维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷4期 中国病毒学 16(4):350-354
2001年12月 VIROLOGICA SINICA December 2001

马尾松毛虫质型多角体病毒多角体蛋白基因的cDNA克隆及序列分析

杜建宇[1],张珈敏[1],郭海涛[1],张晓东[2],胡远扬[1**]

(1.武汉大学病毒研究所,湖北武汉 430072; 2.中国协和医科大学基础所,北京 100730)

Molecular Cloning and Sequencing of *Dendrolimus punctatus* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (DpCPV) polyhedrin gene

DU Jian-yu[1], ZHANG Jia-min[1], GUO Hai-tao[1], ZHANG Xiao-dong[2], HU Yuan-yang[1**]

(1. *Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan* 430072, *China*; 2. *Beijing Union Medical Academy, Beijing* 100730, *China*)

Abstract: CPVs belong to the genus *Cypovirus* in the family *Reoviridae* and infect midgut epithelial cells of the wide range of insects. For the synthesis of cDNA of *Dendrolimus punctatus* CPV (DpCPV) polyhedrin gene, the primers were constructed on the basis of the terminal RNA sequence of BmCPV segment 10, After RT-PCR, the amplified cDNA was cloned into the pGEM-T. The S10 cDNA of DpCPV was found to be 763 nucleotides in length with a single open reading frame in one strand capable of coding a predicted protein of 248 residues (Mr of 28411). Comparison of the nucleotide sequence of the polyhedrin gene of DpCPV with that of BmCPV showed that nucleotides homology is 89.3%, but there are only 6 amino acid differences between the two CPVs.

Key words: *Cypovirus*; *Dendrolomus punctatus*; Polyhedrin; RT-PCR

摘要:通过对马尾松毛虫质型多角体病毒的增殖、纯化,获得一株单一类型的质型多角体病毒。提纯的病毒粒子经SDS-酚抽提,琼脂糖凝胶电泳分离基因组dsRNDA,回收纯化第十片段S10。S10经DMSO变性,逆转录合成cDNA第一链,PCR扩增后,克隆在pGEM-T载体上。对重组子进行限制性内切酶分析及序列测定,结果表明,克隆片段全长763bp,起始密码AUG位于3~5残基,终止密码UGA位于747~749残基。推测DpCPV多角体蛋白基因编码248个氨基酸的多肽,分子量28kD。和家蚕质型多角体病毒(BmCPV)多角体蛋白基因相比较,核苷酸和编码氨基酸序列同源性分别为89.3%和97.6%。

关键词:马尾松毛虫;质型多角体病毒;多角体蛋白基因;序列分析

中图分类号:S763.421 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2001)04-0350-05

马尾松毛虫质型多角体病毒(*Dendrolimus punctatus* cytoplasmic polyhedrosis virus, DpCPV)是我国1973年首次分离的一种松毛虫质型多角体病毒[1],其后又陆续在油松毛虫、赤松毛虫、文山松毛虫、德昌松毛虫体内分离到[2]。马尾松毛虫是我国特有种类,在我国分布广,危害大。虽然DpCPV的应用研究开展得较为广泛,但其分子生物学水平的研究尚未见报道[3~5]。对DpCPV进行分子生物学研究不

* 收稿日期:2000-11-03,修回日期:2001-02-26

作者简介:杜建宇(1972-),男,河南省籍,硕士。

** 通讯作者:胡远扬(1949-),男,教授,研究方向为昆虫病毒分子生物学。Correspondence author.

维普资讯 http://www.cqvip.com

仅能够填补该领域研究空白,还可以比较DpCPV和本属其它成员间的同源和分子进化关系。本实验室在人工增殖DpCPV基础上,提取全基因组,对其第十片段S10进行cDNA克隆和序列测定(Genbank编号AF318306)。通过序列分析比较发现,DpCPV和家蚕质型多角体病毒(BmCPV)多角体蛋白基因的编码区存在80个核苷酸的差异,并且包括了所有的碱基替代类型。现将结果报告如下。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　病毒　马尾松毛虫质型多角体病毒(DpCPV)由本实验室保藏。

