

粘虫核型多角体病毒凋亡抑制基因的定位、 序列和启动子结构*

彭艳华 杨复华 齐义鹏** 黄永秀

2939.44

(武汉大学病毒研究所, 武汉 430072)

摘要 以 AcNPV 凋亡抑制基因 p35 为探针, 与 LsNPV DNA 的限制性片段和 LsNPV DNA EcoRV 片段杂交, 发现 EcoRV 5.5 kb 片段有强烈的杂交信号。将此片段亚克隆后, 测定了 1 244 bp 序列, 发现一个完整的 ORF, 推导的 302 个氨基酸与 AcNPV p35 蛋白有 70.4% 的氨基酸同源性, 证明所测 ORF 为 LsNPV 的 p35 基因。结构分析发现其 5' 端有早期基因启动子元件 GC、ACGT 和 TATA box。有 22 bp 的顺向重复序列, 包括由两个重叠的 TATA box 和上下游两个 ACGT motif 组成的两套启动子元件, 这些结构特征与 AcNPV 的凋亡抑制基因十分相似。

关键词 杆状病毒, 凋亡抑制基因, 基因定位, Southern 印迹, 序列分析, 启动子结构

细胞凋亡 (Apoptosis) 又称细胞程序性死亡 (Programmed cell death), 是细胞受内外刺激后由基因调控的自杀过程, 它是维持机体稳态的主要机制之一。无论是病理状态还是正常生理状态下的细胞凋亡的研究都有重要理论和现实意义^[1], 特别是对 AIDS 病及癌症的治疗, 延缓机体衰老可能带来重大突破^[2]。目前, 在杆状病毒、腺病毒、疱疹病毒和逆转录病毒等病毒中都发现了与细胞凋亡相关的基因^[1-4]。首蓆银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV) 的细胞凋亡抑制基因 p35^[4] 不仅可抑制寄主细胞、幼虫、蛹和成虫的细胞凋亡, 而且对人神经细胞的凋亡有同样的抑制作用, 并且可能还与病毒的寄主范围和 DNA 复制有关。很有可能在生命进化的历史长河中, 从病毒、线虫, 到昆虫、植物、动物以至人的细胞凋亡机制都是高度保守的^[1]。虽然对 AcNPV p35 基因研究比较深入, 但仍存在不少问题, 如 p35 基因作用的靶细胞、细胞的信号传递、基因的转录控制、调控过程中的调节因子、其它杆状病毒是否存在与 AcNPV p35 的同功同源基因、p35 基因的多功能与细胞凋亡抑制功能的关系等。因此, 以中国特有的一种杆状病毒粘虫核型多角体病毒 (LsNPV) 为材料, 寻找与 AcNPV p35 同源的基因, 探索其与寄主细胞凋亡、病毒复制、寄主范围的关系具有重要的意义。

1 材料与方 法

1.1 材料

LsNPV 和 *E. coli* TG1 为本室保存, AcNPV p35 基因载体由美国 Georgia 大学 Miller 教授赠送; 限制性内

收稿日期: 1998-03-2, 修回日期: 1998-08-24

* 国家自然科学基金资助项目

** 联系作者

切酶、随机引物标记试剂盒、银染测序试剂盒为 Promega 或华美公司产品; ^{32}P dCTP 从中国科学院华瑞公司购买。

1.2 方法

碱法小量提取质粒 DNA, 按 Summers^[5] 程序提取病毒粒子 DNA, 用低融点琼脂糖回收 DNA 片段, 随机引物法制备放射性 DNA 探针, 按《分子克隆实验手册》所述方法^[6] 进行 DNA 克隆转化、原位杂交和 Southern blot。按银染测序试剂盒说明书用 ddNTP/PCR/银染色测序, 并用 DNAsis 和 PROsis 软件分析所测序列的同源性、启动子结构和氨基酸组成等。

