

文山松毛虫质型多角体病毒 S8 片段 cDNA 克隆与原核表达*

段 兵^{1,2}, 赵淑玲¹, 张海元¹, 张小霞¹, 肖宇宙¹, 汤显春¹, 彭辉银^{**}

(1. 中国科学院武汉病毒研究所分子病毒学重点实验室, 湖北武汉 430071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

cDNA Clone of Segment 8 and Prokaryotic Expression of *Dendrolimus**punctatus Wenshanensis cypovirus*DUAN Bing^{1,2}, ZHAO Shu-ling¹, ZHANG Hai-yuan¹, ZHANG Xiao-xia¹, XIAO Yu-zhou¹,
TANG Xian-chun¹, PENG Hui-yin^{1**}

(1. Key Lab of Molecular Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. The Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The nucleotide sequence of *Dendrolimus punctatus Wenshanensis cypovirus* genomic segment 8 (S8) has been determined. S8 consists 1332 nucleotides and encodes a putative protein of 390 amino acids with a molecular mass of approximately 44kDa (P44). Then, the fragment containing *p44* gene was inserted into pET-28a expression vector and expressed in *E. coli* BL21. SDS-PAGE results showed that *p44* gene has expressed.**Key words:** *Dendrolimus punctatus Wenshanensis cypovirus*; Genome analysis; *p44* gene; Prokaryotic expression; dsRNA virus.**摘要:** 文山松毛虫质型多角体病毒(DpwCPV)S8 片段被克隆和测序, 该片段全长 1332bp, 编码 390 个氨基酸组成的分子量大约为 43kDa 的蛋白 P44。根据本实验室测定出的马尾松毛虫质型多角体病毒(DpCPV)基因组全序列, 设计引物, 扩增出文山松毛虫质型多角体病毒 S8 部分片段, 并亚克隆出 *p44* 基因序列, 然后将 *p44* 基因序列 cDNA 克隆到表达载体 pET-28a 中, 构建成表达质粒 pET-S8, 用 IPTG 诱导大肠杆菌 BL21, 经 SDS-PAGE 证明 *p44* 基因在大肠杆菌中获得成功表达, 并对其编码蛋白序列进行了分析。**关键词:** CPV; 基因组分析; 原核表达; *p44* 基因; 双链 RNA 病毒

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2004) 06-0627-05

质型多角体病毒(Cytopalsmic polyhedrosis virus) 属呼肠孤病毒科(*Reoviridae*), 质多角体病毒属(*Cypovirus*)^[1-3]。目前在 GenBank 中提交基因序列的 CPV 有: 家蚕质型多角体病毒(*Bombyx mori cypovirus*, BmCPV)^[4-8]、马尾松毛虫质型多角体病毒(*Dendrolimus punctatus cypovirus*, DpCPV)^[9-11]、冷杉合毒蛾质型多角体病毒^[12](*Orgyia pseudotsugata cypovirus*, OpCPV)、粉纹夜蛾质型多角体病毒(*Trichoplusia ni cypovirus*, TnCPV)、大蚕蛾质型多角体病毒^[13](*Antheraea mylitta cypovirus*, AmCPV)、棉铃虫质型多角体病毒(*Heliiothis armigera cypovirus*, HaCPV)、白切根虫质型多角体病毒(*Euxoa scandens cypovirus*, EsCPV) 和舞毒蛾质型多角体病毒^[14](*Lymantria dispar cypovirus*, LdCPV)。CPV 感染许多昆虫的中肠上皮细胞, 并产生大量被称作多角体的蛋白包涵体, 多角体是在病毒感染后期由病毒编码的蛋白结晶而成, 很多的病毒粒子被包进多角体^[15]。多角体在保护和稳定病毒粒子及病毒粒子准确进入中肠上皮细胞中起非常重要的作用^[14], 多角体在昆虫中肠的强碱性条件下溶

收稿日期: 2004-05-12, 修回日期: 2004-06-30

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (30270057)

