油桐尺蠖核型多角体病毒DNA片段的分子克隆及其鉴定*

丁达明　武亚明　方慈祺　周咏芝

孙国萍　张益民　简浩然

（中国科学院武汉病毒研究所，武汉）

提　　要

使用限制性核酸内切酶BamHI将油桐尺蠖核型多角体病毒（Buzura Suppressaria Nuclear Polyhedrosis Virus。简称BsNPV）DNA切为9个片段。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳洗脱，将其酶切片段与BamHI切割后的质粒pBR_{322}重组，转化大肠杆菌，经抗菌素筛选、电泳分析和菌落杂交3种方法证明了插入子的存在，从而表明油桐尺蠖核型多角体病毒DNA BamHI 片段已经克隆。

BsNPV是应用于茶叶害虫防治中的病毒之一，在防治油桐尺蠖中效果比较明显[1]我们进行BsNPVDNA的分子克隆，就是要使该病毒在保护经济作物中，有着更为广泛的应用。

材料与方法

研究材料

BsNPV由本组提取，其DNA的纯化按Hirst等的方法进行[3]。限制性核酸内切酶 BamHI、细菌碱性磷酸单酯酶（BAP）、T_4DNA连接酶以及α-^{32}P-dATP 为NEN公司产品，质粒pBR_{322}、大肠杆菌SR-200由加拿大梁伟才先生的实验室提供。1升肉汤培养基含 10克旦白胨、5克酵母膏、5克NaCl和10mMTris•HCl，pH7.5；1升固体培养基除含上述物质外，还含有4克葡萄糖，并加有15克细菌琼脂[2]。

BsNPV DNA片段的分子克隆

1.酶反应系统：50μgBsNPVDNA溶于100μl含6mM Tris•HCl，pH7.9，6mM $MgCl_2$、120mMNaCl，100μg/ml牛血清旦白的缓冲液中，与50单位BamHI，37°C温育三小时，然后酚抽提，去除旦白和酶。用90μl点样于0.7%琼脂糖平板凝胶（含0.5μg/ml溴化乙锭）电泳，另外留下的10μl用于随机克隆。

* 参加本工作的还包括：陈丽德、周履谦、扬一平、孙松柏、翁兆葵、张一鸣、魏芸斋和叶志华等同志。本工作得到加拿大阿尔伯特大学梁伟才、林复娟博士指导，特此致谢。

本文于1985年7月9日收到

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

10μg pBR_{322}溶于20μl上述缓冲液中，与10单位BamHI 37°C温育三小时，然后加入2μl 1M Tris·HCl pH9.0，1单位BAP，65°C，15分钟加热，酚抽提，乙醇沉淀DNA。

电泳洗脱的BsNPVDNA各片段和用于随机克隆的样品与处理后的pBR_{322}（1μg）分别在20μl 66mM Tris·HCl，pH7.6，6.6mM $MgCl_2$、10mM二硫基苏糖醇(DTT)，66μM焦磷酸钠，1单位的T_4DNA连接酶中，4°C反应过夜（约16小时）。

2.转化：将大肠杆菌SR200接种于5ml固体培养基，37°C过夜培养，取0.1ml过夜培养物转到10ml肉汤培养基中，37°C摇床培养直到培养物的$O.D_{600}$为0.5，离心收集菌体（4,000g，4°C 5分钟）。用50mM $CaCl_2$，10mM Tris·HCl（pH8.0）洗一次，然后重悬于预冷的50mM$CaCl_2$、10mM Tris-HCl，pH8.0溶液，静置于冰中15分钟[4]。

将DNA的连接反应混合物置于预冷的管中，加入5倍的细菌悬液、混匀，冰中静置40分钟，然后42°C 2分钟，每管加入1ml肉汤，37°C孵育30分钟。

抗菌素筛选

把上述反应混合物铺在含氨卞青霉素的固体培养基上，将生长出的菌落分别点在只含氨卞青霉素（Ap^+Tc^-）和含氨卞青霉素与四环素（Ap^+Tc^+）的固体培养基上，以筛选出抗氨卞青霉素而对四环素敏感（Ap^rTc^s）的转化子。

电泳分析

按照Birnboim和Doly的方法[2]，将Ap^rTc^s转化菌通过溶菌酶处理、然后碱水解提取重组质粒，于0.5%琼脂糖凝胶电泳，并以标准质粒pBR_{322}作对照。

