

茶尺蠖核型多角体病毒湖北分离株的分子鉴定

毛迎新^{1,2}, 刘明炎^{1,2}, 龚自明^{1,2*}, 张忠信³, 谭荣荣^{1,2}

(1.湖北省农业科学院 果树茶叶研究所,湖北 武汉 430209 ;2.湖北省茶叶工程技术研究中心,湖北 武汉 430209 ;
3.中国科学院 武汉病毒研究所,湖北 武汉 430071)

摘 要: 运用 PCR 技术扩增茶尺蠖核型多角体病毒安徽分离株(EcobNPV-AH)和湖北分离株(EcobNPV-HB)的同源重复序列 2(hr2),并对湖北分离株的 hr2 进行克隆和序列测定.结果表明,茶尺蠖核型多角体病毒安徽分离株 hr2 扩增产物为 2 条 DNA 片段,大小约 1 300 bp 和 1 800 bp,湖北分离株的 hr2 扩增产物为 1 条 DNA 片段,大小约 1 800 bp,由基因型组成判断,EcobNPV-HB 是新的地区分离株,其 hr2 全长 1 761 个核苷酸,GC 含量 21.7%,编码 540 个氨基酸,具有重复性回文序列,较 GenBank 中登录的 EcobNPV-AH 的 hr2 多 362 个核苷酸.

关 键 词: 茶尺蠖核型多角体病毒;湖北分离株;基因型;同源重复序列 2

中图分类号: S571.1; S476 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)06-0685-05

Molecular identification of *Ectropis obliqua* nucleopolyhedrovirus isolated from Hubei strains

MAO Ying-xin^{1,2}, LIU Ming-yan^{1,2}, GONG Zi-ming^{1,2*}, ZHANG Zhong-xin³, TAN Rong-rong^{1,2}

(1.Institute of Fruit & Tea, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430209, China; 2.Hubei Tea Engineering Technology Research Center, Wuhan 430209, China; 3.Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: Homologous repeat region 2 (hr2) of *Ectropis obliqua* nucleopolyhedrovirus (EcobNPV) isolated from Hubei and Anhui strains were amplified by PCR. The results showed that only one 1.8 kb DNA fragment was amplified from EcobNPV-HB strains and two DNA fragments was amplified from EcobNPV-AH strains, which suggested that EcobNPV-HB strains was an independent strains different from EcobNPV-AH strains. hr2 of *Ectropis obliqua* nucleopolyhedrovirus isolated from Hubei strains was cloned into pMD18-T vector, sequenced and analyzed. The hr2 of EcobNPV-HB strains was composed of 1 761 nucleotides and coded 540 amino acids with a G+C content of 21.7%, comprised of perfect palindromes. Extra 362 nucleotides were observed compared with hr2 of EcobNPV-AH strains in GenBank.

Key words: *Ectropis obliqua* nucleopolyhedrovirus; Hubei strains; genotype; homologous repeat region 2

茶尺蠖(*Ectropis obliqua* Prout)属鳞翅目尺蛾科,在安徽、浙江、江苏、湖南、湖北等主产茶区为害,幼虫咀食茶树叶片,严重时茶丛被啃食殆尽呈扫帚状,对树势和茶叶产量影响极大.茶尺蠖在

鄂东、鄂南等局部地区频繁暴发成灾,年发生 5~6 代,除第 1 代发生整齐外,其余各世代重叠,防治难度较大.现阶段部分茶区每年防治茶尺蠖需施用农药 4~5 次,农药残留已经成为限制有机茶生产

收稿日期: 2010-05-27

基金项目: 湖北省“十一·五”科技攻关项目(2006AA101B31);湖北省农业科技创新中心项目(2008-620-001-03)

作者简介: 毛迎新(1980—),男,吉林洮南人,硕士,助理研究员,主要从事茶树害虫生物防治研究;* 通讯作者, ziminggong@163.com

的瓶颈. 茶尺蠖核型多角体病毒(*Ectropis obliqua* nucleopolyhedrovirus, EcobNPV)是茶尺蠖重要的病原微生物. 20 世纪 70 年代, 安徽首次分离出茶尺蠖核型多角体病毒, 此后, 从湖北茶园也分离出茶尺蠖核型多角体病毒(长期以来被误认为是灰茶尺蠖核型多角体病毒). 目前, 利用安徽茶尺蠖核型多角体病毒(EcobNPV-AH)制剂进行了大田试验^[1]; 已有研究认为, EcobNPV 防效好, 持效期长, 专一性强, 不污染环境, 对非靶标生物安全, 在局部茶园应用效果明显^[2].

