杆状病毒DNA聚合酶基因的研究概况*

乔媛媛 彭 蓉 彭建新** 洪华珠

（华中师范大学生命科学学院 武汉 430079）

摘要：杆状病毒DNA聚合酶基因属于杆状病毒早期基因，是杆状病毒复制的必需基因。它编码病毒诱导的DNA聚合酶，能与其它复制因子一起与杆状病毒DNA的同源区和非同源区的顺式作用元件相互作用起始DNA复制。此基因作为杆状病毒系统发育分类的依据，较之包涵体蛋白、egt基因有更大的优势。

关键词：杆状病毒DNA聚合酶，基因，结构，功能，系统发育

中图分类号：Q 93 **文献标识码**：A **文章编号**：0253-2654（2004）03-0116-04

Research Advances Baculovirus DNA polymerase gene

QIAO Yuan-Yuan PENG Rong PENG Jian-Xin HONG Hua-Zhu

（*College of Life Science*, *Center China Normal University*, *Wuhan* 430079）

Abstract: Baculovirus DNA polymerase gene belongs to an early gene of baculovirus. It is a necessary gene required for replication of virus in insect cells. It can encode DNA polymerase induced by virus. In the process of replication, DNA polymerase can bind to homologous regions and non-homologous regions, which are believed to act as the origins of virus DNA replication with other replication factors. In addition, DNA polymerase has advantages over occlusion protein and egt gene for resolving deep branching taxonomic relationships of baculovirus phylogenies.

Key words: Baculovirus DNA polymerase, Gene, Structure, Function, Phylogeny

DNA复制是病毒生活周期中关键的事件，在此过程中有诸多DNA复制因子参与，而DNA聚合酶在确保子代病毒基因组忠实、有效地增殖中扮演重要角色。对不少病毒如SV40和HSV[1]侵染宿主的研究显示，病毒编码的DNA聚合酶在基因组复制和宿主特异性的水平上起重要作用。相应的病毒特异性的DNA聚合酶活性在杆状病毒侵染的细胞中也被检测出，其DNA聚合酶也由病毒本身编码。

在所有已测序的核型多角体病毒属（NPV）基因组中都包含有单一的DNA聚合酶基因[2,3]，此DNA聚合酶的基因含有起始病毒复制序列。它所编码的病毒蛋白即DNA聚合酶在杆状病毒DNA复制过程中具有重要作用。下面对杆状病毒DNA聚合酶基因的结构和功能等作一综述性介绍。

1 杆状病毒DNA聚合酶基因的结构

到目前为止，已经对多种杆状病毒的DNA聚合酶基因进行了测序和分析。如粉纹夜蛾颗粒体病毒（Tichoplusia ni GV，TnGV），苜蓿银蚊夜蛾核型多角体病毒（Autographa californica NPV，AcMNPV），舞毒蛾核型多角体病毒（Lymantria drispa NPV，LdMNPV），

* 湖北省自然科学基金项目（No.2000J112）

** 联系人 E-mail：jianxinpeng@21cn.com

收稿日期：2003-06-20，修回日期：2003-08-07

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

家蚕核型多角体（Bombyx mori NPV，BmNPV），云杉卷叶蛾核型多角体病毒（Choistoneura fumiferana NPV，CfMNPV），黄杉毒蛾核型多角体病毒（Ogyia pseudotsugata NPV，OpMNPV），莲纹夜蛾核型多角体病毒（Spodoptera littoralis NPV，SpliNPV）。

不同的杆状病毒，它们的 DNA 聚合酶基因的特点有其相似之处。AcMNPV DNA 聚合酶基因位于 *Eco*RI-F/*Eco*RI-V 片断，占整个基因组物理图谱的 39.5～42.5 图谱单位，是一个2,994 bp 组成的开放阅读框（ORF）。从 ORF 的第一个 ATG（+1、+2、+3）开始，终止密码子 TAA（+2953），推导转录出 984 个氨基酸，相对分子量为 114.310 kD。ORF 以反时针方向转录 3 kb RNA。DNA 聚合酶基因 5′端非编码区至少有两个转录起始点，一个位于 ATG 上游-120 核苷酸处，另一个位于-212 核苷酸处，这两个起始密码子都不适宜作翻译起始密码子，这些上游起始信号可能在 DNA 聚合酶表达中起翻译调节的作用。DNA 聚合酶基因 3′多腺苷化位点位于 AATAAA 信号附近，此信号与终止密码 +2952 重叠[4]。

LdMNPV DNA 聚合酶基因编码 1113 个氨基酸，分子量 115.9 kD[5]；CfMNPV DNA 聚合酶基因由2,970 bp 组成，编码 990 个氨基酸，分子量 114.2 kD[6]；OpMNPV DNA 聚合酶基因编码 985 个氨基酸，分子量为 112.6 kD[7]；SpliNPV DNA 聚合酶基因序列编码 998 个氨基酸，分子量为 116kD[8]。

