

HaSNPV 的 9 个基因的转录谱分析*

代文涛^{1,2}, 邓菲¹, 王华林¹, 袁丽¹, 胡志红^{1**}

(1. 中国科学院武汉病毒研究所, 病毒学国家重点实验室, 中国科学院分子病毒学重点实验室, 无脊椎动物病毒学联合
开放实验室, 湖北武汉 430071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

The Transcription Profiles of Nine HaSNPV Genes

DAI Wen-tao^{1,2}, DENG Fei¹, WANG Hua-lin¹, YUAN Li¹, HU Zhi-hong^{1**}

(1. State Key Laboratory of Virology, Key Laboratory of Molecular Virology, and Joint-Laboratory of Invertebrate Virology, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The transcription profiles of nine selected HaSNPV genes, e.g. early phase genes, early and late phase genes, late phase genes and very late phase genes were analyzed using reverse transcription and real-time quantitative PCR. The results indicated that for most of these genes the transcriptional start point was coincident with the prediction of their promoter. But the predicted early phase gene *pkip* started to be transcribed at late phase, and the predicted early and late phase gene *ha107* was only transcribed at late phase. At 72hpi, the transcription level of these genes was generally the highest. The transcription level of *polyhedrin* was obviously higher than the other genes. The *iap2* was the second highly transcribed gene, indicating that it might be functional. The HaSNPV *p10*, unlike its homologue in AcMNPV, was not highly transcribed.

Key words: HaSNPV ; Real-time quantitative PCR ; Transcription profile

摘要: 使用反转录和实时荧光定量 PCR 技术, 我们对 HaSNPV 的几个预期的早期基因、早晚期基因、晚期基因、极晚期基因的转录时相进行分析, 结果表明: 这些基因的起始转录时间与其自身的启动子类型基本是一致的。但是预期的早期基因 *pkip* 晚期才开始转录; 预期的早晚期基因 *ha107* 早期不转录, 仅在晚期转录。这些基因的转录水平一般都在病毒感染细胞 72 h 后达到最高, 并且极晚期基因 *polyhedrin* 的转录水平明显高于其它基因。*iap2* 的转录水平仅次于 *polyhedrin*, 表明它可能是一个功能基因。与 AcMNPV 的 *p10* 不同, 在 HaSNPV/HzAM1 系统中 *p10* 的转录水平并不高。

关键词: HaSNPV ; 实时荧光定量 PCR ; 转录谱

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0047-05

传统的基因转录时相分析方法一般采用反转录 PCR, 通过观察比较每个时相点的 RT-PCR 扩增产物的溴乙锭染色强度来判断基因的转录水平及描绘基因的转录趋势。我们知道, 在进行 PCR 实验时, 即使是重复实验, 各种条件包括起始模板量都一致, 最后得到的 DNA 拷贝数也不会完全一样,

波动较大。一般的定量方法, 如溴乙锭染色的光密度扫描等, 测定的都是 PCR 的终产物, 而不是起始 DNA 拷贝数。因此, 根据最终的 PCR 产物来研究基因的转录时相并不合理, 有时得出的实验结果甚至是与真实情况相反的。

研究基因转录的另外一种方法为 Northern 杂

收稿日期: 2005-06-15, 修回日期: 2005-11-16

作者简介: 代文涛 (1979-), 男, 湖北天门籍, 硕士研究生, 研究方向为分子病毒学。

* 基金项目: 973 项目资助 (2003CB114202); 中荷战略联盟计划资助 (2004CB720404.04-PSA-BD-02); 国家自然科学基金资助 (30025003); 中国科学院知识创新工程项目资助 (Kscx2-1-02, kscx2-SW-301-09); 863 项目 (2003AA214050) 资助。

** 通讯作者: Corresponding author. Tel: 027-87197180, E-mail: huzh@pentium.whiov.ac.cn

交。它在 RNA 水平上直接定量,由于没有进行 PCR 扩增,其结果最真实的反应了基因的转录谱。但是由于在灵敏度上的限制,可能使转录表达量极其微弱的某些时相点不能被检测到,造成一种假象。另外,Northern blot 操作起来比较繁琐,让人望而却步。

