

薄荷伪造桥虫多角体病毒及其核酸的 限制性内切酶酶解分析

罗 经 王汉中 杨学楼

吴晰莹 黄文林

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

提 要

本文描述了从薄荷伪造桥虫 (*Argrogramma agnata* stgr.) 幼虫分离到的一种核型多角体病毒的形态以及采用简便的方法提取的核酸, 经限制性内切酶 EcoRI, BamHI, Hind III, Bgl I, Bgl II 和 Bgl I + Bgl II, BamHI + EcoRI 酶解, 获得该病毒核酸的酶解带谱。以入DNA的 EcoRI 酶解片段在凝胶中的迁移率与相应DNA片段分子量的对数值作标准曲线。从曲线上求得薄荷伪造桥虫多角体病毒核酸酶解各片段的分子量。此病毒核酸的平均分子量为 108.51×10^6 道尔顿。

薄荷是特种经济作物, 是医药、化工、食品工业的重要原料, 也是我国重要外贸物资之一。伪造桥虫是危害薄荷的主要害虫, 它属鳞翅目夜蛾科。危害薄荷的三龄幼虫为暴食期, 可使薄荷减产50%以上。1976年南通县植保站盛桂祥等同志从死亡的薄荷伪造桥虫幼虫分离到多角体病毒, 经实验室及田间试验证明其杀虫效果可达75—100%^[1]。此病毒经我们初步观察认为是杆状病毒属 (*Baculovirus*) 亚组A中的一种病毒^[2]。这里主要报道此病毒核酸的内切酶酶解带谱及分子量。

材料和方法

一、病毒:

(简称A. a NPV) 南通县植保站盛桂祥同志供给多角体原种, 采集幼虫感染病毒, 获得死虫, 经研磨后以1,000rpm与3,500rpm交叉离心, 以及40—60% (W/V) 蔗糖梯度离心获得纯多角体。

多角体经0.05MNa₂CO₃-0.05MNaClpH10.8碱液, 在30°C水浴中降解20—30分钟, 再用pH2.0PBS液中和后离心去沉淀, 上清液经负染色后电镜观察病毒粒子。

本所电镜组邓海凡, 张世敏, 红邓同志拍摄本文照片特此致谢!

武汉大学计算中心廖梦阳老师协助计算分子量特此致谢!

本文1985年8月18日收到。

二、病毒核酸的提取:

取湿重100~200mg多角体加入1 ml蒸馏水, 3 ml pH10.8碱液, 30°C消化20—30分钟后, 再加入3 ml碱液再消化10分钟, 用pH2.0 PBS液调节pH至7.0离心去沉淀。上清液加入10% SDS液, 使其最终浓度达2%, 于60°C水浴保温30分钟。待冷加入5 M NaCl使其最终浓度达1 M。冰箱过夜。第二天取出室温待融, 以3000rpm离心30分钟弃去沉淀。上清液加入20 μ g/ml RNase (RNase先于80°C水浴中处理90分钟)于37°C保温30分钟。再用Tris-饱和酚抽提两次, 用冷乙醚去酚两次, 真空抽去乙醚。然后加入两倍量95%冷乙醇沉淀核酸。加入乙醇后即可见丝状核酸出现, 用玻棒搅起核酸, 于70%乙醇中漂洗一次, 连玻棒一起放在0.1 \times SSC中溶解核酸。取出少量核酸液用紫外分光光度计测定纯度及含量。

三、核酸酶解与琼脂糖凝胶电泳:

酶解反应物含5X缓冲液(1X含100mM Tris-HCl pH7.5, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM α -巯基乙醇) 10 μ l; 核酸4 μ g, 内切酶2 u-5 u/ μ g DNA, 用灭菌双蒸水补充体积至50 μ l, 37°C保温2—3小时, 65°C灭活5分钟中止反应。加入溴酚兰—甘油液备用。

用1%琼脂糖凝胶平板电泳。电泳缓冲液为TNE(50mM Tris-20mM NaAc pH8.0, 1mM EDTA Na₂) 80—100V电泳14—18小时。

