTGGT[TATA]AAAAAGTTGCCCTTTAAATTTGTTACATAACCAAATTACCAGTACAGTTATTCGGGTGAAGCAAAAAATG
AcMNPV   CGATTGTGTTAATTTTGGC[TATA]AAAAGGTCACCCCTTTAAATTTGTTACATAATCAAATTACCAGTACAGTTATTCGGTTTGAAGCAAAAAATG
CfMNPV   GGCCCCATTGAGAGCAACA[TAAA]AACGAGGTCAGAGCTGCAATCGATCACACTGCTCAGTGCAGTTCGCAATTGCAATG
CfDMNPV   ACGGCGCCATGTAGGGCGTC[TATA]AAAACGGGGTCACGGCTACTAACTGCACACACTGTTTAAAGAGCACAGCACTTAACTGCAGTACAATG
LdMNPV   CTCGCGAGCGCGTGGCCTA[TATA]AATATGGGACGCGCGTCCGCTTCACTCGTCGACGATTGACTCGCCGGAACGACACCATG
OpMNPV   ACGGCGCCATCGGCGGCTGC[TATA]AAAAACGGGCGAGGCCGTAGGGGCACACACTCTTGATTCCCAAACAATTGCAATG
SpliMNPV  TGCACACGGTGACACATT[TATA]AATGGGACACGTATCCGTGTCGCCACACAGCATCGTCGTCGTCATCATCATG

```

图 7-1 数种杆状病毒 *egt* 基因翻译起始位点上游部分序列的比较

BmNPV、AcMNPV *egt* 基因启动子本文作者克隆；CfMNPV、CfDMNPV、LdMNPV、OpMNPV 和 SpliMNPV *egt* 基因启动子序列引自 GenBank。□表示 TATA 盒，下划线表示 CAGT 基序。

Fig.7-1 Comparison of sequences upstream translation initiation site of *egt* genes from several baculoviruses

BmNPV and AcMNPV *egt* promoters were cloned by the author. The *egt* promoters of CfMNPV, CfDMNPV, LdMNPV, OpMNPV and SpliMNPV were from GenBank.

The □ show TATA boxes and the under lines mean CAGT motifs.

7.1.3 BmNPV 和 AcMNPV *egt* 基因启动子转录时间晚

以 AcMNPV 为代表的杆状病毒极早期基因，其表达不受蛋白质合成抑制剂放线菌酮（cycloheximide）的影响，即不依赖其它病毒因子的作用，其表达大致在病毒感染后 0-6 h（Slavicek, 1991; Becker & Knebel-Morsdorf, 1993; Krappa *et al.*, 1995; Riegel & Slavicek, 1997; Durantel *et al.*, 1998）。一般认为 AcMNPV *egt* 基因是早期基因，其转录不受蛋白质合成抑制剂放线菌酮（cycloheximide）和 DNA 合成抑制剂 aphidicolin 的影响（O'Reilly and Miller, 1990），在其转录起始位点上游-29 ~ -25 nt 有一 TATA 盒；转录起始位点上游-47 ~ -39 有一类似于其他病毒早期基因 a/ctcGTGTnct 基序的 ATTGTGTA 序列（Tomalski *et al.*, 1988; Nissen & Friesen, 1989）。但用 *cat* (chloramphenicol acetyltransferase) 为报告基因，采用薄板层析法研究 SpliMNPV 和 AcMNPV *egt* 基因启动子转录特性，表明病毒极早期基因 *ie-1* 表达产物 IE-1 极大地促进 AcMNPV 和 SpliMNPV *egt* 基因启动子的活性，而报告质粒单独转染时 CAT 的活力不能被检测到或非常低。SpliMNPV 感染细胞后 3 h 在培养基中检测到了 EGT 酶的活性，但是 *egt* 基因的转录本 mRNA 在病毒感染后 8 h 才检测到，这种时相差异被认为是检测方法的灵敏度不同所致（Toister-Achituv and Faktor, 1997）。

本实验结果显示，BmNPV *egt* 基因启动子不仅需要病毒因子的反式作用，而且其控制的报告基因的转录时间较晚，一直到病毒感染后 24 h 才检测到。对 AcMNPV *egt* 基因启动子的特性

分析,亦得到了相似的结果。由此推测 AcMNPV 和 BmNPV *egt* 基因启动子的转录特性,也许不是早期基因启动子,或者在病毒基因组内主要是从晚期基序进行转录。

7.1.4 ATG 上游-159 ~ -309 bp 存在主要的转录调控顺式元件

对不同长度的 BmNPV、AcMNPV *egt* 基因启动子区段的转录活性比较分析显示,*egt* 基因翻译起始位点 ATG 上游-159 bp 区段具有基本转录活性,说明其中包含了 *egt* 基因启动子的基本元件,如 TATA 盒和 ATGTGTGTTA 基序 (O'Reilly & Miller, 1989)。而 ATG 上游-309 bp 区段的转录活性接近于 ATG 上游-542 bp 区段,并明显高于-159 bp 区段的活性 (4.2.5, 5.5),提示与病毒因子作用的主要转录调控顺式元件可能存在于-159 ~ -309 bp 区段内,但目前尚不清楚具体存在哪些顺式调控元件。

7.2 BmNPV *hr3* 对杆状病毒 *egt* 基因启动子特性的影响

在杆状病毒 BmNPV 和 AcMNPV 基因组中,存在着一些同源重复序列 (*hrs*),它们不仅在病毒 DNA 复制过程中具有复制原点的功能,而且病毒基因转录过程中行使增强子的功能 (Pearson, *et al.*, 1992; Cochran & Faulkner, 1993; Rodems *et al.*, 1993; 张志芳等, 1995; Lu, *et al.*, 1997)。本实验涉及的 *hr3* 来自 BmNPV ZJ-8 株,它含有 3 个重复单位,每个单位含有以 *EcoRI* 位点为核心的 30 bp 不完全回文序列和其两侧 13 bp 茎环结构组成的 72 bp 保守序列 (张志芳等, 1995)。

当在 BmNPV 和 AcMNPV *egt* 基因启动子控制的报告基因下游正向插入 BmNPV *hr3* 序列时,*egt* 基因启动子控制的报告基因的表达量显著增加,*in vivo* 和 *in vitro* 分别增加 100 多倍和 1200-1600 倍 (4.2.4, 5.6),转录时间也略有提前 (从 24 hpi 变为 18 hpi),但是 *egt* 基因启动子的转录特性并未改变,仍然需要病毒因子的反式激活。

7.3 蜕皮激素和保幼激素对杆状病毒 *egt* 基因启动子活性的调节

7.3.1 蜕皮激素的调节作用

昆虫体内的蜕皮激素与保幼激素的平衡控制着昆虫的发育与变态 (Himura *et al.*, 1999),在昆虫的各个发育阶段蜕皮激素的滴度严格控制在特定的水平 (Kiguchi K, *et al.*, 1981; Smith *et al.*, 1985)。同时蜕皮激素又是杆状病毒感染宿主昆虫后产生的 EGT 酶的底物 (O'Reilly & Miller, 1989),当杆状病毒感染昆虫后,EGT 酶使蜕皮激素糖基化而失去生物活性,从而阻碍昆虫的蜕皮与化蛹变态,有利于病毒的复制与繁殖 (O'Reilly, 1997)。

本实验结果显示:在体外条件下,外源昆虫蜕皮激素对 BmNPV 和 AcMNPV *egt* 基因启动子的活性有负调控作用,蜕皮激素对较低浓度的蜕皮激素 (0.5 $\mu\text{g/ml}$) 对 *egt* 基因启动子转录的影响较小,而较高浓度 ($\geq 1.0\mu\text{g/ml}$) 使 *egt* 启动子活性明显下降,可能是较高浓度的底物 (蜕皮激素) 负反馈抑制了 AcMNPV *egt* 基因启动子的活性。

而在家蚕 5 龄幼虫体内,蜕皮激素却表现为正调控作用,每头注射 2.0-8.0 μg 蜕皮激素使 BmNPV 和 AcMNPV *egt* 基因启动子的活性提高数倍。这可能是由于 5 龄前期家蚕幼虫体内的 ecdysone 含量极低,当注射 ecdysone 后体内的蜕皮激素响应元件 (hormone response element) 系统发挥作用,新陈代谢加快,部分基因的转录加强,蛋白质合成加速 (Yao *et al.*, 1993),从而使报告基因的表达量增加。

7.3.2 保幼激素的调节作用

在体外保幼激素类似物 (JHA) 0.5-2.0 $\mu\text{g/ml}$, 都能增强 *egt* 启动子的活性, 但随着 JHA 浓度的升高, 提高幅度呈下降趋势 (图 4-7, 5-6)。保幼激素的主要功能是维持组织器官和细胞的结构与功能, 阻止幼虫的变态和阻止器官及细胞的解离, 从而延长蛋白质的合成时间 (吕鸿声, 1991)。因此, 当相对较低浓度的 JHA 处理时, 荧光素酶活性增加。另一方面, JHA 能够增强 BmNPV 在细胞中的复制 (Zhou *et al.*, 2002a), 当 JHA 达到某一浓度时, 由于复制的病毒增加而一定程度上阻碍了细胞的正常生理, 甚至可能导致部分细胞的解离, 从而部分抵消由于 JHA 作用引起的荧光素酶活性的提高, 出现了增幅下降的现象。在家蚕 5 龄幼虫体内, 用 JHA 涂抹背面和侧面, 在 50-150 $\mu\text{g/ml}$ 范围内都能增强 *egt* 启动子的活性。

7.4 滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子活性的调控

本实验以 *luc* 为报告基因, 对家蚕和野桑蚕海藻糖酶基因启动子的特性及滞育激素对其转录的调控作用进行了分析。

7.4.1 家蚕和野桑蚕海藻糖酶基因启动子的特性

昆虫海藻糖酶基因与哺乳动物、细菌海藻糖酶基因之间存在很高的同源性序列, 即海藻糖酶基因在进化上是比较保守的, 调控其表达的顺式作用元件也比较保守 (Su *et al.*, 1997; 1993)。家蚕海藻糖酶基因是一种非组织特异性表达基因, 可以在卵巢、中肠、马氏管和脂肪体等多种组织中表达, 而且蛹期中肠细胞中海藻糖酶基因转录本 mRNA 的含量约为卵巢细胞的 60 倍 (Su *et al.*, 1994)。因此, 以家蚕、野桑蚕海藻糖酶基因启动子构建的报告质粒, 在家蚕 Bm5 和 Sf21 细胞中都有转录活性。

另一方面, 由于野桑蚕、家蚕海藻糖酶基因启动子核苷酸序列有高度同源性 (94.2%) (赵巧玲等, 2003), 所以它们在异源的 Sf21 细胞系中的转录活性非常相近且都很低。家蚕海藻糖酶基因启动子在同源的源自家蚕卵巢的 Bm5 细胞中的转录活性明显高于其在异源的秋粘虫胚胎的 Sf21 细胞中的转录活性, 而野桑蚕海藻糖酶基因启动子的转录活性在 Bm5 细胞中仍然很低, 这可能是由于野桑蚕海藻糖酶基因启动子核苷酸序列与家蚕之间仍存在着一定的差异, 即对于野桑蚕海藻糖酶基因启动子来说, Bm5 细胞仍属异源细胞。

7.4.2 滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子转录活性的调控

家蚕卵巢是家蚕滞育激素 (DH) 的靶器官。在家蚕体内由咽下神经节的神经分泌细胞合成的 DH, 通过心侧体、咽侧体释放到血淋巴中, 诱导卵巢中海藻糖酶基因的表达, 从而导致蚕卵的滞育 (Su *et al.*, 1997; Yamashita, 1996; 徐卫华等, 1998; 黄君霆, 2003)。本试验中 DH 的作用呈现明显的剂量效应, 即在浓度 13 ~ 33 nmol/L 范围内都有显著的增强调节作用, 其中以 20 ~ 27 nmol/L 增强作用最大, 使海藻糖酶基因启动子转录活性增加约 1.3 倍, 这一 DH 浓度与 Su 等体内试验结果一致。但是, 在体外 DH 对家蚕海藻糖酶基因启动子转录活性的增强作用比在体内条件下低 (Su *et al.*, 1994)。在蚕体内海藻糖酶的表达量是较高的, 而总体来说家蚕和野蚕海藻糖酶基因启动子活性在卵巢来源的家蚕 Bm5 细胞和配子来源的 Sf21 细胞中表达活性均不高, 可能缘于某些反式因子在继代培养细胞系中缺失或除滞育激素外还有一些血液因子诱导海藻糖酶基因启动子的表达, 有待于进一步研究。其原因可能与启动子区段的长度和细胞的特性有关。

上述结果表明源于家蚕卵巢的 Bm5 细胞,可能仍具有家蚕体内卵巢细胞的某些特性,存在与 DH 作用的受体等。因此,当用 DH 处理时,观察到 DH 对家蚕海藻糖酶基因启动子转录活性的影响。如果 Bm 细胞中确实存在 DH 作用的受体,那么将给滞育激素调控的研究提供便利。

综上所述,不论是 BmNPV 还是 AcMNPV *egt* 基因启动子,都有这样一些特点:

