

文章编号: 0529-6579 (1999) 05-0124-03

中蜂囊状幼虫病病毒部分结构蛋白基因的克隆及序列分析^{*}

冯建勋, 余健秀, 张景强

(中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘 要: 根据小 RNA 病毒科 (*Picomaviridae*) 中病毒 RNA 所具有的结构特征, 采用 mRNA capture kit 提取纯化中蜂囊状幼虫病病毒 (Chinese scabrood virus CSBV) 的 RNA, 并以之为 cDNA 合成的模板. 依据小 RNA 病毒科中的脊髓灰质炎病毒结构蛋白基因序列设计了一对引物 VP-5 和 VP-3. 通过 PCR 扩增获得预期大小约为 1 100 bp 的 DNA 片段. 将此片段克隆到 pGEM-T easy 载体上并直接测序. 序列分析表明, 该片段为中蜂囊状幼虫病病毒部分结构蛋白基因, 与意蜂幼虫囊状病病毒结构蛋白基因序列的同源性为 86.8%, 与之对应氨基酸序列的同源性高达 93.4%. 该病毒株为一种新型的蜜蜂囊状幼虫病病毒株.

关键词: 中蜂囊状幼虫病病毒 (CSBV); RT-PCR

中图分类号: Q 93 **文献标识码:** A

中蜂囊状幼虫病是中蜂生产中一种严重的病虫害, 它分布广, 发病率高, 对中蜂幼虫危害甚大, 对成蜂的行为和健康也有直接影响. 1972 年首先在广东发生, 迅速蔓延至全国乃至东南亚, 尤其在东南亚一带几乎形成毁灭性的灾害^[1]. 该病是由一种直径约为 28~30 nm 的球状二十面体病毒所引起, 该病毒命名为中蜂囊状幼虫病病毒 (Chinese scabrood virus, CSBV), 属于小 RNA 病毒科 (*Picornaviridae*), 含有一条正链 ssRNA, 沉降系数为 154 S^[2]; 该病毒衣壳有 3 种结构蛋白^[3]. 该 CSBV 病毒和意蜂囊状幼虫病病毒 (SBV) 二者在结构、生理、生化性质上相似, 但二者具有不同的抗原性, 也没有交叉感染性^[4]. 迄今为止, 人们对该病毒的分子生物学尚未进行深入的研究. 本研究克隆了 CSBV 的部分结构蛋白基因并对其进行了序列分析, 为深入开展 CSBV 的分子病毒学研究提供基础.

1 材料和方法

1.1 材 料

(1) 病毒、菌株和质粒. 从广东地区患囊状幼虫病的中蜂幼虫中提取病毒; 大肠杆菌受体菌株为 *E. coli* DH5 α ; PCR 克隆载体为 pGEM-T Easy Vector (Promega 公司产品).

(2) 酶及试剂. 限制性内切酶 *Eco*RI; 连接酶 T₄ DNA Ligase; mRNA Capture Kit, cDNA Synthesis Kit, PCR Core Kit, PCR cleanup Kit 和 High Pure Plasmid Kit 均为 Boehringer mannheim 公司产品; X-gal 和 IPTG 为 Sigma 公司产品.

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (19634020) 资助项目

收稿日期: 1999-07-22 作者简介: 冯建勋, 男, 1970 年生, 博士研究生.

1.2 方 法

(1) 引物设计. 参照文 [5] 已知序列, 设计 1 对 PCR 引物, 预期扩增产物的大小约 1 100 bp.

VP-5: GCCGGTACCA TAGGTTATCA AGCC
VP-3: GCACTGCAGC CAAGAGGTTA TGCCACAAG

(2) 病毒纯化. 采用文 [3] 的方法.

(3) 病毒 RNA 提取. 参考 mRNA Capture Kit 试剂盒说明方法进行.

(4) 病毒 cDNA 合成. 以 VP-5 和 VP-3 为引物, 参考 cDNA Snythesis Kit 试剂盒说明方法进行病毒 cDNA 的合成.

(5) PCR 扩增条件. 50 μ L 反应液组成: 5 μ L PCR 缓冲液 (10 $\times$), 5 μ L dNTP (2 mmol/L), 5 μ L 引物 VP-5 (2.5 μ mol/L), 5 μ L 引物 VP-3 (2.5 μ mol/L), 1 μ L Taq DNA 聚合酶 (3 ~ 5 U/ μ L), 1 μ L cDNA, 28 μ L ddH₂O. 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后, 进入 30 个循环 (94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min), 后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min , 最后在 4 $^{\circ}$ C 保温.

(6) PCR 扩增产物纯化. 参考 PCR Cleanup Kit 试剂盒说明方法进行.

(7) PCR 扩增产物的克隆及质粒提取. PCR 扩增产物与 pGEM-T Easy 载体连接后, 转化 *E. coli* DH5 α 菌株中. 筛选阳性克隆子, 培养至对数生长期, 用 High Pure Plasmids Isolation Kit 提取纯化质粒 DNA, 该 DNA 用作测序的模板.