近年来, 笔者对湖北茶尺蠖核型多角体病毒(EcobNPV-HB)毒力、安全性、田间应用技术等进行了研究^[3-4], 但未与安徽茶尺蠖核型多角体病毒(EcobNPV-AH)毒力强弱进行比较, 两者是否为不同的地区分离株尚未有定论. 基于此, 笔者应用分子生物学技术对分离自安徽和湖北的茶尺蠖核型多角体病毒进行比较研究, 旨在揭示两者遗传信息的异同.

1 材料与方法

1.1 材料

EcobNPV 湖北分离株(EcobNPV-HB)由湖北省农业科学院果树茶叶研究所增殖, EcobNPV 安徽分离株(EcobNPV-AH)由中国农业科学院茶叶研究所惠赠.

Taq 酶、dNTP 购自上海博彩生物科技有限公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind*III、*Nco* I 以及载体 pMD18-Tvector 均购自 TaKaRa 公司; 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒为 Promega 产品; 特异性引物由上海生工生物工程技术有限公司合成.

菌种 DH5 α 为中国科学院武汉病毒研究所实验室保存.

1.2 方法

1.2.1 病毒多角体纯化

将感染 EcobNPV-AH 和 EcobNPV-HB 死亡的具典型症状的茶尺蠖虫尸分别研磨破碎, 纱布过滤, 用蒸馏水反复冲洗, 600 r/min 离心 10 min, 取上清液, 4 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 用蒸馏水充分悬浮沉淀, 如此差速离心 3~4 次后, 沉淀用

ddH₂O 悬浮, 混匀后计数, 4 °C 保存备用.

1.2.2 病毒基因组 DNA 提取

取纯化的病毒多角体悬液, 分装于 1.5 mL 的离心管, 每管 300 μ L, 各 6 管, 分别加入 10% SDS 30 μ L、Proteinase K (20 mg/mL) 20 μ L, 37 °C 水浴 30 min, 加入 3 \times DAS 150 μ L, 37 °C 水浴 30 min (溶液变清), 加入 100 μ L Tris-HCl 终止碱解反应, 加入 10% SDS 50 μ L, 37 °C 水浴 30 min, 加入等体积的 Tris 饱和酚, 轻摇静置, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1), 轻摇混匀, 静置 2~3 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 溶液分 3 层, 中间为蛋白质, 取上清, 加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1), 轻摇混匀, 静置 2~3 min, 吸取上清液加入透析袋, 用 ddH₂O 透析 48 h, 每 6 h 换 1 次 ddH₂O, 透析结束后, 使用 PEG8000 或 PEG6000 覆盖透析袋, 浓缩 DNA, 直到得到理想的体积.

1.2.3 *hr2* 基因的 PCR 扩增

根据 GenBank 发布的茶尺蠖核型多角体病毒安徽分离株 *hr2* 基因序列 (登录号 DQ837165), 设计 2 条特异性引物, 正向引物 5'端加保护性碱基 CGC 和 *Bam*H I 酶切位点碱基, 反向引物 5'端加保护性碱基 CCC 和 *Hind*III 酶切位点碱基. 正向引物 5'-CGCGGATCCCCATTGTGCCCAGTTCAA-3'; 反向引物 5'-CCCAAGCTTTACTTACTTCCTAAACG TGTCGTA G-3'.

分别以 EcobNPV-AH、EcobNPV-HB 基因组 DNA 为模板, 对 *hr2* 基因进行 PCR 扩增. PCR 反应体系为 50 μ L, 其中 DNA 模板 1 μ L, 10 μ mol/L 正反向引物各 1 μ L, 1 μ L dNTPs, *Taq* DNA 聚合酶 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 Buffer 5 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L. PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 50 s, 58 °C 复性 50 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保温 10 min.

PCR 产物用 E.Z.N.A Gel Extraction Kit (Omega) 纯化和回收.

