

蓖麻蚕核型多角体病毒DNA转染四种昆虫 细胞系的研究^{**}

王 行 国

(华中师范大学生物系, 武汉 430070)

提 要

用蓖麻蚕核型多角体病毒(PcrNPV) DNA转染草地贪夜蛾(SF)、家蚕(Bm)、斜纹夜蛾(SL)和菜粉蝶(Pr)四种昆虫细胞系, 结果表明, PcrNPV DNA能在SF细胞内复制增殖并形成多角体, Pr细胞系对PcrNPV DNA转染不敏感; Bm和SL细胞出现病变症状, 但在电镜下未观察到病毒粒子或多角体。

关键词: 核型多角体病毒 转染 钙磷共沉淀法 昆虫细胞系

蓖麻蚕(*Philosamia cynthia ricini*)核型多角体病毒(PcrNPV)是我国昆虫杆形病毒的典型代表之一。它不仅是研究病毒生物学、病毒遗传学的好材料, 而且有望成为昆虫细胞表达外源DNA的载体系统。近年来, 严家骥等^[1,2,3,4,5,6]在PcrNPV DNA及蛋白质方面有较详细的研究。为了进一步了解PcrNPV基因组DNA的复制和表达特性, 寻找对PcrNPV DNA转染敏感的细胞系, 本文对PcrNPV DNA转染四种昆虫细胞系进行了初步的探讨。

材 料 与 方 法

一、PcrNPV的制备

蓖麻蚕由广东省农科院蚕业研究所提供, PcrNPV毒种由吴柏春同志赠送。采用严家骥等^[1]的方法增殖、分离纯化PcrNPV。同时, 收集病虫血淋巴, 制备病毒原液。

二、PcrNPV DNA分离纯化

参考J.P. Burand等^[7]、C.E. Smith等^[14]以及李敏棠等^[8]的方法, 加以改进。在50mg湿重多角体悬液中, 加入终浓度为0.1mmol/L Na₂CO₃-0.01mol/L EDTA-0.17mol/L NaCl(pH10.9)的碱解液, 室温碱解15分钟, 加SDS、蛋白酶K至终浓度为1%和1mg/ml, 37℃水浴2—4小时, 饱和重蒸酚、氯仿异戊醇抽提, 乙醇沉淀、TE(pH7.6)溶解, O.D₂₆₀/O.D₂₈₀≥1.8。

三、PcrNPV感染

草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞系(SF)、家蚕(*Bombyx mori*)细胞系(Bm)、菜粉蝶(*Pieris rapae*)细胞系(Pr)和斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)细胞系(SL)均由本系昆虫病毒研究

本文于1989年7月30日收到

*本工作承蒙陈曲侯教授的热情指导, 并得到本系遗传学教研室和电镜室的支持和帮助, 谨致谢忱。

室提供。培养基为Tc-199-MK+20%FCS, 培养温度28℃。Bm细胞悬浮生长, 其余细胞贴壁生长。

选用生长良好的细胞, 每培养瓶加入0.5ml病毒原液, 28℃吸附2小时, 然后倾去病毒液, 加入3ml培养液, 28℃培养。用健康幼虫血淋巴作对照。光学显微镜检查。

四、PcrNPV DNA的转染

参照M. Wigler等^[10]、A. Linnenbach和C. M. Croce^[11]的方法, 制备磷酸钙沉淀, 各种组分的终浓度分别为0.24mol/L HEPES、0.137mol/L NaCl、0.18mol/L Na_2HPO_4 、0.51mol/L NaH_2PO_4 、0.125mol/L CaCl_2 、10 μg PcrNPV DNA和15 μg 小牛胸腺DNA。每只培养瓶中加入1ml钙磷DNA沉淀液, 28℃吸附60分钟, 加入1.5ml培养液, 28℃继续培养12小时, 更换全部培养液, 28℃继续培养。用含有25 μg 小牛胸腺DNA的钙磷DNA沉淀液作对照。

