

从茶尺蠖中分离到一株微小 RNA 病毒

王小纯, 张珈敏, 刘传凤, 余海洋, 胡远扬**

(武汉大学生命科学院昆虫病毒研究室, 湖北武汉 430072)

A New Picornavirus Isolated from *Ectropis oblique*

WANG Xiao-chun, ZHANG Jia-min, LIU Chuan-feng, YV Hai-yang, HU Yuan-yang**

(Lab of Insect Virology, College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: A new picorna-like virus was isolated from dead *Ectropis oblique* larvae deceased from NPV infection. Electron microscopic observations of purified virions were non-enveloped isometric particles with diameter of 26nm. The virions contain two capsid proteins: 31.5kDa and 28.8kDa, the amount of later is 2.5 times more than that of the former. Analysis of 3' terminal sequence of EoPV clone identified that it can encode RdRp and has eight conserved motifs. Homology analysis shows that it is closely related to *Perina nuda* picorna-like virus. All of these properties indicate that this virus should be a member of *Picornaviridae*.

Key Words: *Ectropis oblique*; Picornavirus; Isolation and identification

摘要: 从核型多角体病毒 (NPV) 感染致死的茶尺蠖幼虫尸体中分离到一株微小 RNA 病毒 (EoPV) 透射电镜观察纯化的病毒粒子为无囊膜、无表面特征、直径约 26nm 的球状颗粒。16% 的 SDS-PAGE 显示它有两个分子量为 31.5 kDa 和 28.8 kDa 的衣壳蛋白, 后者的含量是前者的 2.5 倍。3' 端克隆序列分析表明 EoPV 基因组 3' 有 poly(A) 尾, 编码 RNA 聚合酶 (RdRp), 含有微小 RNA 病毒 RNA 聚合酶的八个保守基序, 同源性分析表明它与榕透翅毒蛾微小 RNA 病毒 (PnPV) 亲缘关系最近。这些特点表明该病毒为一株新的微小 RNA 病毒。

关键词: 茶尺蠖; 微小 RNA 病毒; 分离鉴定

中图分类号: S432.1

献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0039-04

本研究室于 2000 年首次从 NPV 感染致死的茶尺蠖幼虫中发现了直径为 26nm 的球状病毒。据报道许多昆虫微小 RNA 病毒是从杆状病毒感染的昆虫中发现和分离的^[1], 例如家蚕软化病毒 (IFV) 和榕透翅毒蛾微小 RNA 病毒 (*Perina nuda* picorna-like virus, PnPV)^[2]。采用差异离心和蔗糖密度梯度离心法, 我们首次从 NPV 感染致死的茶尺蠖幼虫中分离纯化了微小 RNA 病毒。将病毒液涂在新鲜茶叶上饲喂茶尺蠖幼虫, 幼虫在第 3 天开始出现症状: 厌食、停止活动并开始萎缩, 大约 5d 内死亡。从虫尸中分离到形状与大小相同的病毒, 我们称之为茶尺蠖微小 RNA 病毒 (*Ectropis oblique* picorna-like virus, EoPV)。我国曾于上个世纪 80 年代从家蚕和蜜蜂

中分离到微小 RNA 病毒^[3], 但并无分子水平的深入报道。EoPV 是我国首例从野生昆虫中分离到微小 RNA 病毒, 该病毒国内外尚未见报道。研究其生物学性质, 不仅对确定其分类地位具有重要的理论意义, 而且对开发生物杀虫剂具有重要的实践意义。

1 材料与方 法

1.1 EoPV 的来源与纯化

EoPV 来自于 NPV 感染致死的茶尺蠖幼虫。虫尸贮藏于 -20℃ 冰箱。分离纯化病毒时, 先将虫尸用 TE 缓冲液匀浆 4 次, 然后 5000r/min 离心 30min 去沉淀。上清液以 40 000r/min 离心 2h (Ti70) 沉淀病毒, 并溶解在 TE 缓冲液; 然后铺在 10%~40% 的

