

152-156

Q939.4

重组质粒转染蟑螂对黑胸大蠊浓核病毒的拯救

张晓东 张珈敏 郭海涛 朱丽华 胡远扬*

(武汉大学病毒研究所, 武汉 430072)

摘要 用 Glassmilk 法纯化 PfDNV dsDNA, 在其 3'端和 Pst I 切开的 pUC119 质粒的 3'端分别加 dG 和 dC 尾, 连接、转化、筛选得到分子量为 8.7 kb 的重组质粒。通过酶切证明插入 DNA 为 PfDNV 全基因组 DNA。利用 DEAE-dextran 转染技术, 将此重组质粒导入黑胸大蠊幼虫体内, 此重组质粒能使虫体发病死亡。电镜超薄切片观察发现虫体细胞内存在大量的病毒粒子。同样, 在免疫扩散实验中虫体 PBS 浸出液能与抗 PfDNV 的抗体产生沉淀线。用重组质粒感染致死的虫体喂食健康黑胸大蠊, 也能使其发病死亡, 通过电镜可以观察到在细胞内增殖的病毒粒子。

关键词 浓核病毒, 黑胸大蠊, 重组质粒, 病毒拯救

黑胸大蠊浓核病毒 (*Periplaneta fuliginosa* Densovirus, PfDNV) 是我室 1991 年在国内首次报道并在国内外第一个分类鉴定的蟑螂细小病毒^[1]。我们对该病毒的理化特性和病理进行了系统的研究, 并构建了 PfDNV 全基因组克隆和酶切亚克隆重组质粒。为了进一步研究黑胸大蠊浓核病毒感染、复制及其基因表达机理, 我们进行了重组质粒感染复原病毒基因特征的实验, 并证实含病毒全基因重组质粒转染黑胸大蠊幼虫后可以拯救出感染性的病毒粒子。

1 材料和方法

- 1.1 **病毒和病毒 DNA** PfDNV 由本室分离、增殖和保存。病毒 DNA 提纯方法参照 Nakagaki^[2] 所叙述方法并略有修改。用于克隆的 PfDNV dsDNA 经琼脂糖电泳后, 切取含完整的 PfDNV dsDNA 片段的凝胶, 通过 Na I 溶液溶胶, Glassmilk 水浴吸附, 乙醇漂洗液漂洗, 最后用 TE 溶液洗脱, 得到纯化 DNA 备用。
- 1.2 **病毒全基因组克隆和酶切亚克隆的构建** 克隆策略如图 1 所示。PfDNV DNA 加 dG 尾, 质粒 pUC119 加上 dC 尾, 连接、转化和筛选按《分子克隆实验指南》^[3] 所述进行。
- 1.3 **重组质粒 DNA 的提取** 按《分子克隆实验指南》^[3] 所述碱裂解法进行。
- 1.4 **DNA 转染** 将适量的重组质粒溶解于含 2 mg//mL DEAE-dextran 的 TE 溶液中, 采用腹部注射法按每只 10 μ L 量注射到黑胸大蠊幼虫体内。注射后的幼虫在 28 $^{\circ}$ C、相对湿度 70% 的饲养房中加入大鼠饲料饲养。
- 1.5 **电镜观察** 不同时间取样, 取虫体的肠道组织, 采用戊二醛-锇酸双固定后, 包埋, 切片, 染色, H-8100 II 型电镜观察并拍照。
- 1.6 **免疫扩散实验** 豚鼠抗 PfDNV 抗血清的制备和双向免疫扩散实验均参照文献[4]进行。
- 1.7 **回感实验** 取重组质粒致死的虫体浸出液作为感染源喂食黑胸大蠊幼虫, 28 $^{\circ}$ C, 相对湿度 70% 的饲养房中饲养并观察。

