

甜菜夜蛾核多角体病毒 基因组 13.7~21.6 m. u. 区域的分析^{*}

杨 凯¹, 代小江¹, 彭亚玲¹, VLAK Just², 庞 义¹

(1. 中山大学生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 荷兰 Wageningen 大学病毒学实验室, Wageningen, Binnenhaven 11, 6709 PD)

摘 要: 甜菜夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus, SeMNPV) 基因组 13.7~21.6 m. u. 区域是 SeMNPV 的重组热点区。以 SeMNPV 美国分离株 SeUS1 为模板, 长片段 PCR 对 SeUS1 的 13.7~21.6 m. u. 区域扩增, 得到 11.3 kb, 2.0 kb 和 0.7 kb 3 个片段。对照已发表的 SeMNPV 基因组序列, 11.3 kb 片段是具完整 SeMNPV 序列基因型的产物, 2.0 kb 和 0.7 kb 片段表明 SeUS1 中还存在两种缺失突变株。对 2.0 kb 和 0.7 kb 片段的序列分析揭示了这两株突变株在缺失部位的 DNA 一级结构。对三株重组 SeMNPV 病毒 (SeXD1、SeXD2 和 SeXD3) 的分析发现, 它们和野生型病毒 SeUS1 中的一个基因型一样, 均缺失了 SeMNPV nt 18 513~29 105 之间长 10 593 bp 的片段, 暗示 SeUS1 中一株自发形成的缺失突变体在离体细胞中具有复制优势。将该片段基因排列与其它 10 种基因组序列已测定的杆状病毒比较, 发现两个在 Group II NPVs 中保守的基因簇。最大简约性法对部分基因的系统发育分析表明, 缺失片段中某些基因可能存在于杆状病毒分化之前的病毒基因组中。

关键词: 甜菜夜蛾核多角体病毒; 缺失突变株; 基因排列; 系统发育分析

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2003) 05-0054-05

甜菜夜蛾是一种重要的农业害虫, 具有爆发性、暴食性、抗药性等特点。甜菜夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus, SeMNPV) 是对甜菜夜蛾专性的杆状病毒, 作为甜菜夜蛾生物防治的一个选择而日益受到重视, 人们正在尝试利用基因工程技术改造 SeMNPV。但是由于缺乏对 SeMNPV 敏感的体外培养细胞系, 构建重组 SeMNPV 非常困难。最近 Dai 等^[1]通过在昆虫体内和培养细胞交替增殖病毒的策略成功建立了遗传改造 SeMNPV 的方法, 然而获得的重组 SeMNPV (命名为 SeXD1) 缺失了 SeMNPV 13.7~21.6 m. u. 区域, 约 10.6 kb 的片段。该缺失片段包含组织蛋白酶基因 (*cathpsin*, *vcath*)、几丁质酶基因 (*chitinase*, *chiA*)、gp37、酪蛋白磷酸酶基因 (*protein tyrosine phosphatase 2*, *ptp2*)、脱皮甾体尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶基因 (*ecdysteroid UDP glucosyl transferase*, *egt*) 以及一些功能未确定的 ORF (open reading frame, ORF)。其中功能已确定的基因都对病毒的适应性有所帮助。

PCR 分析表明: 构建 SeXD1 的亲本病毒 (即美国的一株田间分离株 SeUS1^[2]) 中也存在缺失该

区域的基因型^[1]。杆状病毒基因组某些区域常常发生一些诸如插入、复制或缺失等核苷酸序列的变化, 产生不同基因型从而使病毒在该区域呈现遗传多态性。研究这些重组热点区遗传特征, 能够加深我们对病毒毒力、多样性和进化等方面的认识。

1 材料和方法

1.1 材 料

SeUS1 由美国加州大学 Riverside 分校 Dr. Federici B A 惠赠。三株重组 SeMNPV, SeXD1、SeXD2 和 SeXD3 是本室运用在昆虫体内和培养细胞交替增殖病毒的策略所构建的。SeXD1 是 SeMNPV 的 p10 基因被绿色荧光蛋白基因 (*gfp*) 替代^[1]; SeXD2 是 SeMNPV 的 p10 被 *gfp* 替代, 并引入了限制性酶 *Sse8387 I* 位点序列, 可使 SeMNPV 线性化, 以提高构建重组病毒的效率 (待发表); SeXD3 是 SeMNPV 的 p10 被一个对昆虫专性的蝎毒素基因 *LqhIT2* 替代 (待发表)。