2 实验结果

2.1 LsNPV DNA 的限制性消化和 p35 基因的 Southern 杂交定位

LsNPV DNA 经 EcoRV、EcoRI、XhoI 和 HindIII 分别完全消化(图 1a)。EcoRI 酶切得到 20 个片段, 分别为: 20.1、18.5、15.0、12.6、10.2、10.2、8.9、8.1、7.5、7.5、7.0、6.7、6.4、5.8、5.4、5.0、4.8、4.1、3.8、3.1 kb, 共计 153.5 kb。EcoRV 酶切得到 19 个片段, 分别为: 21.7、16.9、14.85、12.6、10.2、9.1、8.4、8.4、7.6、7.3、6.5、5.5、5.5、4.8、4.3、4.3、3.6、3.2、2.6 kb, 共计 157.0 kb。XhoI 酶切得到 21 个片段, 分别为: 16.4、14.3、12.2、11.2、8.8、8.5、7.85、7.3、7.3、6.7、6.7、6.4、5.8、5.58、5.5、4.98、4.3、3.8、3.5、3.2、2.1 kb, 共计 153.21 kb。HindIII 酶切得到 16 个片段, 分别是: 22.1、18.2、17.1、15.1、12.1、11.1、8.5、8.5、7.3、7.2、7.0、5.7、5.3、5.0、4.8、3.5, 共计 158.7 kb。转膜后与 AcNPV p35 基因探针杂交, 结果如图 1b, 可见 AcNPV p35 基因探针与 LsNPV DNA 的 4 种限制性内切酶切的某些片段产生较强的杂交信号, 它们分别是: EcoRV-5.5 kb, EcoRI-5.0 和 3.8 kb, XhoI-3.5 和 2.1 kb, HindIII-3.5 和 5.0 kb。

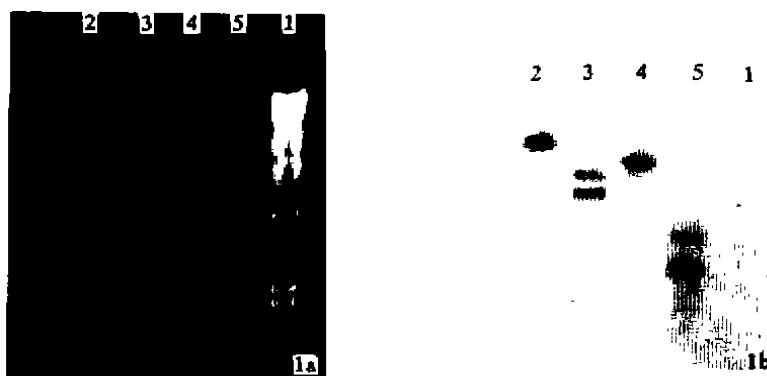


图 1 LsNPV DNA 的限制性消化及 Southern blot

Fig.1 Restriction digestion of LsNPV DNA and Southern hybridization

1: λ DNA/HindIII; 2. EcoRV; 3. EcoRI; 4. HindIII; 5. XhoI

2.2 LsNPV DNA 限制性片段的随机克隆和 p35 基因的原位杂交定位

为了确证 Southern blot 结果, 我们将 LsNPV DNA 的 EcoRV 单酶切混合产物 19 个片段, 分别插入 pBluescript DNA 的同一位点, 获得随机克隆片段文库。将随机克隆的重组菌落与 AcNPV p35 基因探针进行两轮原位杂交, 随机挑选有杂交信号的菌落 16 个, 提取质粒 DNA

并电泳,发现其大小一致,约8.5 kb,根据 Southern 结果,估计其中应含有 EcoRV 的 5.5 kb,将此阳性重组质粒命名为 pLsEv5.5。

2.3 重组质粒的鉴定和插入片段的物理图谱

阳性重组质粒 pLsEV5.5 DNA 经 EcoRV 酶切释放一条 5.5 kb 插入片段与一条 2.96 kb 载体片段,转膜后再用 AcNPV p35 基因探针进行 Southern blot,结果在 5.5 kb 位置有强烈杂交信号(照片省略),获得了与第一次 Southern 杂交和原位杂交相同的结果。因此,我们认为重组质粒 pLsEv5.5 中的插入片段可能含有与 AcNPV p35 同源的基因。回收 5.5 kb 片段,用不同的限制性内切酶单、双酶消化,发现 EcoRI、XhoI、Hind III、Bgl II 和 Hinc II 等 5 种酶在此片段上仅有一个切点,SalI 有 5 个切点,结果见图 2 和表 1。



图2 阳性重组质粒 pLsEv5.5 DNA 的酶切图谱 a.单酶切 b.双酶切

Fig. 2a A single digestion of 5.5 kb positive clone fragment with endonuclease
1. SalI; 2. EcoRI; 3. XhoI; 4. ADNA by Hind III; 5. Hind III; 6. Bgl II; 7. Hinc II.

