

ADP 的交换, 见图 1 (11) 和 (12), 产生  $[1s][2s]^{2+}$  和  $[1s][2s]^{2d}$ . 随着电子传递的循环往复进行和质子连绵不断的提供, 使底物得到不同程度的还原.

### 参 考 文 献

- 1 Hardy R W F, D' Eustachio A J. *Biochem Biophys Res Commun*, 1964; **15**: 314
- 2 Walker M, Mortenson L E. *Biochem Biophys Res Commun*, 1973; **54**: 669
- 3 Smith B E, Lowe D J, Bray R C. *Biochem J*, 1973; **135**: 331
- 4 Cai Q R, Zhang H B, Lin G D. *Advance in Science of China*, 1987; **2**: 125
- 5 Rees D C, Kim J, Georgiadis M M *et al.* In: Stiefel E I eds. *Molybdenum enzymes, cofactors, and model systems*. Washington DC: American Chemical Society, 1993: 170
- 6 Burris R H. In: Gibson A H eds. *Current perspectives in nitrogen fixation*. Australia: Australian Academy of Science, 1981: 126
- 7 Wolle D, Dean D R, Howard J B. *Science*, 1992; **258**: 992
- 8 Thorneley R N F. In: Gresshoff P M eds. *Nitrogen fixa-*

tion: achievements and objectives. New York: Chapman and Hall, 1990: 103

- 9 Burgess B K. In: Stiefel E I eds. *Molybdenum enzymes, cofactors, and model systems*. Washington DC: American Chemical Society, 1993: 144
- 10 Gavini N, Burgess B K. *J Biol Chem*, 1992; **267**: 21179
- 11 Orme-Johnson W H. *Science*, 1992; **257**: 1639

**The Electron Transport in Nitrogenase.** Huang Jingwei, Zhang Hongtu, Wan Huilin, Cai Qirui (Tsai Kuirui) (*Department of Chemistry, State Key Laboratory for Physical Chemistry of the Solid Surface, Xiamen University, Xiamen 361005, China*).

**Abstract** A modified mechanism of 2-step-ATP-driven electron transport is proposed, it can reasonably explain the change of EPR signal in the two components of nitrogenase when the supply of reductant ( $S_2O_4^{2-}$ ) and MgATP are enough or only one is enough.

**Key words** nitrogenase, ATP-driven, EPR signal, electrontransport

## 昆虫病毒的增强蛋白

胡 薇 黎路林 洪华珠

(华中师范大学昆虫学研究所, 武汉 430070)

**摘要** 在某些昆虫病毒的包涵体中相继发现了增强蛋白. 这类蛋白可以增强核型多角体病毒对昆虫幼虫及体外培养的昆虫细胞的感染力, 缩短杀虫时间, 提高杀虫效率; 还可以增强其他生物杀虫剂 (如: Bt) 的毒力. 关于增强蛋白的作用机制有两种观点: 降解围食膜以利于病毒粒子侵染细胞或直接作用于细胞质膜促进病毒粒子的套膜与之融合. 该蛋白是由病毒编码的, 现已克隆出第一个增强蛋白基因, 该基因含有一个 2703 bp 的开放阅读框, 其核苷酸序列分析业已完成. 增强蛋白的发现有望对病毒杀虫剂的推广产生积极影响.

**关键词** 杆状病毒, 增强蛋白, 增效作用

在研究昆虫病毒感染性时, 人们发现某些颗粒体病毒 (GVs) 含有增强蛋白 (enhancing protein), 可以提高昆虫的敏感性, 加速核型多角体病毒 (NPV) 的感染进程<sup>[1,2]</sup>, 而且这种蛋

白还可以提高其他生物杀虫剂 (如: Bt $\delta$ -内毒素) 的杀虫效率. 近期的研究表明, 不同 GVs

中的增强蛋白间有着密切的联系,并且与我们已知的蛋白质无同源性<sup>[3]</sup>.因此 Corsaro 和 Granados 在 1990 年建议用“enhancins”(增强蛋白)来替代以前对该种蛋白的各种称呼,如“synergistic factors”或“viral enhancing factors”.本文将介绍杆状病毒增强蛋白的发现、特征以及第一个 enhancin 基因的克隆.