1.1.2　试剂　柱离心式胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司;cDNA合成试剂盒和PCR扩增试剂盒购自TaKaRa公司;pGEM-T载体试剂盒购自Promega公司;*E. coli* DH5α由本实验室保存;限制性内切酶为华美公司产品;RT-PCR引物由上海生工程公司合成,序列如下:

(+)5' TCATGGCAGACGTAGCAG3';(-)5' AGTTACACGAGCAATCACTG3'

1.2　方法

1.2.1　病毒的增值、纯化　参考Arella等人的方法[6],经过差速离心和蔗糖梯度离心,分别获得DpCPV河南株、湖北株和江西株。采用SDS-热酚法从病毒粒子中纯化RNA。

1.2.2　S10的分离纯化　江西株CPV核酸经1%的琼脂糖凝胶电泳分离,于紫外灯下切下含S10的凝胶,采用柱离心式胶回收试剂盒纯化。经无水乙醇沉淀后,溶于少量无RNA酶的ddh_2O中。

1.2.3　cDNA第一链的合成及其PCR扩增　取纯化的基因组单一片段S10 500ng溶于90%DMSO中,95℃加热5min使之变性。cDNA第一链合成参考Hagiware等人的方法[7],取500 ng RNA样品与合成的两条寡聚核苷酸引物各50 pmol,在70℃下退火,然后再加入dNTP、AMV反转录酶,合成cDNA第一条链。随后进行PCR扩增,加入引物各50pmol,TaqDNA聚合酶2.5单位,扩增条件:92℃变性30s,48℃退火90s,72℃合成60s,30个循环后,于72℃水浴放置10min使延伸反应充分进行。

1.2.4　cDNA克隆　用琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物,纯化DNA。按照pGEM-T载体系统操作手册,回收的PCR产物和载体DNA的量分别为300 ng和100 ng,连接1h。连接产物转化*E. coli* DH5α感受态细胞后,涂于含有Amp/IPTG/X-gla的平板。

1.2.5　重组质粒的筛选和鉴定　经选择培养基筛选,碱裂解法快速制备质粒DNA,酶切及琼脂糖凝胶电泳鉴定重组子。

1.2.6　DNA序列测定和分析　以cDNA阳性克隆子作模板,引物采用质粒载体上的通用引物,正、反向进行双链测序。自动测序由上海博亚公司完成。

2　结果

2.1　病毒的dsRNA图谱

分别提取马尾松毛虫CPV河南株以及湖北株和江西株的核酸,DpCPV-dsRNA在1%的琼脂糖凝胶电泳结果见图1。DpCPV河内南株和湖北株的核酸图谱均显示至少15条带,而江西株有9条带,和家蚕质型多角体病毒1型(BmCPV-1)基因组图谱一致。

2.2　S10的回收和RT-PCR

图2A中可以看到,回收的S10的迁移率与基因组中对应片段完全吻合。根据已发表的BmCPV-1 S10的全序列,合成5'及3'端引物。RT-PCR扩增结果见图2B,扩增产物大小约为760bp。

2.3　重组质粒的酶切鉴定

重组子限制性内切酶鉴定结果见图3。

2.4　序列测定和分析

S10 RT-PCR产物克隆片段的序列测定结果见图4:

图1　DpCPV基因组的琼脂糖凝胶电泳

1,DpCPV江西株dsRNA;2,DpCPV河南株dsRNA;3,DpCPV湖北株dsRNA。

Fig.1　DpCPV genome dsRNA in 1% agarose gel

1,DpCPV Jiangxi strain dsRNA;2,DpCPV Henan strain dsRNA;3,DpCPV Hubei strain dsRNA.

维普资讯 http://www.cqvip.com

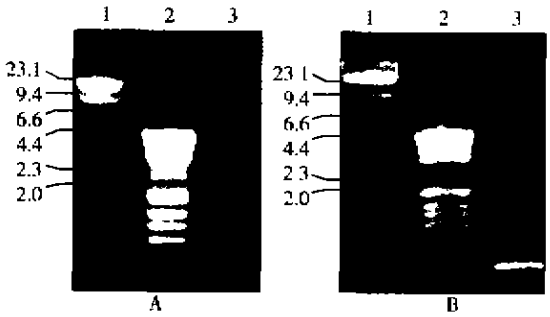

图2 DpCPV-1第10片段的回收和RT-PCR

A:1,λDNA/*Hin*d Ⅲ标准分子量;2,DpCPV基因组dsRNA;3,DpCPV第10片段dsRNA. B:1,λDNA/*Hin*d Ⅲ标准分子量;2,DpCPV基因组dsRNA;3,DpCPV第10片段RT-PCR扩增产物。

