

278-280

30166(15)

第12卷第3期
1997年9月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol 12 No. 3
Sep. 1997

三种夜蛾科昆虫核型多角体病毒 DNA 相关性的研究*

梁布锋 刘明富 王晓蓉

Q939.406

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

关键词 核型多角体病毒, 限制性内切酶分析, 分子杂交, 多角体蛋白基因

DNA, 相关性

核型多角体病毒属杆状病毒科, 主要感染鳞翅目、双翅目和膜翅目的昆虫, 具有 90~160 kb 长的双链, 超螺旋 DNA 基因组。现已发现约 500 种核型多角体病毒, 这些病毒之间有什么关系? 它们的亲缘关系如何? 我们以甘兰夜蛾核型多角体病毒(简称 MbNPV)、甜菜夜蛾核型多角体病毒(简称 SeNPV)和斜纹夜蛾核型多角体病毒(简称 SINPV)为材料, 用限制性内切酶和分子杂交技术对它们的基因组 DNA 进行比较研究, 并对其中一种病毒 MbNPV 多角体蛋白基因进行了定位, 现将结果报道如下:

材料和方法

- 1 材料 甜菜夜蛾和斜纹夜蛾健康幼虫, 病毒毒种 MbNPV、SeNPV 和 SINPV 均由本实验室提供。SINPV 感染斜纹夜蛾幼虫, SeNPV 和 MbNPV 分别感染甜菜夜蛾幼虫。分别收集典型感染的死虫。多角体按常规方法纯化。
- 2 试剂 限制性内切酶和缺口平移药盒购自华美生物工程公司, α - 32 P-dCTP 购自北京福瑞公司, 硝酸纤维膜为美国 S & S 产品。
- 3 病毒 DNA 的制备 分别收集病毒, 提纯多角体, 三种病毒 DNA 的提取参照 Crook^[1]的方法。
- 4 DNA 酶切与电泳 按标准方法进行, 琼脂糖凝胶浓度为 0.7%, 电泳缓冲液为 1×TAE。
- 5 探针标记 作为探针的 DNA 分别是 MbNPV DNA 和 pBs 910 质粒, 后者含完整的油桐尺蠖 NPV 多角体蛋白基因, 以 α - 32 P-dCTP 进行缺口平移标记, 标记过程按药盒说明书进行, 最后经 Sephadex G-50 柱层析分离获得 32 P 标记的 DNA 探针。
- 6 Southern 印迹 按文献方法^[2]吸印约 20 h。硝酸纤维膜在 70℃ 固定 3 h。用于点杂交的待测样品, 取 0.1 μ g 变性 DNA 点于硝酸纤维膜上; 晾干后按上述方法固定。
- 7 分子杂交 按文献方法^[3], 探针为 α - 32 P-dCTP 标记的 MbNPV DNA, 68℃ 杂交; 按以前的报道^[4], 定位 MbNPV 多角体蛋白基因, 探针为 α - 32 P-dCTP 标记的 pBs 910, 在 40% 甲酰胺存在下于 35℃ 杂交。杂交时间均为 20 h, 两种杂交的洗膜条件不同。杂交后, 在增感屏作用下于 -70℃ 放射自显影 5 d。

结果与讨论

1 病毒 DNA 的限制性内切酶分析

三种病毒 DNA 溶液稀释后经紫外分光光度计扫描, 呈典型病毒核酸曲线, 其光密度比 OD_{260}/OD_{280} 一般大于 1.8。以限制性内切酶 Bgl II 和 EcoRI 分别酶解三种病毒 DNA, 电泳分

收稿日期: 1996-08-12, 修回日期: 1997-04-14

* 中国科学院生物分类区系专项资助课题

离后,在 0.7% 琼脂糖凝胶中显示出完全不同的病毒 DNA 片段区带(图 1)。以 λ DNA/Hind III 为分子量标准,绘制标准曲线,求得各片段大小,各片段之和即为基因组大小,分别是: MbNPV, 154 kb; SeNPV, 112 kb; SiNPV, 122 kb。

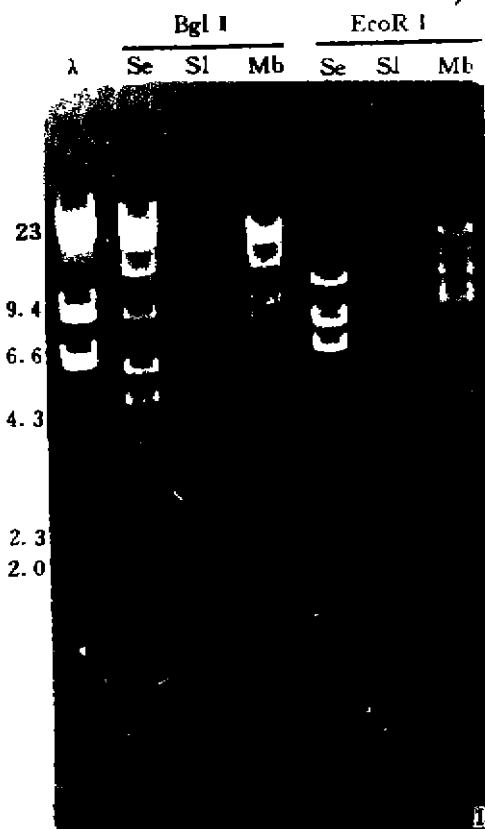


图 1 三种 NPV DNA 限制酶图谱,琼脂糖凝胶浓度 0.7%。左边数字示 λ /Hind III 各片段大小。

Fig. 1 Electrophoresis of the 3 NPV DNAs digested with Bgl II and EcoRI on 0.7% agarose gel. λ /Hind III as a standard marker.