长片段 PCR 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司; Oligo 引物由 Gibco BRL 公司合成; PCR 产物回收试剂盒为 Amersham Biosciences 公司产品; PCR 产

^{*} 收稿日期: 2002-11-07

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 资助项目 (G2000016209); 国家高技术研究发展计划 (863) 资助项目 (2001AA214031-2); 杜邦公司支持的欧共体“援助教育”项目资助

作者简介: 杨凯 (1967 年生), 男, 讲师, 通讯联系人, 庞 义, E-mail: ls12@zsu.edu.cn

物克隆载体 pGEM-T Easy 为 Promega 公司产品; 小量质粒纯化试剂盒为 GENOMED 公司产品。

1. 2 方 法

1. 2. 1 幼虫饲养和病毒增殖 甜菜夜蛾幼虫驯化后饲养在 28 ℃, 相对湿度 70%, 光周期 16H: 8D 的条件下, 饲料为半人工合成饲料。病毒用 4 龄幼虫扩增。病毒包含体的纯化和 DNA 的抽提按照 Muñoz 等^[3]。

1. 2. 2 长片段 PCR (ELT-PCR) 长片段 PCR 系统被用来扩增 *SeMNPV* 13. 7~21. 6 m. u. 区域的序列。依照已发表的 *SeMNPV* 基因组序列^[4] 设计并合成多聚核苷酸引物。引物 P1 为基因组 nt 17 874~17 904:

5' GTAGGGGACGCGAATTTAAGACTGTTGTTCAG 3',
引物 P2 为基因组 nt 29 135~29 163:

5' CGCACGCTCCACGCTACTCGACTTTTGATA 3'。

Perkin Elmer GenAmp 2400 Thermocycler 完成 PCR 反应, 温度循环条件参照产品说明书。w=0. 7% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。

1. 2. 3 PCR 产物的克隆和序列测定 按 PCR 产物回收试剂盒说明书回收目的产物, 并克隆至 pGEM-T Easy。小量质粒纯化试剂盒提取质粒 DNA。采用引物步移法, ABI377 DNA 自动序列仪完成序列测定。DNASTar 的 Seqman 软件完成测定序列的重叠。BLAST 软件将测定序列与数据库中 *SeMNPV* 基因组序列进行比较。Megalyn 软件完成多序列比较。BLAST 软件在 GenBank/PDB/SwissProt/PIR/PRF “nr” 数据库中搜索该缺失片段中 ORF 的同源物。

1. 2. 4 系统发育分析 对于每个基因, ClustalX

1. 81 软件完成多序列对比, 参数为: pairwise alignments: slow, gap opening 10, gap extension 0. 1, matrix BLOSUM, 30; multiple alignments: gap open 10, gap extension 0. 05。检测并调节对比结果, 去除不能很好联配的序列区域。缝隙作为丢失数据。PAUP *4. 0b10 完成最大简约性分析。bootstrap 分析重复 1 000 次。PAUP 软件构建进化树。

2 结果和分析

2. 1 *SeMNPV* 13. 7~21. 6 m. u. 的 ELT-PCR 分析 *SeUS1*、*SeXD1*、*SeXD2* 和 *SeXD3* 基因组 *Pst*I 酶切结果表明 *SeXD1*、*SeXD2* 和 *SeXD3* 都缺失了 *Pst*I-D 片段 (图略), 该片段位于 *SeMNPV* 13. 7~21. 6 m. u. 区域。设计可扩增该区域的引物 P1 和 P2, 以 *SeUS1* DNA 为模板, ELT-PCR 反应获得 3 条主要产物, 大小分别为 11 300, 2 000 和 700 bp (图 1a)。参照已测定的 *SeMNPV* 序列, 以 P1 和 P2 为引物的 PCR 目的产物应为 11 289 bp, 11 300 bp PCR 产物在长度上正好与其匹配, 表明其是具完整基因组序列基因型的产物。其它两个较小的产物 (2 000 bp 和 700 bp) 说明在 *SeUS1* 分离株中存在两个缺失突变株。它们分别缺失了约 9 300 bp 和 10 600 bp 的遗传信息。用 *SeXD1*、*SeXD2* 和 *SeXD3* 的 DNA 为模板的 PCR 产物均为 700 bp (图 1a), 大小正好与以 *SeUS1* DNA 为模板的 700 bp 产物一致。

