

斜纹夜蛾核型多角体病毒 II ORF146 基因的克隆、表达与启动子活性分析

盛晔^{1,2}, 闵丹^{1,2}, 李轶女², 张志芳², 朱越雄¹, 朱江^{1*}

(¹ 苏州大学医学部基础医学与生物科学学院, 苏州 215123)

(² 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要:【目的】研究斜纹夜蛾核型多角体病毒 II ORF146 基因的结构与功能。【方法】根据 SpltMNPV II ORF146 基因序列设计引物, 经 PCR 扩增克隆 ORF146 基因。在生物信息学分析基础上进行启动子活性分析和转录时相分析。构建 ORF146 片段的原核表达载体, 表达并纯化融合蛋白后制备多克隆抗体。【结果】核苷酸序列分析表明, 读码框含 1383 bp, 编码 460 个氨基酸的蛋白质, 推定分子量为 50.4 kDa。启动子活性分析和转录时相分析都表明该基因是个早、晚期都表达的基因, 在病毒感染 8 h 和 18 h 有两个转录峰, 24 h 以后转录水平略有下降, 但趋于稳定。pET-28a-ORF13 原核表达的融合蛋白经纯化后制备的多克隆抗体特异性高, 效价可达 1:3200 以上。【结论】SpltMNPV II ORF146 基因是一个早期和晚期都表达的病毒组成型结构蛋白基因。推测 ORF146 基因可能与 SpltMNPV II 病毒感染宿主细胞后病毒 DNA 复制有关。制备的多克隆抗体可用于深入研究该蛋白的生物学特性与功能。

关键词: 斜纹夜蛾; 核型多角体病毒; ORF146 基因; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 12-1600-07

斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*, Spli) 又名莲纹夜蛾, 俗称夜盗虫^[1], 属鳞翅目夜蛾科的一种杂食性重要农业和林业害虫, 危害植物共计 109 科 389 种, 中国、日本、朝鲜、印度以及东南亚地区经常造成严重危害和巨大经济损失^[2-3]。由于斜纹夜蛾的食性杂、世代重叠、抗性强的特点, 因此防治难度大, 在各种化学合成杀虫剂严重污染环境以及害虫对化学合成杀虫剂抗性日益增强的情况下, 生物防治愈显重要和迫切^[4]。包括中国在内的各国学者, 长期致力于发展核型多角体病毒 (nucleopolyhedrovirus, NPV) 生物杀虫剂来防治农业和森林害虫。斜纹夜蛾核型多角体病毒 (*Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus, SpltMNPV) 作为商品化杀虫剂已在我国一些地方推广使用, 但杀虫作用的迟效性, 宿主域窄等缺

点是发展 NPV 生物杀虫剂的主要障碍, 一些研究正试图通过分子生物学和基因工程技术来克服这些主要障碍^[5-6]。从自然界中寻找和筛选新的高毒力的病毒株系是开发 NPV 生物杀虫剂的另一重要途径^[7]。Kamiya K 等本世纪初从日本全国各地野外感病幼虫收集、分离到 189 个 SpltMNPV 克隆, 筛选并鉴定出三种基因结构类型 (A、B、C)^[8]。对上述三种基因结构型病毒 DNA 限制性核酸内切酶酶切图谱的比较研究表明^[8], A 型 SpltMNPV 与斜纹夜蛾的近缘种 *Spodoptera littoralis* NPV (SLNPV-D) 和 SLNPV-B 相似, B 型 SpltMNPV 与在中国、日本、菲律宾的斜纹夜蛾 (*S. litura*) 幼虫中鉴定的 SpltMNPV 相似^[9-11], 而 C 型 SpltMNPV 的与 A 型和 B 型的都不同。进一步的生物学特性和致病性研究表明, C

基金项目: 国家自然科学基金 (30770279); 苏州市科技支撑计划项目 (SNG0924)

