

家蚕质多角体病毒片段 IV 的全序列测定*

林 伟¹ 杨文利² 徐安龙² 梁玉尧¹ 陈森雄¹

(中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510275)¹

(中山大学海洋生物功能基因组开放实验室 广州 510275)²

摘要: 在随机引物建库的基础上, 通过交叉设计引物及加单链 DNA 接头, 应用 RT-PCR 技术克隆了家蚕质多角体病毒 dsRNA 片段 IV 的全长 cDNA, 并测定了它的全序列。该片段长 3,262 bp, 含有一个完整的开放读码框, 编码一个长 1,058 氨基酸的成熟多肽。序列分析表明, 该片段与日本 BmCPV 片段 IV 的核苷酸序列同源性为 89%, 氨基酸序列同源性为 95%。

关键词: 家蚕质多角体病毒 (BmCPV), 双链 RNA, RT-PCR, 序列测定

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 01-0041-04

* 国家自然科学基金结构生物学倾斜项目 (No.30070169)

本文作者还有: 戴伟君¹ 张景强^{1**}

** 联系人 Tel: 020-84112286; E-mail: ls28@zsu.edu.cn

收稿日期: 2001-10-18, 修回日期: 2001-12-18

SEQUENCING OF WHOLE SEGMENT IV OF BOMBYX MORI CYTOPLASMIC POLYHEDROSIS VIRUS

LIN Wei¹ YANG Wen-Li² XU An-Long² LIANG Yu-Yao¹ CHEN Sen-Xiong¹

(State key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University Guangzhou 510275)¹

(The National Opening Laboratory for Marine Functional Genomics Research, Zhongshan University, Guangzhou 510275)²

Abstract: Based on the preparation of cDNA library using random oligonucleotide, a series of primers overlapping the whole segment IV of BmCPV and an adaptor of ssDNA were designed. BmCPV dsRNA segment IV was acquired by RT-PCR amplification and sequenced. Segment IV was 3,262 bp long and had a single, long open reading frame. BmCPV segment IV encoded a polypeptide with 1,058 amino acids. Sequences analyses showed that it was homologous 89% and 95% to BmCPV dsRNA segment IV of Japan strains in nucleotides and amino acids, respectively.

Key words: Bombyx Mori Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (BmCPV), ds RNA, RT-PCR, Sequencing

质多角体病毒 (CPV) 是一类宿主范围广范的昆虫病原体, 属于呼肠孤病毒科质多角体病毒属。该病毒属的典型特征是病毒粒子通常包埋在称为多角体的蛋白质晶体中, 且多角体主要分布于细胞的细胞质中。

家蚕质多角体病毒 (BmCPV) 是质多角体病毒属的模式种之一, 病毒粒子为正二十面体, 直径约为 80nm, 正二十面体共有 12 个顶点, 每个顶点有两层突起^[1]。该病毒基因组为 10 片段双链 RNA (dsRNA)^[2], 含有 5 个结构蛋白 VP1, VP2, VP3, VP4, VP5。电镜研究显示该病毒仅有单层衣壳^[1], 其中, VP1 和 VP3 为衣壳蛋白主要成分。Keiko 等人测定了日本家蚕质多角体病毒 H 株 dsRNA 片段 IV 的全序列, 并在 SF21 细胞中表达了它的全基因, Westernblot 杂交表明, dsRNA 片段 IV 编码家蚕质多角体病毒衣壳蛋白 VP3^[3]。

家蚕质多角体病毒自身具有 RNA 聚合酶, 能以 dsRNA 为模板合成 mRNA^[1]。20 世纪 80 年代, 我国学者巫爱珍等^[4-6]系统研究了我国家蚕质多角体病毒结构蛋白中具有酶活性的成分的性质与功能, 并利用麦胚无细胞体外翻译系统对 dsRNA 各片段的转录产物 mRNA 进行了体外翻译研究, 初步建立了 dsRNA 各片段与病毒结构蛋白的对应编码关系。目前, 我国质多角体病毒 dsRNA 各片段的序列测定工作还未见报道。本文完成了我国家蚕质多角体病毒衣壳蛋白 VP3 的全序列测定, 为 BmCPV 结构与功能关系研究奠定了基础。