## 1 增强蛋白的发现

1959 年, Tanada<sup>[1]</sup>首次从一种美洲粘虫 (*Pseudaletia unipuncta*) 中分离出美洲粘虫核型多角体病毒 (PuNPV) 和美洲粘虫颗粒体病毒 (PuGV). 当用两种病毒同时喂食美洲粘虫的幼虫时,幼虫对 NPV 感染的敏感性增强,死亡率提高了 10 倍以上;进一步实验表明,加热灭活 (80℃, 10 min) 的 PuGV 仍能增加 NPV 的感染,而加热灭活的 PuNPV 则对 PuGV 的毒性没影响.因此, Tanada<sup>[4]</sup>认为这是 PuGV 中的一种增效因子在起作用,并成功地分离到了这种具增效活性的蛋白质,称之为“synergistic factor”.在下文中我们将用 En-Pu 代表这种从 PuGV 中获得的 enhancin.

En-Pu 的活性并不仅限于美洲粘虫,它还可以增强 NPV 在粘虫 (*P. separata*) 和斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 中的感染<sup>[5]</sup>.此外还发现一种粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) GV (TnGV) 能增强 NPV 对粉纹夜蛾幼虫的感染,并从中获得了一种与 En-Pu 很相似的蛋白质 (En-Tn)<sup>[2,6]</sup>.与之类似的还有, Goto<sup>[7]</sup>从一种地老虎 (*Xestia c-nigrum*) 中得到的 GV 可增强 NPV 在该种幼虫中的感染.因此, GV 增强蛋白对 NPV 感染的增强作用是一种相当普遍的现象.

最近,在一种痘病毒 (EPV) 中也发现可促进 NPV 感染的增强蛋白<sup>[8]</sup>,并研究了这种增强蛋白的生物化学特性<sup>[9]</sup>.

## 2 En-Pu

### 2.1 En-Pu 的性质及定位

En-Pu 是一种脂蛋白,由多肽和磷脂构成,

磷脂部分为卵磷脂<sup>[10]</sup>,是其增效作用所必须的;用磷脂酶 C 处理 En-Pu,可使之失去增效活性;此外,En-Pu 能被 2% 的 SDS 缓慢解聚,加入磷脂酶 C 后,解聚速度加快<sup>[4]</sup>.因此, Tanada 等人推测 En-Pu 中的磷脂具有三种功能:a. 作为 En-Pu 多肽之间的连接物;b. 作为增效作用的启动子;c. 保护 En-Pu 多肽在颗粒体被中肠蛋白酶消化时不被破坏<sup>[4]</sup>. En-Pu 的氨基酸成分分析业已完成<sup>[11]</sup>.

对 En-Pu 的分子量已进行了多次测量<sup>[4,11]</sup>.最近, Zhu 等<sup>[12]</sup>用热处理的颗粒体碱解上清液做 SDS-PAGE 只得到一条具增强活性的蛋白带,分子量为 100 000,而用没有经过热处理的颗粒体则可得两条具增强活性的蛋白带,分子量分别为 100 000 和 98 000;因此,他们认为 En-Pu 是以 100 000 的形式存在于颗粒体中,在纯化过程中可降解为 98 000.另外, En-Pu 具有脂酶活性,能促进脂肪酸  $\beta$ -对硝基苯酯的水解<sup>[11]</sup>. 磷脂酶 A<sub>2</sub> 和胰蛋白酶对 En-Pu 的增效活性均无影响,但氯喹对其有抑制作用<sup>[13]</sup>.