* 通信作者。Tel: +86-512-65880278; E-mail: zjiang@suda.edu.cn

作者简介: 盛晔 (1981-), 男, 常州市人, 博士研究生, 昆虫病毒分子生物学。E-mail: shegnye1981@163.com

收稿日期: 2010-07-21; **修回日期:** 2010-09-20

型 SpltMNPV 的 C3 株是一种繁殖率和毒力极强的新的病毒变异株^[8]。李轶女测定并分析了这一病毒株的基因组全序列(GenBank 登录号: NC_011616)。通过与其他几种代表性杆状病毒基因组的比较,发现它与具有相同宿主来源的中国株 SpltMNPV G2 (SpltMNPV I) 存在着非常显著的差异,却与甜菜夜蛾核型多角体病毒(SeMNPV) 比较接近。是一种新的具有重要研究价值的病毒变异株,故命名为 SpltMNPV II^[12]。质谱分析表明,在 SpltMNPV II 的 149 个 ORF 中,ORF146 是同时存在于 ODV 和 BV 中的功能未知的基因。本研究从该病毒基因组中克隆了 ORF146 基因,进行了序列分析、转录时相分析和启动子活性分析;并对 ORF146 基因进行了大肠杆菌融合表达,纯化了表达产物、制备了多克隆抗体。上述成果为进一步研究病毒基因组的变异与生物学特性的关系、侵染机制、研究和开发新的高效生物病毒农药打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株、Spli 细胞系、质粒和菌株: SpltMNPV 的 C3 株即 SpltMNPV II 原始细胞纯化毒株由 Kamiya K 博士馈赠,本实验室保存。斜纹夜蛾 TUAT-Spli221 细胞由日本名古屋大学资源昆虫研究室 Michihiro Kobayashi 教授提供,本实验室保存。载体质粒 pMD-18T Vector 为 TaKaRa 公司;表达载体 pET-28a⁺、受体菌 *E. coli* TOP10 和 BL21(DE3) 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: PCR 仪为 Thermolyne 公司产品;U-3010 紫外-可见分光光度计为 HITACHI 公司产品;高速冷冻离心机为 Hereaus 公司产品;凝胶成相系统为 Gene Genius 公司产品。Lucifrase analysis kit 为 Promega 公司产品;Lipfect 2000 为 Invitrogen 公司产品。TC-100 培养基为 GIBCO BRL 公司产品。

1.2 多角体纯化

斜纹夜蛾细胞 Spli 用含 10% FBS 的 TC-100 培养基 27℃ 培养。在斜纹夜蛾幼虫 5 龄初期注射感染细胞纯化毒株(BV),让病毒在虫体内繁殖扩增。待其发病后收集感染病虫的尸体进行研磨,用蒸馏水反复清洗,利用差速离心的方法纯化多角体病毒^[13,14]。

1.3 SpltMNPV II 基因组 DNA 的提取

根据 Wu. F 等的方法^[15],略作改进。(1)取适

量纯化好的多角体病毒,加入 750 μL 裂解液(0.1 mol/L Na₂CO₃; 0.17 mol/L NaCl; 0.01 mol/L EDTA; pH 10.5),混匀后 37℃ 下裂解 1 h; (2)用 0.1 mol/L HCl 慢慢将溶液的 pH 调至 8.0; (3)加 Sarcosyl 至终浓度为 0.5%,Proteinase K 至终浓度为 0.25 g/L,混匀后 37℃ 放置 2 h 后,65℃ 放置 2 h; (4)用等体积的酚-氯仿进行抽提; (5)用 2 倍体积的冰无水乙醇沉淀 DNA (-20℃, 30 min); (6)用 70% 乙醇洗 1 次,然后晾干; (7)用适量 0.1 × TE 溶解 DNA 沉淀,4℃ 保存备用。

1.4 ORF146 基因序列分析

利用在线工具 MotifScan online (<http://www.expasy.org/tools>) (Falquet et al., 2002) 分析蛋白序列信息, Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (<http://smart.emblheidelberg.de/>) (Schultz et al., 1998; Letunic et al., 2004) 预测结构域,功能 motif,翻译后修饰位点等信息。

1.5 ORF146 启动子活性分析

设计引物 (pGL-146PF: 5'-GACTCGAGAGCC AACCCAAGTATCAGT-3', pGL-146PR: 5'-TCAAGC TTAATTTTGAA TCTTACTAAAGTTCTACGC-3', 下划线表示酶切位点) 克隆 ORF146 基因上游 300 bp 的启动子区,与 pGL-3 Basic 连接得到质粒 pGL3-146p。将 1 μg pGL3-146p 用脂质体包裹后转染 24 孔板,每孔中有 1 × 10⁵ Spli 细胞,其中一份样品加 SpltMNPV II 病毒,一份不加。以转染 pGL-3 Basic 作对照,平行重复 3 次,28℃ 培养 48 h 后用 Lucifrase analysis kit (Promega 公司) 进行检测。