最近几年兴起的基因芯片技术也可用于转录谱的研究^[1]。它的优点在于高通量,可以同时研究成千上万个基因的转录谱。由于它是通过检测 cDNA 的量来反应 mRNA 的转录表达水平,同样存在灵敏度的限制。并且其花费昂贵,一般的研究者难以承受。同时在实验过程中容易产生误差,其结果往往需要得到进一步的荧光定量 PCR 实验的验证。

实时荧光定量 PCR 技术具有灵敏度高,结果可靠,操作方便等优点^[2],是研究基因转录谱的一种行之有效的办法。棉铃虫核型多角体病毒(*Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus,简称 HaSNPV 或 HearNPV)对棉铃虫有很好的防治效果,在我国已有多年的应用^[3]。近年来,本实验室完成了 HaSNPV 的全序列测定^[4],并对 *lef-2*^[5]、*p6.9*^[6]、*p10*^[7,8]、*ha122*^[9]、*ha94*^[10]、*chitinase*^[11]、*fp25*^[12]等多个基因开展了功能研究。本实验拟采用实时荧光定量 PCR 技术,选择性地开展 HaSNPV 感染 HzAM1 细胞后的早期基因、早晚期基因、晚期基因、极晚期基因的转录谱研究,为今后全面开展基因组转录图谱的研究奠定基础,也为深入了解这些基因的功能积累数据。

1 材料与方法

1.1 病毒与细胞

实验所采用的病毒为 HaSNPV 的野生型虫体克隆株 G4 株(HaSNPV G4),美洲棉铃虫细胞系 HzAm1 来源于美洲棉铃虫蛹期卵巢管组织^[13],在含有 10%FBS 的 Grace's 培养基中培养。病毒的滴度由终点稀释法^[14]测定为 2×10^7 PFU/mL。

1.2 病毒基因的启动子类型分析

对基因起始密码子 ATG 上游 300bp 的 DNA 序列进行分析,查找其中是否含有早期启动子 TATA 元件、早期启动子 CAGT 元件、晚期启动子 TAAG 元件^[15]。如果基因上游仅含有早期启动子元件,被定义为早期基因;如果含有晚期启动子,定义为晚期基因。如果同时含有早期启动子 CAGT 元件与晚期启动子元件,这类基因就被定义为早晚期基因。根据其它杆状病毒的研究,*p10* 基因和 *polyhedrin* 基因被定义为极晚期基因^[16,17]。

1.3 细胞中总 RNA 的提取

经细胞计数, 2.4×10^5 个细胞以 5 moi (感染复数)进行病毒感染。在病毒感染细胞后的特定时间点,分别收取细胞。用 TRIzol (Omega)试剂从被病毒感染的 HzAm1 细胞中提取总 RNA,具体步骤依照厂家使用说明书进行。

1.4 反转录合成 cDNA

反转录用 3'-full RACE core set (TaKaRa) 试剂盒完成,具体步骤依照厂家说明书进行。提取感染后不同时相的感染细胞总 RNA,最后溶于 20 μ L 经 DEPC 处理过的纯水,取 10 μ L 在 AMV 逆转录酶的作用下置于 50 温浴一小时,以带 anchor 的 oligo (dT) 引物进行 cDNA 的合成。所合成的 cDNA 用于实时荧光定量 PCR 的模板。

