

SpltNPV *p49* 基因的克隆和序列分析^{*}

李 镇, 龙紫新, 张余光, 王章, 庞 义

(中山大学生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 根据新发现的杆状病毒凋亡抑制基因 *p49* 基因的序列设计了一对引物, 以 *SpltNPV* 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得了预期大小的约 1.3 kb 的 DNA 片段, 将此片段克隆到 pGEM-T 载体上并直接测序. 序列分析表明, 该片段为 *SpltNPV* 完整的 *p49* 基因开放读码框. 与已知的杆状病毒 *p49* 基因的序列同源性为 87%, 与之对应的氨基酸序列的同源性高达 93%. 它是首次从 *SpltNPV* 中克隆到的抑制细胞凋亡的基因.

关键词: *SpltNPV*; *p49* 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A

杆状病毒是最早发现具有抑制宿主细胞凋亡的基因的病毒之一, 其抑制凋亡的基因主要有两类: *p35* 基因和 *iap* 基因. *p35* 基因最先发现于苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus, *AcMNPV*)^[1], 随后又在许多其它的杆状病毒中发现有该基因^[1~3]. 在功能上, *p35* 基因不仅能够抑制由杆状病毒侵染诱导的宿主细胞凋亡, 还能够抑制哺乳动物细胞的凋亡^[1]. 最新的研究发现在海灰翅夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera littoralis* multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus, *SpliMNPV*) 中有一种新的具有凋亡抑制功能的基因——*p49* 基因^[4].

斜纹夜蛾是我国和东南亚地区粮棉等经济作物及蔬菜上的重要害虫. 应用斜纹夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera litura* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus, *SpltNPV*) 防治斜纹夜蛾是一种行之有效的方法, 目前已在一些地方推广. 杆状病毒在生物防治中的局限性在于它的专一性强, 杀虫谱较窄, 凋亡抑制基因是杆状病毒的宿主范围的重要决定因子^[3]. 研究 *SpltNPV* 的凋亡抑制基因, 不仅具有重要理论意义, 而且具有广泛的实际应用价值.

1 材料和方法

1.1 病 毒 (质粒及菌种)

斜纹夜蛾核多角体病毒 (*SpltNPV*) 中山大学分离株由本室分离保存. 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 由本实验室保存. pGEM-T Kit 购自北京天象人生物工程公司.

1.2 试 剂

限制性内切酶, T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司或 New England Biolab 公司; RNase A 为 Sigma 公司产品; 蛋白酶 K (proteinase K) 为 Boehringer Mannheim 公司产品. λ DNA/*EcoR*

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金重点项目资助项目 (39730030); 本文序列已收录于 Genebank, 登录号为 AF207549.

收稿日期: 1999-12-07; 作者简介: 李镇 (1970~), 男, 博士研究生.

I + *Hind* III Marker 购自华美生物工程公司; DNA 片段回收试剂盒 (QIAEX II Gel Extraction Kit) 购自 QIAGEN 公司.

1.3 方 法

(1) 病毒 DNA 提取、酶切及克隆: 实验方法参照文献 [6] 所述方法进行.

(2) *p49* 基因引物设计: 参照 (*SpltNPV*) 的 *p49* 基因设计引物. 引物由新加坡裕立宝国际有限公司合成: 5'-ATGTGTGTACTGATACCAACATCAACGCC, 3'-TTATATATCTATGTAAATGTTACGATTC. 上游引物保留了起始密码子, 下游引物保留了终止密码子.

(3) PCR 扩增及片段的回收: PCR 扩增程序为: 94 °C, 5 min; 进入循环: 94 °C, 1 min; 50 °C, 1 min; 74 °C, 2 min; 35 个循环; 60 °C, 10 min. PCR 结束后电泳, 将含目的片段的琼脂块切下, 用 QIAEX II Gel Extraction Kit 回收 DNA 片段, 实验参考试剂盒说明书进行. (4) PCR 产物的克隆: 按照 pGEM-T Kit 说明书进行.

(5) DNA 序列测定及序列分析: 序列测定由大连宝生物工程公司完成. 分析软件为 DNASIS (V4.0)、Clustal X (v1.8), 所用数据库为 GenBank、SWISS 数据库.

2 结 果

2.1 DNA 的限制性消化和 *p49* 基因的 PCR 扩增

用 *Eco*R I、*Bam*H I、*Xba* I 完全消化 *SpltNPV* DNA, 文献 [6] 报道一致 (图略). 以 *SpltNPV* 的 DNA 为模板, 扩增后得到 1.3 kb 和 0.5 kb 2 个片段 (图 1).

