维普资讯 http://www.cqvip.com

human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 9524 = 9528

[6] Michael G J R, Kwieciszwski B, Dossett M, *et al* Antiapoptotic and Oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of PKR protein knase [J]. J Virol, 1999, 73: 6506 - 6516.

[7] Tan S L, Nakao H, He Y, *et al*. NS5A, a nonstructural protein of hepatitis C virus, binding growth factor receptor-bound protein 2 adaptor protein in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner and perturbs mitogenic signaling[J]. Cell Biology, 1999, 96: 5533 - 5538.

[8] Ghosh A K, Steele R, Meyer K, *et al*. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth[J]. J Gen Virol, 1999, 80: 1179 - 1183.

[9] Gale M Jr, Blakely C M, Kwieciszewski B, *et al*. Control of PKR kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: Molecular mechanisms of kinase regulation[J]. Mol Celel Biol, 1998, 18: 5208 - 5218

[10] Yoshihiro I, Zhang L W, Chen M, *et al*. Characterization of the nuclear localization signal and subcellar distribution of hepatitis C virus nonstructural protein NS5A[J]. Gene, 1996, 182: 202 - 211.

[11] Fukuma T, Enomoto N, Marumo F, *et al*. Mutation in interferon-sensitivity determining region of hepatitis C virus and transcriptional acticity of the nonstructural region 5 A protein[J]. Hepatology, 1998, 28: 1147 - 1153.

[12] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1994, 2(28): 364-365.

[13] 阮华, 邹金荣, 叶林柏, 等. HDV NS5A 基因表达及其在血清学检测中的应用评估[J] 中国病毒学, 2001, 16(2): 190-192.

维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 1期
2002年2月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(1):66－68
February 2002

斜纹夜蛾多角体病毒包埋型病毒受体的鉴定*

尹崇，余健秀，庞义**，胡晓晖，李朝飞，王立华
（中山大学生物防治国家重点实验室，广东 广州 510275）

Identification of the Receptor for PDV of *Spodoptera litura* Multinucleocapsid Nucleopolyhedrovirus

YIN Chong, YU Jian-xiu, PANG Yi**
(*State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou* 510275, *China*)

Abstract: This research provides the evidence about the identification of baculovirus receptors present in midgut cell lystes. Rabbit antiserum against purified PDV of SpltMNPV was produced. Total midgut cell proteins were prepared with SDS lysis buffer with or without 2-mercaptoethanal(2-ME). After SDS-Polyacrylamid gel electrophoresis(SDS-PAGE), the midgut cell proteins were tranfered to nitrocellulose membrance. Transferred proteins were renaturalized overnight with 4% bovine serum albumin (BSA). Then with PDV-specific antiserum, a virus overlay protein blot assay(VOPBA) was performed to identify the protein that binds PDV of SpltMNPV. It was shown that PDV of SpltMNPV bound to three molecules of approximately 40kD, 73kDand 85kD in midgut cell lysates.

Key words: *Spodoptera litura* multinucleocapsid nucleopolyhdrovirus (SpltMNPV); Polyhedra-derived virus(PDV); Virus receptor; Virus overly protein blot assay(VOPBA)

摘要：蔗糖密度梯度离心法提纯斜纹夜蛾核多角体病毒(*Spodoptera litura* multinucleocapsid nucleopolyhdrovirus, SpltMNPV)包埋型病毒粒子(polyhedra-derived virus, PDV)，以此病毒粒子作抗原，免疫家兔获得抗血清；用SDS裂解缓冲液提取斜纹夜蛾幼虫中肠组织细胞总蛋白。采用病毒铺覆蛋白印迹技术(VOPBA)，利用抗PVD抗血清对病毒受体进行检测，结果表明斜纹夜蛾中肠细胞总蛋白中40kD、73kD、85kD的三种蛋白能够结合PDV。

关键词：斜纹夜蛾核多角体病毒(SpltMNPV)；包埋型病毒粒子(PDV)；受体蛋白；病毒铺覆蛋白印迹技术(VOPBA)