测序结果表明 2. 0 kb 片段共有碱基 2 043 个, 仅覆盖了 *SeMNPV* nt 17 874~29 163 区域 nt 17 874~19 171 和 nt 28 719~29 163 的部分, 并且在 nt 19 171 和 nt 28 719 位点间有一个 300 bp 的插入片

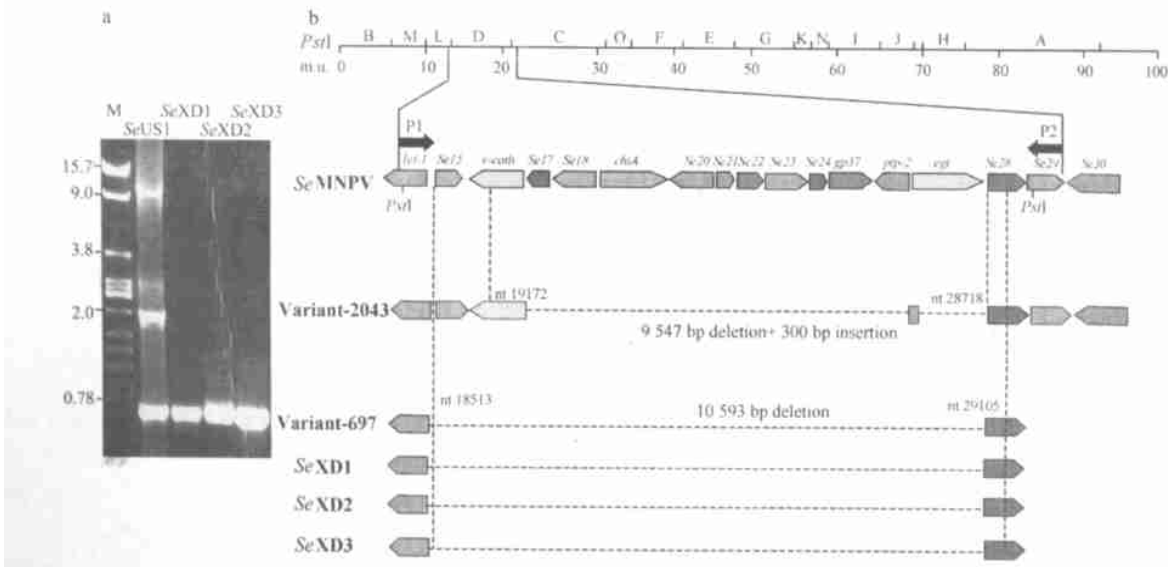


图 1 *SeMNPV* *Pst*I 区域的 PCR 分析
Fig. 1 PCR analysis of *SeMNPV* *Pst*I-D region

段, 该插入片段与 *SeMNPV* nt 30 538 ~ 30 837 的序列一致, 但方向相反, 其两端为精确的倒转重复序列(GCGCA), 暗示其是插入序列的靶位点。推测插入序列与 *Se28*, *Se29* 和部分 *Se30* 构成了一个转座子, *Se28* 和 *Se29* 是通过转座作用进入病毒基因组的。计算机分析表明该插入序列中有一个小的 ORF, 与 *lactococci* 的一个插入序列元件同源。2.0 kb 扩增片段说明 *SeUS1* 中存在一个缺失/插入突变基因型, 我们将该基因型命名为 Variant 2 043(图 1b)。

