

斜纹夜蛾 NPV *p* 74 基因的克隆及部分序列分析^{*}

陈尚武 魏永杰 龙蔡新 徐安龙 王珣章^{**}

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要 以含 *p* 74 基因的 *AcNPV Eco*RI -P 片段作探针, 与 *SINPV* 基因组在非严格条件下进行 Southern 杂交, 将 *SINPV p* 74 基因定位于 4 900 bp 的 *SINPV Xho*I -P 片段. 对 *SINPV Xho*I -P 片段中的一段 940 bp 的 DNA 片段进行序列测定, 通过 internet 经 BLAST 与 GenBank 中的 database 比较分析发现, 序列中的一段 243 nt 序列与 *AcNPV p* 74 基因有 60% 的同源性, 一段 81 nt 序列与 *AcNPV p* 74 基因的同源性高达 79%. 与 *CfNPV p* 74 相比, 2 段 264 nt 和 100 nt 序列分别有 60% 和 71% 的同源性. 测得序列中的部分序列与 *BmNPV OpNPV p* 74 基因也有高达 58% ~ 78% 的同源性. 同时, 这部分序列编码的氨基酸与 *AcNPV* 及 *OpNPV P74* 蛋白的氨基酸序列也有很高的同源性. 结果表明所测序列的一部分为 *SINPV P74* 蛋白 C 端的编码序列.

关键词 核型多角体病毒, 斜纹夜蛾, DNA 测序, *p* 74 基因

分类号 Q 936

斜纹夜蛾是鳞翅目夜蛾科的杂食性害虫, 分布范围广, 是我国粮棉、油、经济作物和蔬菜的重要害虫之一, 也是世界上许多国家和地区的重要害虫.

斜纹夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus, *SINPV*) 属杆状病毒科, 国内于 1972 年在广州地区首次从野外死亡的斜纹夜蛾虫体分离到这种病毒. 目前对斜纹夜蛾唯一有效的微生物杀虫剂就是斜纹夜蛾病毒杀虫剂, 因此, 对 *SINPV* 的研究受到广泛关注.

迄今国内外对 *SINPV* 的研究仍以阐明其生物学特性为主, 对 *SINPV* 进行系统的分子生物学研究, 特别是对一些重要基因的结构分析, 有助于筛选毒力较强的杀虫毒株, 并为这一病毒杀虫剂的进一步改良和发展以及组建昆虫杆状病毒表达载体奠定基础. 苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, *AcNPV*) *p* 74 基因编码 645 个氨基酸的蛋白质. 用缺失 *p* 10 及毗邻的部分 *p* 74 C 端肽段的重组病毒感染粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 幼虫, 不能使感染幼虫发病, 而仅仅缺失 *p* 10 的病毒则象野生型病毒一样具有感染性. 因而认为, *p* 74 是病毒毒力的关键因素^[1]. 本文对 *SINPV p* 74 基因进行了克隆, 并对其部分序列进行测定.

^{*} 国家自然科学基金 (3957003) 和中山大学高等学术研究中心洗为坚博士后基金资助项目

收稿日期: 1997-10-10 陈尚武, 男, 34 岁, 博士后, 副教授 ^{**} 通讯联系人

1 材料与方 法

1.1 病毒 质粒及菌种

斜纹夜蛾核型多角体病毒为本所分离的广州毒株, 从多角体病毒感染的斜纹夜蛾虫体提取. 质粒 pBluescript KS (M13-), pQP10^[21] (含 2 033 bp 的 *AcNPV EcoRI* P 片段) 为本室保存; 宿主菌 DH5 α [*sup E44 lacU169* (ϕ 80 *lacZ* M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*], 本室保存菌种.

1.2 试剂材料

限制性内切酶, DNA 相对分子质量标准 λ -DNA/*EcoRI* -*HindIII*, SABO 产品; T4 DNA 连接酶, nick translation kit, Dig DNA labeling and detection kit, Promega 产品. α -³²P dATP, 北京亚辉生物医学工程公司产品; 甲酰胺, Merck 产品; 尼龙膜, Pharmacia 产品; 其他试剂为生化试剂或国产分析纯.

