维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷4期 中国病毒学 16(4):355-360
2001年12月 VIROLOGICA SINICA December 2001

棉铃虫单核衣壳核多角体病毒(HaSNPV) *Hin*d III-L片段的序列分析*

方明刚[1]、陈新文[1]、王汉中[1]、Just M Vlak[2]、胡志红[1**]

(1.中国科学院武汉病毒所无脊椎动物病毒学联合实验室,湖北武汉 430071; 2.Lab of Virology, Wageningen University, Binnenhaven 11,6709 PD Wageningen, the Netherlands)

Sequence Analysis of the *Hin*d III-L Region of the *Helicoverpa armigera* Single-nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus(HaSNPV)

FANG Ming-gang[1], CHEN Xin-wen[1], WANG Han-zhong, Just M. Vlak[2], HU Zhi-hong[1**]

(1. *Joint - lab of Invertebrate Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071 China*; 2. *Lab of Virology, Wageningen University, Binnenhaven 11,6709 PD Wageningen, the Netherlands*)

Abstract: In order to investigate the genetic organization of the single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (SNPV) of *Helicoverpa armigera* (HaSNPV), the *Hin*d III-L fragment of the viral genome was sequenced. The fragment contained five complete open reading frames(ORFs) representing ORF227 (a unique gene), a late expression factor 10 gene (*lef*10), a baculovirus structural protein gene(*vp*1 054), *Ac*55(a homologue of the AcMNPV ORF55) and *Ac*56 (a homologue of the AcMNPV ORF56), respectively. These five genes were identified for the first time in HaSNPV. Alignment of baculovirus $LEF10_s$ indicates that they have conserved leucine zipper regions, and aligament of baculovirus VP1054s indicates that they are highly conserved.

Key words: Single-nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus of *Helicoverpa armigera* (HaSNPV), *lef*10, *vp*1054, Sequence analysis

摘要:本文报道了棉铃虫单核衣壳核多角体病毒(*Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, HaSNPV)基因组的 *Hin*dIII-L片段的全序列。该片段全长2 635bp,包括5个有意义的开放阅读框:HaSNPV ORF227,晚期表达因子10基因(*lef*10),*vp*1054基因、Ac55(AcMNPV ORF55的同源基因),*Ac*56(AcMNPV ORF56的同源基因)。与其它6种杆状病毒的氨基酸序列比较表明,HaSNPV的 *lef*10基因与甜菜夜蛾核型多角体病毒(SeMNPV)的同源性最高,为64%,与冷杉毒蛾核型多角体病毒(OpMNPV)的同源性最低,为43%;HaSNPV的 *vp*1054基因与SeMNPV的同源性最高,为65%,与OpMNPV的同源性最低,为49%。序列比较表明,HaSNPV的LEF10与VP1054蛋白与其它6种杆状病毒具有相同的保守区和亮氨酸拉链(leucine zipper)

关键词:棉铃虫单核衣壳核多角体病毒;*lef*10基因;*vp*1054基因;序列分析

中图分类号:S434.6223 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5125(2001)04-0355-06

杆状病毒的分子生物学是近年来十活跃的研究领域之一,其模型种苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒

收稿日期:2001-01-08,修回日期:2001-04-13

* 基金项目:国家转基因植物专项资助(J00-A-003);中国科学院创新工程重要方向项目资助(KSCX2-1-02);国家杰出青年基金资助(30025003).