4 株病毒株的 700 bp PCR 产物都覆盖了 *SeMNPV* nt 17 874 ~ 29 163 区域 nt 17 874 ~ 18 512 和 nt 29 106 ~ 29 163 的部分, 说明在 *SeUS1* 中还存在一个缺失了 nt 18 513 ~ 29 105 间 10 593 bp 的基因型。此基因型 PCR 产物包含 697 bp 的病毒序列信息, 命名为 Variant 697。 *SeXD1*、*SeXD2* 和 *SeXD3* 与 Variant 697 具有几乎完全相同的缺失。

由于甜菜夜蛾已对绝大多数化学农药产生了抗性, *SeMNPV* 作为一种潜在的生物杀虫剂越来越引起人们的关注。在美国、埃及、日本等地都分离获得了 *SeMNPV* 野生株。不同地理位置的 *SeMNPV* 分离株的基因组存在异质性, 如在日本不同地区 *SeMNPV* 分离株的基因组大小相差约 16.7 kb^[5]。实验证实, 不同地区分离的野生 *SeMNPV* 株均由不同基因型组成的。基因组异质性是由于病毒基因组中某些区域发生了变化, 如美国株 *SeUS1* 和西班牙株 *SeSP2* 的基因组在 29 ~ 38 m. u.、41 ~ 53 m. u.、60 ~ 88 m. u.、91 ~ 4 m. u. 之间易于发生交叉互

换^[3]。 *SeSP2* 分离株中的 4 个基因型在 8 ~ 10 m. u. 区域的组成各不相同。同时某些片段易于缺失, *SeUS1* 分离株在 *SeUCR1* 细胞中增殖时, 病毒基因组 12.9 ~ 32.3 m. u. 的 25 kb 片段易于丢失, 导致病毒丧失了对宿主昆虫和培养细胞的感染性。 *SeUS2* 分离株中的一个基因型缺失了 14.5 ~ 30.2 m. u. 的 21.1 kb 片段, 另一基因型缺失了 12.8 ~ 23 m. u. 的 14 kb 片段, 两者不能在宿主昆虫中正常增殖, 需要辅助病毒才能复制子代病毒^[9]。

本文对 *SeUS1* *Pst* I D 区域的研究, 发现就该区域而言, 至少存在 3 种基因型, 一种是具有 *SeMNPV* 该区域全部遗传信息, 一种是具有插入/缺失的突变株, 一种缺失了该区域绝大部分遗传信息。3 株重组 *SeMNPV* 均缺失了部分遗传信息, 而在亲本病毒株 *SeUS1* 中也存在具有完全相同的缺失基因型, 该缺失突变株能在甜菜夜蛾幼虫和培养细胞中复制, 表明该区域的基因是病毒在活体和离体复制中非必需的, 推测这种缺失基因型可能在培养细胞中具有复制优势。

2.2 *SeMNPV* 缺失片段的基因排列及与其它杆状病毒的比较

借助计算机分析, 该 *SeMNPV* 缺失片段包含 13 个完整 ORF 和一个不完整 ORF。大部分序列已测定的杆状病毒基因组中都含有 *vcath*, *chiA*, *gp37*, *egt*。 *Se15*, *Se17*, *Se18*, *Se21*, *Se22*, *Se23*, *Se24*, *ptp2*, *Se28* 仅在部分杆状病毒中有与其同源的 ORF。 *Se20* 为 *SeMNPV* 特有的 ORF (表 1)。

表 1 *SeMNPV Pst* I D 区域中 ORF 的同源物搜索¹⁾

Tah 1 Homology search of the ORFs in *SeMNPV Pst* I D region

Se	基因	长度/aa	启动子	其它杆状病毒中的同源物										
				II 组				I 组				颗粒体病毒		
				Moco	Ld	Splt	Ha	Ac	Bm	Op	Eppo	Xe	Px	Cp
13	38 7k	363		36	122	128	123	13	5	12	10	81	54	73
14	lef-1	216		35	12	129	124	14	6	13	11	82	55	74
15		154	L	34	124	130	125							
16	vcath	337	L	33	78	54	56	127	104	125	111	58		11
17/18	lef-7			16				125	102	123	109	129		
19	chiA	572	L	22	70	42	41	126	103	134	110	103		10
20		145												
21		98		25								128		
22/23/24						105	107							
25	gp37	267	L	37	68	32	58	64	52	69	57	107		13
26	ptp2	165	L	38						9				98, 66
27	egt	523	E	39	125	121	126	15	7	14	12		118	141
28		190	E	40	127	bno-a	127		odv-e26					
29		213	L	41	128	119	128	17	9	16	14			
30		886	E	42	129	118	129							