1.3 方 法

1.3.1 病毒 DNA 的抽提与酶切 按本室常规方法进行^[3], 低电压电泳过夜, 照相后转移至尼龙膜.

1.3.2 Southern 杂交 参照厂家提供的手册, Nick translation 标记 *AcNPV* 的 *EcoRI* P 片段 (从 pQP10^[21] 上切取, 2 033 bp, 含 7% 的 *p74* 基因读码框) 作探针, 按文献 [4] 方法与 *SINPV* 基因组杂交过夜, 洗膜后放射自显影. Random primer 标记探针与杂交检测参照厂家提供的操作指南进行.

1.3.3 基因操作 按文献 [4] 方法进行.

1.3.4 DNA 序列测定及序列分析 碱法少量制备质粒 DNA, 经 glass milk 纯化后采用自动 DNA 序列仪进行测序. 对所测定的 DNA 序列应用 DNASIS 软件及通过 internet 应用 BLAST 与 GenBank database 进行比较分析^[5].

2 结 果

2.1 *SINPV p74* 基因的定 位

SINPV 基因组 DNA 用 *XhoI* 酶切, 其 DNA 片段经 $d=0.8\%$ 的琼脂糖凝胶电泳获得很好的分离, 产生 24 个条带. 以 λ -DNA/*EcoRI* -*HindIII* 作为相对分子质量标准, 计算出各片段分子大小, 病毒基因组全长为 1.37×10^5 bp, 与文献报道的基本一致. 以 α -³²P 标记的含大部分 *p74* 基因的 *AcNPV EcoRI* -P 片段作探针, 与 *SINPV* DNA *XhoI* 酶切片段进行 Southern 杂交, 于 *XhoI* -P 片段 (4 900 bp) 可见强杂交信号, 据此, 初步将 *SINPV p74* 基因定位于 *XhoI* -P 片段. 克隆 *SINPV XhoI* -P 片段作进一步分析.

2.2 *XhoI* -P 片段的部分序列及同源性分析

对克隆的 *XhoI* -P 片段作 *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacII*, *SalI*, *SmaI*, *XbaI* 等 10 种限制性内切酶分析, 其中 *BamHI* 有 2 个切点, *EcoRI*, *EcoRV*, *KpnI* 等有单一切点. 应用地高辛标记之 *AcNPV EcoRI* -P 片段与克隆片段杂交, 结果其中的 *BamHI* /*EcoRI* 片段 (BE 片段) 显示强杂交信号. 克隆 BE 片段于质粒 Bluescript, 命名为 pBE. 采用自动序列仪测得的 938 bp 的 *BamHI* /*EcoRI* 片段 (BE 片段) 的 DNA 序列如图 1 所示.

```

1 GAAT TCAT CAGG CACG AGTT TGTG CCCG ACTC GATG GTGA TCAG GAGA GACG AGCC AGAT 60
61 CGGC GGTG TTACT TTCT TTTA CTCT CATC CTAG ATGC ACTC TACC GTAT GCGG TTTT GTTC 120
121 ACGT TGCC CGAC AGGC TTGC AAAC ATTGATTG TCCG GGTG GCGG CGAC GACA AAAT AAAT 180
181 TTAT ACCA ACAC TGCA CCGT TAAACGGG GAGCCGTC ATGC TCGC CGCC GACC CCGA TGTC 240
241 ATTA CGTACCGA AACGCGAT CGAT CACA ATATTGTT GTGC CAGATTTT GTAC AAAAAATTT 300
301 TTAT TTGC TAATGAATAATA AACT TTTG AAAAAAAAAATTGT GTTT TTTA ATAATTTA TGTA 360
361 CCAG AGCA GCGG ATCA CCGG CTGC GAACCGTG CATT CCCA CAAA ATAC ATGA ACGG AGCA 420
421 TTGA TCAA TTTG AAAACTAT CATA AGTATAAAGATT ATGA CGAG ACTG GACATGAC GGA 480
481 CCGC GCGC GGAGATCA CGCG ATTC CAGC GCAT ACCA AAAGCAGA AAGC TTAGAATC TGAT 540
541 CGAG TAGC GGTGTGCGGTTT CTTT CAGAGTTG GCCA TGAT CCGA TTGT GTGC TTGC GTGT 600
601 ACGC GTGA AACT CCGC GCGC GTGT ACATGGCG CTGC ACGC GAGA GCGC CGCC CACG AGCC 660
661 TGAT CTCG TCAA AATCGGAC ACGG GCTC GTCC TCTT CCCA GAGC AACAGTTG TCCG TCCG 720
721 AATT GACT TCTA AACC GTTC AAGT ATTCCCAT ATGT AGAG CATC GAGT CGAG TTGG TATT 780
781 CGTC CATG TCTT CGAC CATG TCGC CAAAAAACATCG GTTC AAAC TCTA TCAT GTCT CTGC 840
841 TGCC TTCG CCAA TGGATTCA TAGT ACCAGATC AGAA ACGA ATCG ACCA GATC GTCC GGAA 900
901 ATTC TCGC GGAA ACATGTTG TTGT AACCGAAC GGAT CC 938

