

# 茶蚕颗粒体病毒 AcMNPV ORF38 同源基因的克隆及序列分析

章东方, 顾江涛, 张若平 (安徽省农业科学院植物保护研究所, 安徽合肥 230031)

**摘要** [目的] 为利用昆虫病毒更好地防治害虫和进行分子生物学研究。[方法] 从感病茶蚕幼虫的尸体中提取颗粒体病毒 DNA 后, 进行酶切、克隆、测序和序列分析。[结果] 成功克隆了茶蚕颗粒体病毒基因组中一个 1 484 bp 的片段。该片段含有 1 个完整的开放阅读框 (ORF) 和 2 个不完整 ORF。完整 ORF 为 666 bp, 有典型 Nidix 结构域, 其编码 1 个与苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒 AcMNPV 的 ORF38 高度同源的基因, 定名为 AcORF38 同源基因。2 个不完整 ORF 分别编码 p47 蛋白基因的 C- 端和 p24 基因的 N- 端。[结论] 茶蚕颗粒体病毒与卷蛾科宿主中颗粒体病毒亲源关系较近, 而与夜蛾科宿主昆虫中颗粒体病毒较远。AcORF38 同源基因与编码 NIP 焦磷酸水解酶的基因高度同源, 可能与病毒的复制和 DNA 损伤的修复过程相关, 也可能与入侵寄主的过程相关。

**关键词** 茶蚕; 颗粒体病毒; AcMNPV ORF38 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号 S476+.13 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)15-06196-03

**Cloning and Sequence Analysis of AcMNPV ORF38 Homologous Gene in Granulovirus of *Andraca bipunctata* Walker**

**ZHANG Dong-fang et al** (Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031)

**Abstract** [Objective] The research aimed to better understand the molecular biology of insect viruses. [Method] After virus DNA was extracted from the cadaver of diseased larva of *Andraca bipunctata*, it was made for enzyme digestion, cloning, sequencing and sequence analysis. [Result] A fragment with the size of 1 484 bp in the genome of granulosis virus in *A. bipunctata* was successfully cloned. This fragment contained one complete open reading frame (ORF) and 2 incomplete ORF. The complete ORF was 666 bp and had the typical Nidix domain, coding one gene which was highly homologous with ORF38 of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus AcMNPV and named as AcORF38 homologous gene. 2 incomplete ORF coded C terminal of p47 gene and N terminal of p24 gene. The granulosis virus in *A. bipunctata* had closer genetic relationship with that in Tortricidae host, while it had farther genetic relationship with host insects of Noctuidae. [Conclusion] AcMNPV ORF38 homologous gene was highly homologous with the gene coding NIP pyrophosphate hydrolase, which was probably related to viral replication and the repairing process of DNA damage, or related with the process of invading hosts.

**Key words** *Andraca bipunctata* Walker; Granulovirus; AcMNPV ORF38 gene; Cloning; Sequence analysis

昆虫病毒是以昆虫作为宿主, 并在宿主种群中流行传播的昆虫病原微生物。昆虫病毒的种类繁多, 目前广泛应用于防治农业和林业害虫的昆虫病毒属于杆状病毒科。昆虫杆状病毒包括核多角体病毒和颗粒体病毒<sup>[1]</sup>。它们的突出特点是在宿主细胞内形成蛋白质包涵体, 这种包涵体在自然环境中具有保护病毒生物学活性的作用, 有利于病毒在自然环境中保存下来。昆虫杆状病毒可以感染鳞翅目、鞘翅目、双翅目等多种害虫, 对人和动物安全无害。茶蚕是一种危害茶树、油茶树等山茶科植物的害虫。低龄幼虫群集于茶树叶片背面咬食嫩叶, 3 龄开始相互缠绕成团取食叶片, 大发生年份受害茶丛 80% 的叶片被蚕食。陈锦绣等<sup>[2]</sup>从收集的病死茶蚕幼虫中首次分离获得茶蚕颗粒体病毒, 随后对该病毒的形态、组织病理、毒力、宿主范围等进行了广泛的研究<sup>[3]</sup>, 为了更好地利用昆虫病毒防治害虫和进行分子生物学研究, 笔者对茶蚕颗粒体病毒的基因组序列进行了初步研究。