收稿日期: 2003-06-13, 修回日期: 2003-07-15

作者简介: 王小纯 (1966-), 女, 副教授, 博士研究生, 从事昆虫病毒分子生物学研究。

** 通讯作者: 胡远扬 (1949-), 男, 武汉, 教授, 从事昆虫病毒分子生物学和结构生物学研究。

Corresponding author. Tel: 027-87686654, E-mail: yyhu@whu.edu.cn

蔗糖梯度上, 25 000r/min、3h (SW40)。部分收集病毒带, 用 TE 缓冲液稀释, 40 000r/min 离心 2h (Ti70) 沉淀病毒。沉淀溶解于 6mL40%的 CsCl 溶液中, 100 000r/min、6h 超速离心, 病毒带部分收集并用 TE 缓冲液稀释, 40 000r/min、2h 沉淀。沉淀溶解于 300 μ L TE 缓冲液, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.2 病毒毒粒子的电镜观察

将纯化的病毒取 10 μ L 滴在覆有 Formvar 的铜网上, 2%的磷钨酸负染, 于日立 H-8100 透射电子显微镜观察照相。

1.3 衣壳蛋白的 SDS-PAGE

将纯化的病毒蛋白用含 1%SDS 加样缓冲液(1:2) 100 $^{\circ}$ C 加热 3-5min, 迅速冰浴。变性处理后, 用 16%的 SDS-PAGE 进行分离^[4], 然后用考马司亮蓝 R-250 染色。通过紫外扫描与蛋白质 Maker 比较, 确定其分子量大小及含量。

1.4 3'端克隆及序列分析

用 TRIZOL 试剂合 (Gibco BRL) 提取纯化病毒的基因组 RNA。依据微小 RNA 病毒的基因组结构特点, 以 oligo(dT)为引物, 以 EoPV 基因组 RNA 为模板, 用 cDNA 的合成试剂合 (Promega) 合成 cDNA。将平末端的 dsDNA 片段插入 PUC18 的 *Sma*I 位点, 转化大肠杆菌 DH5 α , 蓝白斑筛选重组质粒。核苷酸序列测定委托上海博亚生物公司。分别利用 BLAST^[16]和 FASTA^[5]将 EoPV 序列与 GenBank 和 EMBL 数据库进行比较。利用 DNASIS MAX 软件预测已知 EoPV 序列编码的氨基酸序列。利用 Bioedit 软件对 EoPV 编码的 RNA 聚合酶与其它昆虫 RNA 聚合酶进行列阵比较^[5, 7]。利用 DNAMAN 对 RNA 聚合酶进行同源性分析。

2 结果与分析

2.1 电镜观察

在透射电镜下观察负染的病毒粒子如图 1 所示, 它们是直径约 26nm, 无囊膜, 无明显的表面特征的球状颗粒。

2.2 病毒的衣壳蛋白

纯化的病毒蛋白经过 SDS-PAGE 分离、考马司亮蓝 R-250 染色, 可以看到如图 2 所示的病毒衣壳蛋白电泳图。紫外扫描分析表明, 这两个衣壳蛋白的分子量为 31.5 kDa 和 28.8 kDa, 而且后者的含量是前者的 2.5 倍。用高效液相色谱对衣壳蛋白进行分离, 结果如图 3 所示得到了 4 个峰, 后面三个结构蛋白差异极小。

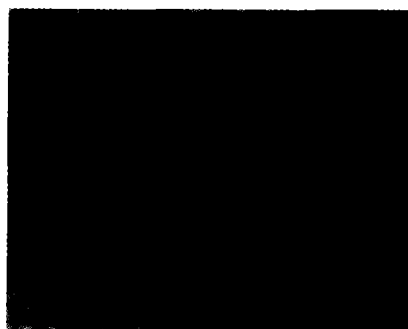


图 1 透射电镜下的病毒粒子负染相片

Fig.1 Electron microscopy of the negative preparation of the purified EoPV

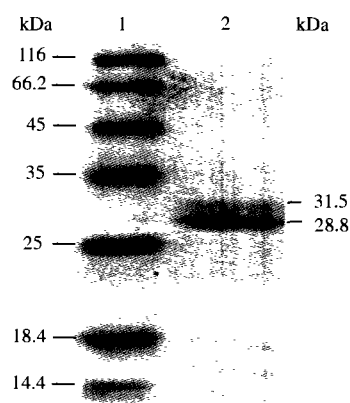


图 2 EoPV 衣壳蛋白电泳图

Fig.2 Structural proteins of EoPV in SDS-PAGE
1, Protein markers(Bio-Rad); 2, Structure proteins of EoPV.

