

斜纹夜蛾核多角体病毒 *egt* 基因的克隆和部分序列分析^{*}

闫庆生 庞 义^{**} 农 广 欧阳晓光 龙肇新

(中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘 要 用 *AcMNPVegt* 基因中的保守区部分片段为探针, 通过 Southern 杂交确定 *SlMNPVegt* 基因的位置在 *Pst*I 4 970 bp 和 *Xba*I 2 600 bp 的片段上. 采用双链 DNA 序列分析方法测序, 在 2 600 bp 片段上的 *Eco*RI 位点两侧得到 594 bp DNA 碱基序列, 用计算机 DNASIS 和 PROSIS 软件, 将 594 bp DNA 碱基序列所推测的氨基酸序列与 *AcMNPV* 和 *SlMNPV* 的 *egt* 基因氨基酸序列进行同源比较, 其同源性分别为 45% 和 86.5%.

关键词 斜纹夜蛾核多角体病毒, *egt* 基因, 克隆和序列分析

分类号 Q 78

斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 是一种杂食性的重要害虫, 危害多种农作物. 昆虫病毒作为生物防治的一种重要因子, 近年来受到了重视. 但是, 主要问题之一就是杀虫时间长. 为克服这一缺点, 人们正设法通过遗传工程的途径加以改良病毒杀虫剂的杀虫效果^[1-3], 其中一个设想是缺失昆虫杆状病毒基因组上的蜕皮甾体尿苷二磷酸葡萄糖转移酶 (Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase, EGT) 基因. EGT 能把糖类如葡萄糖或者半乳糖连接到蜕皮激素上, 使之失去作用. O'Reilly^[4]首次克隆和序列分析苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus, *AcMNPV*) 基因组编码的 *egt* 基因, 并获得 *egt* 基因部分片段缺失的重组病毒, 这种缺失病毒具有和野生型 *AcMNPV* 相同的感染力和毒力, 但是, 前者比后者感染幼虫的致死时间缩短 10% ~ 20%, 摄食量减少 40%, 只是子代病毒多角体量减少了 30%^[1].

昆虫杆状病毒的 EGT 中有一些功能区域是高度保守的, 本研究就是用 *AcMNPVegt* 基因中的保守区部分片段作为探针, 通过 Southern 杂交来确定斜纹夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera litura* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus, *SlMNPV*) *egt* 基因的位置.

1 材料与方法

1.1 供试病毒、菌株、质粒和培养基 *AcMNPV* 由美国 Federici B A 教授提供, *SlMNPV* 是由本室保存的中山大学分离株^[5], 载体质粒用 pUC18, 大肠杆菌 DH5 α 菌株为受体菌, 细菌培养基为 LB 培养基, 筛选培养基含 50 μ g/mL 的氨苄青霉素.

1.2 病毒基因组 DNA 的制备 参考文献 [6], 从昆虫病毒多角体中提取病毒 DNA.

^{*} 国家自然科学基金重点 (39730030) 和国家“九五”重点科技攻关专题 (96-C01-02-04) 资助项目

收稿日期: 1997-09-02 闫庆生, 男, 27岁, 博士研究生. ^{**} 通讯联系人.

1.3 核酸杂交探针的制备 用 pUC18 克隆包含完整 *AcMNPV egt* 基因 *Pst*I 的 G 片段 (6 910 bp)^[4], 用 DEAE 纤维素膜的纸片法回收 *egt* 基因中的 *Eco*RI / *Xba*I 的片段 (1 100 bp), 按试剂盒说明用地高辛标记作探针。

1.4 Southern 杂交及阳性片段的克隆 用上述标记的探针在宽松条件 (5× SSC, $t_h = 50^\circ\text{C}$) 的甲酰胺, 31°C) 下与 *SiMNPV* 基因组 DNA 的 *Eco*RI, *Pst*I 和 *Xba*I 酶切片段杂交, 按试剂盒说明书方法显色。用 pUC18 克隆 *Pst*I 4 970 bp 的阳性片段, 命名为 pSIHI。

1.5 pSIHI 的亚克隆及 DNA 序列分析 用 pUC18 亚克隆 pSIHI 上 *Xba*I 2 600 bp 的片段, 再亚克隆 2 600 bp 上 *Eco*RI 到两端 *Xba*I 的 2 个酶切片段, 然后采用 Pharmacia 公司 T7 DNA 序列分析试剂盒并根据产品说明书上双链 DNA 序列分析方法进行测序。

1.6 DNA 和氨基酸序列同源比较 用计算机 DNASIS 和 PROSIS 软件进行分析。

2 结果和讨论

用地高辛标记 *AcMNPV egt* 基因的保守区部分片段为探针, Southern 杂交结果表明, 阳性带分别为 *SiMNPV* 基因组 DNA 2 个 *Eco*RI, *Pst*I 4 970 bp 以及 *Xba*I 2 600 bp 的片段 (图 1), 用相同探针与 pSIPI 杂交, 确定阳性带 *Xba*I 2 600 bp 的片段位于 *Pst*I 4 970 bp 上 (图 1), 这与基因组总 DNA *Xba*I 酶切片段杂交结果相同。

