斜纹夜蛾核多角体病毒 gp37 及其邻近序列的克隆及分析*

李充璧[1,2] 李朝飞[1] 闫庆生[1] 胡国栋[1] 庞 义[1]**

([1]中山大学生物防治国家重点实验室，广州 510275；[2]内蒙古大学生物工程中心，呼和浩特 010021)

摘要 从斜纹夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, SpltMNPV) 基因组中克隆了 *gp* 37 基因. 分子生物学软件分析表明，在 *gp* 37 基因内部存在糖基化位点. 含有晚期表达基因的启动子序列 (ATAAG)，推测为晚期表达的病毒膜糖蛋白基因. 通过 GP37 蛋白的同源性比较，绘制了以 *gp* 37 基因为基础的杆状病毒进化树，发现与以多角体蛋白基因 (*polyhedrin*) 为基础所绘制的杆状病毒分子进化树有较大差异. 以 *polyhedrin* 基因为基础绘制的杆状病毒分子进化树将家蚕核多角体病毒 (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV) 与杆状病毒代表种——苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 分开，根据 gp37 基因分析则将二者归到同一分枝，这与以 *egt* 基因为基础绘制的杆状病毒分子进化树结果一致.

关键词 斜纹夜蛾核多角体病毒，gp37 基因簇，克隆与序列分析

学科分类号 Q784

到目前为止，有五种核多角体病毒的基因组全序列被测定. 包括苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)、黄杉毒蛾核多角体病毒 (*Orgyia pseudotsugata* NPV, OpMNPV)、家蚕核多角体病毒 (*Bombyx mori* NPV, BmNPV)、舞毒蛾核多角体病毒 (*Lymantria dispar* NPV, LdMNPV) 和甜菜夜蛾核多角体病毒 (*Spodoptera exigua* NPV, SeMNPV). 而研究最清楚的杆状病毒是苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (AcMNPV)，基因组为 134 kb，编码 154 个基因.

斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 是多食性的重要经济害虫 (中山大学昆虫学研究所，1990 年). 目前已有用于防治这种害虫的斜纹夜蛾病毒杀虫剂的生产和应用，但关于斜纹夜蛾核多角体病毒的基因组结构还不完全清楚. 有报道杆状病毒 *gp* 37 基因编码的 37 ku 的糖蛋白与多角体膜有关，但还不能肯定它就是多角体膜的结构成分[1]. *gp* 37 基因是杆状病毒比较保守的基因[2]. 这种基因的编码蛋白在病毒感染宿主昆虫时起重要作用[3]. 为此我们以斜纹夜蛾核多角体病毒 (SpltMNPV) 为材料，采用探针杂交的方法克隆了病毒的 *gp* 37 基因，并进行了序列分析. 目前，关于 SpltMNPV *gp* 37 基因的研究在国内外尚未见报道.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫：斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*) 幼虫由本实验室养虫室提供，为人工饲料饲养的健康幼虫，饲养温度 27~ 28 ℃. 人工饲料配方参考文献 [4].

1.1.2 病毒：野生型 SpltMNPV 中山大学分离株 (简称 ZSU) 为本实验室保存，最初分离自广州市郊区罹病斜纹夜蛾幼虫[5]. 目前，该毒株是注册商品“虫瘟一号”病毒杀虫剂的生产株.

克隆载体质粒 pBluescript SK$^+$、受体菌株 DH5a 和 SeMNPV 基因组的 gp37 基因为本室保存. 用于 DNA 印迹的地高辛 DNA 标记检测试剂盒 (DIG DNA Labeling and Detection Kit) 购自 Boehringer Mannheim 公司；限制性内切酶及其他酶类、质粒和 DNA 片段快速纯化试剂盒、DNA 分子质量标准、购自 New England 公司 (本室保存).

1.2 方法

1.2.1 用昆虫虫体增殖病毒多角体.

1.2.2 多角体病毒 DNA 的提取及限制性内切酶酶切分析按常规方法进行.

