

甜菜夜蛾核多角体病毒 (*SeMNPV*) *gp37* 基因的克隆及序列分析^{*}

李充璧, 闫庆生, 李朝飞, 庞 义, 杨 凯
(中山大学生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 通过鸟枪法克隆了甜菜夜蛾核多角体病毒 (*SeMNPV*) 基因组 DNA *EcoRI* 酶切的 2.2 kb 片段. 序列分析表明, 该片段含有 *gp37* 基因. *SeMNPV gp37* 基因的开放阅读框为 801 个核苷酸, 编码 268 个氨基酸, 预测蛋白质相对分子质量为 30 400. 在 *gp37* 基因起始密码子上游有一典型的杆状病毒晚期基因启动子序列 ATAAG. 同其它昆虫杆状病毒和昆虫痘病毒 GP37/ *Fusolin* 蛋白的比较结果表明, *SeMNPV GP37* 与已知 *gp37/ fusolin* 基因的氨基酸序列同源性较高 (50% ~ 68%), 在其蛋白序列内存在类似的保守区和可能的 N-连接糖基化位点. 在 *SeMNPV gp37* 基因下游存在一个完整阅读框和部分 *egt* 基因序列.

关键词: 甜菜夜蛾核多角体病毒 (*SeMNPV*); *gp37* 基因; 克隆与序列分析

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 03-0070-04

甜菜夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus, *SeMNPV*) 作为一种生物杀虫剂, 对控制甜菜夜蛾具有潜在的发展前景. 但是昆虫病毒种间的遗传变异较大, 宿主专一性强, 故限制了它们的应用^[1]. 为此, 深入了解病毒基因结构和功能, 为遗传改良病毒杀虫剂, 提高杀虫效率, 扩大杀虫谱提供理论指导是非常必要的. 目前所知, 已有 6 种昆虫杆状病毒, 包括苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus, *AcMNPV*)、黄杉毒蛾核多角体病毒 (*Orgyia pseudotsugata* (*Op*) *MNPV*)、家蚕核多角体病毒 (*Bombyx mori* (*Bm*) *NPV*)、舞毒蛾核多角体病毒 (*Lymantria dispar* (*Ld*) *MNPV*)、粘虫核多角体病毒 (*Leucania separata* (*Ls*) *MNPV*) 和云杉卷叶蛾核多角体病毒 (*Choristoneura fumiferana* (*Cf*) *MNPV*) 以及中国棉铃虫痘病毒 (*Heliothis armigera* entomopoxvirus, *HaEPV*) 和双色卷叶蛾痘病毒 (*Choristoneura biennis* (*Cb*) *EPV gp37/ fusolin* 基因的报道^[1~8]. *gp37* 基因在病毒感染晚期编码一种糖蛋白, 它在病毒复制过程中起着重要作用^[6]. 本文克隆了 *SeMNPV* 基因组 DNA *EcoRI* 酶切的 2.2 kb 片段, 对 *SeMNPV gp37* 基因进行了序列分析. 值得一提的是, 在本文工作完成之际, Vlack 等^[9] 测定了 *SeMNPV* 全基因组

序列.

1 材料和方法

(1) 多角体扩增与纯化: 甜菜夜蛾核多角体病毒 (*SeMNPV*) 美国株为本实验室保存. 用人工饲料饲养甜菜夜蛾幼虫, 增殖病毒. 收集病死虫尸, 匀浆, 差速离心纯化多角体^[10].

(2) 病毒 DNA 的提取: 采用碱解法直接从多角体中提取 *SeMNPV* DNA^[7].

(3) 酶切片段的克隆及酶切鉴定: 参照文献 [11], 采用鸟枪法克隆病毒基因. 纯化的 *SeMNPV* 多角体 DNA 经限制性内切酶 (*EcoRI*) 消化, 回收 2.2 kb 片段, 并克隆到载体 pBluscript M13- 上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 蓝白斑筛选重组子, 进行酶切鉴定.

(4) 序列分析: 提取 2.2 kb 的插入子, 利用 ABI-PRISM DNA 全自动测序仪测定其 DNA 序列. 采用 Blast、DNAsis 和 Prosis 软件进行核苷酸序列、同源序列的比较分析.

2 结 果

2.1 *SeMNPV* DNA 的酶切及克隆片段的筛选和鉴定

病毒 DNA 酶切见图 1a, 克隆片段的酶切鉴定结果如图 1b 所示, 载体质粒 pBluscript M13-

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (39730030)

收稿日期: 2000-07-04; 作者简介: 李充璧 (1956-), 男, 副教授; 通讯联系人: 庞 义.

