

蓖麻蚕核型多角体病毒与苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒多角体蛋白基因同源性的研究

陈蔚梅 林栖凤 金红* 卢文筠

(武汉大学病毒研究所, 武汉)

提 要

本文报道以苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒多角体蛋白基因mRNA的cDNA的重组质粒PMA-VI DNA转化E.coli RR₁。采用了多种筛选方法, 包括抗菌素抗性筛选, 菌落杂交及电泳等方法。快速地筛选出含有PMA-VI质粒的菌株。并以蓖麻蚕NPV-DNA作探针, 通过Southern杂交, 表明蓖麻蚕NPV基因组中具有与苜蓿银纹夜蛾NPV多角体蛋白基因同源性的核苷酸序列。

蓖麻蚕核型多角体病毒 [*Attacus ricini* (*Philosamia cytnhia ricini*) nuclear polyhedrosis virus, 简称ArNPV]是我国昆虫杆状病毒的典型代表之一。我们以ArNPV为研究对象, 在对该病毒基因组的分离, 提纯, 物理化学性质及物理图谱等研究的基础上, 正进一步开展以昆虫杆状病毒作为外源基因克隆载体的遗传工程研究。为了确定蓖麻蚕核型多角体蛋白基因在其基因组上的位置, 翱助重组质粒 PMA-VI [为苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (AcNPV) 多角体蛋白的mRNA的cDNA]为探针, 通过Southern杂交, 确证了蓖麻蚕NPV基因组中具有与AcNPV多角体基因同源性的核苷酸序列。

材 料 与 方 法

一、材料: 用于转化的PMA-VI DNA由美国乔治大学 Miller L.K 教授惠赠。蓖麻蚕NPV毒种由广西蚕业指导所惠赠, 病毒感染在本室进行。³⁵S-α-dATP为上海原子核研究所产品, 比放射性大于400Ci/mmol。

二、方法

1. 菌株 E.coli RR₁的增殖及钙处理: E.coli RR₁在L.B 培养基 (蛋白胨 10g/L; 牛肉膏 5g/L; 氯化钠 10g/L; pH7.5) 中增殖至O.D₆₅₀ = 0.4, 立即冷冻离心。将离心收集的菌体悬浮于20ml预先冷却的A液 (5mmol/L Tris·HCl pH7.6; 0.1mol/L NaCl; 5mmol/L MgCl₂) 中, 以同法离心。再将沉淀悬浮于20ml预先冷却的B液 (1mmol/L EGTA, 0.5% Triton X-100, 0.1mol/L NaCl) 中, 以同法离心。将上清液置于-20℃保存。

*本文于1987年11月2日收到

*武汉大学病毒系83级毕业生。

$1\text{ mol/L Tris-HCl pH7.6}$, 5 mmol/L MgCl_2 , 250 mmol/L KCl , 100 mmol/L CaCl_2 中, 置冰浴5分钟。以同法离心, 沉淀重悬于 0.4 ml B液 中, 贮于 4°C 待转化。

2. 转化: 取约 $2.0\mu\text{g PMA-VI DNA}$ (约 $10\mu\text{l}$), 加入 $90\mu\text{l TE 缓冲液}$ ($10\text{ mmol/L Tris-HCl pH8.0}$, 1 mmol/L EDTA)。混匀后加入 0.2 ml 上述钙处理过的受体细胞悬液, 冰浴30分钟后, 42°C 热冲击两分钟, 再加入 1 ml LB培养基 , 37°C 保温30分钟。以每平皿 $50\mu\text{l}$ 的量涂布于含有四环素 (Tc) 的LB培养基平板 (含Tc $20\mu\text{g}$, 琼脂2%) 上, 37°C 倒置培养24小时。