1.2.4 目的片段与载体连接

将回收的 DNA 片段与载体 pMD18-Tvector 相连, 连接反应体系为 10 μ L, 其中目的片段 4.5 μ L, PMD 18-Tvector 0.5 μ L, Solution I 5.5 μ L, 4 °C 连接 12 h.

1.2.5 转 化

在冰上融化 100 μ L 感受态细胞 DH5 α ,向感受态细胞中加入 10 μ L 连接产物,冰上放置 30 min , 42 $^{\circ}$ C 热激 90 s ,迅速转移到冰上放置 90 s ,加 500 μ L SOC 培养液到混合液中,在 37 $^{\circ}$ C 条件下振荡 45 ~ 55 min ,取 150 μ L 振荡后混合液涂 Amp 抗性平板,置生化培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养 12 ~ 16 h 后,挑单菌落至 LB 培养液,37 $^{\circ}$ C 条件下振荡 12 ~ 16 h .

1.2.6 质粒的提取、鉴定与测序

用 E.Z.N.A Plasmid Extraction Kit 试剂盒提取质粒 DNA .

用 *Bam*H I / *Hind*III 双酶切质粒 DNA ,酶切反应体系为 20 μ L ,其中质粒 DNA 5 μ L ,*Bam*H I 和 *Hind*III 各 1 μ L ,10 \times Buffer(k) 2 μ L ,加 ddH₂O 至 20 μ L ,37 $^{\circ}$ C 酶切消化 4 h ,0.8% 琼脂糖凝胶电泳,根据酶切片段大小判断是否为阳性克隆子.质粒鉴定正确送南京金思瑞科技有限公司测序.

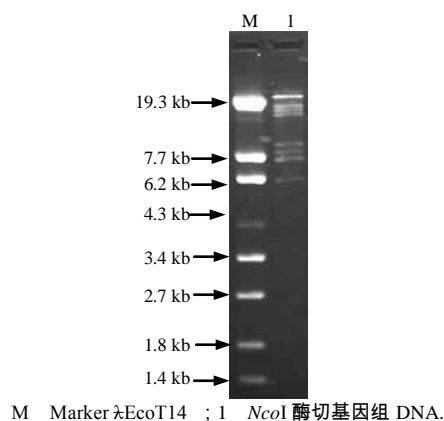
1.2.7 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列的比较分析

核苷酸序列用 NCBI 的 BLAST 软件与 GenBank 数据库进行比对,运用 DNASTar 软件进行氨基酸序列分析和同源性比较.

2 结果与分析

2.1 病毒基因组 DNA 限制性内切酶鉴定

用限制性内切酶 *Nco* I 消化 EcobNPV-HB 基因组 DNA ,经琼脂糖凝胶电泳得到 8 条 DNA 分子带(图 1);用 MapDraw 分析 *Nco* I 消化 EcobNPV-AH



M Marker λ EcoT14 ; 1 *Nco*I 酶切基因组 DNA.

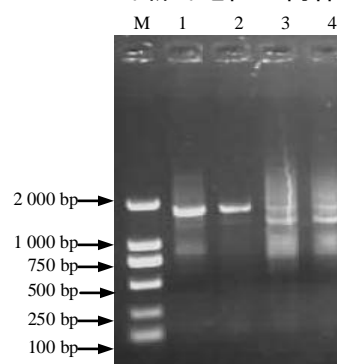
图 1 EcobNPV-HB 限制性内切酶图谱

Fig.1 *Nco*I digestion profiles of EcobNPV-HB genomic DNA

基因组全序列,显示有 11 个酶切片段, EcobNPV-HB 的 8 条核苷酸带,大小与 MapDraw 显示的 *Nco* I 酶切 EcobNPV-AH 的片段主带大小吻合,进一步证明湖北分离出的茶尺蠖病毒为茶尺蠖核型多角体病毒.