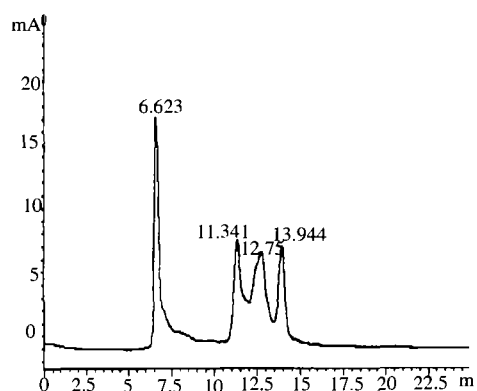


图 3 衣壳蛋白高效液相色谱分离

Fig.3 Capsid proteins through HPLC

2.3 3'端克隆序列分析

以 oligo(dT)为引物, 通过逆转录构建了 3' 端克隆, 序列测定表明: 除 3' 端 poly(A)外, 该插入

片段长 1 120nt。碱基组成为: A 27.7%、T 26.8%、G 24.5%和 C 20.1%,与其它微小 RNA 病毒相似,富含 A/T 碱基。DNASIS MAX 分析该片段能编码含 358 个氨基酸残基的蛋白质,通过与其它昆虫微小 RNA 病毒编码的蛋白质进行列阵比较(图 4),发现该蛋白含有正链 RNA 病毒的 RNA 指导的 RNA

聚合酶(RdRp)的 8 个保守基序^[16]。它与微小 RNA 病毒编码的 RNA 聚合酶有不同程度的同源性(图 5)。其中,与榕透翅毒蛾微小 RNA 病毒(PnPV) RdRp 有约 91%的同源性,由此判断该病毒为微小 RNA 病毒。



图 4 EoPV 与其它昆虫微小 RNA 病毒 RNA 聚合酶保守基序的列阵比较

Fig.4 Alignment of the conserved regions of the putative RNA-dependent RNA polymerase domain

The motifs of RdRp are shaded with I-VIII. Numbers on the left of the first row show the amino acid position of the aligned sequences. EoPV(*Evtropis oblique picorna-like virus*), IFV(*Infectious flacherie virus*), RhPV (*Rhopalosiphum padi virus*), SBV(*Sacbrood virus*) and PnPV (*Perina nuda picorna-like virus*).

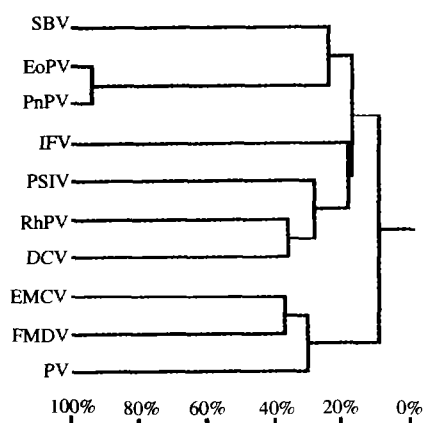


图 5 小 RNA 病毒 RNA 聚合酶同源性分析

Fig.5 Homology tree of RdRp of Picornaviridae

SBV (*Sacbrood virus*), EoPV(*Evtropis oblique picorna-like virus*), PnPV (*Perina nuda picorna-like virus*), IFV (*Infectious flacherie virus*), PSIV(*Plautia stali intestine virus*), RhPV (*Rhopalosiphum padi virus*), DCV (*Drosophila C virus*), EMCV (*Encephalomyocaditis virus*), FMDV (*Foot-and-mouth disease virus*), PV (*Pliovirus*).

3 讨论

哺乳动物小 RNA 病毒一般有 4 个结构蛋白,其中 3 个分子量在 24kDa~41.2kDa 范围内,一个分子量为 5.5kDa~13.52kDa。已报道的昆虫微小 RNA 病毒衣壳蛋白如家蚕软化病毒(IFV)^[9]、蟋蟀瘿病毒(CrPV)^[3]、果蝇 C 病毒(DCV)^[10]和榕透翅毒蛾微小 RNA 病毒(PnPV)^[11]等具有上述特征的 4 个衣壳蛋白,而蜜蜂囊锥病毒(SBV)^[11]、禾谷缢管蚜病毒(RhPV)^[12]、吸血猎蝽病毒(TrV)^[13]和豌豆蚜病毒(APV)^[14]等仅有 3 个衣壳蛋白。衣壳蛋白均在 10% ~16%的 SDS-PAGE 上分离鉴定。由于 EoPV 衣壳蛋白很特别,只有两个。我们又用高效液相色谱对衣壳蛋白进行分离,结果如图 3 所示得到了 4 个峰,可能后面三个结构蛋白差异极小,有待于进一步测序研究证明。