3. 筛选: 本实验采用的重组体PMA-VI是将AcNPV的多角体蛋白基因mRNA的cDNA的HindⅢ片段(分子量为 0.74 kb)插入质粒PBR322DNA的pst I位点^[1], 导致抗铵苄青霉素(Ap)基因失活, 由Ap^r变为Ap^s。分别从Ap和Tc平板中筛选Ap^sTc^r的菌落, 再作菌落杂交确定含PMA-VI DNA的转化子。

a) 抗菌素抗性筛选: 将转化子对应地分别点种在含Ap (含Ap $50\mu\text{g/ml}$, 琼脂2%) 及Tc的平板上, 37°C 培养24小时, 筛选Ap^sTc^r的阳性菌落。

b) Southern杂交: 以 $^{35}\text{S}-\alpha-\text{dATP}$ 经缺口转移标记AcNPV-DNA的限制性内切酶EcoRI的酶切片段为探针^[2], 在50%的甲酰胺介质中, 与转移在硝酸纤维素滤膜上的PMA—VI DNA的电泳图谱于 42°C 杂交24小时^[3], 反应完毕后, 用洗膜液($2\times\text{SSC}$, $0.1\%\text{ SDS}$) 65°C 洗膜三次, 吹干, 夹压X光片, -40°C 放射自显影。

c) 菌落杂交^[4]: 将经抗菌素抗性筛选的Ap^sTc^r菌落点种在含氯霉素 $70\mu\text{g/ml}$, 琼脂2%的平板上, 同时点两皿, 37°C 培养24小时以扩增质粒。留下一皿作对照, 另一皿准备转移菌落作菌落杂交。

将在 $20\times\text{SSC溶液}$ (3.0 mol/L NaCl , $0.3\text{ mol/L Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 中浸泡过的硝酸纤维素滤膜小心地放在培养好的平板上, 使菌落转移到硝酸纤维素滤膜上。然后将带有菌落的硝酸纤维素滤膜放在一叠用 0.5 mol/L NaOH 饱和的滤纸上进行碱处理10分钟, 再移至浸透中和液 ($1\text{ mol/L Tris-HCl pH7.0}$) 的滤纸上放置5分钟, 如此重复一次。再将硝酸纤维素滤膜转到浸透 $2\times\text{SSC溶液}$ 的滤纸上放置5分钟, 用预冷的95%乙醇沉淀DNA。硝酸纤维素滤膜在 80°C 烘烤2小时, 于阴凉处保存, 作菌落杂交用。以Southern杂交中同样的探针, 同法杂交, 将自显影图片与原平板上的菌落进行对照, 确定含有PMA-VI质粒的菌落。

4. 重组质粒DNA的快速提取: 经抗菌素抗性筛选和菌落杂交筛选出的含有PMA-VI质粒的菌株在LB培养基中增殖过液, 加入氯霉素, 使其终浓度为 $170\mu\text{g/ml}$, 37°C 扩增24小时。

质粒的快速提取参照Holmes等的方法^[5]进行。获得的质粒DNA沉淀溶于TE缓冲液中待进一步电泳纯化。

5. PMA—VI DNA的纯化:

用本实验室改进的电洗脱回收法^[6]将以上获得的质粒DNA进行纯化。回收器内溶液为 5 mmol/L Tris-HAc , 2.5 mmol/L NaAc , pH7.5) 外溶液为 $40\text{ mmol/L Tris-HAc}$, pH8.0 , 20 mmol/L NaAc , 1 mmol/L EDTA)。 60 mA , 约 150 V 电泳2小时。回收的DNA用水饱和的正丁醇抽提二次, 用冷无水乙醇沉淀, 置 -40°C 3小时。重溶于TE缓冲

液中，即可用于放射性标记作分子杂交的探针。

结 果 与 讨 论

一、转化结果：

本实验用于转化的PMA—VI DNA带有少量细胞染色体DNA（图1）。转化效率为 10^7 转化子/ μg DNA。转化的菌落分散极好，大小亦适中（图2）。

图1 用于转化的苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒多角体蛋白基因重组质粒DNA，

1,SPPI DNA+EcoRI, (分子量标准) 2,PBR322 DNA(载体) 3,PMA—VI DNA, (有箭头标志处为不同构象的质粒DNA其他条带为细胞染色体DNA) ,