1) E 和 L 分别表示杆状病毒早期基因和晚期基因启动子; *Ac*, 苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒; *Bm*, 家蚕核多角体病毒, *Op*, 黄杉毒蛾核多角体病毒; *Eppo*, 苹淡褐卷蛾核多角体病毒; *Ld*, 舞毒蛾核多角体病毒; *Se*, *SeMNPV*; *Splt*, 斜纹夜蛾核多角体病毒; *Moco*, 蓓带夜蛾核多角体病毒; *Ha*, 中国棉铃虫核多角体病毒; *Xc*, 八字地老虎颗粒体病毒; *Px*, 小菜蛾颗粒体病毒; *Cp*, 苹果小卷蛾颗粒体病毒。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Se17 和 *Se18* 以前被认为是 2 个独立的 ORF, 后续研究表明 *Se17* 和 *Se18* 应为一个 ORF. *Se22*, *Se23* 和 *Se24* 与 *SpltMNPV* ORF105 的不同部分的氨基酸序列同源^[7], 而 *SpltMNPV* ORF105 也与 *HaSNPV* ORF107 同源, 说明 *Se22*, *Se23* 和 *Se24* 的同源物在 *SpltMNPV* 和 *HaSNPV* 基因组中融合成一个 ORF. 为了方便分析, 我们将 *Se17* 和 *Se18* 作为一个 ORF (*Se17/18*); *Se22*, *Se23* 和 *Se24* 作为一个 ORF (*Se22/23/24*).

按包含体形态, 杆状病毒可分为核多角体病毒属 (*Nucleopolyhedrovirus*, NPV) 和颗粒体病毒属 (*Granulovirus*, GV). 根据氨基酸序列比较和基因组的基因排列, NPV 可进一步分为 Group I 和 Group II 两个组^[8]. 从表 1 可以看出, *Se15* 和 *Se28* 分别与缺失片段侧翼的 ORF 构成了两个基因簇, 在 Group II NPVs 中保守. 一个基因簇是 *Se15*, *lef-1* 和 *38.7 k*, *38.7 k* 和 *lef-1* 在所有杆状病毒基因组中都是紧密连接的, *Se15* 仅在 Group II NPVs 有其同源 ORF, 并与 *lef-1* 相邻. 另一个基因簇是 *egt*, *Se28*, *Se29* 和 *Se30*, *Se28* 也仅存在于 Group II NPVs. 两个基因簇在 *LdMNPV* 和 *HaSNPV* 基因组中相邻, 而且方向一致; 在 *SpltMNPV* 中, *Se15*, *lef-1*, *38.7 k* 基因簇的 *Se15* 基因转录方向与其它病毒相反, *egt*, *Se28*, *Se29*, *Se30* 基因簇也发生了倒转 (图 2). 而在 Group I NPVs 中, 一个基因簇只有 *lef-1* 和 *38.7 k*, 没有 *Se15* 的同源物; 另一个基因簇具有 *egt* 和 *Se29* 的同源物, *Se28* 变为 *odr-e26*, 两个基因簇相连且方向一致 (图 2). *Se15* 和 *Se28* 仅在 Group II NPVs 有同源 ORF, 而在 Group I NPV 和 GV 没有同源 ORF, 说明它们是 Group II NPVs 的特异基因, 而这两个分别包含 *Se15* 和 *Se28* 的基因簇似乎是 Group II NPVs 特异基因簇, 它们可能与 NPV 的分化为 Group I 和 Group II 有关.

