

杨扇舟蛾颗粒体病毒 *gra* 基因的分析*

张小霞^{1,2}, 梁振普^{1,2}, 彭辉银^{1**}, 张忠信¹

(1. 中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉 430071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

Cloning and Analysis of the Granulin Gene of *Clostera anachoreta* Granulovirus

ZHANG Xiao-xia, LIANG Zhen-pu, PENG Hui-yin**, ZHANG Zhong-xin

(1. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Primers based on published sequences of granulin genes were synthesized and used to amplify the granulin gene from *Clostera anachoreta* granulovirus (ClanGV). The generated product was sequenced. Sequence analysis indicated the entire ORF of ClanGV granulin gene was 747bp, encoding a protein of 248 aa with an estimated molecular weight of 29.3kDa. A baculoviral late promoter was present at 24 bp upstream of the ATG codon. Two TATA boxes were at 26 and 65bp upstream of the ATG codon, respectively. Phylogenetic analysis indicated that ClanGV was closely related to *Adoxophyes orana* granulovirus (AoGV), *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV), *Choristoneura fumiferana* granulovirus (CfGV), and *Phthorimaea operculella* granulovirus (PoGV). Antibodies prepared against the protein were used in Western blot analysis and indicated that ClanGV granulin reacted positively with occlusion body protein from HaSNPV and CaLGV and reacted weakly with polyhedrin of SeMNPV.

Key words: *Clostera anachoreta* granulovirus (ClanGV); *gra* gene

摘要:本研究利用已知的颗粒体蛋白基因(*granulin, gra*)设计引物,通过PCR扩增得到ClanGV的*gra*基因。对PCR结果序列分析表明,ClanGV的*gra*基因开放阅读框(ORF)全长747bp,共编码248个aa,预计编码的蛋白质大小为29.3kDa。在起始密码子ATG上游-24bp处,有一个杆状病毒晚期启动子序列,ATAAG。有两个TATA框,分别位于ATG上游的-26bp和-65bp位置。基于*gra*的同源分析和进化树分析表明,ClanGV和茶小卷叶蛾颗粒体病毒(*Adoxophyes orana* granulovirus, AoGV)、苹果蠹蛾颗粒体病毒(*Cydia pomonella* granulovirus, CpGV)、云杉卷叶蛾颗粒体病毒(*Choristoneura fumiferana* granulovirus, CfGV)、马铃薯块茎蛾颗粒体病毒(*Phthorimaea operculella* granulovirus, PoGV)的亲缘关系较近。利用提取的颗粒体蛋白免疫家兔,制备了抗体进行免疫杂交分析,结果显示ClanGV除了与分月扇舟蛾颗粒体病毒(*Clostera anastomosis* L. granulovirus, CaLGV)的颗粒体蛋白有较强的杂交信号外,与棉铃虫核多角体病毒(*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, HaNPV)多角体蛋白也有明显的杂交带出现,与甜菜夜蛾核多角体病毒(*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus, SeNPV)只有非常微弱的杂交信号。

关键词: ClanGV; *gra* 基因

中图分类号: S763.12

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2005)06-0660-04

杆状病毒在虫体感染的过程中可形成包涵体(Occlusion body)。包涵体对包埋在内的病毒粒子具有保护作用,这种包涵体形式的病毒在蛋白基质的保护下能在环境中长期稳定存在,因而对幼虫的初始感染和虫体间的传播起到关键的作用,如果

没有包涵体的产生,病毒经口服感染的效率将降低1000多倍^[1]。构成包涵体的主要蛋白,在核多角体病毒(NPV)中称为多角体蛋白,表达该蛋白的基因为多角体蛋白基因(Polyhedrin, *pol*);对颗粒体病毒(GV)来说,包涵体称为颗粒体蛋白,表达该蛋白

收稿日期:2005-05-10,修回日期:2005-07-21

* 基金项目:中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-SW-315)

作者简介:张小霞,女,河南籍,研究方向为病毒与宿主的分子进化

** 通讯作者, Corresponding author, Tel: 027-87198641, E-mail: penghy@wh.iov.cn

的基因为颗粒体基因(*granulin, gra*)。包涵体的直径可达 $15\mu\text{m}$,在被感染的宿主细胞内,包涵体的晶体蛋白可占到细胞总蛋白的 50%以上^[2,3]。