2.2 同源重复序列的 PCR 扩增

对同源重复序列 2(*hr2*)进行 PCR 扩增.湖北分离株 *hr2* 序列的 PCR 扩增产物为 1 条约 1 800 bp 的核苷酸片段,安徽分离株的 *hr2* 序列经 PCR 扩增,得到 2 条核苷酸片段,大小约 1 300 和 1 800 bp ,且 1 300 bp 核苷酸条带较 1 800 bp 核苷酸条带明亮(图 2).由于杆状病毒的同源重复序列(*hrs*)具有易变性,通常用 PCR 扩增病毒的某个同源重复序列时,不同的基因型就会出现不同长度的核酸片段,可根据 PCR 扩增产物的条带数,确定这个病毒分离株是由一个或多个基因型组成^[7].从试验结果来看, EcobNPV-AH 的 *hr2* 的 PCR 扩增产物有 2 条带,它由 2 个基因型组成,而且其中 1 个基因型(*hr2* PCR 产物为 1300 bp 的基因型)占主导地位.而 EcobNPV-HB 为单一基因型,其 *hr2* 的 PCR 产物是 1 条带(1 800 bp).据此可以说明, EcobNPV-HB 和 EcobNPV-AH 的 *hr2* 序列的 PCR 产物明显不相同, EcobNPV-HB 是有别于 EcobNPV-AH 的新的地区分离株.



M Marker DL2000 ; 1、2 茶尺蠖核型多角体病毒湖北分离株 *hr2* 序列 PCR 扩增产物 ; 3、4 茶尺蠖核型多角体病毒安徽分离株 *hr2* 序列 PCR 扩增产物.

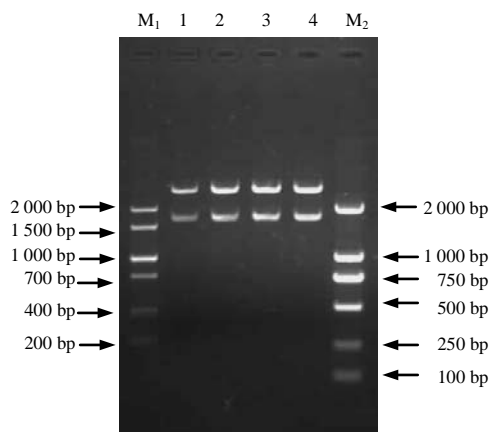
图 2 同源重复序列 2 的 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR amplification of *hr2* at different EcobNPV genomic DNA

2.3 *hr2* 序列克隆及其序列分析

将 EcobNPV-HB *hr2* 序列回收的片段与 pMD18-Tvector(2 690 bp)载体相连,转化,筛选得

到重组质粒 pMD18-*hr2* , 用 *Bam*H I /*Hind*III 双酶切鉴定, 结果显示切出约 1 800 bp 和 2 690 bp 大小的 2 个片段(图 3), 说明筛选的重组质粒正确。



1~4 重组质粒酶切产物; M₁ Marker V; M₂ Marker DL2000。

图 3 重组质粒酶切鉴定结果

Fig.3 Recombinant plasmids digested with *Bam*H I and *Hind*III

利用 DNASTar 软件, 将序列各片段除去载体序列后拼接装配, 获得了 EcobNPV-HB *hr2* 的部分序列, 全长共计 1 761 个核苷酸, 序列大小与预测的 1 800 bp 基本一致, 其中 A、C、G、T 所占比例分别为 42.7%、11.5%、10.2% 和 35.5%, (G+C)% 含量为 21.7%, 编码 540 个氨基酸, 其中 86 个强碱性氨基酸(K、R), 25 个强酸性氨基酸(D、E), 210 个疏水性氨基酸(A、I、L、F、W、V), 196 个极性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y), 预计蛋白质相对分子质量为 64 590。运用 BLAST 软件, 将获得的 EcobNPV-HB 核苷酸序列与 GenBank 公布的安徽株序列比较, 结果显示 EcobNPV-HB 比 EcobNPV-AH 多 362 个核苷酸, 13 个核苷酸发生变化, 二者同源率为 98%。EcobNPV-HB 和 EcobNPV-AH 的 *hr2* 序列在结构组成上都含有 24 个核苷酸的完全回文序列(TTTCAAAATTGATCAATTTTGAAA), 不同之处是该回文序列在 EcobNPV-HB *hr2* 序列中重复出现 15 次, 在 EcobNPV-AH 中重复出现 12 次。通过序列分析可以确定, EcobNPV-HB 是不同于 EcobNPV-AH 的新的茶尺蠖核型多角体病毒地区分离株。