收稿日期: 1998-03-13, 修回日期: 1998-05-25

* 联系人

2 结果和分析

2.1 全基因组重组质粒的构建及酶切鉴定

如图1所示,纯化后的 PfDNV 全基因组与 pUC119 质粒采取加 G-C 尾连接方式构建重组质粒,即在 PfDNV dsDNA 3'末端通过末端转移酶加 Oligo dG 尾,用 Pst I 切开 pUC119 MCS 区域后,在其 3'端加 oligo dC 尾,进行粘端连接后,转化宿主菌大肠杆菌 DH5_αTM,挑选重组质粒(较小的白色菌落)。在挑选的 32 个菌落中,有 3 个为 8.7 kb,进一步用 HindIII 消化分析,其中 3 株显示 5 kb 和 3.7 kb 片段,2 株为 1.8 kb 和 6.9 kb 片段。因为 HindIII 在 PfDNV DNA 上仅有一个切点(1.8 kb 处),而 HindIII 在 pUC119 质粒上也只有一个切点(MCS 区域),所以实际上 5 株重组质粒以两种连接方向组合,本实验选用前者,并命名为 PfDNV-pUC119 重组质粒。

2.2 酶切亚克隆的构建 将上面构建好的 PfDNV-pUC119 重组质粒用 Kpn I 酶解后进行琼脂糖电泳,回收 7.3 kb 的片段,通过 T₄DNA 连接酶连接后,转化宿主菌大肠杆菌 DH5_αTM,挑取阳性菌落,扩增提取质粒,电泳鉴定,获得酶切亚克隆,命名为 PFΔKpn-

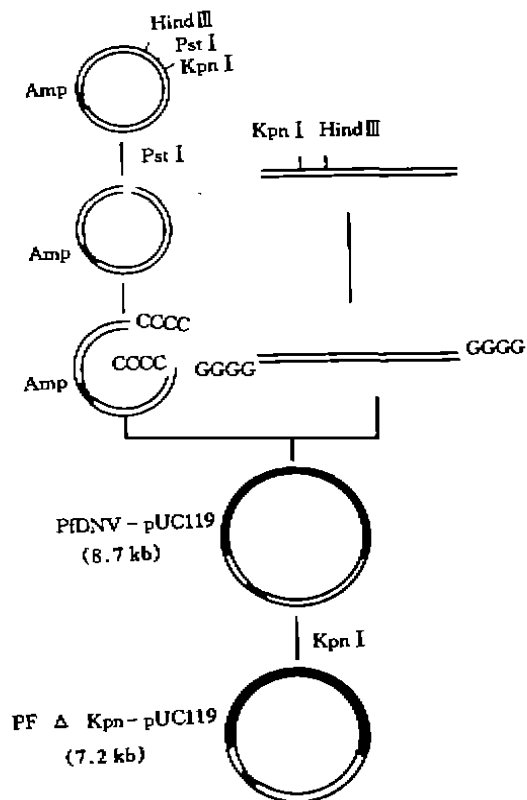


图1 重组质粒 PfDNV-pUC119 和 PFΔKpn-pUC119 的构建

Fig 1 Construction of recombinant plasmids PfDNV-pUC119 and PFΔKpn-pUC119

表 1 质粒转染蟑螂实验结果

Table 1 Transfection experiments of *Periplaneta fuliginosa* with recombinant plasmids

接种物 Inoculum	接种虫数 No. of inoculated larvae	感染虫数 No. of infected larvae	感染百分数(%) % infection
PfDNV-pUC119			
(2 500 ng)	20	20	100
(1 250 ng)	20	18	90
(250 ng)	20	17	85
PFΔKpn-pUC119			
(2 300 ng)	20	0	0
(1 000 ng)	20	0	0
TE 缓冲液 TE buffer	20	0	0
野生型病毒 Wild-type virus	20	20	100
健康蟑螂 Noninoculated larvae	20	0	0

pUC119。因为在 pUC119 和 PfDNV DNA 上各有一个 Kpn I 酶切位点(如图 1),所以此亚克隆实际为缺失了 PfDNV DNA 一末端的重组质粒。

2.3 转染实验 采用腹部注射法向黑胸大蠊幼虫体内注射。每只 10 μL 注射物中全基因组重组质粒分别为 2 500 ng、1 500 ng 和 250 ng,相当于含

PfDENV dsDNA 量 1 600 ng、960 ng 和 160 ng, 其结果见表 1。

从表中可以看出注射的重组质粒的量越大, 虫体最终死亡率也越高。当注射的重组质粒 PfDENV-pUC119 的量在 1.5 μ g 以上时, 虫体最终死亡率与野生型病毒以自然喂食感染几乎相同。此外分别以 TE buffer (含 2 mg/mL 的 DEAE-dextran) 和含 PF Δ Kpn-pUC119 注射幼虫, 生长正常, 没有发现任何病变。

