

# 小菜粉蝶颗粒体病毒颗粒体蛋白基因的序列测定及在大肠杆菌中的表达

陈 可, 张珈敏, 胡远扬\*\*, 刘传凤

(武汉大学生命科学院, 湖北武汉 430072)

## The Nucleotide Sequence and Expression in *E. coli* of the *Pieris rapae* Granulosis Virus Granulin Gene

CHEN Ke, ZHANG Jia-min, HU Yuan-yang\*\*, LIU Chuan-feng

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** According to the Granulin gene's 12 highly conservative nucleotides (TATAAGGAATTT) upstream from the protein initiation codon and the sequence of the *Pieris brassicae* granulovirus (PbGV) granulin gene, primers were designed to amplify the *Pieris rapae* granulosis virus (PrGV) granulin gene. The product of PCR amplification was about 850bp. The result of sequencing the segment showed the complete nucleotide sequence of the segment was 855bp. The segment contained one ORF encoding PrGV granulin gene which starts at position 38~40 and ends at position 779~781. The length of the ORF is 744bp and the length of predicted protein is 247 amino acid with MW of about  $2.9178 \times 10^4$ Da. Comparison of the identities with other granulosis virus granulin gene showed the granulin gene is highly conserved in granulosis virus. The PrGV granulin gene was inserted into an expression vector, PET-28a, to yield the recombinant expression plasmid pet-28a-Gran. After induction by IPTG, the result of SDS-PAGE showed the expression of PrGV granulin in *E. coli* was obtained.

**Key words:** *Pieris rapae* granulosis virus; Granulin(PrGV); Comparison of the identities; Recombinant expression plasmid

**摘要:** 根据颗粒体病毒颗粒体蛋白(Granulin)基因在其起始密码子上游的 12 个碱基高度保守序列(TATAAGGAATTT)以及小菜粉蝶颗粒体病毒(PbGV)的颗粒体蛋白基因的序列<sup>[1]</sup>设计引物, PCR 扩增得到 850bp 左右大小的片段, 核苷酸序列测定结果表明该病毒的 granulin 基因全长为 855bp, 起始密码位于第 38~40 位碱基, 终止密码位于 779~781 位碱基, 编码框序列全长为 744; 推测该基因编码一段由 247 个氨基酸组成的多肽, 分子质量约为  $2.9178 \times 10^4$  道尔顿。与其它颗粒体病毒颗粒体蛋白基因进行同源性比较, 核苷酸同源性都在 70% 以上, 氨基酸同源性都在 75% 以上, 最高的为小菜粉蝶颗粒体病毒(PbGV), 核苷酸同源性为 97%, 氨基酸同源性为 98%。构建了重组表达载体 pet-28a-Gran, IPTG 诱导后经 SDS-PAGE 检测, 表明获得了颗粒体蛋白基因在大肠杆菌 BL21 中的特异表达。

**关键词:** 小菜粉蝶颗粒体病毒; 颗粒体蛋白; 同源性比较; 重组表达载体

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)05-0493-05

小菜粉蝶别名菜白蝶, 幼虫俗称菜青虫, 属鳞翅目、粉蝶科, 为世界性的害虫。我国分布极为普

遍。为十字花科的主要害虫, 其中对甘蓝类蔬菜危害最严重。小菜粉蝶幼虫被小菜粉蝶颗粒体病毒

收稿日期: 2004-02-27, 修回日期: 2004-04-03

作者简介: 陈 可 (1978-), 男, 硕士研究生, 从事昆虫病毒分子生物学研究。

\*\* 通讯作者: 胡远扬 (1949-), 男, 湖北武汉籍, 教授, 从事昆虫病毒分子生物学和结构生物学研究。Corresponding author. Tel: 027-68756654