(8) DNA 测序. 由 Genda Technology Crop. Canada 完成.

(9) 序列分析. 应用 DNASIS 和 PROSIS 软件进行同源性比较等.

2 结果与讨论

2.1 中蜂囊状幼虫病病毒 RNA 提取及 RT-PCR 根据小 RNA 病毒科病毒的 RNA 结构特征可知, 病毒 RNA 3' 端有 Poly A 结构, 因此采用 mRNA Capture Kit 能有效地提取病毒 RNA. 本实验的 RT-PCR 采用两步法, 首先以病毒 RNA 为模板合成 cDNA 的第一链; 再以其为模板直接进行 PCR 扩增. 回收预期大小约为 1 100 bp 的片段, 将其克隆到 pGEM-T Easy 载体上, 得到重组质粒 pGVP1 图 1 是 pGVP1 的 EcoRI 酶切分析.

2.2 CSBV 部分结构蛋白基因的序列分析 所克隆的外源片段共有 1 169 bp, 将其输入 Genbank 中, 应用 BLARSTn 软件对其进行同源性比较, 发现它与最新发表的意蜂囊状幼虫病病毒 (sacbrood virus) 部分结构蛋白基因的核苷酸序列同源性达 86.8%, 而氨基酸序列同源性高达 93.4%^[9]. 这表明所克隆的基因片段属中蜂囊状病病毒的部分结构蛋白基因, 该病毒株为一种新型的蜜蜂囊状幼虫病病毒株.

参考文献:

[1] 袁耀东, 董秉义, 杜芝兰, 等. 中蜂囊状幼虫病病毒的电镜观察 [J]. 微生物学报, 1983, 23

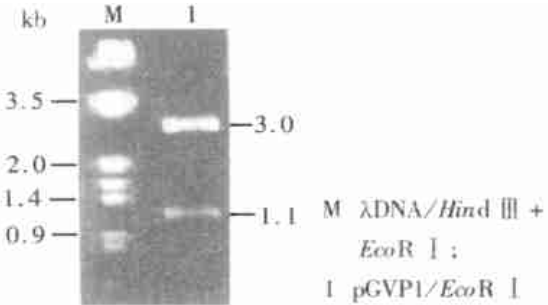


图 1 重组质粒 pGVP1 的 EcoRI 酶切鉴定
Fig. 1 Restriction of recombinant plasmid pGVP1 by EcoRI
M λDNA/ *Hin* dIII+ *Eco*RI ; 1 pGVP1/ *Eco*RI

(3): 285.

- [2] 董秉义, 方月珍, 郭振泉, 等. 中蜂囊状幼虫病病毒的研究 [J]. 中国养蜂, 1984 (3): 6~8.
- [3] 冯建勋, 卢忻英, 张景强, 等. 中蜂囊状幼虫病病毒的纯化、结晶与结构研究 [J]. 电子显微学报, 1998, 17: 387~388.
- [4] 杨冠煌, 张弓绍, 杜芝兰, 等. 中蜂囊状幼虫病病原鉴定 [J]. 中国养蜂, 1979 (5): 17~18.
- [5] PEVEAR D C, OH C K, CUNNINGHAM L L, et al. Localization of genomic regions specific for the attenuated mouse-adapted poliovirus type 2 strain W-2 [J]. J Gen Virol, 1990, 71: 43~52.
- [6] GHOSH R C, BALL B V, WILLCOCKS M M, et al. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus [J]. J Gen Virol, 1999, 80: 1541~1549.

Cloning of Partial Structure Protein Gene from Chinese Sacbrood Virus

FENG Jian-xun^{*}, YU Jian-xiu, ZHANG Jin-qiang

Abstract: Based on viral RNA structure of *Picornaviridae*, RNA of Chinese scabrood virus (CSBV) was purified with mRNA capture kit, which was used as template of cDNA synthesis. A pair of primers (VP-5 and VP-3) was designed according to the structural protein gene sequence of Poliovirus. A predicted DNA fragment in a size of 1 100 bp was amplified and cloned into pGEM-T easy vector and sequenced. The sequencing analysis showed that the fragment was part of a structural protein gene of Chinese scabrood virus. Compared with Sacbrood virus, the nucleotide sequence of the fragment was 86.8% identical and the amino-acid sequence deduced from the nucleotide sequence shared 93.4% identity. The result showed that the Chinese scabrood virus was a novel strain of honeybee Sacbrood virus.

Keywords: Chinese sacbrood virus (CSBV); RT-PCR

更正: 本刊 1999 年第 4 期, 第 55 页图 2 (b) 加注: M 为标准蛋白, 1 为 HT45, 2 为 HD-1-Cry⁻, 3 为 HD-1; 第 56 页表 2 中库蚊栏 LC₅₀/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 改为 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 242 (133~357) 改为 $242 (133 \sim 357) \times 10^3$.