

(10)

59-65

油桐尺蠖核型多角体病毒 DNA 聚合酶
基因的克隆和序列分析*

龚 岷, 李暉东, 梁布锋**

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

Q78
Q939.4

摘要:用 PCR 方法从油桐尺蠖核型多角体病毒(BusuNPV)中扩增出 DNA 聚合酶基因片段,经 pGEM-T 载体克隆到大肠杆菌 DH5 α 菌株中。经自动序列分析仪测出 DNA 聚合酶基因 2 379 bp 长的核苷酸序列,推导出 793 的氨基酸序列。氨基酸同源性比较显示,BusuNPV 与 HzSNPV 的同源性最高,达 57%;与 OpMNPV 的同源性最低,为 39.6%。

关键词:油桐尺蠖核型多角体病毒; DNA 聚合酶; PCR 扩增; 序列分析

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5125(2000)01-0059-07

油桐尺蠖是一种重要的农林作物害虫,危害遍及我国南方 13 个省的多种植物,包括油桐、茶树、水杉、柑橘等。油桐尺蠖核型多角体病毒(*Buzura suppressaria* single nucleocapsid NPV, BusuNPV)是其特异性病毒,在害虫的生物防治中取得了良好的社会效益和经济效益。BusuNPV 是我国特有的杆状病毒,其基因组为双链 DNA,长约 129 kb。目前对 BusuNPV 基因组进行了一系列研究,已完成了 BusuNPV 物理图谱的构建^[1],BusuNPV 多角体基因^[2]、egt 基因的测序^[3]及 50 多种基因的定位和部分序列测定^[4]。杆状病毒 DNA 聚合酶基因所编码的 DNA 聚合酶是杆状病毒能正确和高效复制所需的基本因子之一。BusuNPV 的 DNA 聚合酶基因的研究,对于 BusuNPV 的复制机理的研究以及杆状病毒系统分类工作有重要意义。本研究报道了 BusuNPV 的 DNA 聚合酶基因片段的克隆和序列分析,并与 AcMNPV、BmNPV、CfMNPV、OpMNPV、HzSNPV、LdMNPV 的氨基酸序列进行了同源性比较。

1 材料与方法

1.1 病毒基因组 DNA 的制备

BusuNPV 由本室提供。多角体粗悬液经差速离心、碱解、酚和氯仿抽提后,取上清加入 2 倍体积的无水乙醇进行沉淀,沉淀经离心、空气干燥后,溶于 TE 中,-20℃保存备用。

1.2 酶类及试剂

TaqDNA 聚合酶、dNTP 及 Sall、SphI 限制性内切酶均为 TaKaRa 公司产品。T₄DNA 连接酶由 Promega 公司提供。

收稿日期:1999-05-04 修回日期:1999-07-09

* 中国科学院生物区系分类资助的课题

** 作者简介:龚岷(1973-),女,上海市人,硕士研究生,研究方向为基因工程及生物工程下游技术。

通讯作者简介:梁布锋(1947-),男,广东省人,研究员,硕士,研究方向为病毒的生理生化。

1.3 质粒和菌种

质粒 pGEM-T 为 Promega 公司产品。大肠杆菌 DH5 α 由本室保存。

1.4 引物设计及 PCR 反应

根据已报道的 AcMNPV^[5]、CfMNPV^[6]、LdMNPV^[7] 的 DNA 聚合酶基因中的保守区域序列, 设计出基因扩增引物。引物序列 I: 5'-AACAGGGTGCATATGCAAA3', 引物序列 II: 5'-TTTTAACCAACTAATTTT3'。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 51 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环完成后 72 $^{\circ}$ C 10 min, 取 5 μ L PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 溴化乙锭染色后在紫外灯下观察。

1.5 DNA 聚合酶基因的分子克隆和序列测定

将 PCR 产物克隆于 pGEM-T 载体中, 转化 DH5 α 菌株, 连接、转化和筛选重组子的工作均按文献进行^[8]。选取阳性重组子, 在 ABI377 型全自动 DNA 序列分析仪上进行正、反两个方向测序, 所用的引物分别是 T7 引物和 Sp6 引物。

