

# 家蚕核型多角体病毒 *gp64* 基因的克隆和全序列测定\*

王运湘 李 镇 龙紫新 农 广 王珣章

(中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510275)

**摘 要:** BmNPV *gp64* 基因在杆状病毒分子生物学和杆状病毒表达系统研究中具有重要的作用, 以 AcMNPV *gp64* 基因为探针, 杂交显示 BmNPV *gp64* 基因定位于其基因组 *Bam*HI 酶切的 4.2kb 和 7.4kb 片段上, 克隆阳性片段, 重组质粒分别命名为 pZDBM42 和 pZDBM74。对重组质粒进一步杂交, 将片断更精确定位于 0.45kb 片段、0.75kb 片断上和 1.15kb 片断上, 将三个片断 DNA 进行序列分析, 结果表明: BmNPV 的 *gp64* 基因的开放阅读框(ORF)有 1530 核苷酸, 编码 509 个氨基酸。序列同源性比较显示, BmNPV *gp64* 基因和 AcMNPV *gp64* 基因的核苷酸序列同源性达 84.3%, 氨基酸序列同源性达 94.7%。BmNPV *gp64* 基因 C 端的信号肽序列和 N 端的锚定序列对于 BmNPV 表达系统的改进具有重要的意义。

**关键词:** 杆状病毒, 家蚕, *gp64* 基因, 基因克隆

**中图分类号:** S884.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2000) 01-0038-43

核型多角体病毒在其生活史中存在着两种不同的病毒粒子: 一是包埋的多角体蛋白之中的病毒粒子 PDV(Polyhedrosis Derived Virion), 感染途径是由口服进入中肠再感染细胞; 另一种是在感染细胞中经质膜以“出芽”方式产生的芽生病毒 BV(Budded Virion), 主要是进行血腔和细胞感染<sup>[1~2]</sup>。BV 在胞间具有比 PDV 高得多的传染力是由于其囊膜上有病毒基因编码的膜表面糖蛋白 *gp64*<sup>[2]</sup>, 这种糖蛋白是 BV 感染进入细胞所必需。*gp64* 基因在杆状病毒分子生物学和杆状病毒表达系统研究中具有重要的作用。目前已有三个 *gp64* 基因被鉴定和克隆<sup>[3~5]</sup>, 它们分别来自苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* NPV), 舞毒蛾核型多角体病毒(*Orgyia pseudotsugata* NPV)和云杉卷叶蛾核型多角体病毒(*Choristoneura fumiferana* NPV)。同源性比较显示, 不同种基因间的核苷酸的同源性达 74% 以上, 显示其高度同源。*gp64* 基因在杆状病毒分子生物学和杆状病毒表达载体系统研究中具有重要作用, BmNPV *gp64* 基因 C 端的信号肽序列和 N 端的锚定序列对于 BmNPV 表达系统的改进具有重要的意义<sup>[6~7]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料、质粒和菌株

家蚕核型多角体病毒株 BmNPV 由华南农业大学蚕桑系赠, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株为

\* 国家教委跨世纪人材计划基金资助

**作者简介:** 王运湘(1965-), 男, 安徽省人, 1997 年于中山大学获博士学位, 1998 年 1 月赴美国佛罗里达大学医学院进行博士后研究, 主要从事微生物及分子生物学研究

**收稿日期:** 1998-01-19, **修回日期:** 1998-04-17

本室保存,载体质粒为 pBluescriptM13(+)和 pGEM-7Zf(+).

## 1.2 病毒基因组 DNA 的制备

按严家骥的方法从家蚕核型多角体中提取 DNA<sup>[8]</sup>.

## 1.3 DIG 探针标记和 Southern 杂交

以 AcMNPV 的 *gp64* 基因中保守的 1.3kb 片段为探针,所用的 DIG DNA Labeling and Detection Kit 购自宝灵曼公司,按宝灵曼公司的说明书操作.

## 1.4 DNA 片段的回收和克隆

酶切片段的回收、载体的制备、酶切及转化均按《分子克隆》实验室操作手册说明进行.

