

## 中国棉铃虫核型多角体病毒几丁质酶基因的定位与克隆\*

彭辉银<sup>1</sup> 李星<sup>2</sup> 张双民<sup>1</sup> Basil M. Arif<sup>2</sup> 陈新文<sup>1</sup> 胡志红<sup>1</sup><sup>1</sup>(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)<sup>2</sup>(Forest Pest Management Institute, Sault Ste. Marie, Canada P6A 5M7)

5476.14

**摘要** 以  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP 标记含 CiMNPV 几丁质酶基因的重组质粒为探针, 在 68 ℃ 条件下对棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒(HaSNPV)进行 Southern 杂交, 将 HaSNPV 的几丁质酶基因分别定位在 BamHI-E、Bgl II -E、EcoRI-G、Hind III -F、XbaI-H、BamHI + HindIII-M 和 BamHI + XbaI-H, 并以 pTZ 19R 为载体获得了 XbaI-H 片段克隆。

**关键词** 棉铃虫核型多角体病毒, 几丁质酶基因, Southern 杂交, 基因定位

中国棉铃虫(*Heliothis armigera*)是棉花、烟草、辣椒、番茄的重要害虫之一<sup>[1,2]</sup>。继美洲棉铃虫(*Heliothis zea*)核型多角体病毒(HzSMNPV)于 1975 年作为第一个病毒杀虫剂在美国登记注册以来, 中国棉铃虫核型多角体病毒(*Heliothis armigera* SNPV)杀虫剂于 1994 年在我国首次登记注册<sup>[3]</sup>, 显示了它在病毒杀虫剂研究方面所起的积极作用。

中国棉铃虫核多角体病毒分为两种类型, 单粒包埋类型(HaSNPV)和多粒包埋类型(HaMNPV)。对这两种病毒已进行了大量的工作, 包括生物活性测定、理化性质、血清学性质、核酸内切酶图谱分析等方面的研究<sup>[4-9]</sup>。目前我们正在全面开展 HaSNPV 的分子生物学研究, 已测定的基因有 HaSNPV 多角体蛋白基因(陈新文等, 待发表)和 EGT 基因(Chen *et al* 待发表), 为进一步开展相关研究积累可贵的材料。本文报道以云杉卷叶蛾核型多角体病毒几丁质酶基因为探针, 对中国棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒 DNA 进行几丁质酶基因的定位与克隆。

## 材料与方 法

## 1 多角体扩增与纯化

中国棉铃虫单核衣壳核多角体病毒(HaSNPV)为本研究室所保存。

用半合成的人工饲料饲养健康的中国棉铃虫幼虫扩增病毒, 收集具有典型病毒病症状的病死虫尸, 经高速组织匀浆器匀浆, 差异离心提取多角体。用最终浓度为 1% 的 SDS 溶液处理粗提纯的多角体, 放入 37 ℃ 温育 30 min 后, 转移至 30~60% 蔗糖梯度溶液于 3 500 r/min 离心 40 min, 收集多角体带并用蒸馏水反复洗涤 3 次, 将纯化的多角体悬浮在 TE(pH7.4)中备用。

## 2 DNA 的提取

取  $1 \times 10^9$  PIB 多角体加入 500  $\mu$ L NEN(0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.01 mol/L EDTA, 0.17 mol/L