Fig. 2b Double digestion of 5.5 kb positive clone fragment with endonuclease
1. XhoI + Bgl II; 2. XhoI + SalI; 3. Hind III + XhoI; 4. ADNA by Hind III;
5. EcoRI + SalI; 6. Bgl II + SalI; 7. Hind III + EcoRI; 8. Hinc II + Bgl II.

表1 pLsEv5.5 中插入片段的单酶和双酶消化结果

Table 1 Single and double digestion of 5.5 kb insert fragment in pLsEv5.5

单酶消化 Single digestion	片段数 Number of fragments	片段大小(kb) Sizes of fragments (kb)	双酶消化 Double digestion	片段数 Number of fragments	片段大小(kb) Sizes of fragments (kb)
EcoRI	2	2.0, 3.5	XhoI-Bgl II	3	0.6, 0.6, 4.3
XhoI	2	0.6, 4.9	Hind III-XhoI	3	0.6, 0.65, 4.25
Hind III	2	1.25, 4.25	Hind III-EcoRI	3	0.75, 1.25, 3.5
Bgl II	2	0.6, 4.9	Bgl II-SalI	7	0.2, 0.6, 0.7, 0.71, 0.72, 0.76, 1.8
SalI	6	0.2, 0.71, 0.72, 0.76, 1.3, 1.8	XhoI-SalI	7	0.2, 0.4, 0.71, 0.72, 0.76, 1.2, 1.3
Hinc II	2	2.1, 3.4	EcoRI-SalI	7	0.2, 0.2, 0.51, 0.72, 0.76, 1.3, 1.8
			Hinc II-Bgl II	3	0.6, 1.5, 3.4

根据上述结果,按文献^[7]提出的双酶消化法构建 DNA 物理图谱的三三规则构建了此 5.5 kb 片段的物理图谱(图 3)。

2.4 LsNPV *p35* 基因序列和推导的氨基酸序列

AcNPV *p35* 基因长 1.25 kb, 因此估计在 LsNPV EcoRV 5.5 kb 片段中 *p35* 基因仅占约 1/5。

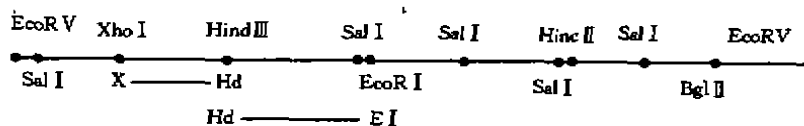


图 3 pLsEv5.5 中的 5.5 kb 插入片段的物理图谱和亚克隆策略

Fig.3 The physical map and subcloning of 5.5 kb insert fragment in pLsEv5.5

EI: EcoRI; X: XhoI; Hd: HindIII

为了测定 *p35* 基因序列并推导其氨基酸序列, 我们采用随机散弹法并根据 dot blot 杂交结果, 测定了 XhoI-HindIII 和 HindIII-EcoRI 两个亚片段共 1 244 bp 序列(图 4)。用 DNAsis 和 PRO-sis 软件分析, 发现了一个完整的 ORF, 从 5' 端 198 bp 的 ATG 起始到终止密码 TAA 的 T 止共 906 bp, 编码 302 个氨基酸。终止密码区有两个 poly A 加尾信号 AATAAA。此 ORF 与 AcNPV *p35* 基因的核苷酸同源性和氨基酸同源性分别为 80.4% 和 70.4%, 证明所测序列为 LsNPV 的 *p35* 基因。

2.5 LsNPV *p35* 基因启动子的结构分析

经计算机用 DNAsis 软件分析发现, LsNPV *p35* 基因与 AcNPV *p35* 基因启动子结构十分相似, 几乎在同一位置发现有两个 TATA box, 其上游有两个 ACGT motif, 再上游有两个 GC motif, 这是杆状病毒早期基因的典型启动子结构。AcNPV *p35* 和 LsNPV *p35* 基因启动子区 37 bp 中仅有 3 个核苷酸不同, 将它们在此区域的特征序列比较如下:

LsNPV: -132 GCGCG/GCGCG/ACGT/ACGT-GA-GCGT/T-T-TATATTATAAAT/70

AcNPV: -132 GCGCG/GCGCG/ACGT/ACGT-GA-ACGT/T-T-TATATTATTATA/70

另外, LsNPV *p35* 基因有两个从 ACGT 起始紧密相连的 22 bp 顺向重复序列, 每个重复序列中在 ACGT 之后是两个重叠的 TATA box。因此, *p35* 基因包括两套启动子单元, 似乎这一基因的典型早期启动子结构是双拷贝的, 而每份拷贝又各具有两个重叠的 TATA box 和上下游两个 ACGT motif, 即:

-88 ACGTTTATATTATAAATATTCAACGTTTATATTATAAATATTCAACGT

有趣的是 AcNPV *p35* 基因的 5' 端也有非常相似的 22 bp 顺向重复结构。

3 讨论

为准确定位 LsNPV 的 *p35* 基因, 我们用 AcNPV *p35* 基因探针进行了 Southern blot 和二轮 Dot blot 杂交, 所选阳性克隆再经 Southern blot 杂交, 证明 LsNPV EcoRV5.5 kb 片段含有 AcNPV *p35* 基因的同源序列。物理图谱的构建为此片段的亚克隆提供了前提。序列分析证实, 该片段上含有一完整的开放阅读框架, 它与 AcNPV *p35* 基因核苷酸同源性和氨基酸同源性分别为 80.4% 和 70.4%, 结果提示此 ORF 为 LsNPV 的 *p35* 基因。到目前为止, 已经报


```

      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Acp35 616 GCCCAAATTGGTCGACGAAACGCAACGACTACTACGT-----GGCGGTATGCGTGTGAA 669
      P G L E N S S F Q V L S F E Y N P D C Y
Lsp35 658 GCCAGGCTTGGAGAACAGCAGCTTCCAAGTGCTATCTTTGAGTACAACCCGATTGTTA 717
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Acp35 670 GCCGGGATTTGAGAACGCGCAGCAACCAAGTGTATCTTTGAGTACAACCCGATTGTTAA 729
      K V I V P F G H E I G V T G C L D D D V
Lsp35 718 CAAAGTTATTGTGCCGTTTGGTCACGAAATTGGCGTCACGGGATGTTTAGACGACGACGT 777
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Acp35 730 CAAAGTTATTGTGCCGTTTGGCTCACGAAATTAACGACACGGGACTTTACGAGTACGACGT 789
      A A K Q D S V E E E R A K A E N R V Q S
Lsp35 778 CGCAGCGAAGCAGGACAGTGTGAGGAAGAGCGCGCAAAGGGCGAAAACCCGTCAGAG 837
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Acp35 790 CGTAGCTTACGTGGACAGTGTGCAGTTTGATGGCGAACCAATTGAAGAGTTTGTGCAGAG 849
      L M P P C C F K N S E N L L C W G E A S
Lsp35 838 TTTAATGCCCGCTGTGCTTCAAAAATTCGGAAAACCTTTTGTGTTGGGGCGAAGCGTC 897
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Acp35 850 TTTAATATTCGGTCGTGCTTCAAAAATTCGGAAAAGGTTTTATATTACAACGAAGCGTC 909
      K N K S M W Y N P K E F T T E C R W P K
Lsp35 898 GAAAAACAAAAGCATGTGGTACAACCCAAAACAGTTTACTACAGAATGCAGATGGCCAA 957
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Acp35 910 GAAAAACAAAAGCATGATCTACAAGGCTTTAGAGTTTACTACAGAATCGAGCTGGGGCAA 960
      S Q N N N W K I F C N R F I Y D K K R K
Lsp35 958 ATCCAAAACAATAATTGAAAAATTTTTGTAAACCGTTTTATTTATGATAAAAAAGAAA 1017
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Acp35 970 ATCCGAAAAGTATAATTGAAAAATTTTTGTAAACCGTTTTATTTATGATAAAAAATCAAA 1029
      V L Y V E L H N V T S A L N K W V I F N
Lsp35 1018 AGTGTGTATGTTAAATGACACAATGTAACCTAGTGCCTCAACAAAAATGTTATATTTAA 1077
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Acp35 1030 AGTGTGTATGTTAAATGACACAATGTAACCTAGTGAACCTCAACAAAAATGTAATATTTAA 1089
      T I K L M
Lsp35 1078 CACAATTAATAATGTAATAAATTTATTGACCATAATTAATAAATGACAAGCAATGACAA 1139
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Acp35 1090 CACAATTAATAAATGTTAAATTTATTGCTAATATTATTTGTGTCATTGCTTGTGATTT 1149
Lsp35 1138 AATAATAT-TAGGCAATAAATTTAACATTTATTTAATTGTGTTAATAATTACATTTTTG 1196
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Acp35 1150 ATTAATTTGGATGATGTCATTGTTTTTAAATTTGAACTGGCTTTACGAGTAGAATTCTA 1209
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Lsp35 1197 TTGAGTGCACTAGTTACATTGTGCAATTT 1224
Acp35 1210 CGCGTAAAACACAATCAAGTATGAGTCAT 1238

