

灰斑古毒蛾核型多角体病毒三个晚期表达因子基因*

顾奇伟, 杨丽荣, 严兴成, 尚金燕, 高 瞻, 张传溪**

(浙江大学应用昆虫研究所病毒分子生物学实验室, 浙江杭州 310029)

Three Late Expression Factor Genes of *Orgyia ericae* Single-nucleocapsid NucleopolyhedrovirusGU Qi-wei, YANG Li-rong, YAN Xing-cheng, SHANG Jin-yan, GAO Zhan, ZHANG Chuan-xi**
(Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Genomic DNA of *Orgyia ericae* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (OrerSNPV) was digested with the restriction enzyme *EcoRI* and the fragments were cloned into the plasmid pUC19 to build a library for sequencing. An ORF encoding the LEF-2 was identified from the cloned *EcoRI*-M (3.0kb) and *EcoRI*-P (2.2kb) fragments with 648 bp in length and potential to encode a 216 amino acid polypeptide with predicted molecular weight of 23.7 kD. In addition, two ORFs encoding the partial LEF-3 and LEF-11 were identified from two ends of the cloned *EcoRI*-E (about 10 kb). Comparison analysis showed that OrerSNPV LEF-2 amino acid sequence shared 35%-49% identities with those of other 27 reported lepidopteran NPV LEF-2s, and the highest identities with *BusuSNPV*, *MacoNPV-A*, *Helicoverpa zea* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (*HezeSNPV*), *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (*HearSNPV*) and *Lymantria dispar* multiple-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (*LdMNPV*). OrerSNPV LEF-2 also shared 26%-31%, 32% and 23% identities with those from lepidopteran GVs, the hymenopteran NPV (*Neodiprion sertifer* nucleopolyhedrovirus, *NeseNPV*) and the dipteran virus (*Culex nigripalpus Baculovirus*). Phylogenetic tree based on the amino acid sequences showed the 28 baculovirus LEF-2s could be divided into 4 branches, NPVs, GVs, *NeseNPV* and *Culex nigripalpus Baculovirus*. OrerSNPV *lef-2* gene was most closely related to *Buzura suppressaria* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (*BusuSNPV*), while OrerSNPV was most closely related to *LdMNPV* in the phylogenetic tree based on LEF-3 sequences and to *Spodoptera exigua* multiple-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (*SeMNPV*) in the tree of LEF-11. EMBL Accession numbers for the nucleotide sequences of the *lef-2*, *lef-3* and *lef-11* are AJ629189, AJ715478 and AJ715479, respectively.

Key words: *Orgyia ericae* NPV; *lef-2*; *lef-3*; *lef-11*; Nucleotide sequence; Phylogenetic relationship

摘要: 将灰斑古毒蛾(*Orgyia ericae*)单粒包埋型核型多角体病毒(OrerSNPV)基因组 DNA 的各 *EcoRI* 酶切片段进行克隆和测序。序列分析结果表明 *EcoRI*-M (3.0kb) 与 *EcoRI*-P 片段 (2.2kb) 相连处含有编码晚期表达因子 (LEF-2) 的开放阅读框 (ORF)。同时在 *EcoRI*-E (约 10kb) 片段两端分别含有 *lef-3* 和 *lef-11* 基因的部分序列。*lef-2* 基因编码区由 648bp 组成, 可编码 216 个氨基酸残基的多肽, 预计蛋白质分子量为 23.7kDa。将 OrerSNPV LEF-2 氨基酸序列与其它已知的 27 种杆状病毒的 LEF-2 序列比较, 发现 OrerSNPV 与其它鳞翅目 NPV LEF-2 氨基酸有 35%~49% 同源性, 其中与 *BusuSNPV*、*MamNPV-A*、*HezeSNPV*、*HearSNPV* 和 *LdMNPV* 同源性最高, 和 GV 有 26%~31% 同源性, 与膜翅目松柏锯角叶蜂 NPV 的同源性为 32%, 与库蚊杆状病毒的同源性只有 23%。根据氨基酸序列绘制的分

收稿日期: 2004-04-05, 修回日期: 2004-05-24

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070032); 高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金(200055)

作者简介: 顾奇伟 (1978-), 男, 硕士, 研究方向为昆虫分子生物学。E-mail: sunrise0235@sina.com

** 通讯作者。 Corresponding author. Tel: 0571-86971697, E-mail: chxzhang@zju.edu.cn

子进化树表明 28 种杆状病毒 *lef-2* 基因可以分为鳞翅目 NPV、GV、膜翅目 *NeseNPV* 与双翅目 *Culex nigripalpus Baculovirus* 四个分支。OrerSNPV *lef-2* 与 *BusuSNPV* 在进化树上关系最为接近, 而 OrerSNPV *lef-3* 和 *LdMNPV* 的最接近, OrerSNPV *lef-11* 则和 *SeMNPV* 的关系最接近。

关键词: 灰斑古毒蛾核型多角体病毒; *lef-2*; *lef-3*; *lef-11*; 序列分析; 分子进化

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2004)05-0504-06

灰斑古毒蛾(*Orgyia ericae* Germar)在内蒙古西部大面积发生, 严重为害防护林。灰斑古毒蛾核型多角体病毒(OrerSNPV)是灰斑古毒蛾的重要病原微生物, 是自然调节灰斑古毒蛾种群的重要因子之一, 具有开发为生物杀虫剂的前景。宿主感染试验表明该病毒宿主专一性很强^[1], 但目前尚没有任何有关该病毒的分子序列数据, 因此尚无法确定该病毒与其它已知病毒的亲缘关系。

杆状病毒基因组呈双链环状 DNA, 分子大小在 90kb~160kb 之间。病毒 DNA 复制是其生命周期中的最主要环节, 因此病毒复制和转录的调控研究是病毒分子生物学研究的重要内容。DNA 复制有顺式和反式激活元件参与。其中, 顺式激活元件包括在同源区域的非回文重复序列和散布在基因组内的回文重复序列。除了 DNA 聚合酶和 DNA 解旋酶, 三种晚期表达因子还以反式激活元件的形式参与 DNA 的复制过程, 所涉及的晚期表达基因大部分编码引物合成酶(*lef-1*), 引物合成酶加工因子(*lef-2*)和单链 DNA 结合蛋白(*lef-3*)^[2]。在受 *AcMNPV* 感染的昆虫细胞中, *lef-2* 对于病毒 DNA 复制和晚期基因表达是必需的^[3,4], 现已明确证实 LEF-2 参与晚期基因 *vp39* 和极晚期基因多角体的表达^[5]。经酵母双杂交分析表明 *lef-2* 和 *lef-1* 的基因产物 LEF-1 存在相互作用^[6]。通过在基因数据库进行序列分析和比对, 发现 LEF-1 是一种推定的引物合成酶, 同时表明它和 LEF-2 是相互作用的, 这与 LEF-2 是引物合成酶加工因子的推定是相符合的。但目前还没有直接的实验来证实此假设。*lef-11* 不参与病毒 DNA 复制, 但可能调控晚期基因的表达^[7]。

目前已经在 28 种杆状病毒中发现有 *lef-2*, 在 22 种杆状病毒中发现有 *lef-3*, 在 21 种杆状病毒中发现 *lef-11* 基因, 因此这三个基因是杆状病毒基因组的核心基因的组成部分。对不同杆状病毒 *lef* 基因的分析, 不但可以为今后病毒复制和晚期基因表达必需因子的结构与功能研究提供数据, 而且对于从分子水平明确一种病毒与其它病毒亲缘关系有重要价值。本文首次报道 OrerSNPV 的 *lef-2* 基因序列及 *lef-3* 与 *lef-11* 的部分序列, 并分析了 OrerSNPV LEF 与其它已知的杆状病毒 LEF 的进化关系。这也

是在 DNA 序列水平上首次对 OrerSNPV 进行研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

OrerSNPV 多角体从采自内蒙古伊盟鄂托克旗杨柴林内灰斑古毒蛾幼虫病体中分离, 再通过喂饲室内饲养的灰斑古毒蛾 3 龄幼虫扩增病毒多角体。克隆载体为 pUC19、宿主菌为 TG1, 均为浙江大学应用昆虫学研究所分子生物学实验室保存。

限制性内切酶、连接酶、琼脂糖胶均购自 Takara 公司。

1.2 OrerSNPV 及其基因组 DNA 的提取

OrerSNPV 多角体的纯化以及 OrerSNPV 基因组 DNA 的提取方法见参考文献^[8]报道。

1.3 *lef-2* 的筛选、测序与序列分析

用 *EcoR* I 酶切分析 OrerSNPV 基因组 DNA, 并将酶切片段连接到经 *EcoR* I 酶切和去磷酸化处理的 pUC19 的载体上, 转化 TG1 感受态细胞, 从而建立病毒基因组 DNA 的 *EcoR* I 酶切片段质粒文库, 将含有不同大小片段的克隆送上海生物工程技术公司进行序列测定。OrerSNPV 核苷酸序列及推导的氨基酸序列应用 BLAST (Version 2.2.7) 搜库程序与 GenBank 数据库比对, 利用 CLUSTALX 和 GeneDoc (Version 3.2) 进行联配和同源性分析。分子进化分析应用软件包为 Genetyx-Win (Version 5.1.1.0)。其它分子生物学操作参考 Sambrook 的方法^[9]。

2 结果

2.1 核苷酸序列分析

OrerSNPV 基因组 DNA 的 *EcoR* I 酶切电泳结果表明, 基因组含有大于 1.1kb 的 *EcoR* I 片段数为 20。对建立的 *EcoR* I 片段质粒文库进行的鉴定表明, 小于 11kb 的片段多已得到了克隆。通过用 M13 通用引物对部分片段的两端测序, 发现 *EcoR* I-M 与 *EcoR* I-P 片段是相邻的片段, 在两片段的一端各编码有 *lef-2* 基因的部分同源序列, *lef-2* 的 N 端编码区位于 *EcoR* I-M 片段, C 端编码区位于 P 片段。通过进一步合成引物, 分别测定了以上两片段 *Lef-2* 编码区及邻

近的核苷酸序列(EMBL Accession#: AJ629189)。*lef-2*的开放阅读框全长是648 bp, 编码216个氨基酸, 预计蛋白质分子量为23.7kDa。在杆状病毒中除 *HezeSNPV* 和 *HearSNPV* *lef-2* 的开放阅读框比 *OrerSNPV* 的分别长69bp和78bp及 *LdMNPV* 的 *lef-2* 开放阅读框与 *OrerSNPV* 的长度相同外, 其它的均短于 *OrerSNPV* 的 *lef-2*。此外在 *EcoR* I-E 片段的两端分别发现具有 *lef-3* (EMBL Accession#: AJ715478) 和 *lef-11* (EMBL Accession#: AJ715479) 基因的部分编码区序列, 长度分别273bp和186bp。*lef-11* 基因编码区的上游为与 *AcMNPV* ORF38 和 *LdMNPV* ORF46 同源的基因, 且两个ORF有76bp部分重叠。

2.2 氨基酸序列分析

OrerSNPV LEF-2推导的氨基酸序列见GenBank CAF32809。氨基酸残基数都在168-270之间, 其中NPVLEF-2氨基酸残基数序列在200-241之间。杆状病毒的LEF-2联配分析发现, LEF-2序列保守性很高, 有15个残基在28种杆状病毒中完全相同(Pro16, Tyr32, Phe48, Gly52, Gly59, Leu63, Cys93, Arg126, Arg136, Cys150, Cys154, Cys158, Tyr173, Lys171, Cys172)。LEF-2氨基酸序列分析发现N-端均为疏水区域, 中间为估计的活性功能区域, 分别有如下的保守的氨基酸: Leu、Cys、Arg、Ile、Cys、Cys、Cys、Tyr、Lys、Cys和Glu, 其中富含的多个Cys可能同形成S-S键并与蛋白的空间构象相关。对*OrerSNPV*氨基酸序列的分析, 发现其同*AcMNPV*很相似, 估计可能存在同*AcMNPV*相似的三个保守功能区域(I-III)。其中区域II是富含半胱氨酸区域, 它包括了一个类似锌指结构的功能域^[28], 但并不是每种NPV都存在这种锌指结构。序列分析(<http://us.expasy.org/tools/scanprosite1.html/>)表明20-23位氨基酸残基为可能的N-糖基化位点(N-{P}-[ST]-{P}), 87-89/205-207位为蛋白激酶C磷酸化位点([ST]-x-[RK]), 128-130位为细胞附着序列(R-G-D)。