2 结果

2.1 BusuNPV DNA 聚合酶基因的 PCR 扩增

对 BusuNPV 基因组 DNA 进行 DNA 聚合酶基因扩增后, 产物经电泳检测, 并与 λ DNA/Hind III 标尺进行比较, 可见扩增带略大于 2 322 bp (图 1)。PCR 产物经纯化、回收后, 与 pGEM-T 载体连接、转化, 筛选获得阳性重组子, 定名为 pDNAP。对阳性重组子分别用 SalI、SalI 和 SphI 进行单酶切及双酶切。双酶切后可切出一个与预期的扩增片段大小相符的片段。随后又对菌落进行 PCR 筛选, 在约 2.4 kb 处可见一条明显扩增带, 从而经一步确证了所克隆的片段即为 BusuNPV 的 DNA 聚合酶基因 (图 2)。



图 1 BusuNPV DNA 聚合酶基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of BusuNPV DNA polymerase

- 1 λ DNA/Hind III Marker;
- 2.3 PCR product;
- 4 PCR negative control.



图 2 重组质粒的酶切鉴定, PCR 扩增

Fig. 2 Restriction analysis, PCR amplification of recombinant plasmid

- 1 λ DNA/Hind III Marker;
- 2 pDNAP SalI digest;
- 3 pDNAP SalI/SphI digest;
- 4 PCR product of pDNAP;
- 5 pGEM-T SalI digest.

2.2 BusuNPV DNA 聚合酶基因序列测定及氨基酸同源性比较

质粒 pDNAP 在全自动 DNA 序列分析仪上进行正、反两个方向测序,测得 2 379 bp 长的核苷酸序列(图 3)。由此推导出其氨基酸序列(图 4),并与已报道的 AcMNPV^[5]、CfMNPV^[6]、LdMNPV^[7]、HzSNPV^[9]、BmNPV^[10]、OpMNPV^[11]的氨基酸序列进行同源性比较(表 1)。