作者简介: 段 兵 (1977-), 男, 湖北黄冈籍, 硕士研究生, 研究方向为病毒生物学及分子生物学。

** 通讯作者: 彭辉银 (1950-), 男, 湖北秭归籍, 研究员, 从事病毒生物学研究。Corresponding author.

解。CPV 为单层衣壳结构, 衣壳外表面有 2 种不同大小的突起, 这些突起结构可能是病毒感染细胞时的吸附部位^[15]。

CPV 的基因组由 10 个分段的等分子数的 dsRNA (S1-S10) 构成。每一个双链 RNA 片段由一个正链和负链的 RNA 片段组成。根据核酸基因组的电泳迁移图谱可将 CPV 分为 14 或 15 个型^[13]。现在研究的最清楚的是家蚕质型多角体病毒 (BmCPV), BmCPV 的病毒粒子由 VP1 (151kDa)、VP2 (142 kDa)、VP3 (130 kDa)、VP4 (67 kDa)、VP5 (33 kDa) 五种结构蛋白构成, 体外用 I¹²⁵ 标记表明 VP1 和 VP3 属于外壳蛋白^[15]。本文对 DpCPV 的 S8 片段的 p44 基因进行了克隆与测序, 并在大肠杆菌 BL21 中成功表达了 P44 蛋白。

1 材料与方 法

1.1 病毒株、菌株和质粒

病毒株为文山松毛虫质型多角体病毒, 在云南省曲靖增殖。限制性内切酶和 PCR 用酶购自 Takara 公司, PCR 引物由北京赛百胜公司合成, 测序工作由上海博亚公司完成, 克隆载体为美国 Promega 公司产品 pGEM-T 载体, 表达载体为美国默克公司 pET-28a 质粒, 受体菌为 *E.coli* DH5 α 和 BL21 (DE3), 由本实验室保存。

1.2 病毒增殖、纯化和核酸的提取

DpCPV 感染用的文山松毛虫幼虫采自云南曲靖, 感染用文山松毛虫质型多角体病毒种由云南省林业科学院段老师馈赠。病毒增殖方法参照洪靖君等方法^[16], 多角体纯化参照刘润忠等方法^[17], 采取差速离心法从感染的文山松毛虫中肠粗提液中提取病毒多角体, 采用 SDS-热酚法^[17](pH8.0) 从病毒粒子中抽提基因组 dsRNA, 然后用无水乙醇沉淀核酸, 沉淀溶于 DEPC 处理的双蒸水中, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳分离基因组核酸, 在紫外灯下切割下所需片段, 用试剂盒回收纯化, 保存于 -20℃。

1.3 引物设计

根据马尾松毛虫质型多角体病毒的 S8 片段末端序列分别设计引物 p5' (5'-TCATTTTCAGGTCATG ATCAATTTCT-3') 和 p3' (5'-TCAACAGGCTGGAC TACCGTTAGCC-3') 扩增文山松毛虫质型多角体病毒片段 8 的序列, 测序后设计扩增 p44 基因的引物 p1 (5'-CGGATCCAGGATGACTACTAACTT-3') (下划线为 *Bam*H I 酶切位点), p2 (5'-TGCGA AAGCTTCTACTCTGCCTCTA-3') (下划线为 *Hind* III 酶切位点)。

1.4 cDNA 合成及 PCR 扩增

取 10 μ L RNA 样品与合成的两个寡核苷酸引物各 50pmol 在 100℃ 水浴中退火 5min, 然后于冰浴充分解链, 再依次加入 10X 扩增缓冲液 5 μ L、dNTP1 μ L、逆转录酶 0.5 μ L、RNAse 抑制剂 1 μ L, 合成 cDNA 第一条链, 然后进行 PCR 扩增。PCR 扩增的反应体积为 50 μ L, 其中引物各 1 μ L、dNTP 各 1 μ L、10X PCR 缓冲液 5 μ L、ExTaq 酶 0.5 μ L, 用水补齐。扩增条件为: 94℃ 预变性 4min, 94℃ 变性 30S, 52.5℃ 退火 40S, 72℃ 延伸 4min, 30 个循环后, 72℃ 保温 10min, 使延伸反应充分进行, 最后于 4℃ 下保存。