作者简介:方明刚(1976-),男,陕西汉中人,硕士生,研究方向为分子病毒学。

** 通讯作者:Correspondence author, E-mail: huzh@pentium.whiov.ac.cn

本文所报导的序列已输入GenBank,序列号为AF266693

维普资讯 http://www.cqvip.com

(*Autographa californica* multiple-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)的研究已取得重大进展。杆状病毒的基因表达在时序上至少可以分为三个阶段:(1)DNA复制之前的早期阶段,(2)包括病毒DNA复制和形成芽殖病毒粒子的晚期阶段,(3)极晚期阶段,在此阶段p10基因和多角体蛋白基因高水平表达,形成包含体。杆状病毒基因表达和DNA复制以级联方式按时序表达[1]。病毒早期基因表达依赖于宿主细胞RNA多聚酶II,病毒DNA复制依赖于早期基因表达,晚期和极晚期基因表达依赖于DNA复制或早期基因表达。迄今,已有6种杆状病毒的全序列被测定,它们是:AcMNPV[2]、家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* NPV, BmNPV)[3]、冷杉毒蛾核型多角体病毒(*Orgyia pseudotsugata* MNPV, OpMNPV)[4]、舞毒蛾核型多角体病毒(*Lymantria dispar* MNPV, LdMNPV)[5]、甜菜夜蛾核型多角体病毒(*Spodoptera exigua* MNPV, SeMNPV)[6]、*Xestia c-nigrum* GV(XcGV)[7]。

棉铃虫是农业生产中的重大害虫,在我国发生面积$6.7\times10^7 hm^2$以上,常年多发生,抗性严重。病毒杀虫剂的使用,可以大幅度减少化学农药的用量,具有极大的经济效益和社会效益。对HaSNPV进行分子生物学研究,是对HaSNPV进行遗传改良,研制更有效的病毒杀虫剂的必不可少的基础。我们对HaSNPV的分子生物学进行了的研究,报导了*egt*基因[8]、*polh*[9]、*lef2*[10],并研制成重组HaSNPV杀虫剂[11]。本文报道了HaSNPV的*Hin*d Ⅲ-L片段的全序列,并对其上编码的基因进行了结构分析。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

HaSNPV的原始株系从湖北地区采集的病死的中国棉铃虫体内分离得到[12]。质粒载体pZT19R及宿主菌DH5α由本室保藏。限制性内切酶、连接酶、去磷酸化酶及缺刻平移试剂盒购自Gibco BRL公司。

1.2 病毒DNA的提取及限制性酶切分析

HaSNPV多角体感染中国棉铃虫幼虫,搜集典型病死虫,研磨过滤,多角体经差速离心纯化,显微镜下记数。以碱裘解法从多角体中直接提取DNA[13]。取1ug DNA进行内切酶消化,限制性内切酶消化条件按常规方法进行。0.7%琼脂糖凝胶电泳。

1.3 克隆及测序

紫外灯下切取目的带(*Hin*dIII-L片段),Glassmilk法回收。回收片段与*Hin*dIII消化并去磷酸化的载体pTZ19R 16℃连接过夜,转化大肠杆菌DH5α。阳性克隆经限制性内切酶分析及Southern blotting鉴定。利用通用引物和合成引物以引物步移法(Primer walking)进行序列测定,自动序列测定在荷兰农业大学的测序中心进行。

1.4 序列分析

序列用UWGCG计算机软件(release 10.0)分析,DNA序列和编码的氨基酸序列用FASTA和BLAST软件与GenBank/EMBL Swissport及PIR数据库进行比较分析,运用GeneDOC软件进行氨基酸序列及同源性分析。

2 结果及讨论

*Hin*d III-L片段位于HaSNPV基因组的30.9-31.8m.u[14]。序列测定结果表明,Hind III-L片段全长2 635bp,此片段包括5个完整开放阅读框:HaSNPV ORF227,晚期表达因子10基因(*lef*10),*vp*1054基因,Ac55(AcMNPV ORF55的同源基因),Ac56(AcMNPV ORF56的同源基因)(图1)。该片段的一个显著特性是在*lef*10处有基因重叠现象,该基因头部与ORF227,尾部与*vp*1054重叠。而AcMNPV、BmNPV、LdMNPV、SeMNPV的基因组中仅*lef*10和*vp*1054相互重叠。现将*Hin*d III-L片段上的各基因的结构特征分述如下:

