

两株蓖麻蚕核型多角体病毒 DNA 同源性的研究*

严银钊^{**} 罗 经

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉, 430071)

S884.59

提 要 两株不同来源的蓖麻蚕核型多角体病毒(ArsesNPV 和 ArNPV)经提纯后,使用 SDS-苯酚抽提病毒核酸,并使用限制性内切酶 EcoRI, BamHI 酶解后,用分子杂交方法与缺口平移标记的 ArsesNPV-DNA 探针杂交,分析了两株蓖麻蚕 NPV 病毒核酸的同源性。EcoRI 酶解的 ArNPV-DNA 产生 8 个片段,其中 5 个片段能与 ArsesNPV-DNA 探针杂交。BamHI 酶解 ArNPV-DNA 产生 7 个片段,其中 6 个片段能与 ArsesNPV-DNA 探针杂交。结果表明,两株蓖麻蚕 NPV 之间病毒核酸具有很高的同源性。使用斑点杂交方法分析了 ArsesNPV 与 ArNPV, 柞蚕 NPV 及家蚕 NPV 之间的核酸同源性,结果表明, ArsesNPV 与 ArNPV, 柞蚕 NPV 具有同源性。而与家蚕 NPV 无核酸同源性。

关键词: 蓖麻蚕核型多角体病毒 核酸 同源性 分子杂交

DNA

核型多角体病毒
Arses NPV (Sursum cointata Sinica Silkworm Nuclear Polyhedrosis Virus)是从自然死亡的较长期饲喂马桑叶的蓖麻蚕中分离的一株核型多角体病毒。我们曾对其多角体形态特征、病毒粒子理化特性进行了研究,并与蓖麻蚕核型多角体病毒(Philosamia Cynthla Ricini (Attacus ricini) Nuclear Polyhedrosis Virus)进行了形态学和理化特性的比较研究^[1]。为了进一步研究 Arses NPV 与 ArNPV 之间的关系,本文使用分子杂交方法研究了 Arses NPV 与 ArNPV、柞蚕 NPV、家蚕 NPV DNA 之间的核酸同源性。结果报道如下。

材料和方法

1 病毒

Arses NPV: 由四川省林科院森保室提供。

Ar NPV: 由武汉大学病毒系馈赠。

家蚕 NPV (Bm NPV)、柞蚕 NPV (Ap NPV): 由本组保存。

各株多角体均按文献^[1]方法提纯。

2 病毒核酸的提取:

按文献^[1]方法提取 DNA, 经紫外分光光度计检测其纯度和含量, 并经 1% 琼脂糖凝胶电泳证明无杂核酸存在后备用。

3 核酸的限制性内切酶酶解:

各限制性内切酶 Hind III, EcoR I, BamH I 以及 λDNA 均购自华美生物工程公司。限制性内切酶均带有 10× 缓冲液。

本文于 1992 年 10 月 6 日收到, 1993 年 2 月 15 日修回。

* 本课题为国家自然科学基金资助项目之一。

** 现在地址: 湖北医学院病毒研究所, 武汉, 430071

酶解混合物 50 μ l 中包含 2 μ g DNA, 15—20 单位内切酶 5 μ l 10 \times 酶解缓冲液, 其余用双蒸水补足。37 $^{\circ}$ C 酶解 2 小时, 1% 琼脂糖平板电泳。

4 缺口平移制备探针:

按文献^{[2][3]}方法进行。30 μ l 反应混合物中包含 Arscs NPV-DNA 1 μ g, [α -³²P]dCTP(100 μ ci)[购自福瑞公司, 北京]10 μ l, DNA 聚合酶 I 5 单位, DNase I 100pg, 100 μ mol/L dATP, dGTP, dTTP, 3 μ l。反应物于 14 $^{\circ}$ C 水浴中保温 2—3 小时, 加入 EDTA 终止反应后, 于 Sephadex G50 (2ml 体积) 柱层析, 经 β 射线计数器(VDUM)测定 Cpm 值。集中第一峰各管, 加热通火后作探针, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

5 Southern 转移和杂交:

按文献^[3]方法操作, 硝基纤维素滤膜为 Mandel Scientific 公司产品, 用于放射自显影的 X 光胶片为广东汕头感光化学厂产品。

预杂交温度为 42 $^{\circ}$ C 18 小时。换上杂交液和探针后再杂交 24 小时。50 $^{\circ}$ C 洗膜, 室温干燥后与 X 光片一起于 -20 $^{\circ}$ C 放射自显影 48 小时后, 冲洗 X 光胶片。

6 DNA 的斑点杂交:

取 Arscs NPV-DNA, Ar NPV-DNA, Bm NPV-DNA, 及 ApNPV DNA 各 1 μ g 分别点于 NC 膜上, 自然干燥后按上述杂交法直接与 Arscs NPV-DNA 探针杂交和放射自显影。

结 果

1 病毒核酸的紫外吸收

SDS-苯酚法直接从多角体提取的核酸, 经紫外分光光度计检测都具有典型的紫外吸收

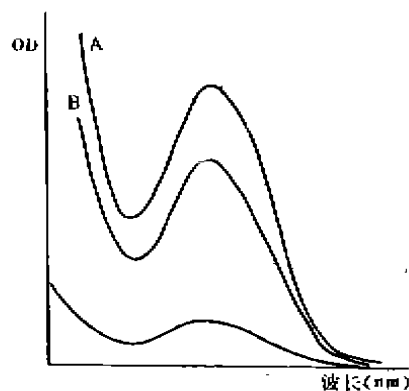


图1 Arscs NPV-DNA 和 ArNPV-DNA 紫外线吸收曲线

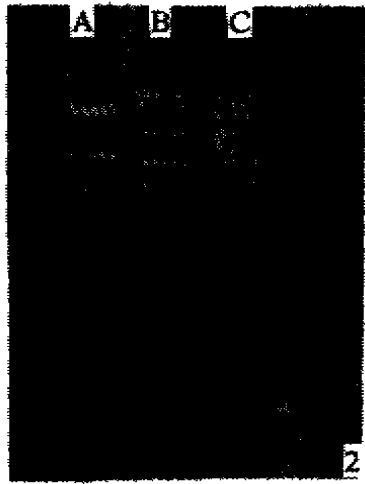
Fig. 1 UV absorption curve of Arscs NPV-DNA and ArNPV-DNA.

A: Arscs NPV-DNA B: ArNPV-DNA

曲线,吸收高峰在258nm,低峰在230nm。Arses NPV-DNA的 $OD_{260}/OD_{280}=1.81:1$;ArNPV-DNA $OD_{260}/OD_{280}=1.79:1$ (图1),用此病毒核酸不经酶解,经1%琼脂糖凝胶电泳,获得均一带,表明此病毒核酸不含宿主核酸。

2 Arses NPV-DNA 和 ArNPV-DNA 酶解图谱

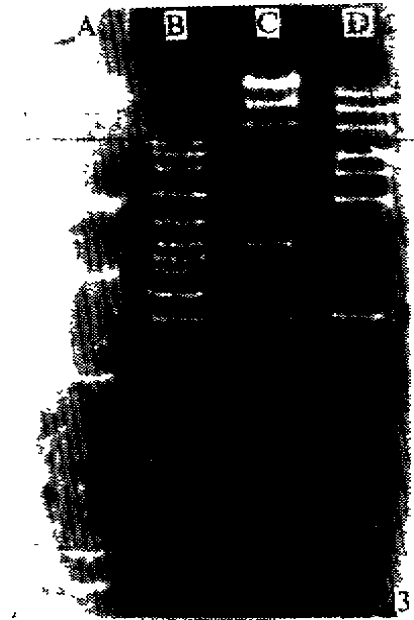
如图2、3所示,Arses NPV-DNA 和 ArNPV-DNA 经EcoRI酶解后分别产生5和8个片段,经BamHI酶解的两株NPV-DNA各获得5个和7个片段。虽然带谱不甚相同,但其中有部分片段分子量相同。使用 λ DNA Hind III酶解片段作分子量标准经计算ArNPV-DNA平均分子量为 77.2×10^6d (表1)。而ArsesNPV-DNA平均分子量为 55.42×10^6d (表1)。这说明两株NPV-DNA酶解图谱不相同外,其核酸分子量也有差异。



A. λ DNA+Hind III 作分子量大小的标志
 λ DNA, as size markers
B. Arses NPV DNA
C. ArNPV DNA

图2 两株NPV DNA的EcoRI酶解带谱

Fig. 2 Patterns of EcoRI digestion fragments of two NPV-DNA



A. λ DNA+Hind III 作分子量大小的标志
 λ DNA, as size markers
B. Arses NPV DNA+EcoRI+BamHI
C. ArsesNPV-DNA
D. ArNPV-DNA

图3 两株NPV-DNA的BamHI酶解带谱

Fig. 3 Patterns of BamHI digestion fragments of two NPV DNA

表1 Arscs NPV DNA Ar NPV DNA 酶解片段分子量

Tab. 1 Molecular weight of Arscs NPV-DNA and Ar NPV-DNA fragments

片段 Fragments	DNA			
	Arscs NPV DNA		ArNPV DNA	
	EcoRI	BamHI	EcoRI	BamHI
1	17.9	18.5	17.9	17.5
2	16.0	15.3	15.2	15.3
3	8.2	12.1	12.0	12.0
4	5.85	6.4	8.2	9.4
5	4.7	3.6	7.2	8.5
6			6.3	7.0
7			5.85	3.6
8			4.7	
总和 Total	52.65×10 ⁶	55.9×10 ⁶	77.35×10 ⁶	73.3×10 ⁶
平均分子量 Average	54.22×10 ⁶ d		75.32×10 ⁶ d	



A. ArscsNPV DNA
B. ArNPV DNA

图4 [³²P]dCTP 标记的 EcoRI-ArscsNPV DNA 探针与 ArNPV DNA-EcoRI 片段杂交结果

Fig. 4 Hybridization analysis of ³²p labeled EcoRI-ArscsNPV DNA probe with ArNPV DNA-EcoRI fragments



A. ArscsNPV DNA
B. ArNPV DNA

图5 ³²p 标记的 ArscsNPV DNA 探针与 ArNPV DNA 的 BamHI 酶解片段的杂交

Fig. 5 Hybridization analysis ³²p labeled BamHI-ArscsNPV DNA probe with ArNPV DNA-BamHI fragments

3 DNA 的片段杂交结果:

ArscsNPV DNA 和 ArNPV DNA 与 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 标记的 ArscsNPV DNA 探针杂交,结果 Arscs NPV-DNA 的 5 个片段全部杂交,而 ArNPV-DNA 的 8 个片段中只有 5 个片段能与探针杂交。这 5 个片段的分子量均与 ArscsNPV-DNA 的 5 个片段分子量相同(图 4)。其余 3 个片段与 ArscsNPV-DNA 的 EcoKI 酶解片段无相同核苷酸序列,所以未能杂交上。

而 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ 标记的 ArscsNPV-DNA 探针与 ArNPV DNA 的 BamHI 酶解片段杂交时,ArNPV-DNA 的 7 个片段中有 6 个片段能与探针杂交(图 5)。说明 ArscsNPV 与 ArNPV DNA 之间具有很高的核酸同源性。

4 斑点杂交:

结果如图 6 所示,使用斑点杂交法,使用 ^{32}p 标记 Arscs NPV DNA-EcoRI 片段作探针与 4 株 NPV-DNA 杂交。结果 Arscs NPV DNA 探针除了能与 Arscs NPV-DNA, ArNPV-DNA 完全杂交外,并能与柞蚕 NPV-DNA 杂交,这表明柞蚕 NPV-DNA 与 ArscsNPV-DNA 有核酸同源性,而与家蚕 NPV-DNA 无核酸同源性。



图 6 ArscsNPV-DNA 探针与 Ar NPV, Bm NPV, Ap NPV DNA 的斑点杂交

Fig. 6 Dot blot of ^{32}p labeled EcoRI Arscs NPV DNA probe with Ar NPV DNA, Bm NPV DNA and Ap NPV DNA