1.2.3 SpltMNPV *gp* 37 基因的 DNA 印迹定位：分离 SeMNPV 基因组的 *gp* 37 基因，按 Boehringer Mannheim 公司地高辛 DNA 标记检测试剂盒推荐的程序加以改进标记探针. 通过真空转印，将酶切后的 SpltMNPV DNA 转印到尼龙膜 (Boehringer

* 研究获国家自然科学基金重点项目 (39730030) 及“九五”国家重点科技攻关项目 (96-01-04) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-82022243, 82022249, E-mail: cbbl@263.net

收稿日期：2000-09-01，接受日期：2000-11-03

Mannheim 产品) 上，将膜置入已预热的不含探针的杂交液中，42 ℃缓慢摇动 2 h. 杂交和免疫检测按 dig-kit 操作说明进行.

1.2.4 目的基因的克隆和筛选按文献 [6] 方法.

1.2.5 重组质粒序列测定：质粒纯化按 QIAGEN Kit 说明操作. 将纯化后的重组质粒送宝生物工程公司 (大连)，运用全自动 DNA 测序仪 (ABI-PRISM, Model 377)，从一端共测定了 4.6 kb 长的片段.

1.2.6 计算机分析：应用计算机软件 DNASIS、PROSIS、MEGALIEN 对所测 DNA 序列进行编码框分析，将其预计编码的蛋白质与 Blast search 寻找的杆状病毒和昆虫痘病毒的 *gp* 37 基因编码的氨基酸序列进行同源性比较.

2 结果与分析

2.1 SpltMNPV *gp* 37 基因定位

本实验从病毒多角体中直接提取 DNA，然后用限制性内切酶消化，再用含有 SeMNPV *gp* 37 基因的 dig-标记探针进行 DNA 印迹，结果表明，阳性带分别位于 SpltMNPV 基因组 DNA 的 *Bam*H I K 片段 7.3 kb，*Bgl* II 11.5 kb，*Eco*R I 的 D 片段 9.5 kb，*Pst* I 的 D 片段 10.4 kb 和 *Xba* I 的 K 片段 6.6 kb 上 (图 1a, b). 确定了 *gp* 37 基因在 SpltMNPV 基因组中的位置.

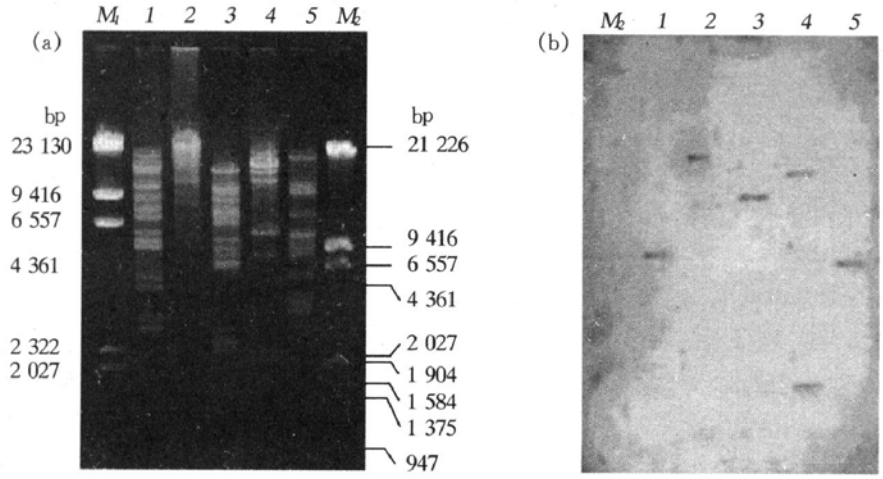

Fig. 1 Southern blot hybridization of SpltMNPV DNA with SpltMNPV *gp* 37 gene probe

(a) SpltMNPV DNA digested with restriction endonuclease; (b) Southern blot. M_1: λDNA/*Hind* III; 1: *Bam*H I; 2: *Bgl* II; 3: *Eco*R I; 4: *Pst* I; 5: *Xba* I; M_2: λDNA/*Eco*R I + *Hind* III.