(*Pieris rapae granulosis virus*, PrGV) 感染后, 表现体节肿胀, 体色黄绿, 腹面变白, 常倒悬而死。死虫表皮脆软易破, 流出淡黄色乳状液。自 1978 年以来, 我国按国际标准化的建议配制成各种 PrGV 制剂在全国 20 多个省、市推广使用, 防治效果十分理想。但是 PrGV 的分子生物学水平的研究尚属空白。PrGV 的颗粒体由包涵体蛋白、病毒粒子和包涵体外膜组成。病毒粒子由包涵体包被, 一个颗粒体包含一个病毒粒子<sup>[2]</sup>。颗粒体的晶格结构由颗粒体蛋白 (Granulin) 构成, 颗粒体蛋白是一种具有特定生物学活性的磷酸糖蛋白。颗粒体不溶于水、乙醇、乙醚、二甲苯和丙酮, 但能够溶于弱碱溶液。颗粒体对外界环境的作用有较强的抵抗力, 可以保护病毒粒子, 使它保持传染性, 对稳定病毒活性起十分重要的作用<sup>[3]</sup>。PrGV 的颗粒体蛋白由颗粒体蛋白基因编码, 其表达产物分子量为  $2.9178 \times 10^4$ d。本文首次报导了 PrGV-Granulin 的基因序列, 包括编码区序列、5'端非编码区的启动子序列和 3'端非编码区的 PolyA 加尾信号, 并构建了一系列表达载体, 对该基因在大肠杆菌中进行克隆和表达。由于颗粒体蛋白在稳定病毒活性方面的重要作用, 该项工作对于我国在生物防治农林害虫的应用研究领域具有积极的基础理论和应用价值。同时, 该基因序列的测定对以后的小菜粉蝶颗粒体病毒基因组文库的构建以及杆状病毒分子进化的研究也提供了一定的参考价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

菜青虫及小菜粉蝶颗粒体病毒、克隆载体 PMD18-T Vector、表达载体 PET-28a、菌株 DH5  $\alpha$  和 BL21 (DE3) 为本室保存。限制性内切酶 *Hind* III、*Xho* I 以及 T4DNA 连接酶等购自晶美公司。

### 1.2 PrGV 的纯化和 DNA 的提取

用差异离心法、蔗糖梯度离心提纯 PrGV, 电镜观察<sup>[4]</sup>。取纯化的 PrGV 病毒液, 加入等量的碱解液 (0.1mol/L EDTA+0.17mol/L NaCl+0.1mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH>10.8), 37°C 水浴 30min, 溶液由浑浊变清亮, 再加入 10% 的 SDS 至终浓度为 1%, 蛋白酶 K 至 0.02g/mL, 37°C 水浴 1h; 用等量的 Tris-cl 饱和酚抽提 DNA 三次, 每次用 12000r/min, 10min, 取上清液; 再用 24:1 的等量氯仿-异戊醇抽提 DNA, 12000r/min, 10min, 取上清液加入 1/10 体积的 3mol/L 的 NaAc 和 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA 2h, 用 75% 的乙醇

洗涤沉淀, 干燥 15min, 用无菌水溶解。

### 1.3 引物设计

颗粒体病毒颗粒体蛋白基因在其 5'端非编码区有 12 个碱基的高度保守序列 TATAAGGAATTT<sup>[1]</sup>, 引物设计根据该保守序列设计上游引物为: 5'-CGCCGGGGTTTATAAGGAATTT-3', Tm=63.7°C, GC%=45.5%。由于 PrGV 和 PbGV 具有很高的亲源性, 根据已知的 PbGV 的 *granulin* 的序列<sup>[5-6]</sup>, 设计下游引物为: 3'-AAGCCACAGATACATTAATTTTGT TGC-5', Tm=61.7°C, GC%=33.3%, 引物由赛百盛基因技术有限公司合成。

### 1.4 PrGV 颗粒体蛋白基因的 PCR 扩增

以 PrGV-DNA 为模板, 94°C、5min; 94°C、45s, 55°C、45s, 72°C、1min, 30 个循环; 72°C、10min。经电泳检测, 得到一条 850bp 左右大小的基因片段。

### 1.5 PrGV-granulin 的克隆及测序

将 PCR 产物用玻璃奶回收, 与 PMD18-Tvector 连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5  $\alpha$ , 蓝白斑筛选阳性克隆, 质粒经酶切及 PCR 鉴定获重组质粒 PMD18-Gran1, 送上海联合基因公司测序。

### 1.6 PrGV-granulin 的原核表达的 PCR 扩增:

根据已经测定的 PrGV-granulin 的序列, 设计引物。正向引物: 5'-TAACAAGCTTAAAATATGGG ATATA ATAGAGCA-3', Tm=64.4, GC%=27.3%; 反向引物为: 5'-AGGGCGAATAATTGAGCTCTGCA GTTT-3', Tm=68.6°C, GC%=44.4%。正向引物中加入了 *Hind* III 的酶切位点 AAGCTT, 反向引物中加入了 *Xho* I 的酶切位点 CTCGAG, 按上述的 PCR 反应条件扩增。

### 1.7 重组表达质粒 PET-28a-Gran 的构建

将约 780bp 左右的 PCR 产物用玻璃奶回收, 与 PMD18-Tvector 连接过夜, 转化 DH5  $\alpha$ , 蓝白斑筛选阳性克隆, 质粒经 *Hind* III、*Xho* I 双酶切鉴定, 获重组质粒 PMD18-Gran2, 送上海联合基因公司测序。