2.2 PCR 产物的克隆与序列测定及序列分析

将大小 2 个片段回收后, 分别克隆到 pGEM-T 载体上, 重组质粒经酶切鉴定证明克隆正确 (图略) 后测序. 对克隆的 1.3 kb 片段测序结果与推导的开放读码框编码的氨基酸序列列于图 2. 0.5 kb 片段测序后发现, 它和 1.3 kb 片段的 5' 端序列完全同源, 应为 1.3 kb 片段的 5' 端的部分.

对所测得的序列通过 Internet 用 BLAST 与 GeneBank database 比较分析发现: 它与 *SpltNPV* 完

整的 *p49* 基因的核苷酸序列同源性达 87%, 氨基酸序列的同源性高达 93%. 证明我们克隆的基因确是 *SpltNPV* 的 *p49* 基因. 我们用 Clustal 软件比较了二者氨基酸序列的同源性 (见图 3).

2.3 *SpltNPV p49* 基因序列与 *AcMNPV* 和 *BmNPV p35* 基因的同源性比较

p35 基因是最早在病毒中发现的凋亡抑制基因之一, 用 Clustal 软件比较 *SpltNPV p49* 基因与 *AcNPV* 和 *BmNPV p35* 的同源性 (图 3). 通过比较发现: *SpltNPV* 的 *p49* 基因与 *p35* 基因有一定的同源性. 特别是它们的 N 端和 C 端, 同源性达 45% 以上.