杆状病毒的包涵体蛋白基因是一个高效表达的极晚期基因,也是一个重要的结构蛋白基因。序列分析表明,包涵体基因的氨基酸序列具有很高的同源性。来源于鳞翅目的包涵体蛋白,他们的同源性平均约为 70%,最高的可达到 97%~99%^[4]。因为启动子很强,包涵体的表达量极高,考虑到包涵体蛋白基因是病毒复制非必需基因,它的缺失不会影响病毒在宿主细胞中的复制,人们就考虑利用此基因进行构建重组病毒^[5],目前重组杆状病毒的构建,采用的主要方法就是将外源基因取代包涵体基因进行目的蛋白的表达^[6]。

基于包涵体蛋白基因的重要性,目前无论 NPV 还是 GV,杆状病毒测序完成最多的是包涵体蛋白基因区的序列,并且极端保守的包涵体蛋白区的基因排列结构可以用来研究不同杆状病毒成员间的亲缘关系。将 PoGV 和斜纹夜蛾颗粒体病毒(*Spo-doptera littoralis granulovirus, SlGV*)的颗粒体蛋白区域进行比较分析,发现虽然这两种病毒可以感染同种细胞系,但系统进化分析结果显示二者的颗粒体蛋白并不属于同一个进化分支^[7]。本研究依据已知的颗粒体蛋白基因设计引物,利用 PCR 技术,得到了 ClanGV 的颗粒体基因。另外利用提取的 ClanGV 颗粒体蛋白制备了抗体。Western-blot 检测结果显示,ClanGV 颗粒体蛋白与 CaLGV 的颗粒体蛋白和 HaNPV 多角体蛋白有较强的杂交信号,与 SeNPV 多角体蛋白只有微弱的杂交信号。这些结果为颗粒体蛋白基因的研究提供了依据,也为深入开展 ClanGV 颗粒体蛋白基因功能奠定了基础。

杨树是我国平原绿化和速生丰产林建设工程的重要树种之一。但是由于虫害肆虐这一制约因素,大大限制了杨树种植业的发展。其中杨扇舟蛾是杨树主要害虫之一,它属于鳞翅目,舟蛾科。杨扇舟蛾颗粒体病毒(*Clostera anachoreta granulovirus, ClanGV*)是杨扇舟蛾的病原体,属于杆状病毒科。ClanGV 对 3 龄以上幼虫致病力很高,是控制杨扇舟蛾大发生的重要因素,因此它可以被研制成为一种对杨扇舟蛾十分有效的生物杀虫剂。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用病毒为杨扇舟蛾颗粒体病毒(ClanGV)的湖北分离株(IVCAS1.0031),该病毒由中国

科学院武汉病毒研究所普通病毒保藏中心提供。杨扇舟蛾幼虫采自湖北嘉鱼一农场。

菌种 DH5 α 本实验室保存。培养基、各种杂交缓冲液及碱解液:LB 液体培养基和固体培养基, SOC 液体培养基以及各种缓冲液的配方参见文献^[8]。

溶菌酶、*Taq* 酶、限制性内切酶、 λ DNA/*Eco*T14 分子量标准均购自 TaKaRa;T 载体购自 Promega;蛋白酶 K 购自 Merk 公司;柱离心式胶回收试剂盒为上海化舜生物工程公司产品;NC 膜购自 Amersham;耦合了碱性磷酸酶的链亲合素购自 Calbiochem;碱性磷酸酶反应底物 NBT 购自 Duchefa。

1.2 病毒的增殖与核酸的制备

参照常规方法进行^[9]。

1.3 颗粒体蛋白基因的扩增和测序

根据已知颗粒体基因的同源比较结果设计引物。引物 1: 5'-GAGGTATAGCCGACACGA-3';引物 2: 5'-TYARTANGCBGGDCCNGT-3',其中 Y=C 或 T, R=A 或 G, N=A 或 T 或 G 或 C, B=A 或 T 或 C, D=A 或 T 或 G。扩增结果与 T 载体连接,转化 DH5 α 。对阳性克隆子进行测序。

1.4 颗粒体蛋白的提取与抗体的制备

蛋白提取主要参照 Bell^[10] 和 Tweenen 的方法^[11]。取颗粒体蛋白与等体积费氏完全佐剂乳化,多点注射家兔皮下和淋巴结。三周后进行加强免疫。再每隔一周加强免疫一次,共两次。取血清检测抗体效价,最后取全兔血,静置分离血清,-20℃ 保存备用。

1.5 Western-blot 检测

将提取的包涵体蛋白进行 SDS-PAGE,然后转膜到硝酸纤维素膜进行 Western-blot 检测。其中一抗为抗 ClanGV 颗粒体蛋白的兔抗血清,二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG。NBT 为碱性磷酸酶的反应底物。杂交方法参照文献^[8]。

