

# 中国棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒 多角体蛋白基因的序列分析\*

陈新文 胡志红

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉, 430071)

Just M. Vlak

(Department of Virology, Wageningen Agricultural University,  
Binnenhaven 11, 7609 PD Wageningen, The Netherlands)

Q965.8

Q939.44

A

**摘要** 以 AcMNPV 的多角体蛋白基因为探针, 定位了中国棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒 (HaSNPV) 的多角体蛋白基因。序列测定表明, HaSNPV 的多角体蛋白基因编码区为 738 个核苷酸, 编码 246 个氨基酸, 预计蛋白质分子量为 29 kDa。同源性分析表明, HaSNPV 与美洲棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒 (HaSNPV) 具有最高的同源性, 在整个阅读框架中只有 4 个碱基的差异, 其中第 179 位碱基的变化导致唯一的氨基酸变化, 这种变化并未导致其二级结构的改变。此外, 两种病毒该基因的启动子结构也完全一样。HaSNPV 与其它的 SNPV 和 MNPV 的同源性明显要低。结果预示 HaSNPV 与 HaSNPV 可能为同种病毒的不同变种。

**关键词** 中国棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒, 多角体蛋白基因, 核苷酸序列

中国棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒 (*Heliothis armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, 简称 HaSNPV) 属杆状病毒科, 核型多角体病毒属。其核酸为 120 kb 的双链 DNA<sup>[1]</sup>, 杆状的病毒粒子包埋于多角体蛋白晶格形成多角体。HaSNPV 因特异性感染棉铃虫而被广泛用于棉铃虫的防治<sup>[2]</sup>, 并成为中国第一个注册的病毒生物农药<sup>[3]</sup>。

杆状病毒作为生物杀虫剂的主要弱点是杀虫速度比较慢, 感染了 HaSNPV 的棉铃虫一般需要 5 d 才能死亡, 这无疑限制了 HaSNPV 作为生物杀虫剂的大面积推广和应用和商品化生产。最近的研究表明, 通过基因工程将外源基因引入到杆状病毒, 可以有效提高杆状病毒的杀虫性能<sup>[4-7]</sup>。基因工程对杆状病毒的修饰, 主要建立在对病毒的分子生物学、特别是对多角体蛋白基因深入研究的基础上, 通过构建转移载体, 与野生型病毒 DNA 共转染昆虫细胞获得重组病毒<sup>[8]</sup>。

多角体蛋白是病毒基因组编码的、分子量约为 30 kDa 的蛋白, 在不同的杆状病毒中具有高度的保守性<sup>[9, 10]</sup>。多角体蛋白基因为病毒复制的非必需基因, 具有强大的启动子, 在病毒复制的晚期大量表达, 因而被广泛地用于表达载体的构建。大量不同来源的外源基因已成功地在杆状病毒表达系统中表达, 具有极大的应用前景<sup>[9]</sup>。对 HaSNPV 多角体蛋白基因结构特

收稿日期: 1997-04-10, 修回日期: 1997-06-09

\* 本工作得到荷兰科学院 (KNAW) 和中国科学院 (CAS) 院级国际合作项目, 国家 95 攻关项目 (96-CB1-02-04-01), 国家自然科学基金项目 (39670028) 及中国科学院生物科学与技术研究特别支持费的支持。文章中报道的核苷酸序列已收入 GenBank, 登记号: U97657。

点的研究,为进一步开展基因工程改良病毒杀虫性能和构建表达载体奠定了良好的基础。本文报道了 HaSNPV 多角体蛋白基因的全序列,并对其结构特点进行了分析。

## 材料与方 法

### 1 多角体与病毒 DNA 的提取

中国棉铃虫单粒包埋核多角体病毒(HaSNPV)由中国科学院武汉病毒所张光裕教授惠赠。多角体感染健康的中国棉铃虫后,收集典型的病死虫,按孙修炼等的方法纯化多角体<sup>[1]</sup>。纯化的多角体经碱解,酚、氯仿抽提,经透析获得纯净的病毒 DNA<sup>[1]</sup>。

