

马尾松毛虫 CPV 基因组第 5 片段的 cDNA 克隆及其序列分析

李 杨, 张珈敏, 汪 洋, 李艳秋, 胡建芳, 胡远扬**

(武汉大学病毒研究所, 湖北武汉, 430072)

Molecular Cloning and Sequence Analysis of *Dendrolimus punctatus cytoplasmic polyhedrosis virus Segment 5*

LI Yang, ZHANG Jia-min, WANG Yang, LI Yan-qiu, HU Jian-fang, HU Yuan-yang**

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: *Dendrolimus punctatus* polyhedra were purified from infected *Dendrolimus punctatus* Larvae using density centrifugation. *Dendrolimus punctatus cytoplasmic polyhedrosis viruses* (DpCPV) were subsequently extracted from polyhedra by SDS treatment, followed by 1% agarose gel electrophoresis, and the segment dsRNA 5 was purified after being excised from the gel. On the basis of nucleotides homology, five pairs of primers were designed. After the RT-PCR, five sub-clone segments were obtained, following sequencing and splicing, the complete nucleotide sequence of the genome segment 5(S5) of DpCPV was determined. The 2851-nucleotide sequence contains a single long open reading frame which spans nucleotides 71 to 2714 and was predicted to encode a protein with a molecular mass of about 100.3kDa. Sequence analysis and deduced amino acid sequence of DpCPV S5 revealed high homology with proteins from LdCPV-1 and BmCPV. From the phylogenetic tree, we can analyse the classification and evolutionary relationship in viruses.

Key words: *Dendrolimus punctatus* CPV (DpCPV); RT-PCR; Phylogenetic tree

摘要: 通过差速离心从感染的马尾松毛虫幼虫虫体中提取质型多角体病毒。碱解法提纯病毒粒子, 1%琼脂糖凝胶分离基因组 dsRNA, 回收纯化第五片段(S5)。根据同源性设计五对引物, 经 RT-PCR, 最终获得五个亚克隆片断, 测序拼接后, 得到 S5 全长。片断全长 2851 个核苷酸, 包括一个 2643 个核苷酸的开放阅读框。推测 DpCPV S5 基因编码了 881 个氨基酸长的多肽, 分子量为 100.3kDa, 与舞毒蛾质型多角体病毒(LdCPV-1)和家蚕质型多角体病毒(BmCPV)比较, 核苷酸和氨基酸的同源性都很高。进一步分析, 利用几种 CPV 序列绘制了系统进化树, 对病毒的分类和进化做了探讨研究。

关键词: 马尾松毛虫质型多角体病毒; 逆转录; 系统进化树

中图分类号: S433

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 04-0352-05

质型多角体病毒 (*Cytoplasmic polyhedrosis virus*, CPV) 是呼肠孤病毒科 (*Reoviridae*) 中具有属的分类地位的类群。1973 年, 我国首次发现马尾松毛虫质型多角体病毒 (*Dendrolimus punctatus cytoplasmic polyhedrosis virus*, DpCPV), 其后, 对该病毒的形态结构、组织病理和理化特性等进行了研究^[1]。其基因组电泳呈 9 个条带, 与家蚕质型多角

体病毒 1 型 (BmCPV-1) 很相似, 同属 CPV-1 型。近年来, 随着基因组学的不断发展, BmCPV 基因组的全序列测定已经完成, 各基因组片段的功能研究也迅速开展^[2]。但总的看来, 质型多角体病毒 14 个电泳型的分子生物学研究还很薄弱。DpCPV 作为我国特有种, 分子水平上的研究才刚刚开始。对 DpCPV 分子水平上的研究将为该病毒的分类及功

收稿日期: 2003-01-21, 修回日期:

作者简介: 李杨 (1978-), 男, 湖北黄石籍, 硕士, 研究方向为昆虫病毒分子生物学。

** 通讯作者: 胡远扬 (1949-), 男, 湖北汉川籍, 教授, 博士生导师, 主要从事昆虫病毒分子生物学研究。Correspondence author.

能确定提供有力的依据。本实验室在人工增殖 DpCPV 的基础上, 对其基因组片断进行了序列测定, 成功完成了 S10、S9 编码区以及 S8 片断的工作^[3], 其它片断的测定也正在进行。本实验通过同源性设计引物, 对 DpCPV S5 片断全序列进行了 cDNA 克隆和序列测定。通过序列分析比较发现, DpCPV S5 序列全长 2851 个核苷酸 (GenBank 登记号 AY185594), 最大 ORF 编码 881 个氨基酸, 和 LdCPV-1 及 BmCPV 相应基因组片断同源性很高。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