1.6 序列分析

所测得的序列应用 DNAClub 和 DNASTar 软件包进行序列分析。用 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), Clustal W 和 Tree View 软件进行基因的排列、同源与进化分析。

2 结果与讨论

2.1 颗粒体蛋白的 SDS-PAGE 检测

将提取的 ClanGV 的颗粒体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,结果如图 1 所示,ClanGV 的颗粒体蛋白大小约为 30kDa。

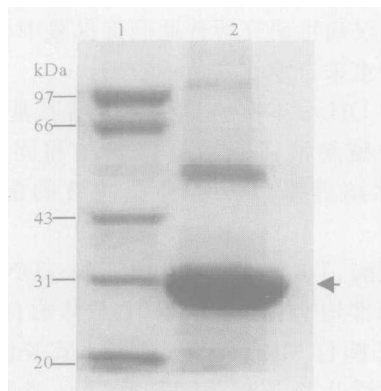


图1 ClanGV 颗粒体蛋白的 SDS-PAGE 电泳照片

Fig. 1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of ClanGV proteins

Granules were purified from infected larvae as described in the text and run on a 12% polyacrylamide gel. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, major occlusion body protein of ClanGV.

2.2 颗粒体蛋白的免疫杂交分析

将提取的 ClanGV、CaLGV、SeNPV 和 HaNPV 的包涵体蛋白进行 SDS-PAGE, 转膜到硝酸纤维素膜后, 进行 Western-blot 检测。经过杂交后可以看到, 在阳性对照的 ClanGV 泳道有一条明显的特异性杂交带, 大小约为 30kDa; 在 CaLGV 泳道也有一条明显的杂交带, 大小与提取的 CaLGV 颗粒体蛋白大小相近, 另外在 HaNPV 泳道中可以看到一条非常清晰的杂交带, 而在 SeNPV 相应多角体的电泳位置却只发现有一条非常微弱的杂交带(图2)。基于包涵体蛋白的免疫杂交分析表明, ClanGV 与 HaNPV 有较近的血清学关系, 而与 SeNPV 几乎无血清学反应。

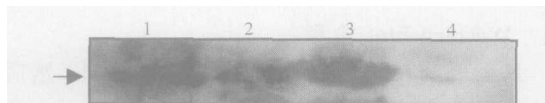


图2 ClanGV 颗粒体蛋白抗体的 Western-blot 杂交分析

Fig. 2 Western-blot analysis of ClanGV granulin

1, the granulin of ClanGV; 2, the granulin of CaLGV; 3, the polyhedron of HaNPV; 4, the polyhedron of SeNPV. The arrow indicated the granulin of ClanGV.

2.3 *gra* 基因的序列测定与分析

利用所设计引物进行 PCR, 电泳检测发现有目标带的出现(图略)。将回收的电泳结果与 T 载体连接后, 转化大肠杆菌, 酶切电泳检测阳性克隆子(图略)。对重组子的测序及分析结果表明, ClanGV 的 *gra* 基因开放阅读框(ORF)全长 747bp, 共编码 248 个 aa, 预计编码的蛋白质大小为 29.3kDa。分析 ClanGV *gra* 基因的启动子序列, 结果显示在起始密码子 ATG 上游-24 bp 处, 有一个杆状病毒晚期启动子序列-ATAAG。有两个 TATA 框, 分别

位于 ATG 上游的-26bp 和-65bp。该基因的 GenBank 登录号为: AY993940。将不同来源的 20 个杆状病毒的包涵体基因启动子区进行排列比较(其中包括 12 个 *gra* 和 8 个 *pol*), 结果显示所有的 GV 都拥有一个包含晚期启动子序列在内的 8 bp 的保守基序(TATAAGGA), 此保守序列与起始密码子 ATG 相距 22-31 bp, 而 NPV 不具有此保守序列。

将推测的 ClanGV 颗粒体蛋白的氨基酸序列与其它 13 个杆状病毒包涵体蛋白的氨基酸序列(其中包括 8 个 *gra* 和 6 个 *pol*)进行了同源性比较分析, 结果显示, 杆状病毒的包涵体基因同源性较高(52%~96%), 其中 NPV 和 GV 各内部成员间的同源性很高, NPV 和 GV 成员间的同源性相对较低。ClanGV 与 GV 家族成员间的同源性很高, 为 84%~95%; ClanGV 与 NPV 家族成员间的同源性较低, 为 54%~56%。其中 ClanGV 与 AoGV、CpGV、CfGV 和 PoGV 的同源性大于 90%(分别为 95%、93%、93%、92%), 而与黄地老虎颗粒体病毒(*Agrotis segetum* GV, AsGV)、*Xestia c-nigrum* GV, XcGV 和小菜蛾颗粒体病毒(*Plutella xylostella* GV, PxGV)的同源性稍低, 分别为 88%、86% 和 84%。序列比较表明, 在多角体蛋白氨基酸序列中, 普遍存在一个核定位信号, KRKK, 一般位于氨基酸的 N 末端^[12,13]。本研究结果显示, *Orgyia pseudotsugata* NPV, OpNPV, 油桐尺蠖核多角体病毒(*Buzura suppressaria* NPV, BsNPV), 家蚕核多角体病毒(*Bombyx mori* NPV, BmNPV) 和 HaNPV 的多角体蛋白在 N 端有一个典型的核定位信号, KRKK, 而在所有的颗粒体蛋白中, 没有此基序结构(图3)。

