

## 分子杂交鉴定杆状病毒

吴中心\* 蔡宜权

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

## 提 要

利用苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, AeNPV) DNA EcoRI-I 片段作为同源探针, 在35℃条件下, 通过 Southern-blot hybridization 将斜纹夜蛾核型多角体病毒 (*Prodenia liturs nuclear polyhedrosis virus*, PINPV) 多角体蛋白基因定位于其 HindIII-A 片段。以 PINPV DNA HindIII-A 片段和 PINPV DNA HindIII-C 片段分别制备探针, 在不同的杂交条件下, 对 PINPV, 甘兰夜蛾 NPV (*Mamestra brassicae nuclear polyhedrosis virus*, MbNPV) 油桐尺蠖 NPV (*Buzura suppressaria nuclear polyhedrosis virus*, BsNPV) 进行了鉴定。结果表明: 由 A 片段制备的探针, 在不同的杂交条件下, 具有相应不同的非特异性, 而由 C 片段制备的探针则具有严格的特异性。

**关键词:** 多角体蛋白基因 基因探针 鉴定

随着杆状病毒基因组结构的不断阐明和杆状病毒各类群间及不同种间同源性研究的逐步深入<sup>[1,2]</sup>, 利用其基因组结构的特点鉴定杆状病毒已成为可能, 而这种方法在杆状病毒检测、分类方面也具有一定意义。本实验首先对 PINPV 基因组的结构进行了研究, 以确定 PINPV 多角体蛋白基因在其基因组 HindIII 酶切图谱上的位置, 然后结合已发展起来的点杂交鉴定病毒的技术<sup>[3]</sup>, 建立了一种利用分子杂交鉴定杆状病毒的技术。这种方法主要是根据不同杆状病毒基因组间存在有高度保守序列——包涵体蛋白基因序列, 从而制备含和不含该序列的两种探针。前者在不同的杂交条件下, 具有不同的非特异性, 可用于非特异性检测和同源关系的研究; 后者具有严格的特异性, 可用于病毒的鉴定。

## 材料与方 法

## 一、NPV DNA 的制备及酶切

P1NPB (*Prodenia liturs Nuclear polyhedral body*) 为本室制备; MbNPB 由东北农学院提供; BsNPB 由本所昆虫病毒室提供。

DNA 制备采用一步抽提法<sup>[4]</sup>。

限制性内切酶 HindIII、EcoRI 购自华美生物工程公司, 反应条件参考产品说明, 水平凝胶电泳采用 0.7% agarose, 缓冲液 TBE, 电泳条件: 2V/cm, EB 染色, 紫外灯下观察照相。

本文于1989年12月22日收得, 1990年6月13日修回

\* 现在通讯地址: 河南省农科院烟草研究所, 许昌, 461000

## 二、探针 I、II、III 的制备

探针 I：由 AcNPV DNA EcoRI-I 片段制备，该片段已克隆入 PBR322 质粒并转化受体菌 *E. coli* TG1 获得重组体，由本室提供。

探针 II、III：分别由 PINPV DNA HindIII-A 片段和 PINPV DNA HindIII-C 片段制备，这两片段已分别克隆入 PUC18 质粒并转化 *E. coli* TG1 获得重组体，由本室吴云海同志提供。

重组质粒 DNA 的制备采用碱裂解法<sup>[5]</sup>。

克隆的 DNA 片段的回收采用低熔点琼脂糖法<sup>[6]</sup>。

探针制备采用  $\alpha$ -<sup>32</sup>P 体外标记，标记按 Amersham Nick Translation Kit 说明书进行。

## 三、杂交膜的制备

膜 I：按 Southern 法将琼脂糖凝胶中的 PINPV DNA HindIII 酶切片转移到硝酸纤维素膜上，80℃真空烘烤 2hr。

膜 II：取 PINPV DNA、MbNPV DNA、B<sub>s</sub>NPV DNA 各 10μg，溶于 25μl TE 中，置入 Eppendorf 管，100℃ 10' 变性，骤冷，点于硝酸纤维素膜上。

膜 III：取系列含量 PINPB (200, 100, 50, 10个) 和系列含量 PINPV DNA (200, 20, 10, 5pg) 分两行点于硝酸纤维素膜上，变性等处理参考 Ward 等人的方法<sup>[6]</sup>。

## 四、68℃及35℃条件下的杂交

探针 I 与膜 I 的杂交在 35℃ 40% 甲酰胺浓度下进行<sup>[7]</sup>。

探针 II、III 分别与膜 III 的杂交在 68℃ 下进行<sup>[6]</sup>。

探针 II、III 分别与膜 II 的杂交则分别采用以上两种杂交条件。

# 结 果

## 一、DNA 的酶切

PINPV DNA 及含 PINPV DNA HindIII-A 和 C 片段的重组质粒 PUC18-A、PUC18-C 的 HindIII 酶切结果见图版 V 1，其中 PUC18-A 酶切后其克隆片段 PINPV DNA HindIII-A 的分子量小于克隆前的 PINPV DNA HindIII-A 片段，这是因为该片段分子量较大，在克隆过程中发生了断裂。但我们的预备实验证明该克隆片段在 35℃ 杂交条件下能与 AcNPV DNA EcoRI-I 片段杂交（结果未列入），说明它含有完整或部分多角体蛋白基因。

含 AcNPV DNA EcoRI-I 片段的重组质粒 pBR322-I 的 EcoRI 酶切图谱如图版 V 2 所示。

## 二、PINPV 多角体蛋白基因在其 HindIII 图谱上的定位

图版 V 3B 为膜 I 与探针 I 在 35℃ 杂交条件下的杂交结果，该结果证明 PINPV DNA HindIII-A 含有与 AcNPV DNA EcoRI-I 同源的保守序列。根据核型多角体病毒的多角体蛋白基因高度保守的特点，可确定 PINPV 多角体蛋白基因位于 A 片段上。