中图分类号：S763.42　**文章标识码：**A　**文章编号：**1003-5125(2002)01-0066-03

斜纹夜蛾多角体病毒(*Spodoptera litura* multinucleocapsid nucleopolyhdrovirus, SpltMNPV)是杆状病毒科核多角体病毒属的成员[1]，因对重要的农业害虫斜纹夜蛾具有良好的防治效果，已被本实验室开发为针对斜纹夜蛾的特效生物杀虫剂。研究SpltMNPV的致病机理，对改造病毒，提高其杀虫效力有重要意义。目前关于杆状病毒与寄主细胞相结合的动力学关系已经有了一些较为细致的研究[2]，但对其受体的鉴定迄今未见报道。

病毒铺覆蛋白印迹技术(Virus overlay protein blot assay, VOPBA)是在Western印迹技术的基础上，利用病毒与受体特异性结合的特点，对病毒受体进行鉴定的方法[3]。本研究应用此方法对SpltMNPV包埋型病毒粒子(polyhedra-derived virus, PDV)的受体进行鉴定，结果显示斜纹夜蛾中肠细胞总蛋白中40kD、73kD、85kD的三种蛋白能够结合PDV。

收稿日期：2001-04-06，修回日期：2001-06-15
* 基金项目：国家自然科学基金资助重点项目(39730030)；国家转基因植物专项基金项目(J00-A-003)
作者简介：尹崇(1968－)，男，博士生，研究方向为分子病毒学。
** 通讯作者：庞义(1945－)，男，教授。Correspondence author.

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 提取病毒

SpltMNPV毒株由本实验室保存。参照文献[4]的方法,从斜纹夜蛾幼虫感染虫尸中提取多角体、40%～60%(w/w)的蔗糖密度梯度离心提纯。提纯的多角体用碱解液(0.02mol/L $NaNO_3$, 0.1mol/L NaCl)裂解,再经30%～50%(w/w)的蔗糖密度梯度离心提纯,0.1×[TEL10mmol/L Tris(PH7.4), 1.0mmol/L EDTA]重悬提纯的病毒粒子,紫外吸收法测定病毒蛋白浓度。同时,提纯的病毒粒子用醋酸铀负染,在透射电子显微镜下观察病毒粒子囊膜的完整性。

1.2 抗PDV兔抗血清制备及检测

以含100μg PDV的抗原-佛氏完全佐剂乳化液首免家兔,一个月以后,用含抗原50μg的不完全佛氏佐剂乳化液进行三次加强免疫,每次间隔两星期,最后一次加强免疫后第10天颈动脉采血。Western印迹法测定免疫前和免疫后血清的抗体效价和抗血清的特异性。

1.3 提取中肠组织细胞总蛋白

剖取斜纹夜蛾三龄幼虫中肠,在TBS[50mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 150mmol/L NaCl]中漂洗干净。按照文献[5]的方法,裂解液沿用SDS-PAGE上样缓冲液(含1mmol/L PMSF, 2% SDS),还原条件下电泳时加5%的2-巯基乙醇(2-ME)。中肠用SDS裂解液冰浴裂解30min,直接煮沸5min,超声波处理2min,使粘稠的裂解混合物稀化,于4℃以12,000rpm离心5min,取上清用作电泳分析。

1.4 SDS-PAGE电泳及蛋白转印

参照文献[6]配制10%分离胶,5%浓缩胶。电泳样品为含与不含2-ME的中肠组织细胞提取液,每泳道加样品20μL。电泳结束后,参照文献[3]的方法,稳流转印过夜,将蛋白转印到硝酸纤维素(NC)膜(Pall-Gelman公司产品)。铅笔描记蛋白Marker的位置,将转印后的NC膜浸入溶于TBS的4%牛血清蛋白(BSA)溶液,4℃复性12h。