2.2 SpltMNPV *gp* 37 基因所在 DNA 片段的克隆

根据 SpltMNPV DNA 的物理图谱[7] 可知，SpltMNPV 基因组 *Eco*R I D 片段大小为 9.58 kb. 用 Gel Extraction Kit 回收 SpltMNPV *Eco*R I D 片段，与 *Eco*R I 酶切的 pBluscript 载体在 16 ℃连接、转化、筛选阳性重组子. 用已知位置的限制性内切酶酶切鉴定，电泳分析结果表明，已克隆到正确的 *Eco*R I D 片段. 命名为 pBSlE9.5 kb.

2.3 SpltMNPV *Eco*R I 9.5 kb 克隆片段的物理图谱

将筛选的阳性重组质粒 pBSlE9.5 kb 经 *Bam*H I、*Bgl* II、*Cla* I、*Eco*R I、*Pst* I、*Xba* I、*Xho* I 单酶切以及双酶切组合确定各个酶切位点的位置. 并参照魏永杰关于 SpltMNPV 基因组的物理图谱及我们克隆的含有 gp37 基因的 SpltMNPV *Eco*R I D 片段酶切结果，绘制出如下物理图谱 (图 2).

2.4 重组 DNA 的部分序列及 GP37 蛋白序列

对 pBSlE9.5 kb 重组质粒进行序列测定. 从质粒一端开始，以测出 *gp* 37 基因为目的，采用 Walking sequencing 共测定了长度为 4.8 kb 的核苷酸序列，测出的序列含有 *gp* 37 基因在内的 6 个完整基因的读码框，其中有与 LdMNPV 基因组同源的 ORF46、v39k、v-ubiquitin、与 LsNPV 基因组同源的 ORF6 以及杆状病毒单链 DNA 结合蛋白 (DNA binding protein, dbp) 基因. 其序列见 GenBank AF216301.

2.5 SpltMNPV *gp* 37 基因开放阅读框的计算机分析

对 SpltMNPV *gp* 37 基因开放阅读框的计算机软件分析结果表明 (图 2)，SpltMNPV *gp* 37 基因开放阅读框位于 *Eco*R I D 区第 2 224~ 3 223 位核苷酸之间，全长 999 bp，编码 332 个氨基酸，分子质量为 37.9 ku 的蛋白质. 在 ATG 上游 21 bp 处存

在晚期基因共有的启动子基序 A/TAAG，属于强晚期启动子. 在 ATG 上游 47 bp 处存在典型的真核生物启动子基序 TATA box (TATAA) 和多处重复序列，重复碱基为 5~ 7 个，重复次数在三次以上. 在终止密码子 TAA 下游 30 bp 处，有真核生物 mRNA 转录终止 poly (A) 加尾酶信号序列: AATAAA. GP37 蛋白 N 端疏水性强，可能为跨膜转运和锚定序列[1]. 其等电点 (p*I*) 为 4.68，表明 GP37 蛋白是一种极性蛋白，其极性区可能是膜融合部位，推测 GP37 的功能是与病毒感染寄主细胞有关[8].