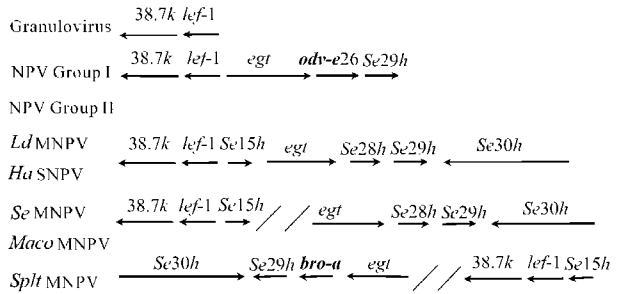


图 2 不同杆状病毒中两个小基因簇 (38.7 k, *lef-1*, *Se15h* 和 *egt*, *Se28h*, *Se29h* 和 *Se30h*) 的基因排列

Fig. 2 Gene organization of two small clusters

(38.7 k, *lef-1*, *Se15h* and *egt*, *Se28h*, *Se29h* and *Se30h*)
in various baculoviruses

2.3 *SeMNPV* 缺失片段内基因的系统进化分析

最大简约性法对 *v-cath*, *chiA*, *gp37* 和 *egt* 的系统发育分析结果表明: 不同的基因导致不同拓扑形状的进化树, 总体上可将杆状病毒科分为 GV 和 NPV 两个属, 说明这些基因可能存在于杆状病毒分化之前共同祖先的基因组中. Group I NPVs 似乎是 NPV 属中的一个组, 树形的变化主要发生在 Group II NPVs (图 3). 树形变化说明不同基因的系统发育史是不同的, 这可能是因为它们位于杆状病毒基因组重组热点区, 在病毒进化过程中发生了不同种病毒间遗传物质的交换.

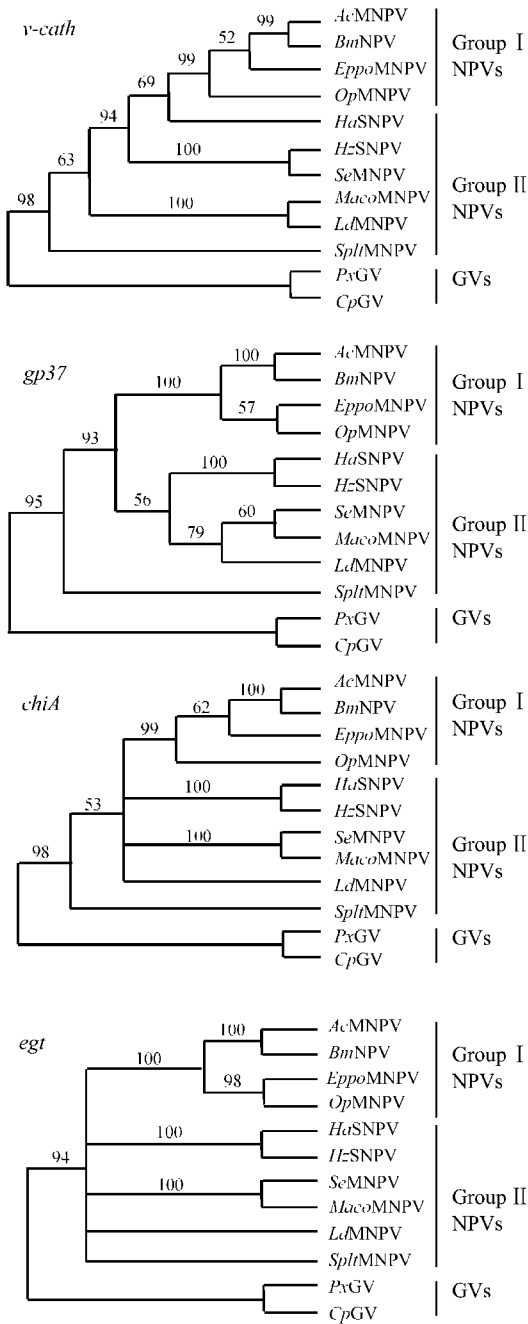


图 3 *v-cath*, *chiA*, *gp37* 和 *egt* 的系统发育分析

Fig. 3 *v-cath*, *chiA*, *gp37* and *egt* gene phylogenies

该缺失片段的基因在其它杆状病毒基因组中呈散布状,而在 *SeMNPV* 基因组中正好组成一个区域,考虑到通过重组等方式将基因聚集在一起的几率很小,推测该缺失片段是祖先病毒的一个历史遗迹。

参考文献:

[1] DAI X J, HAJOS J P, JOOSTEN N N. Isolation of a *Spodoptera exigua* baculovirus recombinant with a 10.6 kb deletion that retains biological activity[J]. J Gen Virol, 2000, 81: 2545—2554.