菌落杂交

1975年，Southern提出了DNA转移技术[5]。用具放射活性的RNA或DNA杂交，放射自显影后，就能发现与之互补的特异DNA和RNA片段的存在[6]。菌落杂交则是Grunstein和Hogness发展的一种与个体菌落进行标记探针杂交的技术[7]将Ap^rTc^s菌落直接复印在硝酸纤维素膜上，培养一段时间后，加入氯霉素抑制SR200生长，而使pBR_{322}仍然增殖。将菌落中的DNA烘烤到滤膜上，运用缺口翻译技术合成具放射性的BsNPV DNA，以此作分子探针，检测滤膜上的重组质粒。

结　果

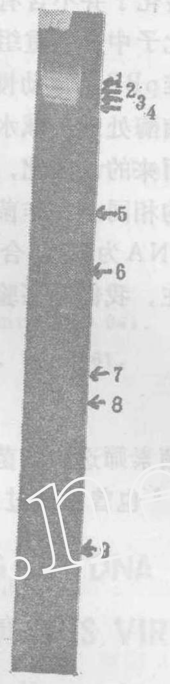
BamHI切割BsNPV DNA，在有0.5μg/ml溴化乙锭的0.7%琼脂糖凝胶上电泳后，紫外检测分析，环状BsNPV DNA有九个BamHI切点，从而得到9个大小不同片段(图1)，将这些凝胶片切割下来，电泳洗脱，每10分钟在紫外光下检测一次，直到DNA均进入透折袋上的缓冲液中，收集含DNA的缓冲液，正丁醇抽提去溴化乙锭，乙醇沉淀DNA。T_4DNA连接酶连接pBR_{322}和BsNPV DNA片段，转化大肠杆菌SR200（质粒的受体菌），抗菌素筛选转化子，我们发现随机克隆转化子多于特异片段克隆的转化子。

把转化子进行溶菌酶处理，碱水解，得到的重组质粒作电泳分折，并以pBR_{322}作对照，结果见图2。A为pBR_{322}对照，B—G为随机克隆的质粒，H→K为特异片段克隆。由图可

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

图1.BsNPV DNA在6mM Tris·HCl pH7.9,6mM $MgCl_2$、120mM NaCl，100μg/mlBSA 的缓冲体系中，与限制性核酸内切酶BamHI37°c温育 3 小时，0.7%琼脂糖凝胶电泳。

Fig1, 0.7% agarose gel electrophoresis of BamHI digests of BsNPV DNA in 6mMTris-HCl, pH7.9 6mM $MgCl_2$, 120mM NaCl, 100μg/ml BSA at 37°C for 3 hrs



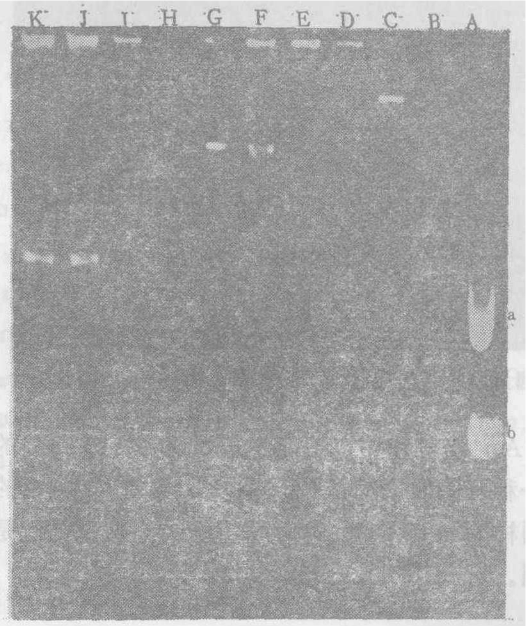


图2.0.5%琼脂糖平板凝胶电泳分折，A为正常pBR_{322}，分为两条带，a为环状，b为超螺旋结构，C、D、F、G、J、K为重组质粒，E：pBR322，B.H.I无质粒可见。

Fig2. 0.5% agarose slab gel electrophoresis. A. pBR_{322} (control)a：nick circular DNA, b：superhelix DNA; C.D.F.G.J.K.：recombinant plasmid, E：pBR_{322}; B.H.I：no plasmid.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