Fig.2 Separation and purification, RT-PCR amplification of DpCPV segment 10

A: 1, λ DNA/*Hin*d Ⅲ marker; 2, DpCPV genome dsRNA; 3, DpCPV segment 10. B: 1, λ DNA/*Hin*d Ⅲ marker; 2, DpCPV genome dsRNA; 3, RT-PCR amplification of DpCPV segment 10.

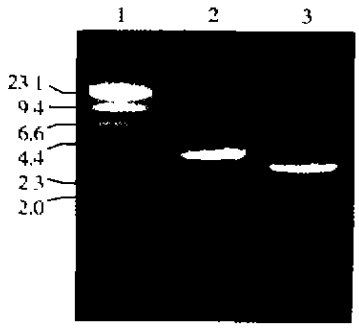

图3 DpCPV第10片段重组质粒的酶切鉴定结果

1,λDNA/*Hin*dⅢ标准分子量;2,*Pst*Ⅰ消化的第10片段的重组质粒;3,*Eco*RⅠ消化的第10片段的重组质粒。

Fig. 3 Restrication analysis of recombinant plasmid of S10 1, λDNA/*Hin*d Ⅲ marker;2, digested recombinant plasmid of S10 by *Pst*I; 3, digested recombinant plasmid of S10 by *Eco*R 1.

```
         ***
DpCPV    ATGGCAGACG TAGCAGGAAC AAGTAACCGA GACTTTCGCG GACGCGAACA AAGACTATTC   60
BmCPV    •••••••••• •••••••••• •••••••••• •••••••••• •••••••••• ••••••••••

DpCPV    AATAGCGAAC AATACAACTA TAACAACAGC TTAAACGGAG AAGTGAGCGT GTGGGTATAC  120
BmCPV    •••••••••• •••••••••• •••••••••• ••G••••••• •••••••••• ••••••••••

DpCPV    GCATACTACT CAGACGGATC AGTGCTCGTA ATCAACAAGA ACTCGCAATA CAAGGTTGGC  180
BmCPV    •••••••••• ••••••G••• T••A•••••• •••••••••• •••••••••• ••••••••••

DpCPV    ATTTCCGAGA CTTTCAAGGC ACTCAAGGAG TATCGCGAAG GGCAGCGCAA CGATTCTTAC  240
BmCPV    •••••A•••• •A••••••••• •••T•••••A ••••••••G• •A••A•A••• •••C••••••

DpCPV    GATGAGTACG AAGTGAATCA GAGCATCTAC TATCCTAATG GCGGCGACGC GCATAAATTC  300
BmCPV    ••••••••T• •••••••••• •••••••••• ••••••••C• ••••T••••• T•GC••••••

DpCPV    CATTCAAACG CCAAGCCACG TGCGATCCAG ATCATCTTCA GTCCAAGTGT GAATGTACGC  360
BmCPV    ••••••••T• •T••A••••• C••••••••• •••••••••• ••••T••••• ••••••G••T

DpCPV    ACCATCAAGA TGGCTAAAGG TAACTCGGTC TCTGTGCCCG ATGATTACTT GCAGCGGTCT  420
BmCPV    ••T••••••• •••••••••• C•••G••••A ••C••••••• ••••G•••C• A•••••A•••

DpCPV    CACCCATGGG AGGCAACCGG AATTAAGTAT CGCAAGATTA AGCGGGATGG AGAAATCGTT  480
BmCPV    •••••••••• •A••G••••• •••C•••••C •••••••••• ••A•A••C•• G•••••••••

DpCPV    GGCTACAGTC ATTACTTCGA ACTACCCCAC GAGTACAATT CGATTTCGCT CGCAGTTAGT  540
BmCPV    ••T•••••C• •••••••T•• •••••••••T ••A•••••C• •C••C••C•• A••G••A•••

DpCPV    GGCGTGCATA AGAACCCATC ATCATACAAC GTCGGATCAG CACACAACGT AATGGACGTC  600
BmCPV    ••T••A•••• •••••••••• •••••••••T •••••••••• ••••T••••• ••••••••••

DpCPV    TTCCAATCTT GCGACCTAGC TCTCAAATTC TGCAACCGTT ACTGGGCCGA GCTTGAACTA  660
BmCPV    ••••••••A• •••••T•G•• •••••G•••• ••••••••C• •••••••••• A••C•••T•G

DpCPV    GTCAACCACT ACATCTCACC GAATGCTTAC CCGTACCTTG ACATCAATAA CCATAGCTAT  720
BmCPV    ••G••••••• ••••T••G•• •••C••C••• ••A•••••C• •T••T••C•• T•••••••••
                                   ***
DpCPV    GGAGTAGCTC TGAGTAACCA TCAGTGA                                      780
BmCPV    •••••••••• •••••••••G •••••••
```