1	AACAGGGTGC	ATATGCAAAC	AAACCTGATC	GAAGGACAAC	ATGTAAAATT	TCGTCAAGCA
61	CAACCGTGTT	CGTCGAATTG	TCGTGTAAAT	TGTGCGGGTC	TCACCGATCC	TGACATGGTT
121	AACAAGATGT	TTTACACAGT	GTCTATGGAA	AGTTTAAAAC	GCGAAATTGT	GCCAGTGATT
181	GTGGCCTACG	ATATTGAAAC	ACATTGGAAC	GGTCAAACGAT	TTTCGAATGC	ACAAGAAGAT
241	CGTATCATGT	CCATT TCAAT	AGTGATGCGG	CGCGACAATA	TCAATACSCG	TCTTTGTTTT
301	TACCACATGC	AAGGCGCGGA	CGATTTGAAT	CAAGAGACCA	CAATTGCCGC	TTTTGATGTA
361	ACCAAAATAA	ACACAATT CG	TTTTGACGAT	GAATTTGACG	TGTGTAAAGC	GTTTTTTGAA
421	CTGTTGCCGC	TTTTAAACGG	TGATTATTTA	CTCGACTACA	ATGGCGACAA	ATTGACATG
481	CCTTATATTT	TAGATCGCAT	TAAGGTGTTA	ACAAATGCGA	CTTATTGTCA	ACAAGCAAAA
541	CGTGGCGCGC	TTTGCCACGA	AAAATTTTGC	ATGATTGCTC	GTTATAATCT	CGATCCGGTG
601	CCGATTGAAA	AACAAGATTT	GCACGATAAA	TTTAATAACC	AATTGAGCAA	TCATTTACTC
661	ACATAATTATG	TTACAGTTGA	TTTGTATCAA	TTTTTGGCG	CAGATCCGGA	ACATAAAAAT
721	CTTGAAAATT	TTCAACTAAA	CACGGTGGCA	GAACATTATC	TGAACGAGTC	CAAAGTGGAT
781	CTTCCATCG	CCGAAATGTT	AAATTTGTAC	AACAATAACT	GCATCCGAAA	AATTATCGAA
841	TATAACATTC	AAGATAGCGT	ATTGCCAATT	GAATGTGTTT	TGAAACTGGA	AATAATGGAT
901	TTTCTTACA	CTCAATGTAT	GCTACTTAT	TTGTGTACAG	ACGATTGCT	TAGCAATATT
961	TCCACAAAA	TTAATATCGT	GTTTTTTTAT	CTATGTATAA	CCAACACAAA	CACAATAAAC
1021	GGTCCGGAAA	TATCCGATCC	TTTTATTTTT	AATAAAAACG	ATCTTAATAT	CACGTCGGGC
1081	AAGCGCAACA	CTACCTTCGA	CAACAGCAAT	AATCGTAACA	GCGTTAATGA	AACACGTACG
1141	GGTTTTGTGA	ATTTGGATTT	GCTGAAACGT	CAACCTGTTC	CAATTGAAAA	AATCCCAAGT
1201	GAAGCTGTCA	AATTGTGCAC	CACTCGGCCA	ATATGTAATT	ACAAAGGGGG	AAAAGTGCIT
1261	GCGCCTAAA	CGGGTCTCCA	AAAATGGGTG	GTGAOGCTGG	ATTTTAACTC	GCTCTACCTT
1321	ACCATTATGA	TGTACGAAGG	CGCCTGTTTT	TCAAATTTGT	TAATTGGTTC	CGATAATAAT
1381	GTGTATTIAG	TTAAAGATTC	GAACGCCATC	AATCCCAAAC	TGCTGGCAAC	GCTTTTAAAT
1441	TTGAGAACTA	CGTACAAAAA	CAAACGCGAC	ATTACAGAAA	AAAATTCGTT	TTTATACAAT
1501	TTATATGATA	CTTTGCAAAA	CGCGGTAAAA	CGAATTGCCA	ACAGTATATA	CGGTTATTTT
1561	GGTATATATT	TTAAAATACT	TGCAAAATAC	ATTACAAAAA	TCGGTCGCAA	GAAATTAATG
1621	GAGGAATTA	AAAAAATTGA	AGCAATGAGC	CAAGACGATG	TATTAGAGC	CAAGTTTCAC
1681	TTATCGAATA	TTGAGTTTCG	AGTAATTTAC	GGCGATACGG	ATTCTTCTT	TATTCAGITT
1741	TTGTTTAAAG	AAGACGAAT	TGCGGCCGAC	ATGCGTCAOG	AAATAATTA	AAAAATTGTC
1801	AACGATCATG	TGCTAAAAAA	ATTAAATGAT	TCGTCCGATG	GCAAAGGTTA	CAAAATGGCT
1861	CTTGAAAACG	TAATGTCTAA	TTTGATTTTA	CTTAAAAAGA	AAAATATTG	TTACTTAAAC
1921	AGCGAAAATC	GCATTAATA	CAAAGGCTGG	TTAATAAAAA	AAGATATGCC	CTATTTCATG
1981	CGAAAATCTT	TTGCGCCCGT	GGTCGATCTT	TTTAAACAATA	ACCAATCGGT	GGCGTGTGGT
2041	ATGAAAATTGC	TTATGGACAA	CATGTCCCAT	TATTATCCAA	ATATCCAAAC	ACGGCGGAT
2101	TGTAATTTAA	ATGACTACAA	GTTTCAAGC	ATGTCGTACA	ACGAAAATTC	TACCAGCAAA
2161	AAGAAAAACA	AAATCGGCGA	GCAAGCGGT	GAAAAGAAAAC	CGGTCATTAC	AATTGCTCGT
2221	CATTGTCCGG	AGTTGATGCT	CCAGGCTGGT	GTTAAAAATT	TGCCCGGCAA	TGGAGATCCG
2281	ATTCGGTTTT	TGCTCATCGA	CATAAACGCC	AGCATTACAA	AAAAGCGTA	TCCGCAAGCG
2341	TTGTTCTGTC	TTAACTTGAA	AAAAATTAGT	TGGTTAAAA		

图 3 BusuNPV DNA 聚合酶基因部分核苷酸序列(2 379 bp)

Fig. 3 Partial nucleotide sequence of BusuNPV DNA polymerase (2 379 bp)