- (1) 其转录需要病毒因子的激活,而且在 24 hpi 才能检测到其控制的报告基因的表达。
- (2) BmNPV *hr3* 显著增强 *egt* 基因启动子的转录活性,并使转录时间略有提早,但是仍需要病毒因子的激活。
- (3) ATG 上游-159 bp 区段具有基本转录活性,与病毒因子作用的主要转录调控顺式元件可能存在于-159 ~ -309 bp 区段内。
- (4) 在体外昆虫蜕皮激素对 *egt* 基因启动子的转录活性有负调节作用,在体内蜕皮激素表现为正调节作用;保幼激素在本实验剂量范围内都表现为正调节作用。

家蚕和野桑蚕海藻糖酶基因启动子,在同源和异源昆虫细胞中都有转录活性,即其藻糖酶基因为非组织特异性表达基因。但是,家蚕海藻糖酶基因启动子在同源细胞的活性明显高于其在异源细胞的活性。

在 Bm5 细胞中,滞育激素对家蚕海藻糖酶基因启动子调控作用并呈现剂量效应。由此推测,源于家蚕卵巢的 Bm5 细胞,可能仍具有家蚕体内卵巢细胞的某些特性,存在与 DH 作用的受体等。

参考文献

- 1 储瑞银, 宓怡德, 吕鸿声, 李载平, 吴祥甫. 乙型肝炎病毒表面抗原基因 (pres2-S) 在家蚕培养细胞中的表达. 生物化学和生物物理学报, 1990, 22: 385-389
- 2 黄君霆. 家蚕滞育分子机制的研究. 蚕业科学, 2003, 29: 1-6
- 3 季平, 张志芳, 何家禄, 宓怡德, 吴祥甫. 利用家蚕生产慈姑蛋白酶抑制剂. 蚕业科学, 1995, 21: 223-227
- 4 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
- 5 吕鸿声. 家蚕化性问题的生化遗传学研究: (I) 家蚕化性的内分泌调节机制. 蚕业科学通讯, 1958 (1): 11-12
- 6 吕鸿声. 昆虫病毒与昆虫病毒病, 科学出版社, 北京, 1981 年: 263-265
- 7 吕鸿声. 中国养蚕学. 上海科学技术出版社, 上海, 1991, 155-183, 514-524
- 8 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学. 中国农业科技出版社, 1998 年: 162, 251-258, 611-642
- 9 雷向东, 宓怡德, 吴祥甫, 李载平, 袁中一. 荧光素酶基因在昆虫细胞中的表达. 生物化学与生物物理学报, 1993, 25: 65-69
- 10 雷向东, 宓怡德, 袁中一, 李载平, 吴祥甫. 萤火虫荧光素酶基因在家蚕中的表达. 科学通报, 1994, 39: 847-849
- 11 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: 590-593
- 12 肖庆利, 张志芳, 易永竹, 何家禄, 吴祥甫. 家蚕核多角体病毒解旋酶基因启动子功能区缺失分析. 生物化学与生物物理学报, 2001, 34: 560-564
- 13 徐卫华, 张元琪, 王盈, 等. 昆虫滞育的分子机理— I. 家蚕胚子发育期的温度条件与滞育激素基因表达. 中国科学 C 辑, 1998, 28: 154-159
- 14 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: 75-76
- 15 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
- 16 张志芳. 家蚕核型多角体病毒 DNA 复制机构及重组杆状病毒在蚕体表达外源基因的研究. 中国农业科学院研究生院博士学位论文, 1994
- 17 张志芳, 张颖, 吕鸿声, 李载平, 吴祥甫. 家蚕核型多角体病毒 DNA 复制起始点 *hr3* 的结构与功能. 中国科学 (B 辑), 1995, 25: 949-955
- 18 赵巧玲, 唐顺明, 张志芳, 等. 野桑蚕、家蚕海藻糖酶基因 5' 侧翼区的克隆与序列分析. 中国蚕业, 2003, 24 (4): 91-93
- 19 周亚竟. 昆虫激素与 CTAB 对杆状病毒复制和相关基因启动子的影响. 华东理工大学博士学位论文, 2002
- 20 Ahmad SA, Hopkins TL. β -glucosylation of plant phenolics by phenol β -glucosyltransferase in

- larval tissues of the tobacco hornworm, *Manduca Sexta* (L.). *Insect Biochem Mol Biol*, 1993, 23: 581-589
- 21 Ahrens CH, Russell RL, Funk CJ, Evans JT, Harwood SH and Rohrmann GF. The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology*, 1997, 229: 381-399
- 22 Alexander AG. Studies on trehalase in *Saccharum* spp. leaf and storage tissues. *Plant Cell Physiol*, 1973, 14: 157-168
- 23 Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Ferber ML and Possee RD. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1994, 202: 586-605
- 24 Barnard EC, Brown G and Stow ND. Deletion mutants of the herpes simplex virus type 1 UL8 protein: effect on DNA synthesis and ability to interact with and influence the intracellular localization of the UL5 and UL52 proteins. *Virology*, 1997, 237: 97-106
- 25 Barrett JW, Krell PJ and Arif BM. Characterization, sequencing and phylogeny of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene from two distinct nuclear polyhedrosis viruses isolated from *Choristoneura fumiferana*. *J Gen Virol*, 1995, 76: 2447-2456
- 26 Becker D, Knebel-Morsdorf D. Sequence and temporal appearance of the early transcribed baculovirus gene HE65. *J Virol*, 1993, 67: 5867-5872
- 27 Blinov VM, Gutorov VV, Holodilov NG, *et al.*, Nucleotide sequence of the *Galleria mellonella* nuclear polyhedrosis virus origin of DNA replication. *FEBS Letter*, 1984, 167: 254-258
- 28 Blissard, G. W., P. H. Kogan, R. Wei and G. F. Rohrmann. A synthetic early promoter from a baculovirus: roles of the TATA box and conserved start site CAGT sequence in basal levels of transcription. *Virology*, 1992, 190: 783-793
- 29 Bonning BC, Hirst M, Possee RD and Hammock BD. Further development of a recombinant baculovirus insecticide expressing the enzyme juvenile hormone esterase from *Heliothis virescens*. *Insect Biochem Mol Biol*, 1992, 22: 453-458
- 30 Boose JA, Tifft CJ, Proia RL and Myerowitz R. Synthesis of a human lysosomal enzyme, beta-hexosaminidase B, using the baculovirus expression system. *Protein Expr Purif*, 1991, 2: 228
- 31 Caradoc-Davies KM, Graves S, O'Reilly DR, Evans OP and Ward VK. Identification and *in vivo* characterization of the *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Virus Genes*, 2001, 22: 255-264
- 32 Carbonell LF, Hodge MR, Tomalski MD and Miller LK. Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors. *Gene*, 1988, 73: 409-418
- 33 Chaeychomsri S, Ikeda M and Kobayashi M. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1995, 206: 435-447
- 34 Challberg MD. A method for identifying the viral genes required for herpesvirus DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 9094-9098

- 35 Chen XW, ZH Hu, Johannes A. Jehle, YQ Zhang and Vlak JM. Analysis of the Ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase gene of *Haliothis armigera* single-nucleocapsid baculovirus. *Virus Genes*, 1997, 15: 219-225
- 36 Chen XW, XL Sun, ZH Hu, M Li, O'Reilly DR, Zuidema D and Vlak JM. Genetic engineering of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus as an improved pesticide. *J Invertebr Pathol*, 2000, 76: 140-146
- 37 Clarke EE, Tristem M, Cory JS and O'Reilly DR. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene from *Mamestra brassicae* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol*, 1996, 77: 2865-2871
- 38 Chen XW, IJkel WF, Tarchini R, XL Sun, Sandbrink H, H Wang, Peters S, Zuidema D, Lankhorst RK, Vlak JM and ZH H. The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol*, 2001, 82: 241-257
- 39 Cocharn MA and Faulkner P. Location of homologous DNA sequences interspersed at five regions in AcMNPV genome. *J Virol*, 1993, 45: 961-970
- 40 Crute JJ, Tsurumi T, Zhu LA, Weller SK, Olivo PD, Challberg MD, Mocarski ES and Lehman IR. Herpes simplex virus 1 helicase-primase: a complex of three herpes-encoded gene products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 2186-2189