## 1 材料与方法

**1.1 茶蚕幼虫的饲养和病毒的繁殖** 在温度 25℃、光照 12 h 的培养箱中, 用新鲜茶枝饲养茶蚕幼虫至 4 龄初, 感染病毒。收集感染病毒死亡症状明显的虫尸, 置 4℃ 冰箱备用。

**1.2 茶蚕颗粒体病毒的纯化** 将收获的感病虫尸用组织捣碎机匀浆, 5 层纱布过滤后用差异离心法和密度梯度离心法分离纯化茶蚕颗粒体病毒包涵体。

**1.3 病毒基因组 DNA 的纯化、酶切、克隆和序列测定** 纯化的病毒包涵体用碱裂解, 蛋白酶消化, 然后用酚氯仿抽提, 乙醇沉淀, 溶于灭菌双蒸水里, -20℃ 保存备用。DNA 的酶

切、克隆按文献[4]操作。测序委托专业公司采用 ABI3730 测序仪完成。

**1.4 数据分析** 用 NCBI 网上的 Blast 和 ORF Finder 软件对获得的 DNA 序列进行分析, 对应 ORF 的氨基酸序列与 GenBank/EMBL 中的同源序列进行蛋白质比对。该研究利用的杆状病毒基因组有: AcMNPV<sup>[5]</sup>、AdorGV<sup>[6]</sup>、CpGV<sup>[7]</sup>、GleGV<sup>[8]</sup>、PhopGV<sup>[9]</sup>、HxyGV<sup>[10]</sup> 和 XecnGV<sup>[11]</sup>。推定的蛋白质分子量和等电点是通过在线帮助计算获得的。序列分析: 测定获得的序列用 NCBI-Blast 软件查找同源性序列, 用 NCBI-ORF Finder 软件分析可能存在的开放阅读框, 序列比对采用 Multalin Version 5.4.1 软件<sup>[12]</sup> 和 Clustal W Version 1.82 软件<sup>[13]</sup>, 系统进化用 PhyIip 3.64 版软件分析和 NCBI 提供的系统进化分析结果进行比较。

## 2 结果与分析

**2.1 序列测定结果** 见图 1。该片段共计 1 484 bp。用 ORF Finder 软件分析显示, 该片段编码 1 个完整的开放阅读框和 2 个不完整的开放阅读框。完整的开放阅读框含有 666 bp, 编码 221 氨基酸。Blast 分析发现该阅读框编码的基因与苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒 AcMNPV 的 ORF38 具有高度的同源性(定义为 AcORF38 同源基因)。在这个基因的上游 53 bp 处是 1 个不完整的开放阅读框 p47 基因, 该片段编码 P47 蛋白的 C 端。在 AcORF38 同源基因的下游 43 bp 处是另外一个不完整的开放阅读框, 序列分析表明它是编码颗粒体外壳蛋白 P24 的 N- 端。AcORF38 homologue 基因上游 59 bp 处存在杆状病毒晚期表达蛋白序列 TTAAG, 在 p24 基因的起始密码上游 24 bp 存在杆状病毒晚期表达蛋白序列 GTAAG, 表明它们可能是晚期表达的蛋白质。

