

## 斜纹夜蛾核多角体病毒 *egt* 基因的核苷酸 全序列分析及同源性比较\*

阎庆生 庞 义\*\* 杨 洁 农 广 欧阳晓光 代小江

(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** 测定了斜纹夜蛾核多角体病毒(*Spodoptera litura* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus, *Sl*NPV)中山大学分离株(Zhongshan University isolate, ZSU)蜕皮甾体尿苷二磷酸葡萄糖转移酶(Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase, EGT)基因的核苷酸全序列。该基因编码框包含 1530 个核苷酸,有 509 个氨基酸组成的蛋白质,分子量为 58.5kD, TATA 框位于 ATG 上游-44 处。在终止密码子 TAA 下游 13 位,有真核生物基因 mRNA 转录 poly(A)加尾酶信号序列:AATAAA。同源性比较显示,*Sl*NPV *egt* 基因推测的氨基酸序列与其它昆虫杆状核多角体病毒 EGT 序列同源性很高,与海灰翅夜蛾核多角体病毒(*Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus, *Sl*iNPV)同源性最高,核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 84% 和 91%,而且有一些与 EGT 结构和功能密切相关的氨基酸是绝对保守的;根据 EGT 蛋白进行分子进化树分析,把昆虫杆状病毒 EGT 主要分成两大类。

**关键词** 昆虫杆状病毒,斜纹夜蛾,多粒包埋核多角体病毒,*egt* 基因,分子进化树

**分类号** Q74 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999) 02-0176-82

斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)是我国、日本及东南亚等国家和地区的一种重要害虫,危害多种农作物,应用野生型斜纹夜蛾核多角体病毒(*Spodoptera litura* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus, *Sl*NPV)防治斜纹夜蛾的病毒杀虫剂已经进行工厂化生产,并且取得了较好的田间实验效果<sup>[1,2]</sup>。

通过缺失病毒基因<sup>[3]</sup>或插入昆虫专性毒素基因<sup>[4,5]</sup>,可以进一步提高病毒杀虫剂的效果。昆虫杆状病毒(Baculovirus)基因组含有一个保守的蜕皮甾体尿苷二磷酸葡萄糖转移酶(Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase, EGT)基因<sup>[6]</sup>,其产物 EGT 可以催化葡萄糖或乳糖与蜕皮激素结合而使之失活,当蜕皮激素的滴度低于一定的域值后,能阻碍被感染幼虫的蜕皮和推迟化蛹时间,使被感染幼虫摄食时间相对延长,有利于子代病毒的大量复制<sup>[3,7]</sup>。生物测定表明,*egt* 基因缺失的重组苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒(*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, *Ac*NPV)比野生型 *Ac*NPV 明显减少感染幼虫的摄食量,并且缩短杀虫时间。

利用昆虫杆状核多角体病毒 *egt* 基因的 DNA 保守性,我们已经定位和克隆了

\* 国家自然科学基金重点项目(No. 39730030)及高技术探索项目(No. 39680029)资助。

\*\* 通讯作者。

收稿日期:1997-12-29,修回日期:1999-01-29。

*SINPV* 的 *egt* 基因<sup>[8]</sup>, 本文报道利用外切核酸酶 III (Exonuclease III, Exo III) 产生嵌套缺失测序模板和双链 DNA 序列分析, 测定了 *SINPV* 的 *egt* 基因核苷酸序列, 并且与其它 *egt* 基因序列进行同源性比较。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒和菌株

质粒 pUC18 由本实验室保存; 质粒 pSlP II 包含 *SINPV* 的 *Pst*I 片段(4.97kb); 质粒 pSlXb2.6 包含 *Pst*I 片段上的 *Xba*I 2.6kb 片段(图 1)<sup>[8]</sup>。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株为受体菌, 本实验室保存。

### 1.2 分子生物学基本操作技术

参考《分子克隆》上的方法改进<sup>[9]</sup>。

### 1.3 双链 DNA 序列分析测序模板的构建

1.3.1 Exo III 嵌套缺失法: 参照 Pharmacia 公司双链嵌套缺失 Kit 推荐的方法, 使用 *Kpn*I 和 *Bam*HI 双酶切 pSlXb2.6, 然后 Exo III, 消化每两分钟取一份样品(100mol/L NaCl, 30 $^{\circ}$ C), *S*I 核酸酶切掉单链 DNA, 终止反应, T4 连接酶自连, 转化筛选。

