

SINPV 基因组酶切图谱及多角体基因的序列分析*

魏永杰 龙紫新 陈尚武 王珣章

(中山大学昆虫学研究所、生物防治国家重点实验室 广州 510275)

摘要 用限制性内切酶 *EcoRI*, *XbaI*, *XhoI*, *BamHI*, *Pst I*, *SacI*, *Hind III*, *SmaI* 酶解斜纹夜蛾核多角体病毒广州株基因组 DNA, 分别得到 26、26、24、20、13、17、9、1 条片段, 并算得基因组平均大小为 136.0kbp。以 AcNPV 多角体基因的部分读码框为探针, 经 Southern 杂交将 SINPV 多角体基因定位于 *XbaI* O 片段上, 将此片段克隆并序列分析, 结果表明 SINPV 的多角体基因位于 *XbaI* O 片段的 *XbaI*-*SalI* 0.8kbp 片段上, 其开放读码框为 750bp, 编码一 249aa 的蛋白质, 与 SpliNPV 相同, 为目前所发现的最长的多角体基因。SINPV 多角体蛋白 Mr = 29236, 其氨基酸序列与其它核多角体病毒的多角体蛋白氨基酸序列有高度的同源性。

关键词 斜纹夜蛾核型多角体病毒, 限制性内切酶图谱, 多角体基因

分类号 Q751 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-02-0088-92

RESTRICTION PATTERNS AND NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE POLYHEDRIN GENE OF *SPODOPTERA LITURA* NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS*

Wei Yongjie Long Qixin Chen Shangwu Wang Xunzhang

(Institute of Entomology & the State Key Laboratory for Biocontrol,

Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract Digestion of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus (SINPV Guangzhou isolate) with restriction endonucleases *EcoRI*, *XbaI*, *XhoI*, *BamHI*, *Pst I*, *SacI*, *HindIII* and *SmaI* resulted in 26, 26, 24, 20, 13, 17, 9 and 1 fragments, respectively. The average size of the genome is about 136.0Kbp. The polyhedrin gene of SINPV was located on the *XbaI* O fragments by southern hybridization method using a DIG labeled AcMNPV polyhedrin gene as probe. With a coding sequence of 780 nucleotides, corresponding to a protein of 249 amino acid, the polyhedrin gene of SINPV is the longest polyhedrin gene known to date together with the *Spodoptera littoralis* NPV polyhedrin gene. This gene codes for a putative protein with an Mr 29236 and the predicted amino acid sequence shows high homology with those of other NPVs.

Key words *Spodoptera litura* Nuclear Polyhedrosis Virus, Restriction endonuclease patterns, Polyhedrin gene

* 国家自然科学基金资助项目 (No.39730030) Project Granted Chinese National Sciencel Fund (No. 39730030)

注: 文中多角体基因序列已被 GenBank/EMBL 数据库收录, 收录号 (Accession Number) 为 AF037262

* The nucleotide sequence of polyhedrin gene of SINPV has been submitted to the GeneBank/EMBL Data libraries under the accession number AF 037262

1998-03-13 收稿, 1998-07-28 修回

斜纹夜蛾(*Spodoptera litura* F.)为鳞翅目夜蛾科的杂食性害虫,在我国长江以南为害严重。斜纹夜蛾核多角体病毒(*Spodoptera litura* Nuclear Polyhedrosis Virus, SINPV)属杆状病毒科核多角体病毒属的单核衣壳核多角体病毒亚属,能感染并致死斜纹夜蛾,对斜纹夜蛾具有良好的防治效果。同其它杆状病毒杀虫剂一样,野生 SINPV 亦存在杀虫速度缓慢的缺陷。近年来,利用基因工程手段构建重组杆状病毒株以加快杀虫速度的研究取得了较大进展^[1],而这些进展取决于对杆状病毒分子生物学,特别是多角体基因结构与功能的详尽了解。多角体基因为杆状病毒极晚期超量表达的非必需基因^[2],它是 NPV 基因工程表达载体系统外源基因最重要的插入区^[3],也是构建重组 NPV 杀虫剂时颇受重视的领域^[1]。开展 SINPV 分子生物学的研究,将有助于改造 SINPV,构建能快速、高效地杀死斜纹夜蛾的重组 SINPV 株。本研究利用 8 种限制性内切酶对 SINPV 基因组 DNA 进行酶切图谱分析,在此基础上计算出 SINPV 的平均分子量;通过核酸杂交技术定位及克隆了 SINPV 的多角体基因,并对此基因进行了序列分析。