基金项目 安徽省自然科学基金项目(03043302)。

作者简介 章东方(1962-), 男, 安徽太湖人, 研究员, 从事分子生物学和病虫害综合防治研究。

收稿日期 2007-12-24

**aat**tcgtttacgttggagaagtcgacactcatgcatccgttggagttaaattccagacgtgcaacgcccttaaacgcgccgcccctac  
 N S F T L E K S T L M H P L E L N S R R C N A L K R A A A Y  
 aataaaacgctcagtaatgatatggagctgaaagttgactttgtacaaggtaaacgaatatcgaccggatcacacgatcctaataagctg  
 N K T L S N D M E L K V D F V Q G K R I S T G S H D P N R L  
 gttgaattattaagg**taa**agtggtttttatgtagtgggtgtaatcaacaacgtcaacctaccttaaa**atg**gtcaacaataaacaacg  
 V E L L R \* p47 AcORF 38 homologue gene M V K Q I K H  
 cggtttgggtgtgaccggtgacgataaagcgataatattgcaagtaacaaatcgtaaatgaaggtgtaacaaaaacttaaaat  
 A G L L V L T G D D K A I I L Q A N K S Y N E G V N K N L K  
 acaacaacacattccgtttgtggagaaattgagtataccaggggcaaacatgactctggtgagaaaaattacgagactgcattgctg  
 Y N K H I P F V E K L S I P R G K H D S G E K N Y E T A L R  
 agtttatagaggaaacgggtcttttggataaagtgacatgtatacggaaaccgtttactcttgagtggaagacaacaacaaatgt  
 E F I E E T G L L F D K V H M Y T E P F T L E W Q D N N K M  
 acaaatatgccatttatgtggcggttttgggtgggttccttgtattatttaaaaaaacgaccaaacacatacaacattcgattgaaagaga  
 Y K Y A I Y V A F L V G S L Y Y L K K R P N T Y N I R L K E  
 tgcgtgtgtaacgtaattgtgggtacaaagtgatgtgttaagcaaaagtttcgcagccaagagttgggtgcaaaattgagatta  
 M S C V N V M L G Y K V D V F K Q K F R S Q E L V R K I E I  
 tgaatttgcacaagtacatttcgtacatggagaacgtcaattggccacctacaatacagtaattattacagtttttaattatgtgt  
 M N L H K Y I S Y M E N R Q L A T Y K Y S N Y Y T F F N Y V  
 acacggtgaaacaattgtatgaattggggcggttggagtggtttgtgaaaatagatctgacatgggttgagcgacactgaaaaattaca  
 Y T V K Q L Y E L G R L E C F V K I D L T W L S D T E K F N  
 tttgtattat**agt**gtgtaataatagatagtag**taagg**gtgtaacggaaaaaagaaa**atg**tcgtttgattataactcgggaccgatagaa  
 I L Y Y \* p24 M S F D Y N S G P I E  
 gtgtttatgtgcaaacgacgagaaaggggtcaatgggttatgctgaagtacagcaattgctagtttactggcaccgtatacacgaatc  
 V F I V S N D E K G V N G Y A E V T A I A S L L A P Y T R I  
 agcactactcaaatatggaataccactcatccgctcgtatcgagtgcaaaaatggaaaaattttgtgcacgccattgcaatttgtaaa  
 S T T Q I W N T T H P S Y R V Q N N G K N F V H A I A I C K  
 ttttggcgcaatccccgaaacagacactcccagttacaacagtttgcgacaattgggtgagatattgatgggtggcgatcaaaatgag  
 F L C A I P E T D T P S Y N S L R Q L V R D L M V G D Q N E  
 ttggaggatgcaacgaaaaaagaattgatggaatataagagattgtaaacgtttagagaatgtgtcaccggacaatagcactgtactc  
 L E D A T K K E L M E I K E I V K R L E N V S P D N S T V L  
 agtgactttaatggattgttgcgtataactaaaagtgaaattattgtcagaatataagagatttttggcaccatccaccgatgtattatt  
 S D F N G L L R I L K S E L L S E L K D F L A P S T D V I I  
 gacatgggtgcaaacggagactgatataaaatctttgctt**gaatt**  
 D M V P T E T D I K S L L E

图1 茶蚕颗粒体病毒基因组片段序列及编码的基因

Fig.1 Fragment sequence of virus genome of *Andraca bipuncta* a *granlois* and the coded gene