经 *Eco*RI 酶切, 得到了 2.2 kb 的片段.

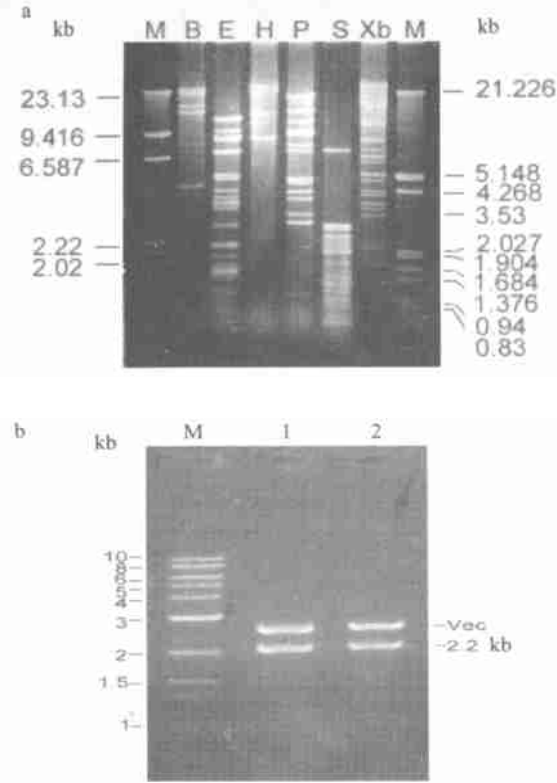


图 1 (a) *SeMNPV* 基因组 DNA 酶切电泳图
(b) 含有 2.2 kb 片段重组子的
*Eco*RI 酶切鉴定电泳图

Fig. 1 (a) Restriction map of *SeMNPV* genome
B—*Bam*HI, E—*Eco*RI, H—*Hind*III,
P—*Pst*I, S—*Sal*I, Xb—*Xba*I, M—Marker
(b) Identification of recombinant plasmid containing
2.2 kb insertion fragment with *Eco*RI
Vec—vector, M—Marker

2.2 *SeMNPV* 基因组 *Eco*RI 酶切的 2.2 kb 克隆片段的酶切图谱

SeMNPV DNA 经 *Eco*RI 酶切的 2.2 kb 克隆片段的酶切图谱、测序策略及所含基因的位置如图 2 所示.

2.3 克隆片段的序列分析

SeMNPV 基因组 *Eco*RI 2.2 kb 片段的重组质粒双向 Walking 测序. 实际测的长度为 2166 nt. 它的 3' 端为蜕皮激素—UDP—葡萄糖基转移酶 (*egt*) 基因 5' 端部分序列, *egt* 基因上游为编码 165 个氨基酸的晚期基因 (见图 2). Blast 检索结果表明, 该片段的 5' 端核苷酸序列与 *AcMNPV* 34.8 kb 基因的核苷酸序列一致性达 60%, 氨基酸序列一致性达 68%; 与 *OpMNPV* *gp37* 基因的核苷酸序列一致性达 58%, 氨基酸序列一致性达到了

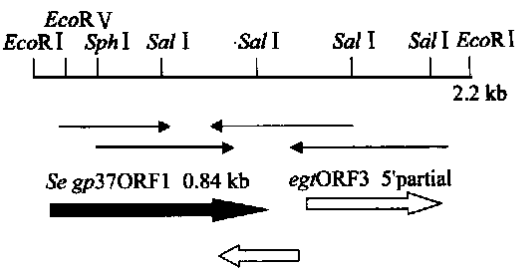


图 2 *SeMNPV* DNA 2.2 kb 片段的酶切图谱及测序策略

Fig. 2 Schematic diagram of location, sequencing strategy of 2.2 kb insertion sequence cloned from *SeMNPV* DNA

58%. 此外, 该片段与 *AcMNPV*, *OpMNPV*, *BmNPV*, *LdMNPV*, *CfMNPV*, *LsMNPV*, *HaEPV* 以及 *CbEPV* 的 *gp37/fusolin* 基因一致的序列内存在 N—连接糖基化位点 (见图 3) 和晚期基因启动子基序 (ATAAG). 我们测得的 *SeMNPV* *gp37* 基因序列与 Vlack 等人的结果一致 (GenBank No. NC—002169).

2.4 几种昆虫杆状病毒与昆虫痘病毒 *gp37/fusolin* 基因编码蛋白的氨基酸序列比较

根据 *SeMNPV* *gp37* 基因推导的氨基酸序列与其它几种昆虫杆状病毒和昆虫痘病毒 GP37/Fusolin 蛋白的氨基酸序列比较结果如图 3 所示.