根据 14 种的包涵体氨基酸序列, 我们构建了无根系统发育树。从图 4 中可以看出, 基于包涵体蛋白基因的进化树支持 NPV 和 GV 的分离。并且在 GV 组中, ClanGV, AoGV, CfGV, CpGV 和 PoGV 形成了一个进化分支, AsGV, XcGV 和 PxGV 没有明显的归属于某一亚组。

根据同源性比较和进化树分析结果, 可以看出 ClanGV 和 CfGV, CpGV, AoGV, PoGV 的亲缘关系较近, 而与 AsGV, XcGV 和 PxGV 的亲缘关系较远。由于颗粒体病毒的相关基因有限, AsGV, XcGV 和 PxGV 的颗粒体病毒没有典型的分支出现, 因此需要更多的基因序列才能对颗粒体病毒进行精确的分类。

ClanGV: YGYNKSLR-YSRHE-ETTCVTDNHHLNLSGSLVNDVRRKDRIRDAEYEPILIIADQYMYVEDPFRGPGGNVRITLFKEIRRVCPDTMKLV
 AoGV: YGYNKSLR-YSRHE-ETTCVTDNHHLNLSGSLVNDVRRKDRIRDAEYEPILIIADQYMYVEDPFRGPGGNVRITLFKEIRRVCPDTMKLV
 CpGV: YGYNKSLR-YSRHDE-ETTCVTDNHHLNLSGSLVNDVRRKDRIRDAEYEPILIIADQYMYVEDPFRGPGGNVRITLFKEIRRVCPDTMKLV
 CfGV: YGYNKSLR-YSRHDE-ETTCVTDNHHLNLSGSLVNDVRRKDRIRDAEYEPILIIADQYMYVEDPFRGPGGNVRITLFKEIRRVCPDTMKLV
 PoGV: YGYNKSLR-YSRHDE-ETTCVTDNHHLNLSGSLVNDVRRKDRIRDAEYEPILIIADQYMYVEDPFRGPGGNVRITLFKEIRRVCPDTMKLV
 AsGV: YGYNKSLR-YSRHDE-ETTCVTDNHHLNLSGSLVNDVRRKDRIRDAEYEPILIIADQYMYVEDPFRGPGGNVRITLFKEIRRVCPDTMKLV
 XcGV: YGYNKSLR-YSRHDE-ETTCVTDNHHLNLSGSLVNDVRRKDRIRDAEYEPILIIADQYMYVEDPFRGPGGNVRITLFKEIRRVCPDTMKLV
 PxGV: YGYNKSLR-YSRHDE-ETTCVTDNHHLNLSGSLVNDVRRKDRIRDAEYEPILIIADQYMYVEDPFRGPGGNVRITLFKEIRRVCPDTMKLV
 OpNPV: -MPDY-ETTCVTDNHHLNLSGSLVNDVRRKDRIRDAEYEPILIIADQYMYVEDPFRGPGGNVRITLFKEIRRVCPDTMKLV
 BsNPV: -YTRY-ETTCVTDNHHLNLSGSLVNDVRRKDRIRDAEYEPILIIADQYMYVEDPFRGPGGNVRITLFKEIRRVCPDTMKLV
 BmNPV: -MPDY-ETTCVTDNHHLNLSGSLVNDVRRKDRIRDAEYEPILIIADQYMYVEDPFRGPGGNVRITLFKEIRRVCPDTMKLV
 HaNPV: -YTRY-ETTCVTDNHHLNLSGSLVNDVRRKDRIRDAEYEPILIIADQYMYVEDPFRGPGGNVRITLFKEIRRVCPDTMKLV
 SINPV: -YTRY-ETTCVTDNHHLNLSGSLVNDVRRKDRIRDAEYEPILIIADQYMYVEDPFRGPGGNVRITLFKEIRRVCPDTMKLV
 AhNPV: -YTRY-ETTCVTDNHHLNLSGSLVNDVRRKDRIRDAEYEPILIIADQYMYVEDPFRGPGGNVRITLFKEIRRVCPDTMKLV

