

## 马尾松毛虫质型多角体病毒 S4 的 cDNA 克隆及序列分析\*

赵淑玲, 梁昌镛, 洪靖君, 彭辉银\*\*

(中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉, 430071)

cDNA Clone and Sequence Analysis of Segment 4 of *Dendrolimus punctatus*  
*cytoplasmic polyhedrosis virus*

ZHAO Shu-ling, LIANG Chang-yong, HONG Jing-jun, PENG Hui-yin\*\*

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

**Abstract:** *Dendrolimus punctatus* cytoplasmic polyhedrosis virus (DpCPV) genome dsRNA was extracted and S4 was separated. RT-PCR amplification technique was adopted to clone the viral genomic dsRNA S4 for sequence determination. The results showed: the full length of S4 is 3262bp, it contains one large open reading frame and encodes a polypeptide with 1058 amino acids in length. The similarity of predicted protein were 94%, 92% and 22% with LdCPV, BmCPV and RRSV, respectively. Amino acid sequences similar to a GTPase, methyltransferase of *Methanosarcina mazei* Goel motifs were also present in the deduced protein.

**Key words:** Sequence analysis; *Dendrolimus punctatus* cytoplasmic polyhedrosis virus; S4; Polyadenylation

**摘要:** 从马尾松毛虫质型多角体病毒湖南株中提取病毒核酸, 回收、纯化第四片段 S4, 经 RT-PCR 扩增得到了 S4 的 cDNA 克隆并测定了其全序列。结果表明, S4 全长由 3 262 个碱基组成, 包含一个编码 1058 个氨基酸的完整开放阅读框架。Blast 同源分析显示, DpCPV S4 与 LdCPV S4、BmCPV S4 和 RRSV S2 编码蛋白氨基酸的同源性分别为 94%、92% 和 22%。另外, 氨基酸序列部分区域与 *Methanosarcina mazei* Goel 的甲基化转移酶有同源性, 且序列中含有鸟苷酸转移酶活性位点。

**关键词:** 马尾松毛虫质型多角体病毒; S4; 多聚腺苷化; 序列分析

中图分类号: S433

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 03-0246-05

质型多角体病毒 (Cytoplasmic Polyhedrosis Viruses, CPV) 属于呼肠孤病毒科 (Reoviridae) 质型多角体病毒属 (Cypovirus)。根据基因组 dsRNA 电泳迁移图谱的类型将 CPV 分为 14 个型, 马尾松毛虫质型多角体病毒 (*Dendrolimus punctatus* CPV, DpCPV) 为 CPV-I 型, 基因组由 10 条分段的 dsRNA 组成。目前 CPV 基因已经克隆测序的多为多角体蛋白基因, 包括家蚕质型多角体病毒 (*Bombyx mori* CPV, BmCPV)<sup>[1]</sup>、冷杉合毒蛾质型多角体病毒 (*Orgyia pseudotsugata* CPV, OpCPV)、棉铃虫质型

多角体病毒 (*Heliothis armigera* CPV, HaCPV)<sup>[2]</sup>、白切根虫质型多角体病毒 (*Euxoa scandens* CPV, EsCPV)<sup>[3]</sup>、枞色卷蛾质型多角体病毒 (*Choristoneura fumiferana* CPV, CfCPV)<sup>[4]</sup>、马尾松毛虫质型多角体病毒 (DpCPV)<sup>[5]</sup>。对它们的多角体蛋白基因进行比较, 发现同一型的 CPV 之间核酸序列和氨基酸序列均有比较高的同源性, 而不同型的 CPV 之间核酸序列无同源性, 氨基酸序列部分区域有同源性, 但同源性不高。

CPV-I 型病毒粒子由 VP1、VP2、VP3、VP4、

收稿日期: 2002-10-09, 修回日期: 2002-11-05

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270057)

作者简介: 赵淑玲 (1979-), 女, 山东省籍, 硕士生, 研究方向为病毒生物防治。

\*\* 通讯作者: 彭辉银 (1950-), 湖北省籍, 研究员, 研究方向为病毒生物防治。Correspondence author.