1.6 ORF146 基因转录时相分析

SpltMNPV II 病毒以 MOI = 10 感染 Spli 细胞,然后提取感染后不同时间点(0、2、4、8、12、18、24、36、48 h)的总 RNA。具体的操作步骤参考 Trizol 试剂产品操作说明进行。先收集每个时间点上的 Spli 细胞,加入 1 mL Trizol,剧烈振荡充分混匀后室温放置 5 min;加入 0.2 mL 的氯仿充分震荡 20 s,室温放置 2 min;4℃,12000 × g 离心 15 min;取上清加入 0.5 mL 的异丙醇,混匀后室温放置 15 min;4℃,12000 × g 离心 10 min;沉淀以 70% 乙醇洗 1 次,室温晾干后溶于适量 DEPC 水中,-80℃ 保存。以紫外分光光度计(260 nm)吸收值测定所抽总 RNA 的浓度。以 Oligo dT 为引物进行反转录,反转录反应条件:30℃ 10 min;42℃ 1 h,70℃ 15 min;4℃ 5 min,得到的 cDNA 以特异引物 (P146-5: 5'-GCTACAACGAGATCGTCATAGATCG-3', P146-6: 5'-

CGGTATGAGGCGATAGTGAAAGTAC-3') 和 10 ng 总 RNA 的转录产物的 cDNA 为模板,以相当量的总 RNA 为对照进行 Real time PCR,反应条件为 95°C 3 min;95°C 20 s,58°C 20 s,72°C 30 s,40 个循环;熔解曲线从 55°C 到 95°C,每 0.5°C 读取 10 s。

标准曲线制作: Realtime-PCR 产物经电泳回收,测其 OD_{260} ,由 1 OD_{260} 相当于 50 mg/L 双链 DNA,用 DNASTAR 软件计算相应的分子量,计算出 10^8 个基因拷贝数所需回收产物的体积,并按每 μL $10^{11} - 10^7$ 个拷贝进行梯度稀释作为标准样进行荧光定量 PCR。以所得 Ct 值对相应的拷贝数的对数作图,即得各个基因扩增的标准曲线及其线性方程 $y = ax + b$ 。对荧光定量 PCR 结果进行绝对定量分析,根据标准曲线方程计算 x 值,则待测基因的拷贝数 $Y = 10^x$ 。

1.7 ORF146 基因的原核表达

以 SpltMNPV II 基因组为模板,以 (ORF146-1: 5'-CGAATTCTTGAAAGACGACGGTGTGT-3',酶切位点为 *EcoRI*,下游引物 ORF146-2: 5'-GAAGCTTCTATTCGACATGAGCAACAATCTG-3',酶切位点为 *HindIII*) 为引物克隆 ORF 146 基因开读框部分约 600 bp 的编码序列,扩增条件: 94°C 5 min;94°C 40 s,58°C 40 s,72°C 40 s,31 个循环;72°C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,用玻璃奶回收法将 PCR 产物 DNA 片段回收,然后连接至 pMD-18T,构建成重组质粒 pMD18T-ORF146,并进行测序鉴定。经测序鉴定后再用 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切,回收目的条带,与原核表达载体 pET-28a⁺ 连接,转化至大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中,得到表达载体 pET-28a-ORF146,并再次双酶切鉴定。DNA 连接转化、质粒制备与纯化、限制性核酸内切酶酶切均按 Sambrook 等方法进行^[16]。重组的原核表达质粒 pET-28a⁺-ORF146 经鉴定正确后,将其转化大肠杆菌 BL21,挑取单个菌落接种 4 mL LB 培养基 (Kan⁺) 中,37°C 继续振荡培养 2 h 后 (OD_{600} 值大约为 0.6 左右),用 IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L 诱导表达目的蛋白,诱导时间分别为 1、2、3、4、5 h。收集菌体进行 SDS-PAGE 分析,分离胶和浓缩胶配制参照分子克隆手册第三版,浓度分别为 15% 和 5%。电泳完毕后用考马斯亮蓝 R-250 染色 2 h,然后脱色直至蛋白质条带清晰可见为止。