限制性内切酶EcoRI, BamHI BRL公司进口; HindⅢ西德进口; Bgl I, Bgl II中科院生物物理所生化厂生产。

结 果

一、多角体及病毒粒子的形态:

多角体经伊红染色后在显微镜下看到大多为三角形的纯多角体。平均大小为1.3—2.3 μ 。电镜观察也多为三角形(图1a)。病毒粒子为杆状, 一端有一小突起, 另一端略尖, 平均大小为350 \times 68nm(图1b)。

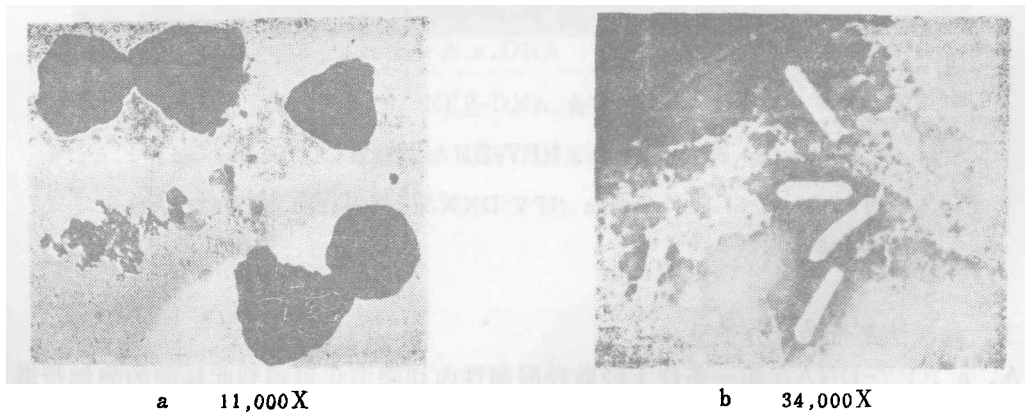


图1 多角体及病毒粒子形态

Fig 1. Morphological of the polyhedra and the virion of *A. agnata* Stgr.

多角体经碱释放后，在电镜下还可看到单粒包埋型的病毒粒子在多角体外壳中（图2）。

提取的核酸经紫外分光光度计检测呈现典型的核酸吸收峰（图3）。其 $A_{260} : A_{280}$ 为 1.89，说明较纯。其含量为 $760\mu\text{g}/\text{ml}$ 。



图2 单粒包埋型病毒粒子34,000X
Fig 2. Single enveloped virus particles of *A. agnata* polyhedron.

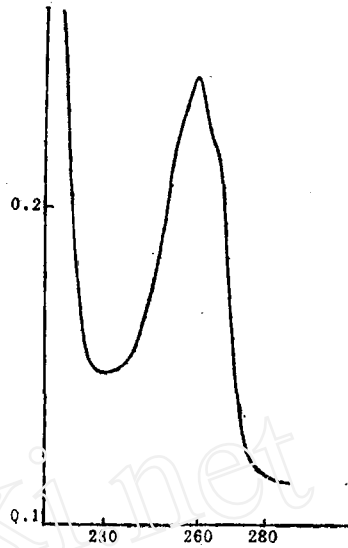


图3 *A. a* NPV-DNA紫外吸收峰扫描图。
Fig 3. Ultraviolet absorbance curve of *A. agnata* NPV DNA.

取此核酸 $20\mu\text{l}$ ，不经酶解，加入 $5\mu\text{l}$ 甘油-溴酚兰液，以 1% 琼脂糖凝胶电泳，得到单一带（图4），说明此核酸不含宿主核酸。