将 PMD18-Gran2 用 *Hind* III、*Xho* I 双酶切, 得 780bp 的片段, 玻璃奶回收。再用 *Hind* III、*Xho* I 双酶切将该片段克隆至表达载体 PET-28a 表达载体, 转化 DH5  $\alpha$ , 质粒经 *Hind* III、*Xho* I 双酶切鉴定, 获重组质粒 PET-28a-Gran1, 将此质粒转化 BL21(DE3), 经 *Hind* III、*Xho* I 双酶切鉴定, 获重组质粒 PET-28a-Gran。

### 1.8 重组表达质粒 PET-28a-Gran 的诱导表达

取含 PET-28a-Gran 表达质粒的 BL21 菌液加入

含 30mg/mL 卡那霉素的 LB 培养液中, 30°C 培养过夜, 再加 20mg/mL 的 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 分别在 0、1、2、3、4、5h 取样 1mL, 以及未诱导培养物 1mL, 收集菌体进行 SDS-PAGE 检测。

## 2 结果

### 2.1 电镜观察

结果如图 1 所示, 在电镜观察下, 颗粒体形态呈椭圆形, 但也有卵形、圆柱形等。包涵体表面和边缘不太整齐, 中稍有凹陷, 有的一段突出, 一段平钝, 也有两端平钝的。其大小约为 330-500nm~200-290nm。

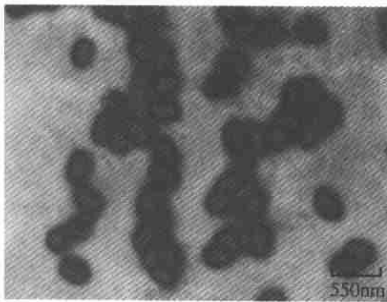


图 1 小菜粉蝶颗粒体病毒  
Fig.1 EM image of PrGV

### 2.2 PCR 产物与质粒 PMD18-Gran1 的鉴定

PCR 产物电泳结果显示在 850bp 附近出现特异的单一 DNA 条带, 如图 2 所示。回收, 连接, 转化 DH5  $\alpha$  获重组质粒 PMD18-Gran1, *Hind* III 酶切及 PCR 鉴定结果显示有 850bp 的片段插入。

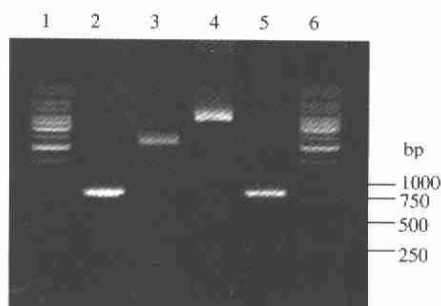


图 2 PCR 产物及重组质粒的鉴定

Fig.2 Identification of PCR product and recombinant plasmid 1 and 6, 1kb DNA ladder marker; 2, PCR product of *granulin*; 3, PMD18-Gran1; 4, PMD18-Gran1 digested with *Xho* I; 5, Identification of PCR of PMD18-Gran1.

### 2.3 PrGV 的颗粒体蛋白基因序列的测定和分析

PCR 产物的克隆片段为 855bp, 经生物学软件 DNASTAR 分析找到一个大的开放阅读框, 其起始密码 ATG 位于第 38~40 位碱基, 终止密码 TAA 位

于 779~781 位碱基, 编码框序列全长为 744; 编码框含有 221 个碱基 A(29.7%)、182 个碱基 C(24.4%)、149 个碱基 G(20.02%)、192 个碱基 T(25.80%), G+C 含量为 44.42%。推测该基因编码一段由 247 个氨基酸组成的多肽, 分子质量约为  $2.9178 \times 10^4$  道尔顿。这 247 个氨基酸由 35 个酸性氨基酸(Asp、Glu); 36 个碱性氨基酸(Arg、Lys、His); 176 个中性氨基酸组成; 蛋白质的等电点是 5.7。

起始密码 ATG 前面的 5' 端非编码区包括 -10bp 处的启动子序列 TATA 框: TTTAA, 并且包括 12 个碱基的高度保守序列 TATAAGGAATTT, 该序列存在于所有其余杆状病毒的高效晚期表达基因的 5' 非编码区, 与转录或翻译的调控有关<sup>[1]</sup>; 该基因的 Kozak 序列为 AATATGG。终止密码 TAA 后面的 3' 端非编码区, 在 840bp 处有一个可能的 PolyA 加尾信号: AATTAAAA。