在用 TRIZOL 试剂合之前,我们曾尝试用各种文献报道的方法提取病毒核酸,但都没有得到完整的核酸带。该核酸对 RNase 和 S1 敏感,而对 DNase

不敏感,从而确定为 ssRNA。3' 端克隆的构建和序列测定进一步证明, EoPV 为单链、正链 RNA 病毒。BLAST 比较及与其它昆虫微小 RNA 病毒编码的蛋白质的列阵比较证明它是微小 RNA 病毒家族成员。已报道的昆虫微小 RNA 病毒有 40 余种,但完成基因组测序的仅 12 个,基因组全长约在 $8 \times 10^3 \sim 10 \times 10^3$ nt 之间。推测得到完整的、高质量的基因组 RNA 是影响昆虫微小 RNA 病毒克隆、测序等进一步深入研究的主要因素。

昆虫微小 RNA 病毒的毒性差异极大。EoPV、IFV、DVC、ABPV 和 SBV 能使宿主感染病毒 3~5d 内死亡。而 PnPV 和 RhPV 仅降低幼虫的生长发育能力。对于家蚕和蜜蜂,如何防止病毒引起的疾病很重要。对于茶尺蠖和果蝇等害虫, EoPV 和 DVC 等毒性强的病毒对开发生物杀虫剂具有重要意义。

参考文献

- [1] Wang C H, Wu C Y, Lo C F. A new picorna-like virus. PnPV, isolated from ficus transparent moth, *Perina nuda* (Fabricius)[J]. *J Invert Pathol*, 1999, 74: 62-68.
- [2] Norman F M, Brian R, Linda A K. General characteristics, gene organization and expression of small RNA viruses of insects[J]. *J Gen Virol*, 1986, 66: 647-659.
- [3] 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学[M]. 北京: 中国农业科学出版社, 2001, 443-445.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 2nd ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.
- [5] Altschul S F, Gish W, Miller W, *et al.* Basic local alignment search tool[J]. *J Mol Biol*, 1990, 215: 403-410.
- [6] Person W R, Lipman D J. Improved tools for biological sequence comparison[J]. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1998 85: 2444-2448.
- [7] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. *et al.* Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. *Nucleic Acids Res*. 1994, 22: 4673-4680.
- [8] Chih Y W, Chu F L, Chang J H. *et al.* The complete genome sequence of *Perina nuda* picorna-like virus, an insect-infecting RNA virus with a genome organization similar to that of the mammalian picornaviruses[J]. *Virology*, 2002, 294:312-323.
- [9] Isawa H, Asano A S, Sahar K, *et al.* Analysis of genetic information of an insect picorna-like virus, infectious flacherie virus of silkworm: evidence for evolutionary relationships among insect, mammalian and plant picorna-like viruses[J]. *Arch Virol*, 1998, 143: 127-143.
- [10] King L A, Moore N F. Evidence for the presence of a genome-linked protein in two insect picornaviruses, cricket paralysis and *Drosophila C* virus[J]. *FEMS Microbiol Lett* 1988, 50: 41-44
- [11] Ghosh R C, Ball B V, Willcocks M M, *et al.* The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 1541-1549.
- [12] Jae S M, Leslie L D, Nancy K, *et al.* Nucleotide sequence analysis shows that *Rhopalosiphum padi* virus is a member of a novel group of insect-infecting RNA viruses[J]. *Virology*, 1998, 243: 54-65.
- [13] Czibener C, La T J L, Muscio O A, *et al.* Nucleotide sequence analysis of *Triatoma* virus shows that it is a member of a novel group of insect RNA viruses[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1149-1154.
- [14] F. van D W, Dulleman A M, Verbeek M, *et al.* Nucleotide sequence and genomic organization of *Acyrtosiphon pisum* virus[J]. *Virology*, 1997, 238: 353-362.
- [15] Govan V A, Leat N, Allsopp M, *et al.* Analysis of the complete genome sequence of Acute Bee Paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-infecting RNA viruses[J]. *Virology*, 2002, 277: 457-463.
- [16] Koonin E V, Dolja V V. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: Implications of comparative analysis of amino acid sequences[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1993, 28: 375-430.