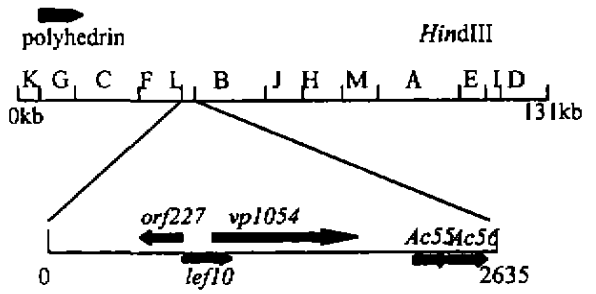

图1 HaSNPV基因组的*Hin*d III酶切图谱及*Hin*d III-L片段的结构

Fig.1 *Hin*d III physical map of the HaSNPV genome and detailed genome organization of the *Hin*d III-L fragment The arrows represent the ORFs and point to their transcriptional direction.

2.1 ORF227

此基因的大小为227个核苷酸,预测编码75个氨基酸大小的蛋白。其它的杆状病毒中未发现此基因,GenBank也未发现其同源基因,它可能是HaSNPV的特有基因。不同的杆状病毒存在着保守基因

维普资讯 http://www.cqvip.com

和特有基因,一般认为共有基因在维持病毒增殖、复制等方面起作用,而特有基因可能决定病毒的毒力和宿主的特异性等。其起始密码子上游第32位有杆状病毒典型的强晚期启动子转录起始信号ATAAG,但在其终止密码子下游未发现PolyA加尾信号AATAAA。该基因不但与*lef*10有42个核苷酸的重叠,而且其强晚期启动子转录起始信号ATAAG仅距离*up*1054基因起始密码子ATG仅11个核苷酸。在91个核苷酸的范围内(从*Hin*d Ⅲ-L片段的第750个核苷酸到第841个核苷酸),聚集了*orf*227、*lef*10、*up*1054三个基因的起始密码子,如此高频率的重复起始,这在杆状病毒基因组中还是不多见的。

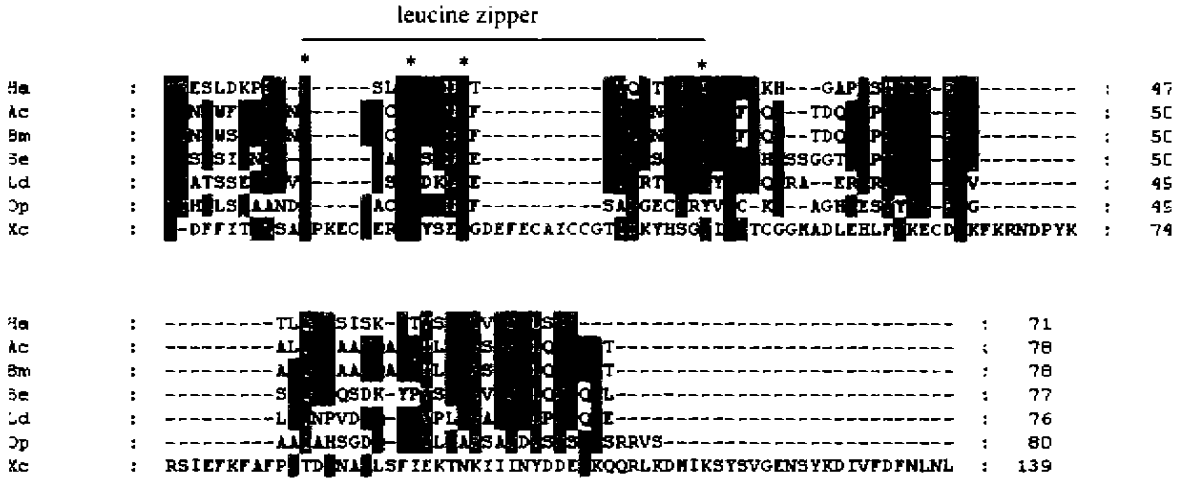

图2　杆状病毒LEF10氨基酸序列同源性比较

Fig.2　Alignment of baculovirus LEF10

The location of leucine zipper motif is shown. The sources are Ayers *et al*(1994) for AcMNPV, Gomi *et al*(1999) for BmNPV, Ijkel *et al*(1999) for SeMNPV, Kuzio *et al*(1999) for LdMNPV, Ahrens *et al*(1997) for OpMNPV. GenDOC software was used for homology shading. Two shading levels were set: black for 100% identity and gray for 80% identity.

