

家蚕核型多角体病毒 gp64基因的定位及克隆^{*}

王运湘 农 广 庞 义 王_珣章 龙 黎新

(中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘 要 以苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 AcMNPV 的膜表面糖蛋白基因 gp64 作为探针, 对经不同内切酶酶切的家蚕核型多角体病毒基因组 DNA 进行 Southern 杂交分析, 发现 *Bam* HI 酶切产生的 4.2 kb 和 7.6 kb 片段呈阳性杂交, 经 DNA 片段回收, 将 4.2 kb 片段进行了克隆。

关键词 家蚕核型多角体病毒, gp64, 苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒, DIG 杂交

分类号 Q 939.44

核型多角体病毒是一种重要的杆状病毒, 在其生活史中存在着两种不同的病毒粒子: 一是包埋在多角体蛋白之中的病毒粒子 PDV (polyhedrosis derived virion), 感染途径是由口服进入中肠再感染细胞; 另一种是在感染细胞中经质膜以“出芽”方式产生的芽生病毒 BV (budded virion), 主要是进行血腔和细胞感染^[1, 2]。BV 在胞间具有比 PDV 高得多的传染力是由于其囊膜上有病毒基因编码的膜表面糖蛋白 GP64^[2], 这种糖蛋白是 BV 感染进入细胞所必需。目前已有 3 个 gp64 基因被鉴定和克隆^[3-5], 它们分别来自苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* NPV), 舞毒蛾核型多角体病毒 (*Orgyia pseudotsugata* NPV) 和云杉卷叶蛾核型多角体病毒 (*Choristoneura fumiferana* NPV), 另外, 家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori* NPV) 的分离株 T3 的基因组全序列也已经被测定 (Maeda S, 待发表), 经 DNA 序列分析, 可确定 BmNPV 的 gp64 基因的 ORF 及序列。同源性比较显示, 不同种基因间的核苷酸的同源性达 74% 以上, 显示其高度同源。本研究利用 AcMNPV 的 gp64 基因作为探针, 对 BmNPV 的基因组 DNA 的酶切片段进行 DIG 杂交, 并对杂交的阳性片段进行克隆。

1 材料和方法

1.1 供试病毒株、菌株、质粒和培养基 家蚕核型多角体病毒株由华南农业大学蚕桑系赠, 大肠杆菌 DH5 α 菌株为本室保存, 载体质粒为 pBluescript(+), 细菌培养基为 LB 培养基, 筛选培养基含 50 mg/L 的氨苄青霉素。

1.2 病毒基因组 DNA 的制备 按严家骥的方法从家蚕核型多角体中提取 DNA^[6]。

1.3 DIG 探针标记和杂交 以 AcMNPV 的 gp64 基因中保守的 1.3 kb 片段为探针, 按宝灵曼公司的地高辛标记和检测试剂盒所附的说明书操作。

1.4 DNA 片段的回收和克隆 酶切片段的回收、载体的制备、酶切及转化均按《分子克隆》实

^{*} 国家自然科学基金 (39680029) 和广东省科学基金 (950039) 资助项目

收稿日期: 1997-01-31 王运湘, 男, 33 岁, 博士

实验室操作手册说明进行.

2 结果和讨论

2.1 *Bm*NPV 基因组的酶切和 Southern 杂交分析 将 *Bm*NPV 基因组 DNA 经 3 种不同的内切酶酶切, 结果如图 1a 所示, 酶切产生了大小不等的 DNA 片段. 以 1.3 kb 的 *AcMNPV* 的 gp64 基因片段作为探针, 酶切片段的 DIG 杂交结果见图 1b, 可以看到 *Bm*NPV 有明显的同源性杂交, 其中经 *Bam*HI 酶切的片段, 出现 4.2 kb 和 7.6 kb 两个阳性杂交带.



图 1 *Bm*NPV 基因组 DNA 的酶切和 DIG 杂交

Fig. 1 Digestion of *Bm*NPV genome DNA and hybridization with DIG

a 不同内切酶酶切图谱; b DIG 杂交结果

- 1 *Bm*NPV DNA+ *Bam*HI; 2 *Bm*NPV DNA+ *Eco*RI; 3 *Bm*NPV DNA+ *Hind*III;
- 4 λ DN A+ *Eco*RI + *Hind*III



