

家蚕质多角体病毒基因部分序列克隆及分析^{*}

林伟¹, 卫剑文², 杨文利², 张景强¹

(1. 中山大学生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275;
2. 中山大学海洋功能基因组国家开放实验室, 广东 广州 510275)

摘要: 根据 *BmCPV* (*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus) 核酸片段 4 的末端序列设计一对引物, 通过 RT-PCR 扩增获得多条 DNA 片段, 对其中占优势的约 740 bp 的片段进行切胶回收, 克隆到 pGEM-Teasy 载体上并进行序列测定. 与 GenBank 中的 database 比较分析表明, 该序列与已登录的序列同源性很低, 并与呼肠孤病毒科其它种的对应核酸序列有较大差异. 本实验证明所测序列为一新序列.

关键词: 家蚕质多角体病毒 (*BmCPV*) 外壳蛋白基因; RT-PCR; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 02-0075-03

质多角体病毒 (CPV) 属于呼肠孤病毒科昆虫质多角体病毒属. 其宿主范围广泛, 包括鳞翅目、双翅目、膜翅目、鞘翅目等. 迄今为止, 已在 200 多种昆虫体内发现有 CPV 感染. 与昆虫核多角体病毒 (NPV) 不同, CPV 能在异种昆虫间交叉传播, 引发一定区域内多种昆虫的群体感染. 因此, 利用 CPV 作为病毒杀虫剂防治农作物害虫具有良好的应用前景. 但对家蚕而言, CPV 感染极易造成爆发性蚕病, 使蚕业生产损失惨重. 因而, 研制抗 CPV 药物成为蚕业生产的迫切需要.

要解决以上两方面的问题, 首先应从分子水平了解 CPV 的感染机制, 揭示 CPV 蛋白衣壳的空间结构与功能的关系. 家蚕质多角体病毒 (*BmCPV*) 是质多角体病毒属的模式种, 病毒呈二十面体球型对称, 对称轴的顶端有多层突起^[1,2]. 由于其结构典型, 大小适中, 材料来源便利, 现已成为病毒结构研究的理想材料. 该病毒结构研究方法主要有两种, 一是冷冻电镜三维空间重构, 二是同步 X 射线晶体衍射, 两者都可达到 10 Å 以下的分辨率, 其结构图可显示病毒外壳蛋白的二级结构. 但要解释结构研究获得的精确重构图, 特别是对一些功能基因、免疫优势区等进行空间定位和分析, 必须对 *BmCPV* 外壳蛋白基因进行序列测定.

BmCPV 含有 10 片段 dsRNA, 片段 4 可能是外壳主要蛋白的编码序列^[3]. 本研究克隆了

BmCPV dsRNA 片段 4 的部分序列并对其进行了测定及同源性比较分析.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、质粒及菌种 家蚕质多角体喂养 5 龄家蚕幼虫, 经 10 代以上繁殖传代, 病毒从质多角体提取; 载体 pGEM-Teasy 购自 Promega 公司; 宿主菌 JM109 为本室保藏菌种.

1.1.2 酶及试剂 限制性内切酶 *EcoR* I 为 Promega 公司产品; TRIzol Reagent, cDNA Synthesis Kit 为 GIBCO BRL 公司产品; QIAquick Gel Extraction Kit 和 QIAprep Spin Miniprep Kit 均为 QIAGEN 公司产品; RNaseH 为 Boehringer mannheim 公司产品.

1.2 方法

(1) *BmCPV* 的分离纯化: 采用文献 [2] 的方法进行.

(2) 引物设计: 参照 Kuchino 等^[4] 1982 年用化学断裂法测得的 *BmCPV* dsRNA 末端序列, 设计一对引物,

VP4-1: 5' TTTCCACCAT GTCATTATAC GAG 3'

VP4-2: 5' GTTTCACACC CCACATTTCC C 3'

(3) 病毒 RNA 的提取: 采用 TRI Reagent 一步法分离 dsRNA^[5].

(4) dsRNA 片段 4 的分离纯化: 按照 Hagiwara 等采用的方法分离纯化 dsRNA 片段 4^[6].

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070169)

收稿日期: 2000-06-19; 作者简介: 林伟 (1966—), 男, 博士研究生; 通讯联系人: 张景强.

(5) 病毒 cDNA 合成: 以 VP4-1 和 VP4-2 为引物, 参照 Paul 等提出的不依赖于模板序列的 dsRNA 全长扩增法进行 cDNA 合成^[7]. 然后用 1 unit 的 RNaseH 37 °C 消化 1 h.

(6) PCR 扩增: 取 RNaseH 消化后的溶液 2 μL 作模板进行 PCR 扩增. 按常规反应条件, 反应体积为 50 μL. 循环参数为 94 °C 变性 3 min 后, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 3 min, 共 30 个循环.

(7) PCR 扩增产物的纯化: PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收 740 bp 的片段, 按 QIAquick Gel Extraction Kit 的说明纯化该片段.