En-Pu 定位于 GV 套膜的外围<sup>[12,14]</sup>, Zhu 等<sup>[12]</sup>认为 En-Pu 是套膜的延续,在 GV 的形成过程中,套膜先被 En-Pu 包围,然后才被基质蛋白包涵.

### 2.2 En-Pu 的作用方式

Tanada 等<sup>[4]</sup>用 En-Pu 与 PuNPV 一起喂食幼虫时发现,中肠微绒毛膜的内部与周围,有比仅喂食 PuNPV 时更多的病毒粒子和核衣壳,这说明 En-Pu 的作用位点是在微绒毛的质膜上;此外,利用抗体结合铁蛋白及免疫酶标电镜的观察结果也支持这一观点.有报道<sup>[15]</sup>说在美洲粘虫幼虫的中肠细胞膜上有 En-Pu 的特异性结合位点,而对于不受 En-Pu 影响的家蚕幼虫,其中肠细胞膜上就没有 En-Pu 的特异性结合位点<sup>[5]</sup>.

基于以上这些研究, Tanada 等<sup>[4]</sup>认为在虫体内, En-Pu 是作为一个结合分子起作用的,它可以促进病毒粒子对中肠细胞的吸附以达到增强病毒感染的效果.

### 2.3 En-Pu 在离体细胞系统中的作用

1983 年, Ohba 等<sup>[16]</sup>首次报道了 En-Pu 能增强 NPV 在离体细胞中的感染. 到目前为止, 已经用 9 种不同的鳞翅目昆虫细胞系对 6 种 NPV 的增强作用进行了研究<sup>[3]</sup>. En-Pu 的增效作用随细胞系和病毒的不同而不同. En-Pu 能使 AcMNPV 和 TnNPV 在草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞 (IPLB-SF-21) 中的 TCID<sub>50</sub> 分别提高 50 倍和 100 倍; 同时还发现, En-Pu 对包埋型和非包埋型的 TnNPV 在 SF-21 细胞中的感染都有增效作用, 但对非包埋型的病毒更加有效<sup>[13]</sup>; 值得注意的是, En-Pu 在某些病毒-细胞系统对感染无影响<sup>[13]</sup>, 甚至降低感染<sup>[17]</sup>. 在那些 En-Pu 具增强活性的例子中, 增强作用在达到最大值前与所用的 En-Pu 剂量呈直线关系<sup>[15~17]</sup>.

目前, 有关在离体条件下 En-Pu 增强病毒感染的机制的研究已有以下实验结果: a. En-Pu 在病毒套膜上有一结合位点<sup>[4]</sup>; b. En-Pu 在质膜上有特异性结合位点<sup>[17]</sup>; c. En-Pu 上有两个结合位点, 分别与质膜和套膜病毒粒子结合<sup>[15]</sup>; d. En-Pu 能使几种离体培养的昆虫细胞发生凝集反应, 并可增强 NPV 在这些细胞中的感染<sup>[16]</sup>; e. En-Pu 能增强 NPV 与细胞质膜的融合<sup>[18]</sup>; f. 增强作用的产生并不需要 En-Pu 与 NPV 同时接种细胞<sup>[13, 18]</sup>. 由此产生了两种假设: a. En-Pu 作为细胞与病毒之间的吸附因子起作用<sup>[15]</sup>; b. En-Pu 是与质膜相互作用, 促进膜融合而起增强作用的<sup>[5, 18]</sup>.

在细胞培养中, 杆状病毒进入细胞形成感染有吞饮作用和膜融合两种途径, 它们都是以与细胞表面结合为前提的, 增加吸附就可能导致感染的增强. 因此, 似乎可以认为 En-Pu 首先增加了病毒与细胞膜的吸附, 进而作用于质膜, 促进病毒进入细胞从而增强其对细胞的感染. 目前已有文献报道, 具套膜的病毒粒子与细胞膜的融合是以一种特殊的病毒-膜融合蛋白为中介的, 这也许为我们理解 En-Pu 的作用打开一新的思路.