1.5 VOPBA分析

复性后的NC膜用Western试剂盒(Roche公司产品)的封闭液封闭30min,然后直接向封闭液内加入1mL提纯的PDV,于4℃作用12h,用TBST(TBS含0.1%的Twee-20)漂洗三次,每次10min,洗去未结合的PDV。再与1:1000稀释的抗PDV兔抗血清作用30min,TBST漂洗三次,每次10min,将NC膜浸入碱性磷酸酶标记羊抗兔抗体溶液30min,如上漂洗三次,每次15min。最后NC膜与显色底物反应至色带清晰,移入水中终止显色。用Kodak Dgital Science ID软件照相记录分析结果。另设阴性对照组,除不加PDV,其它处理步骤相同。

2 结果

2.1 PDV囊膜的电镜观察

在透射电子显微镜下可见提纯的病毒粒子大部分保持完好的病毒囊膜,有少部分病毒粒子的囊膜被破坏,只剩下裸露的核衣壳(见图1)。

图1　提纯病毒粒子的电镜观察(×40 000)

Fig.1　Electronic Micrograph of Virons Purified (40 000)

1. Perfect viron; 2. Nucleocapsid.

2.2 抗血清的制备与检测

以经蔗糖密度梯度离心提纯的PDV作抗原免疫家兔。经检测,免疫前血清不与PDV发生反应,所制备抗血清的抗体效价为10^5,能够特异性识别PDV,与中肠组织蛋白没有交叉反应(见图2)。

2.3 中肠总蛋白

用SDS-PAGE上样缓冲液制备的中肠组织细胞提取液,在加与不加5% 2-ME的情况下经还原和非还原SDS-PAGE电泳分析,凝胶用考马斯亮兰进行染色。结果可见中肠组织细胞总蛋白组成复杂(见图3A)。

2.4 PDV受体

VOPBA结果显示,中肠组织细胞经SDS上样缓冲液裂解时,不论是否加2-ME都能检测到PDV结合的相同分子量的蛋白带。分子量大约在40kD、73kD、85kD左右。与其相对应的中肠组织细胞总蛋白带中,根据考马斯亮兰染色浓度分析,受体蛋白

维普资讯 http://www.cqvip.com

所占比例很小(见图3B)。对照组呈阴性反应(见图3C)。

图2 抗血清特异性的 Western 检测

Fig.2 Specificity of antiserum tested with Western blot

1, Midgut cell lysate; 2, Viron.

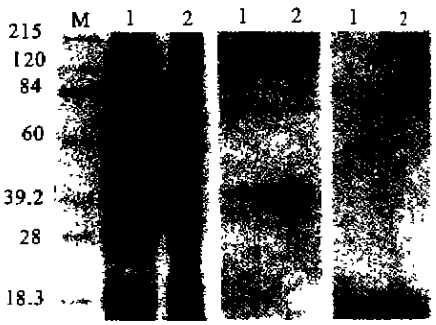

图3 中肠细胞总蛋白的病毒受体蛋白

A. 中肠细胞总蛋白的 SDS 电泳分析; B. VOPBA 鉴定中肠组织细胞上病毒受体; C. 不加 PDV 的对照组.

Fig.3 Receptors for PDV of SpltMNPV in midgut cell

A, Total midgut cell protein extracted with different lysis were subjected to SDS-10% PAGE. B, Receptors for PDV of SpltMNPV identified by VOPBA; C. Control of VOPBA without PDV; M-protein marker; 1-midgut cell lysates treated by SDS lysis buffer with 2-ME; 2-midgut cell lysates treated by SDS lysis buffer without 2-ME

3 讨论

病毒受体是病毒入侵靶细胞的门户,病毒与细胞受体的特异性结合,决定病毒的宿主专一性。Horton 在研究 PDV 与靶细胞结合的动力学关系时,发现 PDV 能够与培养细胞和人工重构的中肠细胞膜定量结合,而用蛋白酶处理过的中肠细胞重构的细胞膜结构、PDV 不能与之有效结合,由此推测中肠细胞膜上存在 PDV 受体[2]。本研究通过 VOPBA 检测证实了这一推测,结果显示 40kD、73kD、85kD 三个不同分子量的蛋白能与 PDV 结合,表明斜纹夜蛾中肠细胞上的 PDV 受体可能有多种。靶细胞上存在同一病毒多种受体分子的现象,在犬温热病毒[5],登革热病毒[3]等受体的研究中已有发现。