### 2 PCR 制备 AcMNPV 多角体蛋白基因

以人工合成的寡聚核苷酸 VW90(GGAGATCTAATATGCCGGATTACTCA)和 VW91(GGAGATCTT-TAATACGCCGGACCAGT)为引物,pAcTLI(含 AcMNPV 多角体蛋白编码区)为模板,合成 AcMNPV 多角体蛋白基因完整的编码区,解链温度为 95℃,退火温度为 55℃,聚合温度为 72℃,重复 30 个循环<sup>[12]</sup>,电泳回收 PCR 产物。

### 3 Southern 杂交

纯化的 HaSNPV DNA 经限制性内切酶(GIBCO-BRL)消化,0.7%琼脂糖凝胶电泳,转移至 Hybond N 膜(Amersham)上。以 AcMNPV 多角体蛋白基因 PCR 产物为探针,随机引物扩增法标记探针,非严格条件杂交<sup>[12]</sup>。

### 4 克隆及序列测定

用 Glassmilk(GIBCO-BRL),从胶中回收与 AcMNPV 多角体蛋白基因产生阳性杂交信号的酶切片段,克隆进质粒 pTZ19R(Promega),利用全自动分析仪测定序列。所得序列采用 GCG 和 DNASTAR 进行同源性比较与结构特点的分析。

## 结 果

### 1. 基因定位与克隆

以 AcMNPV 多角体蛋白基因的 PCR 产物为探针,与不同的限制性内切酶消化的 HaSNPV DNA 进行杂交,定位 HaSNPV 的多角体蛋白基因(见图 1)。26.5 kb Sst I 片段、14.3 kb Xba I 片段和 7.2 kb Xho I 片段具有明显的杂交信号,Hind III D(13.3 kb)和 J(3.2 kb)两片段产生阳性杂交信号。在此基础上对 13.4 kb Xba I 片段作了进一步的酶切分析(见图 2),然后克隆了 Hind III D 和 J 两片段(pHaHD13 和 pHaHJ30)用于序列分析。

### 2 多角体蛋白基因的全序列

HaSNPV 多角体蛋白基因的编码区全长 738 核苷酸(见图 3),其 5'端(253 nt)位于 Hind III D 片段,3'端(485 nt)位于 Hind III J 片段,共编码 246 个氨基酸,预计蛋白质的分子量为 29 kDa,与孙修炼等<sup>[1]</sup>通过 SDS-PAGE 测得的分子量吻合。通过 GCG 进行同源性分析,发现 HaSNPV 多角体蛋白基因与 HzSNPV 多角体蛋白基因<sup>[13]</sup>具有极高的同源性(图 3)。在整个编码区只有 4 个碱基的差别,分别位于 197(C/A),549(C/T),612(T/C)和 672(A/G),但只有第 197 位碱基的差异导致第 66 位氨基酸的变化(Thr/Lys)(见图 3,4)。

### 3 多角体蛋白基因启动子的结构特点

如图 4 所示,HaSNPV 多角体蛋白基因的启动子序列与 HzSNPV<sup>[13]</sup>的完全一致。在 5'端非编码区-51 位碱基处具有作为转录起始位点的特征保守序列 TAAG<sup>[10,14]</sup>。在转录起始位点下游-25 碱基处具有高度保守的特征序列 TTGTGA,另外一个保守序列 ATTGTT 与大多