### 3 En-Tn

如同 En-Pu 增强 PuNPV 感染一样, 人们发现 TnGV 能增加粉纹夜蛾幼虫对几种 NPV 的敏感性. 这种增强作用是 TnGV 中的一种增强蛋白 (En-Tn) 引起的, 该蛋白与 En-Pu 的特性相似<sup>[2]</sup>. 电泳分析表明该蛋白分子量为 101 000<sup>[2]</sup>. En-Tn 对紫外线照射的抗性比病毒粒子大 10 倍, 且对热稳定<sup>[6]</sup>. 用 TnGV 喂食粉纹夜蛾五龄幼虫发现其围食膜被严重损坏, 感染后 0.5 h 到 3 h 内围食膜上的 3 个高分子量蛋白质消失, 而 4 h 后围食膜又恢复原状. 纯化的 En-Tn 可以改变从粉纹夜蛾围食膜上提取的蛋白质的电泳图谱, 这说明 En-Tn 能消化围食膜的某种结构蛋白<sup>[2]</sup>. 有人已经对四种不同的夜蛾的围食膜蛋白进行了分析, 从中都发现 En-Tn 可改变围食膜蛋白的电泳图谱<sup>[3]</sup>. 这暗示着 En-Tn 的增强作用可能与其对围食膜的破坏有关. 对 En-Tn 的检测结果显示其有很强的蛋白水解酶活性<sup>[3]</sup>. En-Tn 的特征及围食膜底物蛋白的验证仍有待明确.

有人用纯化的 En-Tn 和 AcMNPV 协同感染粉纹夜蛾四龄幼虫, 发现其对幼虫致死率的增强作用与所用剂量的对数呈直线关系, 增强的程度与病毒浓度的增加呈平行关系; 此外, En-Tn 明显降低了 AcMNPV LD<sub>50</sub> 和 LD<sub>90</sub> 剂量水平感染幼虫的半存活时间<sup>[6]</sup>. En-Tn 的这些作用既无病毒特异性, 也无宿主特异性<sup>[3]</sup>.

如果 En-Tn 可以降解围食膜这一保护性结构, 那么它就有可能提高那些必须穿透这道屏障的生物杀虫剂的效能. 实验证明, En-Tn 可以增强 Bt 不同变种对几种夜蛾的毒力; 其对 Bt 毒性的增强作用随 Bt 种类和 En-Tn 剂量的不同在 2~7 倍之间变化. 由于 Bt 是应用最广的生物杀虫剂, 因此所有增强其效能的改进都具有潜在的商业意义<sup>[3]</sup>.

### 4 痘病毒中的增强蛋白

Xu 等<sup>[8]</sup>首次报道了一种粘虫 (*P. seperates*) 的痘病毒 (PsEPV) 与 NPV 之间的

增效作用, 并且从 PsEPV 的小球体的碱解上清中分离到一种蛋白质样分子, 可以使 NPV 的  $ID_{50}$  (median infectious dose) 减小到几千分之一. SDS-PAGE 分析显示, 该因子分子量为 38 000, 为均一的糖蛋白, 免疫双向扩散试验表明该因子与 En-Pu 无血清学关系, 但是它们的氨基酸组成却很相似, 酸性氨基酸的含量都很高<sup>[9]</sup>, 其作用机制有待进一步研究.