表1　7种杆状病毒LEF10氨基酸序列比较

Table 1　Amino acid sequence identity(%) of 7 baculoviral LEF10 proteins

	Ac	Bm	Se	Ld	Op	Xc
Ha	62	62	64	55	43	15
Ac		98	71	58	57	16
Bm			71	60	58	17
Se				64	44	17
Ld					40	16
Op						13

2.2　*lef*10基因

HaSNPV *lef*10的起始密码子位于上一个基因ORF227的内部,终止密码子位于下一个基因*up*1054的内部。*lef*10基因的起始密码子上游未发现强晚期启动子转录起始信号TAAG,且其终止密码子下游未发现PolyA信号AATAA。但在其上游-174位发现一个杆状病毒早期基因启动子起始子CAGT,它可能是转录起始位。

HaSNPV *lef*10基因大小为216个核苷酸,编码一个71个氨基酸的蛋白因子。HaSNPV *lef*10基因推导的氨基酸序列与目前已知杆状病毒的LEF10的氨基酸序列比较表明(图2,表1),HaSNPV的LEF10与SeMNPV LEF10的同源性最高,为64%、与XcGV LEF10的同源性最低,仅为15%。不过从表1可以看出,XcGV作为颗粒体病毒与其余6种多角体病毒的同源性普遍比较低。虽然不同杆状病毒的LEF10之间的同源性并不高,但均存在着一段富含Leu和Ile的保守区,该区含有一个明显的亮氨酸拉链(Leucine Zipper)(图3)。亮氨酸拉链的作用机理是发布在α螺旋的同一侧的疏水性的Leu之间的相互作用,使蛋白质之间识别、亲和。1994年,Lu和Miller鉴定出了AcMNPV基因时,发现*lef*10在实验条件下是晚期和极晚期基因高效表达所必需的。LEF10可能参与晚期启动子的识别,或稳定晚期转录产物,或作为病毒RNA多聚酶复合物的亚单位直接参与转录[15,16]。

2.3　*up*1054基因

HaSNPV *up*1054基因的起始密码子位于*lef*10基因的内部,距离ORF227的起始密码子46个核苷酸。该基因大小为1056个核苷酸,推测编码一个含351个氨基酸的蛋白。*up*1054基因起始密码子上游未发现早晚期启动子的特征序列,如TAAG、CAGT、