1.3.2 限制酶亚克隆目的片段: 参照酶切图谱用 pUC18 亚克隆目的片段。

### 1.4 双链 DNA 序列分析

参照 Pharmacia 公司双链 T7DNA 序列分析 Kit 推荐的方法, 同位素<sup>32</sup>P 标记, 手工读片, 进行序列分析。

### 1.5 计算机分析

应用计算机软件 DNASIS、PROSIS、MEGALIEN, 对所测 DNA 序列进行编码框分析、蛋白质分析, 并与其它 12 种 *egt* 及相关基因氨基酸进行同源性比较。

## 2 结 果

### 2.1 Exo III 嵌套缺失法测序模板的构建

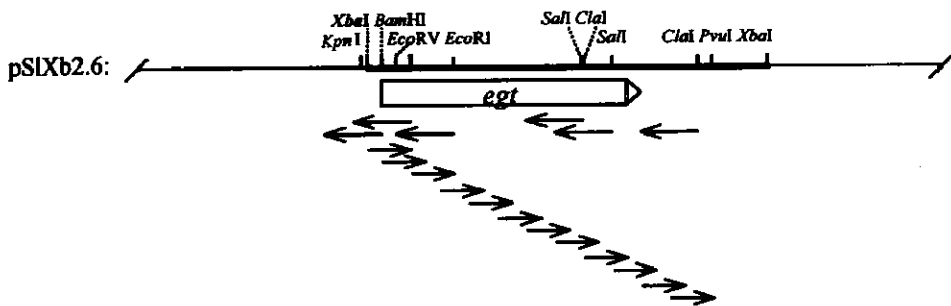


图 1 *SINPV* DNA 的 *Pst*I 片段酶切图谱及 *egt* 基因位置

Fig.1 Physical map of *Pst*I region of *SINPV* and location of *egt* gene for sequencing strategy

The arrows indicate the direction of sequencing



### 3 讨 论

Toister-Achituv 在分析昆虫杆状核多角体病毒 *egt* 基因起始密码子(ATG)上游启动子区域时发现,在 ATG 前 -50~-70 之间都有典型的真核生物基因启动子区域起顺式作用的 TATA 框<sup>[10]</sup>,另外,根据与 *SliNPV egt* 基因核苷酸顺序同源性高达 84% 的海灰翅夜蛾核多角体病毒(*Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus, *SliNPV*) *egt* 基因<sup>[11]</sup>的 ATG 与其 TATA 框的距离,也可以推测 *SliNPV egt* 基因 ATG 起始于第 113 位,这样 TATA 框位于 ATG 上游-44 处。

表 1 昆虫杆状病毒 EGT 氨基酸序列同源比较  
Table 1 Homologous comparison of EGT from insect baculovirus

%	<i>SliNPV</i>	<i>BsNPV</i>	<i>SeNPV</i>	<i>MbNPV</i>	<i>LdNPV</i>	<i>AcNPV</i>	<i>BmNPV</i>	<i>CfNPV</i>	<i>CfDEF</i>	<i>OpNPV</i>	<i>LaoGV</i>	Human
<i>SliNPV</i>	91	67	65	65	60	61	61	57	59	57	59	49
<i>SliNPV</i>	-	65	64	65	59	59	60	55	57	56	57	49
<i>BsNPV</i>		-	70	71	64	64	64	56	58	58	56	47
<i>SeNPV</i>			-	80	63	63	62	60	60	63	57	48
<i>MbNPV</i>				-	63	63	62	59	60	60	60	48
<i>LdNPV</i>					-	59	59	58	59	57	57	46
<i>AcMNPV</i>						-	97	71	73	68	73	45
<i>BmNPV</i>							-	71	72	69	57	45
<i>CfNPV</i>								-	80	82	54	42
<i>CfDEF</i>									-	80	54	42
<i>OpNPV</i>										-	53	42
<i>LaoGV</i>											-	45