```

图 1 *SIN PV XhoI* P 片段中 *Bam* H⁻¹ *Eco* R^I 片段的核苷酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequences of *Bam* H⁻¹ *Eco* R^I fragment of *SIN PV XhoI* fragment P

对所测得的序列通过 internet 经 BLAST 与 GenBank database 比较分析发现, 序列中的 597~ 839 nt 与 *AcN PV p 74* 读码框 (从终止密码子算起) 中的 224~ 466 nt 具有 60% 的同源性, 858~ 938 nt 与 *AcN PV p 74* 读码框的 488~ 568 nt 的同源性高达 79% (图 2). 所测序列的 574~ 837 nt 与 *Choristoneura fumiferana N PV (Cf NPV) p 74* 读码框的 201~ 464 nt 也有 60% 的同源性, 序列的 839~ 938 nt 与 *Cf NPV p 74* 读码框的 469~ 568 nt 的同源性也高达 71%. 同时还发现, 所测序列中的部分序列与 *Bombyx mori N PV (Bm NPV)* 及 *Orgyia pseu-dotsugata N PV (Op NPV) p 74* 基因有 58%~ 78% 的同源性, 而与 GenBank 中的其他基因序列则没有高的同源性.

```

597 GTGTACGC GTGAAACTCGGCGCGCGTGTACATGGCGCTCGACGCGAGAGCCGCGCCCACGAGCGG
224 GTGTACTGCATAAACTCCA TGCAGTGTA TAGCGAGCTAGTGGCTAACGCTTGCCCCACCAAAG
TGATCTCGTCAAAAATCGGACACGGGCTCGTCTCTTCC CAGAGCAACAGTTG TCCGTCGAA TTGACTT
TAGATTCGTC AAAATCCTCA ATTTTCATC ACCCTCCTCCAAGTTT AACATTTGGCCGTCGGAA TTA ACTT
CTAAACCGTTCAAAGTAT TCCCATATGTAGAGCATC GAGTCGAGTTGGTATTCG TCCATGTCTTCGAC
CTAAAGATGCCACATAATCTAA TAAATGAAATAGAGATTCAAACGTGGCGTCATCGTCCGTTTCGAC
CATGTCGCCAAAAAACATCGGTTCAAAC TCTATCATGTCTCTG 839
CATTTCGAAAAGAACTCGGGCATAAACTCTATGATTTCTCTG 466

858 TCATAGTACGAGATCAGAAAACGAATCGACCAGATCGTCGGGAAA TTCTCGCGGAAAACAT
488 TCAAAGTACGCAGTCAGGAACGTGCGCGACATGTCTCGGGAAACTCGCGCGGAAAACAT
GTTGTTGTAACCGAACCGGATCC 938
GTTGTTGTAACCGAACGGGTCC 568