五、PcrNPV DNA转染的证实

(一)光学显微镜检查: 在倒置显微镜下, 检查活细胞核内是否形成典型的多角体颗粒。统计病变细胞并拍照。

(二)电子显微镜检查: 收集细胞, 3.8%戊二醛和1%锇酸固定, 乙醇丙酮系列脱水, 国产环氧树脂618包埋。醋酸铀及柠檬酸铅染色, LKB-IV型超薄切片机制片, Hitachi H-600电镜观察并拍照。

(三)限制性内切酶分析

用PcrNPV DNA转染致病细胞的上清液, 次级感染正常细胞扩增病毒。

转染细胞DNA的抽提, 参考J. Kuznar等^[10]、C. S. H. Young和S. J. Silverstein^[17]的方法并加以改进。收集细胞($>2 \times 10^7$)、TNE(10mmol/L TrisHCl(pH8.0)—150mmol/L NaCl—1mmol/L EDTA)离心洗涤一次, TE(pH8.0)悬浮, 细胞密度不超过 1×10^7 细胞/ml, 分别加SDS、蛋白酶K至终浓度1%和500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。37℃水浴过夜, 然后加病毒碱解液, 37℃水浴1小时, 饱和重蒸酚、氯仿异戊醇抽提, 乙醇沉淀, TE(pH8.0)溶解。再加入热处理过的RNaseA至终浓度100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 37℃处理2小时, 加入SDS和蛋白酶K(剂量同上), 37℃保温3小时, 饱和重蒸酚、氯仿异戊醇抽提, 乙醇沉淀, TE(pH7.6)溶解, O.D260/O.D280 >1.8 。对照组处理同上。

EcoRI、BamHI、BglII和HindIII均购自华美生物工程公司。

参照T. Maniatis等^[12]的方法, 按一定比例将DNA、限制性内切酶和酶解缓冲液混合, 37℃酶切2小时, 65℃终止反应后, 1%琼脂糖凝胶电泳, 电极缓冲液为TBE, 电压40V, 室温电泳16小时, KZJ-1型可见/紫外检测仪上观察并拍照。

结 果

一、PcrNPV感染四种昆虫细胞系

用病毒原液感染四种昆虫细胞系, 光学显微镜检查, 发现感染24小时后, 细胞聚集成团, 部分细胞向四周伸出树枝状突起, 连成网状。对照组无明显变化。48小时后部分SF和Bm细胞核膨大, 120小时可见细胞核内形成多角体。感染后第六天统计, SF、Bm的感染率分别为5%和10%。感染120小时的SL细胞核内也出现颗粒结构, 但未见典型的多角体。Pr细胞以及全部对照组均未出现明显的病症。

二、PcrNPV DNA转染四种昆虫细胞系

用PcrNPV DNA转染草地贪夜蛾细胞系(SF), 光学显微镜检查, 转染五天后, 少

数细胞核膨大,八天后核内可见明显的多角体〔图2〕,转染率约为 1.2×10^{-5} 细胞/ μg DNA。对照组生长正常,无明显病症〔图1〕。电子显微镜检查,转染组细胞核内形成病毒粒子和多角体〔图7〕,多角体形态结构与PcrNPV相同。对照组细胞结构正常,未见多角体或病毒粒子。从转染组和对照组细胞中抽提DNA,EcoRI和BamHI酶切分析,转染组出现病毒DNA带而对照组则无〔图6〕,转染组病毒DNA酶切电泳带与供体PcrNPV DNA相应的酶切电泳带一致〔图5、6〕。

PcrNPV DNA转染家蚕细胞系(Bm),光学显微镜检查,转染四天后可见部分细胞核膨大,第六天细胞核内出现多角体颗粒〔图4〕,转染率约 1×10^{-4} 。第八天后细胞大量衰老死亡。对照组中仅观察到衰老细胞,无病变细胞〔图3〕。电子显微镜检查,转染组和对照组中均未发现多角体或病毒粒子。