3 讨 论

同种野生型病毒不同分离株(基因型变种)之间的生物活性可能存在很大差异。对不同杆状病毒分离株进行生物学和分子生物学特征的比较研究, 可为强毒株筛选与应用提供参考依据, 对杆状病毒的分子流行病学研究及病毒分子生态学的研究具有重要意义。目前, 比较杆状病毒不同分离株常用的方法主要有两种: 序列测定和基因组限制性内切酶图谱分析, 但由于不少病毒的不同地区分离株之间限制性内切酶图谱差异微小, 难以区别比较, 而又不可能对每个地区分离株都进行全序列测定, 因此, 二者在实际应用中存在一定局限性。事实上, 绝大多数核型多角体病毒(ChchNPV^[5]和TnSNPV^[6]除外)基因组中都具有同源序列(*hrs*), *hrs*作为核型多角体病毒基因组中高度易变的序列, 当用 1 对特异引物PCR扩增该序列时, 不同基因型的病毒会出现不同长度的PCR产物, 每个产物代表 1 个基因型, 且不同的地区分离株往往有不同的基因型组成。Rosa Murillo等^[7]通过对甜菜夜蛾核型多角体病毒(SeMNPV)分离株基因组中的*hr1*序列PCR扩增, 比较了 SeMNPV 不同分离株之间的差异。EcobNPV-AH全序列中有 3 段同源序列(*hr1*、*hr2* 和*hr3*), 其核苷酸大小分别为 1 615、1 433 和 493 bp^[8], 本研究借鉴Murillo的试验方法, 利用PCR技术对茶尺蠖核型多角体病毒 2 个分离株基因组的 3 段同源序列进行扩增, 结果表明, EcobNPV-HB 和EcobNPV-AH的*hr2* 序列扩增产物不同, 根据*hr2* 序列扩增产物的大小和数量, 可以确定茶尺蠖核型多角体病毒的基因型或基因型组成, 有效区分 EcobNPV-HB和EcobNPV-AH。

早期研究表明, *hrs*可能是昆虫核型多角体病毒潜在的复制起始区, 具有复制起始点的功能, 并确定其具有类似生物增强子的功能^[9]。本研究克隆了茶尺蠖核型多角体病毒湖北分离株的*hr2*, 其序列测定结果显示, 在此区域内AT含量达 78.3%, 具有明显的富含AT特征, 符合真核生物复制起始区的共同特征。EcobNPV-HB的*hr2* 与EcobNPV-AH