Fig1 The recombinant DNA containing cDNA of mRNA of polyhedrin gene of *Autographa California* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) used for transformation,
1,SPPI DNA+EcoRI,(molecular weight marker)
2,PBR 322 DNA,(vector)

3,PMA—VI DNA,(Arrows show diffrent conformations of plasmid DNA, Some others was chromosome DNA of cell,

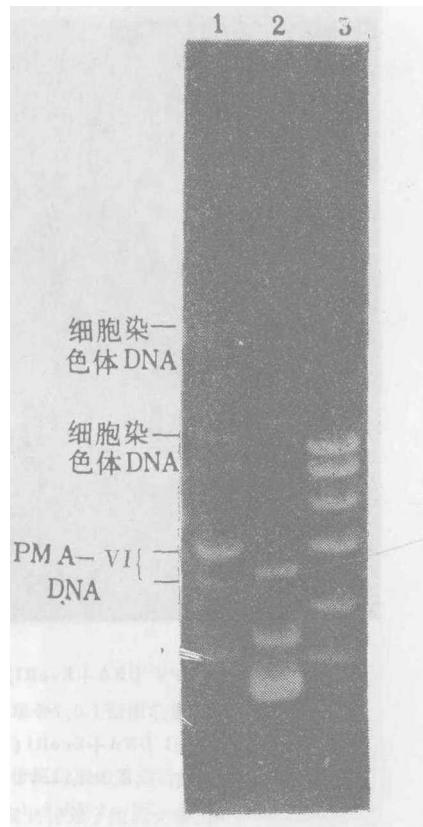


图 2 Tc 平板上的转化子

Tc: $20\mu\text{g}/\text{ml}$

转化效率: 10^7 转化子/ μg DNA

Fig 2 Transformant in Tc Plate,

Tc: $20\mu\text{g}/\text{ml}$,

Efficiency of transformantion:
 10^7 transformants/ μg DNA,



二、Southern 杂交结果：

以蓖麻蚕NPV-DNA的EcoRI酶切片段为探针，与含有苜蓿银纹夜蛾NPV多角体蛋白基因的质粒PMA-VI DNA进行杂交结果如图3。箭头所指处为AcNPV多角体蛋白基因与ArNPV基因组具有同源核苷酸序列的片段。表明在蓖麻蚕核型多角体病毒基因组中存在着与苜蓿银纹蛾核型多角体病毒多角体蛋白基因具有同源性的核苷酸序列。