## 5 增强蛋白基因的克隆

Hashimoto<sup>[19]</sup>已从一种  $\lambda$ gt11 表达文库中克隆出编码 En-Tn 的基因, 并对其进行了序列分析. 该基因序列含有一个 2703 bp 的开放阅读框, 预计编码一分子量为 104 000 的蛋白质; 已证明在距翻译起始位点 -8 nt 至 -4 nt 之间有一杆状病毒晚期基因表达启动子. 已测出的 AA 序列与任何已知的蛋白质都无同源性, 但测出 En-Tn 的氨基酸组成却与 En-Pu 十分相似. 蛋白质印迹中, En-Tn 的抗血清与来源于 PuGV 包涵体的 En-Pu 有交叉反应; PuGV 基因组的 DNA 印迹分析表明, 该病毒含有一个与 En-Tn 基因互补的序列. 基因克隆与序列分析表明, PuGV 基因组中含有一个与 En-Tn 基因类似的 2703 bp 的开放阅读框, 这两者在碱基对水平上的同源性超过 99%, 唯一大的区别是在 +1962 nt 和 +1985 nt 处有一个交互移码 (reciprocal frameshift), 这使得同源性降低到 98%<sup>[3]</sup>. 毫无疑问, 这个 PuGV 基因正是编码 En-Pu 的. 因此, TnGV 和 PuGV 中增强 NPV 感染的蛋白因子几乎是相同的.

## 6 增强蛋白在其他杆状病毒中的分布

有人从 12 种 GVs 和 5 种 NPVs 中分离出包涵体蛋白, 用 En-Tn 的特异性抗血清进行了蛋白质印迹分析, 结果发现除 PuGV 外, 在其他 5 种鳞翅目的 GVs 中也有与 En-Tn 抗血清发生交叉反应的蛋白; 这些病毒包括从盐泽枝灯蛾, 苹果小扁蛾, 棉铃虫, 小菜粉蝶, 旋幽夜蛾得到的 GVs<sup>[3]</sup>. 它们代表着从鳞翅目宿主 4 个科的昆虫中分离出的杆状病毒, 再加上

Goto<sup>[7]</sup>证明的 En-Xc, 在已被检测的 13 个 GVs 中, 有 8 个含有增强蛋白 (>60%)<sup>[3]</sup>. 这表明增强蛋白在 GVs 中的存在相当普遍, 极有可能成为杆状病毒蛋白的一个新类群. 此外, AcMNPV 的包涵体中也可能含有一种蛋白, 它可以使幼虫围食膜中一种 68 000 的蛋白降解, 而且该蛋白与 En-Tn 抗血清无交叉反应, 可能代表着一种完全不同的杆状病毒增强蛋白<sup>[2]</sup>.

## 7 结 语

新的高效生物杀虫剂能很好地替代化学杀虫剂, 昆虫病毒增强蛋白在这方面的应用前景是诱人的, 因为它能增强许多昆虫病毒的感染, 缩短杀虫时间, 还可以增强其他生物杀虫剂 (如: Bt) 的毒性. 有证据表明, 增强蛋白产生这些效应的机制可能是: a. 促进病毒粒子对中肠细胞的吸附; b. 作为破坏围食膜的蛋白水解酶. 增强蛋白可能同时具有这两种功能或者还有另外一些未被发现的活性. AcMNPV 和 EPV 中增强蛋白样物质的发现, 使得增强蛋白的存在范围从 GVs 扩展到整个昆虫病毒, 这可能与昆虫病毒之间的增效作用密切相关.

利用增强蛋白生产出高效生物杀虫剂有以下几种可能的途径<sup>[3]</sup>. 第一, 用基因工程的方法制出一种含增强蛋白基因的重组病毒, 使增强蛋白包含在有活性的包涵体中, 随包涵体的消化溶解而释放到围食膜和中肠处. 这个方法解决了昆虫需要在合适的时间段内同时降解病毒和增强蛋白的问题. 第二种方法, 可以生产出增强蛋白的转基因植物, 这种转基因植物可为昆虫及任何喷洒的杆状病毒和 Bt 产品提供一个连续而迅速的活性增强蛋白的来源.