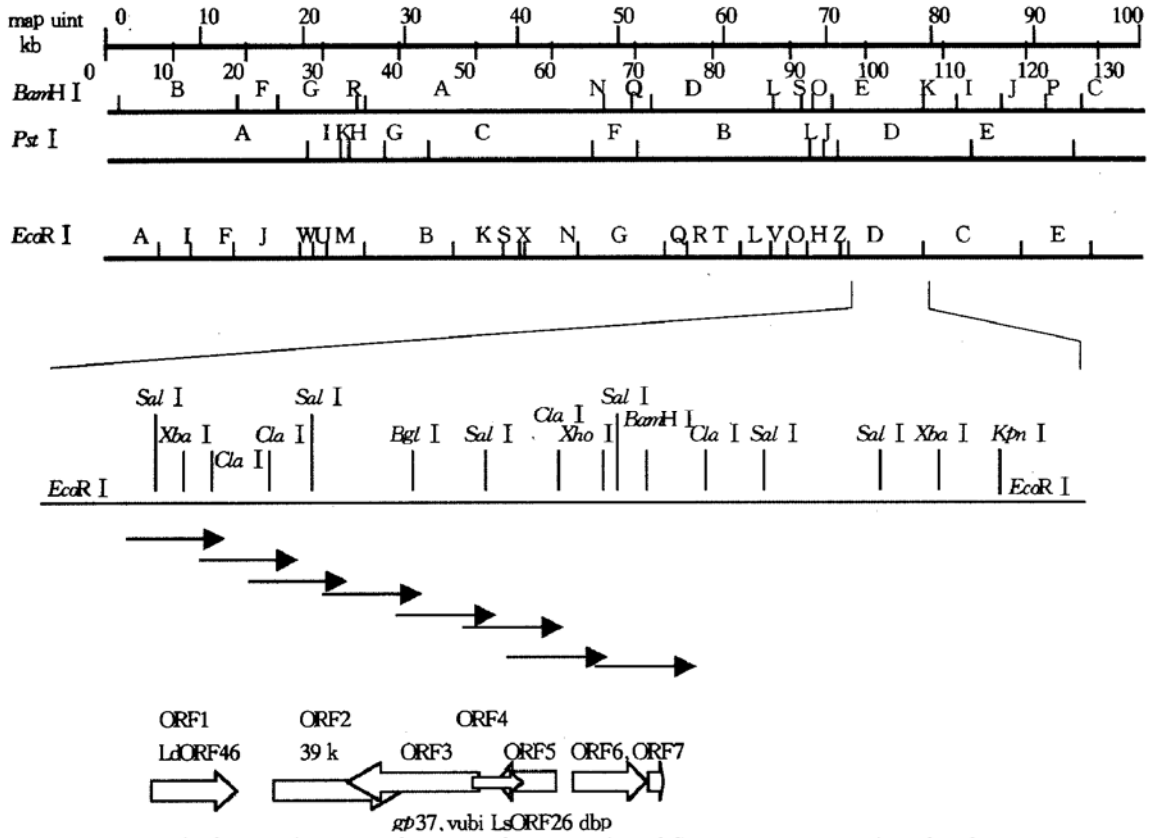

Fig. 2 Physical map of *Eco*R I 9.5 kb region of SpltMNPV and location of *gp* 37 gene

2.6 GP37 蛋白同源性比较

将 SpltMNPV *gp* 37 基因推衍的氨基酸序列与 8 种昆虫核多角体病毒包括杆状病毒代表株——苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* multinucleopolyhedrovirus, AcMNPV) 和另外 7 种昆虫核多角体病毒 (BmNPV, CfNPV, LdMNPV, LsMNPV, MbMNPV, OpMNPV, SeMNPV) 以及两种昆虫痘病毒 (entomopoxvirus, EPV) 包括 CbEPV 和 HaEPVD 的 GP37/Fusolin 蛋白的氨基酸序列进行序列及同源性比较，结果表明，SpltMNPV GP37 蛋白存在与其他杆状病毒和昆虫痘病毒所共有的结构特征，它内部存在的一致的保守区及 N 连接糖基化位点. 但是，由于 SpltMNPV *gp* 37 基因的 5′ 端插入了 ubiquitin 基因，故 SpltMNPV GP37 蛋白的氨基酸同源序列顺序后移. 但是，它内部存在的保守区及 N 连接糖基化位点和数目都没有改变. 而 N-糖苷键几乎总是在部分一致序列 DXS/T 天氢酰胺的中间. X 是除脯氨酸以外的任何氨基酸. 序列内部共存在三个糖基化位点. 这种基序称为潜在的糖基化位点.

昆虫杆状病毒 GP37 蛋白之间，以及与昆虫痘病毒 GP37/fusolin 氨基酸序列同源性比较的图谱省略. 而杆状病毒和昆虫痘病毒的 GP37 氨基酸序列来源如下，AcMNPV, OpMNPV 和 CbEPV (Gross and Wolgamot, 1993 年); GP37s 序列 SeMNPV 和 SpltMNPV (本文); BmNPV (Gomi, 1999 年); LdMNPV (Kuzio, 1999 年); LsMNPV (Phanis, 1999 年); CfMNPV (Liu and Carstens, 1996 年); MbMNPV (Phanis 等, 1999 年); HaEPV (Dall 等, 1993 年).