1 材料和方法

1.1 病毒株系及多角体纯化

SINPV 广州株由本室分离并保存。用 PBS 缓冲液匀浆感染 SINPV 多角体的虫尸,经数轮差速离心得到较纯净的多角体。

1.2 NPV DNA 的制备

在多角体悬液中加入等体积溶液 1(100 mmol/L Na_2CO_3 , 100 mmol/L NaCl),室温放置 30 min 后 2000 r/min 离心 5 min。上清加等体积溶液 2(100 mmol/L Tris, 10 mmol/L EDTA, 2% SDS, 20 mmol/L β -巯基乙醇, 54% 蔗糖)45℃ 保温 30 min, 酚/氯仿抽提,乙醇沉淀后溶于 TE 缓冲液,置 4℃ 备用。

1.3 限制性内切酶来源及酶切片段大小计算

限制性内切酶 *Eco*RI, *Xba*I, *Xho*I, *Bam*HI,

*Pst*I, *Sac*I, *Hind*III, *Sma*I 购自 Promega 公司,高分子量 Marker 购自 GIBCO BRL 公司, *Spp*I DNA / *Eco*RI Marker 为北京天象人生物试剂公司产品。病毒基因组 DNA 经完全酶切后,在 0.7% 琼脂糖凝胶中充分展开酶切片段(图 1A)。对于较难分离的大片断,利用 0.5% 的凝胶电泳分离(图 1B),大小相同的片段通过亚克隆区分。电泳缓冲液为 $1 \times \text{TBE}$,电压为 35V(1V/cm),电泳时间 12~18h,电泳结束后用 EB 染色。利用 UVP Life Science 公司 UVP-8000 凝胶分析系统摄像,并扫描出各条带迁移距离。出 λ DNA / *Eco*RI + *Hind*III 片段、*Spp*I DNA / *Eco*RI 片段、高分子量 Marker 为标准,借助 DNASIZE 软件计算出各酶解片段分子量,并由此算出 SINPV 基因组大小。

1.4 多角体基因的定位

将基因组酶切并作电泳分离后,应用 Southern 转移方法,印迹到 NC 膜上,以本室保存的 AcNPV 的多角体基因的 *Kpn*I-*Sca*I (0.5 kbp) 片段为探针,用 Boehringer Mannheim Biochemica 的 DIG system 进行标记;同时也对 λ DNA / *Eco*RI + *Hind*III Marker, *Spp*I DNA / *Eco*RI Marker 进行标记。杂交参考 DIG system 说明书进行,杂交条件为 60℃ × 8h;洗膜条件为 55℃ × 30 min。

1.5 基因组片段的克隆及亚克隆

将杂交阳性片段 *Xba*I 3.0 kbp 的 O 片段克隆到载体质粒 pUC18 上,构建成重组质粒 pP18PH。具体方法参照〈Molecular Cloning〉^[4]操作手册进行。将 pP18PH 用 *Sal*I, *Hind*III, *Xba*I 单酶切及双酶切分析,构建出 *Xba*I O 片段的物理图谱,并分别将 *Xba*I-*Sal*I 0.8 kbp 片段、*Sal*I-*Hind*III 1.0 kbp, *Hind*III-*Xba*I 1.2 kbp 片段亚克隆到质粒 pUC18 上,得到重组质粒 pP18PH1、pP18PH2 和 pP18PH3。

1.6 DNA 序列测定及分析

参照美国 BIOCHEMICAL 公司 SEQUENCING KIT 操作手册,对 pP18PH1、pP18PH2 和 pP18PH3 上的克隆片段进行序列分析;用 DNASIS (V4.0) 软件分析所测得的序列。