收稿日期:1997-05-26, 修回日期:1997-10-08

\* 本研究得到所长基金和中山大学国家生物防治重点实验室基金课题资助

L NaCl)置 37 ℃ 温育 30 min 后,于 4 000 r/min 离心 5 min。取上清置 14 000 r/min 离心 30 min,弃上清。将沉淀悬浮在 200 μL 的 TE 中,加 100 μL 2% 蛋白酶 K 置 37 ℃ 温育 20 min,另加 100 μL 10% Sarkasyl 于 55 ℃ 温育 1 h,加 400 μL 水饱和酚提取 DNA,盖紧离心管盖,上下翻转 3~5 次,于 10 000 r/min 离心 5 min,小心收集上层水相移至另一只离心管,加 800 μL,从 -20 ℃ 冰箱中取出预冷的无水乙醇与之混合,轻微翻转,置 -20 ℃ 冰箱中 2 h 或过夜。从冰箱中取出沉淀的 DNA 置 14 000 r/min 离心 30 min,弃上清。加 1 μL 预冷的 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀,于 14 000 r/m 离心 30 min,弃上清。DNA 沉淀经自然干燥或真空干燥,加 40~100 μL TE 溶解 DNA 或置 37 ℃ 恒温水浴锅中温育 10 min,取 3~5 μL DNA 作限制性内切酶图谱分析。

### 3 DNA 酶切及电泳

限制性内切酶 BamHI、BglII、EcoRI、HindIII、KpnI、PstI、XbaI 和 XhoI 均为 Sigma 公司产品;琼脂糖凝胶浓度为 0.7%;缓冲液为 1 × TAE(pH8.0),酶切、电泳方法参见文献[10]进行。

### 4 棉铃虫核多角体病毒几丁质酶基因杂交定位

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP 为 Promega 公司产品。

HaSNPV DNA 从琼脂糖凝胶转移至硝酸纤维素滤膜,其方法参见文献[10]。带放射性标记的云杉卷叶蛾核多角体病毒几丁质酶基因作探针,与固定的棉铃虫核多角体病毒 DNA 杂交。

将含 HaSNPV DNA 的硝酸纤维素滤膜放入杂交管中,加入 20 mL 预杂交液(6 × SSC;5 × Denhardt 试剂;0.5% SDS)于 68 ℃ 使其完全湿润约 60 min。

于 100 ℃ 沸水中变性带放射性标记的几丁质酶基因迅速放入冰浴中骤冷。

从 68 ℃ 培养箱中取出杂交管,迅速将预冷变性的 DNA 探针缓慢加入到杂交管中,68 ℃ 温育 16 h。取出滤膜放入 2 × SSC 和 0.5% SDS 溶液中,于室温洗涤 10 min,移入盛有 200 mL 2 × SSC 和 0.1% SDS 容器中洗涤 15 min,轻轻摇动。再将滤膜转回新配制的 0.1 × SSC 和 0.1% SDS 杂交管中,置 68 ℃ 温育 30 min,重复一次。最后用二张 Saran 包装膜覆盖滤膜。并将滤膜对 X 光片(Kodak XAR-2)加增感屏曝光 12~20 h 以获得放射自显影像。

### 5 HaSNPV DNA XbaI-H 几丁质酶基因的克隆及鉴定

质粒载体 pTZ19R 经 XbaI 酶切后去磷酸化,与 HaSNPV DNA XbaI-H 片段连接,方法参见文献[10]。将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,从 Blue-gal LB 平板上挑取阳性菌落扩大培养,提取质粒 DNA, XbaI 酶切筛选阳性克隆子,回收所获得的阳性克隆子的插入片段,与 HaSNPV 基因组作 Southern 杂交,进一步证实克隆的准确性。

## 结 果

### 1 HaSNPV DNA 酶切与电泳

用几种常见的限制性内切酶(BamHI, BglII, EcoRI, HindIII, KpnI, PstI, XbaI, XhoI, B + HindIII, B + XbaI),酶解棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒 DNA,在 0.7% 琼脂糖凝胶上电泳(图 1)。根据片段迁移率计算出各片段的大小(表 1)。

### 2 棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒几丁质酶基因定位

棉铃虫单核衣壳 DNA 经几种限制性内切酶消化、电泳、并转移至硝酸纤维素滤膜后与 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP 标记的云杉卷叶蛾核多角体病毒几丁质酶基因在 68 ℃ 杂交 16 h,在 -20 ℃ 冰箱中放射自显影 12 h,显示出 7 条清晰的杂交带, BamHI-E, BglII-E, EcoRI-G, HindIII-F, XbaI-H, BamHI + XbaI-H, BamHI + HindIII-M(图 1, 2)。