不同种的核多角体病毒 GP37 氨基酸之间的同源性比较发现，SpltMNPV GP37 与粘虫核多角体病

毒 GP37 相比，它们之间的同源性程度最高为 56%，与两种昆虫痘病毒纺锤体样结构蛋白 GP37/fusolin 相比较，同源性程度相对较低，为 30%～37% 左右. 它们的全氨基酸序列同源性比较如表 1.

Table 1 Homologous comparison of GP37 from insect baculovirus and fusolins from entomopoxiviruses

	LsMNPV	SeMNPV	BmNPV	MbMNPV	LdMNPV	AcMNPV	CfMNPV	OpMNPV	CbEPV	HaEPV
SpltMNPV	56	54	53	52	51	49	35	47	37	30
LsMNPV		58	58	57	61	55	41	56	38	38
SeMNPV			65	83	71	65	42	61	27	41
BmNPV				67	61	90	61	69	43	40
MbMNPV					68	66	46	60	38	41
LdMNPV						53	42	55	38	38
AcMNPV							62	69	42	41
CfMNPV								65	39	40
OpMNPV									39	42
CbEPV										63
HaEPV										

Note: Figures represent homologic percentage of amino acid identity sequences (%).

2.7 GP37 蛋白的分子进化树

根据 GP37 的同源性绘制的杆状病毒分子进化树见图 3. 将 SpltMNPV GP37 氨基酸序列与基因库的资料用 blastp programme 比较. 15 种昆虫病毒的 fusolin 氨基酸序列相似性程度较高，是用于进化分析的基础. 用 CLUSTAL W[9] 进行氨基酸对比排序，用 PAUP4.0b4a 软件进行进化分析，进化树显示，昆虫痘病毒是独立于杆状病毒的一个类群，而杆状病毒中的颗粒体病毒和核多角体病毒又分为两个类群. 在核多角体病毒中斜纹夜蛾核多角体病毒和粘虫核多角体病毒两个种又从其他核多角体病毒中分出来. AcMNPV 和 BmNPV 的同源性高达 90%，在进化树上处于同一个分枝，而 SpltMNPV 和 LsMNPV、OpMNPV 和 CfMNPV 的同源性相对较高，也分别处在进化树的同一个分枝上.

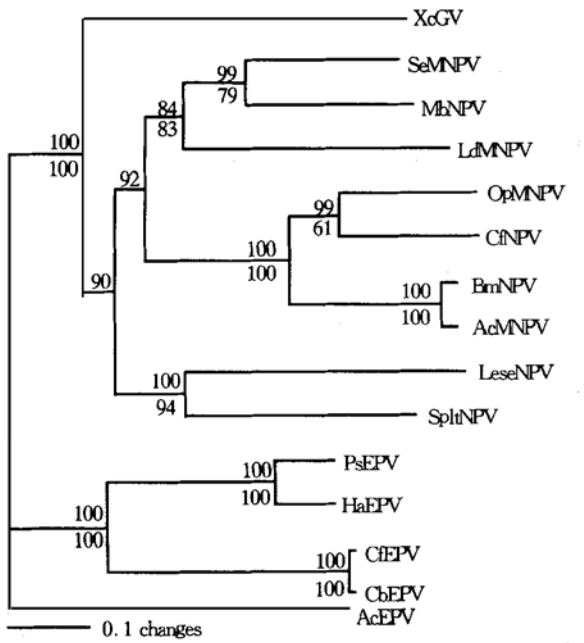

Fig. 3 A phylogenetic tree of baculoviruses based on amino acid sequences of GP37s

Data is from GenBank above. AcMNPV[10], BmNPV[11], LdMNPV[12], SeMNPV[13], LsNPV[8], CfNPV[14], MbNPV[8], XcGV[15], AcEPV[16], PsEPV[17], HaEPV[18], CfEPV[16], CbEPV[19].