## 参 考 文 献

- 1 Tanada Y. J Insect Pathol, 1959; 1: 215
- 2 Derksen A G G, Granados R R. Virology, 1988; 167: 242
- 3 Corsaro B G, Gijzen M, Wang P *et al.* Parasites and pathogens of insects. London: Academic Press, 1993: 127~145
- 4 Tanada Y. J Invertebr Pathol, 1985; 45: 125

- 5 Hukuhara T, Zhu Y, Kuroda Y. Invertebrate and fish tissue culture, Japan; Science Press, 1988; 159~162
- 6 Gallo L G, Corsaro B G, Hughes R R *et al.* J Invertebr Pathol, 1991; **58**: 203
- 7 Goto C. Appl Entomol Zool, 1990; **25**: 135
- 8 Xu J H, Hukuhara T. J Invertebr Pathol, 1992; **60**: 259
- 9 Xu J H, Hukuhara T. J Invertebr Pathol, 1994; **63**: 14
- 10 Kozuma K, Hukuhara T. J Invertebr Pathol, 1992; **59**: 328
- 11 Hara S, Tanada Y, Omi E M. J Invertebr Pathol, 1976; **27**: 115
- 12 Zhu Y, Hukuhara T, Tamura K. J Invertebr Pathol, 1989; **54**: 49
- 13 Yamamoto T, Tanada Y. Virology, 1980; **107**: 434
- 14 Hukuhara T, Zhu Y. J Invertebr Pathol, 1989; **54**: 71
- 15 Uchima K, Egarter D F, Tanada Y. J Invertebr Pathol, 1989; **54**: 156
- 16 Ohba M, Tanada Y. Naturwissenschaften, 1983; **70**: 613
- 17 Nakagaki M, Ohba M, Tanada Y. J Invertebr Pathol, 1987; **50**: 169
- 18 Kozuma K, Hukuhara T. J Invertebr Pathol, 1994; **63**: 63
- 19 Hashimoto Y, Corsaro B G, Granados R R. J Gen Virol, 1991; **72**: 2645

Wei, Li Lulin, Hong Huazhu (*Institute of Entomology, Centre China Normal University, Wuhan 430070, China*).

**Abstract** Several enhancing proteins (enhancins) were isolated from the inclusion bodies of some insect viruses. The proteins can enhance the infection of NPV both *in vitro* and *in vivo*. There are two hypotheses about the mechanism of enhancement: disrupting the peritrophic membrane (PM) and facilitating the penetration of virions or increasing the attachment and fusion between the virion envelope and the midgut cell membrane. The proteins are encoded by virus. The first enhancin gene has been cloned and sequenced. Since enhancins can shorten the life-span of infected larvae and increased the effectiveness of biopesticides, it will stimulate the widespread application of viral pesticides.

**Key words** baculovirus, enhancins, synergism

## The Enhancing Proteins of Baculovirus. Hu

# 病毒治癌

张靖溥

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

**摘要** 病毒治疗癌症近来有新进展. 分子生物学技术的发展, 大大促进了病毒在寄主专一性、基因传递的定位性及溶解癌细胞方面的研究: 选择适当的病毒种类, 根据癌细胞特征性表面蛋白的特性修饰病毒的表面蛋白, 使之对癌细胞具有更强的亲和性; 去除病毒中原有的致病基因如癌基因, 并根据靶细胞的特性针对性地改造有关病毒基因如插入适当的抗癌基因, 可能构建成安全有效的工程病毒用于癌症治疗. 病毒治癌除具有较强的特异性外, 和其他基因治疗方法相比, 还具有能利用寄主细胞进行自我复制、级联放大以克服初始剂量不足等特点.

**关键词** 溶癌作用, 基因改造, 病毒

用病毒攻克癌症的想法, 在本世纪初已产生. 50 年代, 人们注意到在组织培养中, 许多病毒能有效地感染和裂解肿瘤细胞. 在体内, 病

毒感染肿瘤细胞后, 可以增强免疫系统对肿瘤

收稿日期: 1995-02-13, 修回日期: 1995-07-11