## 1.5 重组质粒的纯化及 DNA 序列测定

用购自 SIGMA 公司的 plasmidPURE™ miniprep kit 进行重组质粒的纯化,利用 ABI PRISM™377 型全自动测序仪,进行 DNA 的序列分析.

## 1.6 DNA 和氨基酸序列同源分析

利用 DNASIS 和 PROSIS 软件进行分析

# 2 结果和讨论

## 2.1 BmNPV 基因组的酶切和 DIG 杂交分析

将 BmNPV 基因组 DNA 经 *Eco*RI、*Xba*I 和 *Bam*HI 三种不同的内切酶酶切,结果如图 1-a 所示,酶切产生了大小不等的 DNA 片段.以 1.3kb 的 AcMNPV 的 *gp64* 基因片段作为探针,酶切片段的 DIG 杂交结果见图 1-b,结果显示 BmNPV 有明显的同源性杂交,其中经 *Bam*HI 酶切的片段,出现 4.2kb 和 7.4kb 两个阳性杂交带;*Eco*RI + *Xba*I 双酶切的杂交片段约 10kb 以上.

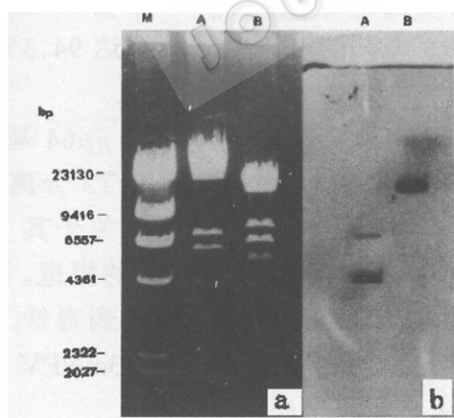


图 1 BmNPV 基因组 DNA 的酶切和 DIG 杂交  
Electrophoretic analysis of BmNP genome; b. DIG hybridization.

Fig.1 DIG hybridization of BmNPV *gp64* gene  
in genome DNA

a. Restriction analysis; b. DIG hybridization.

M:  $\lambda$ DNA/*Eco*RI + *Hind*III; A: BmNPV DNA/*Bam*HI;  
B: BmNPV DNA/*Eco*RI + *Xba*I.

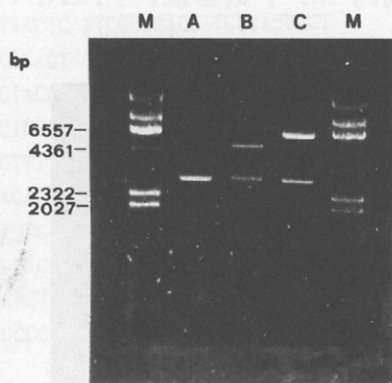


图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig.2 Restriction endonuclease characterization of  
recombinant plasmids

M:  $\lambda$ DNA/*Hind*III; A: pBluescript M13/*Bam*HI;  
B: pZDBM42/*Bam*HI; C: pADBM74/*Bam*HI.

## 2.2 BmNPV *Bam*HI 酶切的 4.2kb 和 7.4kb 片段的克隆

将 BmNPV *Bam*HI 酶切的 4.2kb 和 7.4kb 片段回收,分别克隆到载体 pBluescript (+), pGEM-7Zf(+)上,图 2 的酶切分析显示,所获得的菌株质粒经酶切分别产生约 3.0kb 的载体片段和 4.2kb 的外源片段,及约 3.0kb 的载体片段和 7.4kb 的外源片段,证实已筛选到重组质粒,并分别命名为 pZDBM42 及 pZDBM76。

## 2.3 pZDBM42, pZDBM76 的 DIG 杂交和酶切图谱分析 DIG 杂交

以 *Sal*I, *Bam*HI 等酶切 pZDBM42, pZDBM76, 再进行 DIG 杂交,在 pZDBM42 的 *Bam*HI + *Sal*I 酶切出现单一 1.9kb 的阳性带,在 pZDBM76 的 *Bam*HI + *Sal*I 酶切出现单一 0.45kb 的阳性带(图略)。