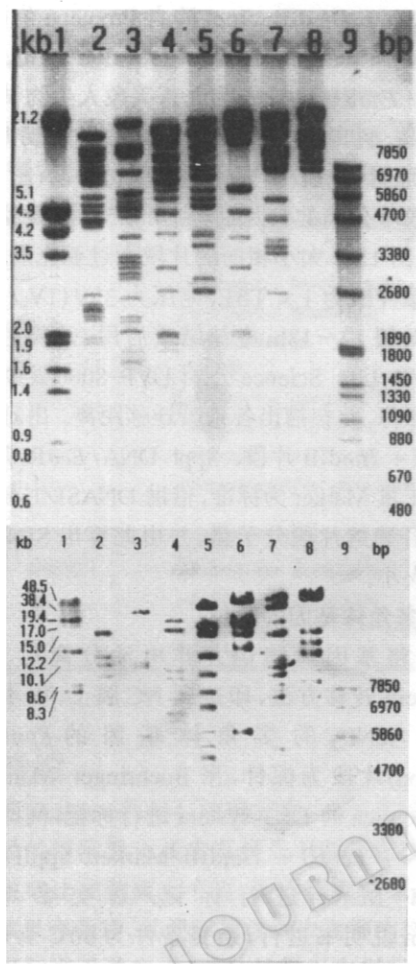


图 1 SINV 广州株的限制性内切酶酶切图谱

A 0.7% agarose 1.λDNA / *EcoRI* + *HindIII*, 2.*EcoRI*, 3.*XbaI*, 4. *XhoI*, 5.*BamHI*, 6.*PstI*, 7.*SacI*, 8.*HindIII*, 9.*SppI*DNA / *EcoRI* Marker

B 0.5% agarose 1.High molecular Marker, 2.*EcoRI*, 3.*XbaI*, 4. *XhoI*, 5.*BamHI*, 6.*PstI*, 7.*SacI*, 8.*HindIII*, 9.*SppI*DNA / *EcoRI* Marker

2 结果与讨论

2.1 SINV DNA 的限制性内切酶图谱

SINV 基因组 DNA 经 *EcoRI*, *XbaI*, *XhoI*, *BamHI*, *PstI*, *SacI*, *HindIII* 酶解后分别得到 26、26、24、20、13、17、9 条片段 (图 1), 而 *SmaI* 只有单一切点 (图未显示)。以 λDNA / *EcoRI* +

表1 SINV广州株的限制性内切酶酶切片(kbp)

	<i>EcoRI</i>	<i>XbaI</i>	<i>XhoI</i>	<i>BamHI</i>	<i>PstI</i>	<i>SacI</i>	<i>HindIII</i>
A	16.7	25.0	20.4	33.9	41.1	44.2	64.3
B	11.5	11.9	16.3	18.1	19.2	30.5	15.7
C	10.5	10.6	13.8*	15.0	19.2	18.1*	13.0
D	9.5	10.0	12.2*	11.5	15.0	15.0	11.5
E	8.5	7.5	11.5*	9.5	12.5	10.8*	11.5
F	8.1	7.5	9.8	8.1	6.2	10.3*	9.3*
G	7.4	6.1	9.0	7.2	6.2	9.8	8.7
H	7.0	5.6	7.8	6.9	4.9	9.2	7.5
I	6.9	5.3	7.5	6.2	4.1*	8.5*	2.3*
J	5.9	5.1	7.0	5.7	3.0	8.1*	
K	5.4	4.9	7.0	5.3	2.2	7.8	
L	5.1	4.0	6.6	5.3	2.0	5.5	
M	4.7	3.5	6.2	4.1*	1.9	4.5	
N	4.7	3.3	5.7	3.7		3.9*	
O	4.5	3.2	4.9	3.0		3.7	
P	3.6*	3.1	4.9	2.8		3.5	
Q	2.7	3.0	4.1	2.8		2.7	
R	2.5	2.6	3.2	1.4			
S	2.4	2.3	2.7	1.0			
T	2.4	2.2	2.1				
U	2.3	2.1	2.0				
V	2.2	2.1	1.9				
W	2.0	1.8	1.8				
X	1.9	1.7	1.2				
Y	1.7	1.7					
Z	1.1	1.0					

Number	26	26	24	20	13	17	9
--------	----	----	----	----	----	----	---

Totle 137.6 137.1 132.1 136.5 137.5 136.4 134.5

注: 标*号者为亚克分子带, 计算基因组大小时并没计算在内, 基因组平均大小为136.0kbp.