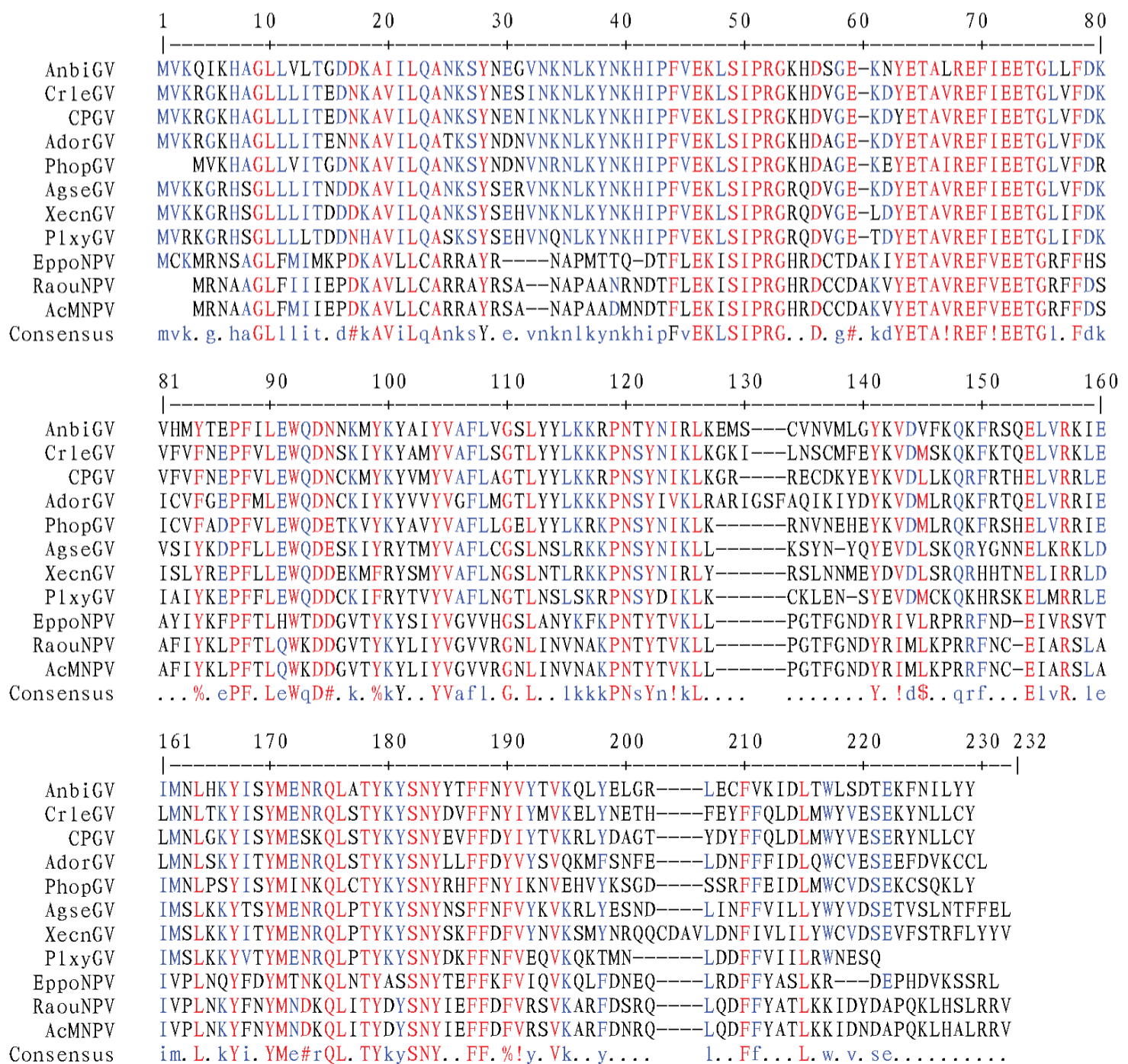


图2 11种杆状病毒中编码AcMNPV ORF38 同源基因的蛋白质序列比对

Fig.2 Comparison of protein sequence of coded AcMNPV ORF38 homologous gene in 11 baculovirus