讨 论

从限制性内切酶酶谱分析可以看出 Arscs NPV-DNA 和 ANPV-DNA 之间有些片段分子量是相同的,分子杂交结果显示这些分子量相同的片段绝大多数具有核酸同源性。唯 Ar NPV-DNA 经 BamHI 消化片段中 $3.6 \times 10^4\text{d}$ 一个片段未能杂交上,这可能是它们的一级结构不相同的缘故。

从多角体和病毒粒子形态、病毒结构蛋白,限制性内切酶谱分析和 DNA 分子杂交等结果看, Arscs NPV 和 Ar NPV 之间有着密切的关系,但它们之间又具有差异。在自然界中昆虫病毒通过环境条件改变而形成基因重组的新毒株的例子不少^[4,5,6]。我们认为 Arscs NPV 和 Ar NPV 之间出现的情况,可能是由于蓖麻蚕经较长时期喂养马桑叶,生理条件和环境条件发生变化,通过其基因重组(如缺失等)而形成的另一株蓖麻蚕 NPV。

斑点杂交的结果显示 Arscs NPV-DNA 能与 ArNPV-DNA 杂交外,还能与亲缘关系较远的 Ap NPV-DNA 杂交,这说明 Arscs NPV 与 Ap NPV 之间具有 DNA 同源性。而与家蚕 NPV 之间无同源性。杆状病毒科中的核型多角体病毒包含有多核衣壳核型多角体病毒亚属和单核衣壳核型多角体病毒亚属^[6],它们的 DNA 限制性内切酶图谱不同,因此它们的 DNA 序列没有广泛

的同源性,但在同一亚属中若干个病毒株则有相似的内切酶图谱。Jewell J. E. and Miller L. K (1980)^[7]等曾用 Southern 印迹法分析测定了四株多核衣壳核型多角体病毒和两株单核衣壳核型多角体病毒的序列同源性,指出在单核衣壳型和多核衣壳型的核型多角体之间只有0.2%以下的核酸同源性。这一报道与本实验结果相一致。因为我们分析的四株 NPV 中除家蚕 NPV 为单核衣壳核型多角体病毒外;其余 3 株均为多核衣壳核型多角体病毒。

参 考 文 献

- 1 罗经,严银钊,杨学楼,等:两株蓖麻蚕核型多角体病毒的比较研究. 中国病毒学, 1993, 8(1): 76-83.
- 2 Maniatis T, Fritsch E. F and Sambrook J. Molecular cloning New York Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982, 435-478.
- 3 谭惠育,核酸分子杂交技术. [研究生生化技术教材]. 武汉,中国科学院武汉病毒研究所, 1988, 8-15.
- 4 吕鸿声主编. 昆虫病毒与昆虫病毒病, 第1版. 北京, 科学出版社, 1982, 180-183.
- 5 Knell J D, Summers M D. et al. , Investigation of Genetic Heterogeneity in Wild Isolates of *Spodoptera Frugiperda* NPV by Restriction Endonuclease Analysis of Plaque Purified Variants. *Virology*, 1981, 112: 190-197.
- 6 Wilson M. Baculoviridae. *Arch Virol*, 1991, Supplement(2): 117-123.
- 7 Jewell J E, Miller L K. et al. DNA Sequence Homology Relationship Among six Lepidopteran NPV *J Gen Virol*, 1980, 48: 161.

Studies on DNA Homology between Two Nuclear Polyhedrosis Viruses from *Attacus ricini* Larvae

Yan Yinfang Luo Jing

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

Arscs NPV DNA and Ar NPV DNA purified by SDS-phenol method were digested by restriction endonucleases EcoRI and BamHI. Arscs NPV DNA resulted in 5,5 fragments and Ar NPA DNA resulted in 8,7 fragments respectively after analysis on agarose gel electrophoresis. Five of eight fragments of Ar NPV DNA digested by EcoRI could be hybridized with probe of Arscs NPV DNA labeled by radioactive isotope ³²p, and six of seven fragments of Ar NPV DNA digested by BamH I could be hybridized with probe. Dot blot hybridization showed that there was homology between Arscs NPV, Ar NPV, Ap NPV but no homology between Arscs NPV and Bm NPV.

Key words: Ar NPV Nuclear acid Homology Hybridization