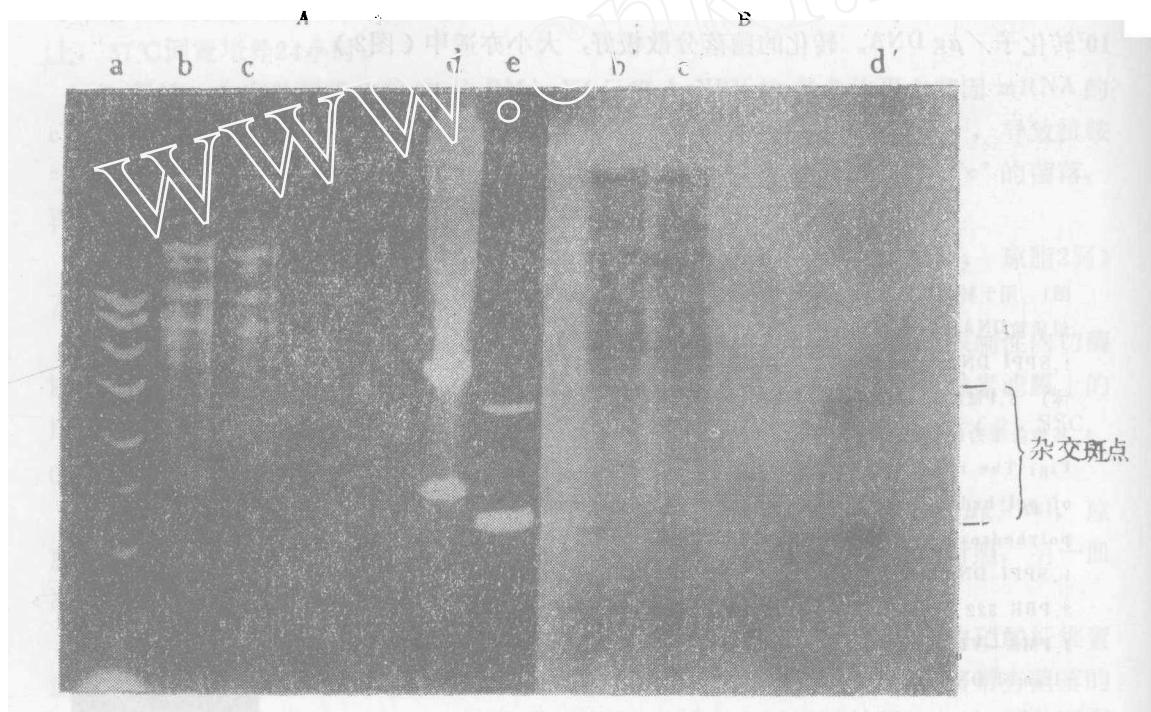


图 3 ArNPV DNA+EcoRI 及 PMA-VI DNA 的电泳图谱 (A) 和杂交图谱 (B)。

A: 电泳图谱 (0.7% 琼脂糖凝胶)
 a, SPPI DNA+EcoRI (分子量标准). b, c, ArNPV DNA+EcoRI
 (探针). d, PMA-VI DNA. e, PBR322 DNA (载体)

B: 杂交图谱 (放射自显影图)
 b', c', ArNPV DNA+EcoRI. d', PMA-VI DNA

Fig. 3 Electrophoretic pattern (A) and hybridization pattern
 (B) of ArNPV DNA+EcoRI and PMA-VI DNA.

A: electrophoretic pattern, (0.7% agarose gel)
 a, SPPI DNA+EcoRI. (molecular weight marker)

b, c, ArNPV DNA+EcoRI. (probe)

d, PMA-DNA.

e, PBR322DNA. (vector)

B: hybridization pattern (autoradiography).

b', c', ArNPV DNA+EcoRI.

d', PMA-VI DNA

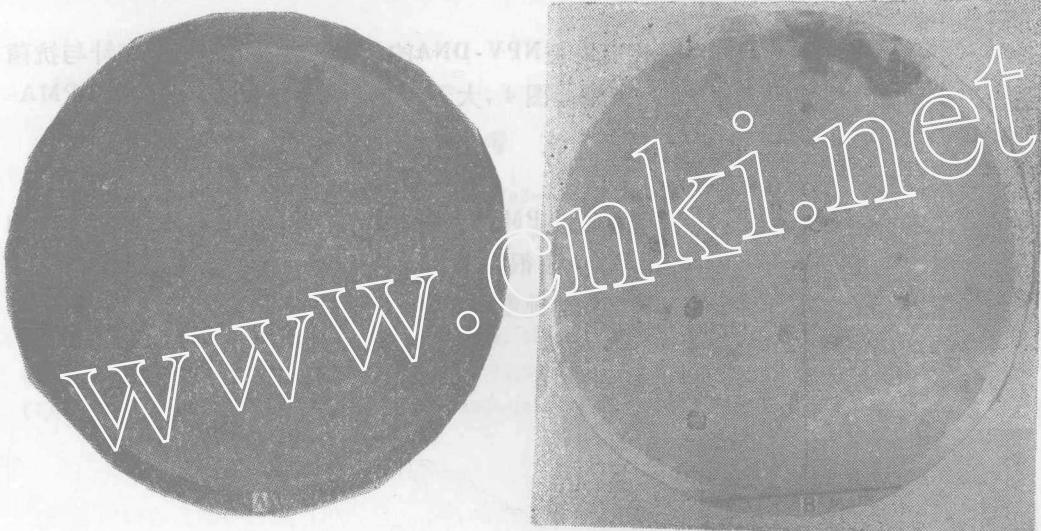


图4 菌落杂交

A: 点种在含氯霉素的LB平板上的 AP^sTc^r 菌落。

B: 菌落杂交后的放射自显影图。

Fig 4 Colony hybridization.