(8) DNA 片段的克隆及质粒提取: 纯化后的目的片段与 pGEM-Teasy 载体连接后, 转化 *E. coli* JM109 菌株, 挑选阳性克隆子, 培养至对数生长期. 用 QIAprep Spin Miniprep Kit 提取纯化质粒 DNA.

(9) DNA 测序: 测序由上海基康生物技术有限公司完成.

(10) 序列分析: 应用 DNA TOOL 软件及通过 Internet 应用 BLAST 与 GenBank database 进行比较分析.

2 结果与讨论

2.1 BmCPV dsRNA 的提取及 RT-PCR

目前, *BmCPV* 的蛋白序列测定限于多角体蛋白、非结构蛋白及小分子结构蛋白. 主要结构蛋白相对分子质量大, 序列复杂, 基因组各片段与呼肠孤病毒科其它各属成员间无序列同源性^[3], 难以获得全长基因克隆, 需对其进行分段克隆, 测序分析.

为了消除 dsRNA 其它片段非特异性扩增的影响, 对病毒总 RNA 进行电泳, 回收目的片段 4, 再用该片段进行 RT-PCR, 结果得到多条 DNA 片段, 其中 740 bp 的条带占据明显优势. RT-PCR 实验先后重复 3 次, 都得到一致结果. 将

740 bp 的电泳条带切胶回收后, 克隆到 pGEM-Teasy 载体上. 得到重组质粒 pGVP1. 图 1 是 pGVP1 的 *EcoRI* 酶切分析. 实验表明, 用特异性引物扩增得到非单一产物, 可能是模板内部含有同源序列.

2.2 外壳蛋白基因部分序列分析

随机挑取 3 个重组质粒克隆进行测序, 结果表明, 所克隆的外源片段长 738 bp, 图 2 为所测的核苷酸序列及推测的氨基酸序列. 通过 Internet 经 BLAST 与 GenBank 的 database 比较分析发现, 该序列与数据库中已登录的序列同源性 < 30%. 数据库中与所测片段序列同源性最接近的是水稻锯齿叶矮缩病毒 (rice ragged stunt virus) 的一段序列, 其同源性为 28%. 该病毒为植物呼肠孤病毒属的典型成员.

本实验所测序列与 Hagiwara 等^[8]的实验结果具有相似性. Hagiwara 等 2000 年 4 月报道了 *BmCPV* 的片段 6 和 7 的全序列, 这两个序列与其它呼肠孤病毒的对应该序列没有实质同源性. 本实验证明所测序列为一新序列, 全序列测定正在进行中.

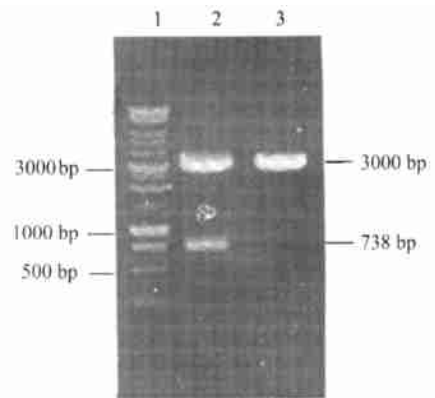


图 1 pGVP1 的 *EcoRI* 酶切鉴定

Fig. 1 *EcoRI* restriction digestion

pattern of plasmid pGVP1

1 DNA 标准; 2 pGVP1/*EcoRI*

3 pGVP1-Teast Vector/*EcoRI*

```
2   TTC CAC CAT GTC ATT ATA CGA GAA CAG ATA TCA TTA ACT GAA AAC ATG ACG CAA GTA GTA 61
1   F  H  H  V  I  I  R  E  Q  I  S  L  T  E  N  M  T  Q  V  V  20
62  AGT ATT GGC GGA CGT AAC TTA GCT GAT ATG TCT GTT GTC CCT CTT AAC ATG AAG TAC GTA 121
21  S  I  G  G  R  N  L  A  D  M  S  V  V  P  L  N  M  K  Y  V  40
122 GTA ATA GAT CCA GCC ACA CGT ATC GAA ACA CTA ACG CAG GAA GGA GGA GGT ATC GAA GTC 181
41  V  I  D  P  A  T  R  I  E  T  L  T  Q  E  K  K  N  I  E  V  60
182 CAA TCC AGA CCA TTC CAA TTT GAT GCG GCG AAC ATG CAT CTG GAG AAT AAT TCT ATA TAC 241
61  Q  S  R  P  F  Q  F  D  A  A  N  M  D  L  E  N  N  S  I  Y  80
```