3 讨 论

3.1 杆状病毒 *gp*37 基因结构及同源性分析

对不同种的昆虫杆状病毒 *gp* 37 基因的研究表明，它是一个祖先的基因，可能所有杆状病毒都有这个基因. 已知 GP37 蛋白是杆状病毒外膜的一种结构糖蛋白，含有高比例的亲水性氨基酸. 目前，已经报道的昆虫病毒 *gp* 37 基因有 11 种，核多角体病毒有 8 种. 分析可知，杆状病毒 37 ku 糖蛋白基因有较高的同源性. 根据 SpltMNPV *gp* 37 基因的结构分析，在它的上游插入了 ubiquitin 基因，推测有两种可能. 其一，由于 Ubiquitin 蛋白是附着于杆状病毒内膜上的典型的磷脂化蛋白[20]. 故推测 Ubiquitin 蛋白可起一种分子伴侣 (chaperone) 作用，在 SpltMNPV 中 ubiquitin 可能转座插入到 gp37 基因中，伴随着 GP37 蛋白在病毒感染周期中起作用；其二，根据杆状病毒的进化分析，SpltMNPV 与其他多数杆状病毒的亲缘关系较远，这种结构上的差异也反映了他在杆状病毒中的特殊地位. 把 SpltMNPV GP37 的氨基酸序列与其他 10 种昆虫杆状病毒 GP37 以及两种昆虫痘病毒的 GP37/fusolin 蛋白氨基酸序列进行比较，确定了

GP37 的保守性. 发现在保守区内有一些与 GP37 结构和功能密切相关的氨基酸是绝对保守的, 其 N 端含有 13 个半胱氨酸残基, 推测与形成类晶体有关[21]. 将 SpltMNPV *gp* 37 基因簇的序列与已经报道的五种杆状病毒基因组 (AcMNPV, OpMNPV、BmNPV、LdMNPV、SeMNPV) 序列比较发现, SpltMNPV 基因组结构不同. *gp* 37 基因存在于基因组的不同位置上, 推测 *gp* 37 基因在杆状病毒的生命周期中有转座作用[8]. 而 SpltMNPV GP37 蛋白也与其他杆状病毒 GP37 蛋白结构不同的是 Ubiquitin 蛋白落在了它的前面, 处于同一读码框内. 这种结构上的不同可能反映了功能上的差异.

3.2 杆状病毒 GP37 的分子进化树分析

根据 SpltMNPV GP37 蛋白的氨基酸序列与其他昆虫核多角体病毒 GP37 序列比较发现, 氨基酸同源性达 45% ~ 56%, 与 LsMNPV 的同源性最高, 达 56%. 以多种昆虫病毒的 GP37 蛋白序列为基础, 绘制的杆状病毒分子进化树得到了引导程序的支持 (1000 次平行测定, 结果依赖于 O'Relly 实验室的帮助). 目前关于杆状病毒的分子进化树, 多以多角体蛋白和颗粒体蛋白基因为基础, 二者是杆状病毒中保守性程度很高的基因, 在进化过程中产生的变异不容易分开, 很难真实反映杆状病毒之间的亲缘关系, 故在分子进化的研究中应选择能够客观反映各物种在分子水平上的差异的基因做分子进化树分析. 除了多角体蛋白和颗粒体蛋白基因之外, *gp* 37 基因是又一个杆状病毒比较保守的基因. 因此, 可以利用它们之间的同源性差异进行分子进化方面的分析, 从而研究昆虫病毒的进化. GP37 或 Fusolin 的进化分析表明, 在杆状病毒进化树上, GP37 为基础的进化研究与现已发表的以其他病毒蛋白为基础的进化研究结果相一致[22,23]. 从 GP37 的分析结果可以看出昆虫包涵体病毒至少包括核多角体病毒、颗粒体病毒和痘病毒三个类群. 这个结果与传统分类结果相一致. 在进化上核多角体病毒与颗粒体病毒的亲缘关系较近, 而与痘病毒的亲缘关系较远. 核多角体病毒 AcMNPV、BmMNPV、CfMNPV 和 OpMNPV, 它们合在一起明显的区别于分析的其他 NPVs. 而昆虫痘病毒 (EPVs) 又形成独立的一枝. 究竟为什么 NPVs 的 GP37 和 EPVs 的 fusolin 同源性较高, 目前还不清楚. 推测可能 NPVs 和 EPVs 具有共同的祖先或在进化过程中通过重组或转座获得了 GP37/fusolin.[8,24]. 杆状病毒因种类繁杂、数量庞大, 故在昆虫病毒中占有重要地位. 从分子水平揭示杆状病毒的进化机制, 是杆状病毒研究的一个重要内容. 已知多角体蛋白基因用于研究杆状病毒的进化关系, 但是由于多角体蛋白基因过分保守, 不同的杆状病毒之间的差异不明显, 很难将年代积累的突变效应反映出来. 例如 AcMNPV 和 BmNPV 多角体基因的同源性较低, 在进化分析上不在一个分枝上, 而 *gp* 37 基因的同源性高达 90%, 表明亲缘关系非常近, 处于进化树的同一个分枝上, 这与以 *egt* 基因为基础的进化分析结果相一致[25]. *gp* 37 基因在杆状病毒中虽是一个比较保守的基因, 但其保守性又远不象多角体基因那样普遍高度保守. 如 LsMNPV、AcMNPV、BmMNPV、OpMNPV、CfMNPV 亲缘关系较远, 但在多角体基因的进化树中差别不明显. 在 *gp* 37 基因进化树上则反映了这一点. 当然, 不能说哪一个基因能最准确地体现杆状病毒及昆虫痘病毒之间的亲缘关系. 但是, 至少 *gp* 37 基因进化树分析是对多角体基因分子进化树的有益补充.