A: AP^sTc^r colones in L.Broth plate containing chloramphenicol.

B: Autoradiographic pattern of colony hybridization.

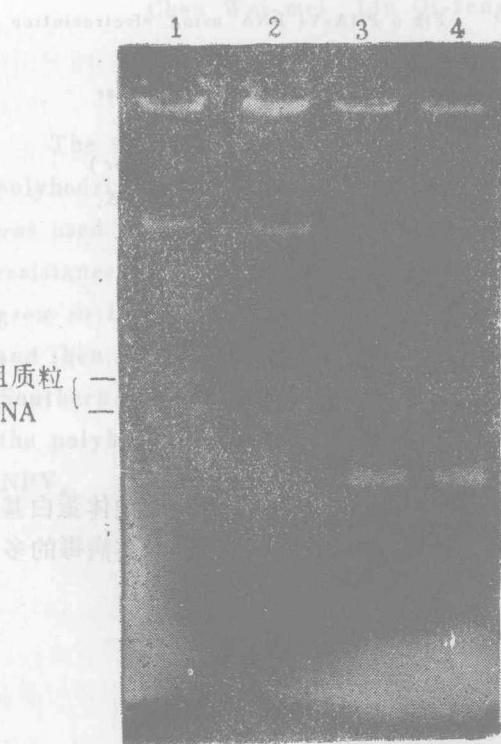


图5 快速提取的重组质粒DNA。

1,2,PMA—VI DNA

3,4,PBR 322 DNA

Fig 5 Recombinant plasmid DNA

by rapid isolation.

1,2, PMA-VI DNA,

3,4, PBR 322 DNA.