表 1 棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒 DNA 酶切片段分子量(kb)  
Table 1 Molecular weight of REN digestion fragment of HaSNPV DNAs(kb)

分子量 (MV) Fragments	Ha SNPV DNA									
	BamHI	BglIII	EcoRI	HindIII	KpnI	PstI	XbaI	XhoI	B+HindIII*	B+XbaI*
A	35.2	23.1	18.0	23.1	49.7	38.3	23.1	33.9	23.1	23.1
B	26.3	20.2	10.2	21.5	35.0	35.0	16.5	23.1	15.0	15.0
C	16.8	19.1	9.4	18.5	24.5	24.2	15.5	21.2	11.0	8.8
D	16.8	14.2	9.4	14.8	9.8	13.2	12.2	15.5	9.5	7.5
E	14.2	11.0	6.8	11.0	5.7	12.3	10.2	10.4	8.8	7.5
F	7.6	9.2	6.3	10.6		5.7	9.2	10.0	7.8	7.0
G	4.2	7.0	6.3	10.4		3.4	9.0	7.0	5.7	6.3
H	3.9	5.7	5.8	7.5			7.2	4.5	5.6	6.2
I	1.8	4.8	5.8	6.7			6.0	3.35	5.5	5.7
J	1.7	4.1	4.7	3.2			5.6	2.05	4.3	5.5
K	1.4	3.2	4.5	2.6			5.4		4.0	4.8
L		2.6	4.5	1.5			3.8		4.0	4.2
M		2.4	4.3				3.2		3.6	4.0
N			4.2				2.8		3.4	3.6
P			3.7				1.9		3.3	3.4
Q			3.6				1.6		3.0	3.1
R			2.9				1.3		2.8	2.8
T			1.7				1.0		2.5	2.6
U			1.4						2.4	2.4
V			1.0						1.7	1.8
W									1.7	1.8
X									1.5	1.4
Y									1.4	1.3
Z									1.3	1.0
总计 Total	129.9	126.6	114.5	131.4	124.7	132.1	135.5	131	132.9	129.0
平均 Average		128.76	(*—BamHI)							

### 3 基因克隆与鉴定

从 Blue-gal 平板上选取一白色菌落, 摇瓶扩增提取质粒 DNA, XbaI 酶切电泳产生两条主带, 一条为目的基因 DNA, 与 HaSNPV DNA XbaI-H 片段泳动速度一致。另一条为载体质粒 DNA(pTZ 19R), 见图 3。以此重组质粒 DNA 为探针在 68℃ 条件下与 HaSNPV DNA 酶切片段杂交, 证明 XbaI-H 片段被克隆(结果未显示)。

## 讨 论

昆虫杆状病毒几丁质酶基因(Chitinase gene)是一个晚期复制基因, 在 AcMNPV 和 CfMNPV 中其大小均为 1 653 bp, 由 551 个氨基酸组成, 在翻译起始位点上游 14 bp 处具有典型杆状病毒晚期复制位点(TAAG)。有研究表明, 在病毒感染过程中它能使宿主细胞液化<sup>[11,12]</sup>。除此之外, 作者认为它与病毒侵染机制有一定的关系。从两株云杉卷叶蛾核多角体病毒的感染特性的研究中发现, 一株既感染细胞(Cf-70)同时也感染幼虫的病毒 DNA 中, 含有完整的几丁质酶基因; 另一株只感染细胞(Cf-70)不感染幼虫的病毒, 缺失一条含几丁质酶基因 3.5 kb