```

图 2 *XhoI* P 片段中 *Bam* H⁻¹ *Eco* R^I 部分核苷酸序列 (上行) 与 *AcN PV p 74* 基因开放读框 (下行) 比较

Fig. 2 Alignment of the partial nucleotide sequences of *Bam* H⁻¹ *Eco* R^I fragment of *XhoI*

fragment P (above) with that of *AcNPV p 74* gene open reading frame (below)

氨基酸序列比较分析表明, 所测序列 557~ 841 nt 编码的氨基酸与 *AcN PV P 74* 蛋白 585~ 491 位的氨基酸有 49% 的相同及 71% 的相似, 序列 854~ 937 nt 编码的氨基酸与 *AcN PV P 74* 蛋白 485~ 458 位的氨基酸有 75% 的相同和 89% 的相似 (图 3). 序列 557~ 841 nt 和 851~

937 nt 编码的氨基酸与 *OpN PV P7* 蛋白的 584~ 490 和 485~ 457 位的氨基酸分别有 50% 和 72% 的相同及 70% 和 89% 的相似. 比较已测杆状病毒 *p74* 基因的长度及所测序列中可能存在的开放读框, 推测所测序列的一部分 (374~ 938 nt) 为 *SIN PV P7* 蛋白 C 端的编码序列.

```

841 SRDMIEFEP M FFGDMV EDMDEYQLDSM LYIWEY L NGLLEV NSDGQ LLLW EEDEPV SDFDEITLV GA
SR + IEF P FF + MVE Dr + S + + + Yr LEV NSDGQ L EE + + DFDE TLV G
491 SREI IEFMPE FFS EMV ETD DDA T FESLF HLLDY V ASLEV NSDGQM LNLEEGDEIE DFDESTLV GQ

ALASSAMY TRAEFHAY TERHN RIM ANSER N 557
ALA S + YTR EF Y T R N + + + + N
ALATSSLYTRM EFM QY TFRQN TLLSM NKEN 585

937 DPGYNNM FPREFPDDL V DS FLI SYYES 854
DPGYNNM FPREFPDDr + FL + Yr ES
458 DPGYNNM FPREFPDDMSRT FLT AYFES 485

```

图 3 *Bam* H^I -*Eco* R^I 片段部分核苷酸 (557~ 841, 854~ 937) 编码的氨基酸序列 (上行) 与 *AcN PV P74* 氨基酸序列 (下行) 的比较

Fig. 3 Alignment of the amino acid sequences (above) derived from partial nucleotide sequences (557~ 841, 854~ 937) of *Bam* H^I -*Eco* R^I fragment with that of *AcN PV P74* protein (below)

3 讨 论

目前, 对 *SIN PV* 尚缺乏系统的分子生物学研究工作, 较少资料可资借鉴. 由于对 *AcN PV* 等杆状病毒已作详尽研究, 通常可以 *AcN PV* 的基因作探针来定位某一杆状病毒中的相应基因. 本研究以 *AcN PV Eco* R^I -P 片段 (2 033 bp, 含 71% 的 *p74* 读码框) 作探针与 *SIN PV* 基因组在非严格条件下进行 Southern 杂交, 将 *SIN PV p74* 基因定位于 4 900 bp 的 *SIN PV Xho* I -P 片段.