## 2.4 pZDBM19, pZDBM045 的克隆及序列测定

将 pZDBM42 的 *Bam*HI + *Sal*I 1.9kb 双酶切片段及 pZDBM76 的 *Bam*HI + *Sal*I 0.45kb 双酶切片段,分别克隆到 pBluescript M13(+)载体质粒,并分别命名为 pZDBM19 及 pZDBM045。pZDBM19 及 pZDBM045 的酶切鉴定见图 3。pZDBM19 再以 *Sal*I + *Pst*I 双酶切得到 0.75kb 和 1.15kb 二片段,分别克隆到 pBluescript M13(+)载体质粒,命名为 pZDBM075 和 pZDBM115。利用 ABI PRISM™ 377 型全自动测序仪读取 pZDBM045, pZDBM075 和 pZDBM115 三段 DNA 的全序列。BmNPV *gp*64 基因的全序列如图 4 所示。

## 2.5 BmNPV *gp*64 基因的序列分析

将读取的 pZDBM045, pZDBM075 和 pZDBM115 三段 DNA 全序列,用 DNASIS 软件和 PROSIS 软件与 AcMNPV *gp*64 基因进行比较分析,确定 BmNPV 的 *gp*64 基因的开放阅读框(ORF),BmNPV 的 *gp*64 基因的开放阅读框有 1530 核苷酸,编码 509 个氨基酸。两种基因间的核苷酸的同源性达 84.7%,显示其高度同源。BmNPV 的 *gp*64 基因的 ORF 编码 509 个氨基酸,与 AcNPV *gp*64 基因 ORF 编码的氨基酸同源性达 94.3% (图 5)。

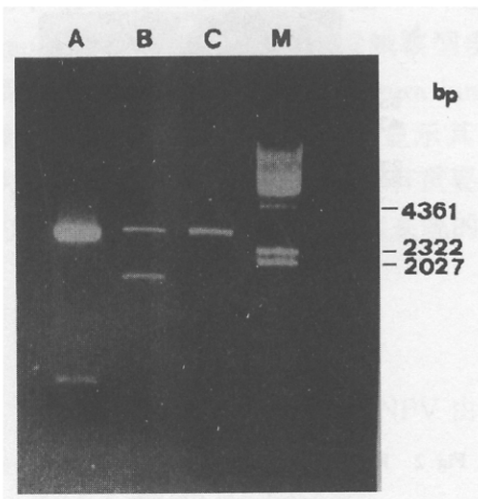


图 3 亚克隆质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Restriction enzyme characterization in subcloning plasmids

A: pZDBM19/ *Bam*HI + *Sal*I; B: pZDBM045/ *Bam*HI + *Sal*I; C: pBluescript M13(+) / *Bam*HI + *Sal*I; M: ADNA/ *Hind*III.

关于家蚕核型多角体病毒 *gp*64 基因的研究,目前只有 Maeda 报道了 T3 分离株的基因组全序列<sup>(9)</sup>,尚没有专门关于其 *gp*64 基因的克隆、功能和表达调控的报道。本研究利用我国分离到的 BmNPV 病毒株,进行了基因定位,并克隆了完整的 BmNPV *gp*64 基因,并进行了全序列分析。