1.8 pET-28a-ORF146 融合蛋白的纯化和鉴定

大肠杆菌表达产物融合蛋白通过 Ni-NTAHis-tag(上海闪晶分子生物科技有限公司)亲和柱纯化,

方法见其 Ni-NTA 树脂使用说明书。纯化产物通过 SDS-PAGE,切成 1 mm³ 的小胶块进行质谱分析。质谱分析在中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室完成,方法为二级质谱的数据库搜索鉴定法 (MS/MS Database Searching)。

1.9 多克隆抗体的制备

质谱分析鉴定正确后的纯化融合蛋白送中国科学院遗传与发育研究所,免疫豚鼠制备多克隆抗体。免疫共四次,每次免疫时间为十天,待四免结束后取血清即为目的蛋白的多克隆抗体。二抗和显色剂分别为羊抗豚鼠 IgG-HRP 和 HRP-BAD 底物显色试剂盒(北京博奥森公司)。

1.10 多克隆抗体效价及特异性的检测

多克隆抗体的效价使用 ELISA 间接法测定;抗体特异性采用 Western blot 检测。

2 结果

2.1 SpltMNPV II ORF146 基因序列分析

序列分析表明,该基因涵盖了 1383 bp 的读码框,编码 460 个氨基酸,理论预测蛋白分子量为 50.4 kDa。GenBank 登录号为 NC_011703。起始密码子 ATG 上游发现有一个 TATA box,位于 -151 nt 处;在 -59 nt 处,发现有一个晚期启动子基序 ATAAG。SMART (Simple Modular Architecture Research, Tool, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析结果显示,该蛋白在 5-71 位之间为 HTH_XRE 结构域,48 - 120 位之间为 PA2c 结构域,54 - 187 位之间为 FBG 结构域,60 - 91 之间为 ZnF_A20 结构域,173 - 232 之间为 LIM 结构域,188 - 409 之间为 PIPKc 结构域。各结构域的功能参见表 1。

表 1 SMART 预测蛋白结构功能域

Table 1 Predict the structural and functional domains using SMART

Domain	Amino acid sites	Domain function
HTH_XRE	5 - 71	Involved in transcription regulation
PA2c	48 - 120	Phosphatase binding
FBG	54 - 187	Involved in signal transduction
ZnF_A20	60 - 91	DNA binding, zinc ion binding
LIM	173 - 232	Zinc ion binding
PIPKc	188 - 409	Kinase binding

2.2 ORF146 基因启动子活性分析

Spli 细胞转染 pGL3-146p 质粒 48 h 后,用光量子计分别检测 24 孔板每个样品孔的光量子数 CPM,在不加 SpltMNPV II 病毒的样品组中,光量子数较对照组提高了近 2 倍,说明宿主细胞可以直接识别该基因的启动子,该启动子具有早期启动子的

特性。在加 SpltMNPV II 病毒的样品组中,其光子数有大幅度的增加,高达 15 倍左右,说明该基因启动子的转录活性能被病毒编码的反式因子所激活(图 1),因此,ORF146 基因很可能是一个在病毒感染的早期和晚期都能有效表达的基因。

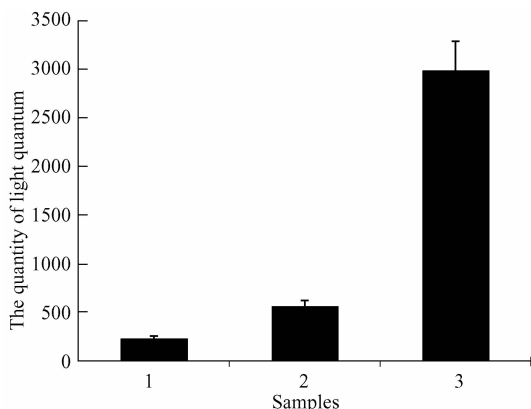


图 1 ORF146 基因启动子活性分析

Fig. 1 Promoter analysis of ORF146 gene. 1. Mock; 2. Transfecting pGL3-146p DNA without infection of SpltMNPV II; 3. Transfecting pGL3-146p DNA with infection of SpltMNPV II.