见，有的转化子并不含有质粒（如B、H、I），有的转化子仍含正常pBR_{322}质粒（如E）但大部分转化子中含有重组质粒，由于插入子的存在，重组质粒分子量高于pBR_{322}，在电泳过程中比标准pBR_{322}泳动慢。

由溶菌酶处理、碱水解后吸附在硝酸纤维素膜上的DNA，就是原一个细菌（转化子)长成的菌落而来的。因此，一般说来，它们具有相同的核酸，且其大小、形状，分子量以及碱基组成等均相同。在作菌落杂交的同时，我们仍以 pBR_{322} 作对照。应用缺口翻译系统，以BsNPV DNA为模板,合成与BsNPV DNA互补的分子探针,检测重组质粒中BsNPV DNA片段的存在，我们的实验证实了插入子的存在（见图3）。

讨　　论

由抗菌素筛选出的菌落，通过电泳分析，有的并不为重组质粒，这种现象在1979年Dagert,M.等[8]也曾报道过。一种可能的解释是pBR_{322}中Tc基因发生突变,使菌落由$Tc^r \rightarrow Tc^s$，

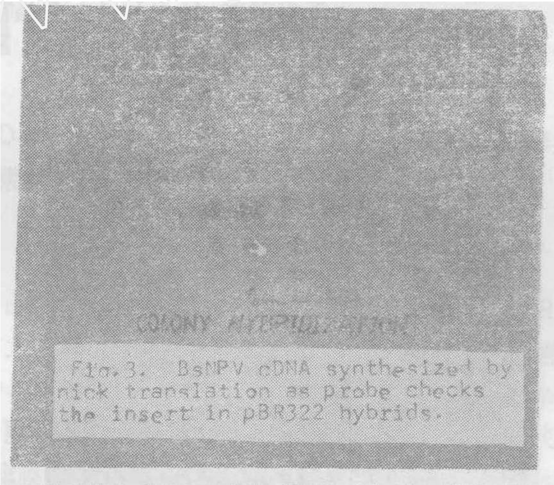


图3 菌落杂交，由缺口翻译系统合成的BsNPVcDNA为探针，检测pBR_{322}杂种中的插入子。

这样，这些菌落在含Tc^+Ap^+培养基中也不能生长，而在Ap^+Tc^-的培养基中可以生长，于是造成假阳性结果。另一种可能的解释是，有些被 BamHI 切割后的质粒，没有重新连接起来，因此，虽然它们也同样为 Ap^rTc^s，却并非重组子。这也许就是转化子中有与对照质粒同样大小质粒存在的原因。

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参 考 文 献

〔1〕谢天恩，彭辉银，1980，中国茶叶，5：18。
〔2〕Maniatis,T.et al, 1982, Molecular Cloning,Cold Spring Harbor Laboratory.
〔3〕Hirt,B.J. 1967, J.Mol.Biol.26：365.
〔4〕Norgard,M.V.et al.,1978, Gene 3：279.
〔5〕Southern,E.M. 1975, J.Mol.Biol. 98：503.
〔6〕Denhardt,D.T.et al., 1966, Biochem.Biophys. Res. Commun.23：641.
〔7〕Grunstein,M.et al., 1975, Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72：3961.
〔8〕Dagert,M. et al., 1979, Gene 6：23.

IDENTIFICATION AND MOLECULAR CLONING OF DNA OF BUZURA SUPPRESSARIA NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS*

Ding Da-ming Wu Ya-ming Fang Ci-qi Zhou Yong-zhi
Sun Gon-ping Zhang Yi-min Jian Hao-ran
(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica,Wuhan)

The DNA of Buzura Suppressaria Nuclear Polyhedrosis Virus(BsNPV) was digested at least 9 fragments by restriction endonuclease BamHI.The fragments eluted by polyacrylamide gel electrophoresis were recombined with plasmid pBR_{322} incubated with BamHI and transfered into E.coli. Antibiotic screening, electrophoresis analysis and colony hybridization showed the existence of insert sequence in hybrid plasmid. The result suggested that the cloning of BamHI fragments of BsNPV DNA be successful.

* Other colleagues are：Chen Li-de, Zhou Lu-qian, YangYi-pin, Sun Song-bo,Weng Zhao-kui,Zhang Yi-ming Wei Yun-zai and Ye zhi-hua.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net