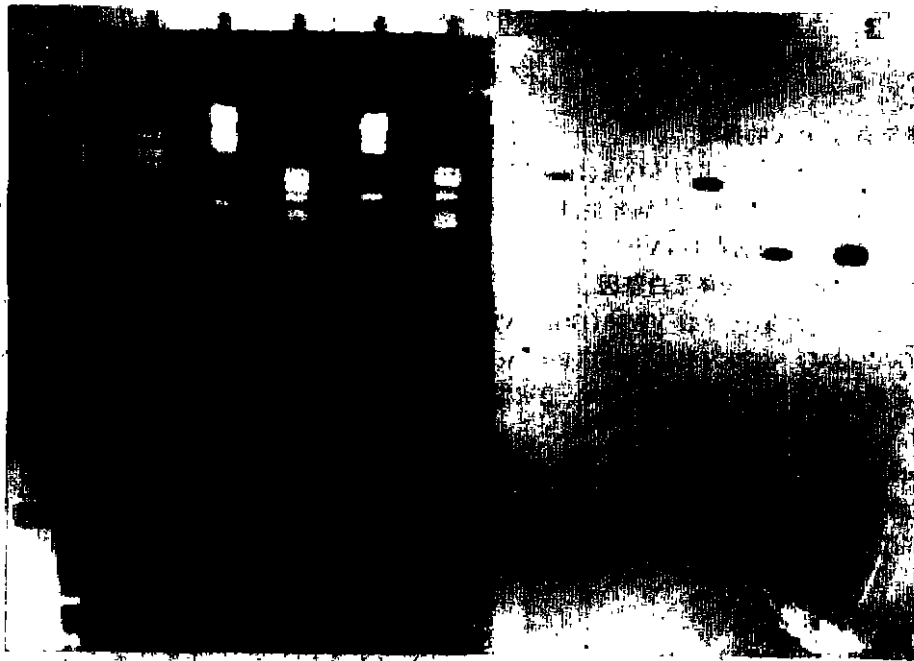


图1 HaSNPV多角体蛋白基因的定位, a. 酶切分析1, 2, 3, 4为HaSNPV DNA用HindIII, SstI, XbaI和XhoI消化, 5为AcMNPV DNA用EcoRI消化. b. 以AcMNPV DNA多角体蛋白基因PCR产物为探针, 非严格条件下进行的Southern杂交。

Figure 1 Localization of the *Heliothis armigera* SNPV polyhedrin gene. Restriction enzyme analysis (a) of HaSNPV DNA digested with HindIII, SstI, XbaI and XhoI (lane 1, 2, 3, 4) and AcMNPV DNA digested with EcoRI (lane 5); and Southern blotting hybridization (b) under non-stringent condition with PCR product of AcMNPV polyhedrin gene as a probe.

数多粒包埋核型多角体病毒(TTCGTA)<sup>[11]</sup>有一定的差别, 而与油桐尺蠖单粒包埋核型多角体病毒(*Buzura suppressaria* SNPV, BsSNPV)的ATTGTA<sup>[15]</sup>相似。

#### 4 多角体蛋白氨基酸的比较

图5和表1比较了7种不同核型多角体病毒的多角体蛋白基因的氨基酸序列。HaSNPV的多角体蛋白基因在氨基酸水平与HzSNPV也具有极高的同源性, 唯一的氨基酸差别位于第66位, 这种变化并未导致两者在二级结构上的变化。HaSNPV多角体蛋白与另外两种SNPV, BsSNPV<sup>[15]</sup>和 *Orgyia pseudotsugata* SNPV (OpSNPV)<sup>[16]</sup>的同源性高于其它MNPV; *Mamestra brassicae* MNPV (MbMNPV)<sup>[17]</sup>, *Spodoptera exigua* MNPV (SeMNPV)<sup>[18]</sup>和 AcMNPV<sup>[19]</sup>。该蛋白在33~36位氨基酸之间具有类似于AcMNPV多角体蛋白的核定位信号肽KRKK<sup>[20]</sup>。