VOPBA 是近年来开始采用的一种鉴定病毒受体的方法。Salas-Benito 应用此技术在培养细胞总蛋白与细胞膜蛋白中,都检测到了两个不同分子量的登革热病毒受体[3]。其它一些病毒如:麻疹病毒、狂犬病病毒、伪狂犬病病毒、牛病毒性腹泻病病毒受体的鉴定,都应用了 VOPBA 技术[5]。在 VOPBA 技术中可用不同的方法指示病毒与受体的结合,可直接应用同位素标记的病毒粒子,也可用单克隆抗体或多克隆抗体。如果使用多克隆抗体,要保证抗体的特异性,不与寄主蛋白发生交叉反应,如有交叉反应,可通过寄主蛋白预吸收除去交叉反应抗体。本研究制备的 PDV 抗体不与中肠蛋白发生交叉反应,表明提取的 PDV 抗原纯净,所得到的抗血清适用于 VOPBA 分析。

使用 SDS 裂解液提取受体蛋白,样品可直接用于 SDS-PAGE 电泳分析。尽管 SDS 属于变性去污剂,可是本研究以及郭爱珍[5]和 Salas-Beito[3]等都用它检测到了病毒受体,说明转印到 NC 膜上的受体蛋白部分发生了复性,因而具有了一定的与病毒结合的活性;在加和不加 2-ME 的情况下,都能检测到 PDV 受体,说明这些受体蛋白不含二硫键结构。

参考文献

[1] Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, *et al*. Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses, sixth report of International Committee on Taxonomy of Viruses[C]. New York: Springer-Verlay Vien and New York, 1995. 104-113.

[2] Horton H M, Burand J P. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion[J]. J Virol, 1993, 67(4): 1860-1968.

[3] Salas-Beruto J S, Angel R M D. Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type4 virus[J]. J Virol, 1997, 71(10): 7246-7252.

[4] Braunagel S C, Summer M D. *Autographa californica* polyhedrosis virus, PDV and ECV virural envelopes and nucleopcapsids: structural proteins, antigeins, lipid, and fatty acid profiles[J]. Virology, 1994, 202: 316-328.

[5] 郭爱珍,陆承平. 犬瘟热病毒细胞膜受体的鉴定[J]. 病毒学报, 2000, 16(2): 155-157

[6] 萨姆希鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1992, 2: 862-897

维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷 1期
2002年2月

中 国 病 毒 学
VIROLOGICA SINICA

17(1):69－72
February 2002

桃蚜体内与病毒结合的共生菌 *Buchnera* groEL 基因的克隆和序列分析*

崔晓峰[1]，吴云锋[1**]，林林[1]，梁小波[1]，张建新[1]，周广和[2]
(1.西北农林科技大学植保学院，陕西杨凌 712100；2.中国农业科学院植物保护研究所，北京 100094)

Cloning and Sequence Analysis of *Buchnera* GroEL Gene from Endosybiotic Bacterium of *Myzus persicae*

CUI Xiao-feng[1], WU Yun-feng[1**], LIN Lin[1], LIANG Xiao-bo[1], ZHANG Jian-xin[1], ZHOU Guang-he[2]
(1. *Department of Plant Protection*, *NWSUAF*, *Yangling*, *Shanxi* 712100, *China*;
2. *Institute of Plant Protection*, *CAAS*, *Beijing* 100094, *China*)

Abstract: *Buchnera* groEL gene of endosymbiotic bacterium (*Buchnera* sp.) from *Myzus persicae* Yangling boitype (P.R.China) was isloated, and the complete nucleotides sequence was determined. It is indicated that *Buchnera* groEL gene of *M. persicae* includes 1647 base pairs, has 99% and 91% sequce similarity with *Buchnera* groEL gene of *M. persicae* The Netherland biotype (AF003957) and *Acyrthosiphon pisum* Japanese biotype (X61150), respectively. *Buchnera* GroEL-YL contains 548 amino acide, and has 3 different amino acids comparing with *Buchnera* GroEL-NT, that is AA_{111}Met→Lys、AA_{222}Val→Met and AA_{348}Gln→His.