PcrNPV DNA转染SL细胞系,三天后部分细胞核膨大,细胞边缘不整齐,细胞内出现许多颗粒,六天后细胞开始死亡。对照组细胞内也出现一些颗粒结构。电镜检查,细胞内含有许多脂肪颗粒和空泡结构,无多角体或病毒粒子。

PcrNPV DNA转染Pr细胞系。十天后仍无任何病变,转染组和对照组细胞都生长正常,传代培养后仍无病变。电子显微镜检查,细胞结构正常,无任何病变。

讨 论

1. 利用钙磷DNA共沉淀法,PcrNPV DNA能够转染SF细胞系,而Pr和SL细胞系则不敏感。电镜和酶切分析结果表明,PcrNPV DNA能在SF细胞内复制、增殖形成多角体。因此,在目前缺少蓖麻蚕细胞系的情况下,SF细胞系可作为研究PcrNPV DNA分子生物学、遗传学以及用PcrNPV作载体表达外源基因的受体系统。

2. 1981年,Miller, L.K根据杆形病毒的分子生物学特征,提出了改造杆形病毒作为基因工程新载体的思想〔13〕。Susumu Maeda等〔15〕已用家蚕核型多角体病毒(BmNPV)作载体,使人 α -干扰素基因在家蚕活体内成功地表达。蓖麻蚕核型多角体病毒(PcrNPV)属杆形病毒,具有约 81×10^6 道尔顿,共价闭合环状、核内复制的DNA基因组,DNA和蛋白质的理化特性较清楚〔17, 22, 33, 47, 57, 6〕,具有与AcNPV多角体蛋白基因同源的DNA序列〔7〕,并能在SF细胞内增殖和表达,因此,改造PcrNPV作为外源基因表达载体已具备了一定的基础。

3. 蓖麻蚕核型多角体病毒DNA转染Bm细胞,仅在光学显微镜下观察到多角体颗粒,电镜则未检查出病变细胞。这可能是由于悬浮生长的Bm细胞,密度大时容易衰老死亡,加上转染率低,病毒不易次级感染,致使超薄切片时切着病变细胞的机率小,因而不宜在电镜中观察到,有关PcrNPV DNA转染Bm细胞系仍需进一步证实。