- 41 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
- 42 Durantel D, Croizier G, Ravallec M, Lopez-Ferber M. Temporal expression of the AcMNPV lef-4 gene and subcellular localization of the protein. *Virology*, 1998, 241: 276-284
- 43 Eldridge RL, Horodyski FM, Morton DB, O'Reilly RD, Truman JW, Riddiford LM AND Miller LK. Expression of an eclosion hormone gene in insect cells using baculovirus vector. *Insect Biochem*, 1991, 21: 341-351
- 44 Eldridge R, O'Reilly DR, Hammock BD and Miller LK. Insecticidal properties of genetically engineered baculoviruses expressing an insect juvenile hormone esterase gene. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 1583-1591
- 45 Evans, OP and O'Reilly DR. Purification and Kinetic analysis of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Biochemical Journal*, 1998, 330: 1265-1270
- 46 Evans OP and O'Reilly DR. Expression and structural characterization of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *J Gen Virol*, 1999, 80: 485-492
- 47 Faktor O, Toister-Achituv M and Kamensky B. Identification and nucleotide sequence of an ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Spodoptera littoralis* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virus Genes*, 1995, 11: 47-52
- 48 Fang R, Olds L C, Santiago N A, *et al.* GATA family transcription factors activate lactase gene promoter in intestinal Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 280: G58-67
- 49 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
- 50 Galand G. Purification and characterization of kidney and intestinal brush-border membrane trehalase from the rabbit. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 789: 10-19
- 51 Gershburg E, Stockholm D, Froy O, Rashi S, Gurevitz M and Chejanovsky N. Baculovirus-mediated expression of a scorpion depressant toxin improves the insecticidal efficacy achieved with excitatory toxins. *FEBS Letter*, 1998, 422: 132-136
- 52 Gomi Sumiko , Kei Majima and Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol*, 1999, 80: 1323-1337
- 53 Gottlieb J and Challberg MD. Interaction of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase and the UL42 accessory protein with a model primer template. *J Virol*, 1994, 68 : 4937-4945
- 54 Gutoerrez C, Ardourel M, Bremer E, Middendorf A, Boos W and Ehmann U. Analysis and DNA sequence of the osmoregulated *treA* gene encoding the periplasmic trehalase of *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet*, 1989, 217:347-354
- 55 Hammock BD, McCutchen BF, Beetham J, Choudary PV, Fowler E, Ichinose R, Ward VK, Vickers JM, Bonning BC and Harshman LG. Development of recombinant viral insecticides by expression of an insect-specific toxin and insect-specific enzyme in nuclear polyhedrosis viruses. *Arch Insect Biochem Physiol* , 1993 , 22 : 315-344
- 56 Hammock BD, Bonning BC, Possee RD, Hanzlik TN and Maeda S. Expression and effects of juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. *Nature*, 1990, 344: 458-461
- 57 Hashimoto Y, Hayakawa T, Ueno Y, Fujita T, Sano Y and Matsumoto T. Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. *Virology* 2000, 275: 358-372
- 58 Hayakawa, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S. I., Goto, C. and Maeda S. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology*, 1999, 262: 277-297
- 59 Hehre EJ, Sawai T, Brewer CF, Nakano M and Kanda T. Trehalase: stereocomplementary hydrolytic and glucosyl transfer reactions with α - and β -glucosyl fluoride. *Biochemistry*, 1982, 21: 3090-3097
- 60 Hey AE and Elbein DA. Partial purification and properties of a trehalase from *Streptomyces hygroscopicus*. *J Bacteriol*, 1968,96:105-110
- 61 Hiruma K, Shinoda T, Malone F, Riddiford LM. Juvenile hormone modulates 20-hydroxyecdysone-inducible ecdysone receptor and ultraspiracle gene expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Genes Evol*, 1999, 209: 18-30
- 62 Hu ZH, Broer R, Westerlaken J, Martens JW, Jin F, Jehle JA, Wang LM and Vlak JM. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of a single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Buzura suppressaria*. *Virus Res*, 1997, 47: 91-97
- 63 Huston DH and Manners DJ. Studies on carbohydrate-metabolizing enzymes: the hydrolysis of α -glucosides, including nigerose by alfalfa and other higher plants. *Biochem J*, 1965, 94: 783-789
- 64 Hyink O, Dellow RA, Olsen MJ, Caradoc-Davies KM, Drake K, Herniou EA, Cory JS, O'Reilly DR, and Ward VK. Whole genome analysis of the *Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus. *J*

- Gen Virol*, 2002, 83 : 957-971
- 65 Idahl L A, Sandstrom PE, Sehlin J. Measurements of serum glucose using the luciferin/luciferase system and a liquid scintillation spectrometer. *Anal Biochem*, 1986, 155: 177-181
- 66 Ikeda M, Su ZH , Saito H , *et al.* Induction of embryonic diapause and stimulation of ovary trehalase activity in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 1993 , 39 : 889-895
- 67 Ijkel WF, van Strien EA, Heldens JG, Broer R, Zuidema D, Goldbach RW and Vlak JM. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J Gen Virol*, 1999, 80: 3289-304
- 68 Imai k, Nomura T, Katsuzaki H, Komiya and Yamashita O. Minumum structure od diapause hormone required for biological activity. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62:1875-1879
- 69 Inceoglu AB, Kamita SG, Hinton AC, Huang Q, Severson TF, Kang K and Hammock BD. Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest Manag Sci*, 2001, 57: 981-987
- 70 Jaenisch R. Transgenic animal. *Science*, 1988, 204: 1468-1474