Key words: *Myzus persicae*; Endosymbiotic bacterium; *Buchnera* groEL; Transmission

摘要：以桃蚜(*Myzus persicae*)杨凌生物型为材料，利用一对特异性引物，用PCR的方法从桃蚜体内扩增出了内共生菌的 *Buchnera* groEL 基因，序列测定结果表明其长度为1 647bp，与GenBank中的桃蚜荷兰生物型、豌豆蚜(*Acyrthosiphon pisum*)日本生物型 *Buchnera* GroEL 基因长度相同，同源性分别为99%和91%；*Buchnera* GroEL-YL 编码548个氨基酸，序列比较发现与 *Buchnera* GroEL-NT 仅有3个氨基酸的差异，即 AA_{111}Met→Lys、AA_{222}Val→Met and AA_{348}Gln→His.

关键词：桃蚜；内共生菌；*Buchnera* GroEL；传毒
中图分类号：S433.3　**文章标识码**：A　**文章编号**：1003-5125(2002)01-0069-04

蚜虫是植物病毒传播的最重要的昆虫介体，其中以桃蚜(*Myzus persicae Sulz.*)传播的病毒最多，可达100多种病毒[1]。Van den Heuvel 等用病毒结合蛋白印迹试验(virus overlay protein blot assay)首先从桃蚜体内鉴定了5种可与马铃薯卷叶病毒(PLRV)结合的蛋白，而对PLRV具有高亲和力的最易检测的分子量为63kD的蛋白被鉴定为蚜虫初生内共生菌(*Buchnera* sp.)编码蛋白[又称为共生素(symbionin, SymL)]，其为分子伴侣cpn60家族成员，在蚜虫体内含量最丰[2]。用抗生素处理蚜虫干扰体内共生菌原核蛋白的合成，结果病毒外壳蛋白降解，蚜虫传毒能力下降[2]。已有研究表明蚜虫在循回持久性传播黄矮病毒属(*Luteovirus*)和马铃薯卷叶病毒属(*Polerovirus*)病毒及豌豆耳突花叶病毒属(*Enamovirus*)的豌豆耳突花叶病毒(PEMV)时，蚜虫体内初生共生菌的 *Buchnera* GroEL 蛋白参与了传毒过程。推测 *Buchnera* GroEL 可能对蚜虫专化获取或传播病毒不起主要作用，而是与进入血淋

收稿日期：2001-05-14，修回日期：2001-07-19
* 基金项目：国家自然科学基金(39970483)；国家863青年基金(97-137)
作者简介：崔晓峰(1977－)，男，陕西户县籍，现为浙江大学博士研究生，从事植物病毒学方面的研究。
** 通讯作者。Correspondence author. E-mail: wuyf@public.xa.sn.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com

巴的病毒结合，从而阻碍了蛋白酶降解病毒，维持病毒在蚜虫体内的持久传播[2~4]。吴云锋等用免疫沉淀法从桃蚜体内分离纯化了一种63kD的病毒结合蛋白(virus binding protein, VBP)[6]，通过部分氨基酸列的分析，利用一对特异性引物以桃蚜杨凌生物型为材料，克隆了此病毒结合蛋白基因，通过序列测定和分析证明其为内生共菌的 *Buchnera* groEL 基因，报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 蚜虫 供试桃蚜采用杨凌烤烟田(暂命名为杨凌生物型)，在防虫温室内多代转接并将单头虫克隆五代后，饲养于普通烟叶(*Nicotiana tabacum*)上，收集3～4龄期的无翅蚜冰冻于－60℃冰箱，备用。

1.1.2 菌种、质粒与试剂 大肠杆菌 *E. coli* DH5α、质粒 pBluescript KS 由中国科学院微生物所提供；限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等购自 Takara 公司，Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 蛋白部分氨基酸序列测定 采用免疫沉淀法[6]从桃蚜体内分离了一种病毒结合蛋白，氨基酸序列由第四军医大学全军基因诊断研究所测定。