由 DNASIS 软件分析可知, *SeMNPV* *gp37* 基因的读码框为 801 nt, 编码蛋白的相对分子质量为 30400, 它比现已报道的其它昆虫杆状病毒 GP37 蛋白的相对分子质量略小一些. *SeMNPV* *gp37* 基因与 *AcMNPV*, *OpMNPV*, *LdMNPV*, *BmNPV*, *CfMNPV*, *LsMNPV*, *HaEPV* 和 *CbEPV* *gp37/fusolin* 核苷酸序列比较, 其一致性分别为 60%, 58%, 53%, 52%, 51%, 53%, 56% 和 58%; 而其编码的氨基酸序列与 *AcMNPV*, *OpMNPV*, *LdMNPV*, *BmNPV*, *CfMNPV*, *LsNPV*, *HaEPV* 和 *CbEPV* GP37/Fusolin 的氨基酸序列比较, 其一致性分别为 68%, 58%, 54%, 59%, 51%, 46%, 50% 和 52%.

3 讨论

克隆了 *SeMNPV* 的 *gp37* 基因, 推衍了其编码蛋白的氨基酸序列, 并比较了它与 *AcMNPV*, *OpMNPV*, *LdMNPV*, *BmNPV*, *CfMNPV* 和 *LsMNPV* 等 6 种昆虫杆状病毒以及 *HaEPV* 和 *CbEPV* 两种昆虫痘病毒 GP37/Fusolin 蛋白氨基酸序列的

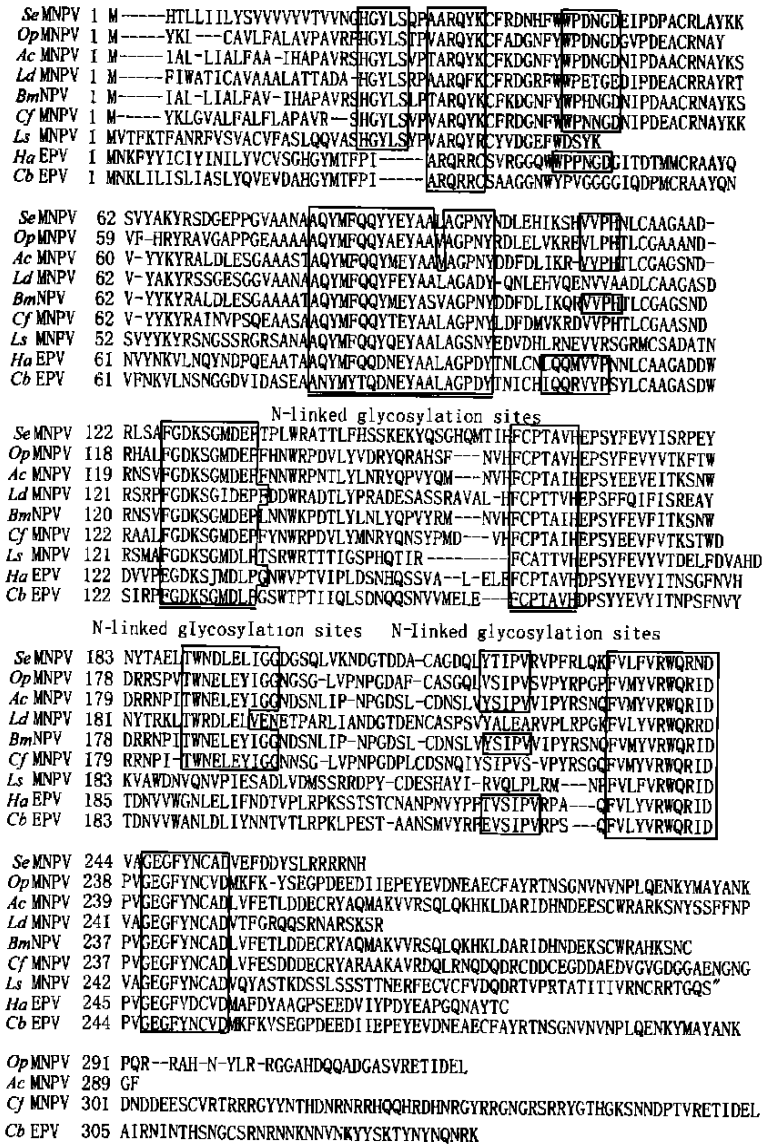


图 3 *SeMNPV gp37* 推导的氨基酸序列与其它几种昆虫杆状病毒及昆虫痘病毒 GP37/Fusolin 蛋白的氨基酸序列比较

Fig 3 Comparison of the predicted amino acid sequences of *SeMNPV* GP37 protein with other several insect baculoviruses and entomopoxviruses GP37/Fusolin proteins