图4 DpCPV与BmCPV多角体蛋白基因编码区核苷酸序列比较

两者相同的核苷酸用"·"表示，"***"分别指示起始和终止密码子。

Fig.4 Comparison of nucleotide sequence of DpCPV polyhedrin gene with that of BmCPV Identical nucleotides are indicated by "·",the initiation codon and termination codon are indicated by."***"

维普资讯 http://www.cqvip.com

RT-PCR 产物的克隆片段为 763bp,经软件分析找到一个大的开放阅读框。其起始密码 AUG 位于 3-5 残基,终止密码 UGA 位于 747～749 残基。推测 DpCPV 多角体蛋白基因编码 248 个氨基酸的多肽,分子量 28kD。和 BmCPV-1 多角体蛋白基因相比较,核苷酸序列同源性为 89.3%,二者有 80 个核苷酸的差异,但大多数为密码子第 3 位的改变。

如图 5 所示,DpCPV-1 多角体蛋白基因推导的氨基酸序列和 BmCPV-1 相比较,同源性为 97.6%,二者共有 6 个氨基酸的差异,分别为 Arg76→His、His98→Arg、Ser129→Ala、Asp135→Glu、Lys209→Arg、His247→Arg。这些氨基酸的变化,经过软件 WinDNASIS 分析,对多肽的亲水性、疏水性没有显著的影响,对蛋白质的二级结构也没有大的改变。

```
DpCPV  MADVAGTSNR DFRGREQRLF NSEQYNYNNS LNGEVSVWVY AYYSDGSVLV INKNSQYKVG   60
BmCPV  ********** ********** ********** ********** ********** **********

DpCPV  ISETFKALKE YREGQRNDSY DEYEVNQSIY YPNGGDAHKF HSNAKPRAIQ IIFSPSVNVR  120
BmCPV  ********** *****H**** ********** *******R** ********** **********

DpCPV  TIKMAKGNSV SVPDDYLQRS HPWEATGIKY RKIKRDGEIV GYSHYFELPH EYNSISLAVS  180
BmCPV  ********A* ****E***** ********** ********** ********** **********

DpCPV  GVHKNPSSYN VGSAHNVMDV FQSCDLALKF CNRYWAELEL VNHYISPNAY PYLDINNHSY  240
BmCPV  ********** ********** ********R* ********** ********** **********

DpCPV  GVALSNHQ                                                           300
BmCPV  ******R*
```

图 5　DpCPV 与 BmCPV 多角体蛋白氨基酸序列比较二者相同的氨基酸用"·"表示

Fig.5　Comparison of amino acid sequence of DpCPV polyhedrin with that of BmCPV Identical amino acid is indicated by "·"

3　讨论

目前分离、报道的马尾松毛虫 CPV 毒株均为混合株,核酸电泳图谱显示至少存在 15 条带,通过蔗糖梯度离心纯化后的 CPV 核酸电泳图谱为九条带,与家蚕 CPV-1 一致。对文山松毛虫 CPV 原毒株,德昌松毛虫 CPV 原毒株以及引进的日本赤松毛虫 CPV 原株的核酸图谱分析发现,它们均为 CPV-1 型[2]。可见,CPV-1 型病毒在松毛虫中是一个普遍存在的 CPV 类型。我们利用马尾松毛虫 CPV 野生型分离株感染马尾松毛虫,河南株和湖北株仍为原株带型,而江西株表现为 CPV-1 型,这种现象属首次报道。对于 CPV 增殖前后核酸电泳图谱的改变,目前的解释多从宿主的异质性出发,认为是宿主对不同类型 CPV 的感受性的差异造成的。我们认为,环境因素(包括虫体生理状况和饲养条件)可能是导致差别复制的重要原因。