对已完成序列测定或部分序列测定的其他杆状病毒 *p74* 分析发现, *CfN PV p74* 的读码框也是 1 935 nt, 与 *AcN PV p74* 具有很高的同源性, 其中核苷酸序列有 73% 同源, 有 77% 的氨基酸相同, N 端 240 个氨基酸更是高达 88% 的同源性^[6]. *OpN PV P74* 的 C 端与 *AcN PV P74* 的氨基酸同源性达 70%, 有 71% 的核苷酸同源^[7]. *SeN PV P74* 的 C 端与 *AcN PV* 和 *OpN PV P74* 氨基酸序列分别有 77% 和 71% 的类似^[8]. 本文对 *Xhd* -P 片段中的一段 940 bp 的 *Bam* H^I /*Eco* R^I 片段 DNA 进行序列测定, 与 GenBank database 比较发现, 所测序列中的一部分与 *AcN PV*, *CfN PV*, *BmN PV*, *OpN PV* 的 *p74* 基因有高的同源性, 其编码的氨基酸与 *AcN PV* 和 *OpN PV P74* 蛋白 C 端也有很高的同源性. 据此认定这一部分序列为 *SIN PV P74* 蛋白 C 端的编码序列.

有关 *SIN PV* 的研究, 尚未见确切的基因定位及完整基因序列的报道, *SIN PV p74* 基因的克隆和部分序列的测定, 为进一步研究 *p74* 基因结构与功能打下了基础. 另外, 也可作为基因标志构建 *SIN PV* 物理图谱, 还可以根据 *p74* 基因与上下游基因的共线性关系, 研究 *SIN PV* 其他基因结构.

参 考 文 献

- 1 Kuzio J, Jaques R, Faulkner P. Identification of *p74*, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology*, 1989, 173: 759~ 763
- 2 龙紫新, 林广云, 王珣章, 等. 利用 *AcN PV p10* 启动子表达 β -半乳糖苷酶基因的研究. *生物化学与生物物理学报*, 1993, 25 (2): 195~ 199

- 3 曾庆, 龙紫新, 王珣章, 等. 斜纹夜蛾 N PV 多角体基因的克隆和部分测序. 中山大学学报 (自然科学版), 1994, 33 (4): 70~ 77
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 53~ 85
- 5 Altschul S F, Gish W, Miller M, et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol, 1990, 215: 403~ 410
- 6 Hill J E, Kuzio J, Wilson J A, et al. Nucleotide sequence of the *p*74 gene of a baculovirus pathogenic to the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. Biochimica et Biophysica Acta, 1993, 1172: 187~ 189
- 7 Leisy D J, Rohrmann G F, Nesson M, et al. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus *p*10 gene. Virology, 1996, 153: 157~ 167
- 8 Zuidema D, Van Ders M M, Van Strien E A, et al. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *p*10 gene of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. J Gen Virol, 1993, 74: 1017

Cloning and Sequencing of *p*74 Gene of *Spodoptera litura* Nuclear Polyhedrosis Virus

Chen Shangwu* Wei Yongjie Long Qingxin Xu Anlong Wang Xunzhang

Abstract Based on Southern blot hybridization at low stringency using the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (*Ac*NPV) *p*74 gene as heterologous probe (*Eco*RI fragment P of *Ac*NPV DNA containing partial *p*74 gene), the *p*74 gene of *Spodoptera litura* NPV (*Sl*NPV) were localized on the *Xho*I fragment P (4 900 bp) of the physical map of the viral genome. A 938 nt fragment (*Bam*HI -*Eco*RI) of *Xho*I fragment P was subcloned and sequenced. Two fragments, 243 nt and 81 nt, from the determined sequence, shared 60% and 79% nucleotide identity with *Ac*NPV *p*74 gene respectively. Another two fragments, 264 nt and 100 nt, shared 60% and 71% nucleotide identity with *Choristoneura fumiferana* NPV (*Cf*NPV) *p*74 gene respectively. Partial sequence of the 938 nt fragment showed 58%~ 78% nucleotide sequence homology to *Bombyx mori* NPV (*Bm*NPV) and *Orgyia pseudotsugata* NPV (*Op*NPV) *p*74 genes. Amino acid sequence encoded by the partial determined nucleotide sequence shared high amino acid sequence similarity with *Ac*NPV and *Op*NPV *p*74 proteins. The results indicate that the partial sequence of the 938 nt fragment is the *Sl*NPV *p*74 protein coding sequence.

Keywords nuclear polyhedrosis virus, *Spodoptera litura*, DNA sequencing, *p*74 gene

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China