- 71 Katagiri N, Ando O and Yamashita O. Reduction of glycogen in eggs of silkworm, *Bombyx mori*, by use a trehalase inhibitor, trehazolin, and diapause induction in glycogen-reduced eggs. *J Insect Physiol*, 1998, 44:1205-1212
- 72 Kelley TJ, Masler EP, 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
- 73 Kiguchi K and Agui N. Ecdysteroid levels and developmental events during larval molting in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol*, 1981, 27: 805-812
- 74 Kiguchi K. Ecdysteroid level and developmental events of larval molting in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect*, 1986, 23:242-247
- 75 Kondo A and Maeda S. Host range expansion by recombination of the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol*, 1991, 65: 3625-3632
- 76 Kool M, Ahrens CH, Goldbach RW, Rohrmann GF and Vlak JM. Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 11212-11216
- 77 Kool M, Voeten JT, Goldbach RW, Tramper J and Vlak JM. Identification of seven putative origins of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus DNA replication. *J Gen Virol*, 1993, 74: 2661-2668
- 78 Kuzio J, Pearson MN, Harwood SH, Funk CJ, Evans JT, Slavicek JM and Rohrmann GF. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology*, 1999, 253: 17-34
- 79 Kovach MJ, Carlson JO and Beaty BJ. A *Drosophila* metallothionein promoter is inducible in mosquito cells. *Insect Mol Biol*, 1992, 1: 37-43

- 80 Krappa R, Roncarati R, Knebel-Morsdorf D. Expression of PE38 and IE2, viral members of the C3HC4 finger family, during baculovirus infection: PE38 and IE2 localize to distinct nuclear regions. *J Virol*, 1995, 69: 5287-5293
- 81 Li Q, Donly C, L Li, Willis LG, Theilmann DA and Erlandson M. Sequence and organization of the *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus genome. *Virology*, 2002 , 294 : 106-121
- 82 Liu G and Carstens EB. Site-directed mutagenesis of the AcMNPV *p143* gene: effects on baculovirus DNA replication. *Virology*, 1999, 253: 125-136
- 83 Lohman TM. Helicase-catalyzed DNA unwinding. *J Biol Chem*, 1993, 268: 2269-2272
- 84 Lu A and Carstens EB. Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1991, 181: 336-347
- 85 Lu A and Carstens EB. Immediate-early baculovirus genes transactivate the *p143* gene promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1993 , 195: 710-718
- 86 Lu A and Miller LK. The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication. *J Virol*, 1995, 69 : 975-982
- 87 Luckow VA and Summers MD. Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* polyhedrosis virus expression vectors. *Virology*, 1988, 167: 56-71
- 88 Lu ML, Farrell PJ, Johnson R, Iatrou K. A baculovirus (*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus) repeat element functions as a powerful constitutive enhancer in transfected insect cells. *J Biol Chem*, 1997, 272: 30724-30728
- 89 Luque T, Finch R, Crook N, O'Reilly DR, Winstanley D. The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. *J Gen Virol*, 2001, 82: 2531-2547
- 90 Luque T, Okano K, O'Reilly DR. Characterization of a novel silkworm (*Bombyx mori*) phenol UDP-glucosyltransferase. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 819-825
- 91 Maeda S, Kawai T, Obinata M, Fujiwara H, Horiuchi T, Sacki Y, Sato Y and Furusawa M. Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*, 1985, 315: 592-594
- 92 Maeda S. Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. *Biophys Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 165: 1177-1183
- 93 Maeda S and Majima K. Molecular cloning and physical mapping of the genome of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol*, 1990, 71: 1851-1855
- 94 Manzan MA, Lozano ME, Sciocco-Cap A, Ghiringhelli PD, and Romanowski V. Identification and characterization of the ecdysteroid UDP-glycosyltransferase gene of *Epinotia aporema* granulovirus. *Virus Genes*, 2002 , 24: 119-30
- 95 Marsden HS, McLean GW, Barnard EC, Francis GJ, MacEachran K, Murphy M, McVey G, Cross A, Abbotts AP, Stow ND. The catalytic subunit of the DNA polymerase of herpes simplex virus type 1 interacts specifically with the C terminus of the UL8 component of the viral helicase-primase complex. *J Virol*, 1997, 71: 6390-6397
- 96 Merryweather AT, Weyer U, Harris MP, Hirst M, Booth T and Possee RD. Construction of

- genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 delta endotoxin. *J Gen Virol*, 1990, 71: 1535-1544
- 97 Miller J. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1972
- 98 Miller LK. Baculovirus as gene expression vectors. *Ann Rev Microbiol*, 1988, 42: 177-199
- 99 Nakano M, Sumi Y and Miyakawa M. Purification and properties of trehalase from rat intestine. *J Biochem*, 1977, 81: 101-1049
- 100 Nissen MS, Friesen PD. Molecular analysis of the transcriptional regulatory region of an early baculovirus gene. *J Virol*, 1989, 63: 493-503
- 101 No D, Yao TP and Evans RM. Ecdysone-induced gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Natl Acad USA*, 1996, 93: 3346-3351
- 102 O'Reilly DR and Miller LK. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Science*, 1989, 245: 1110-1112
- 103 O'Reilly DR and Miller LK. Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene. *J Virol*, 1990, 64: 1321-1328
- 104 O'Reilly DR, Howarth OW, Rees HH and Miller LK. Structure of the ecdysone glucoside formed by a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Insect Biochem*, 1991a, 21: 795-801
- 105 O'Reilly DR and Miller LK. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene. *Biotechnology*, 1991b, 9: 1086-1089
- 106 O'Reilly DR, Browns MR and 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
- 107 O'Reilly DR. Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyltransferase. *Insect Biochem Mol Biol*, 1995, 26: 541-550.