## 讨 论

序列分析表明, HaSNPV和HzSNPV的多角体蛋白基因具有极高的同源性。两种病毒仅

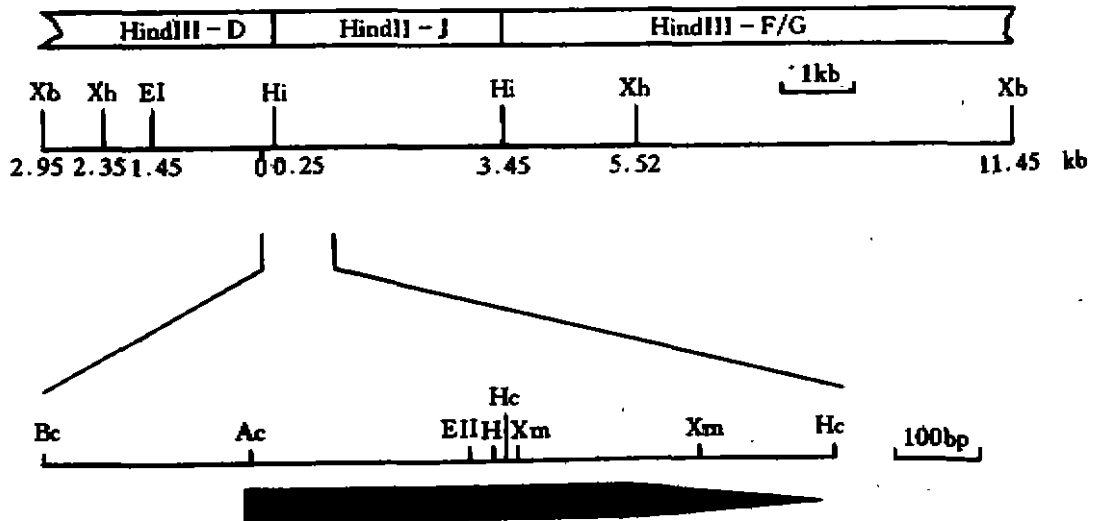


图 2 HaSNPV 基因组 DNA 的部分物理图谱。多角体蛋白基因起始密码子 ATG 的 A 作为物理图谱的零点。上图表示含多角体蛋白基因的 13.4 kb XbaI B 片段, 下图表示一个 1kb 左右片段的详细物理图谱。箭头代表 HaSNPV 多角体蛋白基因的开放阅读框架及方向。Ac = AccI; Bc = BclI; EI = EcoRI; Hi = Hind III; Hc = Hinc II; Xb = XbaI; Xm = XmnI; Xh = XhoI。

Figure 2 Partial physical map of *H. amigera* SNPV genomic DNA. The A of the polyhedrin gene start codon ATG is taken as the zero point of the physical map. The upper part represents the 13.4 kb XbaI fragment B which contains the polyhedrin gene. The lower part represents a detailed restriction map of a fragment of about 1 kb. The arrow shows the HaSNPV polyhedrin gene ORF and its orientation. Ac = AccI; Bc = BclI; EI = EcoRI; Hi = Hind III; Hc = Hinc II; Xb = XbaI; Xm = XmnI; Xh = XhoI.

表 1 7 种 NPV 多角体蛋白基因的核苷酸及氨基酸同源性分析 (%)

Table 1 Amino acid and nucleotide sequence identities (%) of 7 NPV polyhedrins\*

	HzSNPV	BaSNPV	OpSNPV	MbMNPV	SeMNPV	AcMNPV
HaSNPV	<b>99</b>	<b>99</b>	90	79	89	78
HzSNPV		90	79	89	78	86
BaSNPV			91	79	87	76
OpSNPV				95	81	94
MbMNPV					94	81
SeMNPV						91
AcMNPV						

\* 黑体代表氨基酸序列的同源性

Bold lettering denotes amino acid sequence identities

有 4 个核苷酸的差别, 分别位于第 197、549、612 与 672 位。第 66 位氨基酸的变化为蛋白质水平的唯一差异。它们具有显著高于与其它杆状病毒的亲缘关系。有研究表明: HaSNPV 与 HzSNPV 在生物学和理化特性等方面也十分相似, 它们对中国棉铃虫都有很强的毒力, 且毒力相近, 对二龄末三龄初的中国棉铃虫的 LD<sub>50</sub> 分别为 361 PIB/g of diet 和 387 PIB/g of diet; SDS-PAGE 电泳表明其多角体蛋白大小基本一致, 分别为 28.75 kD 和 28.50 kD; 病毒粒子结构多肽也非常相似, 各有 21 种结构多肽, 其中 16 种分子量完全相同; 以 HaSNPV DNA 为探针能与 HzSNPV DNA Hind III 所有酶切片段产生杂交; HaSNPV 的限制性酶切图谱与 HzSNPV 也十分相似<sup>[1]</sup>。HaSNPV 和 HzSNPV 在生物学和理化性质、基因组结构上所表现的相似性,