1.5 基因克隆

琼脂糖凝胶电泳分离 RT-PCR 产物, 用 DNA 回收试剂盒纯化目的 DNA, 按照 pGEM-T 克隆载体的操作手册将目的 DNA 片段与载体连接, 连接物命名为 pGEM-S8。后将连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞后, 涂于含有 Amp/IPTG/X-gal 的 LB 平板上, 于 37℃ 恒温培养 16~18 h, PCR 产物克隆参照分子克隆^[18]。pGEM-S8 插入序列测定由上海博亚公司完成。

1.6 S8 片段的原核表达

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒 pGEM-S8, 与同样双酶切的 pET-28a 载体相连, 重组表达质粒命名为 pET-S8。将 pET-S8 转化感受态细胞 BL21, 上海博亚公司对 pET-S8 中插入的 DNA 片段进行测序。按文献^[17]用 IPTG 进行目的蛋白的表达诱导, 在 1.0mm/L 的 IPTG 下, 不同的时间进行诱导目的蛋白表达。用 12% 的 SDS-PAGE 分离胶进行蛋白电泳, 凝胶成像分析系统 GeneGenius 处理电泳结果。原核表达见分子克隆^[18]。

2 结果与分析

2.1 文山松毛虫质型多角体病毒的基因组电泳、S8 RT-PCR 及 pGEM-S8 的酶切鉴定

文山松毛虫质型多角体病毒基因组经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离, 结果见图 1, 从图谱可以看出, 文山松毛虫质型多角体病毒核酸基因组为 10 个片段, 与 CPV 1 型的基因组图谱一致。重组质粒 pGEM-S8 的双酶切鉴定见图 2。

2.2 S8 片段 ORF 的基因序列分析及同源性比较

测序可知文山松毛虫质型多角体病毒的 S8 片段的克隆片段长 1332bp, 用 EditSeq 软件对氨基酸序列进行分析, p44 基因全长 1174bp (38-1210), 编码 390 个氨基酸残基, 大约分子量为 43.7KD。

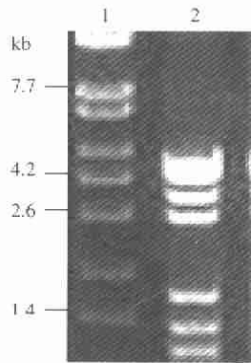


图1 文山松毛虫质型多角体病毒基因电泳图

Fig.1 DpCPV genome dsRNA

1, Marker; 2, DpCPV-WS genome

务器进行预测, 编码蛋白的等电点 PI=5.29, α -helix 占 36.15%, β -turn 占 5.38%, coil39.49%, 延伸链 18.97%。在蛋白氨基酸序列中含 2 个 N-糖基化位点 (69-72; 381-384)、8 个蛋白激酶 C 磷酸化位点。