OrerSNPV LEF-3的29-32位氨基酸残基为可能的N糖基化位点(N-{P}-[ST]-{P}), 22-24位氨基酸残基为可能的蛋白激酶C磷酸化位点([ST]-x-[RK]), 79-82位氨基酸残基为可能的酪蛋白激酶磷酸化位点([ST]-x(2)-[DE]), 80-88位氨基酸残基为可能的酪氨酸酶磷酸化位点([RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y)。*OrerSNPV* LEF-11的43-46位氨基酸残基为可能的N糖基化位点(N-{P}-[ST]-{P}), 39-42位氨基酸残基为可能的cAMP和cGMP依赖性蛋白, 蛋白激酶磷酸化位点为([RK](2)-x-[ST])。

2.3 杆状病毒 *lef-2* 基因的分子进化

在已经测定了基因组全序列的16种(株)NPV和6种GV的基因组均鉴定出*lef-2*基因, 库蚊杆状病毒*Culex nigripalpus Baculovirus*基因组中也发现*lef-2*基因, 另外尚未完成基因组全序列测定的*AnfaNPV*、*PenuNPV*、*AmalNPV*、*BusuSNPV*、*AnNPV*和膜翅目病毒*NeseNPV*的*lef-2*基因也已经报道。由*lef-2*基因的这种保守性可以推断该基因是杆状病毒的最重要核心基因之一, 在病毒的生活史中不可缺少。将推导的*OrerSNPV*的LEF-2氨基酸序列与其它已知的NPV LEF-2进行同源性比较分析的结果(表1)表明, 杆状病毒LEF-2氨基酸序列相互间同源性为15%~96%, 其中22种鳞翅目NPV的LEF-2之间的同源性为31%~96%, 鳞翅目6种GV之间的同源性为32%~64%。鳞翅目NPV与GV之间的同源性为23%~44%; 膜翅目松柏锯角叶蜂NPV与鳞翅目NPV的同源性为24%~35%, 与GV之间的同源性为24%~32%; 双翅目库蚊杆状病毒*C. nigripalpus Baculovirus*与鳞翅目NPV、GV、松柏锯角叶蜂NPV的LEF-2之间的同源性分别为15%~25%、13%~15%和15%。*OrerSNPV*与*BusuSNPV*同源性最高, 达49%, 同*MacoNPV-B*、*HezeSNPV*、*LdMNPV*和*HearSNPV*分别为47%, 46%, 46%和46%, 在6种GV中, 与*AdorGV*同源性最低, 只有21%。*OrerSNPV*的LEF-2与松柏锯角叶蜂NPV和*C. nigripalpus Baculovirus*同源性更低, 分别为32%和18%。根据氨基酸序列, 用Gentyx-win程序绘制了已知的28种杆状病毒LEF-2基因分子进化树(图1)。结果表明杆状病毒*lef-2*基因至少可以分为NPV、GV、松柏锯角叶蜂NPV和*C. nigripalpus Baculovirus*四个分支。在进化树上*OrerSNPV*与*BusuSNPV*的亲缘关系最为接近, 与*OpMNPV*、*PenuNPV*、*CfMNPV*、*EppoNPV*、*AnNPV*、*CjDEFNPV*、*AnfaNPV*、*RaouNPV*、*AcMNPV*和*BmNPV*的进化关系也较为接近。

在已经测定了全序列的16种(株)NPV和6种GV基因组中, 除了*Xc-nGV*的基因组没有鉴定出*lef-3*基因外, 其它均编码有*lef-3*基因; 已经测定了基因组全序列的22种NPV和GV都编码有*lef-11*基因, 此外还没有完成全序列测定的*LeseNPV*和*ChfuGV*也鉴定出*lef-11*基因, 但*C. nigripalpus Baculovirus*基因组没有鉴定出*lef-3*和*lef-11*基因。将推导的*OrerSNPV* LEF-3和LEF-11的部分氨基酸序列与其它已知的NPV进行同源性比较分析, 结果表明*OrerSNPV* LEF-3部分氨基酸序列和*LdMNPV*^[29]同源性最高, 达43%, 其次是*MacoNPV-A* (NP-