VP5 五种结构蛋白组成, 分别由 DpCPV-1 第一(S1)、三(S3)、第四(S4)<sup>[6]</sup>、第六(S6)、第七(S7)片段<sup>[7]</sup>编码, 第二片段(S2)编码依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶基因, 第八(S8)<sup>[8]</sup>、第九(S9)片段<sup>[9]</sup>编码病毒的两种非结构蛋白, 病毒的多角体蛋白则由第十片段编码。对 BmCPV 细胞外 I<sup>125</sup> 标记显示 VP1 和 VP3 为病毒粒子的衣壳蛋白<sup>[10]</sup>。

DpCPV 是我国重大森林害虫—松毛虫的重要致病病毒, 它通过感染幼虫的排泄物进行水平扩散, 通过带毒成虫产卵进行垂直传递, 对松毛虫有良好的持续控制效果。一直以来, 对 DpCPV 的研究多为生物学特性及病毒制剂, 分子生物学研究较少。因此开展 DpCPV 基因组的序列测定、功能分析和病毒的侵染、复制及其致病机理等方面研究具有十分重要的意义。

DpCPV S4 编码的蛋白 VP3 是病毒粒子的重要组成部分, 可能在病毒的感染过程中起重要作用。本文克隆和测定了 DpCPV 完整基因序列, 并进行了同源性比较分析及编码蛋白部分功能的分析。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 病毒、质粒及菌种: DpCPV 湖南株为本实验室保藏, 感染 4 龄松毛虫 10d 后, 病毒从质多角体提取; pGEM-T 载体购自 Promega 公司; DH5a 为本所病毒室保藏菌种。

1.1.2 试剂: Taq DNA 聚合酶、RNaseH、限制性内切酶均为 Takara 公司产品; M-MLV 逆转录酶为 Promega 公司产品; Gel Extration Mini Kit 购自上海华舜公司; RNaid Kit 为 QBiogene(Bio101)产品。

### 1.2 方 法

1.2.1 马尾松毛虫质型多角体病毒 dsRNA 的提取: 参照刘润忠等<sup>[11]</sup>的 SDS-热酚法提取病毒核酸, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离各片段后用 RNaid Kit(Bio101)回收 S4, 溶于 DEPC 处理的纯水中。

#### 1.2.2 引物设计:

寡聚胸腺核苷引物 Adapter-Oligo (dT): 5'-GGCGAAGCTTGTGCGACGAATTC(T)<sub>17</sub>-3'

锚定引物 Adapter: 5'-GGCGAAGCTTGTGCGAAGCTTC-3'

根据 Ikeda<sup>[6]</sup>等测的 BmCPV S4 的序列设计的特异性引物:

4a: 5'-CATCTTGCGGATTAGAATAG-3' (439-458bp)

4b: 5'-GCCACAGCTATGCTAACCAG-3' (2825

-2872bp)

41: 5'-CCACCATGTGGCATTATACGAGTATC-3' (9-34bp)

42: 5'-ATCTATAGGGAATGGCACACGGACC-3' (1804-1828bp)

43: 5'-GGAATGGGAGATAGAGCGGTTCGAGC-3' (1770-1795bp)

44: 5'-GTGCGCCGTTGATTGTCCTAGTCTGG-3' (2919-2944bp)

1.2.3 DpCPV S4 两末端序列 cDNA 合成及 PCR 扩增: 采用在 dsRNA 3'端加 poly (A) 的方法<sup>[12,13]</sup>以获得到 S4 完整的末端序列。取 50ng 回收的 DpCPV S4 双链 RNA, 95℃ 变性 5min 后迅速置冰上冷却。多聚腺苷化反应: 50mmol/L Tris-HCl (pH7.9), 10mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 250mmol/L NaCl, 2.5mmol/L MnCl<sub>2</sub>, 1mmol/L DTT, 1mmol/L ATP, 1.5U Poly (A) 聚合酶。37℃ 反应 10min。多聚腺苷化的 RNA 加 Adapter-Oligo(dT)引物, 95℃, 3min 后迅速置冰上冷却。用 M-MLV 逆转录酶 (200U) 在 37℃ 保温 1h 进行逆转录, 然后 90℃, 5min 终止反应。取逆转录反应产物 5μL, 加一末端特异性引物 (两末端特异性引物分别为 4a 和 4b) 和 Adapter 引物进行 PCR 反应, 反应条件为: 94℃ 5min 后, 以 94℃ 30s, 56℃ 40s, 72℃ 1min, 30 个循环, 最后 72℃ 5min。

1.2.4 DpCPV 内部序列 cDNA 合成及 PCR 扩增: 将 DpCPV S4 分两段进行扩增。取 50ng 回收的 DpCPV S4 与两个内部特异性引物各 50pmol, 95℃, 5min 变性后迅速于冰上冷却。加入 dNTP、M-MLV 逆转录酶 (200U) 合成 cDNA 第一链。然后进行 PCR 扩增, 扩增条件为 94℃ 40s, 54℃ 40s, 72℃ 1.5min, 35 个循环。