1 材料

1.1 多角体

家蚕质多角体由华南农业大学蚕桑系提供。以家蚕质多角体喂养 5 龄家蚕幼虫, 经 10 代以上繁殖传代。

1.2 质粒和菌株

质粒载体 pGEM-Teasy 购自 Promega 公司; 大肠杆菌菌株 DH5α 由本实验室保存。

1.3 工具酶及其它分子生物学试剂

TRIzol LS Reagent、Thermoscript RT-PCR Systems 为 Gibco BRL 公司产品; QIAquick Gel Extraction Kit 和 QIAprep Spin Miniprep Kit 为 Qiagen 公司产品; 高可信度 DNA Polymerase

为 TakaRa 公司产品; T4 RNA Ligase 为 Promega 公司产品。

2 方法

2.1 BmCPV dsRNA 片段 IV 的分离纯化

参照 Kyoji 和 Masahino 的方法^[7]。消化多角体, 采用 TRIzol LS Reagent 一步法分离提取 BmCPV 的 dsRNA。将获得的总 dsRNA 进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 按 QIAquick Gel Extraction Kit 说明书挖胶回收并纯化 dsRNA 片段 IV。

2.2 ds RNA 片段 IV 的全序列测定

按照 Paul 等方法^[8]。用 T4 RNA 连接酶在 5μg dsRNA 片段的 3' 末端连接一单链 DNA 接头 (5' PO₄ TGG TCC ACG CTC AAC GTA GTC NH₂ 3'), 根据随机测序结果 (略), 按照以下策略进行引物设计 (见图 1)。分别以 P₄₋₁, P₄₋₂; P_{L-1}, P_{R-1}; P_{L-2}, P_{R-2}; P₄₋₁, P₄₋₃ 为引物, 按 Gibco BRL 公司说明书进行 RT-PCR, 目的片段回收、纯化按 Qiagen 公司说明书进行; 基因克隆按 Promega 公司说明书进行。以 T7 和 Sp6 为测序引物, 采用 ABI377 DNA Sequencer DNA 自动序列仪进行序列测定, 每个片段至少各测 3 次。

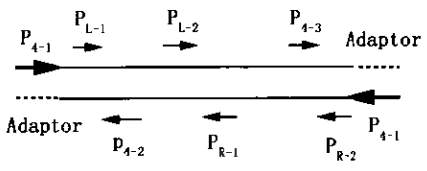


图 1 BmCPV dsRNA 片段 IV 扩增引物设计示意图

3 结果

3.1 BmCPV dsRNA 片段 IV 的全序列

在随机测序的基础上 (结果略), 根据我们的测序策略, 通过 RT-PCR 得到 4 个片段 f₁, f₂, f₃, f₄ (见表 1), 长度分别为 187 bp, 1, 677 bp,

表 1 BmCPV dsRNA 片段 IV 的分段 RT-PCR 扩增

片段	碱基位置 (nt)	大小 (bp)	引物名称	引物序列 (5' ~ 3')
f ₁	-21 ~ 165	187	P ₄₋₁	GAC TAC GTT GAG CGT GGA CCA
			P ₄₋₂	CGT GTG TGA TCG TCG TTG TGA GTT G
f ₂	14 ~ 1,690	1,677	P _{L-1}	ATG TGG CAC TAT ACG AGT ATC
			P _{R-1}	GAT AAT AGA TGT ATC CGG AGC
f ₃	1,655 ~ 3,190	1,536	P _{L-2}	AAT TCA TAT CTA ATG GCT CCG
			P _{R-2}	CTA CGA GCG TAC AAG TTT GAT
f ₄	3,050 ~ 3,262 + 21	231	P ₄₋₃	GAG ATA ATA AGA CCA TCG ACG CCT G
			P ₄₋₁	GAC TAC GTT GAG CCT GGA CCA