*gp*64 蛋白在核型多角体病毒芽生病毒感染细胞过程中,是膜融合作用的决定因子,它也是芽生病毒囊膜上唯一由病毒基因编码的蛋白,而囊膜则起源于细胞膜, *gp*64 基因序列分析显示,基因中的外作用区域(ectodomain)存在两个主要功能区,区段 I 是膜融合位点,区段 II 是蛋白寡聚化和膜转运

```

1 TTGTCGACGC CGGCTGTAAAC GCGGCTTGT TGCATACAGC ATTCGAAGCC ATCATTAAAA
61 TGGGCGCGCT ACAGGTGGAA AGCGACTATC CATACGAAGC AGACAATAAC AATTGCCGTA
121 TGAACCTAA CAAGTTTCTA GTTCAAGTAA AAGATTGTTA TAGATACATT ATCGTGATCG
181 AGGAAAAACT TAAAGATTTG TTACCCCTTG TCGGCCCTAT TCCTATGGCC ATAGACGCTG
241 CCGACATTGT TAACATATAA CAGGCTATTA TAAAATATTG TTTGCGACGC GGTCTAAACC
301 ATGCGGTTCT TTTAGTGGGT TATGGTGTG AAAACAACAT TCCGTATTGG ACCTTTAAAA
361 ACACCTGGGG CACGGATTGG GGAGAGGACG GATTTTTCAG GGTACAACAA AACATAAACG
421 CTTGTGGTAT GAGAAACGAA CTTGCGTCTA CTGCAGTCAT TTATTAATCT CTCGCTATTT
481 GGAACATAAT CATATCGCCT AAGATATTTT GTAATTAAT ATACAATTAA AAACATATACA
541 ATTTTTTTTA TTAACAATAA TGATACAATT TTTATTAFTA CATTTAATAT TGTCTACTAT
601 TACGGTTTCT AACCATACAG TACAAAAATA AAATTACAAT AAATACAATT ACAAAAAGTGG
661 CTACATGACC AAACATGAAC GAAATCAATT TGGCGGCCAA TTGCGCTTCA GCCATGGAAG
721 TGATGTCGTT CAGACTGGTA CCGACGCGCG CAAACTTGGT GTTCTCCATG GTGGTTATGA
781 GATTGCTTTT TTGTTGGGCA ATAAACGACC AACCGCTGGC ATCTTTCCAA CTGTCGTGAT
841 AGGTTGTGTT CCGCATGGTC GGAATCCAAA ATTCGACGTC GTCGTGGATT GCTAGTTCCT
901 TGTAGTTGCT AAAATCTATG CATTGCGACG AGTCCGTGTT GCGCACCCAA CGCCCTTCTT
961 TGTAATAGCT GTTGTGTAG CAATTACTGG TGTGTGCCGG CGGATTGGTG CACGGCATCA
1021 GCAAAAACGT CTCGTCCGAC AAAAATGTTG AAGAAACAGA ATTGTTCTAG AGATTGCCAA
1081 TCAAAACGTC GTCCACCTTG GCCACGGAAA CTATCAGGTC GTGCAGCATA TTGTTTATCT
1141 TGTGATATG CGCATGCATC AGCTCAATGT TCATTTTCAG GAAATCGTTT TCGTACATCA
1201 GCTCCTCTTG AATATGCATC AGGTCGCCTT TGGTGGCAGT GTCTCCTTCT GTGTACTTGG
1261 CTCTAACGTT GTGGCGCCAA GTGGGTGGCC GTTCTTGAC TTGGTGCTCG ACTTTACGTT
1321 TAATGCATCT GTTAAACCTG CAATCCACG TGTTTTAGA AAGATCATAT ATATCATTGT
1381 CGATCAACA GTGTTCCGCT GTCACCGATT CGGGGTATT TTTGTCATCT TTAATGAGCA
1441 GACACGCAGC TTTTACTTGG CCGGTGGGGA ACCTAGACTT TTGTTTGAGA ATCATACTCA
1501 CGCCGTCTCG ATGAAGCGCA GTGTCCACGG TCACGTTAAT GGGGTGCCC TCAGCGTCCA
1561 AAATGTATAC CTGACACTCG TCGGTGTCGT CGTGCCACTC GAGCCTGCTG TACATTTTCG
1621 AAGTAGAAAC GCGGCATCGC CACGATTTGT TGCACGTGTG GTACGCAAAAG TGATGTTAT
1681 TGTGCCGTTT CACCAACTCT TTGCGTTTGA CCCACTGGCC GCGGCCCTCG TTGTCGGGAA
1741 AACACTCTTC GCTGTCACTG CCGCAACGGT CGATTAACTC TTGCGCCACC TCGCACTGCT
1801 GCCTGATACC CCACATGAGC AAATCTTCTT TGCCACAGT CAGCGTTTTC ATGGATTCTT
1861 CGACGCGTGT GTTGGGATCC AGCGAGCCTC CGTTGTACGC ATACGCTGG TAGTACCCCT
1921 TGAGCCAAT AATCAGTTT TCGTTGTAGT CCGTCTCCAC GATGGTGATT TCCACGTCTT
1981 TTTGCAGCGT TTCCTTGGGC GGGGTAATGT CCAAGTTTTT AATTTGTAC GGACCGTTT
2041 TCATTTGCGC GTTGCAGTGC TCCGCCGCAA AGGCAGAATG CCGCGCCGCC AAAAGCACGT
2101 ATAAAACAAT AGCGCCTACC ATCTCGCTTG TGTCTTCTT ATCGAAGCCT TGGTATGACT
2161 GATTTACTAG TAGCATTGAG GCATCTTATA TACCCGACCG CTATTTGCC ACCTGACACA
2221 AGGCACGTTG TTAATTAAT AATTCTATCT TTTATCTTA ATTGTAAGAT TATTTTATC
2281 TCGCTGTTAT AAAACCGGA TTATGAAAAC GGACGCCAG TCGACA