维普资讯 http://www.cqvip.com

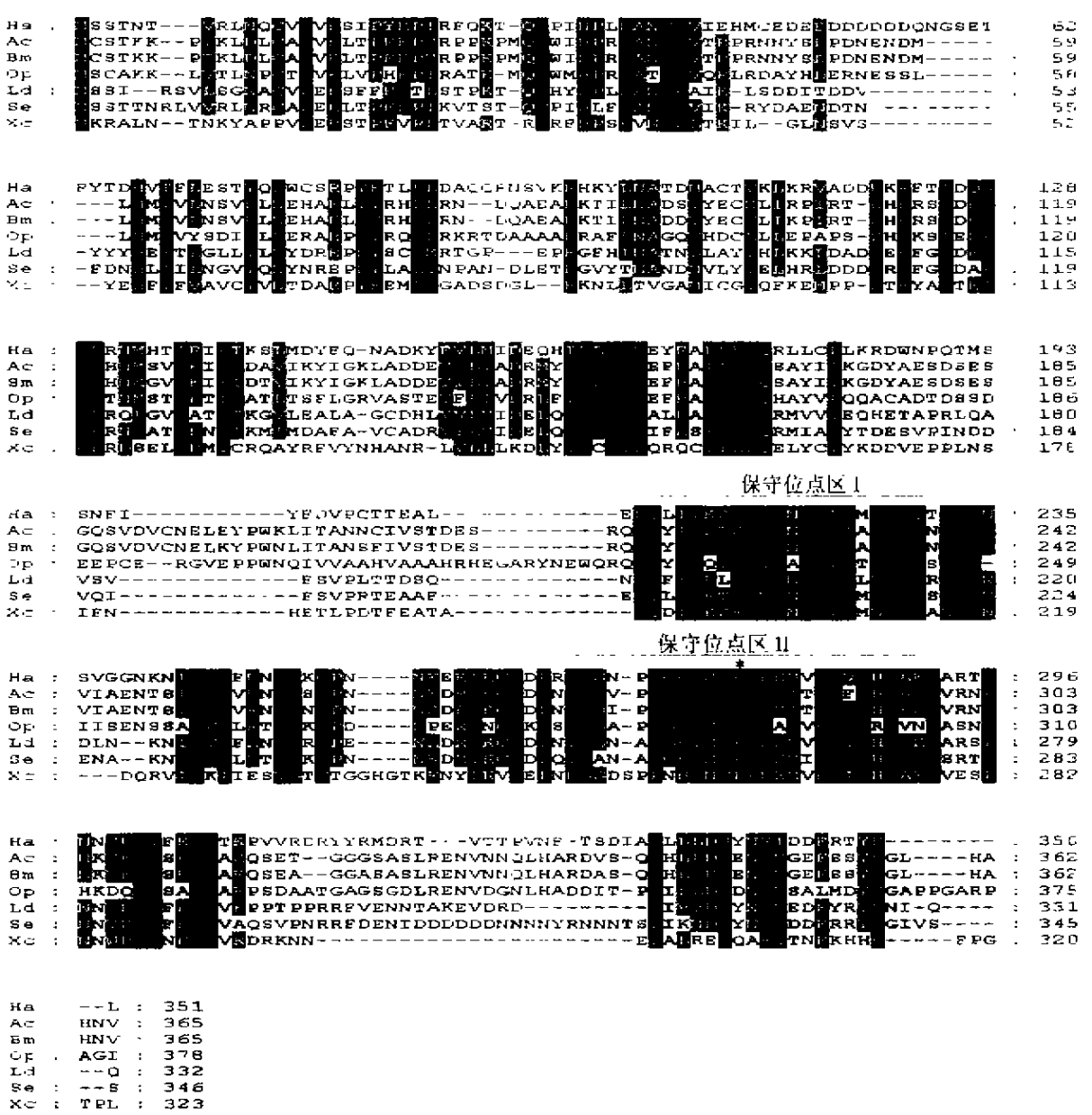

图 3 杆状病毒 VP1054 氨基酸序列同源性比较

Fig 3 Alignment of baculovirus VP1054

The sources are Ayers *et al*(1994) for AcMNPV, Comi *et al*(1999) for BmNPV, Ijkel *et al*(1999) for SeMNPV, Kuzio *et al*(1999) for LdMNPV, Ahrens *et al*(1997) for OpMNPV, Haykawa *et al*(1998) for XcGV. GenDOC software was used for homology shading. Two shading levels were set: black for 100% identity and grey for 80% identity. The conserved Pro286 was marked with asterisk.

TATA 等,在其终止密码子下游也未发现 PolyA 加尾信号 AATAAA(图 2)。这与 Olszewski 等[15]报导的 AcMNPV vp1054 基因一致。HaSNPV *vp*1054 基因和其它 6 种已报道的杆状病毒的 *vp*1054 基因的氨基酸序列进行同源性分析,发现这些基因的氨基酸序列有 2 个同源性很高的保守区;保守区 Ⅰ 和 Ⅱ 的同源性分别高达 88% 和 70% 以上,比它们的平均同源性 56% 高出 14% 以上,我们推测这两个保守位点区在维持其功能上起重要作用。HaSNPV VP1054 与 SeMNPV VP1054 的同源性最高,为 65%,与 OpMNPV VP1054 的同源性最低,为 49%。