## 三、探针 II、III 对 PINPV, MbNPV, B<sub>s</sub>NPV DNA 的杂交鉴定

图版 V 4 为探针 II、III 分别与膜 II 在 68℃ 杂交体系中杂交的结果，含多角体蛋白基因的探针 II 在 68℃ 杂交条件下，除与自身病毒 DNA 杂交外，还可与 MbNPV DNA 杂交，既说明 NPV 多角体蛋白基因区为保守序列，也说明 PINPV DNA 与 MbNPV DNA 之间有较高的同源性。

图版 V 5 为探针 II、III 分别与膜 II 在 35℃、40% 甲酰胺杂交的结果。探针 II 与 MbNPV DNA, BsNPV DNA 均获得阳性杂交结果, 而不含多角体蛋白基因序列的探针只与自身病毒 DNA 杂交。

#### 四、探针 II、III 的敏感性

如图版 V 6 所示, 探针 II、III 分别与膜 III 杂交的结果基本一致, 说明点杂交技术在本实验中至少可检测到 10 个 NPBs 或 5pgDNA 的水平。

## 讨 论

利用分子杂交鉴定杆状病毒的技术, 在国内外曾有报道<sup>[6,10]</sup>。本实验在病毒基因组结构研究的基础上, 首次将该技术所使用的探针区分为特异性和非特异性两种, 同时应用了 35℃ 杂交条件, 从而使该技术在理论上更加完善, 在实际应用中具有更广泛的价值。

含多角体蛋白基因的探针 II, 在用于病毒鉴定时, 即使在 68℃ 杂交条件下, 其鉴定结果亦具有非特异性, 以前也有类似报道, 如 AcNPV DNA EcoRI-I 片段在 68℃ 杂交体系可与家蚕、柞蚕、蓖麻蚕、黄杉毒蛾的 NPV DNA 杂交<sup>[10-13]</sup>。现在越来越多的实验室证明, 在 35℃ 杂交条件下, 杆状病毒各类群间及同一亚群不同种间都具有一定程度的同源性, 可在不同的杂交条件下被检测出来, 并证明该同源序列位于包涵体蛋白基因区。我们的实验结果与此相符。几种被鉴定病毒的多角体蛋白基因区均为保护序列, 而非多角体蛋白基因区特异性较强, 分别由其制备成的探针 II、III 用于病毒鉴定时, 前者具有非特异性, 后者则有特异性。在实际应用中, 尤其是大田病毒资源调查方面, 根据不同探针的不同特性, 可以首先利用非特异性探针进行初步分析, 即通过改变杂交条件、初步确定被鉴定的病毒与探针 DNA 之间的同源程度<sup>[14]</sup>, 进而估计其所属类群<sup>[15]</sup>, 然后再利用特异性探针做进一步鉴定。此外, 非特异性探针在研究病毒亲缘关系方面亦有一定应用价值。

我们还用全质粒 DNA 制备了探针并与回收的克隆 DNA 片段制备的探针进行比较, 二者结果一致, 而前者由于不需要重组质粒 DNA 的酶切和克隆片段的回收, 操作简便得多。

此外, 我们还首次进行了斜纹夜蛾核型多角体病毒多角体蛋白基因在其 HindIII 酶切图谱上的定位。

## 参 考 文 献

- [1] Smith, G.B. et al., 1982, *Virology*, 123: 393—406.  
 [2] Rohrmann, G.F. et al., 1982, *J Gen Virol*, 62: 137—143.  
 [3] Sela, I. et al., 1984, *Techniques*, 4: 385—399.  
 [4] 蔡宣权, 1987, 病毒学集刊, 5: 67—72.  
 [5] Maniatis, T et al., 1982, *Molecular cloning*.  
 [6] Ward, V.K., 1987, *J Virol Methods*, 15: 65—73.  
 [7] Howly, P.M., 1979, *J Biol Chem*, 254 11: 4876—4883.  
 [8] 蔡良琬, 1987, 核酸研究技术, 科学出版社。  
 [9] 丁清泉, 1989, 生物防治通报, 4(4): 179—180。  
 [10] Leisy, D.J., 1984, *J Virol*, 52(2): 639—642.  
 [11] 胡裕文, 1988, 病毒学报, 2: 156—160。  
 [12] Iatrou, K., 1985, *J Virol*, 54(2): 436—445.  
 [13] 陈蔚梅, 1988, 病毒学杂志, 3: 293—299。  
 [14] 吴云涛, 1989, 病毒学报, 3: 280—283。  
 [15] Rohrmann, G.F., 1986, *J Gen Virol*, 67: 1499—1513.

## Identification of Baculovirus by Dot Hybridization

Wu Zhong-xin Cai Yi-quan

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

The polyhedrin gene of *Prodenia lituea* nuclear polyhedrosis virus (PINPV) was mapped on the PINPV DNA HindIII-A fragment by Southern-blot hybridization with the AcNPV DNA EcoRI-I fragment as probe under 35°C hybridization conditions. Then, two probes were prepared from PINPV DNA HindIII-A and PINPV DNA HindIII-C fragments respectively for the identification of PINPV DNA, MbNPV DNA, B<sub>2</sub>NPV DNA under different hybridization conditions. The results showed that the probe containing the polyhedrin gene was more extensive, while the probe lacking the polyhedrin gene more specific.

**Key words:** Polyhedrin gene Gene probe Identification

\* Present address, Northeast Agricultural College of China, Harbin 150030.