1 CCATTGTGCCAGTTCAAACGTGGTAGTTGCACGTAATAATTTATAGTTGCTGTTGATTT
 1 P L C P V Q T G * L H V K F I V A V V F
 61 ATTCATTGTAAAATCTGTGCTAAATTTTACTCTTATTTCAAATTTAAATAATTTTCA
 21 I H C K I L C * I F T L I S N L N N F S
 121 TTATTGTGCAGTATTGACAACTAAATTAGCTTTCAAATTTGATTAATTTTGAATACAA
 41 L L C S I D K L N * L S K L I N F E I Q
 181 CATGGTTTAACGTTAAACAAAACAACTTTGCTTTCAAATTTGATCAATTTTGAAATACA
 61 H G L T L T K T N F A F K I D Q F * N T
 241 CTATTGTTTAACGTTAAACAAAACAACTTCGCTTTCAAATTTGATCAATTTTGAAATAC
 81 L L F N V N K N K L R F Q N * S I L K Y
 301 ACTATTGTTTATACAGACAAAACCAATTTTGCTTTCAAATTTGATCAATTTTGAAATAC
 101 T I V Y T D K N Q F C F Q N * S I L K Y
 361 AAGATGAATTTAACTAGTAAAAAGTAACTACTTTCAAATTTGATCAATTTTGAAATAC
 121 K M N L N * * K V N Y F Q N * S I L K Y
 421 ACTATTGTTTATACAAATAAAAACAACTTTGCTTTCAAATTTGATCAATTTTGAAATAC
 141 T I V L Y K * K Q T L L S K L I N F E I
 481 CAAAATGGTTTAACGTTAAACAAAACAACTTTGCTTTCAAATTTAATCAATTTTGAAAT
 161 Q N G L T L T K T N F A F K I N Q F * N
 541 ACAAATGGTTTGATATTAAGAAAAACAACTTTGCTTTCAAATTTAATTAATTTTGAA
 181 T K W F D I K K N K L C F Q N * L I L K
 601 TACAAAATGGTTTGATATTAAGAAAAACAACTTTGCTTTCAAATTTGATCAATTTTGAA
 201 Y K M V * Y * E K Q T L L S K L I N F E
 661 ATACAAGATGGATTTAACTAGTAAAAAGTAACTACTTTCAAATTTGATCAATTTTGAA
 221 I Q D G F K L V K S K L T F K I D Q F *
 721 AATACAAGATGAATTTAACTAGTAAAAAGTAACTACTCTCAAATTTGATCAATTTTGAA
 241 N T R * I * T S K K * T T L K I D Q F *
 781 AATACACTATGTTTATACAAATAAAAACAACTTTGCTTTCAAATTTGATCAATTTTG
 261 N T L L F Y T N K N K L C F Q N * S I L
 841 AAATACAAAATGGTTTAACGTTAAACAAAACAACTTTGCTTTCAAATTTAATCAATTTT
 281 K Y K M V * R * Q K Q T L L S K L I N F
 901 GAAATACAAAATGGTTTGATATTAAGAAAAACAACTTTGCTTTCAAATTTAATTAATTT
 301 E I Q N G L I L R K T N F A F K I N * F
 961 TGAATACAAAATGGTTTGATATTAAGAAAAACAACTTTGCTTTTAAATTTGATCAAT
 321 * N T K W F D I K K N K L C F * N * S I
 1021 TTGAAATACAAGATGGATTTAACTAGTAAAAAGTAAATTAACCTTTCAAATTTGATCAAT
 341 L K Y K M D L N * * K V N * L S K L I N
 1081 TTGAAATACAAGATGAATTTAACTAGTAAAAAGTAACTACTTTCAAATTTGATCAAT
 361 F E I Q D E F K L V K S K L L S K L I N
 1141 TTGAAATACACTATTGTTTATACAAATAAAAACAACTTTGCTTTCAAATTTGATCAAT
 381 F E I H Y C F I Q I K T N F A F K I D Q
 1201 TTTGAAATACAAATGGTTTAACGTTAAACAAAACAACTTTGCTTTCAAATTTAATCAA
 401 F * N T N G L T L T K T N F A F K I N Q
 1261 TTTTGAAATACAAAATGGTTTGATATTAAGAAAAACAACTTTGCTTTCAAATTTAATCA
 421 F * N T K W F D I K K N K L C F Q N * S
 1321 ATTTGAAATACAAAATGGTTTGATATTAAGAAAAACAACTTTGCTTTCAAATTTGATC
 441 I L K Y K M V * Y * E K Q T L L S K L I
 1381 AATTTGAAATACAAGATGGATTTAACTAGTAAAAAGTAAATTAACCTTTCAAATTTGAT
 461 N F E I Q D G F K L V K S K L T F K I D
 1441 CAATTTTGAAATACATTATTGTTTAACGTTAAACAAAACAACTTTGCTTTCAAATTTGA
 481 Q F * N T L L F N V N K N K L C F Q N *
 1501 TCAATTTTGAAATACAAAATGGTTTAACCTTTAAACAAAACAAATTTGCTTTCAAATTTGA
 501 S I L K Y K M V * L * Q K Q I C F Q N *
 1561 TCAATTTTGAAATACAAGATGGTTTAACATTGACAAAACCTTTTACAATGTTTTCGATTG
 521 S I L K Y K M V * H * Q N F Y N V F R L
 1621 CAGCAAATTTGCTATCAAAATGATTGAAATGAATTACACAATGAGTTAAGTTACAAAC
 541 Q Q I C Y Q N * L K L N Y T M S * V T N
 1681 TAGTAACTTGCTTTCAAATTTAATTAATTTTGAAATACATTTTCAATTTTGTGGCTAC
 561 * * T C F Q N * L I L K Y I F N F C G Y
 1741 GACACGTTTAGGAAGTAAGTA
 581 D T F R K * V
 下划线处为回文序列。

图 4 茶尺蠖核型多角体病毒湖北分离株 *hr2* 的核苷酸及其推导的氨基酸序列Fig.4 Sequence of nucleotide and deduced amino acid of *hr2* from EcobNPV-HB strains

(下转第 699 页)