1.2.5 cDNA 克隆: 用琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 纯化 DNA, 连接到 pGEM-T 载上。连接产物转化 DH5a 感受态细胞后, 涂于含有 Amp/IPTG/X-gal 的 LB 平板。

1.2.6 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。

1.2.7 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 DpCPV S4 两末端片段的扩增

通过在 dsRNA 两条链的 3'端加 Poly(A)尾, 然后用 Oligo (dT) 和根据 BmCPV S4 序列设计的引物经 RT-PCR 扩增出末端片段。以 Oligo (dT) 和 4a 为引物扩增的产物定为 F4a, 用引物 Oligo (dT) 和 4b 扩增的 cDNA 产物定为 F4b。然后分别将 RT-PCR 产物连接到 pGEM-T 载体上得到重组质粒 pGEM-4a 和 pGEM-4b, 分别用 *Nco* I 和 *Not* I 双酶切鉴定 pGEM-4a 和 pGEM-4b。结果如图 1 所示:

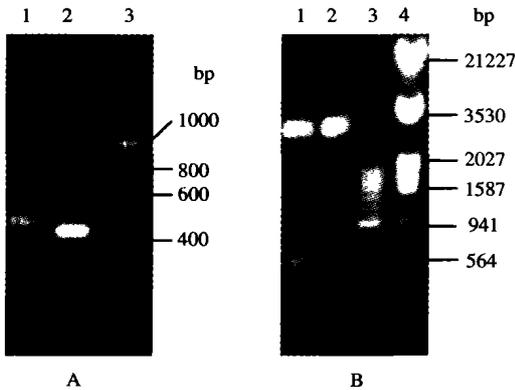


图 1 DpCPV S4 两末端片段的 RT-PCR 产物及重组质粒酶切鉴定

Fig.1 Analysis of the RT-PCR products and recombinants of DpCPV S4 terminal sequence

A: 1, PCR product F4a; 2, PCR product F4b; 3, 200bp DNA Marker.

B: 1, pGEM-4a/*Nco* I + *Not* I; 2, pGEM-4b/*Nco* I + *Not* I; 3, 200bp DNA Marker; 4,  $\lambda$  DNA/*Eco*RI + *Hind* III

## 2.2 DpCPV S4 内部片段的扩增

根据已经发表的 BmCPV 第 4 片段的序列设计引物, 分两部分克隆 DpCPV S4 内部片段, 用引物 41 和 42 扩增的 cDNA 产物为 F41, 引物 43 和 44 扩增的 cDNA 产物为 F42, 分别连接到 pGEM-T 载体上得到重组质粒 pGEM-41 和 pGEM-42, 分别用 *Nco* I 和 *Not* I 双酶切鉴定 pGEM-41 和 pGEM-42, 结果如图 2 所示。

## 2.3 克隆片段的序列测定及分析

采用在 dsRNA 3'端加 poly(A) 的方法<sup>[12,13]</sup>获得 S4 两末端片段的扩增产物 F4a 和 F4b, 中间序列用特异性引物分两段扩增得到产物 F41 和 F42, 将它们分别克隆并测序, 得到了 DpCPV S4 的全长序列。该序列已经登录 GenBank 号为 AF542082。对 DpCPV S4 全序列进行分析, 结果表明: S4 全长为 3262nt, 包含一个可以编码 1058 个氨基酸的开放性阅读框, 起始密码子 ATG 位于 14~16 残基, 终止

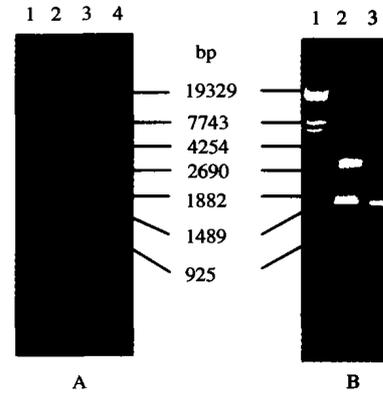


图 2 DpCPV S4 内部片段的 RT-PCR 扩增及重组质粒酶切鉴定

Fig.2 Analysis of the RT-PCR products and recombinants analysis of DpCPV S4 internal sequence

A: 1, pGEM-42/*Nco* I + *Not* I; 2, PCR product F42; 3, 200bp DNA Marker; 4,  $\lambda$ -*Eco*T14 I digest.