在对 LdMNPV 与 AcMNPV 的 DNA 聚合酶比较显示，两者氨基酸序列有 45%的相似性，与人、单纯疱疹病毒、EBV、酵母、牛痘病毒、腺病毒的 DNA 聚合酶有 13%～27%的序列同一性。在这些相似的区域内，有 7 个区域与上面所述的病毒在序列和相关的线性空间排列上均保守。这些区域与底物连接，引物相互作用、焦磷酸杂交有关，其中有 3 个区域与核酸外切酶有关。计算机分析显示，CfMNPV 基因的氨基酸序列与 AcMNPV 的 DNA 聚合酶有 62%的序列相同，有 41%的序列与 LdMNPV 的 DNA 聚合酶序列相同。它的许多氨基酸区域与其它真核和原核来源的大量 DNA 聚合酶一致。这些序列同样含有行使以下 DNA 聚合酶功能必需的序列。包括与模板连接，引物连接，DNTP 连接，3′→5′和 5′→3′核酸外切酶活性、聚合酶活性。

一个有趣的现象是将 SpliNPV DNA 聚合酶的前 80 个氨基酸缺失突变后，对 DNA 聚合酶活性没有影响，表明 DNA 聚合酶的前 80 个氨基酸对体外 DNA 聚合酶活性是非必需的[8]。缺失前 80 个氨基酸的 SpliNPV DNA 聚合酶（Δ80 DNA pol）和 SpliNPV DNA 聚合酶与哺乳动物的 DNA 聚合酶 δ 有相同的生化特性。当用 DNA 聚合酶和 Δ80 DNA pol 进行 DNA 合成时，两者表现相等的活性。表明 DNA 聚合酶 δ 的前 80 个氨基酸也没有催化活性。进一步分析，Δ80 DNA pol 比 DNA 聚合酶 δ 的复制效率低。比较 SpliNPV DNA 聚合酶和哺乳动物的 DNA 聚合酶 δ，发现后者氨基酸序列比前者长 100 个，两个序列的前 80 个氨基酸有所不同。关于 SpliNPV DNA 聚合酶的前 80 个氨基酸在体外 DNA 复制的重要性还需进一步进行研究[8]。

2　杆状病毒 DNA 聚合酶蛋白的功能

杆状病毒 DNA 聚合酶基因属于杆状病毒早期基因，在杆状病毒侵染宿主早期，病毒基因开始表达 DNA 聚合酶[4,9]。DNA 聚合酶是杆状病毒复制的必需蛋白。在有蛋白质合成抑制剂放线菌酮存在的条件下，杆状病毒 DNA 聚合酶基因的转录并不受影响[4,10]。转录分析也表明，DNA 聚合酶基因在病毒侵染后早期表达[4]，早于病毒 DNA

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

复制的起始，因为在DNA复制起始前，病毒感染复数低，且病毒mRNA不能积累，所以它的转录水平非常低[9]。此外，AcMNPV的DNA聚合酶是在含有起始点质粒的昆虫细胞中复制的几个必需基因之一。所有这些证据表明，杆状病毒DNA聚合酶是由杆状病毒在侵染宿主早期由杆状病毒编码的，在DNA复制中起重要作用。

早先研究杆状病毒DNA复制时确认了两种类型的顺式作用元件即同源区和非同源区来起始病毒DNA的复制。DNA复制的非同源区复制原点在AcMNPV，OpMNPV[12]，甜菜夜蛾（Spodoptera exigua NPV，SeMNPV）[13]，SpliMNPV中均有所描述。

Jianhe Huang等在研究SpliNPV E4片断（非同源区原点的结构，344 bp）时，对此片段进行不同长度的缺失，发现起始核心元件定位在E4片断的两个*Hin*dⅢ位点之间。这个区域含有22 bp的不完全回文结构序列（5′CGGtGATCTGGCCAGATCgCCG3′），此序列含有1个NFI转导因子结合位点，若此位点缺失，导致瞬时复制试验和体外原点依赖的复制不能进行。基于这些结果得出，22 bp的不完全回文结构和/或NFI结合位点组成了SpliNPV DNA聚合酶所结合的SpliNPV的DNA的非同源区原点的核心元件。SpliNPV DNA聚合酶能利用这些元件来体外合成DNA。总之，SpliNPV DNA聚合酶与推导的SpliNPV非同源区元件之间有特异的相互作用[8]。

Ijkel等在分析AcMNPV的DNA聚合酶的特性时发现，它除了具有聚合酶活性外，还有3′→5′核酸外切酶活性，但无5′→3′核酸外切酶活性[3]。分析SpliNPV DNA的聚合酶同样具有聚合酶活性，3′→5′核酸外切酶活性；这与DNA的聚合酶δ的特性相同。在AcMNPV基因组中发现了一个大小与哺乳动物鼠增殖细胞核抗原（PCNA）相似，同源性为42%的基因ETL，且病毒的复制依赖于该基因的表达。由此杆状病毒DNA聚合酶蛋白被归属于DNA聚合酶δ[11,14]。AcMNPV的DNA聚合酶对aphidicolin敏感，很容易通过对某些核苷酸的类似物，热稳定性及盐浓度的不同敏感性与宿主的DNA聚合酶相鉴别[4,10]。SpliNPV DNA聚合酶的活性可被aphidicolin阻抑，aphidicolin同样影响3′→5′核酸外切酶活性。SpliNPV DNA聚合酶的3′→5′核酸外切酶活性可被热钝化。在适宜的阳离子浓度下，SpliNPV DNA聚合酶显示高的活性，而在高盐浓度下此活性被抑制[8]。