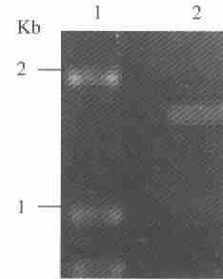


图2 重组质粒 pGEM-S8 酶切鉴定

Fig.2 Analysis of pGEM-S8

1.Marker; 2, pGEM-S8 digested by BamH I/Hind III digestion of pGEM-S8

起始密码子 ATG 位于 38-40 位碱基, 终止密码子位于 1208-1210 位碱基。蛋白结构由 PredictProtein 服

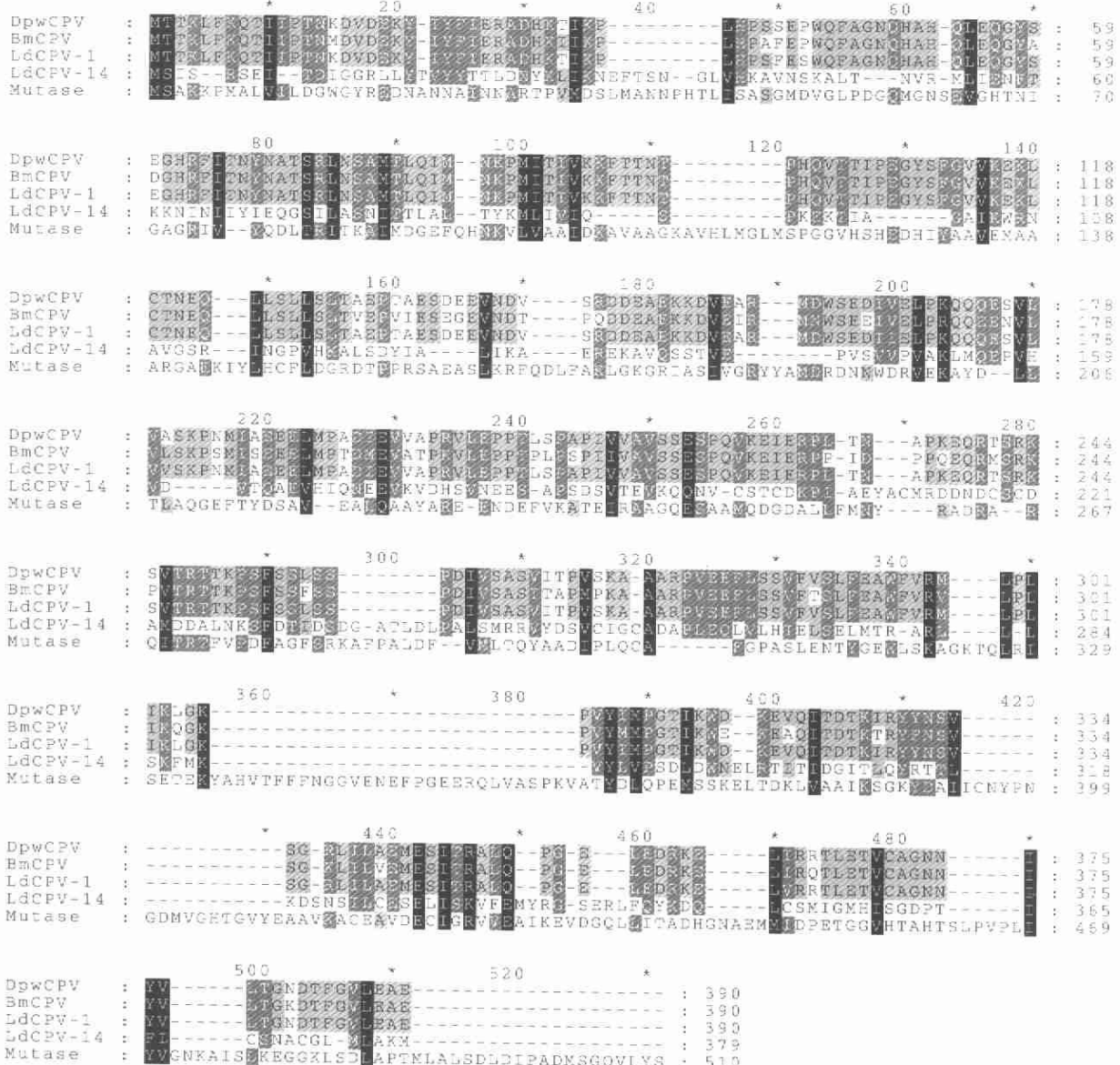


图3 DpwCPV、BmCPV、LdCPV-1、LdCPV-14 及 Mutase 氨基酸序列同源性比较

Fig.3 The alignment of amino acid sequence

Blast 比较分析,文山松毛虫质型多角体病毒的 S8 片段的核苷酸序列与舞毒蛾质型多角体病毒 (LdCPV-1) S8 和家蚕质型多角体病毒 (BmCPV) S8 的同源性分别为 98% 和 92%, 而氨基酸的同源性分别为 96% 和 82%, 但与 LdCPV-14 型的核酸同源性仅为 38%, 氨基酸的同源性为 36%, S8 片段编码蛋白的第 322-378 位氨基酸序列与磷酸甘油酸变位酶 (Mutase) 第 59-115 氨基酸序列有 24% 同源性。见图 3。