马尾松毛虫质型多角体病毒 (DpCPV) 由本实验室保藏。逆转录酶 M-MLV 和 Taq 酶及玻璃奶购自 MBI 公司, 限制性内切酶、pMD18-T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司, *E.coli* DH5 α 由本实验室保存, RT-PCR 引物由赛百胜公司合成。根据同源性比较, 利用 Primer Premier5 设计引物, S1-5 为 sense primer, A1-5 为 anti-sense primer, 五对引物如下。

S1: 5' GGCCGAGTAATTTCCCGTC 3'
 S2: 5' CGGCAGAGCCATAATGAAACG 3'
 S3: 5' GGCGATAAAGTTGTGCGGTG 3'
 S4: 5' CAGCAGTGCGATTCAACTTTC 3'
 S5: 5' CAGCGAAGAATCCGACATACCCCT 3'
 A1: 5' AGCAGGGCCTATGCAAGTCG 3'
 A2: 5' GGAAGGCTAACCATCTCCCCG 3'
 A3: 5' TCGGCGTGCTATCTTATGTTCC 3'
 A4: 5' CCGAGGTAGTGGGTCCAGGG 3'
 A5: 5' GCCGTGTTTAGAACGAACCTCAT 3'

1.2 病毒的增殖纯化和 dsRNA 的抽提

病毒的增殖、纯化参考 Arella 等人的方法^[4], 经过差速离心、蔗糖梯度离心和多角体的碱解, 获得纯化的 DpCPV 江西株病毒粒子。采用 SDS-热酚法从病毒粒子中纯化 dsRNA。

1.3 S5 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 S5 的凝胶。用玻璃奶回收试剂盒回收 S5 片断。

1.4 cDNA 第一链的合成及其 PCR 扩增

取纯化的基因组单一片段 S5 500ng 溶于经 DEPC 处理的 ddH₂O 中, 96°C 水浴加热 8min 使之变性。cDNA 第一链合成参考 Hagiwara 等人的方法^[5], 取 500ngRNA 样品与 Sense primer 和 Anti-sense primer 各 20pmol, 在 70°C 下退火, 然后再加入 dNTP,

M-MLV 逆转录酶, 合成 cDNA 第一条链。随后进行 PCR 扩增, 加入引物各 40pmol, Taq 聚合酶 2 个单位, 扩增条件: 94°C 变性 60s, 52°C 退火 60s, 72°C 合成 90s, 30 个循环后, 于 72°C 放置 10min 使延伸反应充分进行。五对引物分别扩增出片断 P280, P650, P890, P590, P790, 五个片段, 经 SeqMan 软件进行拼接、编辑和校对, 得全长片断。克隆策略见图 1。

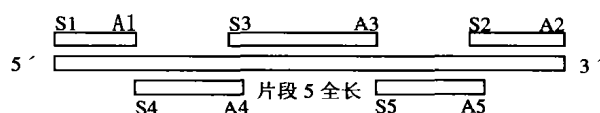


图 1 S5 克隆和序列测定策略

Fig.1 Cloning and sequencing strategy of S5

1.5 cDNA 克隆

用琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 回收纯化目的 DNA。按照 PMD18-T 载体的操作手册将 PCR 产物与载体连接。连接产物转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞后, 涂于含有 Amp/IPTG/X-gal 的平板上。

1.6 重组质粒的筛选和鉴定

从平板上挑取白斑, 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。

1.7 DNA 序列测定分析

以阳性克隆子为模板, 引物采用质粒载体上的通用引物进行测序。测序工作由上海博亚公司完成。核酸和蛋白质数据分析采用 DNASIS、DNATOOL 及 DNASTAR 等序列分析软件分析, 同源性数据经 BLAST 在 GenBank 中获得。