2.4 感染测定

2.4.1 双向免疫扩散实验 结果如图 2。在中央孔加入豚鼠抗 PfDENV 抗体, 周边四孔分别加入质粒转染致死的虫体 PBS 研磨液、正常虫体 PBS 研磨液、野生型病毒致死的虫体 PBS 研磨液和 PBS 液。结果发现在中央孔与 1 和 3 两孔之间分别出现特异性沉淀线, 说明这两种样品中都有病毒粒子存在。

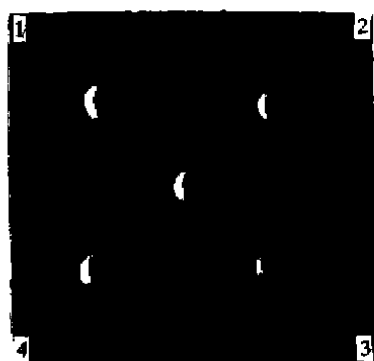


图 2 血清学反应

Fig. 2 Serological reaction

A 豚鼠抗 PfDENV 抗血清

1. 转染虫体的 PBS 研磨液; 2. 正常虫体的 PBS 研磨液;
3. 野生型病毒致死的虫体 PBS 研磨液; 4. PBS 缓冲液.

A Guinea pig antiserum against PfDENV

1. PBS solution of larvae transfected by pUC119;
2. PBS solution of healthy larvae;
3. PBS solution of larvae infected by wt virion;
4. PBS buffer.

2.4.2 电镜超薄切片观察 通过超薄切片电镜技术, 我们在重组质粒感染的黑胸大蠊虫体前肠及后肠细胞中发现大量的病毒。病毒大量复制, 使细胞核膨胀(图 3), 在细胞质中可见大片晶格状排列的病毒聚集物(图 4)。而且其超微病理变化与野生型病毒致死的超微病理变化一样。

2.4.3 回感实验 为了证实在蟑螂体内从重组质粒拯救出来的病毒是否具有感染性, 我们将转染致死的虫体喂食健康黑胸大蠊, 一段时间后虫体同样发病死亡, 而且通过超薄切片电镜观察也发现大量病毒的增殖。

3 讨论

我们构建了含 PfDENV 全基因组的克隆及其亚克隆, 分别命名为 PfDENV-pUC119 和 PF Δ Kpn-pUC119。通过 DEAE-dextran 介导的转染技术, 分别将它们导入黑胸大蠊幼虫体内, 实验结果表明, PfDENV-pUC119 质粒转染后能使虫体发病死亡。超薄切片电镜观察, 虫体细胞内存在大量病毒, 且病毒的存在方式及超微病理变化与野生型 PfDENV 感染的虫体细胞没有本质区别。虫体 PBS 浸出液也能与豚鼠抗 PfDENV 抗血清产生沉淀线。相反, 缺失一末端的 PF Δ Kpn-pUC119 重组质粒转染蟑螂后不能使虫体发病死亡, 且通过电镜超薄切片和双向免疫扩散都不能检测到病毒粒子。以前的报道认为在细小病毒的拯救模式中, 均包括病毒本身的末端重复序列^[9], 本实验证实缺失了一末端的 PfDENV DNA 重组质粒不能被拯救。

细小病毒科所属的细小病毒和腺病毒伴随病毒的全基因组重组质粒转染细胞、拯救病毒已有报道^[5-7], 1990 年也曾经报道过在昆虫宿主中用全基因组重组质粒拯救出浓核病毒^[8]。



图 3 重组质粒转染的蟑螂后肠细胞核中可见大量球状病毒粒子($\times 60\ 000$)

Fig. 3 Nucleus of transfected colon cell by recombinant plasmid, shows large amount spherical virus particles ($\times 60\ 000$)