在 CPV 的 14 个类型(type)中[8],目前除了 BmCPV-1 外,还有三种 5 型 CPV(*Euxoa scandens* CPV, EsCPV; *Orgyia pseudotsugata* CPV, OpCPV; *Heliothis armigera* CPV, HaCPV)和 *Choristoneura fumiferana* CPV (CfCPV)的多角体蛋白基因测定了全长序列。分析表明,同型 CPV 多角体蛋白基因高度相似,而不同型的 CPV 之间多角体蛋白几乎没有同源性。DpCPV-1 和 BmCPV 多角体蛋白基因的高度同源再次证实了 CPV 分型的正确性。但我们也发现,3 种 5 型 CPV 多角体蛋白基因只有 17 个核苷酸的差异,且碱基替代都是 A-G 和 T-G 之间的改变,而 DpCPV-1 和 BmCPV 多角体蛋白基因的编码区有 80 个核苷酸的不同,明显高于 3 种 5 型 CPV 之间的差异,并且包括了所有的碱基替代类型。

通过对 CPV-5 型的 3 种 CPV S10 的全序列进行分析,发现它们不仅在多角体蛋白基因编码区高度同源,而且在 5′和 3′末端的非编码区也是保守的,这些保守的末端序列可能对病毒复制是有极其重要意义的。为了获得 DpCPV S10 的全长 cDNA,我们以 BmCPV-1 H 株(野生型)S10 的 5′和 3′末端序列进行引物的设计,但是经过 RT-PCR 却没有得到预期的目的,并未扩增到 cDNA 产物。分析显示,BmCPV 多角体蛋白基因的 5′和 3′末端二级结构比较复杂,得到 cDNA 可能存在一定困难。另外,通过对 BmCPV H 株和突变株的 S10 的全序列分析发现,B、B_2、C_1、C_2 和 P 突变株与野生株相比,在 5′和 3′末端发生了部分缺失[9],因此在 DpCPV S10 的 RT-PCR 引物设计中不能不考虑这种情况。我们正在利用 RACE 的方法对 S10 末端进行序列测定,以期获得其结构信息。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参考文献

[1] 广东省林业科学研究所.马尾松毛虫多角体病毒研究初报[J].林业科技通讯,1974,10:13.

[2] 陈昌杰.松毛虫综合管理[M].北京:林业出版社,1990.282-300.

[3] Hagiware K. Nucleotide sequences of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus segments 6 and 7 encoding viral structural protein V4 and V5[J]. JGen Virol,2000,81:1143-1147.

[4] Galinski M S, Yu Y, Heminway B R, *et al*. Analysis of the C-polyhedrin genes from different geographical isolates of a type 5 cytoplasmic polyhedrosis virus[J]. J Gen Virol,1994,75:1969-1974.

[5] Echeverry F, Bergeron J, Kaupp W, *et al*. Sequence analysis and expression of the polyhedrin gene of *Choristoneura fumiferana* cytoplasmic polyhedrosis virus (CfCPV)[J]. Gene,1997,198:399-406.

[6] Arella M, Lavallee C, Belloncik S, *et al*. Molecular cloning and characterization of cytoplasmic polyhedrosis virus polyhedrin and a viable deletion mutant gene[J]. J Virol,1988,62:211-217.

[7] Hagiware K, Tomita M, Nakai K, *et al*. Determination of the nucleotide sequence of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus segment 9 and its exporession in BmN4 cells[J]. J Virol,1998,72(7):5762-5768.

[8] Belloncik S, Liu J, Su D, *et al*. Identification and characterizations of a new cypovirus type 14, isolated from *Heliothis armigera*[J]. J Invert Pathology,1996,67:41-47.

[9] Ikeda K, Nakazawa H, Alain R, *et al*. Characterizations of natural and induced polyhedrin gene mutants of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis viruses [J]. Arch. Virol,1998,143:241-248.