图3 14种包涵体蛋白的氨基酸序列同源性分析

Fig. 3 Amino acid alignment of 14 occlusion body proteins

The typical nuclei signal KRKK was indicated with astisks. The shading levels were set at 100% and 80%. *Adoxophyes orana* GV, AoGV (NC_005038); *Cydia pomonella* GV, CpGV (NC_002816); *Choristoneura fumiferana* GV, CfGV (AF439352); *Phthorimaea operculella* GV, PoGV (NC_004062); *Agrotis segetum* GV, AsGV (NC_005839); *Xestia c-nigrum* GV, XcGV (NC_002331); *Plutella xylostella* GV, PxGV (NC_002593); *Orgyia pseudotsugata* NPV, OpNPV (NC_001875); *Buzura suppressaria* NPV, BsNPV (X70844); *Bombyx mori* NPV, BmNPV (NC_001962); *Helicoverpa armigera* NPV, HaNPV (NC_002654); *Spodoptera littoralis* NPV, SINPV (NC_003102); *Adoxophyes honmai* NPV, AhNPV (NC_004690).

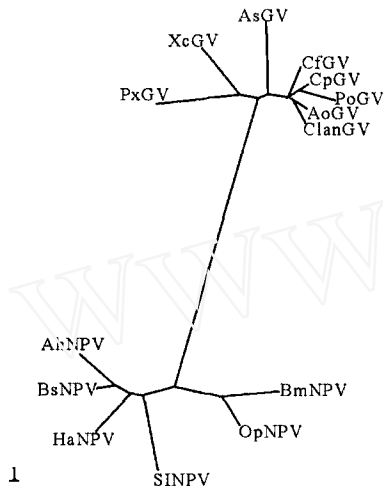


图4 根据14种杆状病毒包涵体蛋白的氨基酸序列构建的无根进化树

Fig. 4 The unrooted phylogenetic tree of baculoviruses based on the amino acid sequences from baculoviral occlusion body

Unrooted tree was generated with the help of Tree view program. The virus full names were given in Fig. 3.

参考文献

- [1] Volkman L E, Summers M D. Autographa californica nuclear polyhedrosis virus; comparative infectivity of the occluded, alkali-liberated and non occluded forms [J]. J Invertebr Pathol, 1997,30:102-103.
- [2] Je T H, Jin B R, Park H W, et al. Baculovirus expression vectors that incorporate the foreign protein into viral occlusion bodies [J]. Biotechniques, 2003,34:81-87.

- [3] O'Reilly D R, Miller L K, Luchow V A. Baculovirus expression vectors-A laboratory manual [M]. New York: Oxford University Press, 1992.
- [4] Ji P, Wang W B, He J L, et al. Infectivity of Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus containing heterologous polyhedron [M]. Proceedings Vectors and CISC, 2000. 174-177.
- [5] Vlak M, Rohrmann, The nature of polyhedron. In "Viral Insecticides for Biological control" [M]. Orlando: Academic Press, 1985. 489-544.
- [6] Kang S K, Je Y H, Jin B R, et al. Recombinant baculovirus, construction method thereof and insect pesticidal composition containing the same [P]. US,6338846,1998.
- [7] Taha A, Nour-El-Din A, Croizier L, et al. Comparative analysis of the granulin regions of the *Phthorimaea poerculella* and *Spodoptera littoralis* granuloviruses [J]. Virus Genes, 2000, 21:147-155.
- [8] 金冬雁. 分子克隆实验指南[M]. 第二版,北京:科学出版社, 1992.
- [9] 张小霞,梁振普,张忠信,等.棉铃虫核多角体病毒进化保守性基因 *iap2* 基因表达载体的构建及表达[J]. 昆虫知识, 2003, 40:35-39.
- [10] Bell C D, Orlob G B, Serological studies on virions and polyhedron protein of a nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* [J]. Virology, 1977,78:162-172.
- [11] Tweeten K A, Bulla L A Jr, Consigli R A. Structural polypeptides of the granulosis virus of *Trichoplusia ni* [J]. J Virol, 1980,33: 877-886.
- [12] 陈新文,胡志红. 棉铃虫核多角体病毒多角体蛋白的序列分析[J]. 中国病毒学, 1997,12:346-353.
- [13] 王根,张传溪,贡成良,等. 棉铃虫核多角体病毒多角体蛋白基因的克隆和核苷酸序列分析[J]. 病毒学报, 1997,13: 83-87.