	1	Met	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ser	Tyr	Ser	Pro	Thr	Leu	Gly	Lys	Thr	Tyr	Val
Ha	1	ATG	TAT	ACT	CGT	TAC	AGT	TAC	AGC	CCT	ACT	TTG	GGC	AAA	ACC	TAT	GTG
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	47	Tyr	Asp	Asn	Lys	Tyr	Phe	Lys	Asn	Leu	Gly	Ala	Val	Ile	Lys	Asn	Ala
Ha	49	TAC	GAC	AAC	AAA	TAC	TTT	AAG	AAT	TTA	GGT	GCT	GTT	ATT	AAA	AAT	GCC
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	33	Asn	Arg	Lys	Lys	His	Leu	Glu	Glu	His	Glu	His	Glu	Glu	Arg	Asn	Leu
Ha	97	AAA	CGC	AAG	AAG	CAT	TTA	GAG	GAG	CAC	GAA	CAT	GAA	GAA	CGC	AAC	TTG
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	49	Asp	Ser	Leu	Asp	Lys	Tyr	Leu	Val	Ala	Glu	Asp	Pro	Phe	Leu	Gly	Pro
Ha	145	GAT	TCG	CTC	GAC	AAA	TAC	TTG	GTG	GCG	GAA	GAT	CCT	TTT	TTG	GGA	CCT
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	65	Gly	Thr	Asn	Gln	Lys	Leu	Thr	Leu	Phe	Lys	Glu	Ile	Arg	Ser	Val	Lys
Ha	193	GGC	ACA	AAT	CAA	AAA	CTA	ACT	TTG	TTT	AAA	GAG	ATT	CGC	AGC	GTT	AAG
H <sub>2</sub>		...	A	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	81	Pro	Asp	Thr	Met	Lys	Leu	Val	Val	Asn	Arg	Ser	Gly	Arg	Glu	Phe	Leu
Ha	241	CCC	GAC	ACA	ATG	AAG	CTT	GTA	GTT	AAC	TGG	AGC	GGT	CGC	GAA	TTT	CTT
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	97	Arg	Glu	Thr	Arg	Thr	Arg	Phe	Met	Glu	Asp	Ser	Phe	Pro	Ile	Val	Asn
Ha	289	CGC	GAA	ACT	TGG	ACG	CGT	TTC	ATG	GAA	GAC	AGT	TTT	CCC	ATT	GTA	AAC
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	113	Asp	Gln	Glu	Ile	Met	Asp	Val	Phe	Leu	Ser	Val	Asn	Met	Arg	Pro	Thr
Ha	337	GAC	CAA	GAA	ATT	ATG	GAC	GTG	TTT	CTG	TCT	GTT	AAT	ATG	CGA	CCA	ACC
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	129	Lys	Pro	Asn	Arg	Cys	Tyr	Arg	Phe	Leu	Ala	Gln	His	Ala	Leu	Arg	Cys
Ha	385	AAA	CCG	AAC	CGT	TGT	TAC	CGA	TTC	TTA	GCG	CAA	CAC	GCT	CTG	CGT	TGT
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	145	Asp	Pro	Asp	Tyr	Ile	Pro	His	Glu	Val	Ile	Arg	Ile	Val	Glu	Pro	Ser
Ha	433	GAT	CCC	GAC	TAT	ATT	CCT	CAC	GAA	GTC	ATT	CGT	ATT	GTA	GAA	CCT	TCC
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	161	Tyr	Val	Gly	Ser	Asn	Asn	Glu	Tyr	Arg	Ile	Ser	Leu	Ala	Lys	Lys	Tyr
Ha	481	TAT	GTA	GGC	AGT	AAC	AAC	GAG	TAC	AGA	ATT	AGT	TTA	GCC	AAA	AAA	TAC
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	177	Gly	Gly	Cys	Pro	Val	Met	Asn	Leu	His	Ala	Glu	Tyr	Thr	Asn	Ser	Phe
Ha	529	GGC	GGT	TGT	CCC	GTT	ATG	AAC	TTG	CAC	GCT	GAA	TAC	ACT	AAT	TCC	TTT
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	193	Glu	Asp	Phe	Ile	Thr	Asn	Val	Ile	Arg	Gln	Asn	Phe	Tyr	Lys	Pro	Ile
Ha	577	GAA	GAT	TTC	ATT	ACC	AAC	GTA	ATT	TGG	GAG	AAC	TTT	TAC	AAA	CCA	ATT
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	209	Val	Tyr	Val	Gly	Thr	Asp	Ser	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Ile	Leu	Leu	Glu
Ha	625	GTT	TAC	GTA	GGC	ACT	GAT	TCT	GCC	GAA	GAA	GAG	GAA	ATA	CTC	CTA	GAA
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	225	Val	Ser	Leu	Ile	Phe	Lys	Ile	Lys	Glu	Phe	Ala	Pro	Asp	Ala	Pro	Leu
Ha	673	GTT	TCT	TTG	ATA	TTT	AAG	ATC	AAA	GAA	TTT	GCA	CCT	GAC	GCT	CCG	CTA
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	241	Tyr	Thr	Gly	Pro	Ala	Tyr	***									
Ha	721	TAC	ACT	GGT	CCT	GCA	TAT	TAA									
H <sub>2</sub>		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

HindIII

T

C

G

图 3 HaSNPV 和 HzSNPV 多角体蛋白基因的排列比较。图中显示了编码的氨基酸序列。斜体表示 HindⅢ位点,点表示相同的核苷酸。

Figure 3 Alignment of *H. armigera* (Ha) and *H. zea* (Hz)SNPV polyhedrin genes. The predicted amino acids are indicated. Dots represent identical nucleotides. The HindⅢ restriction site separating HindⅢ - D and HindⅢ - J is indicated.

HaSNPV	TAAA <u>ATAAG</u> TATTTTTTTCC TATTGTTCAA GATTGTGAA <del>A</del> AATCAAAT ATCCC	ATA
HzSNPV	TAAA <u>ATAAG</u> TATTTTTTTCC TATTGTTCAA GATTGTGAA <del>A</del> AATCAAAT ATCCC	ATA
BsSNPV	TTCA <u>ATAAG</u> TATTTTTTTCC TATTGTAAAA CATTGCGAA <del>A</del> AATCAAAT ACAAC	ATA
OpSNPV	CTCA <u>ATAAG</u> TATTTTTTGTCC TTTCGTAAAA CATTGTGAA <del>A</del> TTTCAAAT ACACC	ATA
MbMNPV	AAAT <u>GTAAG</u> TAATTTTCTCC TTTCGTAGAA GATTGTGAA <del>A</del> AATAAAAT	ATA
SfMNPV	AATT <u>GTAAG</u> TAATTTTTTCC TTTCGTAAAA CATTGTGAA <del>A</del> AAATAAAT	ATA
SeMNPV	AATT <u>GTAAG</u> TAATTTTTTCC TTTCGTAAAA CATTGTGAA <del>A</del> AAATAAAT	ATA
OpMNPV	TTA <u>ATAAG</u> TAATTTCCCTGT TATTGTAACA ATTTTGTAA <del>A</del> AAAATTTTCTATAACC	
AcMNPV	TTAA <u>ATAAG</u> TATTTTACTGT TTTCGTAA <del>C</del> GTTTTGTAA <del>T</del> AAAAAAAC CTATAA	ATA

图 4 9 种 NPV 多角体蛋白基因启动子区域的序列比较。下划线表示含转录起始信号的核序列。

Figure 4 Comparison of the promoter of nine NPV polyhedrin genes. The core sequences which provide the start signal sequence of the transcription are underline.

及多角体蛋白基因之间的高度同源性,说明两种病毒很可能是同一病毒的不同变种。从分子水平进行更深入的比较对阐明两者之间的亲缘关系十分必要。

杆状病毒多角体蛋白基因是一种相当保守的基因<sup>[10]</sup>, HaSNPV 多角体蛋白基因也不例外。HaSNPV 与 HzSNPV 高度同源,同时与其它 NPV 也表现出较高的同源性,但 HaSNPV 与两种 SNPV——BsSNPV 和 OpSNPV 的同源性(氨基酸的一致性分别为 90% 和 89%)高于 HaSNPV 与三种 MNPV——MbMNPV, SeMNPV 和 AcMNPV 的同源性(氨基酸一致性分别为 86%, 86% 和 85%)。说明 HaSNPV 与 BsSNPV 和 OpSNPV 有较近的亲缘关系。

本文对 HaSNPV 多角体蛋白基因的研究,为我们进一步开展 HaSNPV 昆虫杆状病毒表达载体系统的研究,以及通过基因改造以提高病毒的杀虫性能打下了基础。对多角体蛋白基因两侧序列的进一步分析及转录的研究,也有助于比较 HaSNPV 与 HzSNPV 及其它杆状病毒的基因组结构特征与进化关系。

## 参 考 文 献

- 1 孙修炼,张光裕.棉铃虫(*Heliothis spp*)核型多角体病毒四个分离株的比较研究.中国病毒学,1994,9(4):309~318
- 2 张光裕.我国棉铃虫病毒杀虫剂的研究开发和应用.长江流域资源与环境,1994,3(1):1~6
- 3 张友清,王晓容,刘润忠.中国棉铃虫病毒杀虫剂产业化进展.见:中国有害微生物综合治理论文集.北京:中国农业出版社,1996.1215
- 4 Tomalski MD, Miller LK. Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene. Nature, 1991, 352: 82~85
- 5 Stewart LMD, Hirst M, Lopez-Ferber M *et al.* Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. Nature, 1991, 352: 85~88

HaSNPV	MYTRYSYSPT	LGRTYVYDNK	YFKNLGAVIK	NAKRRKHLLE	HEHEERNLDS	LDKYLVAEDP	
HzSNPV	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
BsSNPV	.....K.S	.....R	.....Y	.....EI	.....V.T.P	.....	
OpSNPV	.....N.S	.....R	.....Y	.....QI	.....A.HT.P	.....	
MmSNPV	.....N.S	.....R	.....Y.S	.....N.R.Y	.....L.KT.P	.....R	
SeSNPV	.....N.A	.....R	.....F.S	.....E.LQ	.....I.T.P	.....ER.V	
AcSNPV	..-PD...R.T	I.R.....	.....	.....FA	.....I.AT.P	.....N	60
*							
HaSNPV	FLGPGTNQKL	TLFKEIRSVK	PDTMKLVVNW	SGREFLRFTW	TRFMEDSFPI	VNDQEIMDVF	
HzSNPV	.....K	.....	.....	.....	.....	.....	
BsSNPV	.....K	.....N	.....	.....	.....	.....	
OpSNPV	.....K	.....N	.....	.....	.....	.....	
MmSNPV	.....K	.....N	.....	.....	.....	.....V	
SeSNPV	.....K	.....I	.....	.....	.....	.....	
AcSNPV	.....K	.....N	.....G	K.....Y	.....	.....V	120
HaSNPV	LSVMRPTKP	NRCYRFLAQH	ALRCDDPYIP	HEVIRIVEPS	YVGSNNEYRI	SLAKKYGGCP	
HzSNPV	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
BsSNPV	..VI...R	.....	.....	.....V	.....	.....RG	
OpSNPV	..VI...R	.....F	.....	.....E.V	.....	.....RG	
MmSNPV	..VI...R	.....FK	.....	.....V	.....	.....V	
SeSNPV	..VI...R	.....F	.....	.....V	.....V	.....T	
AcSNPV	..VV...R	.....K	.....	.....V	.....D	.....W	180
HaSNPV	VMNLHABYTN	SFEDFITNVI	WENFYKPIVY	VGTDSAEEEE	ILLEVSLIFK	IKEFAPDAPL	
HzSNPV	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
BsSNPV	.....S	.....E.NR	.....	.....	.....V	.....V	
OpSNPV	.....	.....E.NR.H	.....	.....	.....V	.....	
MmSNPV	.....S	.....E.NR	.....	.....	.....	.....	
SeSNPV	.....S	.....E.NR	.....	.....G	.....L.V	.....	
AcSNPV	I...S	.....Q.DR	.....	.....I	.....	.....V	240
HaSNPV	YTGPAY	246					
HzSNPV	.....						
BsSNPV	.....						
OpSNPV	..S.K						
MmSNPV	..N						
SeSNPV	..N						
AcSNPV	F.....						