		NRVHMOT	SEG	64F4	C	1		
BusuNPV	:	NRVHMOTNL	TEG	QHVKR	QAQT	CS	SNCRVNCAG-LT	DFDM
LdMNPV	:	NRVHMOTSL	LEG	OYVRE	KNAHAC	RDY	RLSHTA---	KDVHE
AcMNPV	:	NRVHMOTPE	VEG	AYMRE	KKTOR	CQNNY	VGGSTTRME	NLQH
			V	L	I6PV6	YDIETHS1G	S	
BusuNPV	:	VNKMFYT	VSMES	LKRE	IVPVI	VAY	YDIETHSNC	QRE
LdMNPV	:	FESMLER	VQVSALS	SHEL	LDVV	ACV	YDIETHSD	QRE
AcMNPV	:	FNEDFEL	VDENTL	TS	GIMPV	LSCY	YDIETHSD	GHNS
			D	I68I	V6	41	4	C
BusuNPV	:	DRIMSI	SI	VRR	DNINT	RL	CFYHMOG	ADDLNQE
LdMNPV	:	DFIIGI	AV	VR	DAADR	RI	CFEYS	DDDPVDLSS
AcMNPV	:	DCIMSI	GF	VY	KNDEY	AK	CFMYHK-LP----	NOI
			6	F	E	DM6	6	6
BusuNPV	:	VTKINT	IR	ED	EDMI	KAF	FE	LL
LdMNPV	:	APDTAA	VH	FR	GR	DMIA	AFF	OLL
AcMNPV	:	DDDTYV	VMS	QNE	SDMT	AF	EDMI	KIT
			6	P56	R	6	RY1L	
BusuNPV	:	MEYILD	RI	KVLT	NATY	COQ	AKR	ARV
LdMNPV	:	LESLT	GR	ANKL	----	CG	PAE	AARAT
AcMNPV	:	LEPYIL	GR	LNKT	----	KM	----	L
			1	K	N	6	Y	6
BusuNPV	:	VP	E	KODL	HDK	FENN	CS	NHLLT
LdMNPV	:	VNVVT	Q	QSY	DK	FENK	LH	SHYLT
AcMNPV	:	AAPT	T	KLE	F	INKL	G	NKV
			6	ENF	Q	L	N	T
BusuNPV	:	N	ENF	Q	L	N	T	V
LdMNPV	:	D	ENF	Q	L	N	T	V
AcMNPV	:	K	V	ENF	Q	L	N	T
			Y	N	6	D	6	Y
BusuNPV	:	E	X	N	Q	D	S	V
LdMNPV	:	E	X	N	Q	D	C	V
AcMNPV	:	K	Y	N	Q	D	C	M
			I	S	H	I	6	F
BusuNPV	:	I	S	H	K	I	N	I
LdMNPV	:	I	S	H	K	I	T	V
AcMNPV	:	I	S	H	L	I	S	V
			6	C	R	N	T	6
BusuNPV	:	T	S	C	A	S	T	S
LdMNPV	:	I	S	C	---	Q	F	K
AcMNPV	:	I	S	C	---	Q	F	K
			I	P	A	6	L	Y
BusuNPV	:	I	P	S	E	A	V	K
LdMNPV	:	I	P	S	E	A	V	K
AcMNPV	:	I	P	S	E	A	V	K
			L	Y	T	I	M	6
BusuNPV	:	L	Y	T	I	M	W	E
LdMNPV	:	L	Y	T	I	M	W	E
AcMNPV	:	L	Y	T	I	M	W	E
			L	R	5	K	R	D
BusuNPV	:	T	L	N	L	R	T	T
LdMNPV	:	T	L	S	E	M	R	V
AcMNPV	:	K	L	S	E	R	C	K
			Y	G	Y	6	I	5
BusuNPV	:	Y	G	Y	G	I	5	K
LdMNPV	:	Y	G	Y	G	I	5	K
AcMNPV	:	Y	G	Y	G	I	5	K