1.2.2 模板 DNA 的提取 100mg 冰冻的蚜虫于200μL TE buffer 中匀浆，5 000r/min 离心 3min 后，收集沉淀，加入 500μL 裂解 buffer(0.1mol/L NaCl、0.1mol/L EDTA、1% SDS、0.1%蛋白酶 K)于 65℃水浴中裂解 60min，冰上放置 5min 后，5 000r/min 稍离心，上清液分别用酚：氯仿(1:1)、氯仿抽提，冷乙醇沉淀 DNA，紫外法测定 DNA 的浓度和质量。

1.2.3 引物设计 根据所测的蛋白部分氨基酸序列及 GenBank 中豌豆蚜(*Acyrthosiphon pisum*)的内共生菌 symL 序列(X61150)设计引物，引物由上海 Sangon 公司合成。序列如下：

5' 引物(SP1)：ACCCTGCAGATGGCCGCT-AAAGATGTAA

3' 引物(SP2)：CGGGATCCTTACATCATT-CCGCCCATACC

1.2.4 PCR 扩增 在 50μL 体系中进行，内含引物 SP1 和 SP2 各 0.6μmol/L、模板 200ng、dNTPs 2.5mmol/L、10 × PCR buffer5μL、Mg^{2+} 5mmol/L、Taq 酶 1U，加水至 50μL。PCR 反应条件为 90℃预变性 5min 后，进行 94℃ 1min、52℃ 1min、72℃ 2min 的 35 个循环的扩增，72℃延伸 10min 后，保存于 4℃。

1.2.5 连接、转化与筛选 按 Sambrook 等[7]的方法进行 PCR 产物与 pBluescript KS 的连接、转化和阳性克隆的筛选，酶切和 PCR 鉴定插入片段的大小和方向。

1.2.6 序列测定与分析 序列测定由上海 Sangon 公司从两个方向进行，氨基酸序列推导和同源性比较借助 Blast 和 DNASIS 软件进行。

2 结果与分析

2.1 桃蚜体内病毒结合蛋白的部分测序

采用免疫沉淀法从桃蚜体内纯化了一种病毒蛋白[6]，部分氨基酸序列的测定结果见表 1。经检索 GenBank，该蛋白 N 端(9 个氨基酸)与蚜虫初生共生菌 GroEL 蛋白完全一致，因此，初步确定本文从桃蚜体内分离的病毒结合蛋白为桃蚜内共生菌的 GroEL 蛋白。

表 1 桃蚜内共生菌 GroEL 蛋白的部分氨基酸序列

Table 1 Partial animo acid sequences of GroEL protein of endosymbiotic bacterium from *Myzus persicae*

编号	氨基酸位置	测序结果
S1	1-9	M-A-A-K-D-V-K-F-G-(N 端)
S2	329-335	T-T-I-I-G-G-V-
S3	51-55	K-D-G-V-S-
S4	306-310	A-M-E-L-E

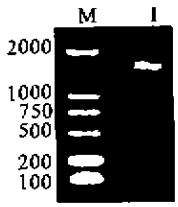

图 1 桃蚜体内内共生菌 *Buchnera* groEL 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplication of *Buchnera* GroEL gene of endosymbiotic *bacterium* in *Myzus persicae*

M, DL2000 marker; 1, PCR product.

2.2 基因克隆

利用设计的一对特异性引物，采用 PCR 体外扩增的方法从蚜虫体内扩增出一条约为 1.65kb 的片段(图 1)，将其连接到质粒载体 pBluescript KS 上，转化大肠菌 *E. coli* DH5α，重组质粒经蓝白斑斑选、*Pst* I/*Bam* H I 双酶切鉴定和 PCR 鉴定证实全长目

维普资讯 http://www.cqvip.com

的片段已连接到 pBluescript KS 载体上(图 2,3)，命名为 pKSMP。

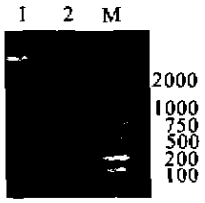

图 2　重组质粒 pKSMP 的双酶切

Fig. 2　Recombinant plasmid pKSMP indentificated by *Pst* I/*Bam* H I digestion

M, DL2000 marker; 1, pKSMP; 2, pBluescript KS.