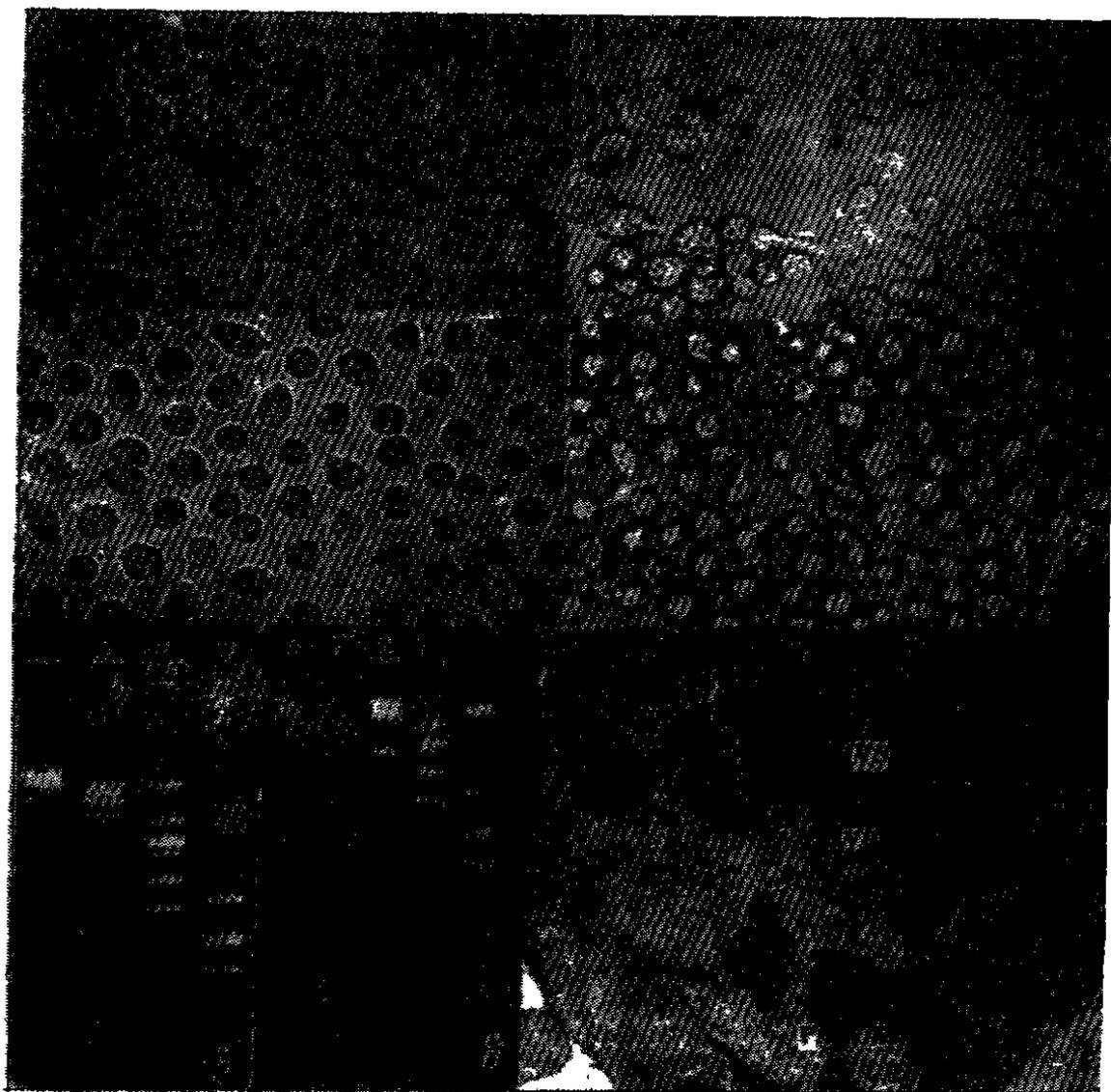


图1. 第八天的对照SF细胞
图3. 第六天的对照组Bm细胞
图5. 供体PerNPV DNA酶切图谱
a. PerNPV DNA+BamH I
c. PerNPV DNA+EcoR I
图6. PerNPV DNA转染组和对照组SF
细胞总DNA的酶切结果
e. 对照组SF细胞DNA+BamH I
g. 转染组SF细胞DNA+BamH I
i. λDNA+EcoR I
图7. PerNPV DNA转染组SF细胞的电镜切片
p. 多角体 VB. 病毒束
VS. 病毒发生基质

图2. PerNPV DNA转染后第八天的SF细胞
图4. PerNPV DNA转染后第六天的Bm细胞
b. PerNPV DNA+Bgl II
d. λDNA+EcoR I
f. 对照组SF细胞DNA+EcoR I
h. 转染组SF细胞DNA+EcoR I

Fig 1. SF cells used as the control,
Fig 2. SF cells transfected with PerNPV-DNA,

Fig 3. Bm cells used as the control.

Fig 4. Bm cells transfected with PcrNPV-DNA.

Fig 5. The restriction pattern of PcrNPV-DNA

a. PcrNPV-DNA+BamH I

b. PcrNPV-DNA+Bgl II

c. PcrNPV-DNA+EcoR I

d. λ DNA+EcoR I

Fig 6. The restriction pattern of the total DNA from both the transfected SF cells and the control group.

e. Total DNA of SF cells from the control group+BamH I

f. Total DNA of SF cells from the control group+EcoR I

g. Total DNA from the transfected SF cells+BamH I

h. Total DNA from the transfected SF cells+EcoR I

i. λ DNA+EcoR I

Fig 7. The electron micrograph of SF cell transfected with PcrNPV-DNA.