- 108 O'Reilly DR. Auxiliary genes of baculoviruses. In Miller LK: The Baculoviruses. Chapter 11. New York, Plenum Press, 1997, pp. 286-295
- 109 Park EJ, Burand JP, Yin CM. The effect of baculovirus infection on ecdysteroid titer in gypsy moth larvae. *J Insect Physiol*, 1993, 39: 791-796
- 110 Pearson M, Bjornson R, Pearson G, and Rohrmann G. The *Autographa californica* baculovirus genome: evidence for multiple replication origins. *Science*, 1992, 257:1382-1384
- 111 Perk EJ, Yin CM and Burand JP. Baculovirus replication alters hormone-regulated host development. *J Gen Virol*, 1996, 77: 547-554
- 112 Rausell C, Llorca J, Real MD. Separation by FOLC chromatofocusing of UDP-glucosyltransferase from three developmental stages of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem Physiol*, 1997, 34: 347-358
- 113 Riegel CI, Lanner-Herrera C, Slavicek JM. Identification and characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of the *Lymantria dispar* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol*, 1994, 75: 829-838

- 114 Riegel CI, Slavicek JM. Characterization of the replication cycle of the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. *Virus Res*, 1997, 51: 9-17
- 115 Rodrigues JC, De Souza ML, O'Reilly D, Velloso LM, Pinedo FJ, Razuck FB, Ribeiro B and Ribeiro BM. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes*, 2001, 22: 103-112
- 116 Rodems SM and Friesen PD. The hr5 transcriptional enhancer stimulates early expression from the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome but is not required for virus replication. *J Virol*, 1993, 67: 5776-5785
- 117 Ruf J, Wacker H, James P, Maffia M, Seiler PG, von Kieckebusch A, Semenza G and Mantei N. Rabbit small intestinal trehalase: purification, cDNA cloning, expression and verification of glycosylphosphatidylinositol anchoring. *J Biol Chem*, 1990, 265: 15034-15039
- 118 Sacktor B. Trehalase and transport of glucose in the mammalian kidney and intestine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1968, 60: 1007-1014
- 119 Saito S. Trehalase of Silkworm, *Bombyx mori*: purification and properties of the enzyme. *J Biochem*, 1960, 48: 101-109
- 120 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 121 Schaltman K and Pong O. Identification and characterization of ecdysterone receptor in *Drosophila melanogaster*. *Proc Acad Natl Sci USA*, 1982, 79: 6-10
- 122 Shikata M, Shibata 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-target insect, the silkworm, *Bombyx mori* (*Lepidoptera, Bombycidae*). *J Gen Virol*, 1998, 79: 1547-1551
- 123 Slavicek JM. Temporal analysis and spatial mapping of *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus transcripts and in vitro translation polypeptides. *Virus Res*. 1991, 20: 223-236
- 124 Slavicek JM, Popham HJR and Riegel CI. Deletion of the *Lymantria dispar* multicapsid nucleopolyhedrovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene enhances viral killing speed in the last instar of the gypsy moth. *Biol Control*, 1999, 16: 91-103
- 125 Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta-interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol*, 1983, 3: 2156-2165
- 126 Smith I and Goodale C. Sequence and in vivo transcription of *Lacanobia oleracea* granulovirus *egt*. *J Gen Virol*, 1998, 79: 405-413
- 127 Smith SL. Regulation of ecdysteroid titer synthesis. In: Kerkut GA, Gilbert LL (eds). Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology. Oxford Pergamon Press. 1985, 7: 295-341
- 128 Steven SP and Paul DF. The CAGT motif functions as an initiator element during early transcription of the baculovirus transregulator *ie-1*. *J Virol*, 1995, 69: 3575-3583
- 129 Su ZH, Sato Y, Yamashita O. Purification, cDNA cloning and Northern blot analysis of trehalase

- of pupal midgut of silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1173 : 217-224
- 130 Su ZH, Ikeda M, Sato Y, *et al*. Structure of trehalase gene of the silkworm, *Bombyx mori* and phylogenic relationship of trehalases. *J Seric Sci Jpn*, 1997, 66 (6) : 457-464
- 131 Su ZH, Ikeda M, Sato Y, *et al*. Molecular characterization of ovary trehalase of silkworm, *Bombyx mori* and transcriptional activation by diapause hormone. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1218:366-374