HindIII, *SppI* DNA / *EcoRI* 片段及高分子量 Marker 为分子量标准, 借助于 DNASIZE 软件, 算出各片段大小如表 1 所示。根据各酶解片段大小总和算出 SINV 基因组的平均大小为 136.0kbp。

目前已报道的 SINV 有广州株、武汉株、台湾株、印度株和日本株, 冯美珍等对武汉株 SINV 曾做过初步的酶切分析^[5]。将本研究结果与武汉株的作一比较, 发现二者基因组大小差别很大, 前者为 136.0kbp 而后者为 120.0Kb。

SINPV 武汉株 *Pst* I、*Hind*III 酶解片段分别为 12 条、7 条,而广州株的则为 13 条和 9 条,且各对应片段大小差异很大,表明不同株系的 SINPV 有较大差别。

电泳结果显示 SINPV 广州株的 *Eco*RIP 片段、*Bam*HIM 片段、*Xho*I C、D、E 片段、*Sac*I C、E、F、J、K、O 片段条带较弱,为亚克分子带 (Submolar fragment)。亚克分子带在各种核型多角体病毒中广泛存在^[6]。其原因可能是该株系本身包含几个基因型不同的变异株,而其中一种占较大的优势。本研究中 *Sac*I、*Xho*I 的亚克分子带条带多且较亮,而 *Eco*RI、*Pst* I 的少且弱,说明 SINPV 广州株中含几种变异株且变异株所占的比例较大;其中含 *Sac*I、*Xho*I 位点变异的变异株较多而含 *Eco*RI、*Pst* I 位点变异的变异株较少。为了获得纯化的病毒株系,今后有必要利用细胞培养及空斑技术纯化。

2.2 SINPV 多角体基因的定位,杂交片段的克隆与亚克隆

应用 Southern 杂交方法,以 DIG 标记的 AcNPV 多角体基因的开放读码框的 *Kpn*I-*Scal* 0.5kbp 片段为探针进行杂交,其中 *Eco*RI A、E、H、*Xba*I O、*Xho*I A、D、*Bam*HI B、*Pst* I A、*Sac*I K、*Hind*III H 片段有阳性杂交信号 (图 2)。为方便克隆,我们将 *Xba*I 3.0kbp 的 O 片段克隆到质粒 pUC18 上,构建成重组质粒 pP18PH。将 pP18PH 分别用 *Sal* I、*Hind*III、*Xba* I 单酶切及双酶切分析,构建出 *Xba* I O 片段的物理图谱 (图

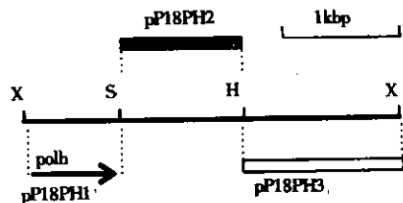


图3 *Xba*I O 片段的克隆与亚克隆

X、*Xba*I、S、*Sal*I、H、*Hind*III、*polh* 多角体基因

pP18PH1 含 *Xba*I-*Sal*I 0.8kbp 片段的亚克隆

pP18PH1 含 *Sal*I-*Hind*III 1.0kbp 片段的亚克隆

pP18PH1 含 *Xba*I-*Hind*III 1.2kbp 片段的亚克隆

3), 并分别将 *Xba*I-*Sal*I 0.8kbp 片段、*Sal*I-*Hind*III 1.0kbp、*Hind*III-*Xba*I 1.2kbp 片段亚克隆到质粒 pUC18 上,得到重组质粒 pP18PH1、pP18PH2 和 pP18PH3。

2.3 SINPV 多角体基因的序列分析

利用双链 DNA 测序方法分别对重组质粒 pP18PH1、pP18PH2 和 pP18PH3 上插入的外源片段进行序列分析。序列分析结果表明,pP18PH1 所插入的 *Xba*I-*Sal*I 片段上 815bp,内含有多角体基因完整的开放读码框 (open reading frame ORF)。该 ORF 长 750bp,编码一 249aa 的蛋白质,蛋白质 Mr = 29236 (图 4)。目前已报道的杆状病毒多角体基因中以 *Spodoptera littoralis* (Spli) NPV 多角体基因最长,为 750bp^[7]。因此,SINPV 多角体基因与 SpliNPV 多角体基因为目前所发现的最长的多角体基因。