2.3　序列分析

序列测定结果表明所获得的桃蚜杨凌生物型病毒结合蛋白基因包括起始密码子(AUG)和终止密码子(TTA)全长为 1 647bp，经联网查询发现其与 GenBank 中的桃蚜荷兰生物型(AF003957，缩写为 *Buchnera* groEL-NT)、豌豆蚜日本生物型 *Buchnera* groEL 基因长度相同，同源性分别为 99% 和 91%，这表明此病毒结合蛋白基因即为内共生菌 *Buchnera* groEL 基因(缩写为 *Buchnera* groEL-YL)，同源性比较结果也表明同一蚜虫不同地理种群间 *Buchnera* groEL 基因较不同蚜虫间具有高度同源性。*Buchnera* groEL-YL 和 *Buchnera* groEL-NT 之间有 7 个碱基的差异，依次为第 332(t→a)、612(t→c)、664(g→a)、723(c→a)、1044(a→t)、1251(a→t)和 1 367(c→t)位核苷酸(图 4)。

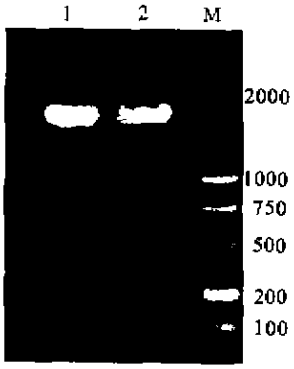

图 3　重组质粒 pKSMP 的 PCR 鉴定

Fig. 3　Recombinant plasmid pKSMP indentificated by PCR

M, DL2000 marker; 1, 10×pKSMP; 2, 100×pKSMP.

2.4　蛋白质的氨基酸序列推导

进入利用计算机软件进行 *Buchnera* groEL 基因编码氨基酸的推导，结果表明其编码 548 个氨基酸，与 Hogenhout 等报道的桃蚜荷兰生物型内共生菌 *Buchnera* groEL 蛋白序列同源性为 99.5%[5]，第 332(t→a)、664(g→a)和 1044(a→t)位核苷酸的变异导致第 111(Met→Lys)、222(Val→Met)和 348(Gln→His)位氨基酸发生变化，而 723(c→a)、612(t→c)、1251(a→t)和 1367(c→t)的核苷酸变异不影响编码的氨基酸序列。

Buchnera GroEL-NT:　MAAKDVKFGNEARIKMLRGVNVLADAVKVTLGPKGRNVVLDKSFGAPSITKDGVSVAREIELEDKFENMGAQMVKEVASKANDAAGDGTT

TATLLAQSIVNEGLKAVAAGKNPMDLKRGIDKAVISAVEELKNLSVPCSDSKAITQVGTISANADEKVGALIAEAMEKVGNDGVITVEEGTGLQNELEVVKGMQFDRGYL　200
TATLLAQSIVNEGLKAVAAGMNPMDLKRGIDKAVISAVEELKNLSVPCSDSKAITQVGTISANADEKVGALIAEAMEKVGNDGVITVEEGTGLQNELEVVKGMQFDRGYL

SPYFINKPETGIVELENPYILMADKKISNVREMLPILESVAKSGKPLLIISEDLEGEALATLVVNSMRGIVKVAAVKAPGFGDRRKAMLQDISILTGGSVISEELAMELE　310
SPYFINKPETGIVELENPYILVADKKISNVREMLPILESVAKSGKPLLIISEDLEGEALATLVVNSMRGIVKVAAVKAPGFGDRRKAMLQDISILTGGSVISEELAMELE

KSTLEDLGQAKRVVISKDTTTIIGGVGEKHTIQSRISHIRQEIQEATSDYDKEKLNERLAKLSGGVAVLKVGAATEVEMKEKKARVEDALHATRAAVEEGVVAGGGVALV　420
KSTLEDLGQAKRVVISKDTTTIIGGVGEKHTIQSRISQIRQEIQEATSDYDKEKLNERLAKLSGGVAVLKVGAATEVEMKEKKARVEDALHATRAAVEEGVVAGGGVALV