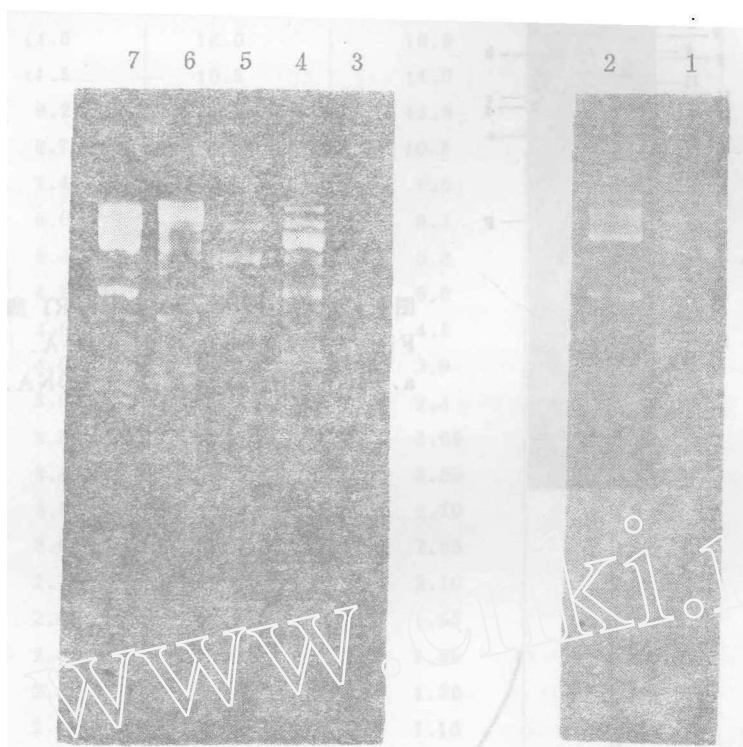


图4 *A. a* NPV-DNA 核酸带
Fig 4. The band of *A. agnata* NPV-DNA undigested by restriction endonuclease.

三、核酸酶解带谱及分子量：

A. a NPV-DNA 在同一条件下经数种限制性内切酶消化可得到此核酸的酶解带谱（图5）。经 *EcoRI* 酶解可得 28 条带，*BamHI* 可得 21 条带，*HindIII* 可得 23 条带，*BglI* 可解成 29 条带，*BglII* 可解成 23 条带。而 *BglI* + *BglII* 双酶解得 27 条带，*EcoRI* + *BamHI* 得 23 条带。

以EcoR1酶解 λ DNA，各片段在凝胶电泳中的迁移距离与相应各片段分子量的对数值作标准曲线（图6、7）。从此标准曲线上查出此A.a.NPV-DNA各片段的分子量。各片段的分子量列于表1。各酶解片段分子量总和，求得该核酸平均分子量为 108.51×10^6 道尔顿。



- 1 EcoR1+BamH1-A.a.NPV.
- 2 EcoR1-A.a.NPV
- 3 EcoR1- λ DNA
- 4 Hind III-A.a.DNA
- 5 Bgl I+Bgl II-A.a.NPV-DNA
- 6 BamH1-A.a.DNA
- 7 EcoR1-A.a.DNA

图5 A. a. NPV-DNA 各酶酶解带谱。

Fig 5. The map of *A. agnata* NPV-DNA digested by several restriction endonuclease.

A. a. NPV-DNA
- EcoR1

λ DNA-EcoR1

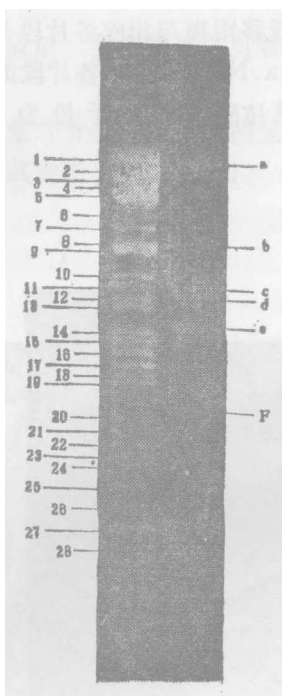


图6 A. a. NPV-DNA-EcoR1 酶解带谱
Fig 6. The map of EcoRI-A.
a. NPV-DNA and EcoRI- λ DNA.