1.5 实时荧光定量 PCR

使用 Opticon 实时荧光定量系统(MJ Research 公司)进行定量分析。荧光染料为 SYBR Green I,它是一种双链 DNA 结合染料,与双链 DNA 结合后,其荧光值大大增强,因此在一个体系内,其信号强度代表了双链 DNA 分子的数量。反应体系为:5 μ L 10 \times buffer,1 μ L 20 μ mol/L 正向引物,1 μ L 20 μ mol/L 反向引物(anchor),1 μ L 10m mol/L dNTPs,1.5 μ L 20 \times SYBR Green I 荧光染料,0.5 μ L Taq 酶,1 μ L cDNA 模板,加纯水至总体积 50 μ L。各个基因的循环条件因其引物及扩增片段长度不同而在在退火温度和延伸时间上有所不同。PCR 引物序列如下:*dnapol*, 5'-TAACGAGTTAATCGAAGTG-3', 扩增产物 372bp;*pkip*, 5'-CTACACACACACACAC GTTCGCAAT-3', 扩增产物 580bp;*iap3*, 5'-AGGCA AAGATTCGTGCAGAC-3', 扩增产物 294bp;*fp25*, 5'-ACTCGTGACGCCCTATTACCG-3', 扩增产物 350bp;*ha107*, 5'-GTTGCCCACTCGCGACA TAAG-3', 扩增产物 550bp;*iap2*, 5'-AAAATATGTT TCGACCAGTCAC-3', 扩增产物 200bp;*ha66*, 5'-AGGCGTCTCCTAAAACCTT-3', 扩增产物 340bp;*polh*, 5'-GGCGGACCCACGGTTATATGACATTTC CTA-3', 扩增产物 1000bp;*p10*, 5'-GGGAATTCTA CGACGAAATAATCATGGCA-3', 扩增产物 300bp。

标准曲线的制定:每个基因都有它自己相应的标准曲线。常规 PCR 反应(不加入荧光染料 SYBR Green I,其余条件与上同)的目的扩增片段经回收纯化、紫外分光光度计定量后计算其浓度,然后连续 10 倍稀释,得到 10 倍系列稀释液,以此作为模板建立标准曲线。将不同时间点样本的实时荧光定量 PCR 结果用软件 Opticon Monitor 进行分析,阈值设为 0.01,由此得出相应的 Ct (Cycle

Threshold) 值。再根据已建立的标准曲线计算得出最终结果。

2 结果

2.1 HaSNPV 的 9 个基因的启动子分析

我们选择分析了 HaSNPV 的 9 个基因的启动子。表 1 显示这 9 个基因的一些基本特征。根据这些基因的启动子类型对这些基因的类型进行预测, 包括早期基因 *dnapol*、*pkip*, 早晚期基因 *iap3*、*fp25*、*ha107*, 晚期基因 *iap2*、*ha66*, 极晚期基因 *polyhedrin*、*p10*。

表 1 HaSNPV 9 个基因启动子的基本特征
Table 1 The basic characters of the promoters of nine HaSNPV genes

Gene	Gene length (bp)	Promoter	TATA element	CAGT element	TAAG element	Predicted gene function
<i>dnapol</i>	3063	E	+	+	-	DNA polymerase
<i>pkip</i>	510	E	+	-	-	Interact with protein kinase
<i>iap3</i>	807	E / L	+	+	+	Inhibitor of host cells apoptosis
<i>Fp25</i>	654	E / L	+	+	+	Mediate the transition of BV to ODV formation
<i>ha107</i>	1374	E / L	+	+	+	Unknown
<i>iap2</i>	753	L	+	-	+	Inhibitor of apoptosis
<i>ha66</i>	2358	L	-	-	+	unknown
<i>polh</i>	738	VL	+	-	+	Polyhedrin
<i>P10</i>	264	VL	+	-	+	Correlate with cellular filament formation

E, E/L, L, VL indicated the early promoter, the early and late promoter, late promoter, very late promoter, respectively.