**2.2 序列分析** Blast 分析表明,AcMNPV ORF38 同源基因与苹果蠹蛾颗粒体病毒(*Gdia pomonella granulovirus*, CpGV) ORF69 在氨基酸序列上 68% 相同,84% 相似,与 GHeGV ORF62 70% 相同,85% 相似,在已经测定全部序列的 7 种颗粒体病毒中,这个基因的氨基酸同源性非常高。该编码框与核型多角体病毒 AcMNPV ORF38 基因有 40% 相同,61% 相似。多序列比对分析表明,这些基因编码的蛋白质在 N- 端含有 Nudix 结构域(图 2),AcORF38 同源基因 Nudix 结构域保守序列为 49 SIPRGKHDSGEKKNYETALREFIEETGLLFD 78,完全符合 Nudix 结构域 GX5EX7REUXEEXGU 的特征(图 2)。Nudix(Nucleoside diphosphate linked to another moiety) 水解酶类是具有高度保守序列 CX5EX7REUXGU(其中 X 代表任何氨基酸,U 代表 Ile、Leu、Val 等脂肪族氨基酸) 焦磷酸水解酶类。已经从病毒到人类的约 200 个物种中发现了 1 800 多个含有 Nudix 结构域的蛋白质序列,对约 20 种含 Nudix 结构域的酶的性质进行研究,这些酶的底物可以是核苷三磷酸、辅酶、糖苷、二核苷多聚磷酸盐。这些底物在细胞中可能作为细胞信号分子、细胞代谢调节因子或在细胞周期的不同阶段需要调控的代谢中间产物。然而更多的底物可能是对细胞有潜在毒性的化合物,在细胞的正常生长、繁殖过程中需要及时地通过这类水解酶降解<sup>[14-20]</sup>。

**2.3 系统进化树分析** 选用已测定过全序列的 7 种颗粒体病毒和 3 种核型多角体病毒的 AcMNPV ORF38 同源基因的氨基酸序列进行系统进化分析,结果表明(图 3),茶蚕颗粒体病毒与卷蛾科宿主中发现的颗粒体病毒亲源关系较近,而与夜蛾科宿主昆虫中发现的颗粒体病毒亲源关系较远。

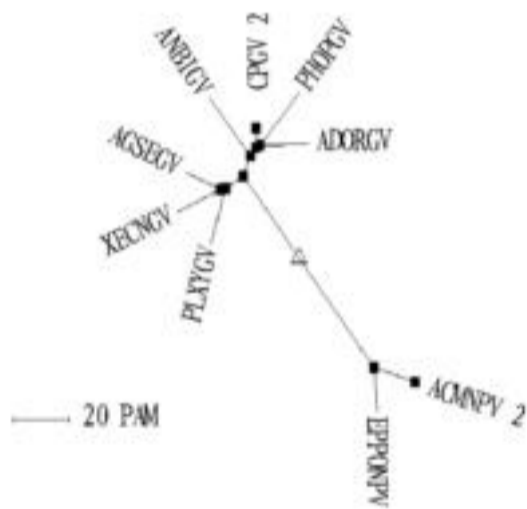


图3 7种颗粒体病毒和3种核型多角体病毒的AcMNPV ORF38同源基因的氨基酸序列系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis with AcMNPV ORF38 homologue genes from 7 granuloviruses and 3 nucleopolyhedroviruses

### 3 讨论

茶蚕颗粒体病毒是茶树害虫茶蚕的一种病原微生物,被应用于茶园中防治茶蚕危害并取得了较好的效果。笔者克隆了茶蚕颗粒体病毒基因组中 1 个 1 484 bp 的片段。序列分析表明,该片段含有 1 个完整的开放阅读框和 2 个不完整的开放阅读框。完整阅读框编码的氨基酸序列与 AcMNPV ORF38 的氨基酸序列有 40% 相同,61% 相似(定名为 AcORF38 同源基因)。该基因与编码 NIP 焦磷酸水解酶的基因高度同源,可能与病毒的复制、DNA 损伤的修复过程相关,也与病毒

入侵寄主的过程相关。该基因在病毒中的作用还有待进一步的研究后获得明确的结论。2 个不完整阅读框分别与其他杆状病毒的 p47 和 p24 基因同源性高。根据对 AcMNPV ORF38 同源基因的氨基酸序列进行的系统进化分析表明,茶蚕颗粒体病毒与卷蛾科宿主昆虫中分离获得的颗粒体病毒亲源关系更近。