B: 1,  $\lambda$ -*Eco*T14 I digest; 2, pGEM-41/*Nco* I + *Not* I; 3, PCR product F41.

密码子 TAA 位于 3188~3190 残基, 编码蛋白的分子量为 119kDa。S4 编码蛋白含有一些  $\alpha$ -helix、coli 等二级结构, 但无  $\beta$ -turn 结构, 整体结构比较  $\alpha$ -helix 结构占 31.2%。与 BmCPV VP3 蛋白的疏水性及抗原性比较显示, 两者疏水性的曲线峰值极为相近, 抗原性曲线有部分地方不同。同源性分析显示, DpCPV S4 与 BmCPV S4、LdCPV -1 核苷酸的同源性均为 82%, 而氨基酸的同源性分别为 92%、94%; 与 LdCPV -14 S4、RRSV P2 蛋白的同源性为 32%和 22%; 与 RBSDV S3、FDV S4 编码蛋白的氨基酸序列只有部分同源性, 同源性分别为 26% (526-675 个氨基酸)、26% (503-648 个氨基酸)。与 BmCPV S4 比较, 共有 571 个碱基发生突变, 发生在密码子第三位碱基上的突变占总突变率的 77.2%, 这种突变多数并没有引起氨基酸序列的变化。在 S4 编码蛋白氨基酸序列的 77-81aa 位含有一个鸟苷酸转移酶活性位点, 另外与 *Methanosarcina mazei* Goe1 的甲基化酶在 365-482aa 处有 30%的同源性 (见图 3)。

## 3 讨论

质型多角体病毒 (CPV) 基因组为分段的 dsRNA, 和所有真核生物一样, CPV 的 mRNA 的 5' 端也都经过加帽和甲基化, 形成 mGpppAmpGp 结构, 但 3' 端无 poly(A) 的尾巴。Lambden 等<sup>[14]</sup>采用单引物扩增法, 用 T4 RNA Ligase 在 dsRNA 的 3'

DpCPV	365	ISNTGQGRIKHS LAVTGITQHSTVPDIVLGPTS-----EDVITISMVEP----MSIAAEDMYGY---
		** *++** *+* *+ + + ++ ++ + + + ** +++ + + **+ +
Mtase	43	MTQENKGRVEKTLTSGMALTPESESRVLDIGAGPGSLAIPLAEMVAHVTAVEPAEGMMEILKQNMETYGTR
DpCPV	423	VIDTPTRDIWPADEQVEQKGDVAVALYDTK-TSRALGMFNNTIRIDDLLSPLLQGVYRITYAKGDT
		++ *+ + + +* + ++ +* +++* + ** + ++ * +++
Mtase	111	NIDCVYKD-W---ETVDAGSDLCPPYDVVFASYSGLMKDIRASIQKMDVSSGGYVYLYWFAGDT

图3 DpCPV S4 编码蛋白与 *Methanosarcina mazei* Goel 的甲基化酶的氨基酸序列同源性比较

Fig.3 Amino acids homologous analysis of protein encoded by DpCPV S4 and methyltransferase of *M. mazei*

'+' represent identical amino acids and '\*\*' represent similar amino acids.

端连接-DNA 引物, 然后用与其互补的引物经 RT-PCR 得到完整的序列。但是 dsRNA 和引物的连接效率比较低, 且已连接上引物的 dsRNA 和未连上的 dsRNA 很难分开, 所以得到目的产物比较困难。通过在 dsRNA 末端加 poly(A)尾, 用 Oligo(dT) 经 RT-PCR 也可得到完整的序列。由于 Poly(A)聚合酶在 RNA3'端加尾的效率比较高, 所以容易得到全长的片段, 但这种方法一般适用于扩增较短的片段。DpCPV 全长 3262bp, 片段比较长, 我们先在 dsRNA 末端加 poly(A)尾得到 DpCPV S4 的两末端片段, 然后利用特异性引物扩增得到中间片段, 拼接后得到了其完整的序列。DpCPV 和 BmCPV 同属于 CPV-I 型, 各对应片段序列之间有较高的同源性, 所以不需用随机引物法引导 cDNA 合成, 而直接根据 BmCPV S4 序列设计特异性引物来扩增内部片段。这种方法对于 DpCPV 的 cDNA 合成来说是一种简单、可行的方法。