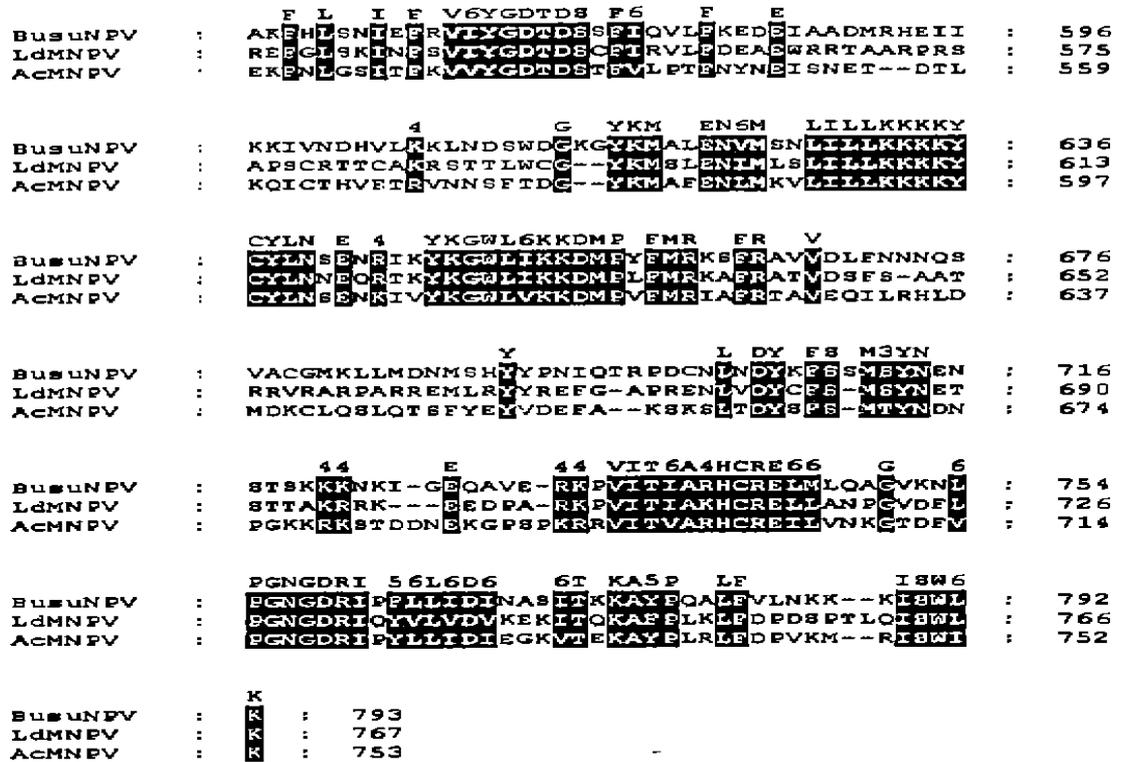


图 4 三种杆状病毒 DNA 聚合酶氨基酸同源性

Fig. 4 Alignment of amino acid sequence of the DNA polymerase gene of BusuNPV, LdMNPV, AcMNPV. Black represents similarity of aa subgroup.

表 1 杆状病毒 DNA 聚合酶氨基酸同源性比较

Table 1 Amino acid sequence similarity of baculovirus DNA polymerase

	HzSNPV	LdMNPV	AcMNPV	BmNPV	CfMNPV	OpMNPV
BusuNPV	57	52.3	42.24	41.99	40.73	39.60
HzSNPV		56.38	45.96	46.09	44.27	42.97
LdMNPV			44.72	44.85	42.11	43.29
AcMNPV				96.80	64.81	66.27
BmNPV					64.72	66.18
CfMNPV						84.97

The values were derived from the GCG gap program and indicated as percentage similarity

3 讨论

杆状病毒 DNA 聚合酶基因被认为是病毒复制所需要的基本因子之一,而不同的 DNA 聚合酶特异性也可能与病毒的宿主范围和毒力有关^[6]。该基因的结构与功能日益被人们所关注,近年来已有苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV)、舞毒蛾核型多角体病毒(LdMNPV)、家蚕核型多角体病毒(BmNPV)、云杉卷叶蛾核型多角体病毒(CfMNPV)、黄杉毒蛾核型多角体病毒(OpMNPV)、美洲棉铃虫核型多角体病毒(HzSNPV)和中国棉铃虫核型多角体病

毒(HearNPV)^[12]等杆状病毒的DNA聚合酶基因序列被研究。在它们的编码区内,有10个共同的保守区域^[11]。本研究所测定的编码区保守区域,与其他已报道的杆状病毒DNA聚合酶基因保守区域相吻合。这些保守区域也反映了不同杆状病毒在病毒复制时具有一些共同的功能。

PCR技术用于克隆基因片段已显现出其独特的优越性。单条虫增殖的病毒材料就足以作为模板,经PCR扩增后可以产生微克级的特异DNA片段,产物可以直接克隆到质粒载体上,免除了杂交基因定位需经历的制作限制性内切酶图谱、杂交、克隆、亚克隆等一系列过程。作者选用高保真的Taq酶,在10个保守区中,从第2至第10区,一次扩增出近2.4 kb长片段,占整个DNA聚合酶基因80%的区域,在这一区域中包含该蛋白的主要结构成分。迄今已有600多种杆状病毒被分离,有关杆状病毒的分子分类工作日益受到关注,已有报道用多角体基因和egt基因等非必需基因构建的分子进化树。相比较而言,DNA聚合酶基因是病毒进化中较早出现的基因,属于病毒复制的必需基因,更能代表杆状病毒的本身属性。另外,该基因较长,为多角体基因长度的4倍以上,在计算遗传距离时较后者更为精确,用于研究系统的分子进化可能更为有利。