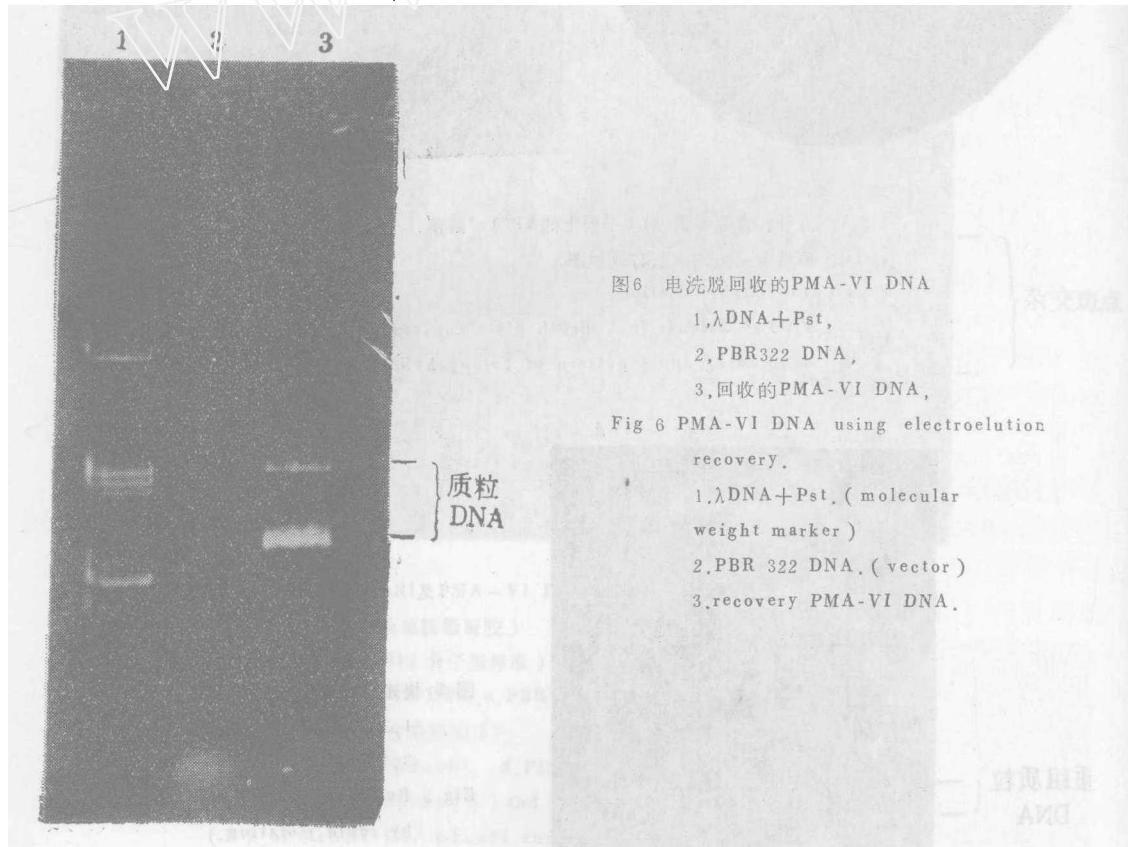
三、菌落杂交

与上述Southern杂交相同，采用蓖麻蚕NPV-DNA的EcoRI酶切片段为探针与抗菌素抗性筛选后的Ap^rTc^r菌落杂交，结果如图4，大部份呈现杂交斑点，即含有质粒PMA-VI的菌株。

四、质粒DNA的纯化：

经抗菌素抗性筛选及菌落杂交确认含有PMA--VI质粒的菌株，经大量扩增，快速抽提出的质粒DNA分子量大于PBR322 DNA，很容易从电泳图谱上加以鉴别（图5）。

为了适应分子杂交探针DNA所需要的纯度和专一性，用我们室改进的电洗脱回收法纯化质粒DNA，结果如图6。



上述结果证明了在蓖麻蚕NPV的基因组中具有与苜蓿银纹夜蛾NPV多角体蛋白基因同源性的核苷酸序列，这与世界各国许多实验室先后证明的昆虫核型多角体病毒的多角体蛋白基因具有极大同源性^[7]是一致的。

参 考 文 献

- [1] M.J.Adang et al., 1982, *J.of virol.* 44(3): 782—793.
- [2] Rigby, P.W.J., et al., 1977, *J.Mol.Biol.* 113: 237—251.
- [3] Jo-Anne R.Dillon et al., 1985, *Recombinant DNA Methodology*, p67—81.
- [4] Michael Grunstein et al., 1975, *proc.Nat Acad.Sci.USA* 72(10): 3961—3965.
- [5] Homes D.S. et.al., 1981, *Anal.Biochem.* 114: 193
- [6] 马延高等, 1985, 《生物化学与生物物理进展》1.73
- [7] G.F.Rohrmann, 1986, *J.Gen.Virol.* 67 1499—1513.

Studies on the Homology of *Attacus ricini* Nuclear Polyhedrosis Virus and Polyhedrin Gene of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus

Chen Wei-mei Lin Qi-feng Jin Hong Lu Wen-jun

(Dept.of Virology,Wuhan University,Wuhan)

The recombinant DNA (PMA-VI DNA) containing cDNA of mRNA of polyhedrin gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) was used to transform *E.coli RR₁*, and colonies were selected by antibiotic resistance and colony hybridization. The colony containing PMA-VI plasmid grew in L.Broth. The plasmid DNA was rapidly isolated by boiling method, and then recovered by electroelution. With the plasmid DNA as a probe and by Southern hybridization, the results showed that the sequence homologues to the polyhedrin gene of AcNPV was contained in the genome of *Attacus ricini* NPV.