2.2 HaSNPV 9 个基因的转录谱分析

图 1 所示为病毒感染细胞后不同时间点各基因的 PCR 扩增产物的常规电泳分析结果。

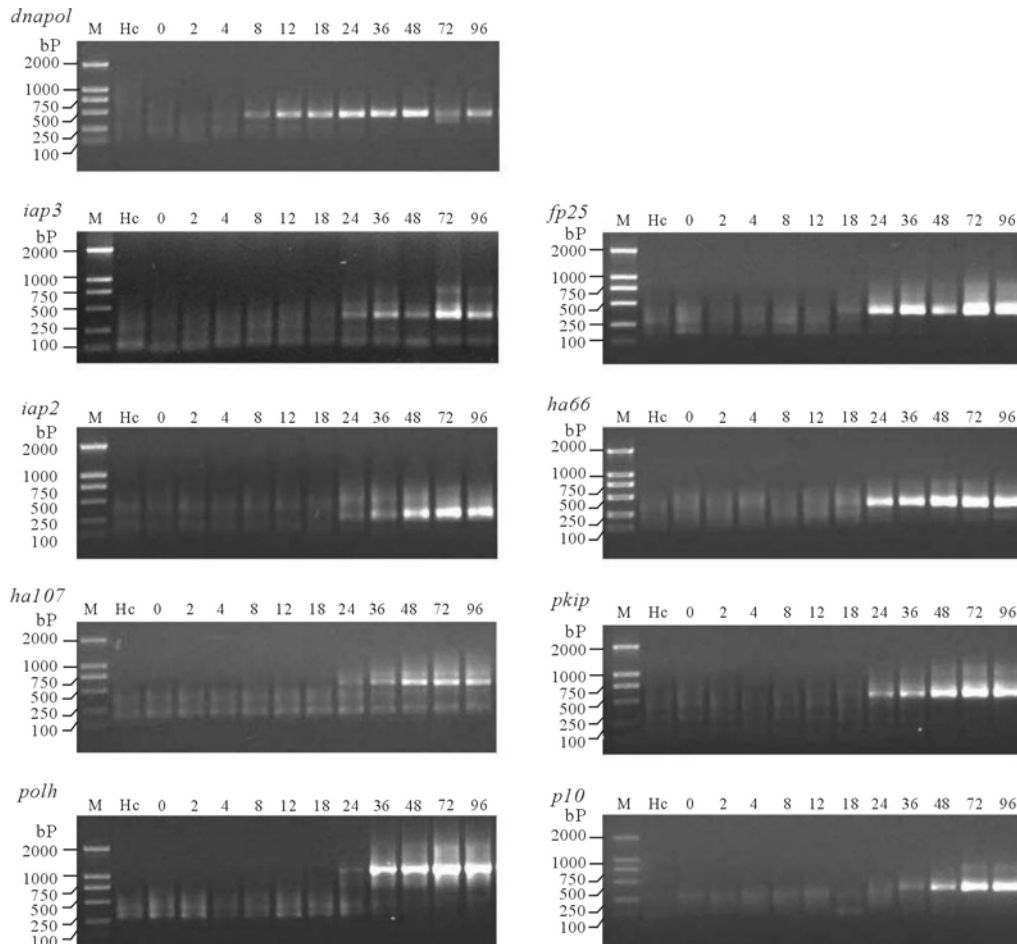


图 1 9 个基因的转录谱的常规电泳分析

Fig 1 General gel analysis of transcription profile of nine HaSNPV genes

DNA Marker (M): DL2000. The health HzAm1 cells (Hc) were used as negative control. The PCR product length of nine HaSNPV genes were listed in Table 1.

我们使用实时荧光定量 PCR 技术对上述 9 基因的转录谱进行精确的定量, 得到在感染后不同时间点样本中被检基因在每个细胞中的平均转录出的 mRNA 的绝对拷贝数。根据这些数据作出 9 个基因的转录谱图 (图 2)。

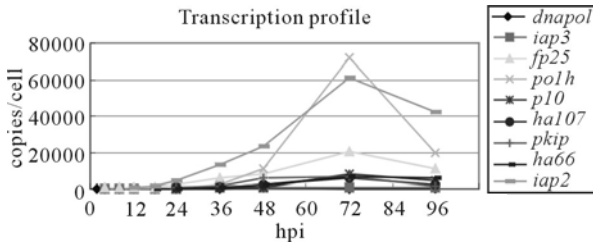


图 2 HaSNPV 的 9 个基因的转录谱

Fig 2 The transcription profiles of nine HaSNPV genes

从图 2 中可以看出预期的早期基因 *dnapol* 从感染后 2h 就开始有转录, 随后转录量逐渐升高, 在 48h 其转录水平达到最高, 之后下降很快; *dnapol* 的转录量在感染的整个过程中都非常小。另外预测的早期基因 *pkip* 在感染早期并没有表达, 而是在感染后 24h 才开始转录。由于 HaSNPV 在 HzAm1 上的复制从感染后 7h 开始^[18], 因此, *pkip* 实际上为晚期基因。