- 132 Summers MD and Smith GE: A manual of methods for baculovirusvectors and insect cell culture procedures. *Texas Agri. Experi. Station Bull*. 1987, 1555: 10-18, 38-46
- 133 Sun X, Chen X, Zhang Z, Wang H, Bianchi FJ, Peng H, Vlak JM and Hu Z. Bollworm responses to release of genetically modified *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedroviruses in cotton. *J Invertebr Pathol*, 2002, 81:63-69
- 134 Talbot BG and Huber RE. Partial purification, stabilization and characterization of adult honey bee midgut trehalase and a new trehalase specific disc gel stain method. *Insect Biochem*, 1975, 5: 337-347
- 135 Tang SM, Yi YZ, Shen XJ, *et al*. Functional analysis of the larval serum protein gene promoter from silkworm, *Bombyx mori*. *Chin Sci Bull*, 2003 , 48 : 2611-2615
- 136 Thiem SM and Miller LK. Identification, sequence and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol*, 1989, 63: 4489-4497
- 137 Toister-Achituv M and Faktor O. Transcriptional analysis and promoter activity of the *Spodoptera littoralis* multicapsid nucleopolyhedrovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene. *J Virol*, 1997 , 78: 487-491
- 138 Tomalski MD, Wu JG and Miller LK. The location, sequence, transcription, and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene. *Virology*, 1988, 167 : 591-600
- 139 Treacy MF, All JN and Ghidu GM. Effect of ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene deletion on efficacy of a baculovirus against *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol*, 1997 , 90 : 1207-1214
- 140 Van Regenmortel HV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens E, Estes MK, Lemon S, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR and R Wickner (ed), *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy*. Academy Press, Inc., San Diego, Calif.
- 141 Vijayakumar P, Ross W and Reese T. α , α -Trehalase of *Trichoderma reesei*. *Can J Microbiol*, 1978, 24:1280-1283
- 142 Wang XZ, Ooi BG and Miller LK. Baculovirus vectors for multiple gene expression and for occluded virus production. *Gene*, 1991, 100: 131-137
- 143 Williams DR, Chen JH, Fisher MJ, Rees HH. Ecdysteroid inactivation in response to elevated levels of 20-hydroxyecdysone or an agonist, RH 5849 in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Biochem Soc Trans* , 1996 , 24 : 438S

- 144 Xu WH, Sato Y, Ikeda M, Yamashita O. Molecular characterization of the gene encoding the precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide (DH-PBAN) of the silkworm, *Bombyx mori* and its distribution in some insects. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1261: 83-89
- 145 Yamashita O, Hasegawa K, Seki M. Effect of the diapause hormone on trehalase activity in pupal ovaries of the silkworm, *Bombyx mori* L. *Gen Comp Endocrinol*, 1972, 18: 515-523
- 146 Yamashita O. Diapause hormone of silkworm, *Bombyx mori*: structure, expression and function. *J Insect Physiol*, 1996, 42: 669-679
- 147 Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, Mckeown, Cherbas P and Evans RM. Functional ecdysone receptor is the product of *EcR* and *ultraspiracle* genes. *Nature*, 1993, 366: 476-479
- 148 Zhang ZF, JL He, NM Zhou, G Hua, XF Wu. Replication of AcNPV and foreign gene expression of recombinant Ac NPV in silkworm pupa. *Acta Sericologica Sinica*, 1993, 19: 203-207
- 149 Zhu Q, Dabi T, Lamb C. TATA box and initiator functions in the accurate transcription of a plant minimal promoter in vitro. *Plant Cell*, 1995, 7: 1681-1689
- 150 Zhou YJ, YZ Yi, QL Xiao, ZF Zhang, JL He and YX Zhang. Effects of insect hormones on the replication of nucleopolyhedrovirus. *Int J Indus Entomol*, 2002a, 4: 137-141
- 151 Zhou YJ, Xiao QL, Zhang ZF, He JL, Zhang XY. Foreign insect hormone stimulating the transcription of the *ie-1* promoter of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus *in vivo* and *in vitro*. *Biosci Biotech Biochem*, 2002b, 66:1488-1494
- 152 Zhou YJ, Yi Y Z, Zhang Z F, JL He and YX Zhang. Cetyltriethylammonium bromide stimulating transcription of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus *gp64* gene promoter mediated by viral factors. *Cytotechnology*, 41, 2003a: 37-44
- 153 Zhou, YJ, YZ Yi, ZF Zhang, JL He, YX Zhang and XF Wu. Promoter activities in the baculovirus envelope glycoprotein *gp64* gene. *Acta Biochim. Biophys Sin*, 2003b, 35: 18-26

致 谢