2 结果

2.1 DpCPV S 片断的回收

在 1% 的琼脂糖凝胶电泳中, DpCPV 基因组核酸和质型多角体病毒 1 型基因组图谱一致 (图 2)。目的片段为 2.8kb。

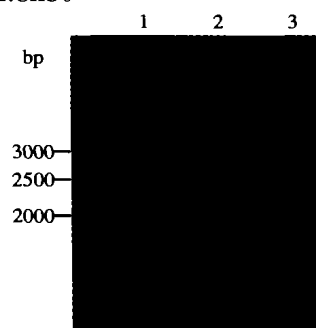


图 2 DpCPV 基因组及第五片段的回收

Fig.2 DpCPV genome and purification of S5

1, Marker; 2, DpCPV genome; 3, S5 segment recovered.

2.2 DpCPV 基因组第五片段的引物设计及序列测定

通过同源性分析,由 GenBank 获取 BmCPV 及

LdCPV-1 型第五片断序列,参考末端序列的高度保守性,设计的引物。S1 和 A1,及 S2 和 A2 扩增出目的片段大小约 280bp 和 650bp (图 3A)。

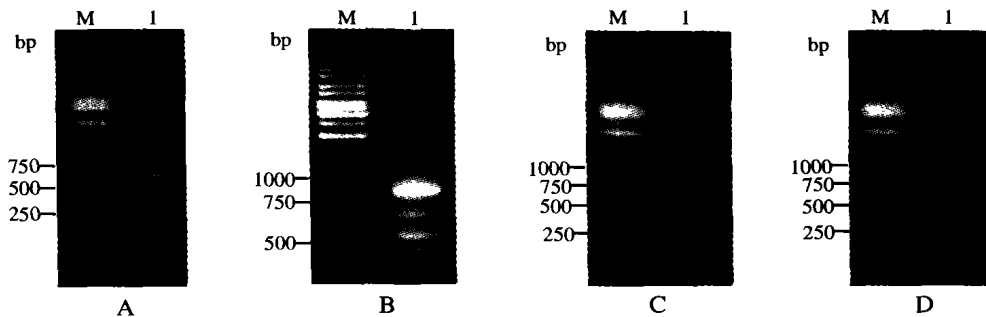


图 3 五对引物的 RT-PCR 电泳图

A: 引物 A1-S1 及 A2-S2; B: 引物 A3-S3; C: 引物 A4-S4; D: 引物 A5-S5; M, DNA 标准分子量; I, RT-PCR 电泳结果。

Fig.3 Electrophoresis of five primers by RT-PCR

A: primer A1-S1 and A2-S2; B: primer A3-S3; C: primer A4-S4; D: primer A5-S5; M, DNA marker; I, Electrophoresis of RT-PCR.

通过引物 A3 和 S3 扩增出的片段中,虽然出现了三条较小的非特异性条带,但目的片断清晰,大小约为 890bp,回收该片断后,进行测序,也进一步证实了这个 890bp 的片段为目的片段 (图 3B)。

以上三个片断做序列测定后,根据已测序列设计引物, S4 和 A4 扩增出目的片段 590bp (图 3C), S5 和 A5 扩增出目的片段 790bp (图 3D)。经拼接,得完整的第五片断序列全长。

2.3 DpCPV 基因组第五片段的核苷酸及氨基酸序列特征

第五片段 PCR 产物克隆片段的序列测定结果: DpCPV 基因组第五片段的全长 2851bp, GenBank 登记号为 AY185594。其中包含一个 2643bp 大小的 ORF,起始于 71bp 处,终止于 2714bp 处,此编码蛋白由 881 个氨基酸构成。核酸全序列在数据库 GenBank 上比较发现,与舞毒蛾质型多角体病毒 (LdCPV-1) 和家蚕质型多角体病毒 (BmCPV) 第五片段同源性为 99% 和 80%,氨基酸比较, LdCPV-1 和 BmCPV 分别为 99% 和 86%。在数据库中,并没有发现其它序列在比较中获得较高的分值 (Score)。

2.4 蛋白质特性分析

经 DNASIS 对 ORF 编码的蛋白质进行二级结构预测,比较发现和 BmCPV 和 LdCPV-1 中的同种编码蛋白构型基本一致。等电点经 DNASTAR 中 Protean 分析为 6.8, 分子量为 100.3kDa。该蛋白质二级结构、抗原性、亲/疏性等预测 (图 4)。