```

图 4 BmNPV *gp64* 基因 DNA 的全序列

Fig. 4 Nucleotide sequence of the BmNPV *gp64* ORF. Sequence of the plus strand is shown from left to right, relative to the standard AcMNPV map (Vlak & Smith 1982).

功能区<sup>(10)</sup>。*gp64* 基因在杆状病毒表达系统有重要的应用: 1). *gp64* 基因的信号肽序列可融合外源基因, 将异源表达蛋白分泌到胞外, HIV-1 gp120 蛋白, IL-1 受体蛋白和表面金属蛋白酶 gp63 与 *gp64* 基因的信号肽序列融合表达, 其表达量都得到明显的提高。2). *gp64* 基因的区段 II 可融合外源基因, 异源表达的融合蛋白中 *gp64* 蛋白的区段 I 膜

	10	20	30	40	50	60
ACNPV. AMI	MVSAIVLYVLLAAAAHSAFAAAEHCAQMKTGPKYIKNLDITPPKETLQKDVEITIVETDY					
	X:::.....					
GP64. AMI	MVGAIVLYVLL-AAAHSFAAAEHCAQMKTGPKYIKNLDITPPKETLQKDVEITIVETDY					
	20	30	40	50	60	70
	70	80	90	100	110	120
ACNPV. AMI	NENVIIIGYKGYQAYAYNGGSLDPNTRVEETMKTNLVKGEDLLMWSIRQQCEVGEELIDR					
	.....					
GP64. AMI	NENVIIIGYKGYQAYAYNGGSLDPNTRVEESMKTNLVKGEDLLMWGIRQQCEVGEELIDR					
	80	90	100	110	120	130
	130	140	150	160	170	180
ACNPV. AMI	WGSDSDDCFRDNEGRGQWVGKELVKRQNNHFAHHTCNKSWROGISTSKMYSRLECODD					
	.....					
GP64. AMI	WGSDSEECFRDNEGRGQWVGKELVKRQNNHFAHYTCNKSWROGVSTSKMYSRLECHDD					
	140	150	160	170	180	190
	190	200	210	220	230	240
ACNPV. AMI	TDECQVYILDAEGNPINVTVDTLHRDGVSMILKQKSTFTTRQIKAACLLIKDDKNNPES					
	.....					
GP64. AMI	TDECQVYILDAEGNPINVTVDTLHRDGVSMILKQKSTFTTRQVKAACLLIKDDKNNPES					
	200	210	220	230	240	250
	250	260	270	280	290	300
ACNPV. AMI	VTREHCLIDNDIYDLSKNTWNCNFNRCIKRKVEHRVKKRPPTWRHNVRAKYTEGDTATKG					
	.....					
GP64. AMI	VTREHCLIDNDIYDLSKNTWNCNCFNRCIKRKVEHQVKKRPPTWRHNVRAKYTEGDTATKG					
	260	270	280	290	300	310
	310	320	330	340	350	360
ACNPV. AMI	DLMHIQEELMYENDLLKMIELMHAHINKLNMLHDLIVSVAKYDERLIGNLMNNSVSST					
	.....					
GP64. AMI	DLMHIQEELMYENDLLKMIELMHAHINKINNMLHDLIVSVAKYDERLIGNLMNNSVSST					
	320	330	340	350	360	370
	370	380	390	400	410	
ACNPV. AMI	FLSDDTFLMPCTNPPAHTSNCCYNNSIYKEGRWVANIDSSQCIDFRNYKELAI-HDVEFW					
	X:::.....					
GP64. AMI	FLSDDTFLMPCTNPPAHTSNCCYNNSIYKEGRWVANIDSSQCIDFSNYKELAI-DDDVEFW					
	380	390	400	410	420	430
	420	430	440	450	460	470
ACNPV. AMI	IPTIGNTTYHDSWKDASGWSFIAQQKSNLITTMENTKFGGVGTSLSDITSMAEGELAACL					
	.....					
GP64. AMI	IPTIGNTTYHDSWKDASGWSFIAQQKSNLITTMENTKFGGVGTSLNDITSMAEGELAACL					
	440	450	460	470	480	490
	480	490	500	510		
ACNPV. AMI	TSFMFGHVVFVILIVILFLYQMRNRN-RQY					
	.....					
GP64. AMI	TSFMFGHVATEVIVFIVILFLYQMRNRNSRQY					
	500	510	520	530		