```

图4 LsNPV p35基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列及与AcNPV p35基因的比较

Fig. 4 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the LsNPV p35 gene

The nucleotide sequence of AcNPV p35 gene is shown below the nucleotide sequence of LsNPV p35 gene. Two dots indicate an identical nucleotide, and the deduced amino acid sequence of LsNPV p35 are shown above the corresponding nucleotide sequence. The stop codon of the LsNPV p35 gene and the poly A signal sequence AATAAA are underlined

道的杆状病毒凋亡抑制基因有 AcNPV^[1]和 BmNPV^[4]的 p35 基因, 黄杉毒刺蛾核型多角体病毒 (OpNPV)^[8]和苹果卷叶蛾颗粒体病毒 (CpGV)^[9]的 iap 基因。我们的研究表明 LsNPV 中存在与 AcNPV p35 基因同源的基因, 它具有杆状病毒早期基因的特征性转录起始元件 ACGT, 即具有典型的早期基因启动子特征。根据王家旺等报道^[10], ACGT 和 CAGT 都是早期基因启动子的组成元件, 但 ACGT 在 TATA box 上游, CAGT 在 TATA box 下游, 本文报道的 p35 基因符合这一特征。LsNPV p35 基因启动子区的 22 bp 顺向重复序列中的两套启动子元件是很有特色的结构, 很可能这一特征性结构保证了 p35 基因的强转录和多点起始。这种特征性结构除 AcNPV 和 LsNPV p35 基因外, 在其他基因中极为少见, 因此, 它可能与特异性的凋亡抑制有关。本工作为下步 LsNPV p35 基因的功能研究奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Roy N, Mahadevan M S, Mclean M *et al*. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell*, 1995, 80:167~178
- 2 Clem R J, Robson M, Miller L K. Influence of infection route on the infectivity of baculovirus mutants lacking the apoptosis-inhibiting gene p35 and adjacent gene p94. *J Virol*, 1994, 68(10):6759~6772
- 3 Clem R J, Fechtner M, Miller L K. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science*, 1991, 254:1388~1390
- 4 Kimita S G, Mijima K, Maeda S. Identification and characterization of p35 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. *J Virol*, 1993, 67(1):455~463
- 5 Summers M D, Smith G E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agric Exp Sta Bwll. 1987, 33~35
- 6 萨姆布鲁克 J, 费里奇 E F, 曼尼柯蒂斯 T. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1993
- 7 齐义鹏, 黄永秀. 大尺蠖核型多角体病毒 DNA 的限制性消化和物理图谱. *病毒学报*, 1987, 3(3):264~269
- 8 Noteborn M H M, Todd D, Verschuere C A J *et al*. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *J Virol*, 1994, 68(1):346~351
- 9 Birnbaum M J, Clem R J, Miller L K. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol*, 1994, 68(4):2521~2528
- 10 王家旺, 齐义鹏, 黄永秀等. 杆状病毒早期基因的结构与功能. *病毒学报*, 1995, 11(3): 285~287

Location, Sequence and Promoter Structure of Apoptosis-Inhibiting Gene of *Leucania seperate* Nuclear Polyhedrosis Virus

Peng Yanhua Yang Fuhua Qi Yipeng Huang Yongxin

(*Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072*)

Abstract LsNPV DNA restriction fragments were hybridized with *p35* gene fragment of AcNPV. The 5.5 kb fragment of LsNPV was cleaved by single and double digestion and its physical map was constructed. After subcloning and sequencing, a intact ORF that is 906 bp in length, deduced amino acids are 302 in number was found. There are GC, ACGT motif and TATA box which are specific sequence of promoter of baculoviruses early gene. This ORF of LsNPV was compared with *p35* gene of AcNPV, and 80.4% nucleotide sequence homology and 70.4% amino acid sequence homology were found between two genes. Furthermore, in its promoter region there is 22 bp forward repeat, including 2 sets of promoter units, each is composed of 2 overlapping TATA box and 2 sets of ACGT motif in the upstream and the downstream of TATA box.

Key words Baculovirus, Apoptosis-inhibiting gene, Location of gene, Southern blot, Sequence analysis, Structure of promoter