通过序列的同源性比较显示, DpCPV S4 与 BmCPV S4、LdCPV-I S4 有比较高的同源性(核苷酸的同源性为 82%, 氨基酸的同源性分别为 92%、94%), 而与 LdCPV-14 S4 的同源性较低(32%)。DpCPV、BmCPV、LdCPV-I 同为 CPV-I 型, 它们之间同源性高, LdCPV-14 属于 CPV-14 型, 同源性比较低。DpCPV S4 和呼肠孤病毒科的 RRSV S2、RBSDV S3、FDV S4 有同源性, 而与本科的其它病毒则未见有同源性, RRSV、RBSDV、FDV 均为植物呼肠孤病毒, 显示了昆虫呼肠孤病毒和植物呼肠孤病毒有近源关系。

钟伯雄<sup>[15]</sup>在研究家蚕质型多角体病毒时发现, BmCPV S4 编码的蛋白 VP3 可与 GTP 结合, 另外还可与 dsRNA 结合, 而病毒粒子的其它结构蛋白则无此作用。推测 VP3 可能在病毒核酸 RNA 形成

mGpppAmpGp 帽子结构时起作用, 具有鸟苷酸转移酶的作用。在本实验中, DpCPV S4 编码蛋白的氨基酸序列与甲基化转移酶有同源性, 且含有鸟苷酸转移酶的活性位点模式结构, 进一步证明了 CPV-I 型 VP3 蛋白在 RNA 形成帽子结构时起作用。

对 BmCPV S4 和 DpCPV S4 的疏水性及抗原性分析显示, 它们的疏水性曲线基本没有变化, 而抗原性曲线有些区域变化比较明显, 说明了它们抗原性的不同。对 CPV 的研究发现, BmCPV 的宿主域比较窄, 对松毛虫无感染性, 而 DpCPV 对家蚕则有一定感染性<sup>[16]</sup>。是否因为抗原性的变化导致了其宿主域的不同有待进一步证明。

### 参考文献

- [1] Arella M, Lavallee C, Bellonck S, et al. Molecular cloning and characterization of CPV polyhedrin and its viable deletion mutant gene [J]. J Virol, 1988, 62: 211-217.
- [2] Galinski M S, Yi Y, Heminway B, 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.
- [3] Fossiez F, Bellonak S, Arella M. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Euxoa scandens* cytoplasmic polyhedrosis virus (EsCPV) [J]. Virology, 1989, 169: 462-465.
- [4] Fernando E, Jean B, William K, et al. Sequence analysis and expression of the polyhedrin gene of *Choristoneura fumiferana* cytoplasmic polyhedrosis virus (CfCPV) [J]. Gene, 1997, 198: 399-406.
- [5] 杜建宇, 张珈敏, 郭海涛, 等. 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 [J]. 中国病毒学, 2001, 16(4): 350-354.
- [6] Ikeda K, Nagaoka S, Winkler S, et al. Molecular characterization of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 4 [J]. J Virol, 2001, 75 (2): 988-995.
- [7] Hagiwara K, Matsumoto T. Nucleotide sequences of genome segments

- 6 and 7 of *Bombyx mori cyovirus 1*, encoding the viral structural proteins V4 and V5, respectively [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1143-1147.
- [8] Hagiwara K, Tomita M, Kobayashi J, *et al.* Nucleotide sequence of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus segment 8 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 72: 5262-5268.
- [9] Hagiwara K, Tomita M, Nkai K, *et al.* Determination of the nucleotide sequence of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus segment 9 and its expression in BmN cells [J]. *J Virol*, 1998, 72: 5762-5768.
- [10] Lewandowski L J, Traynor B L. Comparison of the structure and polypeptide composition of three double-stranded ribonucleic acid-containing viruses (*Diplomaviruses*): cytoplasmic polyhedrosis, wound tumor virus, and reovirus [J]. *J Virol*, 1972, 10: 1053-1070.
- [11] 刘润忠, 谢天恩, 彭辉银, 等. 文山松毛虫质型多角体病毒形态结构及理化性质的研究 [J]. *中国病毒学*, 1992, 7 (1): 69-79.
- [12] Cashdollar L M, Esparza J, Hudson G R, *et al.* Cloning the double stranded RNA genes of reovirus: sequence of cloned S2 gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 7644-7648.
- [13] Fang Q, Attoui H, Biagini J F P, *et al.* Sequence of genome segments 1, 2, and 3 of the Grasscarpeovirus (genus *Aquareovirus*, family Reoviridae) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 274: 762-766.
- [14] Lambden P R, Cooke S J, Caul Q, *et al.* Cloning of noncultivable human rotavirus by single primer amplification [J]. *J Virol*, 1992, 66: 1817-1822.
- [15] 钟伯雄. 家蚕质型多角体病毒的三磷酸结合蛋白 [J]. *蚕业科学*, 2001, 27 (1): 38-41.
- [16] 赵同海, 张永安, 王玉珠, 等. 松毛虫质型多角体病毒 RT-PCR 检测技术的建立 [J]. *林业科学*, 2001, 37 (3): 78-82.