RVAGKTSNLRGQNEDQNVGIRVALRAMEAPLRQIVSNSGEEPSVVTNNVKDGKGNYGYNAATDEYGDMIDFGILDPTKVTRSALQYAASVAGLMITTECMVTDLPKEDKS　530
RVAGKTSNLRGQNEDQNVGIRVALRAMEAPLRQIVSNSGEEPSVVTNNVKDGKGNYGYNAATDEYGDMIDFGILDPTKVTRSALQYAASVAGLMITTECMVTDLPKEDKS

SDSNSSPAGGMGGMGGMM　548
SDSNSSPAGGMGGMGGMM

图 4　桃蚜内共生菌 *Buchnera* groEL-YL 与 *Buchnera* groEL-NT 的氨基酸序列比较

Fig. 4 Comparison of the amino acid of *Buchnera* groEL-YL and *Buchnera* groEL-NT *Myzus persicae*

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨论

本研究以桃蚜杨凌生物型为材料，用PCR的方法在国内首先从桃蚜体内扩增出病毒结合蛋白基因，并确认该蛋白由蚜虫内共生菌编码。序列测定结果表明其长度为1 647bp，与GenBank中的桃蚜(荷兰生物型)的 *Buchnera* groEL基因长度一致，在核苷酸水平上二者仅存在7个核苷酸的差异，同源性高达99%。氨基酸序列比较结果表明两者存在3个氨基酸的差异，其生物学意义有待进一步研究。

已有研究表明蚜虫体内广泛存在内共生菌，用抗生素处理蚜虫干扰内共生菌蛋白的合成，结果蚜虫传毒效率降低[2]。蚜虫内共生菌在体内为蚜虫的生存提供Met、Cys、Trp等必需氨基酸[8]。去除内共生菌后蚜虫将不能生存也不能传播持久性病毒，因为进入血淋巴中的病毒只有与内共生菌的 *Buchnera* groEL结合才能免于被血淋巴中的蛋白酶类降解。

Buchnera groEL由蚜虫腹部的菌胞——一个专化的脂肪体细胞所包含的胞内共生菌(*Buchnera sp.*)合成，其为分子伴侣cpn家族成员[2]。已知大肠杆菌分子伴侣GroEL蛋白参与多肽的折叠、蛋白组装、转位等过程，蚜虫 *Buchnera* GroEL是否还参与体内病毒传播的其他过程还不得而知。Filichkin等在蚜虫唾液中检测到类似 *Buchnera* GroEL的分子存在[3]，因而可能与其病毒从血淋巴到唾腺(ASG)的转运有关。本研究为进一步研究此基因在桃蚜传毒过程中的生物学功能及其基因工程应用方面打下了基础。

参考文献

[1] Gray S M, Banerjee N. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal virus[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1999, 63(1): 128-148

[2] Van den Heuvel J F J M, Verbeek M, van der Wilk F. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*[J]. J Gen Virol, 1994, 75: 2559-2565.

[3] Filichkin S A, Brumfield S, Filichkin T P, *et al*. *In vitro* interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with barley yellow dwarf virus[J]. J Virol, 1997, 71: 569-577.

[4] Hogenhout S A, van der Wilk F, Verbeek M, *et al* Potato leafroll virus binds to the equatorial domain of the aphid endosymbiotic GroEL homology[J]. J Virol, 1998, 72: 358-365.

[5] Hogenhout S A, van der Wilk F, Verbeek M, *et al*. Identification the determinants in the equatorial domain of *Buchnera* GroEL implicated binding *Potato leafroll virus*[J]. J Virol, 2000, 72(10): 4541-4548

[6] 吴云锋. 蚜虫传毒机制的研究[D]. 陕西杨凌: 西北农业大学, 1994.

[7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南(第二版)(金冬雁, 黎孟枫等译). 北京: 科学出版社, 1992.

[8] Douglas A E. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*[J]. Annu Rev Entomol, 1998, 43: 17-37.