本研究内容由国家自然科学基金项目（编号：30271007）资助。

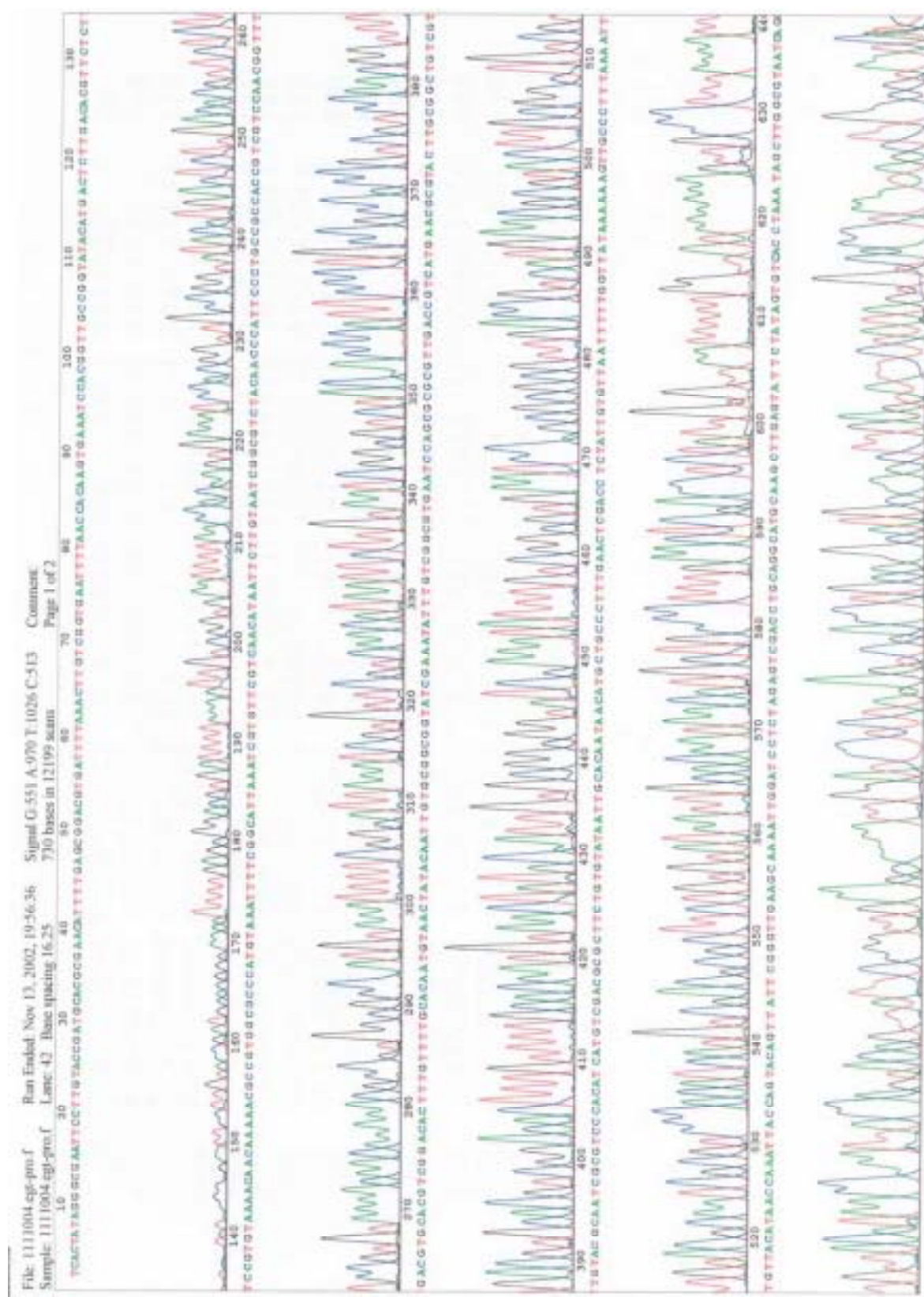
本论文是在指导老师李奕仁研究员和张志芳博士的悉心指导下完成的。二位导师在我学位论文的选题、实验方案的设计，到实验操作和论文撰写，倾注了大量的心血。对此，谨向导师表示衷心的感谢。

实验期间，农业部家蚕生物技术重点实验室为我提供了良好的实验条件和技术指导。易永竹老师及时提供昆虫培养细胞，保证了实验的顺利进行；何家禄研究员对实验给予了大力支持和指导；杜厚琴女士做了大量辅助工作；实验室唐顺明博士、周亚竟博士、陈寅博士、林旭爱博士、肖庆利博士和李爱玲女士、余招峰先生、黄海青先生和周庆祥先生等，在实验中给予了很多帮助。农业部蚕桑产品质检中心为我三年的学习创造了机会，叶夏裕研究员、李桂芳女士、陈涛先生、汪萍女士和其他同事们，给予了理解和工作上的支持。蚕研所领导，科研处张健处长给予极大的关心和支持；吴金美博士、桂仲争博士、汪生鹏博士、魏幼平研究员、陈锡潮研究员、胡丹明女士和方璦女士提供了诸多帮助。中国科技大学张天翼博士提供部分实验指导。马雅琴、王睿辉等同学提供部分参考资料。研究生院的老师们在学习期间给予了极大的关心和指导。在这里，对来自各方面的指导和帮助，一并表示诚挚的谢意。

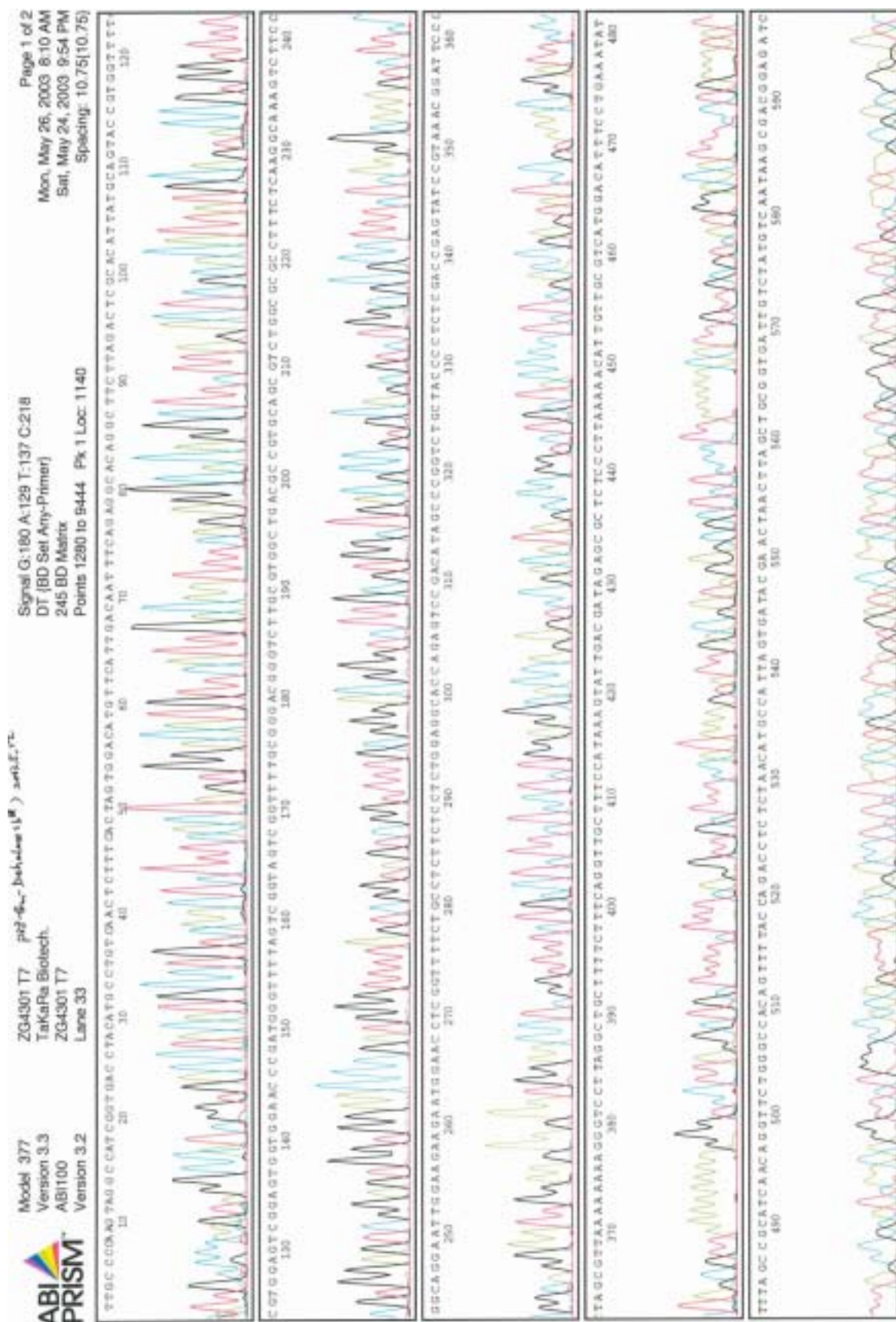
感谢中国科学院生物化学与细胞生物学研究所吴祥甫先生、中国科技大学徐卫华教授、尊敬的老所长吕鸿声先生和钱纪放老师，以及浙江大学徐孟奎教授等给予的支持和关心。

特别要感谢我的家人，是他们的理解与支持让我有了学习的决心和信心，并顺利完成了学业。

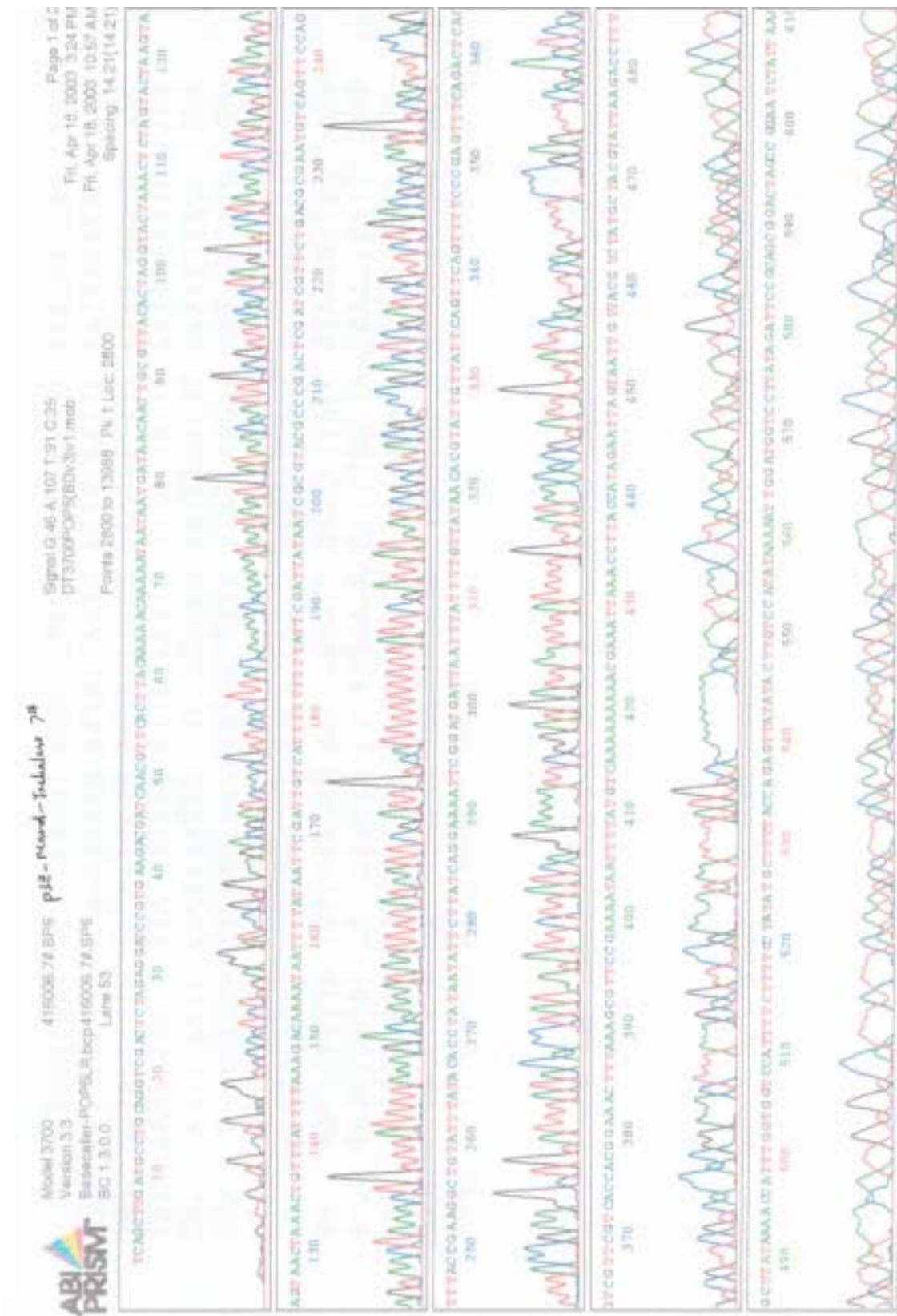
沈兴家
2004年6月于镇江

附录2 AcMNPV *egt* 启动子测序图





附录 4 Bombyx mandarina trehalase 5' 侧翼区测序图-1





附录 5 攻读博士期间发表论文

- 1、**Xing-Jia Shen**, Yong-Zhu Yi, Shun-Ming Tang, Zhi-Fang Zhang , Yi-Ren Li, Jia-Lu He. The Ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase Gene Promoter from *Autographa californica* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus. *Zeitschrift fur Naturforschung C* (德国, SCI 收录, 已录用)
- 2、**Xing-Jia Shen**, Yong-Zhu Yi, Shun-Ming Tang, Zhi-Fang Zhang , Yi-Ren Li, Jia-Lu He, Xiang-Fu Wu . Characterization of Ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase Gene Promoter from *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus. *International Journal of Industrial Entomology* (韩国, 已录用)
- 3、**沈兴家**, 唐顺明, 易咏竹, 赵巧玲, 张志芳, 李奕仁, 何家禄. 家蚕、野桑蚕海藻糖酶基因启动子的特性及其滞育激素的转录调节. *蚕业科学*, 2004, 30 (2): 147 ~ 150
- 4、**Xing-Jia Shen** ,Qiao-Ling Zhao ,Zhi-Fang Zhang ,Yi-Ren Li and Jia-Lu He. Cytochrome Subunit b and NADH Oxido- reductase Subunit I Genes of Mitochondrial Genome from the Eri Silkworm, *Samia cynthia ricini* and Phylogenetic Analysis. *International Journal of Wild Silkmoth & Silk*, 2003, 8 : 51-56 (日本, 国际野蚕学杂志)
- 5、**沈兴家**, 赵巧玲, 张志芳, 李奕仁, 何家禄, 韦波. 蓖麻蚕线粒体基因组中 *nd1* 及其侧翼 tRNA 基因的克隆与结构分析. *蚕业科学*, 2002, 28 (4): 289 ~ 293
- 6、唐顺明, 易永竹, **沈兴家**, 张志芳, 李奕仁, 何家禄. Functional Analysis of Larvae Serum Protein Gene Promoter from Silkworm, *Bombyx mori*. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48 : 2611-2615 (科学通报, SCI 收录)
- 7、**沈兴家**, 张志芳, 李奕仁. 昆虫杆状病毒 *egt* 基因研究进展. *中国蚕业*, 2004, 25 (2): 4 ~ 7
- 8、张志芳, 朱中泽, **沈兴家**, 郭锡杰, 何家禄. BmNPV *hr3* 亚结构功能及对极早期基因 *ie-1* 启动子的增强作用. 浙江省生物化学与分子生物学学会第八届会员代表大会暨江浙两省省际联合学术交流会 (2002.11.16 宁波) 论文集 : 294 ~ 300
- 9、唐顺明, **沈兴家**, 张志芳, 李奕仁, 何家禄. 野桑蚕、家蚕 LSP 基因 5 ' 侧翼区的克隆与序列分析. *蚕业科学*, 2003, 29 (2): 142 ~ 146
- 10、**沈兴家**, 易永竹, 唐顺明, 张志芳, 李奕仁, 何家禄. Functional Analysis on Promoter Activity of *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase Gene (摘要). 华东六省一市生物化学与分子生物学会—2003 年学术交流会 (2003.8.21-22, 上海) 论文集 : 72
- 11、**沈兴家**, 李奕仁. 我国蚕品种改良的现状. *蚕业科学*, 2001, 27 (增刊): 17 ~ 20
- 12、**沈兴家**, 李奕仁, 唐顺明, 李桂芳, 沈雪华. 春秋兼用耐氟蚕品种华峰_{GW} × 雪 · A 的选配. *蚕业科学*, 2002, 28 (1): 52 ~ 55
- 13、**沈兴家**, 李奕仁, 唐顺明, 李桂芳, 沈建华. 蚕品种国家审定标准及其合理性探讨. *中国蚕业*, 2002, 23 (3): 4 ~ 6
- 14、**沈兴家**, 叶夏裕, 李奕仁, 徐安英, 汪 萍. 我国桑蚕原种质量现状及其国家标准的制订. *中国蚕业*, 2004, 25 (1): 51 ~ 54

- 15、唐顺明,李奕仁,沈兴家,窦永群,李桂芳. 蚕茧、生丝、坯绸中有害物质的检测试验. 中国蚕业, 2001, 22 (3), 72
- 16、赵巧玲,李龙,魏兆军,张志芳,沈兴家. Path Coefficient Analysis on Major Silk Quality Characteristics of the Silkworm, *Bombyx mori* L. *International Journal of Industrial Entomology*, Vol.5, 2002(1), 135-139
- 17、赵巧玲,沈兴家. 蚕种安全检查孵化试验初报. 中国蚕业, 2002, 23 (4): 22 ~ 23
- 18、李奕仁,叶夏裕,沈兴家,许明芬,陶涛,吴钢,余爱群.《桑蚕原种》GB 19179-2003, 国家质量监督检验检疫总局,2003 年 6 月 4 日发布,2003 年 12 月 1 日实施。(标准起草人)
- 19、李奕仁,沈兴家,叶夏裕,徐安英,徐孟奎,潘恒谦,汪萍.《桑蚕原种检验规程》GB/T 19178-2003,国家质量监督检验检疫总局,2003 年 6 月 4 日发布,2003 年 12 月 1 日实施。(标准起草人)
- 20、李爱玲,徐安英,沈兴家,唐顺明,张志芳,潘沈元. 家蚕、野桑蚕线粒体 *Cyt b* 基因片段序列分析及分子进化研究. 蚕业科学, 2004, 30 (1): 80-84
- 21、汪萍,李奕仁,叶夏裕,李桂芳,陈涛,沈兴家,唐顺明. 全国桑蚕一代杂交种质量调查及行业标准实施评价. 蚕业科学, 2004, 30 (1): 95-98

Zeitschrift für Naturforschung
Redaktion

Uhlandstraße 11, D-72072 Tübingen (courier service), Postfach 2645, D-72016 Tübingen (regular mail)
Telefon 07071/31555, Fax 07071/360571
e-mail: znaturforsch.redaktion@t-online.de <http://www.znaturforsch.com>

Ref.-No.: 243/04

Received: May 10, 2004

Authors: X.-J. Shen, Y.-Z. Yi, S.-M. Tang, Z.-F. Zhang, Y.-R. Li, J.-L. He

Title: Characterization of Ecdysteroid UDP-Glucosyltransferase Gene Promoter from
Autographa californica Multicapsid Nucleopolyhedrovirus

Dear authors:

☐ Your paper has been accepted for publication.