3 个基因 p47、AcMNPV ORF38 同源基因和 p24 在已经完成基因组测序的所有颗粒体病毒中都有对应的阅读框存在。除 CpGV 多出一个反向的基因阅读框 ORF70 外,该基因组片段中基因的排列顺序、转录起始方向与其他的颗粒体病毒一致,表明它们的高度保守特性。

### 参考文献

- [1] BISSARD G, BLACK B, CROOK N, et al. Virus Taxonomy [C] // Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York: Springer Verlag, 2000: 195-202.
- [2] 陈锦绣, 丁永官, 徐德进, 等. Studies on a granulosis virus of the tea bush Caterpillar, *Andaca bipunctata* [Lep.: Bombycidae] and its utilization [J]. 中国生物防治, 1992, 8(2): 72-76.
- [3] 丁永官, 章东方, 陈锦绣, 等. Field application of AbGV Sprays to control tea caterpillar [J]. 中国生物防治学报, 1999, 15(4): 154-156.
- [4] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989.
- [5] AYRES MD, HOWARD S C, KUZIO J, et al. The complete DNA sequence of *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* [J]. Virology, 1994, 202: 586-605.
- [6] WORMLEATON S, KUZIO J, WINSTANLEY D. The complete sequence of the *Adoxophyes orana granulovirus genome* [J]. Virology, 2003, 311(2): 350-365.
- [7] LUQUE T, HENCH R, CROOK N, et al. The complete sequence of the *Gdia pomonella granulovirus genome* [J]. J Gen Virol, 2001, 82: 2531-2547.
- [8] LANGE M, JEHLE J A. The genome of the *Glyptotendia leucotreta granulovirus* [J]. Virology, 2003, 317(2): 220-236.
- [9] CRUZIER L, TAHA A, CRUZIER G, et al. The complete sequence of the potato tuber moth, *Plthorinaeae operculella*, granulovirus [Z]. GenBank: AF499596, 2003.
- [10] HASHIMOTO Y, HAYAKAWA T, UENO Y, et al. Sequence analysis of the *Rutella xylostella granulovirus genome* [J]. Virology, 2000, 275(2): 358-372.
- [11] HAYAKAWA T, KO R, OKANO K, et al. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum granulovirus genome* [J]. Virology, 1999, 262(2): 277-297.
- [12] CORPET F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering [J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(22): 10881-10890.
- [13] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. CLUSTAL: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22: 4673-4680.
- [14] BESSMAN MJ, FRICK D N, O'HANDLEY S F. The MitT proteins or "nucix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "houseclearing" enzymes [J]. J Biol Chem, 1996, 271: 25059-25062.
- [15] BHAINAGAR S K, BESSMAN MJ. Studies on the mitator gene, mitT of *Escherichia coli* [J]. J Biol Chem, 1988, 263: 8953-8957.
- [16] BHAINAGAR S K, BULLIONS L C, BESSMAN MJ. Characterization of the mitT nucleoside triphosphatase of *Escherichia coli* [J]. J Biol Chem, 1991, 266: 9050-9054.
- [17] MAKI H, SEKIGUCHI M. MitT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis [J]. Nature, 1992, 355: 273-275.
- [18] SHEKHIS, O'HANDLEY S F, DUNN C A, et al. Identification and characterization of the nucix hydrolase from the archaeon, *Methanococcus jannaschii*, as a highly specific ADP-ribose pyrophosphatase [J]. J Biol Chem, 1998, 273: 20924-20928.
- [19] WEBER D J, ABEYGUNAWARDANA C, BESSMAN MJ, et al. Secondary structure of the MitT enzyme as determined by NMR [J]. Biochemistry, 1993, 32: 13081-13088.
- [20] ESHNOSA J C, TERCERO J A, RUBIO MA, et al. The pur7 Gene from the Promycium Biosynthetic pur Cluster of *Streptomyces alboniger* Encodes a Nudix Hydrolase [J]. J Bacteriol, 1999, 181(16): 4914-4918.