参 考 文 献

- [1] Liu MF, Hu ZH, Liang BF *et al.* Physical mapping of *Buzura suppressaria* nuclear polyhedrosis virus genome [J]. *Archives of Virology*, 1993, 128:357~362
- [2] Hu ZH, Liu MF, Jin F *et al.* Nucleotide sequence of the *Buzura suppressaria* single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene [J]. *Journal of General Virology*, 1993, 74:1617~1620
- [3] Hu ZH, Broer R, Westerlaken J *et al.* Characterization of the ecdysteroid UDP glucosyltransferase gene of a single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Buzura suppressaria* [J]. *Virus Research* 1997, 47:91~97
- [4] Hu ZH, Arif BM, Jin F *et al.* Distinct gene arrangement in the *Buzura suppressaria* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79:2841~2851
- [5] Tomalski MD, Wu JG, Miller LK *et al.* The location, sequence, transcription, and regulation of a baculovirus DNA polymerase gene [J]. *Virology*, 1988, 167:591~600
- [6] Liu JJ, Carstens EB. Identification, location, transcription, and sequence analysis of the *Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase gene [J]. *Virology*, 1995, 209:538~549
- [7] Bjornson RM, Glocker B, Rohrmann GF *et al.* Characterization of the nucleotide sequence of the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus DNA polymerase gene region [J]. *J Gen Virol*. 1992, 73:3177~3183
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning: a laboratory manual* [M]. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Cowan P, Bulach D, Goodge K *et al.* Complete sequence of *Helicoverpa zea* nuclear polyhedrosis virus in GenBank database. 1994(accession numbers: V11242)
- [10] Chaerchomsri S, Ikeda M, Kobayashi M *et al.* Nucleotide sequence and transcription analysis of the DNA polymerase gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus [J]. *Virology*, 1995, 206:437~447
- [11] Ahrens CH, Rohrmann GF. The DNA polymerase and helicase genes of a baculovirus of *Orgyia pseudotsugata* [J]. *J Gen Virol*, 1996, 77:825~837
- [12] 王根,张传璞,季平等.中国棉铃虫核型多角体病毒DNA聚合酶基因的克隆和序列分析[J].*中国病毒学*, 1998, 13(1):77~82

Cloning and Sequencing of the *Buzura suppressaria* Nucleopolyhedrovirus DNA Polymerase Gene

GONG Min, LI Wei-dong, LIANG Bu-feng

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071, China)

Abstract: The DNA polymerase gene of *Buzura suppressaria* nucleopolyhedrovirus (BusuNPV) was amplified by PCR using virus DNA template. The amplified fragment was cloned into *E. coli* via plasmid pGEM-T. The fragment of insert was analyzed on an automated DNA sequencer. Its sequence showed that the insert has 2 379 nucleotides in length and 793 aa was predicated. Comparing with other six members of *Baculoviridae*, amino acid sequence of the DNA polymerase of BusuNPV has 57% similarity with HzSNPV, and 39.6% with OpMNPV.

Key words: *Buzura suppressaria* nucleopolyhedrovirus (BusuNPV); DNA polymerase; PCR amplification; Sequence analysis

新书《临床病毒学》即将出版

由裘法祖教授题词、陆德源教授作序、杨占秋教授等主编的《临床病毒学》一书将于 2000 年 3 月由中国医药科技出版社出版。全书分三部分:上篇介绍病毒与宿主细胞的相互作用、病毒致病机制、抗病毒免疫、诊断与治疗;中篇介绍常见病毒的特征、致病机制、临床特征、诊断与防治;下篇介绍常见的病毒学方法。全书约 55 万字,重点反映了 90 年代以来病毒学研究的新进展,是临床医学、病毒学工作者的必备参考书。该书暂定价 50 元。欲购者请与武汉市湖北医科大学病毒所肖红、文利同志联系,邮编 430071,电话 027-87331136//87331521。或与北京市中国医药科技出版社发行科联系,联系人薛军,邮编 100088,电话 010-62235640。