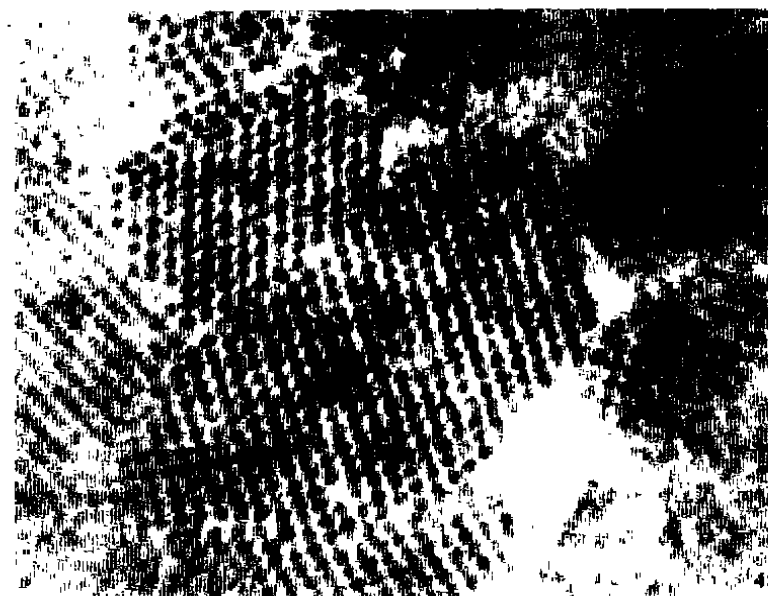


图 4 重组质粒转染的蟑螂后肠细胞中病毒呈晶格状聚集($\times 80\ 000$)

Fig. 4 Crystalline accumulation of the PfDNV virion in transfected colon cell by recombinant plasmid ($\times 80\ 000$)

用含蟑螂病毒基因组的重组质粒在蟑螂体内复制出病毒,对于蟑螂病毒基因工程研究具有重要意义。重组质粒在虫体内复制机理正在进一步研究。

总之,重组质粒 PfDNV-pUC119 的构建及其转染的研究将为浓核病毒乃至细小病毒的复制机理研究提供一个很好的模型,并将在防治世界性卫生害虫——蟑螂的工作中起到重要作用。

参 考 文 献

- 1 Hu Y, Zhang J, Bando H *et al.* A densovirus newly isolated from the smoky-brown cockroach *Periplanta fuliginosa*. Arch Virol, 1994, 138:365~372
- 2 Hu Yuanyang, Seki H, Shigemi Kawase. Electron microscopic studies on DNA from a densovirus (Yamanashi isolate) of the silkworm, *Bombyx mori*. Appl Ent Zool, 1986, 21(4):613~619
- 3 萨姆布鲁克等著.金冬雁等译.分子克隆实验指南.第二版,北京:科学出版社,1992.
- 4 范秀容等编.微生物学实验.第二版,北京:高等教育出版社,1989.
- 5 Laughlin C A, Tratschin J D, Coon H *et al.* Cloning of infectious adeno-associated virus genomes in bacterial plasmids. Gene, 1983, 23:65~73
- 6 Merchlinsky M J, Tattersall P J, Leary J J *et al.* Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus minute virus of mice. J Virol, 1983, 47:227~232
- 7 Samaski R J, Berns K I, Tan M *et al.* Cloning of adeno-associated virus into pBR322:Rescue of intact virus from the recombinant plasmids in human cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79:2077~2081
- 8 Mireille J, Françoise X J, Monica G *et al.* Cloning of the genome of a densovirus and rescue of infectious virions from recombinant plasmid in the insect host *Spodoptera littoralis*. Virol, 1990, 179:403~409
- 9 Andrew K M, Cheung. Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human detroit 6 cells. J Virol, 1980, 33(2):739~748

Rescue of Infectious Virions from Recombinant Plasmid with the Genome of *Periplanta fuliginosa* Densovirus

Zhang Xiaodong Zhang Jiamin Guo Haitao Zhu Lihua Hu Yuanyang

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072)

Abstract An infectious genome of the *Periplanta fuliginosa* densovirus (PfDNV) has been cloned into the bacterial plasmid pUC119. The viral genome could be rescued from the recombinant plasmid PfNDV-pUC119 by transfection to sensitive *Periplanta fuliginosa* larvae. Virions can be found in the cells of the transfected larvae by electron microscope, and the rescued virions were as infectious as wild-type virions. In contrast, the viral genome could not be rescued from the recombinant plasmid deleted one extremity.

Key words Densovirus, *Periplanta fuliginosa*, Recombinant plasmid, Rescue