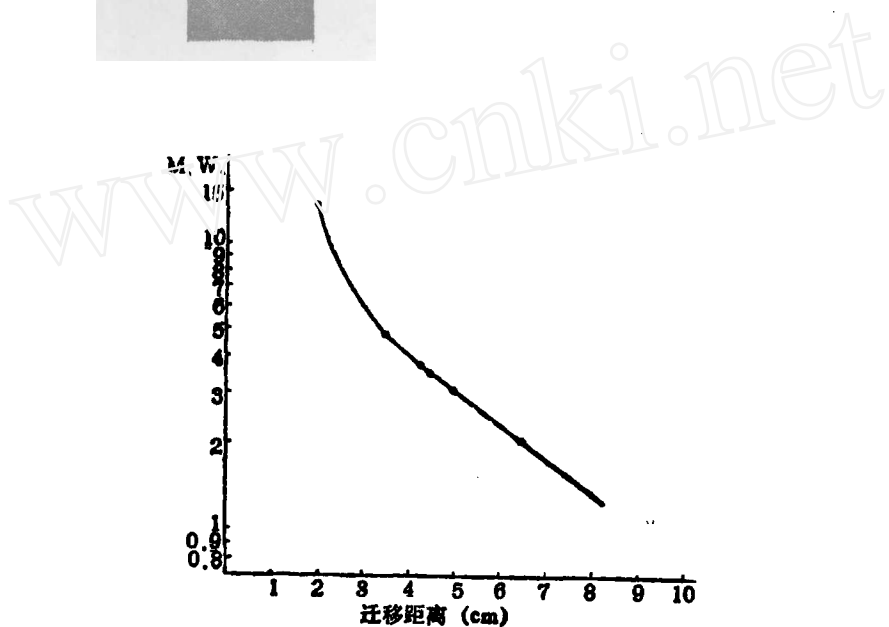


图7 EcoR1- λ DNA 迁移距离与分子量关系曲线

Fig 7. The standard curve of molecular weight and mobility of λ -DNA in 1% agarose.

表1 A.a.NPV-DNA各酶酶解片段的分子量($\times 10^6$ d)

Table. Molecular weight of each A.a.NPV DNA. fragmants generated by restriction endonuclease.

	EcoRI	Hind III	BamHI	Bgl I + Bgl II	EcoRI+BamHI
1	14.5	16.0	16.0	14.5	15.7
2	11.5	10.5	14.0	11.5	10.5
3	9.2	8.5	13.0	8.6	8.8
4	8.7	8.0	10.5	6.2	7.0
5	7.4	6.4	7.3	5.4	6.3
6	6.0	5.5	6.4	4.6	5.95
7	5.4	4.9	5.8	4.3	5.1
8	4.7	4.6	5.5	4.05	5.0
9	4.5	4.5	4.5	3.9	4.4
10	4.05	4.3	3.9	3.7	4.15
11	3.8	3.9	3.4	3.6	3.9
12	3.55	3.4	3.05	3.5	3.5
13	3.4	3.1	2.85	3.2	3.3
14	3.05	3.0	2.70	3.1	3.1
15	2.95	2.8	2.25	2.95	2.9
16	2.75	2.65	2.10	2.75	2.75
17	2.58	2.55	1.55	2.65	2.40
18	2.50	2.25	1.35	2.55	2.25
19	2.40	2.15	1.20	2.40	1.90
20	2.05	2.10	1.10	2.15	1.75
21	1.88	1.98	1.05	1.85	1.55
22	1.78	1.58		1.78	1.35
23	1.70	1.12		1.70	1.20
24	1.65			1.48	
25	1.48			1.25	
26	1.35			1.18	
27	1.20			0.8	
28	1.08				
总计	117.10	105.58	109.50	105.64	104.75

讨 论

薄荷伪造桥虫多角体病毒是国内首次分离到的又一种核型多角体病毒, 国外未见报道。其杀虫效果可达75—100%, 其防治效果稳定, 这为我国病毒制剂的利用又增添了一个新品种。它可以感染大豆伪造桥虫^[1], 其复制后的病毒在生物学特性及核酸性质上与薄荷伪造桥虫多角体病毒是否相同, 有待进一步作比较研究。