2.3 ORF146 基因转录时相分析

由图 2 可见,ORF146 在病毒感染后 2 h 即有转录,在 8h 和 18h 有两个转录高峰,24 h 以后转录水平略有下降,但趋于稳定。ORF146 在病毒感染的早期和晚期都有转录。

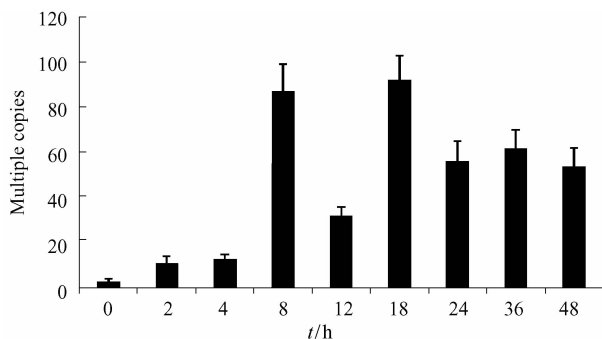


图 2 病毒感染后各时相 ORF146 转录变化趋势图

Fig. 2 The transcriptional changes trends of the ORF146 gene.

2.4 重组质粒 pET-28a-ORF146 的诱导表达

表达质粒 pET-28a-ORF146 经 PCR 扩增及酶切后,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,均出现 1 条约 600 bp 的特异条带(图 3),构建载体测序结果与电子克隆获得的基因序列进行比较,结果表明两者完全一致,由此证明,成功克隆了 SpltMNPV II ORF146 的部分序列 ORF146。

重组质粒 pET-28a-ORF146 在大肠杆菌 BL21 中通过 IPTG (1.0 mmol/L) 诱导融合表达,诱导时间

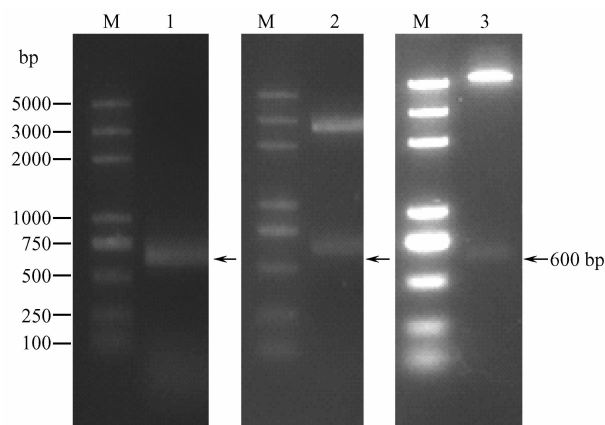


图 3 ORF146 部分序列的克隆与载体构建鉴定

Fig. 3 PCR and Restriction analysis of pET28a-ORF146. M. DL2000 DNA Marker; 1. PCR products of ORF146; 2. Restriction identification of pMD18T-ORF146; 3. Restriction identification of pET-28a-ORF146.

为 1、2、3、4、5 h,结果表明在 30 kDa 下方有目的蛋白的融合表达(图 4)。由于选取 ORF146 部分序列,ORF146 的 N 端融合了 His-Tag 序列,融合蛋白的分子量应为 27.6 kDa 左右,所以表达的融合蛋白分子量与理论预测值相符,而且该条带是对照组(条带 1 和 2)中所没有的。SDS-PAGE 结果显示,在 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L,目的蛋白在诱导 1 h 时已开始表达,4 h 时后表达量已达最高。如图 4 所示,由于目的蛋白表达量较高,以包涵体的形式存在于胞内,经破碎后,都存在于包涵体沉淀中,上清中几乎没有。

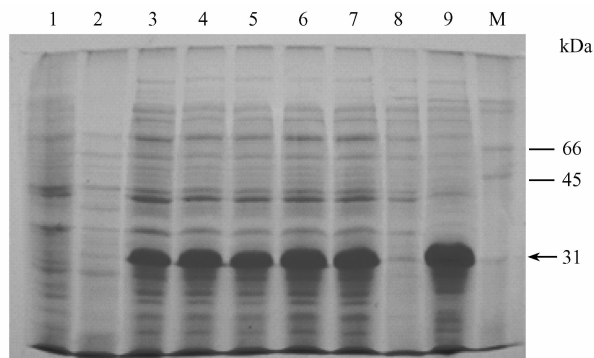


图 4 pET-28a-ORF146 在 BL21 中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Analysis of ORF146 protein expressed in BL21 cell by SDS-PAGE. M. Protein Marker; 1. BL21 with pET-28a; 2-7. Induced by IPTG after 0、1、2、3、4、5 h; 8. Supernatant after cell lysis; 9. sedimentation after cell lysis.