注:表中数字为氨基酸序列同源性百分数。

目前,已经发表的昆虫病毒 *egt* 基因有 12 种,核多角体病毒有 10 种,分别是 *AcNPV*<sup>[6]</sup>、家蚕核多角体病毒(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, *BmNPV*)(Genbank L 33180)、柞蚕核多角体病毒(*Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus, *CfNPV*)与其变异株(a defective virus of *CfNPV*, *CfDEF*)<sup>[12]</sup>、舞毒蛾核多角体病毒(*Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus, *LdNPV*)<sup>[13]</sup>、甘蓝夜蛾核多角体病毒(*Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus, *MbNPV*)<sup>[14]</sup>、油桐尺蠖核多角体病毒(*Buzura Suppressaria* nuclear polyhedrosis virus, *BsNPV*)<sup>[15]</sup>、黄杉毒蛾核多角体病毒(*Orgyia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis virus, *OpNPV*)(部分序列)<sup>[16]</sup>、甜菜夜蛾核多角体病毒(*Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus, *SeNPV*)(D. Zuidema, 私人通讯)、和 *SliNPV*<sup>[11]</sup>;颗粒体病毒有两种,即(*Lacanobia oleracea* granulosis virus (LoGV))<sup>[17]</sup>和苹果小卷蛾颗粒体病毒(*Cydia pomonella* granulosis virus, CpGV)<sup>[18]</sup>。对照 *SliNPV egt* 基因推测的氨基酸序列与其它昆虫杆状核多角体病毒 EGT 序列,发现氨基酸同源性



图3 昆虫杆状病毒EGT与人UGT氨基酸序列同源比较

Fig.3 Alignment of amino acid sequences of baculovirus EGT proteins with human UDP-glucuronosyltransferase. Humugt:human UDP-glucuronosyltransferase. A consensus EGT sequence (Cons) is also presented, in which residues identical in all aligned EGT sequences are inupper-case, and those owned by the majority of EGT proteins are in lower-case. "\*" indicates the signal sequence cleavage site in AcNpV EGT. "." indicates the identical important residue.

达 57% 到 91%, 与 *Sli*NPV 的同源性最高, 核苷酸和氨基酸序列比较分别是 84% 和 91% (表 1)。把 *Sli*NPV EGT 的氨基酸序列与其它 10 种昆虫杆状核多角体病毒 EGT 以及一种昆虫颗粒体病毒 *Lo*GV 和一种人的 UGT 蛋白氨基酸序列<sup>[19]</sup> 进行比较时, 确定 EGT 的保守性, 发现在保守区内有一些与 EGT 结构和功能密切相关的氨基酸是绝对保守的, 如 *SINPV* EGT 的 N-末端 S31, 还有 C-末端所含有的 7 个氨基酸, 它们是 G305、W355、Q358、G375、E381、P388 和 P393, O'Reilly 认为它们与酶活性以及催化底物结合位点有关<sup>[7]</sup> (图 2, 3)。像其它昆虫杆状病毒一样, *Sli*NPV EGT 的 N-末端也有信号肽区域, 精确的切割位点需要进一步证明, C-末端也没有类似人 UGT 的膜锚定区, 因此, 也可能是分泌到细胞外的蛋白。

除了多角体和颗粒体蛋白基因之外, *egt* 是昆虫杆状病毒不同种类之间测定序列最多的基因, 而且, 又因为 *egt* 是很保守的, 因此, 可以利用它们之间的同源性差异进行分子进化方面的分析, 从而研究昆虫病毒的进化。依据 MEGALIGN 软件中 Clustal 方法, 进行的分子进化树分析结果可以看出昆虫杆状病毒的 EGT 可以分成两群 (图 4), 一群病毒是 *Ac*NPV、*Bm*NPV、*Cf*NPV、*Cf*DEF 和 *Op*NPV, 还可以细分为 *Ac*NPV 和 *Bm*NPV 以及 *Cf*NPV、*Cf*DEF 和 *Op*NPV 两个亚群, 另一群包括 *Mb*NPV、*Se*NPV、*Bs*NPV、*Ld*NPV、*Si*NPV 和 *Sli*NPV, 其中 *Mb*NPV、*Se*NPV 和 *Bs*NPV 为另一个亚群, *Si*NPV 和 *Sli*NPV 为一个亚群, 而 *Ld*NPV 在这一分支中属于独立的。这一结果丰富了以前的 EGT 进化分析<sup>[7, 15, 16]</sup>。

根据功能的不同, 病毒基因组上的基因可以分成两类: 一类是病毒复制必须的基因, 如结构蛋白的、必须调控蛋白的、与病毒 DNA 复制有关的以及与子代病毒装配有关的基因; 另一类是病毒所携带的复制非必须基因, 也叫做奢侈基因 (Auxiliary gene), 这些基因主要是起到增强病毒在某一方面的能力, 有利于本身复制, 缺少了也不能阻止病毒的复制。*egt* 基因就是一种非必须基因, 缺失它反而能起到改良昆虫病毒杀虫剂效果的作用, 目前, 缺失 *egt* 基因的 *Si*NPV 正在构建中。