☒ Please respond the comments on your paper (see below) and send us a revised version. For comparison please return the 1st version with the referee's remarks (reviewer's copy). We would appreciate receiving your revised paper also as an electronic file (.Doc or .RTF or .TEX or .WP) for more rapid publication.

☐ We decided that your paper should be declined for the following reasons:

This paper reports on properties of promoter fragments of the nucleopolyhedrovirus *egt* gene, the first gene identified in baculovirus. The activation of the luciferase gene was used as a marker to check various constructs with different parts (lengths) of the promoter. The influence of ecdysone was studied in addition.

The paper deals with an interesting topic since baculovirus molecular genetics are important to understand insect development and metabolism. The rather small take-home message is well written but requires condensing and revision of the paper. This is mandatory.

- 1.) This paper is no review and therefore the refs. have to be reduced by 15 at least.
- 2.) The Discussion is rather general and does not essentially deal with your Results. Omit Discussion completely, the Results are sufficient. In essence your paper is a methodological study and should focus on the techniques used.
- 3.) Citations in text by name(s) + year, no nos.
- 4.) Rewrite the reference list according to ZNC. Consult a recent issue.
- 5.) See p. 1 and 2 for corrections.

When resubmitting your revised paper please include the 1st version marked by the reviewer. Furthermore mail an accompanying letter dealing with the comments made, item by item.

The reviewer will check your revised paper again.

May 15, 2004

Bitte einen Bogen ausgefüllt **ohne** Unterschrift zurück



**International Journal of
Industrial Entomology**

Dept. of Sericulture and Entomology
National Institute of Agricultural Science &
Technology, RDA
61 Seodun-dong Kwonseon-gu, Suwon,
441-100 Korea
e-mail: ijekorea@hanmail.net
Tel: +82-31-290-8592. Fax: +82-31-295-2176

25 March 2004

Dr. Zhi-Fang Zhang
Key Laboratory of Silkworm Biotechnology,
Ministry of Agriculture, Sericultural Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences.
Zhenjiang 212018, China.

Dear Dr. Zhi-Fang Zhang,

Thank you for submission of the manuscript entitled "**Characterization of Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase Gene Promoter from *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus**" (MS number: IJIE-04-27, received on 22 February, 2004) for publication in the Journal IJIE. We are pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication. However, two of the referees strongly suggested that the manuscript be revised according to their suggestion marked on the submitted version. For convenience, I have marked their suggestion on one print. Particularly, your MS is highly deviated in style from IJIE (most of the part). For your reference, I have included one previously submitted paper and this paper pretty much followed the style required for submission to IJIE. Please critically follow this example. When I receive your revised manuscript I have to check it again. If the manuscript is not necessary for editorial correction any more, I will send it to the publisher, but if not, I have to send it to you again. The revised, new manuscript can be sent to me through the e-mail address as shown in this letter. Again, thank you for submitting your valuable research result to the IJIE.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Iksoo Kim', written over a horizontal line.

Iksoo Kim, Ph. D.
Managing Editor of IJIE
Researcher

cc: Dr. Byung Rae Jin (Editor-in Chief of IJIE)

作者简历

沈兴家,男,1963年出生,1986年毕业于浙江农业大学蚕桑系,同年分配到中国农业科学院蚕业研究所工作。长期从事家蚕遗传育种和分子生物学等研究。1992年晋升为助理研究员,1999年晋升为副研究员。1997-2000年以同等学历申请硕士学位,2000年获农学硕士学位。2001-2004年在中国农业科学院研究生院攻读博士。1998-2002年担任家蚕品种资源与育种研究室副主任(副处),期间2000-2002年兼任农业部蚕桑产品质量监督检验检测中心(镇江)办公室主任;2002年11月起任农业部蚕桑产品质检中心副主任。

曾先后参加承担国家星火计划、“八五”、“九五”和“十五”国家重点科技攻关项目,国家茧丝绸发展风险基金项目以及多个部省级蚕桑科研项目。“八五”“九五”期间育成限性夏秋用蚕品种“秋·西×夏D”、春秋兼用耐氟蚕品种“华峰_{GW}×雪·A”,并分别于1998、2000年通过国家农作物品种审定。作为主要起草人之一,参加现行《桑蚕原种》等两项国家标准和《桑蚕一代杂交种》等多项农业行业标准的编写。

分子生物学方面,主要涉及绢丝昆虫线粒体基因及其分子进化,家蚕及昆虫杆状病毒等基因的克隆与特性分析,外源基因的体外体内表达,昆虫激素对外源基因的表达调控等研究。

有较好英语水平(读、听、说和写四会)。1993年以来,多次以专家兼英语翻译身份赴国外指导蚕桑生产,圆满完成任务。

1996-2004年共发表学术论文19篇,其中第一作者13篇。

2004年6月