613196)与 *MacoNPV-B*^[30], 分别为 41%和 36%。^[30]、*MacoNPV-A*^[31]同源性最高, 达 74%。其次是 *OrerSNPV LEF-11* 部分氨基酸序列和 *MacoNPV-B AcMNPV*^[32]与 *HearSNPV*^[33], 达 61%。

表1 28种杆状病毒的LEF-2氨基酸同源性

Table 1 Matrix of pairwise percent identity of the amino acid sequences of baculovirus LEF-2

aa No	Orer	Busu	Ma-A	Heze	Hear	Ld	Ma-B	Se	Bm	Ac	Adho	Op	Chfu	Eppo	An	Penu	Anaf	Raou	Spli	Amal	Nese	Cp	Plxy	Crie	Xc-n	Phop	Ador
Orer	216																										
Busu	209	49																									
Ma-A	211	47	45																								
Heze	238	46	46	46																							
Hear	241	46	46	47	96																						
Ld	216	46	40	37	41	41																					
Ma-B	215	45	44	80	47	47	37																				
Se	209	45	42	56	45	45	39	56																			
Bm	210	41	41	38	40	40	36	39	43																		
Ac	210	40	43	39	39	40	37	40	42	89																	
Adho	211	40	39	39	42	42	41	41	40	39	38																
Op	204	40	36	38	39	39	43	41	37	52	52	37															
Chfu	202	40	37	38	39	39	39	41	38	52	52	36	80														
Eppo	203	40	40	36	40	40	36	40	36	54	54	37	70	68													
An	204	40	38	40	37	37	38	38	36	53	53	38	70	67	70												
Penu	204	40	36	39	39	39	43	42	38	52	52	38	98	77	70	69											
Anaf	210	39	42	38	38	38	37	39	42	87	92	38	53	54	55	51											
Raou	210	39	42	38	39	39	36	39	41	88	92	38	54	54	58	56	51	93									
Spli	210	37	39	38	37	37	40	41	38	31	31	37	36	33	33	33	33	34	31								
Amal	206	35	36	40	41	41	33	40	40	52	52	35	44	46	46	43	43	53	53	31							
Nese	200	32	33	35	33	32	31	25	28	29	29	30	27	27	24	25	26	29	29	25	26						
Cp	171	31	34	27	31	25	23	31	35	37	26	44	27	30	28	38	28	24	26	28	35	32					
Plxy	270	30	27	27	30	30	25	30	30	38	23	27	32	34	41	37	32	37	37	27	33	31	40				
Crie	168	28	30	26	30	29	26	27	27	34	22	37	28	29	27	32	40	38	38	26	25	30	64	39			
Xc-n	189	28	30	31	24	26	25	28	27	31	23	36	28	29	26	32	30	38	31	24	25	30	41	44	38		
Phop	180	27	25	31	32	27	28	28	26	26	23	35	26	28	26	28	30	32	30	25	27	25	55	38	54	46	
Ador	170	26	30	24	23	24	24	26	26	26	22	38	26	26	24	28	27	29	28	24	27	24	48	37	47	44	32
C.ni	225	23	22	23	25	22	22	21	22	20	18	17	19	20	21	22	21	17	18	19	15	15	14	15	14	14	13

Abbreviation of the viruses: Busu-*Buzura suppressaria* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus^[10]; Ma-B: *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus B^[11]; Heze: *Helicoverpa zea* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (GenBank NP_542744); Hear-*Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus^[12]; Ld-*Lymantria dispar* multiple-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus^[13]; Ma-A-*Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus A^[14]; Se-*Spodoptera exigua* multiple-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus^[15]; Bm-*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus^[16]; Ac-*Autographa californica* multiple-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus^[17]; Adho-*Adoxophyes honmai* nucleopolyhedrovirus^[18]; Orps-*Orgyia pseudotsugata* multicapsid nucleopolyhedrovirus^[19]; Chfu-*Choristoneura fumiferana* multiplenucleopolyhedrovirus^[20]; Eppo-*Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus (GenBank NP_203173); An-*Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus (GenBank P81473); Penu-*Perina nuda* nucleopolyhedrovirus (GenBank AAD48439); Anaf-*Anagrapha falcifera* nuclear polyhedrovirus^[21]; Raou-*Rachiplusia ou* multiplenucleopolyhedrovirus^[22]; Spli-*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus^[23]; Amal-*Amsacta albistriga* nucleopolyhedrovirus (GenBank AAD26699); Nese-*Neodiprion sertifer* nucleopolyhedrovirus (GenBank AAF24989); Cp-*Cydia pomonella* granulovirus^[24]; Plxy-*Plutella xylostella* granulovirus^[25]; Crie-*Cryptophlebia leucotreta* granulovirus (Jehle GenBank NP_891885); Xc-n-n-*Xestia c-nigrum* granulovirus^[26]; Phop-*Phthorimaea operculella* granulovirus (GenBank NP_663202); C.ni-*Culex nigripalpus* Baculovirus^[27]