该基因序列已经被 GenBank 接纳, 序列号为 AY428513。

与 PbGV 的颗粒体蛋白基因进行同源性比较<sup>[1]</sup>, 核酸的同源性为 97%, 氨基酸的同源性为 98%; 与 TnGV 的颗粒体蛋白基因进行同源性比较<sup>[7]</sup>, 核酸的同源性为 74%, 氨基酸的同源性为 77%。与其它的颗粒体病毒比较, 核酸和氨基酸的同源性也都在 70% 以上, 同源性比较的结果如表 1 所示。

表 1 10 种颗粒体病毒颗粒体蛋白基因氨基酸序列(上)和核苷酸序列(下)的同源性(%)

Table 1 Amino acid (upper) and nucleotide sequence (lower) identities of 10 granulosis virus granulin genes(%)										
	PrGV	PbGV	TnGV	AoGV	CIGV	CpGV	EaGV	CIGV	PoGV	HbGV
PrGV	—	98	77	86	84	85	83	85	84	84
PbGV	97	—	77	85	83	83	82	84	83	83
TnGV	74	73	—	87	87	86	87	87	87	85
AoGV	77	77	77	—	93	96	92	95	93	93
CIGV	77	77	76	80	—	94	90	92	91	90
CpGV	77	77	76	80	80	—	92	97	95	93
EaGV	77	77	79	80	79	79	—	92	90	91
CIGV	78	78	77	80	80	80	81	—	93	95
PoGV	78	78	78	80	79	79	79	81	—	91
HbGV	76	75	75	77	82	82	78	78	76	—

### 2.4 表达 PCR 产物与重组质粒的鉴定

表达 PCR 的产物电泳结果显示在 780bp 附近有单一 DNA 带(图 3), 回收, 连接, 转化 DH5  $\alpha$ , 获重组质粒 PMD18-Gran2, *Hind* III、*Xho*I 双酶切鉴定, 显示有 780bp 片段插入。

回收 780bp 片段, 定向插入 PET-28a 多克隆位点 *Hind* III 与 *Xho*I 之间, 转化 DH5  $\alpha$ , 获重组质粒 PET-28a-Gran1, *Hind* III、*Xho*I 双酶切鉴定, 显示有 780bp 的片段插入。

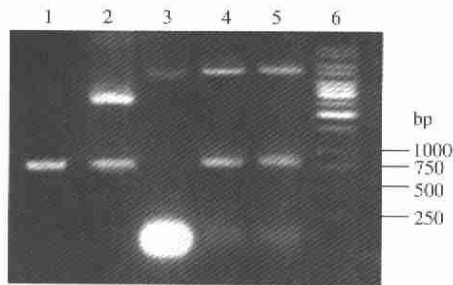


图 3 PCR 产物及重组质粒的鉴定

Fig.3 Identification of PCR product and recombinant plasmid  
1. PCR product of Granulin for expression; 2. PMD18-Gran2 digested with *Xho*I and *Hind* III; 3. PET-28a; 4. PET-28a-Gran1 digested with *Xho*I and *Hind* III; 5. PET-28a-Gran digested with *Xho*I and *Hind* III; 6. 1kb DNA ladder marker.

将此重组质粒, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 获重组质粒 PET-28a-Gran; *Hind*III、*Xho*I 双酶切鉴定, 显示有 780bp 片段插入。

### 2.5 PrGV 颗粒体蛋白基因的表达及 SDS-PAGE 鉴定

将酶切证实的重组质粒 PET-28a-Gran 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 挑选转化子进行诱导表达。在 IPTG 的诱导下, 颗粒体蛋白在 5h, 表达效果最好, 表达结果如图 4 示:

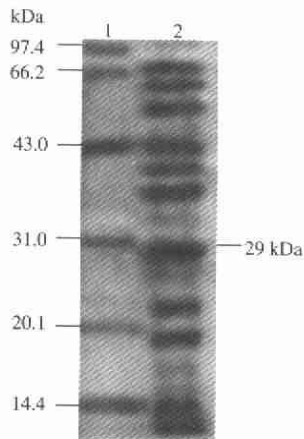


图 4 PrGV 颗粒体蛋白基因在大肠杆菌中的表达及 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Expression of PrGV granulin gene in *E.coli* and SDS-PAGE analysis

1. Protein marker; 2. induced PET-28a-Gran/BL21(DE3) at 5 hours

## 3 讨论

杆状病毒是一类在自然界中只感染节肢动物的病毒, 它隶属于杆状病毒科, 包括两个属, 即颗粒体病毒属(GV)和核型多角体病毒属(NPV)。杆状病毒由于其在生物杀虫剂以及表达载体方面具有独特的应用价值, 近年来其分子水平的研究获得了迅猛的发展。但是多年来由于 GV 的离体增殖缺乏适宜的离体细胞支持系统, 所以杆状病毒的研究主