2.5 纯化表达产物的质谱分析

大肠杆菌表达产物融合蛋白通过 NiNTA His-

tag 亲和柱纯化后,通过 SDS-PAGE 切成 1 mm^3 的小胶块,进行质谱分析。经过二级质谱的数据库搜索鉴定法 (MS/MS Database Searching) 分析 (图 5),结果显示,在 XC 值高达 3.738 时,每一段氨基酸片断仍至少有连续 15 个氨基酸能够完全与目的片段的

序列匹配,比可信最低标准的 6 个氨基酸多出 9 个氨基酸,而且有 5 段肽段能够匹配得上。能够检测出来的氨基酸序列与预期序列匹配率高达 55.36%,所以能够确定纯化蛋白就是目标基因 ORF146 部分序列的表达产物。

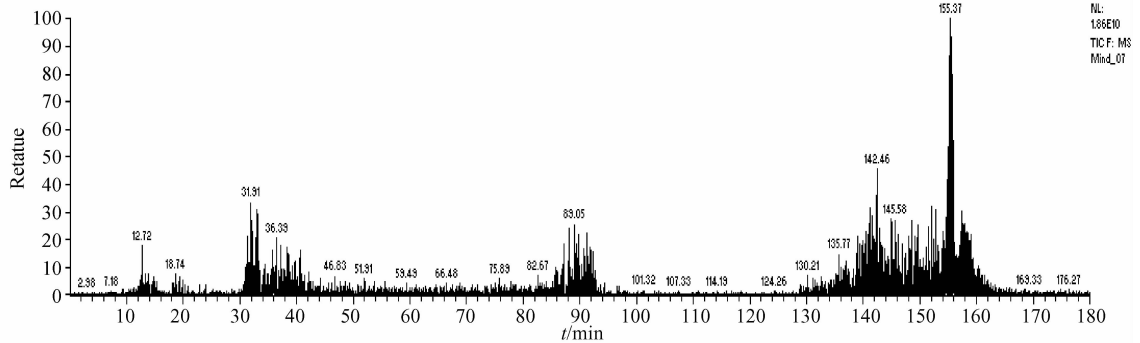


图 5 融合蛋白质谱分析结果图

Fig. 5 MS/MS Database Searching results.

2.6 ELISA 检测多克隆抗体的效价

待免疫 4 次豚鼠后,取少量血清用于 ELISA 检测抗体效价。从图 6 可以看出,制备的多克隆抗体的效价可达 1:3200 以上。

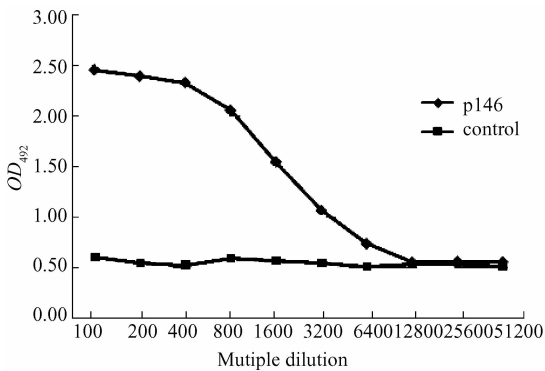


图 6 ELISA 测定多克隆抗体效价

Fig. 6 Titre determine of anti-ORF146 antibody by ELISA.

2.7 豚鼠抗 ORF146 多克隆抗体特异性测定

将 IPTG 诱导的 pET-28a-ORF146 表达产物,以豚鼠抗 ORF146 多克隆抗体为一抗,进行 Western blot 分析,结果如图 7,显色带单一,而且大小与预期分子量相吻合,表明多克隆抗体的特异性很好。

3 讨论

对斜纹夜蛾核型多角体病毒 SpltMNPV II ORF146 基因的功能研究还未见报道。本文对 ORF146 基因进行了序列分析、启动子活性分析、转录时相分析、原核表达和多克隆抗体的制备。序列分析表明,该基因涵盖了 1383 bp 的读码框,编码 460 个氨基酸,理论预测蛋白分子量为 50.4 kDa。

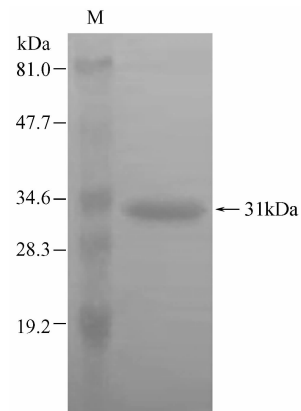


图 7 western blot 测定多抗特异性

Fig. 7 Western blotting analysis of anti-ORF146 antibody.