划线部分为 N-连接糖基化位点和保守区 (Vialard et al., 1990)

一致性。从结果可以看出, *gp37* 基因在昆虫杆状病毒和昆虫痘病毒中是一个比较保守的基因。*SeMNPV* GP37 蛋白与 *OpMNPV*, *LdMNPV* 以及 *AcMNPV* 的 GP37 蛋白序列一致性程度较高, 而与 *LsNPV*, *HaEPV* 和 *CbEPV* GP37/Fusolin 的氨基酸序列比较, 其一致性程度相对较低。这可能反映出杆状病毒进化过程中的亲缘关系差异。它们的共同特点是都含有保守的 N 连接糖基化位点, 推测我们克隆的基因很可能是编码糖蛋白的基因, 在该基因转录起始位点 ATG 上游 14 个核

苷酸处含有晚期启动子保守序列 ATAAG, 这与晚期基因的结构特征相一致。GP37 蛋白是病毒主要的包涵体蛋白, 大部分与包涵体的外膜相连, 对包涵体外膜有明显的亲和性。但也有少部分分布在多角体基质内, 它可能在病毒感染周期中起重要作用^[9]。关于 *SeMNPV* GP37 蛋白的功能, 目前尚不清楚, 有待进一步研究。

致谢: 感谢复旦大学生命科学院苏德明教授对论文的修改。

参考文献:

[1] WU J G, MILLER L K. Sequence, transcription and translation of a late gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus encoding a 34.8K polypeptide [J] . J Gen Virol, 1989, 70: 2449—2459.

[2] CHRISTIAN H G, GREGORY M W, REBECCAL Q R. A 37—Kilodalton glycoprotein from a baculovirus of *Orygia pseudotsugata* is localized to cytoplasmic inclusion bodies[J] . J Virol, 1993, 67: 469—475.

[3] MAEDA S. *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus DNA complete genome [DB] . GenBank Accession Number L33180, 1996.

[4] THIEM S M, CASSARS C. Identification and sequence of a *Lmantria dispar* nuclear polyhedrosis virus gene with homology to entomopox fusolin proteins and their baculovirus homologues[DB] . GenBank Accession Number LDU 38895, 1996.

[5] 刘德立, 金天权, 齐义鹏. GP37 蛋白结构分析与昆虫病毒分子进化的关系[J] . 病毒学报, 1999, 15(3): 277—281.

[6] LIU J J, CARSTENS E B. Identification, molecular cloning, and transcription analysis of the *Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus spindle-like protein gene[J] . Virology, 1996, 223: 396—400.

[7] DALL D, SRISKANTHA A. A gene encoding a highly expressed spindle body protein of *Heliothis armigera* entomopoxvirus[J] . J Gen Virol, 1993, 74: 1811—1818.

[8] HALL R L, MOYWER R W. Identification of an Amsacta spheroidin-like protein within the occlusion bodies of *Choristoneura biennis* entomopoxvirus [J] . Virology, 1993, 192: 179—187.

[9] IJKE W F, van STRIEN E A, HELDENS J G, et al. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome [J] . J Gen Virol, 1999, 80 (12): 3289—304.

[10] HINK W F, HALL R L. Recently established invertebrate cell lines[A] . In: MITSUHASHI J, ed. Invertebrate cell system applications[M] . Boca Raton, Fla: CRC Press Inc, 1989. 269—293.

[11] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual[M] . New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.

Cloning and Sequencing of *Spodoptera exigua* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus (*SeMNPV*) *gp37* Gene

LI Chong bi, YAN Qing sheng, LI Zhao fei, PANG Yi, YANG Kai

(State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: An *EcoR* I 2.2 kb fragment of *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus (*SeMNPV*) genome DNA was cloned by using random cloning method. The *gp37* gene of *SeMNPV* which is contained in this fragment has been identified. The open reading frame of the *SeMNPV gp37* gene is 801 nucleotides long encoding a putative protein of 268 amino acids with an Mr of about 30 400. The 5'—nonencoding region upstream of a translational start site contains one late consensus motif (ATAAG). The *SeMNPV gp37* gene has 50%~68% amino acid identity to other baculovirus *gp37* genes and entomopoxvirus *fusolin* genes. Conserved regions of GP37/Fusolin very high amino acid conservation and potential N—linked glycosylation sites were also identified in *SeMNPV GP37* sequence.

Keywords: *SeMNPV*; *gp37* gene; cloning and sequence analysis