要集中在 NPV 领域, 而 GV 的分子水平的研究相对比较缺乏。随着杆状病毒分子生物学研究的深入, 作为杆状病毒科一大分枝的颗粒体病毒属的研究变得越来越迫切, 颗粒体病毒的颗粒体蛋白(Granulin)是 GV 中研究的比较多的一种结构蛋白, 它类似于 NPV 中的多角体蛋白(Polyhedrin), 二者在结构、功能及亲缘关系上十分的接近, 它们主要是保护病毒在外界环境中长期而稳定的存在; 另外, 在促进病毒传播和昆虫口服感染过程中也起到关键作用。通过小菜粉蝶颗粒体病毒与其它颗粒体病毒的 Granulin 核苷酸和氨基酸的同源性比较, 发现其核苷酸序列同源性大部分都在 70%以上, 氨基酸序列同源性大部分都在 75%以上; 与多角体病毒的 Polyhedrin<sup>[8-10]</sup>比较, 核苷酸序列和氨基酸序列的同源性都在 50%以上, 多角体蛋白与颗粒体蛋白在氨基酸序列的保守程度上要较多角体蛋白与多角体蛋白、颗粒体蛋白与颗粒体蛋白之间的保守程度为低, 这反映了多角体蛋白与颗粒体蛋白在血清学和形态发生学上有一定的差异<sup>[11]</sup>, 但是这两种蛋白质的特定区域高度保守。这表明, 在杆状病毒中, 颗粒体病毒的颗粒体蛋白基因是一个十分保守的基因。

多角体蛋白基因(Polyhedrin)是 NPV 中研究的最为详细的结构蛋白, 由于它的高效晚期表达以及非病毒复制必须的特性使其在表达载体系统和重组杆状病毒杀虫剂方面具有极大的应用价值。目前利用多角体的包装功能, 将毒素蛋白包装在多角体病毒的多角体蛋白中构建重组病毒, 是一种杆状病毒杀虫剂的新策略<sup>[3]</sup>; 颗粒体蛋白与多角体蛋白具有类似的功能和较高的同源性, 它的研究工作的开展将会给杆状病毒的应用研究提供一个很有潜力的基因来源。

小菜粉蝶颗粒体病毒作为颗粒体病毒的一种, 在农业病虫害防治中发挥了很大的作用, 但是其基因水平的研究尚属空白, 本文首次报导了小菜粉蝶颗粒体病毒的颗粒体蛋白基因, 是一个十分保守的基因, 它的测定为以后其他基因的筛选以及小菜粉蝶颗粒体病毒基因组文库的构建都提供了一定的参考价值。

## 参考文献

- [1] Chakerian R, Rohrmann G F *et al*. The nucleotide sequence of the *Pieris brassicae* granulosis virus granulin gene[J]. *J Gen Virol*. 1985, 66:1263-1269.
- [2] 苏金, 付仓生, 菜粉蝶颗粒体病毒包涵体蛋白的特性[J]. 核农

- 学报, 1990, 4(3): 151-156.
- [3] 邓菲. 昆虫病毒包涵体蛋白的结构与功能研究 [D]. 武汉: 中国科学院武汉病毒研究所, 2003
- [4] 王学兰. 几种昆虫病毒粒子核酸释放的电子显微镜的观察 [J]. 科学通报, 1983, 28 (24): 1524-1526.
- [5] Normane E, Crook. A comparison of the granulosis viruses from *Pieris brassicae* and *Pieris rapae* [J]. *Virology*, 1981, 115:173-181
- [6] Kathleen A T, Lee A B, Richard A C, *et al.* Restriction enzyme analysis of the genomes of *Plodia interpunctella* and *Pieris rapae* granulosis viruses [J]. *Virology*, 1980, 104:514-519
- [7] Akiyoshi D, Chakerian R, Rohrmann G F, *et al.* Cloning and sequencing of the granulin gene from the *Trichoplusia ni* granulosis virus *Virology*, 1985, 141:328-332
- [8] Ayres M D, Howard S C, Kuzio J, *et al.* The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus [J]. *Virology*, 1994, 202:586-605.
- [9] Abrens C H, Russel R L, Funk C J, *et al.* The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome [J]. *Virology*, 1997, 229; 381-399.
- [10] Gomi S, Majima K, Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus [J]. *J Gen Virol*, 1999, 80: 1323-1327.
- [11] 孙国勋, 丁翠, 蔡秀玉. 杆状病毒的结构蛋白及其功能 [J]. 昆虫学报. 2001, 44 (3) .