242	TTA	TTT	ATT	GCG	GTG	ATC	ATG	AAT	GAG	CCA	AAC	GGA	GCA	GCT	ACT	CCT	GCT	AGA	ATG	CAA	301
81	L	F	I	A	V	I	M	N	E	P	N	G	A	A	T	P	A	R	M	Q	100
302	ATG	GAC	AAA	ATA	CGC	AAT	GTC	GCC	ACA	GCT	ATG	CTA	ACT	AGG	ACG	AAC	TGC	GTT	GCG	TAC	361
101	M	D	K	I	R	N	V	A	T	A	M	L	T	R	T	N	C	V	A	Y	140
422	ATA	CGT	GTC	GAG	GAG	GGT	CGA	CTG	GAA	GTG	GCG	AAT	TAT	GTA	CCC	GTA	GAT	ACA	CTC	GTC	481
141	I	R	V	E	E	G	R	L	E	V	A	N	Y	V	P	V	D	T	L	V	160
482	GAG	GCA	GCT	GTG	ACA	TTG	ATG	TTG	GGT	GAC	ATC	GGC	ATA	ACA	CAT	GAG	ATA	ATA	AGA	CCA	541
161	E	A	D	V	T	L	M	L	R	D	I	G	I	T	H	E	I	I	R	P	180
542	TGG	ACG	CCT	GAG	CTT	ATA	GAC	GCC	TGC	TCG	AAC	TAT	GGT	ATT	CGA	CTA	TGG	TAT	TCG	CCT	601
181	S	T	P	E	L	I	D	A	C	S	N	Y	G	I	R	L	W	Y	S	P	200
602	AGG	TTC	AAC	AGG	TGG	TGC	GGT	TTT	GGA	CGT	GTT	CAA	CCA	CTA	CTC	CCC	CGT	GAT	CAA	ACT	661
201	T	F	N	R	W	C	G	F	G	R	V	Q	P	L	L	P	R	D	Q	T	220
662	TGT	ACG	CTC	GTA	GTG	CTG	AGT	CTT	AAG	CAC	AGG	AGT	TGA	GGA	GCT	CAG	TCC	CGG	GAG	GGA	721
221	C	T	L	V	V	L	S	L	K	H	R	S	*	G	A	Q	S	R	E	G	240
722	AAT	GTG	GGG	TGG	GAA	AC															738
241	N	V	G	W	E																260

图 2 738 bp 的核苷酸序列及推测的氨基酸序列
Fig 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid of 738 bp segment

参考文献:

[1] ZHANG H,ZHANG J Q,YU X K, et al Visilization of pro-
tein-RNA interactions in cytoplasmic polyhedrosis virus
[J] . J Virol, 1999, 73(2) : 1624— 1629.

[2] 余学奎,卢 英,张景强,等. 家蚕质多角体病毒
(*BmCPV*) 结构研究[J] . 生物化学与生物物理学报,
1999, 31(5) : 563— 566.

[3] 吕鸿声. 虫病毒分子生物学[M] . 北京: 中国农业科
技出版社, 1998. 411— 442.

[4] KUCHINO Y, NISHIMURA S, SMITH R E, et al. Homol-
ogous teminal sequences in the double-stranded RNA
genome segments of cytoplasmic polyhedrosis virus of the
silkwom *Bombyx mori*[J] . J Virol, 1982, 44: 538— 543.

[5] 李永明,赵玉琪. 实用分子生物学方法手册[M] . 北
京: 科学出版社, 1998. 250— 251.

[6] HAGIWARA K,TOMITA M, NAKAI K, et al. Determina-
tion of the nucleotide sequence of *Bombyx mori* cytoplas-
mic polyhedrosis virus segment 9 and its expression in
BmN4 Cells[J] . J Virol, 1998, 72: 5762— 5768.

[7] PAUL R L, SUSAN J C, OWEN E C, et al Cloning of
noncultivable human rotavirus by single primer amplifica-
tion[J] . J Virol, 1992, 66: 1817— 1822.

[8] HAGIWARA K, MATSIMOTO T Nucleotide sequence of
genome segments 6 and 7 of *Bombyx mori* cypovirus 1, en-
coding the viral structural proteinsV4 and V5, respectively
[J] . J Gen Virol, 2000, 81: 1143— 1147.

Cloning and Sequencing of Partial Structure Protein Gene of
Bombyx mori Cytoplasmic Polyhedrosis Virus

LIN Wei¹, WEI Jian-wen², YANG Wen-li², ZHANG Jin-qiang¹

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

Abstract: A pair of primers was designed according to terminal sequence of genome fragment 4 of *Bombyx mori* cy-
toplasmic polyhedrosis virus (*BmCPV*) . A series of DNA segments were acquired by RT-PCR amplification. The
predominant fragment about 740 bp in the products of RT-PCR amplification was purified after being excised from
the gel and then was cloned into pGEM-Teasy vector and sequenced. The sequence of the predominant segment
showed low homology with the listed sequences in the database of GenBank and was different from the counterpart of
the family Reoviridae. The result showed that the determined sequence was a new one.

Keywords: *BmCPV* capsid protein gene; RT-PCR; gene cloning; sequence analysis