参 考 文 献

- (1) 严家骥等, 1982, 病毒学集刊, 1: 163—161.
- (2) 林栖凤等, 1983, 病毒学集刊, 3: 107—111.
- (3) 胡国津等, 1984, 病毒学集刊(第一集), p144—147.
- (4) 潘约新, 1984, 病毒研究集刊(第一集), p148—154.
- (5) 吴柏春, 1984, 病毒研究集刊(第一集), p156—159.
- (6) 马延高等, 1985, 生物化学与生物物理进展, 2: 39—43.
- (7) 陈蔚梅等, 1988, 病毒学杂志, 3: 239—298.
- (8) 李敏棠等, 1981, 科学通报, 26(22): 1891—1396.
- (9) Burand, J.P., et al, 1980, *Virology* 101: 286—290.
- (10) Kusnar, J., et, al, 1987, *Virology*, 101: 169—176.
- (11) Linnenbach, A., and C.N-Croce, 1982, Viral-DNA vectors in the analysis of mammalian differentiation, In: "Techniques in Somatic Cell Genetics", J.W.Shay, ed, P 429—447, Plenum Press, New York.
- (12) Maniatis, T., et al, "Molecular Cloning a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- (13) Miller, L.K., 1981a, A virus vector for genetic engineering in eukaryotes, In: "Genetics engineering in the plant sciences", N.J.Panopoulos, ed, Praeger Publisher, New York.
- (14) Smith, G.E., et al, 1978, *J.of Virol.* 30: 828—838.
- (15) Susumu Maeda, et al, 1985, *Nature*, 316: 392—394.
- (16) Wigler, W., et al, 1979, *Cell*, 14: 726—731.
- (17) Young, C.S.H., and S.J.Silverstein, 1980, *Virology*, 101: 503—515.

Studies on Transfection of Four Insect Cell lines with DNA of *Philosamia Cynthia ricini* Nuclear Polyhedrosis Virus

Wang Xing-guo

(Department of Biology, Huazhong Normal University Wuhan 430070)

The study on transfection of four insect cell lines which involve *Spodoptera litura*(SL), *Bombyx mori*(Bm), *Spodoptera frugiperda*(SF) and *Pieris rapae*(pr) with DNA of *Philosamia cynthia ricini* Nuclear Polyhedrosis Virus (PcrNPV) by means of calcium phosphate coprecipitation method showed, (a) the polyhedral particles in SF and Bm cell lines transfected with DNA of PcrNPV were observed under a light microscope, and no polyhedra appeared in the nuclei of SL and Pr cell lines transfected with PcrNPV DNA. (b) four insect cell lines were detected with an electron microscope, the polyhedra and virions of PcrNPV were only observed in SF cell line transfected with PcrNPV DNA, and whether polyhedrin or virion did not appear in the other three cell lines transfected with DNA of PcrNPV as well as four control groups. (c) total DNA of both the transfected SF cell line and the control group was respectively cleaved with BamHI and EcoRI, the viral DNA bands were only observed in the DNA sample of the transfected SF cell line and the restriction pattern of the viral DNA from the transfected SF cell line was identical to the donor PcrNPV DNA.

The result of the experiment showed PcrNPV DNA can not only transfect SF cell line but also reproduce and build polyhedra in the nuclei of SF cell. Therefore, it was proposed that SF cell line should be used as a receptor system which is useful for study on molecular biology and genetics of PcrNPV DNA and expression of extraneous genes carried in the vector of PcrNPV.

Key words: Nuclear Polyhedrosis Virus Transfection Calcium phosphate coprecipitation method Insect cell line