[2] GELERNTER W D, FEDERICI B A. Isolation, identification, and determination of virulence of a nuclear polyhedrosis virus from the Beet Armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. Environ Entomol, 1986, 15: 240—245.

[3] MUNOZ D, VLAK J M, CABALLERO P. *In vivo* recombination between two strains of the genus *Nucleopolyhedrovirus* in its natural host, *Spodoptera exigua*[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 3025—3031.

[4] UKEL W F, van STRIEN E A, HELDENS J G. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome[J]. J Gen Virol, 1999, 80 (Pt 12): 3289—3304.

[5] HARA K, FUNAKOSHI M, KAWARABATA T. *In vivo* and *in vitro* characterization of several isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus[J]. Acta Virol, 1995, 39: 215—222.

[6] MUNOZ D, CASTILLEJO J I, CABALLERO P. Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population of *Spodoptera exigua* [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64: 43772—43775.

[7] PANG Y, YU J, WANG L. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome [J]. Virology, 2001, 287(2): 391—404.

[8] HERNIOU E A, LUQUE T, CHEN X. Use of whole genome sequence data to infer baculovirus phylogeny[J]. J Virol, 2001, 75(17): 8117—8126.

Analysis of *Spodoptera exigua* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus 13.7~21.6 m. u. Region

YANG Kai¹, DAI Xiao jiang¹, PENG Ya ling¹, VLAK Just², PANG Yi¹

(1. State Key Laboratory for Biocontrol, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;
2. Laboratory of Virology, Wageningen University and Research Center, Binnenhaven 11, 6709 PD Wageningen, the Netherlands)

Abstract: The *Pst* I D restriction fragment, located between 13.7 and 21.6 map units, is a hypervariable region in the genome of *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus (*SeMNPV*) US1 isolate (*SeUS1*). Using *SeUS1* as the template and synthetic oligonucleotide primers that can amplify the entire *Pst* I D region, three DNA products were obtained by PCR with sizes of 11.3 kb, 2.0 kb and 0.7 kb, respectively. These products represent three major genotypic variants. Sequence analysis and *in situ* comparison to the complete sequence of *SeUS1* identified two genotypes with a deletion/insertion, whereas the third genotype represented intact viral DNA. Meanwhile, three constructed *SeMNPV* recombinants were found to lack the same *SeMNPV* 13.7~21.6 m. u. genomic segment. More interestingly, the junction site in all construction mutants is accurately identical to that of the same spontaneous mutant in parental isolate *SeUS1*. It seems that *in vitro* either the genomic segment is prone to deletion or that a natural genotype with such a deletion has some replication advantages. *SeMNPV* 13.7~21.6 m. u. (nt 18 513~29 105) segment contains some auxiliary genes, such as *cathepsin(v cath)*, *chitinase(chiA)*, *gp37*, *protein tyrosine phosphatase(ptp2)*, *ecdysteroid UDP glucosyl transferase(egt)*, and other unidentified ORFs. Comparison of the gene organization in the deletion segment of *SeMNPV* to that of 10 other baculoviruses, which the complete genome sequences have been analyzed to date, show some conservation gene order in this segment in *Nucleopolyhadrovirus* Group II taxa. Phylogenetic analysis of *v cath*, *chiA*, *gp37*, *egt* indicates these gene sequences show a deep division between the GV's and NPV's, NPV's can be further divided into two groups. The genomic segment seems to be present in the genome of the most recent common ancestor baculoviruses even if it is hypervariable.

Key words: *SeMNPV*; deletion mutant; gene order; phylogenetic analysis