2.3 融合基因表达载体的构建

用 *Bam*H I 和 *Hind* I 从重组质粒 pGEM-S8 双酶切下编码区基因片段, 连接到 pET-28a 表达载体上, 双酶切电泳鉴定其分子量的大小, 见图 4。经测序证明插入的 DNA 序列与先前的测定结果相一致, 并且该片段正确位于表达框中和酶切位点内。

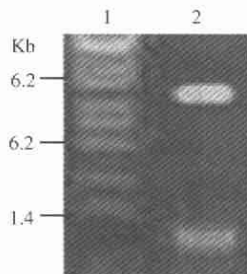


图 4 重组质粒 pET-S8 酶切鉴定
Fig.4 Restriction analysis of pET-S8
1, Marker; 2, Digested by *Bam*H I/*Hind* III

2.4 重组基因的诱导表达

在 1.0mmol/L 的 IPTG 浓度下, 分别诱导 1h、2h、3h, 在 45kDa 附近有一条明显的表达带, 在诱导时间 1h 时, 融合蛋白的表达量已经很高了, 随着时间的延长, 表达量的变化不大, 见图 5。

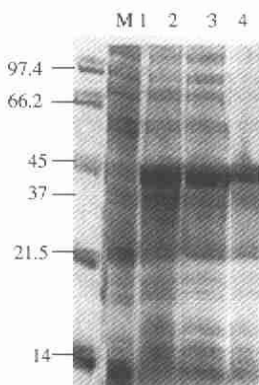


图 5 IPTG 诱导时间对蛋白表达的影响
Fig.5 Fusion protein expression induced by IPTG in different time
M, Marker; 1, pET-28a induced by 1.0mmol/L IPTG in 4 h; 2-4, pET-S8 induced by 1.0mmol/L IPTG in 1, 2, 3 h.

3 讨论

在呼肠孤病毒科成员中, 以正呼肠孤病毒、轮状病毒和植物呼肠孤病毒的研究较为详尽, 对各片段均有较详尽的报道。相对来说, 质型多角体病毒的研究还比较少, 仅家蚕质型多角体病毒得到了较为系统的研究。在 GenBank 中, 已公布的 CPV 病毒核酸序列有 BmCPV-1 (家蚕质型多角体病毒) 两个株系 (H 株和 I 株), LdCPV-1, LdCPV-14, TnCPV-15 (粉纹夜蛾 15 型质多角体病毒) 和 DpCPV (松毛虫质型多角体病毒)。根据现有的数据分析表明, 同型质型多角体病毒间的同源性较高, 不同型的则较低或没有。分析文山松毛虫质型多角体病毒第 8 片段的序列可知, 其 5' 末端与 3' 末端序列拥有家蚕质型多角体病毒 10 个片段的末端特征, 即 5' 端具有 AGTAA 保守序列, 3' 端具有 GTTAGCC 保守序列, 此为 1 型质多角体病毒的共同特征^[19]。其他型的质型多角体病毒也具有各自保守的末端共同序列。由于质型多角体病毒的每个片段均靠与病毒结合的 RNA 聚合酶形成复制酶模板 mRNA, 因此这些保守序列可能为复制酶提供识别位点^[20]。