比较 SINPV 与 *Autographa californica* (Ac) NPV 等 6 种核多角体病毒的多角体蛋白氨基酸序列^[8]的同源性,结果表明,SINPV 与其它各核多角体病毒的多角体蛋白氨基酸序列高度同源。其中,与 SpliNPV 的多角体蛋白氨基酸序列同源性最高,达 100%。因此,本研究也进一步证明 SINPV 与 SpliNPV 有很近的亲缘关系^[9]。SINPV 与其它各核多角体病毒的多角体蛋白氨基酸序列同源性分别为, *Spodoptera exigua* (Se) NPV 84%、*Orgyia pseudotsugata* (Op) NPV 83%、*Autographa californica* (Ac) NPV 84%、*Lymantria dispar* (Ld) NPV 80%、*Bombyx mori* (Bm) NPV 79%。

杆状病毒作为一种生物杀虫剂已被广泛应

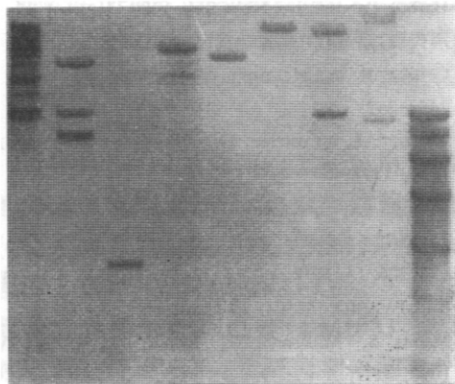


图2 SINPV 广州株多角体基因的定位
各泳道点样顺序与图1B一致

1	TCT	AGA	TAG	TGA	AAA	ATC	AAA	TAT	CCC	ATA	ATG	TAT	AGT	CGT	TAT	AGT	48
1											M	Y	S	R	Y	S	6
49	GCC	TAC	AAT	TAT	AGT	CCC	CAT	CTG	GGC	AAA	ACC	TAT	GTA	TAC	GAT	AAC	96
7	A	Y	N	Y	S	P	H	L	G	K	T	Y	V	Y	D	N	22
97	AAG	TAT	TAC	AAA	AAT	CTA	GGT	CAC	GTG	ATT	AAA	AAT	GCT	AAA	CGC	AAA	144
23	K	Y	Y	K	N	L	G	H	V	I	K	N	A	K	R	K	38
145	CAC	GAT	GCT	CTC	GAA	CGC	GAG	GCC	GAC	GAG	CGT	GAG	CTC	GAT	CAC	CTC	192
39	H	D	A	L	E	R	E	A	D	E	R	E	L	D	H	L	54
193	GAC	AAG	TAT	CTG	GTC	GCA	GAG	GAT	CCG	TTC	ATG	GGT	CCT	GGT	AAA	AAT	240
55	D	K	Y	L	V	A	E	D	P	F	M	G	P	G	K	N	70
241	CAA	AAG	TTG	ACT	CTG	TTC	AAA	GAG	ATT	CGT	AAC	GTG	AAG	CCC	GAC	ACG	288
71	Q	K	L	T	L	F	K	E	I	R	N	V	K	P	D	T	86
289	ATG	AAG	CTG	ATC	GTC	AAT	TGG	AAC	GGT	AAA	GAG	TTT	CTG	CGC	GAG	ACT	336
87	M	K	L	I	V	N	W	N	G	K	E	F	L	R	E	T	102
337	TGG	ACT	CGC	TTT	ATG	GAA	GAC	AGC	TTC	CCC	ATC	GTA	AAC	GAT	CAA	GAA	384
103	W	T	R	F	M	E	D	S	F	P	I	V	N	D	Q	E	118
385	GTG	ATG	GAC	GTG	TTT	TTA	GTG	ATA	AAC	ATG	CGT	CCC	ACT	AGA	CCG	AAC	432
119	V	M	D	V	F	L	V	V	N	M	R	P	T	R	P	N	134
433	CGT	TGC	TTT	AGA	TTT	TTA	GCG	CAG	CAC	GCG	CTC	CGA	TGC	GAT	CCC	GAG	480
135	R	C	F	R	F	L	A	Q	H	A	L	R	C	D	P	E	150
481	TAC	GTT	CCT	CAC	GAC	GTG	ATC	CGT	ATC	GTA	GAA	CCG	TCG	TAC	GTC	GGC	528
151	Y	V	P	H	D	V	I	R	I	V	E	P	S	Y	V	G	166
529	ACC	AAT	AAC	GAA	TAC	CGC	ATC	AGT	CTG	GCT	AAG	AAG	GGC	GGC	GGT	TGT	576
167	T	N	N	E	Y	R	I	S	L	A	K	K	G	G	G	C	182
577	CCC	GTG	ATG	AAC	CTG	CAC	GCC	GAA	TAC	ACC	ACG	TCG	TTC	GAG	AGC	TTC	624
183	P	V	M	N	L	H	A	E	Y	T	T	S	F	E	S	F	198
625	ATC	GAC	AAG	GTG	ATA	TGG	TAC	AAC	TTT	TAC	AAG	CCC	ATC	GTG	TAC	GTG	672
199	I	D	K	V	I	W	Y	N	F	Y	K	P	I	V	Y	V	214
673	GGC	ACC	GAC	TCG	GCT	GAA	GAG	GAG	GAG	ATC	CTT	CTC	GAA	GTG	TCG	CTC	720
215	G	T	D	S	A	E	E	E	E	I	L	L	E	V	S	L	230
721	GTG	TTC	AAG	ATC	AAA	GAG	TTT	GCT	CCC	GAC	GCG	CCT	CTA	TAC	ACC	GGT	768
231	V	F	K	I	K	E	F	A	P	D	A	P	L	Y	T	G	246
769	CCC	GCG	TAT	TAA	ATT	TGC	GAA	GAG	GAC	AAC	CGA	GAC	AGT	TCG	TCG	AC	815
247	P	A	Y	*													250