参 考 文 献

1 Wu J G, Lois K M. Sequence, transcription and translation of a late gene of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus encoding a 34.8 K polypeptide. J Gen Virol, 1989, **70** (9): 2449 ~ 2459

2 刘德立, 金天全, 齐义鹏. GP37 蛋白结构分析与昆虫病毒分子进化的关系. 病毒学报, 1999, **15** (3): 277~ 281
Liu D L, Jin T Q, Qi Y P. Viriloga Sinica, 1999, **15** (3): 277 ~ 281

3 Sriskantha A, Osborne R J, Dall D J. Mapping of the *Heliothis armigera* entomopoxvirus (HaEPV) genome, analysis of genes encoding the HaEPV spheroidin and triphosphate phosphohydrolase I proteins. J Gen Virol, 1997, **78** (12): 3115~ 3123

4 李广宏. 甜菜夜蛾室内种质的保持及几种饲料成分对 SeNPV 产量的影响: [博士学位论文], 广州: 中山大学, 1998
Li G H. Influence of production of SeNPV for several forage elements as well as preservation of Beet armyworm at room. [Dissertation for Doctor's degree], Guangzhou, Zhongshan University, 1998

5 中山大学生物系昆虫专业昆虫病毒研究组. 斜纹夜蛾核型多角体病毒的初步研究. 中山大学学报 (自然科学版), 1976, **3**: 92~ 97
Research Group on Insect Virus in the Biology Department of Zhongshan University. Acta Zhongshna University Sinica, 1976, **3**: 92~ 97

6 J. 萨姆克鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 金冬雁, 等译. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1996. 16~ 56, 237~ 287, 304~ 323
Sambrook J, Fritsch E F, Coulson A R. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

7 魏永杰. SlNPV 的物理图谱和部分基因的序列分析: [博士学位论文], 广州: 中山大学, 1998
Wei Y J. Physical map and partial sequence analysis of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SpltNPV). [Dissertation for Doctor's degree], Guangzhou, Zhongshan University, 1998