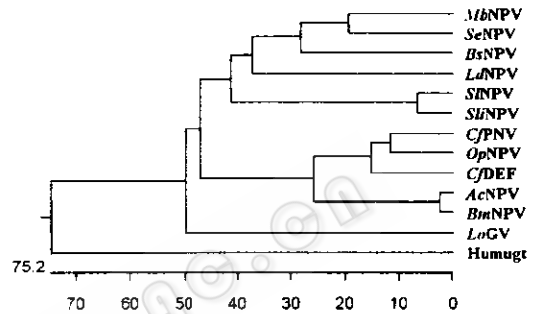


图 4 根据 EGT 氨基酸序列所得昆虫杆状病毒的分子进化树

Fig. 4 A phylogenetic tree of baculoviruses based on EGTs

## 参 考 文 献

- [1] 刘复生, 陈其津, 龙繁新等. 杀虫微生物, 1991, 3: 141~146.
- [2] 庞 义, 昆虫病毒病. 见《昆虫病理学》(蒲蛰龙主编), 广州: 广东科技出版社, 1994, p85--216.
- [3] D. R. O'Reilly, L. K. Miller. *Biotechnology*, 1991, 9: 1086~1089.
- [4] 庞 义. 杀虫微生物, 1994, 4: 1~7.
- [5] 庞 义, 姚 斌, 范云六等. 昆虫天敌, 1995, 17(2): 90~92.
- [6] D. R. O'Reilly, L. K. Miller. *J. Virol.*, 1990, 64: 1321~1328.

- [7] D.R. O'Reilly. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1995, **25S**:541~550.
- [8] 阎庆生, 庞义, 农广等. 中山大学学报(自然科学版), 1998, **37**(3):125~127.
- [9] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] M. Toister-Achituv, O. Factor. *J. Gen. Virol.*, 1995, **78**:487~491.
- [11] O. Factor, M. Toister-Achituv, B. Kamensky. *Virus Genes*, 1995, **11**:47~52.
- [12] J. W. Barret, P. J. Krell, B. M. Arif. *J. Gen. Virol.*, 1995, **76**:2447~2456.
- [13] C. L. Reigel, C. Lanner-Herrera, J. M. Slavicek, *J. Gen. Virol.*, 1994, **75**:829~838.
- [14] E. E. Clarke, M. Tristem, J. S. Cory. *et al.* *J. Gen. Virol.*, 1996, **77**:2865~2871.
- [15] Z. H. Hu, R. Broer, J. M. Vlak *et al.* *Virus Res.*, 1997, **47**:91~97.
- [16] M. N. Pearson, R. M. Bjornson G. F. Rohrmann *et al.* *Virology*, 1993, **197**:71~75.
- [17] I. R. L. Smith, C. Goodale. *J. Gen. Virol.*, 1997, in press.
- [18] N. E. Crook, K. L. Pickup, J. D. Brwon *et al.* Scientific Program and Abstracts of the 14th Annual Meeting of American Society for Virology, Austin, Texas, 1995, p.197.
- [19] B. L. Coffman, T. R. Tephly, Y. M. Irshaid *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.*, 1990, **281**:170~175.

## Characterization of the Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase Gene of *Spodoptera litura* Multinucleocapsid Nuclear Polyhedrosis Virus\*

Yan Qingsheng Pang Yi Yang Jie Nong Guang Ouyang Xiaoguang Dai Xiaojiang

(Institute of Entomology and State Key Laboratory for Biological Control, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

**Abstract** Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (EGT) gene of Zhongshan University isolate of *Spodoptera litura* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus (SiMNPV) had been sequenced. The open reading frame of the gene is 1530 nucleotides long, encoding a putative protein of 509 amino acids with 58.5kD. The 5' noncoding region has a TATA box. A polyadenylation signal, AATAAA, is contained downstream of the translation stop codon. A putative signal peptide was present at the N-terminus of the protein. Comparison of the homology with other baculovirus *egt* genes has been made. The results showed that the gene is highly homologous in the nucleotide and amino acid sequence. The SiNPV *egt* gene is most closely related to that of *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus (SiNPV) with the identities of 84% nucleotide and 91% amino acid respectively. Alignment of amino acid sequences and a phylogenetic tree of twelve baculoviruses EGTs has been constructed.

**Key words** Baculovirus, *Spodoptera litura*, multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus, ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene, phylogeny

\* Sponsored by the Project Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 39730030 and 39680029).