通过 BLAST 分析显示, 本实验所测得的山松毛虫质型多角体病毒与马尾松毛虫质型多角体病毒比较, 只有几个氨基酸不同 (Ser 40-Phe; Asp 195-Ala; Glu 661-Gly), 经 dnastar 软件分析, 这些氨基酸的改变并没有对肽链的亲水性、疏水性造成太大的影响, 但 Ser 和 Asp 的改变是否会影响蛋白的活性以至导致宿主选择和病毒毒力的改变, 还需做深入的研究。文山松毛虫质型多角体病毒基因组的 p44 基因编码的蛋白与同型 CPV 病毒的同源性比较高, 而与其他呼肠孤病毒科的各属病毒编码蛋白没有同源性, 但同时也显示, P44 蛋白与磷酸甘油酸变位酶有 24% 的同源性, 磷酸甘油酸变位酶在细胞代谢中起着非常重要的作用, 磷酸甘油酸变位酶的突变能造成能量传递途径的中断, 给细胞带来致命的后果, p44 基因编码蛋白也许在病毒粒子侵染宿主细胞中和能量的提供有关系, 进一步的功能分析还有待研究。

参考文献

- [1] Holmes I H, Boccardo G, Esters M K, *et al.* Family Reviridae [M]. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, New York: Springer, Wien, 1995.
- [2] Francki R I B, Fauquet C M, Knudson D L, *et al.* Classification and

- nomenclature of viruse.Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [J]. Arch Virol, 1991, Suppl 2.
- [3] Mertens P P C, Arella M, Attoui H.Reoviridae [M]. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses.Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, 2000.
- [4] Hagiwara K, Rao S, Scott S W, *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(Pt 6): 1477-1482.
- [5] 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.
- [6] Hagiwara K, Matsumoto T, *et al.* Nucleotide sequences of genome segments 6 and 7 of Bombyx mori cypovirus 1, encoding the viral structural proteins V4 and V5, respectively [J]. J Gen Virol, 2000, 81(Pt 4): 1143-1147.
- [7] Hagiwara K, Tomita M, *et al.* Nucleotide sequence of Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus segment 8[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 247(3): 549-553.
- [8] Zhao S L, Liang C Y, Hong J J, *et al.* Genomic sequence analyses of segments 1 to 6 of Dendrolimus punctatus cytoplasmic polyhedrosis virus[J]. Arch Virol, 2003, 148(7): 1357-1368.
- [9] Zhao S L, Liang C Y, Hong J J, *et al.* Molecular characterization of segments 7-10 of Dendrolimus punctatus cytoplasmic polyhedrosis virus provides the complete genome[J]. Virus Res, 2003, 94(1): 17-23.
- [10] 赵淑玲, 梁昌镛, 洪靖君, 等. 马尾松毛虫质型多角体病毒S4得 cDNA克隆及序列分析[J]. 中国病毒学, 2003, 18(3): 246-250.
- [11] 洪靖君, 张海元, 赵淑玲, 等.马尾松毛虫CPV基因组S7的序列分析及部分序列的原核表达[J]. 中国病毒学, 2003, 18(6): 581-586.
- [12] Galinski M S, Yu Y, *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 (Pt 8): 1969-1974.
- [13] Qanungo K R, Kundu S C, Mullins J I, *et al.* molecular cloning and characterization of Antheraea mylitta cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 9[J]. J Gen Virol, 2002, 83: 1483-1491.
- [14] Rao S, Carner G R, Scott S W, *et al.* Comparison of the amino acid sequences of RNA-dependent RNA polymerases of cypoviruses in the family Reoviridae[J]. Arch Virol, 2003, 148(2): 209-219.
- [15] Ikeda K, Nagaoka S, Winkler S, *er al.* Molecular Characterization of *Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus Genome Segment 4[J]. J Virol, 2001, 75(2): 988-995.
- [16] 洪靖君, 段家龙, 赵淑玲, 等. 家蚕对马尾松毛虫质型多角体病毒敏感性[J]. 昆虫学报, 2002, 45: 815-21.
- [17] 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: 69-79.
- [18] 金东雁, 等. 分子克隆实验指南第二版[M].北京: 科学出版社, 1992.
- [19] Imai M, Riclusrdson M A, Ikegami N, *et al.* Molecular Cloning of Double-Stranded RNA Virus Genomes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80: 373-377.
- [20] Nibert M L, Schiff L A.Reoviruses and their replication [M]. Fields virology Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001.