2.5 系统发育树的比较

系统发育树的绘制选择质型多角体 1 型中的 DpCPV、LdCPV 和 BmCPV 的 H 株、I 株, 5 型中的 TnCPV, 14 型中的 LdCPV, 以它们基因组的第五片断或与其相类似片断,由 MegAlign 中的 Jotun Hein 方法绘制 (见图 5)。我们可以发现, BmCPV 的 H、I 株的进化关系, LdCPV-1 和 DpCPV 的进化关系很近,而它们和不同型的 TnCPV、LdCPV-14 的进化关系较远。

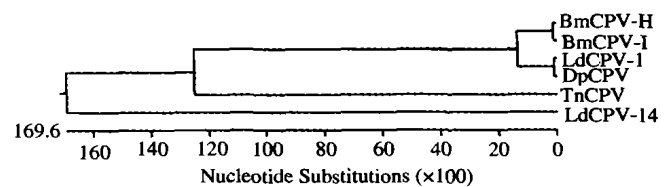


图 5 几种 CPV 核酸序列建立的分子系统进化树

Fig.5 A phylogenetic tree, using some kinds of CPV nucleotide sequence

3 讨论

质型多角体病毒属,原称质型多角体病毒亚组,属昆虫呼肠孤病毒,代表种为家蚕质型多角体病毒 1 型。根据 Payne 等 1976 年提出的方法,以基因组 dsRNA 在琼脂糖或 PAGE 图谱差异将质型多角体病毒分为 14 个电泳型。不同电泳型间至少有 3 个基因节段的迁移率不同^[6,7]。由于 CPV 基因组每一节段都单独复制和表达,一般一个节段对应一种蛋白,多数节段实际的编码框与理论推测的最大开放阅读框一致,只有少数节段编码的蛋白须经

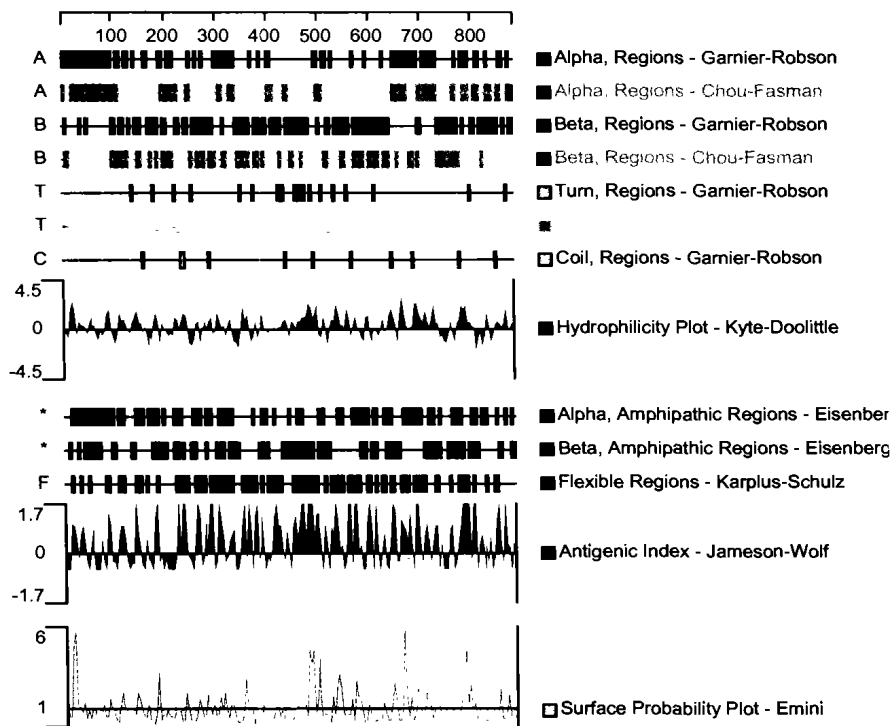


图 4 S5 编码蛋白的二级结构、抗原性及疏水性/亲水性预测

Fig.4 secondary structure, antigenicity predictions and hydrophobicity plot of S5 protein