三个预测的早晚期基因中的两个, *iap3*、*fp25* 从感染后 4h 开始转录, 在 72h 其转录量都达到最高。而另一个预测的早晚期基因 *ha107* 只在晚期才开始转录, 其早期启动子没起作用。

二个预测的晚期基因 *iap2*、*ha66* 和晚期基因 *ha107* 分别从 12h、18h、24h 开始转录, 其转录量都是在 72h 达到最大值。特别值得一提的是, *iap2* 的转录水平很高, 几乎与极晚期基因 *polyhedrin* 的转录水平持平。

两个极晚期基因 *polyhedrin*、*p10* 都在感染后 24h 开始转录, 也是在 72h 其转录量达到最大值。并且 *polyhedrin* 的转录水平明显的高于其它基因 (图 2); 相反 *p10* 的转录在整体水平来看并不高, 与它的同源基因在 AcMNPV/Af 细胞系统中高表达的情况不同^[19]。

图 3 所示为除去三个转录水平高的基因 *polyhedrin*、*iap2*、*fp25* 之后, 其它几个基因的转录谱。从中可以看出 *p10*、*ha107*、*ha66* 这三个基因的转录谱很相似, 都在 48h 开始明显增高, 在 72h 达到高峰, 在 96h 显著降低。*pkip* 基因则在 48h 就接近转录高峰, 至 72h 后才开始下降。*iap3* 和 *dnapol* 在感染的全程中转录水平一直不高。

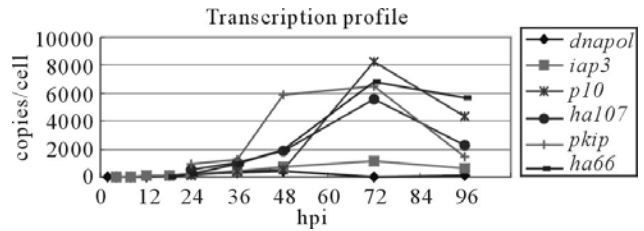


图 3 HaSNPV 几个转录水平较小的基因的转录谱

Fig.3 The transcription profile of several low level HaSNPV genes

3 讨论

早期基因 *dnapol* 在 48hpi 其转录水平达到最大值, 之后很快下降, 转录量非常之小。这是因为在 48h 之后病毒的复制活动不再活跃。这与关于 HaSNPV 复制动力学分析的结果相一致: 病毒在感染后 14~20h 这个时间段复制最为活跃, 随后开始慢慢下降, 60h 之后, 病毒复制几乎停止^[18]。

图 2 显示, 除 *dnapol* 之外, 这些基因都在感染后 72 小时它们的转录水平达到最高。极晚期基因 *polyhedrin* 的转录水平明显高于其它基因, 这也是杆状病毒的基本特征之一, *polyhedrin* 的高水平转录为极晚期病毒在细胞内形成大量多角体所必需。

iap2、*iap3* 是两个与凋亡相关的基因, 据文献报导, 在杆状病毒 HycuNPV 感染宿主细胞的过程中, 主要是由 IAP3 来抑制凋亡, 而 IAP2 在抑制凋亡方面却没有作用^[20]。在本研究中晚期基因 *iap2* 的转录水平很高, 几乎与极晚期基因 *polyhedrin* 的转录水平持平, 可以推测 *iap2* 很可能是一个功能基因。由于病毒抑制细胞凋亡是全程的, 因此在感染的早期与晚期都需要表达与抑制凋亡相关的调节蛋白。而早晚期基因 *iap3* 在感染早期 4h 就开始转录, 在感染的全程中都有转录, 但其转录水平不高。这两个基因在 HaSNPV 对 HzAm1 细胞的感染过程中所起的作用可能不同, 其功能有待深入研究。

本研究表明, HaSNPV 基因的转录时相与启动子的预期并不一定完全相符。例如 *pkip* 按启动子类型推测为早期基因, 而结果显示为晚期基因; *ha107* 按启动子推测为早晚期基因, 而结果显示为晚期基因。这说明 HaSNPV 的启动子系统还有待深入研究。