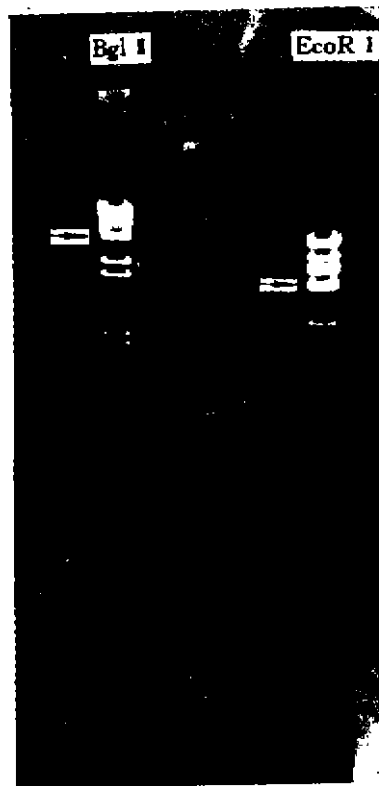


图 3 MbNPV DNA 多角体蛋白基因定位。箭头示出现杂交带的片段。

Fig. 3 Hybridization profiles of MbNPV polyhedrin gene. 32 P-labelled BsNPV polyhedrin gene as a probe. Arrow heads show the hybridized bands.



图 2 三种 NPV 基因组同源性点杂交分析, MbNPV DNA 作探针。

Fig. 2 Dot blot hybridization of the 3 NPV DNAs. MbNPV DNA as a probe.

2 病毒基因组间同源性

以 α - 32 P-dCTP 标记的 MbNPV DNA 作探针,在严格条件(68℃)下与这三种病毒点杂交,除自身 MbNPV DNA 出现强烈杂交信号外,SeNPV DNA 和 SiNPV DNA 均未见杂交斑点(图 2)。

3 MbNPV 的多角体蛋白基因定位

以 pBs 910 质粒为探针与 MbNPV DNA 酶切片段杂交,在严格条件下(68 ℃ 或 42 ℃, 50% 甲酰胺),未发现杂交带(结果未列出)。当降低杂交条件(35 ℃, 40% 甲酰胺),在 Bgl II - C 片段、EcoRI - G 片段对应处出现杂交带,表明 MbNPV 多角体蛋白基因就定位在这些片段上(图 3)。

一般认为,昆虫杆状病毒的进化依赖于其宿主,来自同科或同属昆虫的病毒较异科或异属昆虫的病毒亲缘关系接近^[5]。但本研究的三种病毒,虽然其宿主均属鳞翅目夜蛾科昆虫,且 SeNPV 和 SINPV 的宿主为同一属昆虫,三种病毒都是多粒包埋型病毒,病毒基因组为双链 DNA,但其基因组大小以及 DNA 限制性内切酶图谱都有显著的差异。分子杂交的结果也证实, MbNPV DNA 在严格条件下与 SeNPV DNA 和 SINPV DNA 之间均无阳性杂交。Smith 和 Summers 报道的 MbNPV DNA(荷兰株)与 SeNPV DNA 杂交也得出相似结果,两者在严格条件下亦无阳性杂交^[6]。初步结果表明以夜蛾科昆虫为宿主的这三种核多角体病毒基因组之间没有明显的相关性,它们之间的差异较大,亲缘关系较远。

参 考 文 献

- 1 Crook N E, Spencer R A, Payne C C. Variation in *Cydia pomonella* granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants. *J Gen Virol*, 1985, 66:2423-2430
- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 474-491
- 3 Howley P M, Israel M A, Law M F *et al.* A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. *J Biol Chem*, 1979, 254:4876-4883
- 4 Cameron I R, Possee R D. Conservation of polyhedrin gene promoter function between *Autographa californica* and *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis viruses. *Virus Res*, 1989, 12: 183-200
- 5 Rohrmann G F. Polyhedrin structure. *J Gen. Virol.*, 1986, 67:1499-1513
- 6 Smith G E, Summers M D. DNA homology among subgroup A, B and C baculoviruses. *Virology*, 1982, 123:393-406

Studies on Relationship of Three Nuclear Polyhedrosis Virus Genomes from Noctuid Insects

Liang Bufeng Liu Mingfu Wang Xiaorong

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

MbNPV, SeNPV and SINPV are important biological agents for three noctuid insects *Mamestra brassicae*, *Spodoptera exigua* and *Spodoptera litura*, respectively. The genomic DNAs from these NPVs were analysed by restriction and dot hybridization. The results showed that they have different restriction maps and low homology among MbNPV, SeNPV and SINPV. The polyhedrin gene of MbNPV was localized under non-stringency by using ³²P-labelled *Buzura suppressaria* NPV polyhedrin gene as a probe.

Key words Nuclear polyhedrosis virus(NPV), Restriction enzymes analysis, Dot hybridization, Polyhedrin gene