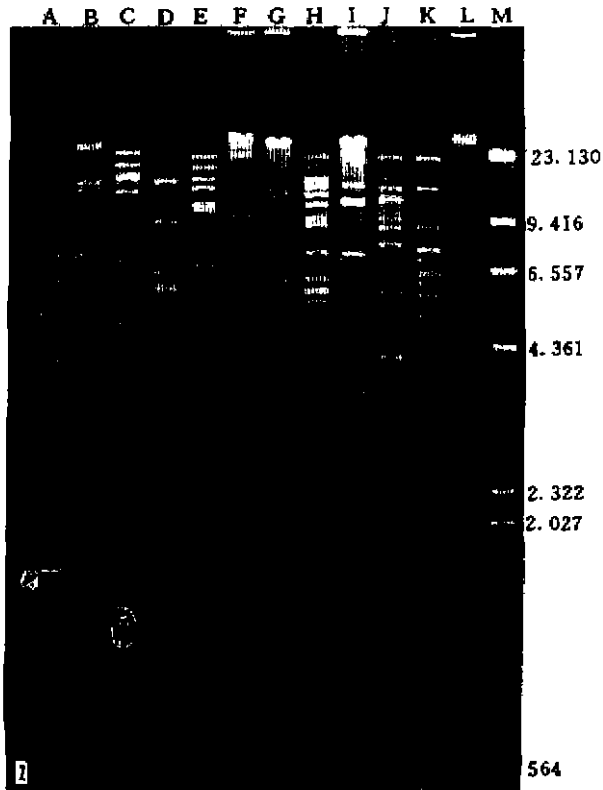


图1 HaSNPV-DNA酶切图谱

Fig 1 Restriction map of HaSNPV DNA

(A-1kb ladder, B-BamHI, C-BglII, D-EcoRI, E-HindIII, F-KpnI, G-PstI, H-XbaI, I-XbaI, J-BamHI + HindIII, K-BamHI + XbaI, L-Ureut DNA, M-λDNA/HindIII, N-H-XbaI clone, O-HaλDNA/XbaI, P-λDNA/EcoRI + BamHI + HindIII)

的DNA片段。通过mRNA分析进一步证实前者感染细胞后12h就能检测出几丁质酶基因的表达产物,而后者病毒感染细胞后96h仍然难检测出几丁质酶基因的产物(彭辉银等,待发表)。吴汉云等研究认为:一种粘质沙雷氏菌几丁质酶基因对BT制剂的增效作用十分明显。在BT制剂(HD-1)中加入5u/mL几丁质酶,24h后使抗性害虫小菜蛾死亡率比对照提高53.8%<sup>[13]</sup>。值得注意的是这种粘质沙雷氏菌产生的几丁质酶基因序列与杆状病毒(AcMNPV, CfMNPV, BmNPV)几丁质酶基因序列具有高达70%的同源性(彭辉银等,待发表)。为进一步研究HaSNPV几丁质酶基因的序列及其功能,我们以pTZ19R为载体完成了HaSNPV DNA XbaI-H片段的克隆,并将进行HaSNPV几丁质酶基因序列测定及其功能研究正在进行之中。

## 参 考 文 献

- 1 张友清,汤显春,葛培等.棉铃虫核多角体病毒杀虫剂.中国棉花,1982,1:12
- 2 张光裕,刘敦化,王锋等.使用棉铃虫核多角体病毒杀虫剂防治烟青虫.中国蔬菜,1992,3:19
- 3 张友清,刘润忠,王晓蓉等.我国第一个农药登记的病毒杀虫剂.全国生物防治学术讨论会论文集,1995:219
- 4 吴柏春.中国棉铃虫核型多角体病毒VHA273毒株多角体蛋白某些理化特性的研究.病毒学杂志,1990,3:294
- 5 张光裕,黄文林,朱必春等.棉铃虫核型多角体病毒的血清学性质.微生物学报,1985,25(3):262
- 6 黄解于,朱国凯,任德新等.棉铃虫核多角体病毒新疆株DNA的限制性内切酶酶解图谱.自然杂志,1985,9(3):239
- 7 李敏棠,忻纪厚,李载平等.棉铃虫核多角体病毒DNA的限制性内切酶酶解图谱和电镜观察.昆虫学报,1986,29(2):121
- 8 孙修炼,张光裕.棉铃虫核型多角体病毒四个分离株的比较研究.中国病毒学,1994,9(4):309
- 9 扬忠,黎路林,洪华珠.中国棉铃虫核多角体病毒VHA273毒株的克隆及基因组物理图谱.中国生物防治,1996,12(4):150
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, CSH, 1989
- 11 Rachael E Hawtin, Kevin Arnold, Martin D Ayres *et al.* Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. Virology, 1995, 212:673-685
- 12 Thomas C J, Hawtin R E King I A *et al.* Structure-function analyses of the AcNPV chitinase. American Society for Virolo-