过表达后的切割, 所以 CPV 基因组片段的大小与编码的蛋白的大小有很强的相关性^[2]。基因组 dsRNA 片段交叉杂交分析与病毒结构蛋白血清学比较, 都证明这一分类系统的可行性。在不同电泳型之间迄今未发现 RNA 序列同源性而且血清学交叉反应的水平也很低^[8, 9]。这种分类方法优于早期的习惯上以质型多角体病毒的昆虫宿主来命名的方法。

目前质型多角体病毒的命名, 同时包括基因组电泳型与其原始宿主名。对同一电泳型内或不同电泳型间的质型多角体分子水平的相互关系知之甚少。截至本文撰写时, 能从 GenBank 中获得的 CPV 序列有 BmCPV H、I 株, LdCPV 1、14 型, TnCPV 5 型全基因组序列, DpCPV 部分序列 (由本试验室完成), 以及 3 种 5 型, 一种 13 型病毒的多角体蛋白基因。序列比较显示不同型的 CPV 间几乎没有同源性, 但同型之间的同源性却相当的高。这从一方面证实了依据 CPV 基因组 dsCPV 电泳迁移图谱进行 CPV 分类的合理性。这从本文的进化树分析可见一斑。随着基因组研究的不断开展, 分子特征研究必然起到举足轻重的作用。更多 CPV 基因组的测定, 必将为我们更合理地对其科属间的分类定位和功能研究提供必要的参考。特别是差异较大,

同源性低的不同型之间的比较, 这迫切需要我们找出和建立完善的计算分析平台, 对基因组片段进行模拟分析, 找到共性后再加以比较, 其中最重要的是对功能上的比较。

从病毒进化角度来分析, RNA 病毒的变异性要远远大于 DNA 病毒, 那么同科属病毒株内部之间和不同科属病毒之间的进化关系的研究就显得尤为有意义。例如, BmCPV VP3 和水稻锯齿矮缩病毒 (*Rice ragged stunt virus*, RRSV) S2 及 *Nilaparvata lugens reovirus* S4 和斐济病病毒 (*Fiji disease fivirus*) S4 有着一定的同源性, 这很可能告诉我们植物呼肠孤病毒起源于昆虫呼肠孤病毒^[10]。还有 BmCPV S5 编码的 P101 蛋白, 和口蹄疫病毒 (FMDV) 的 2A protease (2A^{pro}), 氨基酸有着 93% 的同源性, 而 2A^{pro} 序列特征一般存在于小 RNA 病毒科 (*Picornaviridae*) 中的, 在呼肠孤病毒科 (*Reoviridae*) 中的首次发现, 也揭示了 dsRNA 病毒和 ssRNA 病毒的进化关系^[11]。

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] Hagiwara K, Rao S, Simon W, Scott, et al. Nucleotide sequences of

- segments 1, 3 and 4 of the genome of *Bombyx mori* cypovirus 1 encoding putative capsid proteins VP1, VP3 and VP4, respectively[J]. *J Gen Virol*, 2002, 83: 1477-1482.
- [3] 杜建宇, 张珈敏, 郭海涛, 等。马尾松毛虫质型多角体病毒 (Dp CPV) 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.
- [4] 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.
- [5] Hagiwara K, Tomita M, Nakai K, *et al.* Determination of the nucleotide sequence of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus segment 9 and its expression in BmN4 cells[J]. *J Virol*, 1998. 72 (7): 5762-5768.
- [6] Payne CC, Rivers C F. A provisional classification of Cytoplasmic Polyhedrosis Viruses based on the sizes of the RNA genome segments[J]. *J Gen Virol*, 1976, 33: 71-85.
- [7] 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.
- [8] Mertens P P C, Crook N, Rubinstein R, *et al.* Cytoplasmic polyhedrosis virus classification by electrophoretotype: validation by serological analyses and agarose gel electrophoresis[J]. *J Gen Virol*, 1989. 70: 173-185.
- [9] Mertens PPC, Pedley S, Crook NE, *et al.* A comparison of six cypovirus isolates by cross-hybridisation of their dsRNA genome segments[J]. *Arch Virol*, 1999. 144: 561-576.
- [10] 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.
- [11] Hagiwara K, Kobayashi J, Tomita M, *et al.* Nucleotide sequence of genome 5 from *Bombyx mori* cypovirus 1[J]. *Arch Virol*, 2001. 146: 181-187.