该基因起始密码子 ATG 上游发现有一个 TATA box,位于 -151 nt 处,一个晚期启动子基序 ATAAG,位于 -59 nt 处。SMART 分析结果显示了该蛋白可能存在有多个磷酸化位点,蛋白质磷酸化参与调节细胞多种生命活动过程,包括细胞的增殖、发育和分化、细胞骨架调控、细胞凋亡、神经活动、肌肉收缩、新陈代谢,肿瘤发生等,是细胞生命活动的调控中心^[17-18]。生物体内磷酸化与去磷酸化是一个可逆的动态变化过程,当细胞中磷酸化蛋白质表达失调以及蛋白质磷酸化功能异常时,会引发一系列疾病。蛋白磷酸化可使蛋白质抵抗消化酶的作用,赋予蛋白质传导信号的功能并且对蛋白质正确折叠起着重要作用^[19]。

质谱分析结果显示该蛋白同时存在于 ODV 和 BV 中,而且蛋白丰度很高,推测其为病毒的组成型

结构蛋白。启动子活性分析表明该基因的启动子同时具有早期和晚期启动子的特性。为了证实启动子活性分析的结果,又进行了转录时相分析,结果发现,感染后 2 h 即有转录,并在感染后 8 h 和 18 h 分别有两个转录高峰。实验证明,启动子活性分析与转录时相分析的结果是一致的,该基因在病毒感染宿主细胞的早期和晚期都有表达。而且感染后期转录趋于稳定,为 18 h 峰值的 60% - 70%,这更进一步证明该基因是一个病毒的组成型结构蛋白基因。转录时相分析在 SpltMNPV II 病毒感染宿主细胞 8 h 和 18 h 时有两个明显的高峰,这一现象与杆状病毒感染宿主细胞时的 DNA 复制的特征是一致的,推测 ORF146 基因可能与 SpltMNPV II 病毒感染宿主细胞后病毒 DNA 复制有关,参与早期 BV 的发生和晚期 ODV 的成熟两个过程。

本实验还纯化了 ORF146 蛋白并制备了多克隆抗体。结合生物信息学分析,这些实验工作将有利于对该蛋白的进一步研究。如在宿主细胞中的定位,在病毒粒子中的定位,在细胞中的表达时相以及在虫体中的侵染途径等,将为进一步了解病毒侵染机制,研制高效价的生物农药奠定基础。