图 5 BmNPV gp64 基因与 AcMNPV gp64 基因氨基酸序列的比较

Fig.5 Alignment of predicted amino acid sequence of AcMNPV and BmNPV gp64 gene. Only mismatched residues in AcMNPV are shown. the sequence are 94.7 identical

融合位点将固定在病毒粒子囊膜上,便于蛋白的纯化。Grabherr R 等(1997)将 HIV-1 gp41 融合到 *gp64* 基因,提纯的重组病毒即可进行 ELISA 检测。3)由于 *gp64* 蛋白在膜融合过程中所起的作用,本实验室正利用 *gp64* 蛋白与杀虫晶体蛋白构建嵌合蛋白,对于改变膜融合机制、扩大杀虫寄主范围,将会产生有意义的结果。同时,我们还发现,*gp64* 蛋白作为芽生病毒囊膜唯一病毒编码的蛋白,在病毒侵染细胞过程中,是细胞与病毒发生接触的第一个病毒来源的信号,其作用可能并不限于膜融合作用,还可能参与到细胞凋亡作用过程,其在细胞凋亡机制中可能起到的作用正引起我们注意。

## 参 考 文 献

- [1] Granados R R, Federici B A. The biology of baculovirus. CRC Press, 1986, 89~108.
- [2] Keddie B A, Volkman L E. *J Gen Virol*, 1985, **66**:1195~2000.
- [3] Whitford M, Stewart S, Kuzio J, et al. *J Virol*, 1989, **63**:1393~1399.
- [4] Blissard G W, Rohrmann G F. *Virology*, 1989, **170**:527~555.
- [5] Hill J E, Faulkner P. *J Gen Virol*, 1994, **75**:1811~1813.
- [6] Grabherr R. *Biotechniques*, 1997, **22**(4):730~735.
- [7] 农 广, 庞 义. 中山大学学报, 1997, **36**(3):61~66.
- [8] 严家骥. 病毒学集刊, 1982, **1**:153~161.
- [9] Maeda S. *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (individual isolate T3) DNA, complete genome. (unpublished, from Genebank)
- [10] Monsma S A, Blissard G W. *J Virol*, 1995, **69**:2583~2595.

## THE IDENTIFICATION OF BmNPV *gp64* ENVELOPE GENE

Wang Yunxiang Li Zhen Long Qixin Nong Guang Wang Xunzhang

(State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

**Abstract:** *gp64* glycoprotein, an abundant and the only membrane glycoprotein encoded by the baculovirus genome, contains a signal peptide sequence at N-terminus, a transmembrane anchor at C-terminus and a ectodomain between them. The efficient signal sequences and the transmembrane anchor sequences of AcMNPV *gp64* gene have been exploited in baculovirus expression system. Using 1.3kb AcMNPV *gp64* gene coding sequence as the probe, the nucleotide sequence of BmNPV *gp64* gene was determined, and a 1530 nucleotide open reading frame flanked by an AT-rich sequence was identified that could encode a polypeptide with 509 amino acid residues. Computer analysis indicated BmNPV *gp64* gene is 84.3% identical to AcMNPV at the level of nucleotide sequence and 94.7% identical at the level of predicted amino acid sequence.

**Key words:** Baculovirus, *Bombyx mori*, *gp64* gene, Gene cloning