3 DNA聚合酶作为杆状病毒系统发育的分类依据

杆状病毒的命名是基于形态学和其首次分离时所在的宿主而定的。随着研究的深入，各种杆状病毒在基因组中有序列同源性。如AcMNPV和OpMNPV的DNA聚合酶在瞬时DNA复制中可互换[7]。因而从基因水平上研究杆状病毒的亲缘关系对各种杆状病毒进行分类将更有说服力。此外，研究杆状病毒间的相关性能更深刻地了解病毒的宿主范围，有助于设计未来生物杀虫剂。

通常，杆状病毒的系统发育研究以包涵体蛋白序列为基础进行，Zanotto等揭示在侵染鳞翅目的GV和NPV杆状病毒中，GV在进化中要早于NPV，但是通过将35种以上的杆状病毒的包涵体蛋白作为杆状病毒家系的分类，结果是不理想的。因为此蛋白小(245~250个氨基酸残基)，一半以上的残基固定不变，几乎没有可供系统发育估算的位点。最近，几个egt基因序列在不同的NPV分类群中被测定。用这些数据创建的系统发育树在某种程度上与多角体蛋白分类树相吻合，但Ⅱ类NPV的进一步定位还没能很好地解决。Dieter等利用DNA聚合酶的多肽序列，DNA聚合酶的核苷酸序列分别来估计杆状病毒的系统发育，发现两者有相同的拓扑学结构。相关的粗略的统计学分析证

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

实，DNA 聚合酶比包涵体蛋白在解决分类群的进一步分支关系上更有优势[15]。Nielsen 等根据 DNA 聚合酶基因的系统发育，证实了在地理上不同的两种病毒 Malacosoma californicum pluviale NPV（McplMNPV）和 Malacosoma disstria NPV（MadiMNPV）比其它已测序的杆状病毒的亲缘关系更近，并且形成了一个明显的进化分类支。在此项研究中还发现，简并引物 BVP1 可单独作为从各种 NPV 中扩增 DNA 聚合酶基因有意义区段的一个有利工具[16]。

4 结束语

杆状病毒 DNA 聚合酶基因在 DNA 复制中起至关重要的作用，它的活性直接决定着杆状病毒复制的可能性，起着复制开关的作用。当前杆状病毒 DNA 聚合酶的研究主要集中在基因的定位，测序，同源性比较等方面。通过质粒构建、Back-to-Back 系统、基因库搜索进行。今后仍有必要发掘已测定的 DNA 聚合酶基因的相关的结构特点，探索其它杆状病毒 DNA 聚合酶基因的结构、理化性质、分子水平上的作用机理，来丰富杆状病毒的研究内容。在精确定位杆状病毒系统发育方面，可与包涵体蛋白、egt 基因共同作为分类依据，在分子水平精细地构建进化分类树，期望此特点在设计新型病毒杀虫剂方面作出贡献。

参 考 文 献

[1] Marcy A I, Yager D R, Coen D M. J Virology, 1990, **64**: 2208 ~ 2216.
[2] Kuzio J, Pearson M N, Harwood S H, *et al*. J Virology, 1999, **253**: 17 ~ 34.
[3] Xin H, Linda A. J General Virology, 1999, **80**: 2519 ~ 2526.
[4] Tomalski M D, Wu J G, Miller L K. J Virology, 1988, **167**: 591 ~ 600.
[5] Bjornson R M, Glocker B, Rohrmann G F. J General Virology, 1992, **73**: 3177 ~ 3183.
[6] Liu J J, Carstens E B. J Virology, 1995, **209**: 538 ~ 549.
[7] Ahrens C H, Rohrmann G F. J General Virology, 1996, **77**: 825 ~ 837.
[8] Huang J H, Levin D B. J General Virology, 2001, **82**: 1767 ~ 1776.
[9] Glocke B, Hoopes R R, Rohrmann G F. J Viology, 1992, **66**: 3476 ~ 3484.
[10] 彭建新. 杆状病毒分子生物学. 武汉：华中师范大学出版社，2000.
[11] 张志芳，何家禄，吴祥甫. 蚕业科学，1995，86 ~ 89.
[12] Pearson M N, Bjonson R N, Ahrens C, *et al*. J Virology, 1993, **197**: 715 ~ 725.
[13] Heldens J G M, Broer R, Zuidema D, *et al*. J General Virology, 1997, **80**: 2263 ~ 2274.
[14] O' Reilly D R, Crawford A M, Miller L K. Nature, 1989, **337**: 606.
[15] Bulach D M, Kuma A, Zaia A, *et al*. J Invertebrate Pathology, 1999, **73**: 59 ~ 73.
[16] Niesen C B, Cooper D, Short S M, *et al*. J Invertebrate Pathology, 2002, **81**: 131 ~ 147.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn