第7条第1期 1992年3月

中国病毒学 VIROLOGICA SINICA

Vol.7 No.1 Mar. 1992

"三明治"杂交法对斜纹夜蛾核型 多角体病毒DNA克隆株的鉴定

吴云涛 柯丽华 萦宜权

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

5476.13

用限制性内切酶Hind II 将斜纹夜蛾核型多角体病毒DNA切割为A、B、C、D1、D2、 E、F七个片段,与载体 pUC18体外连接后转化大肠杆菌 TC1。通过"三明治"杂交法签

定,分别获得七个片段的克隆株。但A片段克隆株中外源DNA片段发生了缺失。

基因克隆 核多角体后毒 核型多角体病毒 "三明治"杂交

無效夜蛾核型多角体病毒 (Prodenia litura Nuclear Polyhedrosis Virus, PINPV) 属杆状病毒A亚群⁽¹⁾,基因组为双链闭合环状 DNA,分子量71×10¹D,有关它的形态结 构[2], 生物杀虫效果[9]及生化特征已有报道[4]。为了进一步研究该病毒基因组的结构与 功能基因的表达调控, 构建此 病毒的基因库是非常必要的, 本文 报道了 PINPV-DNA HindⅢ酶解片段的克隆及鉴定。

材料和方法

一、病毒及 PINPV-DNA 酶解片段的制备

取经 PINPV 感染后病死之虫尸腐烂液,按文献[5]的方法提纯多角体病罚。用一步法抽提 DNAI (1。P1NPV-DNA用限制性内切酶Hind III(华美生物工程公司出品)进行完全酶解。 然后用 0.6%低融点琼脂糖分离酶解片段。按 Weis lander lef 法分别回收每一DNA 片段,然后分别进行 克隆。

二、重组质粒的构建及受体菌的转化

载体质粒pUC18及受体菌株大肠杆菌TG1(E.coli TG1)由英国剑桥大学Ellar 教授惠贈。经 Hind III 酶解后的质粒 pUC 18用低融点琼脂糖加以回收 [6],按0.1单位/pmol DNA 的比例加入牛肠 碱性磷酸酶,37℃ 保温30分钟,然后再按同样比例第二次加入牛肠碱性磷酸酶,继续在37℃ 保温 30分钟,除去末端5'磷酸。每一P1NPV-DNA酶解片段的连接反应液中,各加入20ng质粒pUC18及 100ng PINPV-DNA 酶解片段,1单位T₄连接酶。反应条件为 15℃、16小时。按 Mandel^[7]的方

本文于1990年2月7日收到,1991年11月5日修回。

1N=1mol/L×离子价数。

法转化受体菌,37℃培养过夜。待长出菌落后进行筛选。

三、重组曹落的簖选及鉴定

用X-gal指示平板筛选重组菌落。无色的有外源基因插入的重组菌落按快速质粒制备法扩增,抽提质粒^[1],用限制性内切酶Hind II 进行重组质粒的分析。酶解片段用0.6%琼脂糖分离。

四、DNA片段分子杂交鉴定

DNA 片段的放射性标记用 Amersham 公司的 α^{-3} P dCTP, 按其说明书进行缺口转移反应, $1\mu_{\rm g}$ DNA 加入 100uci α^{-1} P dCTP, 15 C 反应 2 小时,通过 Sephade × G-50 除去游离的 α^{-3} P dCTP得杂交探针。鉴定重组质粒用分子杂交方法参照Rankil 0 的单链探针 "三明治"杂交法。 按 Southern 1 L 将P1NPV-DNA Hind T 每解电泳片段转移到请散纤维素滤膜上,65 C 进行预杂交及杂交,杂交探针分别为 α^{-3} P dCTP标记的pUC18及非标记的各种合外源DNA片段的重组质粒,两者按等摩尔数加入杂交液中,杂交时间为24小时,杂交后于室温用0.1×SSC、0.2%SDS 洗涤三次,每次1小时。一80 C 曝光三天。菌落杂交时 $^{[11]}$,先将菌落在2×TY培养基上培养至半径1~2 mm,然后转到硝酸纤维素滤膜上用0.5N NaoH 进行裂菌及 DNA 变性,用 1 Imol/L 1 Tris、C1 (pH7.4),2×SSC中和,80 C 1小时烤滤瓶,68 C 顶杂交及杂交。

结 果

一、PINPV-DNA HindⅢ 酶解图谱

用限制性内切酶 Hind III 完全酶解 $\operatorname{PINPV-DNA}$,在 0.6% 琼脂糖凝胶上电泳呈 6 条 带(图 1),分别以A~F表示,其中D带含两种大小相似的DNA片段,在本实验条件下未能通过琼脂糖凝胶电泳分开。以 λ DNA Hind III 酶解片段为标准,根据片段迁移率计算出各片段大小(表 1)。

表 1 PINPV-DNA Hind面片改与pUC18体外量组版粒的转化率
Tab, 1 Transformation efficiency of Concatamers of PINPV-DNA Hind面
fragments and PUC18

DNA片段 DNA fragments	DNA长度 DNA length (kb)	挑选的菌落数 Selected Colonies	重组的菌落数 Recombinant Colonies	转化率 Trasformation efficiency(%)
A	28,8	20	1	_
В	19.9	50	8	16.0
c	17.8	30	5	16.7
\mathbf{D}_1 , \mathbf{D}_2	15.5	45	11	24.4
E	9.1	40	13	32.5
F	8.0	40	23	57,5

二、PINPV-DNA Hind II 酶解片段的克隆和鉴定

随机挑选经氨苄青霉素筛选的菌落。 PINPV-DNA 酶解片段的重组质粒转化后菌落的挑选株数如表 1。挑选的菌落转到 X-gal 指示培养基上,再挑出无色菌落,以碱法小量提取质粒DNA,经Hind II 酶解,在琼脂糖凝胶电泳中分离,除最大的A片段稍小于克隆前外,来自于其他 5 个PINPV-DNA Hind II 片段的克隆质粒中插入片段的大小都分别与克隆前一致(图 2)。

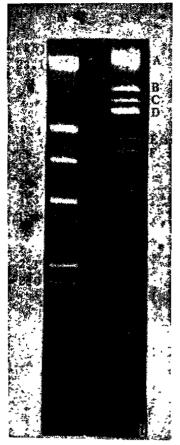


图 L PiNPV-DNA HindⅢ限制性内切跨游注。 P.PINPV-DNA HindⅢ片段。
M.λDNAHindⅢ片段作分子量标准。
Fig.1 HindⅢ restriction pattern
of PINPV-DNA
Notes: P.PINPV-DNA HindⅢ
fragments,
M.λ DNA HindⅢ fragments
as molecular weight marker,

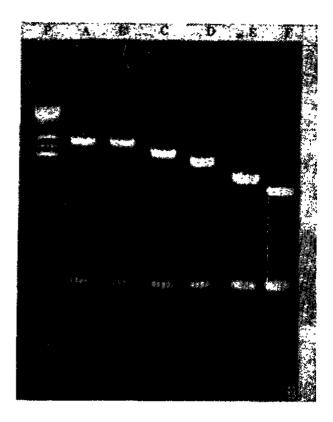


图 2 克隆质粒DNA Hind田酶解图潜注: P.PINPV-DNA Hind田片段。
A~F.分别为各片段克隆之质粒DNA酶解产物。
g.酶解之pUC18
Fig. 2 Hind田 cleavage patterns of cloned recombinant plasmid DNAs
Notes, P. PINPV-DNA Hind田 fragments
A~F, Hind田 digestion products of Cloned recombinant plasmid DNAs,
g.Hind田 digestion products of pUC18,

将 PINPV-DNA Hind Ⅲ 片段通过琼脂糖凝胶展开,然后转移到硝酸纤维素滤膜上与上述重组菌落质粒及 ⁵²P 标记的pUC18进行 "三明治"杂交。 结果每种重组菌落质粒 DNA 都能与相应的 PINPV-DNA Hind Ⅲ 片段及 pUC18杂交(图 3),故可认为这些片段确为原PINPV-DNA Hind Ⅲ 酶解之每一片段。

为获得D带中两个片段的各自克隆,从得到的D片段克隆中挑取其中8株菌落进行菌落杂交。用 D_1 片段的重组质粒中外源 PINPV-DNA Hind II 片段作探针与D片段8个克隆重组质粒杂交。结果此探针除与自身重组质粒杂交外,还与 D_6 、 D_7 重组质粒杂交,而不与 D_2 、 D_8 、 D_4 、 D_6 、 D_6 、 D_6 、 D_7 ,要组质粒杂交,而不与 D_2 、 D_8 、 D_6 、 D_6 、 D_6 、 D_6 个图4)。故可认为 D_1 、 D_6 、 D_7 为来源于同一片段的克隆

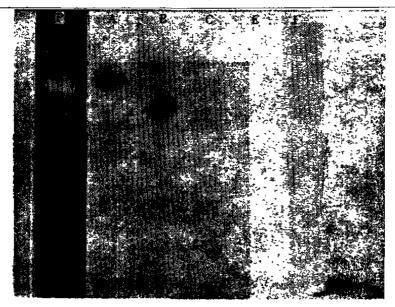


图 3 重组质粒的"三明治"杂交鉴定

注: P. PINPV-DNA HindⅢ片段

A~F。将(P)转移到硝酸纤维素滤膜上分别与各种对应重组质粒及³²P标记pUC18进行"三明治"杂交结果。

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid by Sandwith hybridization Notes, P. PINPV-DNA Hind II fragments.

A~F. (P) were transferred onto nitrocellulost filters and hybridized with each recombinant plasmid and 32P labelled pUC18.

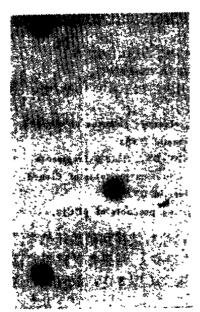


图4 \$2P标记的D₁片段与8个重组菌落杂 交结果

Fig. 4 Colonies hybridization of the 32P labelled D1 frament to DNAs of the eight recombinent plasmids

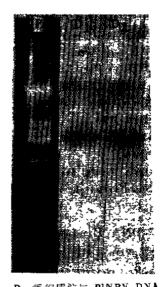


图 5 D₁、D₂ 重组质位与 PINPV-DNA 及³ 2 标记 pUC18 进行"三明治"杂交结果注: P.PINPV-DNA Hind五片段
Fig. 5 Sandwith hybridigation of D₁、D₂ recombinant plasmid and ³ 2 P labelled pUC18 to PINPV-DNA Notes; P.PINPV-DNA Hind五 fragments

重组质粒。将 D_1 、 D_2 重组质粒分别与PINPV-DNA Hind Π 片段进行"三明治"杂交(图 5),两者都与pINPV-DNA Π Hind D 片段杂交,故可认为 D_1 、 D_2 的重组质粒分别来自于D片段的两个不同片段。

A片段大小为28.8kb,但克隆质粒酶解后大小为20kb,小于克隆前大小,这可能是由于在克隆过程中DNA受机械损伤或其他原因所致,故全基因组中有91%已克隆于大肠杆菌中,9%的DNA发生了缺失。

讨 论

本文将"三川治"杂交法用于 DNA 克隆的筛选及鉴定。 此法只需制备一种探针,便可准确鉴定出各种克隆株中的外源 DNA 片段来自于那一酶解片段。使工作量大 大 减 小,此法特别适宜于混合克隆中的酶解片段的鉴定,能达到简便、快速、准确的目的。 Ranki^[0]曾利用单链探针"三明治"杂交法改决了粗样品中核酸检测问题。 因此, 此法有可能用于重组菌落的直接检测而不必经过质粒抽提步骤来进行重组质粒的鉴定。有关"三明治"杂交方法的研究较少,在实验中我们发现,变性的双键DNA探针同样能用于"三明治"杂交法。在杂交过程中,二种探针的配比是杂交的关键步骤,当加大非标记探针的比例时,杂交带会加强,但继续加大时杂交带相反会减弱甚至出现阴性结果,因此二种探针的最佳配比今后有待进一步实验确定。

在A片段的克隆中,克隆后A片段发生了缺失,这可能是由于克隆过程中 DNA 受到机械损伤或者其他原因所致。 类似现象在其他研究中也有发现^[12],确实原因有待进一步探明。

参 考 文 献

- (1) 黄冠辉等, 1975, 昆虫学报, 18:71。
- (2) 张立入等, 1979, 中国科学, 4:398。
- (3) 广洲市徽生物研究所农业室,1976, 微生物学通讯,1:1。
- (4) 蔡宜权等, 1987, 病毒学集刊, 5:67。
- (5] 金明洁等, 1987, 昆虫学报, 30:377。
- (6) Weislander L et al., 1979, Annal Biochem, 98: 305.
- (7) Mandel M et al., 1970, J Mol Biol, 53: 159.
- (8) Manitis T et al., 1982, Molecular cloning. A laboratory Manual, Cold spring Harbor Laboratory, cold Spring Harber, New York, pp86~96.
- (9) Ralki M et al., 1983, Gene, 21: 77.
- (10) Southern E et al., 1975, J Mol Biol, 98: 513.
- (11) Grunstein M et al., 1975, Prol. Natl Acad Sci USA. 72: 3961.
- (12) 柯丽华等, 1987, 清毒学杂志, 1:67。

Identification of PINPV-DNA Recombinant Colonies with Sandwich Hybridization

Wu Yon-tao Ke Li-hua Cai Yi-quan

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

The genome of the bacularvirus PINPV was digested completely into seven fragment (A, B, C, D_1 , D_2 , E, F) with Hind m. These fragments were ligated in vitro with vector pUC18 seperately and used to transform host strain E.coli TG₁. Recombinant colonies were identified with sandwich hybridization. Seven kinds of recombinant colonies containing the PINPV-DNA Hind m fragments were obtained, but unfortunately the A fragment was less than the original one.

Kew words: Prodenia litura Nuclear Polyhedrosis Virus Sandwich hybridization Gene Cloning