8 Phanis C G, Miller D P, Cassar S C, *et al*. Identification and expression of two baculovirus gp37 genes. J Gen Virol, 1999, **80** (7): 1823~ 1831
9 Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 1994, **22** (22): 4673~ 4680
10 Ayres M D, Howard S C, Kuzio J, *et al*. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, 1994, **202** (2): 586~ 605
11 Gomi S, Majimol K, Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. J Gen Virol, 1999, **80** (5): 1323~ 1337
12 Kuzio J, Pearson M N, Harwood S H, *et al*. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *lymantria dispar*. Virology, 1999, **253** (1): 17~ 34
13 Ijkel W F, van Strien E A, Heldens J G, *et al*. Sequence and organization of the Spodoptera exigua multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. J Gen Virol, 1999, **80** (12): 3289~ 3304
14 Liu J J, Carstens E B. Identification, molecular cloning, and transcription analysis of the *Choristoneura fumiferana* nuclear polyhedrosis virus spindale-like protein gene. Virology, 1996, **223** (2): 396~ 400
15 Hayakawa T, ko R, Okano K, *et al*. Sequence analysis of the Xestia c-nigrum granulovirus genome. Virology, 1999, **262** (2): 277~ 297
16 Mitsuhashi W, Saito H, Sato M. Complete nucleotide sequence of the fusolin gene of an entomopoxvirus in the cupreous chafer. Anomala cuprea Hope (Coleoptera: Scarabaeidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1997, **27** (10): 869~ 876
17 Hayakawa T, Xu J, Hukuhara T. Cloning and sequencing of the gene for an enhancing factor from pseudaletia separata entomopoxivirus. Gene, 1996, **177** (1~ 2): 269~ 270
18 Dall D, Sriskantha A, Vera A, *et al*. A gene encoding a highly expressed spindle body protein of Heliothis armigera entomopoxivirus. J Gen Virol, 1993, **74** (9): 1811~ 1818
19 Yuen L, Dionne J, Arif B, *et al*. Identification and sequencing of the spheroidin gene of Choristoneura biennis entomopoxivirus. Virology, 1990, **175** (2): 427~ 433
20 Guario L A, Smith G, Dong W. Ubiquitin is attached to membranes of baculovirus particles by a novel type of phospholipid anchor. Cell, 1995, **80** (2): 301~ 309
21 Gauthier L, Cousserans F, Veyrunes J C. The Melolontha melolontha entomopoxvirus (MmEPV) fusolin is related to the fusolins of lepidopteran EPVs and to the 37K baculovirus glycoprotein. Virology, 1995, **208** (2): 427~ 436
22 Kang W, Tristem M, Maeda S, *et al*. Identification and characterization of the Cydia pomonella granulovirus cathepsin and chitinase genes. J Gen Virol, 1998, **79** (9): 2283~ 2292
23 Zanotto P M D, Kessing B D, Maruniak J E. Phylogenetic interrelationship among baculovirus: evolutionary rates and host associations. J Invert Pathol, 1993, **62** (2): 147~ 164
24 Afonso C L, Tulman E R, Lu Z, *et al*. The genome of Melaroplus sanguinipes entomopoxvirus. J Virol, 1999, **73** (1): 533~ 552
25 闫庆生, 庞 义, 杨 洁, 等. 斜纹夜蛾核多角体病毒 egt 基因的核苷酸全序列分析及同源性比较. 生物工程学报, 1999, **15** (2): 176~ 182
Yan Q S, Pang Y, Yang J, *et al*. Acta Biotechnology Sinica, 1999, **15** (2): 176~ 182

Cloning and Sequencing of *Spodoptera litura* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus *gp* 37 Gene Cluster*

LI Chong-Bi, LI Zhao-Fei, YAN Qing-Sheng, HU Guo-Dong, PANG Yi**
(*State Key Laboratory for Biocontrol, Zhongshan University, Guangzhou* 510275, China)

Abstract The *gp* 37 genes of *Spodoptera litura* NPV (SpltMNPV) was cloned and sequenced. Employing computer analysis, glycosilated sites and the promoter motif existed in the *gp* 37 gene. and was shown as a late gene encoding a 37 ku glycoprotein. A phylogeny tree was designed by the comparison of their homologues from known *gp* 37 genes of baculoviruses. It was shown that the phylogeny of baculoviruses on the basis of *gp* 37 gene was different from that based on *polyhedrin* genes. For example, *Bombyx mori* NPV (BmNPV) and *Autographa californica* NPV (AcMNPV) were evolved in the same branch, otherwise, they were put in two distinct branches in the tree according to the analysis of *polyhedrin*. This result was consistent with the baculovirus phylogeny based on EGT published previously.

Key words *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SpltMNPV), *gp* 37 gene cluster, cloned and sequenced

* This work was supported by National Natural Sciences Foundation of China (39730030).
** Corresponding author. Tel: 86-10-82022243, 82022249, E-mail: cbbl@263.net
Received: September 1, 2000 Accepted: November 3, 2000