将OrersNPV的LEF-3部分序列和已知的15种NPV的LEF-3与5种GV的LEF-3绘制分子进化树, 分析发现OrerSNPV和LdMNPV进化关系最接近。其次分别是MacoNPV-A和MacoNPV-B。将OrerSNPV LEF-11部分序列和已知的16种NPV的LEF-11与6种GV的LEF-11基因分子进化树分析, 发现OrerSNPV和SeMNPV^[15]进化关系最接近, 其次分别是MacoNPV-A、MacoNPV-B。

3 讨论

lef-2 基因在已经测定了基因组全序列的各种杆状病毒中均存在, 包括鳞翅目 NPV、GV 的基因组及库蚊杆状病毒 *C.nigripalpus Baculovirus* 基因组, 膜翅目病毒 *NeseNPV* 也已经发现有 *lef-2* 基因, 这表明其功能的不可替代性。而已经测定全序列的 23 种 (株) 杆状病毒基因组中, 除了 *Xc-nGV* 没有

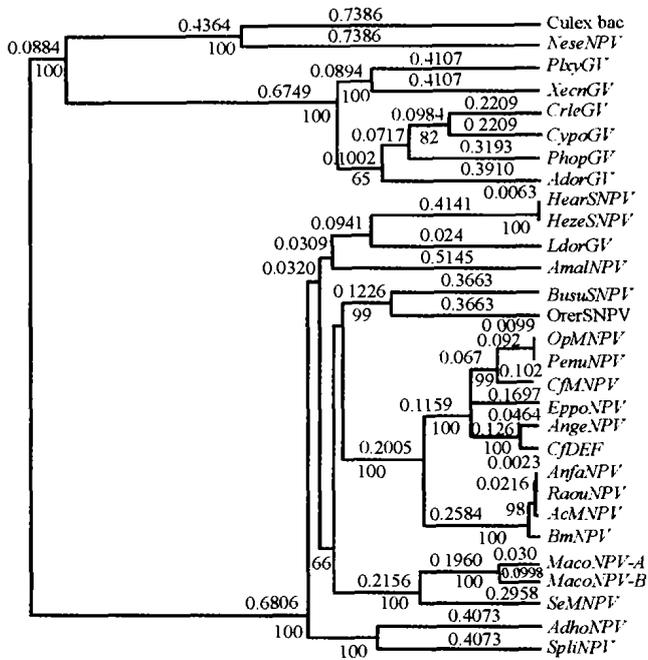


图 1 状病毒 LEF-2 蛋白序列的分子进化树

Fig.1 A phylogenetic tree of LEF-2 from baculoviruses

Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) was used. The number at each branch in A indicates the distance (expected site substitution number). Bootstrap probabilities (%), as determined by the neighbor-joining method (N-J) for 100 resamplings, were also given below the main nodes.