图 2 重组质粒 pZDBM42 的酶切和 DIG 杂交

Fig. 2 Digestion of the recombinant plasmid pZDBM42 and DIG hybridization

a 不同内切酶酶切片段; b DIG 杂交结果

- 1 pZDBM42+ *Bam*HI; 2 1.3 kb 片段;
- 3 pBS-AC+ *Bam*HI;
- 4 λ DN A+ *Eco*RI + *Hind*III

2.2 4.2 kb 片段的克隆和杂交证实 将 4.2 kb 片段回收并克隆到载体 pBluescript(+) 上, 图 2a 的酶切分析显示, 所获得的菌株质粒经酶切产生 2.96 kb 的载体片段和 4.2 kb 的外源片段, 证实已筛选到重组质粒, 并命名为 pZDBM42 图 2b 显示了以 1.3 kb 片段为探针的 DIG 杂交结果, DNA 杂交显示 pZDBM42 的 4.2 kb 片段呈阳性, 同时正对照 1.3 kb 片段和质粒 pBS-AC 中的 gp64 基因 1.0 kb *Bam*HI 片段亦呈阳性, 阳性结果证实了 pZDBM42 所克隆的 4.2 kb 片段确实是 gp64 基因的片段.

3 结 语

家蚕核型多角体病毒 gp64 基因的研究, 目前只有 Maeda 报道了 T3 分离株的基因组全序列, 尚没有专门关于其 gp64 基因的克隆、功能和表达调控的报道. 本研究利用我国分离到的 *Bm*NPV 病毒株, 进行了基因定位, 并克隆到了 4.2 kb 片段, 另外 7.6 kb 片段的克隆工作正在进行之中, 基因的克隆为进一步的功能和表达研究奠定了基础.

gp64 蛋白在核型多角体病毒芽生病毒感染细胞过程中, 是膜融合作用的决定因子, 它也是芽生病毒囊膜上唯一由病毒基因编码的蛋白, 而囊膜则起源于细胞膜. gp64 基因序列分析

显示,基因中的外作用区域(ectodomain)存在两个主要功能区^[7],区段I 是膜融合位点,区段II 是蛋白寡聚化和膜转运功能区.由于 gp64蛋白在膜融合过程中所起的作用,本实验室正利用 gp64蛋白与杀虫晶体蛋白构建嵌合蛋白,对于改变膜融合机制、扩大杀虫寄主范围,将会产生有意义的结果.同时,我们还发现,gp64蛋白作为芽生病毒囊膜唯一病毒编码的蛋白,在病毒侵染细胞过程中,是细胞与病毒发生接触的第一个病毒来源的信号,其作用可能并不限于膜融合作用,还可能参与到细胞凋亡作用过程,其在细胞凋亡机制中可能起到的作用正引起注意.

参 考 文 献

- 1 Granados R R, Williams K A. In vivo infection and replication of baculovirus. In Granados R R, Federici B A. The Biology of Baculovirus. USA: CRC Press, 1986, 89~ 108
- 2 Keddie B A, Volkman L E. Infectivity difference between the two phenotypes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: importance of the 64 k envelope glycoprotein. J Gen Virol, 1985, 66: 1195~ 2000
- 3 Whitford M, Stewart S, Kuzio J, et al. Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J Virol, 1989, 63: 1393~ 1399
- 4 Blissard G W, Rohrmann G F. Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. Virol, 1989, 170: 527~ 555
- 5 Hill J E, Faulkner P. Identification of the gp67 gene of a baculovirus pathogenic to the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. J Gen Virol, 1994, 75: 1811~ 1813
- 6 严家骥.昆虫病毒核酸研究(I).柞蚕和蓖麻蚕核型多角体病毒 DNA的分离和提纯.病毒学集刊, 1982, 1: 153~ 161
- 7 Monsma S A, Blissard G W. Identification of a membrane fusion domain and an oligomerization domain in the baculovirus GP64 envelope fusion protein. J Virol, 1995, 69: 2583~ 2595

Identification and Cloning of the gp64 Gene in the Genome of *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus

Wang Yunxiang* Nong Guang Pang Yi Wang Xunzhang Long Qixin

Abstract After the digestion of *Bombyx mori* NPV (*Bm*NPV) genome DNA with different restriction enzymes, the gp64 gene was localized with the gp67 gene probe from *Autographa californica* NPV. Two positive bands were found in the *Bm*NPV genome digested with *Bam*HI, and their sizes were 4.2 kb and 7.6 kb respectively. The 4.2 kb fragment was cloned into the pBluescript vector, and the recombinant plasmid was named as pZDBM42.

Keywords *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, gp64, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, DIG hybridization

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