参考文献

- [1] 梁东瑞,蔡毓能,刘岱岳,张起麟,胡远扬. 中国昆虫病毒图谱. 长沙:湖南科学技术出版社. 1986,28.
- [2] 秦厚国,汪笃栋,丁建. 斜纹夜蛾寄主植物名录. 江西农业学报(*Acta Agriculturae Jiangxi*),2006,18(05): 51-58.
- [3] 姚文辉. 斜纹夜蛾的生物学特性. 华东昆虫学报(*Entomological Journal of East China*),2005,14(2): 122-127.
- [4] 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学. 北京:中国农业科技出版社,1998.
- [5] O' Reilly DR, Miller LK. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the TGE gene. *Biotechnology*, 1991,9:1086-1089.
- [6] Kikhno I, Gutiérrez S, Croizier L, Croizier G, and Lopez-Ferber M L. Characterization of *pif*, a gene required for the *per os* infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*,2002, 83:3013-3022.
- [7] Haas-Stapleton EJ, Washburn JO, and Volkman LE. P74 Mediates Specific binding Targets in the Midgut Epithelia of *Heliothis virescens* Larvae. *Journal of Virology*,2004, 78: 6786-6791.
- [8] Kamiya K, Zhu J, Murata M, Laviña-Caoili, BA, Ikeda M, Kobayashi M, Kawamura, S. Cloning and comparative characterization of three distinct nucleopolyhedroviruses isolated from the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Japan. *Biological Control*,2004. 31(1): 38-48.
- [9] Haas-Stapleton EJ, Washburn JO, Volkman LE. *Spodoptera frugiperda* resistance to oral infection by *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus linked to aberrant occlusion-derived virus binding in the midgut. *Journal of General Virology*, 2005, 86: 1349-1355.
- [10] Pijlman GP, Puijssers AJP, Vlak JM. Identification of *pif-2*, a third conserved baculovirus gene required for *per os* infection of insects. *Journal of General Virology*, 2003,84:2041-2049.
- [11] Fang M, Nie Y, Wang Q, et al. Open reading frame 132 of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus encodes a functional *per os* infectivity factor (PIF-2). *Journal of General Virology*, 2006,87:2563-2569.
- [12] 李轶女. 东方粘虫颗粒体病毒和斜纹夜蛾核型多角体病毒 II 基因组全序列分析. 北京:中国农业科学院博士学位论文,2008.
- [13] Ohkawa T, Washburn JO, Sitapara R. Specific Binding of *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Occlusion-Derived Virus to Midgut Cells of *Heliothis virescens* Larvae Is Mediated by Products of *pif* Genes *Ac119* and *Ac022* but Not by *Ac115*. *Journal of Virology*,2005,79: 15258-15264.
- [14] Pang Y, Yu J, Wang L, Hu X, Bao W, Li G, Chen C, Han H, Hu S, Yang H. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Virology*,2001,287(2): 391-404.
- [15] Wu F, Lavina B, Ikeda M, Laviña-Caoili BA, Ikeda M. Cloning and biological characterization of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in nucleopolyhedrovirus isolated from China. *Journal of Service Science in Japan*, 2000,69(3): 177-189.
- [16] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor- Laboratory Press,1989: 53-85.
- [17] Hong T, Summers MD, Braunagel SC. N-terminal sequences from *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus envelope proteins ODV-E66 and ODV-

- E25 are sufficient to direct reporter proteins to the nuclear envelope, intranuclear microvesicles and the envelope of occlusion derived virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94: 4050-4055.
- [18] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nolan, C, ed). NEW YORK: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 53-85.
- [19] Pijlman GP, Puijssers AJP, Vlak JM. Identification of pif-2, a third conserved baculovirus gene required for peros infection of insects. *Journal of General Virology*, 2003, 84: 2041-2049.

Cloning and expression of *ORF146* gene of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus II (SpltMNPVII)

Ye Sheng¹, Dan Min¹, Yinü Li², Zhifang Zhang², Yuexiong Zhu¹, Jiang Zhu^{1*}

(¹ College of Life Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China)

(² Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: [**Objective**] To study the structure and function of a newly found virus strain *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus II (SpltMNPVII) ORF146 gene. [**Methods**] The primers were designed according to the sequence of SpltMNPVII genome. The promoter of ORF146 was amplified by PCR. The promoter activities and the time course of mRNA transcription were analyzed. The fragment of the ORF146 gene was then cloned into the vector of pET28a(+) and expressed. The polyclonal antibody was prepared by using the purified fusion protein. Titration determination of anti-ORF146 antibody was evaluated by ELISA. [**Result**] Nucleotide sequence analysis demonstrated that this gene has a 1383 bp ORF, encoding 460 amino acids with a predicted molecular weight of 50.4 kDa. Analysis of both promoter activities and the time course of mRNA transcription of the ORF146 gene showed that ORF146 was transcribed in early stage as well as in late stage. The transcription began at 2 h post infection (hpi) and reached two peaks at 8 and 18 hpi and then the transcription level was slightly decreased from 24 hpi. pET-28a-ORF146 fusion protein expressed in prokaryotic and purified polyclonal antibody was with good specificity, with the titer above 1:3200. [**Conclusion**] SpltMNPV II ORF146 gene is a composition structure protein, which was expressed at both early and late stage. ORF146 might be involved in viral DNA replication. The polyclonal antibody can be used to further study the biological characteristics and functions of proteins.

Keywords: Virus; *Spodoptera litura*; nucleopolyhedrovirus; ORF146 gene; expression; polyclonal antibody

(本文责编: 张晓丽)