## 彩 版

秦启联,等. 粘虫核型多角体病毒和颗粒体病毒侵染粘虫前胸腺的病理观察(正文见第 246 页)

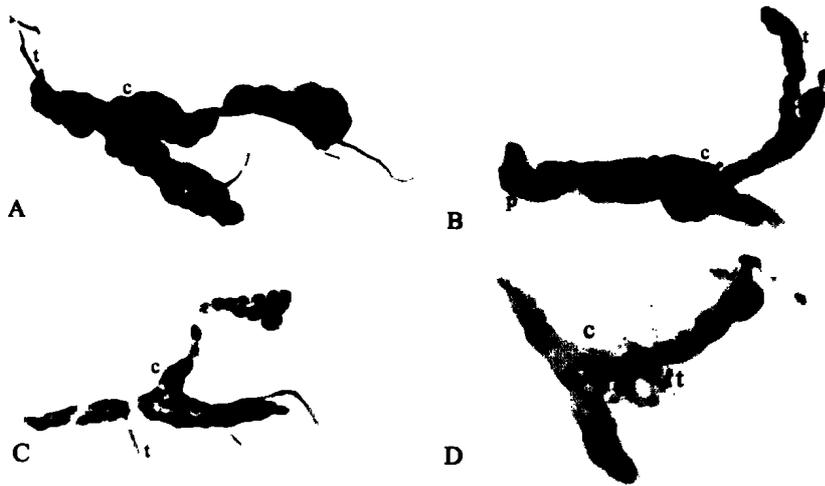


图 1 感染病毒后的粘虫前胸腺的病理观察

A, 正常 6 龄粘虫前胸腺; B, PsNPV 感染 10d 后粘虫的前胸腺; C, PsGV 感染 12d 后粘虫的前胸腺; D, PsNPV+PsGV 感染 10d 后粘虫的前胸腺。  
c, 腺体细胞; p, 沉积在气管周围的病变物; t, 气管。

Fig.1 Pathological changes of *Pseudaletia separata* prothoracic gland (PTG) after baculoviruses infection

A, PTG in non-infected 6 instar larva; B, PTG in PsNPV 10d p.i. larva; C, PTG in PsGV 12d p.i. larva; D, PTG in PsNPV+PsGV10d p.i. larva. c, cells of the PTG; p, some pathological changes around the tracheae; t, the trachea.

许振辉,等. 猪瘟病毒野毒株持续感染细胞模型的稳定性研究(正文见第 266 页)

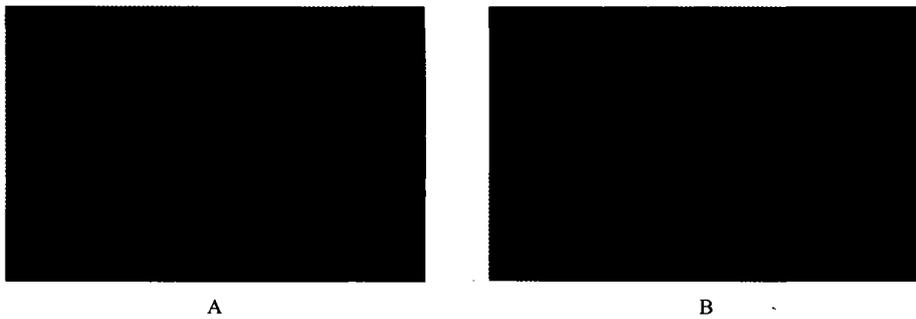


图 1 CSFV39 在宿主细胞内的免疫荧光检测

A, 第 128 代 CSFV39-PK15 细胞 (X200); B, 阴性对照 (X200)。

Fig.1 The detection of CSFV39 antigen (Detected by immunofluorescence Technique) in CSFV39-PK15 cells

A, The 128th passage CSFV39-PK15 cells post infection (X200); B, PK-15 control cells (X200).