1,536bp, 231 bp, 通过对所测序列进行比较分析, 拼接出 BmCPV 片段 IV 的全长序列, 该片段长 3,262bp。含有一个完整的开放读码框 (14 nt - 3,190 nt), 编码一个长 1,058 氨基酸的成熟多肽。该序列已被 GenBank 收录, 序列接受号为 AF433659。

3.2 同源比较分析

通过与 GenBank 的 Database 进行序列比较分析发现, 本株 BmCPV 与日本 BmCPV H 株^[3]及 I 株的核苷酸同源性均为 89%, 氨基酸同源性为 95%, 另外, 本株 BmCPV 与日本 BmCPV H 株之间存在 3 个核苷酸 (1,173 nt ~ 1,175 nt) 的间隙, 即比日本 BmCPV H 株的读码框多 1 个氨基酸, 而与日本 BmCPV I 株之间不存在核苷酸间隙, 因此, 本株 BmCPV 与日本 BmCPV I 株的亲缘关系更近。除此之外, 本株 BmCPV 与呼肠孤病毒科的

其它成员水稻锯齿叶矮缩病毒、斐济病毒等同源性较低。

4 讨论

根据基因组 dsRNA 电泳图谱的不同, 可把质多角体病毒分成 14 个电泳型^[3], 电泳型之间至少有 3 个基因节段的迁移率不同^[9]。不仅质多角体病毒与呼肠孤病毒科的其它成员间无序列同源性, 甚至不同电泳型的质多角体病毒之间未发现 RNA 序列的同源性^[9]。虽然日本家蚕质多角体病毒 H 株、I 株 dsRNA 片段Ⅳ的全序列已测定完成, 但其保守的核苷酸序列还是难以确定。Houssam^[10]总结了前人测定 dsRNA 序列的经验, 认为 dsRNA 全长片段大于 2~2.5 kb 时, 很难一步完成全长序列的克隆, 必须分段或分步进行克隆测序。鉴于以上原因, 我们根据随机建库测序的结果 (略), 选择了分段克隆的方法进行 BmCPV dsRNA 片段Ⅳ的序列测定。

BmCPV 的基因组中 (A + T)% 为 58%~64%^[9], 为了避免接头的互补引物与片段Ⅳ中的序列同源, 设计接头及互补引物时, 除满足一般引物的条件外, 我们专门设计引物的 (A + T)% ≈ 45%。另外, 接头的 3' 末端用-NH₂ 封闭可以防止 dsRNA/DNA 连接时接头 DNA 的环化和自连作用。

参 考 文 献

- [1] Zhang H, Zhang J, Yu X, *et al.* J Virol, 1999, 73 (2): 1624~1629.
- [2] Hayashi Y, Kawase S. Virology, 1964, 23: 611~614.
- [3] Keikio I, Sumiharu N, Stefan W, *et al.* J Virol, 2001, 75 (2): 988~995.
- [4] 巫爱珍, 戴仁鸣, 沈学仁. 中国科学 (B), 1981, 11: 1376~1380.
- [5] 巫爱珍, 戴仁鸣, 沈学仁. 中国科学 (B), 1983, 3: 209~212.
- [6] 戴仁鸣, 巫爱珍, 孙玉昆. 中国科学 (B), 1986, 7: 729~733.
- [7] Kyoji H, Masahiro T, Kenta N. J Virol, 1998, 72: 5762~5768.
- [8] Paul R, Susan J, Ian N C. J Virol, 1992, 66: 1817~1822.
- [9] 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学. 北京: 中国农业科技出版社, 1998. 411~422.
- [10] Attoui H, Billoir F, Francois J, *et al.* J Virol Methos, 2000, 89: 148~158.