VP1054 蛋白是杆状病毒的芽殖病毒和包含体病毒所共有的组成成分,是病毒核衣壳装配所必需的结构蛋白。AcMNPV VP1054 蛋白在病毒感染细胞 12h 后可以检测到,24h 后积累水平达到最高,这种高积累水平可持续到 48h 后[17]。这种时序性表

维普资讯 http://www.cqvip.com

达是杆状病毒晚期蛋白的典型特征。Oslewski 等发现了一个 AcMNPV Vp1054 的一个突变株,该蛋白的 pro286 变换成 Ser,结果造成了 VP1054 的结构不稳定。突变株感染的细胞内缺乏 VP1054 的积累,病毒不能装配成成熟粒子。在已报道的这 7 种杆状病毒中,Pro286 绝对保守,位于保守位点区Ⅱ内,AcMNPV VP1054 的研究表明 VP1054 的保守氨基酸位点对维持其空间折叠结构是绝对需要的[17]。

表 2　7 种杆状病毒 VP1054 氨基酸序列比较

Table 2　Amino acid sequence identity(%) of baculoviral VP1054 proteins

	Ac	Se	Bm	Ld	Op	Xc
Ha	54	65	54	63	49	51
Ac		54	97	50	66	48
Se			54	67	48	48
Bm				51	67	47
Ld					45	50
Op						42

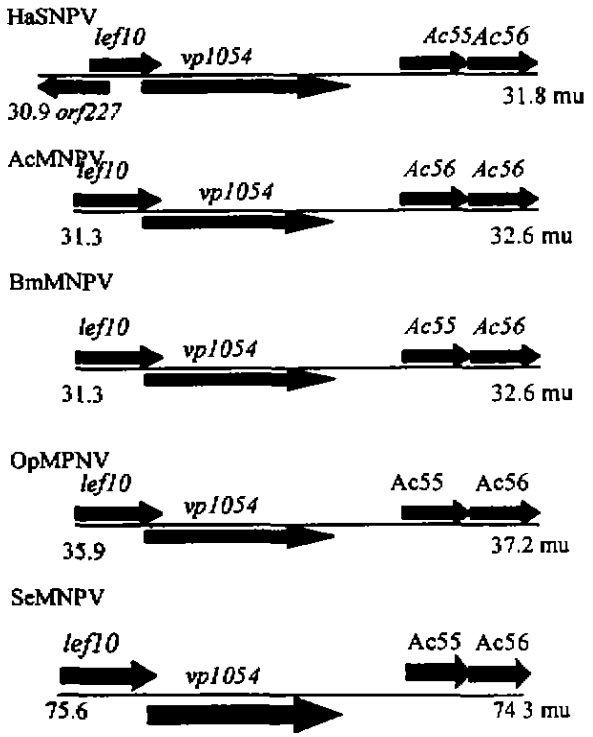

图 4　5 种杆状病毒基因排列比较

Fig.4　Comparision of the gene organization between five baculoviruses. The arrows represent the ORFs and their directions of transcription. In SeMNPV, the transcription direction of the four genes is opposite to the other baculoviruses.

2.4　*Ac*55 和 *Ac*56

这两个基因分别为 AcMNPV ORF55 和 ORF56 的同源区。其编码产物蛋白的功能未见报导。这两个开放阅读框都比较小,*Ac*55 为 207 个核苷酸 *Ac*56 为 195 个核苷酸,分别编码 68 个氨基酸和 64 个氨基酸的蛋白。*Ac*55 的起始密码子距离 *vp*1054 的终止密码子 119 个核苷酸,在其起始密码子上游-22 个核苷酸处有杆状病毒早期基因起始 CAGT,推测 *Ac*55 是一个早期转录基因。*Ac*56 起始密码子上游-15bp处有一个强晚期启动子转录起始信号 ATAAG,该起始信号位于 *Ac*55 的内部。*Ac*56 还有一个显著的特征是终止密码子 TAA 与 PolyA 加尾信号 AATAAA 紧密相连,且共用一个腺苷酸 A。