lef-3 基因, 库蚊杆状病毒没有 *lef-3* 和 *lef-11* 外, 其它均含有这两个基因, *lef-3* 与 *lef-11* 也都是杆状病毒的重要基因。本研究表明, OrerSNPV 也存在 *lef-2* 基因和 *lef-3* 与 *lef-11* 的基因。现已经确定 6 种必需基因参与了杆状病毒的复制过程: DNA 聚合酶、DNA 螺旋酶、LEF-3、IE-1、LEF-1 和 LEF-2。LEF-11 虽然不参与病毒基因组 DNA 的复制, 但能调节晚期基因的表达。在鳞翅目 NPV、GV 的基因组中都发现有 *lef-2*, *lef-3*, *lef-11* 基因, 说明所有鳞翅目杆状病毒都具有这些基因来调控病毒复制和晚期基因表达。Chen 等^[34]对 16 种昆虫杆状病毒的 *lef-2* 基因进行同源性和分子进化分析后, 将昆虫杆状病毒分成三大组。AcMNPV、BmNPV、AnfaMNPV、OpMNPV、CjMNPV、AnMNPV、AmalNPV、PenuNPV 分为杆状病毒 I 组; BusuSNPV、HearSNPV、LdMNPV、SeMNPV 为杆状病毒 II 组; GV 为另一组, 包括 CyopGV、Xc-n-nGV、PtxyGV。本文对 28 种昆虫杆状病毒的 *lef-2* 基因分析结果表明, 昆虫杆状病毒 *lef-2* 基因可分成四大分支, 其中 NeseNPV 和 *C. nigripalpus Baculovirus* 各成一个分支, GV 为一个分支, 鳞翅目 NPV 为一个分支。OrerSNPV LEF-2 与 BusuSNPV 进化关系最相近, 与 OpMNPV、

PenuNPV、CjDEFNPV、EppoNPV、AnNPV、NeseNPV 和 CjMNPV 的进化关系也较为接近。

对 OrerSNPV 的 *lef-2*、*lef-3* 和 *lef-11* 基因部分序列进行同源性和分子进化关系分析发现, 三者间分子进化并不完全相同。OrerSNPV *lef-3* 基因所测部分序列同其它病毒的同源性很高, 61%~74%。OrerSNPV *lef-3* 和 LdMNPV 的进化关系最接近, OrerSNPV *lef-11* 和 SeMNPV 进化关系最接近, OrerSNPV 的 *lef-2* 则与 BusuSNPV 的基因进化关系最相近, 我们还对 OrerSNPV 几丁质酶基因与其它已知杆状病毒的几丁质酶基因进行了进化关系分析, OrerSNPV 几丁质酶基因与 LdMNPV 的亲缘关系最为接近。但 BusuSNPV 的 *lef-3* 和 *lef-11* 及几丁质酶基因还没有报道, 与 OrerSNPV 的关系尚不清。从已经测定的序列可以看出, OrerSNPV 是一种与 BusuSNPV、HearSNPV、LdMNPV、SeMNPV 亲缘关系较为接近的病毒。OrerSNPV 与其它病毒的确切进化关系, 有待于进一步对其多角体蛋白基因和整个基因组序列的研究。

参考文献

- [1] 孙发仁. 灰斑古毒蛾核型多角体病毒病的自然流行[J]. 中国生物防治, 1997, 13 (2): 141-142.
- [2] Lu A, Krell P J, Vlak J M, et al. Baculovirus DNA replication[A]. Miller L K. The Baculovirus[C]. New York: Plenum Press. 1997, 171-191.
- [3] Merrington C L, Kitts P A, King L A, et al. An *autographa californica* nucleopolyhedrovirus *lef-2* mutant: consequences for DNA replication and very late gene expression[J]. Virology 1996, 217: 338-348
- [4] Kool M, Ahrens C H, Goldbach R W, et al. Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 11212-11216.
- [5] Passarelli A L, Miller L K. Three baculovirus genes involved in late, very late gene expression: *ie-1*, *ie-n*, *lef-2*[J]. J Virol, 1993, 67: 2149-2158.
- [6] Evans J T, Leisy D J, Rohrmann G F. Characterization of the interaction between the baculovirus replication factors LEF-1, LEF-2 [J]. J Virol, 1997, 71: 3114-3119.
- [7] Todd J W, Passarelli A L, Miller L K. Eighteen baculovirus genes, including *lef-11*, *p35*, *39K*, *p47*, support late gene expression[J]. J Virol, 1995, 69(2): 968-974.
- [8] 王根, 张传溪, 金伟, 等. 棉铃虫核型多角体病毒限制性酶切图谱和多角体蛋白基因定位[J]. 环境与应用生物学报, 1996, 2 (4): 1387-1394.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed)[M]. New York: Cold Spring Harbor