另外, HaSNPV 的 *p10* 基因并不像 AcMNPV 的 *p10* 基因那样有高表达; 相反, HaSNPV 的 *iap2* 转录水平很高, 几乎达到多角体蛋白的转录水平。这些都表明 HaSNPV 的基因组转录可能与杆状病毒的代表种 AcMNPV 有较大的不同。

References

- [1] Yamagishi J, Isobe R, Takebuchi T, *et al.* DNA microarrays of baculovirus genomes: differential expression of viral genes in two susceptible insect cell lines[J]. *Arch Virol*, 2003, 148:587-597.
- [2] Heid C A, Stevens J, Livak K J, *et al.* Real time quantitative PCR[J]. *Genome Res*, 1996, 6:986-94.
- [3] Zhang G(张光裕). Research, development and application of *Heliothis* viral pesticide in China [J]. *Resour Environ Yangtze Basin(长江流域资源与环境)*, 1994, 3 : 1-6.
- [4] Chen X, Ijkel W F J, Tarchini R, *et al.* The sequence of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82:241-257.
- [5] Chen X, Ijkel W F J, Dominy C, *et al.* Identification, sequence analysis and phylogeny of the *lef-2* gene of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid baculovirus[J]. *Virus Res*, 1999, 65:21-32.
- [6] Wang H, Chen X, 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.
- [7] Wang H, Chen X(王华林, 陈新文), Vlcek J M, *et al.* Sequence and transcriptional analysis of the *p10* gene of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus [J]. *Chin J Virol(病毒学报)*, 2001, 17 : 81-86.
- [8] Dong C, Li D, Long G, *et al.* Identification of functional domains of *HearNPV P10* for filament formation[J]. *Virology*, 2005, 338:112- 120.
- [9] Long G, Chen X, Peters D, *et al.* Open reading frame 122 of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus encodes a novel structural protein of occlusion-derived virions[J]. *J Gen Virol*, 2003, 84:115-121.
- [10] Fang M, Wang H, Wang H, *et al.* The open reading frame 94 of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus encodes a novel occlusion-derived virion protein: ODV-EC43[J]. *J Gen Virol*, 2003, 84:3021-3027.
- [11] Wang H, Wu D, Deng F, *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of the chitinase gene from the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus[J]. *Virus Res*, 2004, 100: 179-189.
- [12] Wu D, Deng F, Sun X, *et al.* Functional analysis of FP25K of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus[J]. *J Gen Virol*, 2005, 86:2439-2444.
- [13] McIntosh A H, Ignoffo C M. Characterization of 5 cell lines established from species of *Heliothis*[J]. *Appl Entomol Zool*, 1983, 18: 262-269.
- [14] Knudson D L, Tinsley T W. Replication of a nuclear polyhedrosis virus in a continuous cell culture of *Spodoptera frugiperda*: purification, assay of infectivity, and growth characteristics of the virus[J]. *J Virol*, 1974, 14:934-944.
- [15] Peng J(彭建新). Molecular biology in baculovirus (杆状病毒分子生物学) [M]. Wuhan: Central China Normal University Press, 2002. 176-196.
- [16] Vanarsdall A L, Okano K, Rohrmann G F. Characterization of a baculovirus with a deletion of *vlf-1*[J]. *Virology*, 2004, 326:191-201.
- [17] Mistretta T A, Guarino L A. Transcriptional activity of baculovirus very late factor 1[J]. *J Virol*, 2005, 79:1958-1960.
- [18] Dai W(代文涛). The replication of HaSNPV in HzAm1 cells (HaSNPV 在 HzAm1 细胞中的复制研究)[D]. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2005.
- [19] Weyer U, Knight S, Possee R D. Analysis of very late gene expression by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and the further development of multiple expression vectors[J]. *J Gen Virol*, 1990, 71:1525-1534.
- [20] Ikeda M, Yanagimoto K, Kobayashi M. Identification and functional analysis of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus *iap* genes[J]. *Virology*, 2004, 321:359-371.