图4 SINPV多角体基因的核苷酸及氨基酸序列

编码的氨基酸名称以大写字母表示,*表示终止密码子(TAA),文中多角体基因序列已被GenBank/EMBL

数据库收录,收录号(Accession Number)为AF 037262

用,它具有寄主专一,对人畜无害等优点。但与化学农药相比,杆状病毒杀虫速度过于缓慢,害虫在感染病毒数天乃至数周才会死亡;在此过程中,害虫仍会对作物造成一定的危害。杆状病毒杀虫剂的这些缺陷可通过两条途径得以改善:其一,选择毒力较强的病毒株系。利用限制性内切酶分析病毒基因组的方法不仅可以准确区分不同的病毒株系,还可以结合毒力测定筛选出有效的杀虫毒株。其二,利用基因工程手段,在野生病毒中引入对昆虫专一的毒素基因或激素、激素调节蛋白基因,构建重组杆状病毒株,以加快杀虫速度^[1]。开展对 SINPV 分子生物学的研究,特别是对多角体基因序列的测定,则为构建高效的重组 SINPV 杀虫提供了理论基础。

参 考 文 献

[1] Bonning B C, Hammock B D. Annu Rev Entomol,

1996, 41:191~210.

- [2] Miller L K. Ann Rev Microbio, 1988, 42:177~199.
- [3] King L A, Possee R D. The baculovirus expressing system, a laboratory guide. London UK. Chapman & Hall, 1991,181~191.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis. Molecular cloning, a laboratory manual. edited by Cold Spring Harbor Laboratory, NY:CSH, 1989, 1.21~1.85.
- [5] 冯美珍,蔡宜权. 病毒学报,1990, 6(1)56~61.
- [6] Getting R R, McCarthy W J. Virology, 1982, 117: 245~252.
- [7] Croizier L, Croizier G. Biochem Biophys Acta, 1996, 1218:457~49.
- [8] Protein sequence and PID numbers: SeNPV PID: g61956, OpNPV PID: g332539, SpiiNPV PID: g222226, AcNPV PID: g332452, LdNPV ID: g332516, BmNPV PID: 332501. In GenBank.
- [9] Maeda S, Mukohara Y, Kondo A. J Gen Virol, 1990, 71:2631~2639.