- Laboratory press, 1989.
- [10] Hu Z H, Arif B M, Jin F, *et al.* Distinct gene arrangement in the *Buzura suppressaria* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome[J]. J Gen Virol, 1998, 79: 2841-2851.
- [11] Li L, Donly C, Li Q, *et al.* Identification and genomic analysis of a second species of nucleopolyhedrovirus isolated from *Mamestra configurata* [J]. Virology, 2002, 297: 226-244.
- [12] 张传溪, 武家才. 棉铃虫核型多角体病毒基因组组织及 p10 基因分析[J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33: 179-184.
- [13] Kuzio J, Pearson M N, Harwood S H, *et al.* Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*[J]. Virology, 1999, 253: 17-34.
- [14] Li Q, Donly C, Li L, *et al.* Sequence and organization of the *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus genome[J]. Virology, 2002, 294:106-121.
- [15] Ijkel W F, Van Strien E A, Heldens J G, *et al.* Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome[J]. J Gen. Virol, 1999, 80: 3289-3304.
- [16] Gomi S, Majima K, Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus[J]. J Gen. Virol, 1999, 80: 1323-1337.
- [17] Popham H J R, Pellock B J, Robson M, *et al.* Characterization of a variant of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with a nonfunctional ORF 603[J]. Biol Control, 1998,12: 223-230.
- [18] Nakai M, Goto C, Kang W, *et al.* Genome sequence and organization of a nucleopolyhedrovirus isolated from the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* [J]. Virology, 2003, 316: 171-183.
- [19] Ahrens C H, Russell R L, Funk C J, *et al.* The sequence of the *Orygia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. Virology, 1997, 229: 381-399.
- [20] Carstens E B, Liu J J, Dominy C. Identification and molecular characterization of the baculovirus *CfMNPV* early genes: *ie-1*, *ie-2* and *pe38*. Virus Res, 2002, 83 (1-2):13-30.
- [21] Federici B A, Hice R H. Organization and molecular characterization of genes in the polyhedrin region of the *Anagrapha falcifera* multinucleocapsid NPV[J]. Arch Virol, 1997, 142: 333-348.
- [22] Harrison R L, Bonning B C. Comparative analysis of the genomes of *Rachiplusia ou* and *Autographa californica* multiple nucleopolyhedroviruses[J]. J Gen Virol, 2003, 84: 1827-1842.
- [23] Pang Y, Yu J, Wang L, *et al.* Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome[J]. Virology, 2001, 287: 391-404.
- [24] Luque T, Finch R, Crook N, *et al.* The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome[J]. J Gen Virol, 2001, 82: 2531-2547.
- [25] Hashimoto Y, Hayakawa T, Ueno Y, *et al.* Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome[J]. Virology, 2000, 275: 358-372.
- [26] Wormleaton S, Kuzio J, Winstanley D. The complete sequence of the *Adoxophyes orana* granulovirus genome[J]. Virology, 2003, 311: 350-365.
- [27] Afonso C L, Tulman E R, Lu Z, *et al.* Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus* [J]. J Virol, 2001, 75: 11157-11165
- [28] Evanx R M, Hollenbeg S M. Zinc fingers:guilt by association[J]. Cell, 1988, 15:1-3.
- [29] Kuzio J, Pearson M N, Harwood S H, *et al.* Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*[J]. Virology, 1999, 253: 17-34.
- [30] Li L, Donly C, Li Q, *et al.* Identification and genomic analysis of a second species of nucleopolyhedrovirus isolated from *Mamestra configurata* [J]. Virology, 2002, 297:226-244.
- [31] Li Q, Donly C, Li L, *et al.* Sequence and organization of the *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus genome[J]. Virology. 2002, 294: 106-121.
- [32] Ayres M D, Howard S C, Kuzio J, *et al.* The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclearpolyhedrosis virus[J]. Virology, 1994, 202: 586-605.
- [33] Wang H, Chen X W, Wang H, *et al.* Nucleotide sequence and transcriptional analysis of a putative basic DNA-binding protein of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus[J]. Virus Genes, 2001, 22:113-120.
- [34] Chen X W, Ijkel Wiffred F J, Dominy C, *et al.* Identifacation, sequence analysis and phylogeny of the *lef-2* gene of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid baculovirus[J]. Virus Res, 1999, 65: 21-32.