薄荷伪造桥虫多角体病毒核酸的分子量平均为 108.51×10^6 道尔顿, 它是目前所报道的

多角体病毒核酸分子量中较大的一种。家蚕NPV-DNA马延高等报道为 82×10^6 道尔顿³。李敏棠⁴报道家蚕NPV-DNA为 73×10^6 d。李金照⁵等报道大尺蠖NPV-DNA为 50×10^6 d。林栖凤⁶报道蓖麻蚕NPV-DNA分子量为 74.6×10^6 d。李晓利⁷报道粘虫NPV-DNA S株分子量为 76.2×10^6 d, F株为 93.3×10^6 d。罗经⁸等测得斜纹夜蛾NPV-DNA分子量为 75.51×10^6 d, 孙松柏⁹等报道褐点粉灯蛾NPV-DNA分子量为 60×10^6 d。孙松柏等¹⁰报道油桐尺蠖NPV-DNA分子量为 75×10^6 d。G. E. Smith et al¹¹曾报道几种核型多角体病毒的核酸分子量, ACM-NPV 79.0×10^6 d, 粉纹夜蛾多角体病毒 81.1×10^6 d, 棉铃虫NPV 92.9×10^6 等。综上所述的核酸分子量都未超过 100×10^6 d的。所以我们认为薄荷伪造桥虫多角体病毒核酸分子量是目前所报道的最大的一种。A. a. NPV-DNA的各种限制性内切酶酶解图谱比较复杂, 我们曾试图将此核酸酶解后与PBR₃₂₂质粒连接, 再克隆至大肠杆菌中去制成克隆, 后因其片段太多未能全部克隆成功, 经过筛选只得到十多个克隆, 这方面的工作还有待进一步深入。

使用限制性内切酶酶解法测得的分子量数值上有一定误差, 因此所测出的分子量只是近似值。当DNA片段分子量大于 13.0×10^6 道尔顿时, 分子量的对数值与泳动距离不呈直线关系, 使测定结果偏低或偏高。我们使用五种内切酶酶解后测得的分子量只EcoRI酶解的偏高外, 其余均近似。所以用几种酶测得的分子量加以校正, 比用单一酶求得的分子量更精确可靠。有几种酶酶解片段总分子量偏低, 可能是有所丢失所致。

参 考 文 献

- [1] 南通县植保站, 1980, 内部总结资料。
- [2] 罗经等, 1982, 《病毒学集刊》No 1, 191。
- [3] 马延高等, 1983, 《病毒学集刊》No 3, 141。
- [4] 李敏棠等, 1981, 《科学通报》22: 1391。
- [5] 李金照等, 1983, 《病毒学集刊》No 3, 129。
- [6] 林栖凤等, 1983, 《病毒学集刊》No 3, 107。
- [7] 李晓利, 1984, 《病毒学研究集刊》第一集, 196。
- [8] 罗经等, 待发表资料。
- [9] 孙松柏等, 1985, 《西南林学院学报》第一期。
- [10] 孙松柏等, 1985, 《华中农学院学报》第二期。
- [11] Smith G. E et al. 1978, *Virology* 89: 517。
- [12] Burgess, S. 1977. *J. Gen. Virol.* 37: 501。
- [13] Miller L.K. et al, 1979. *J. Virol.* 29: 1044。
- [14] Gale E. Smith et al. 1980. *J. Virol.* 33 (1): 311。

**A STUDY ON THE NPV OF
ARGROGRAMMA AGNATA STGR
AND ANALYSIS OF ITS NUCLEAR ACID MAP
WITH RESTRICTION ENDONUCLEASES**

Luo Jing, Wang Hang-zhong, Yang Xue-lou, Wu Xi-ying, Huang Wen-lin

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

In this paper the morphology of NPV isolated from A.a.Stgr. is described and the map of A.a.NPV-DNA extracted in a simple method is obtained through restriction endonuclease digest such as EcoRI, BglI, BglII, BamHI, HindIII, and double digest BglI+BglII, BamHI+EcoRI. By using relationship between the different size of λ -DNA cleaved by EcoRI and it's mobility in 1% agarose electrophoresis, standard curve of molecular weight is made. The molecular weight of each A. a. NPV-DNA fragments generated by restriction endonuclease above is obtained from standard curve. The average molecular weight of A. a. NPV-DNA is 108.51×10^6 daltons.