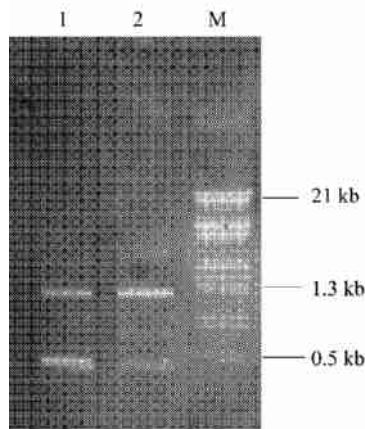


图 1 PCR 扩增的结果

Fig 1 The results of PCR for *p49*

1, 2: the products of PCR

M: λ DNA/ *Eco*RI + *Hind* III

```
1  ATG TGT GTA CTG ATA CCA ACA TTC AACGCC TCG GCG ACT ACG ATC GTA GAT TGT GCG AAT TTG AGC GAT AGC TCG TTG 78
1  M C V L I P T F N A S A T T I V D C A N L S D S S L 26
79  GGC CAT CTG ATT TAC GTA AAT AAC GTT GCC GTG TCG AAA ACG GGCAAC TAC ATT AAT CGA TCA GTG ATC ATG GCG TTG 156
79  R D L I Y V N N V A V S K T G N Y I N R S V I M A L 52
157 AAC ATT AGCGGA CCC GTC GTG TCT GTG AAT CGA GTG TCC ATG CAC ATT GTG CAC ATG TAC AGA TCG CAC ATT GAC AGC 234
53  N I S G P V V S V N R V S M H I V H M Y R S H I D R 78
235 ATC TTT GAT AGA TTC AACAGA TTC AGG TAT TCG GCG ACC GTG ACG GAT GGT GGC GAT ATT GAT CGA GTT TTA AAG TCT 312
235 I F D R F N R L T Y S A T V T D G G D I D R V L K S 104
313 GAC GAT TAC ACC GTC GTG TGT ATG TCG GCGACGAA CTT TTG GACAAT TAC AAA AAA TGT TTG ATC AAC GAA ATG CGA 390
105 D D Y T V V C M S R S E L L D N Y K K C L I N E M G 130
391 GCG ACT GAC GAC GAC GTC GAA AAG TTT AGA AAA TAC TGT CTC AAA CCT TTA GTC GAC ACG GAA AAT GAT GGT GCC GTT 468
131 A T Q D D V E K F R K Y C L K P L V E T E N D G G V 156
469 GAA GAT CGA AAA AAA CCG TAC GTG GTG ATA TGT TCC TTG AAA CCG AAA CTA TTA AAC AAA AAC AAG ACA TTG TCG TTT 546
157 E D R K K P Y V V I C S L K P K L N K N K T L C F 182
547 ACA TAC AAA CCA CAC ACC GGT CAA GTT ATC GTG CCG CTT ATG CAC GAG ATC AAC GAA AAT GGA AGC GAC GTC TAT TCA 624
183 T Y K P Q T G Q V I V P L M H E I N E N G S D V Y S 208
625 TAT GAA GTG ATG GCG ATG ATC AAG GAC GTG AGG CTC TCG AAC AAA CCG CTG AGT ATG CTG GAA CGA TTG AAG CGT TCG 702
209 Y E V M A M I K D V R L S N K P L S M L E R L K R S 234
703 ATG GAC CAG ATT GTG TTA AAT CAC AAC GAG AAC AAA TAC ATG ATG ACT AAT CAG CTT GAA TCT TTA AAA TAT TAT TTA 780
235 M D Q I V L N H N E N K Y M M T N Q L E S L K Y Y L 260
781 AAG TCT ATA AAC TCG AAC GAAGAC GAT GAT TTA AAC AAA TTG ATG AAT GTA TTA AAT AAT TTG ATT GAT CAA CTC GAA 858
261 K S I N S N E D D D L N K L M N V L N N L I D Q L E 286
859 AAA GTT TTG CAT AAA AAA TCC ATT TGT GAC TTT TCC GAC GAC GAC GAA GAC GAC GGT TTG ATT GAT ATG AAG TAT 936
287 K V L H K K K S I T C D F S D D D D D D G G T L I D M K Y 312
937 TAC AAT TCG ATA ATC GAAGAC AAT ATG GGT ATA CTG TTG ATG AAG ATA CAA CAG TAC ATT GAT GAC CGT CAC ATG TTT 1014
313 Y N S I I E D N M R I L M K I Q Q Y I D D R H M F 338
1015 TTG TCG CGG CCG TTG TCG GTC GAA AAG ACT ACA AAG ATT GGT CTG TTT GAA AAC GTG ATG TCG TTC ATG AAA CCG TTC 1092
339 L S P P L S V E K S T K I R L F E N V M S F M K R F 364
1093 AAT CTC GGAGAA TTG TAT TCG TAT TTA AAA AAA ATT ATC GAT TCG AAA CCG CAC GAA AAC AAT CAG AAA CTT CCG TCG 1170
365 N L G E L Y S Y L K K I I D W K T H E N N Q K L A W 390
1171 CCC GAA ATG GTC GAC GAC AAG TAC GCT TTT TTA AAA TAC GAC TAT TTT GGT ACT CCA CAC GGA TTC GTG TAC GAT GAC 1248
391 P E I V D D C K Y A F L K Y D Y F G T P H G F V Y D Q 416
1249 AAA GAT CGA ACT ATG TAC GAT AAG TTG CAT TCG GGT ATA GCG CCG AAT GGT AAC ATT TAC ATA GAT ATA TAA 1320
417 K D R T M Y V K L H C G I A A N R N I Y I D I * 440
```

图 2 1.3 kb 片段的核苷酸序列及推导的编码氨基酸序列

Fig 2 Nucleotide sequence and the putative amino acid sequence of the 1.3 kb fragment

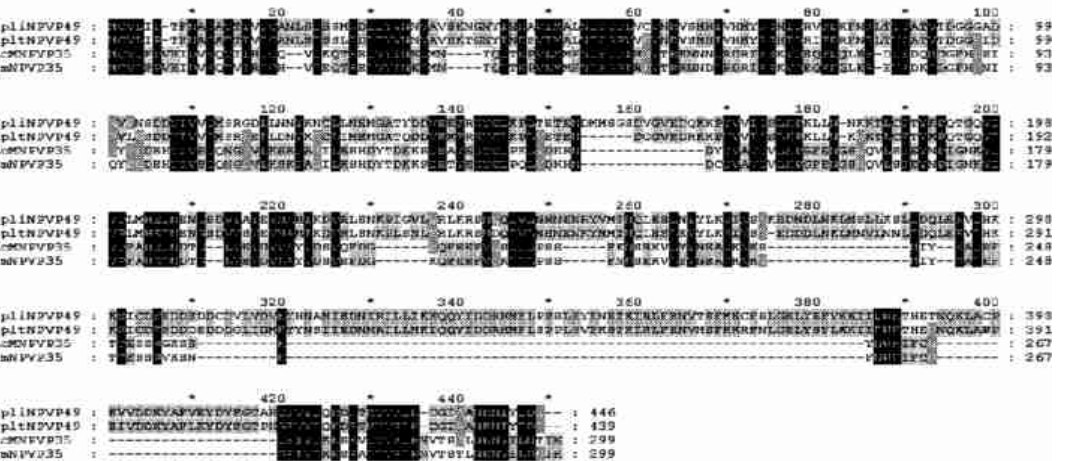


图 3 *SpltNPV*、*SpltNPV* p49 基因和 *AcMNPV*、*BmNPV* p35 基因推测的氨基酸同源性的比较

Fig 3 Amino acid Alignment of *SpltNPV*, *SpltNPV* s p49 gene and *AcMNPV*, *BmNPV* s p35 gene