以 *Xba*I 2 600 bp 上 *Eco*RI 到两端 *Xba*I 的酶切片段的 2 个亚克隆质粒 DNA 为模板, 采用双链 DNA 序列分析方法进行序列分析, 在 *Eco*RI 两侧得到 594 bp DNA 碱基序列, 将此段 DNA 序列和推测的氨基酸序列分别与 *AcMNPV*^[4] 和海灰翅夜蛾核

型多角体病毒 (*Spodoptera littoralis* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus, *SiMNPV*)^[7] *egt* 基因 DNA 和氨基酸序列进行同源性比较, 结果表明其 DNA 同源性分别为 60% 和 87%, 氨基酸序列同源性分别为 45% 和 86.5%。Barret 等^[8] 根据 5 种 EGT 一级结构同源性比较发现了 5 个保守区, 第 II、III 区可能涉及 EGT 的底物结合位点, 第 IV 区是最大的、也是保守性最高的区域, 在这个区域内高度保守的 P-V-P/S 被认为是与维系蛋白质的空间构象有关。根据这段 594 bp DNA 碱基序列所推测的氨基酸残基序列和 *SiMNPV* 氨基酸序列^[7] 的同源比较, 发现位于第 III 区和第 IV 区也有 P-V-P-S 的结构 (图 2)。因而, *SiMNPV* 的 *egt* 基因定位在 *Pst*I 4 970 bp 以及 *Xba*I 2 600 bp 的片段上, 已知部分序列与 *SiMNPV* 的 *egt* 高度同源, 尽管与 *AcMNPV egt* 同源性不高, 但是它们都具有相同位置的与维系 EGT 的结构和功能密切相关、高度保守的氨基酸残基。全序列测定正在进行中。



图 1 *SiMNPV egt* 基因的物理图谱

Fig. 1 Physical mapping of *SiMNPV egt* gene

(a) 基因组和 pSIPI 限制性内切酶酶切图谱;

(b) Southern 杂交图谱

(a) (b)

1λ DNA / *Eco*RI + *Hind*III; 2 *Eco*RI; 3 *Pst*I;

4 *Xba*I; 5 pSIPI / *Pst*I; 6 pSIPI / *Xba*I;

7 pUC18 / *Eco*RI; 8λ DNA / *Hind*III

[illegible]

图2 *SlMN PV* 与 *SlMN PV EGT* 的部分氨基酸残基序列比较

Fig. 2 Comparison of partial amino acid sequence between *SlMNPV* and *SliMNPV* EGT

参考文献

- 1 Miller L K. Genetically engineering insect virus pesticides: present and future. J Invert Pathol, 1995, 65: 211~216
- 2 庞义. 昆虫杆状病毒基因工程. 杀虫微生物, 1994, 4: 1~7
- 3 庞义, 姚斌, 范云六, 等. 利用蝎毒基因改良杆状病毒杀虫剂. 昆虫天敌, 1995, 17 (2): 90~92
- 4 O'Reilly D R, Miller L K. Regulation of expression of a baculovirus pesticide ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene. J Virol, 1990, 64: 1321
- 5 中山大学生物系昆虫专业昆虫病毒研究组. 斜纹夜蛾核型多角体病毒的初步研究. 中山大学学报 (自然科学版), 1976, 3: 92~97
- 6 Summers M D, Smith G E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures, 1987
- 7 Factor O, Toister-Achituv M, Kamensky B. Identification and nucleotide sequence of an ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Spodoptera littoralis* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. Virus Genes, 1995, 11: 47~52
- 8 Barret J W, Krell P J, Arif B M. Characterization, sequencing and phylogeny of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene from two distinct nuclear polyhedrosis viruses isolated from *Choristoneura fumiferana*. J Gen Virol, 1995, 76: 2447~2456

Cloning and Partial Nucleotide Sequencing of *egt* Gene of *Spodoptera litura* Multinucleocapsid Nuclear Polyhedrosis Virus

Yan Qingsheng^{*} *Pang Yi* *Nong Guang* *Ouyang Xiaoguang* *Long Qingxin*

Abstract The ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (EGT) gene of *Spodoptera litura* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus (SIMNPV), which located within a *Pst*I 4 970 bp region, was cloned using *Autographa californica* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) *egt* gene as a probe and southern hybridization method. Partially, 594 nucleotides (nt) of *Xba*I 2 600 bp fragment within *Pst*I 4 970 bp region was sequenced. The predicted peptide of the 594 nt exhibited a 45% and 86.3% amino acid identity with the *egt* polypeptides from AcMNPV and *Spodoptera littoralis* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus (SliMNPV), respectively.

Keywords Baculovirus, *Spodoptera litura* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus, *egt* gene, cloning and sequencing

* State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China