2.5　基因排列

HaSNPV 的 *Hin*d Ⅲ-L 片段上的 5 个基因排列紧凑,*orf*227、*lef*10、*vp*1054 两两重叠,*Ac*55、*Ac*56 首尾相连。HaSNPV 和其它几种杆状病毒的基因排列比较表明(图 5),AcMNPV、BmNPV、OpMNPV 除缺乏 *orf*227 这个 HaSNPV 特有的基因外,这三种病毒的基因排列与 HaSNPV 完全一致。在 SeMNPV 基因排列中,虽然 *lef*10、*vp*1054、*Ac*55、*Ac*56 的转录方向与 HaSNPV 相反,但是 *lef*10、*vp*1054 两两重叠,*Ac*55、*Ac*56 首尾相连,这与 HaSNPV 一致。这几种杆状病毒的基因排列上的一致反映了它们在进化中的关系较近。

参考文献

[1] Miller L K. The Baculovirus[M]. New York: Plenum Press, 1997. 141-144.

[2] Ayers M D, Howard S C, Kuzio J, *et al*. The complete DNA sequence of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus[J]. Virology, 1994, 202: 586-605.

[3] Gomi S, Majima K, Maeda S. Sequence analysis of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus[J]. J Gen Virol, 1999, 80: 1323-1337.

[4] Ahrens C H, Russwell R L, Funk C J, *et al*. The sequence of *Orgyia pseudotsugata* multinuclear polyhedrosis virus genome[J]. Virology, 1997, 229: 381-399.

[5] Kuzio J, Pearson M N, Harwood S H, *et al*. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantric dispar*[J]. Virology, 1999: 253: 17-34

[6] Iijkel W F, van Strien E A, Vlak J M, *et al*. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome[J]. J Gen Virol, 1999, 80: 3289-3304.

[7] Hayakawa T, Ko R, Okano K, *et al*. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome[J]. Virology, 1999, 262: 277-297.

[8] Chen X, Hu Z H, Jehle J A, *et al*. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of *Heliothis armigera* single-nucleopolyhedrovirus[J]. Virus Genes, 1997, 15: 219-225.

[9] 陈新文, Vlak J M, 胡志红. 中国棉铃虫单粒包埋核多角体病毒

维普资讯 http://www.cqvip.com

(HaSNPV)的多角体基因的核酸序列分析[J].中国病毒学,1997,12:346-353.

[10] Chen X, Wilfred F J, Doming C, *et al*. Idendification, sequence analysis and phylogeny of the lef-2 gene of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid baculovirus[J]. Virus Res, 1999, 65:21-32.

[11] Chen X W, Sun X L, Hu Z H, *et al*. Genetic engineering of *H. armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus as an improvement pesticide[J]. J Invertebr Pathl, 2000, 76:140-146.

[12] 张光裕,张友清,葛珞,等.中国棉铃虫核型多角体病毒湖北株在生物防治中的生产与应用[J].植物保护学报[J].1981,8:235-240.

[13] 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[J].中国病毒学,1994,9:309-318.

[14] Chen X W, Li M, Sun X L, *et al*. Genetic organization of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus[J]. Archi Virol, 2000, 145:2539-2555.

[15] Lu A, Miller L K. Identification of three late expression factor gene within the 33.8- to 43.4-Map-Unit region of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus[J]. J Virol, 1994, 68:6710-6718.

[16] Lu A, Miller L K. The roles of eighteen baculovirus late expression genes transcription and DNA replication[J]. J Virol, 1995, 69:975-982.

[17] Olszewski J, Miller L K. Identification and Characterization of a baculovirus structural protein, VP1054, required for nucleocapsid formation[J]. J Virol, 1997, 71:5040-5050.