3 讨论

目前发现有 *p35* 基因的杆状病毒有家蚕核多角体病毒 (*BmNPV*) 粉纹夜蛾核多角体病毒 (*TnMNPV*)、粘虫核多角体病毒 (*LsMNPV*)、棉铃虫核多角体病毒 (*HaNPV*) 等¹⁻³。其中, *TnMNPV*、*HaNPV* 都是通过 PCR 的方法扩增并克隆出来的。最新发现杆状病毒中与抑制

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

凋亡有关的基因是 *p49*, 而从 *SpltNPV* 克隆到 *p49* 基因是首次报道. 克隆的 *SpltNPV* 的 *p49* 基因与 *p35* 基因有一定的同源性. 特别是它们的 C 端和 N 端, 同源性高达 45% 以上, 而在 *P35* 蛋白中, 其 N 端和 C 端是 *p35* 基因行使凋亡抑制功能所必需的^[1]. 在推导的 *P49* 蛋白的 91~95 处也有一个与 *P35* 类似的凋亡蛋白酶 (Caspase) 作用保守序列 (motif) ——D—G 序列. 这段序列是凋亡蛋白酶作用底物的酶切位点^[4]. 这些都预示着 *p49* 基因与 *p35* 基因可能是同一类基因, 其作用的机理也类似. 施先宗在研究 *TnMNPV* *p35* 基因的功能后认为, *p35* 基因有抑制凋亡的作用的同时, 还有促进病毒复制的功能^[3], *p49* 基因是否亦有抑制凋亡和促进病毒复制的功能, 有待进一步研究. *SpltNPV* *p49* 基因的和克隆, 不仅丰富了杆状病毒的的凋亡抑制基因, 也为进一步研究杆状病毒的侵染、复制以及杆状病毒杀虫剂的研究提供了理论基础.

致谢 本实验得到中山大学昆虫所、生物防治国家重点实验室余健秀老师和杨凯博士生的大力支持, 在此表示感谢!

参考文献:

- [1] CLEM R J, MILLER L K. Induction and inhibition of apoptosis by insect viruses. Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease [J]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- [2] 施先宗, 王 章, 龙繁新, 等. 粉纹夜蛾核多角体病毒 *p35* 基因功能的研究 [J]. 病毒学报, 1999, 15: 78~83.
- [3] 王业富, 齐义鹏, 李志达, 等. 棉铃虫核多角体病毒 *p35* 基因的 PCR 扩增和克隆及其在原核细胞中的表达 [J]. 病毒学报, 1999, 15: 252~259.
- [4] DU Q S, LEHAVI D, FAKTORO, et al. Isolation of an apoptosis suppressor gene of the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus [J]. J Virol, 1999, 73: 1278~1285.
- [5] 代小江, 庞义. 杆状病毒的寄主范围决定因子 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 1996, 35(增刊 2): 197~203.
- [6] 魏永杰, 龙繁新, 陈尚武, 等. *SINPV* 基因组酶切图谱及多角体基因的序列分析 [J]. 微生物学通报, 1999, 26: 88~92.

Cloning and Sequence Analysis of *p49* Gene from *Spodoptera litura* Nucleopolyhedrovirus (*SpltNPV*)

* LI Zhen, LONG Qing-xin, ZHANG Yu-guang, WANG Xun-zhang, PENG Yi

Abstract: A fragment of 1.3 kb was produced by PCR from *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (*SpltNPV*) DNA, with primer, designed according to the *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus (*SpltNPV*) *p49* gene. The fragment was sequenced after being cloned into the pGEM-Tvector. The sequencing analysis showed that the fragment was the *p49* gene. Compared with *SpltNPV* *p49* gene, the nucleotide sequence of the fragment was 87% identical and the amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence shared 93% identity.

Keywords: *SpltNPV*; *p49* gene; clone; sequence analysis