图5 7种杆状病毒多角体蛋白的氨基酸排列比较。  
 氨基酸以单字母代码表示。点显示相同的氨基酸。星号显示 HaSNPV 与 HzSNPV 之间唯一的氨基酸差别。  
 Figure 5 Amino acid alignment of seven baculovirus polyhedrins. The one-letter code designation for amino acids is used. The dots denote identical aminoacids. The asterisk indicates the only one different amino acid between HaSNPV and HzSNPV.

- 6 McCuchen BF, Choudary PV, Crenshaw R *et al*. Development of recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin; potential for pest control. *Bio/Technology*, 1991, 9:845~852
- 7 Vlak JM. Genetic engineering of baculoviruses for pest control. In: Whitten MJ and Oakeshott JM eds. *Molecular approaches to pure and applied entomology*, Springer-Verlag, 1993. 90~127
- 8 Miller LK. Baculovirus as gene expression vectors. *Annual Review of Microbiology*, 1988, 42:177~199
- 9 Vlak JM, Rohrmann GF. The nature of polyhedrin gene. In: *viral insecticide for biological control*. Maramorosch K and Sherman KE eds. Academic Press, 1985, 489~544
- 10 Zanotto PM, Kessing BD, Maruniak JE. Phylogenetic interrelationship among baculoviruses. Evolutionary rates and host associations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1993, 62: 147~162

- 11 O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. Baculovirus expression vectors. New York, WH Freeman and Company, 1992.
- 12 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 13 Cowan P, Bulach D, Goodge K *et al.* Nucleotide sequence of the polyhedrin gene region of *Helicoverpa zea* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus; placement of the virus in Lepidopteran nuclear polyhedrosis virus group II. Journal of General Virology, 1994, 75: 3211~3218
- 14 Rohrmann GF. Baculovirus structural proteins. Journal of General Virology, 1992, 73: 749~761
- 15 Hu ZH, Liu MF, Jin F *et al.* Nucleotide sequence of the *Buzura suppressaria* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene. Journal of General Virology, 1993, 74: 1617~1620
- 16 Leisy DJ, Nesson M, Pearson M *et al.* Location and nucleotide sequence of the *Orgyia pseudotsugata* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene. Journal of General Virology, 1986, 67: 1073~1079
- 17 Cameron IR, Possee RD. Conservation of polyhedrin gene promoter function between *Autographa californica* and *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus. Virus Research, 1989, 12: 183~200
- 18 van Strien EA, Zuidema D, Goldbach RW *et al.* Nucleotide sequence and transcription analysis of the polyhedrin gene of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. Journal of General Virology, 1992, 73: 2813~2821
- 19 Hooft van Iddelkinge BJL, Smith GE, Summers MD. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, 1983, 131: 561~565
- 20 Jarvis DL, Bohlmeier DA, Garcia AJr. Enhancement of polyhedrin nuclear localization during baculovirus infection. Journal of Virology, 1992, 66: 6903~6911

## Nucleotide Sequence Analysis of the Polyhedrin Gene of *Heliothis armigera* Single Nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus

Chen Xinwen<sup>1</sup> Hu Zhihong<sup>1</sup> Just M Vlask<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

<sup>2</sup>(Department of Virology, Wageningen Agricultural University,  
Binnenhaven 11, 6709 PD Wageningen, the Netherlands)

The polyhedrin gene of the *Heliothis armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (HaSNPV) was localized by Southern blot hybridization with a probe from the *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) polyhedrin gene. Nucleotide sequencing showed the open reading frame of the HaSNPV polyhedrin gene was 738 nt, encoded 246 amino acids with a predicted size of 29 kDa. Alignment with polyhedrin sequences in GENE Bank indicated the highest homology with the polyhedrin gene of *H. zea* SNP (HzSNPV). There were four different nucleotides and only one change (nt 197 C→A) resulted in an amino acid change in HzSNPV (Thr →Lys). This change did not alter the secondary structure of the molecule. The promoter regions of both polyhedrins were identical including the location of the ATAAG core element, where the transcription starts. The amino acid homology with other SNPs and with MNPVs polyhedrins was much lower. The results indicate that HaSNPV and HzSNPV are probably variants of a single baculovirus genotype.

**Key words** *Heliothis armigera* SNP, Polyhedrin gene, Nucleotide sequence