gy, 15th Annual Meeting, London, Canada, 1996. 170

13 吴云汉, 邱立友, 姚占芳. 几丁质酶对 BT 菌剂增效作用的研究. 全国生物防治学术讨论会论文集, 1995. 174

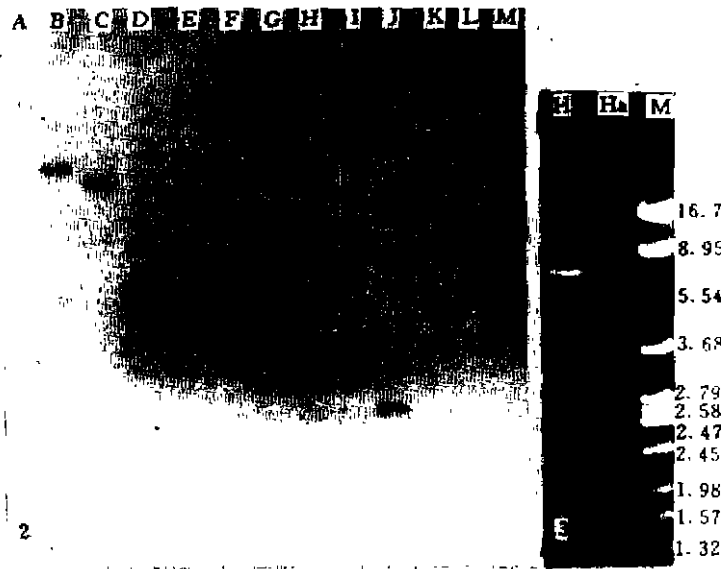


图 2  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  标记的含 CfMNPV 几丁质酶基因与 HaSNPV-DNA 几种限制性内切酶切产物的杂交图谱  
Fig 2 Hybridization profile of HaSNPV DNA digested by restrictive enzymes, recombinant plasmid of CfMNPV DNA HindIII-M as probe.

图 3 HaSNPV/DNA/Xba I - H 克隆鉴定图谱.

H: 几丁质酶基因克隆. Ha: HaSNPV/DNA/XbaI.  
M:  $\lambda$ -DNA

Fig 3 Restriction map of the clone containing

H: plasmid containing XbaI - H/XbaI.

Ha: XbaI - H fragment of HaSNPV.

M:  $\lambda$ DNA/EcoRI/BamHI/HindIII

## Localization and Cloning of the Chitinase Gene of *Heliothis armigera* Single Nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus

Peng Huiyin<sup>1</sup> Li Xing<sup>2</sup> Zhang Shuangming<sup>1</sup> Basil M. Arif<sup>2</sup> Chen Xinwen<sup>1</sup> Hu Zhihong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

<sup>2</sup>(Forest Pest Management of Institute, Sault Ste. Marie, Canada, P6A5M7)

**Abstract** The chitinase gene of *Heliothis armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (HaSNPV) was localized on BamHI-E, BglIII-E, EcoRI-G, HindIII-F, XbaI-H, BamHI + HindIII-M, and BamHI + XbaI-H fragments, using the  $\alpha\text{-P}^{32}$ dATP labelled recombinant plasmid harboring *Choristoneura fumiferana* multiple nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (CfMNPV)DNA HindIII-M which contains chitinase gene as the probe. The XbaI-H fragment of HaSNPV was cloned into pTZ 19R vector for further sequencing the chitinase gene.

**Key words** *Heliothis armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (HaSNPV), Chitinase gene, Southern hybridization, Gene localization