

醇再次沉淀,溶于少量 ddH₂O。

1.2.4 加 dG 同聚尾及 RNA 的降解,上述管中,加入加尾缓冲液、TdT 酶和 dGTP,37 ℃ 30 min,EDTA 终止反应,乙醇沉淀。碱降解 RNA,乙醇再次沉淀,溶于少量 ddH₂O。

1.2.5 PCR 扩增:扩增体系及循环参数参考文献^[10],略做修改。循环参数为:第一循环,94 ℃ 30 min,58 ℃ 2 min,72 ℃ 4 min;第二循环,94 ℃ 30 min,40 ℃ 2 min,72 ℃ 4 min;3~20 循环,94 ℃ 30 min,58 ℃ 2 min,72 ℃ 4 min。循环完毕,72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.6 cDNA 扩增产物的分级电泳回收:扩增产物浓缩上样琼脂糖凝胶电泳,长波紫外灯下切除 300 bp 以下片段的凝胶,反向电压凝胶电泳浓缩产物,凝胶冻融法回收^[11]。

1.2.7 cDNA 克隆和酶切分析:cDNA 的克隆参照 Promega 公司 pGEM-T 克隆试剂盒说明书进行,稍作改动。原代重组子经稀释涂平板,37 ℃ 倒置培养 16 h 后随机挑取白菌落培养,提取质粒进行酶切分析。

1.2.8 重组质粒的点杂交:随机选取重组质粒点 NC 膜,80 ℃ 固定;EcoR I 完全消化 HaNPV 基因组 DNA,纯化备用。参照长臂光敏生物素探针标记试剂盒推荐方案进行基因组探针制备和重组质粒点杂交。

2 结果

2.1 重组质粒酶切分析

重组质粒经 EcoR I 和 BamH I 双酶消化,1% 琼脂糖凝胶电泳分析,cDNA 插入片段大小在 0.3~1.1 kb 之间。见图 1。

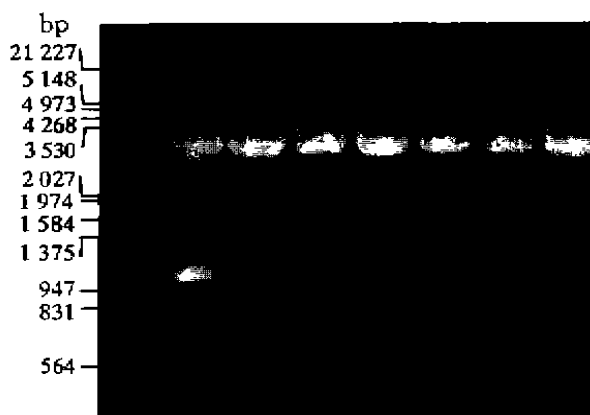


图 1 部分 pGEMT-cDNA 重组质粒 EcoR I / BamH I 酶切分析

Fig.1 Identification of some recombinant plasmids pGEMT-cDNA with digestion of EcoR I and Hind III

Lane 1. λ DNA EcoR I / BamH I markers. Lane 2~8. recombinant plasmids digested by EcoR I and BamH I

2.2 重组质粒点杂交分析

重组质粒与 HaNPV 基因组探针杂交。以酶切完全的 HaNPV 基因组 DNA 为阳性对照,空白为阴性对照。杂交结果显示:28 个随机挑选的重组质粒中,16 个有紫色点杂交信号,12 个无杂交信号(见图 2)。这一结果表明文库中 HaNPV 病毒基因的 cDNA 克隆数大于 50%。

3 讨论

采用 PCR 方法构建 cDNA 文库具有简便快速的优点。从罹病幼虫体内捕获大量的 HaN-

PV的 mRNA 是至关重要的一步。在逆转录和 PCR 操作中, 特别应注意排除引物和小分子 cDNA 片段的干扰。我们在实验中发现, 过量的引物会降低或抑制 cDNA 的扩增, 而过度的小分子 cDNA 片段则会抑制大分子 cDNA 片段的有效扩增。

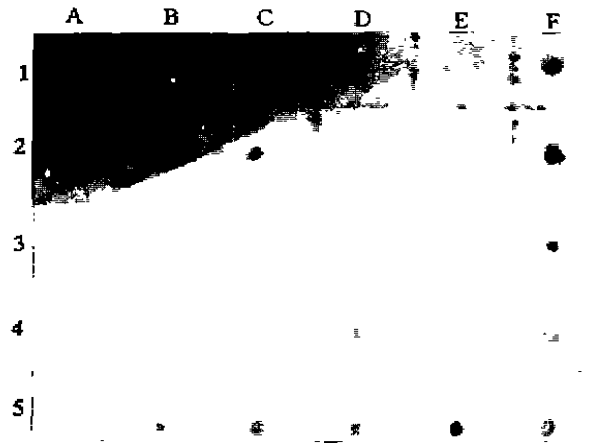


图2 部分重组质粒的点杂交分析

Fig.2 Dot hybridization of some recombinant plasmids with genomic probe of HaNPV

A1 positive control B1 negative control

HaNPV 罹病幼虫 cDNA 文库的构建, 有助于获得 HaNPV 病毒与宿主昆虫相互作用条件下表达的基因, 在基因水平上深入了解 HaNPV 病毒与宿主昆虫相互作用的分子机理, 并进一步分析 HaNPV 基因表达及宿主反应情况。对于研制更好的病毒杀虫剂, 克服潜伏期棉铃虫造成的危害, 提高病毒治虫的效果具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 张友清, 汤显春, 葛路, 等. 棉铃虫多角体病毒杀虫剂[J]. 中国棉花, 1982;12
- [2] 姜志来. 我国棉铃虫灾害减灾对策及技术取得重大进展[J]. 生命科学, 1994, 6(1):27
- [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[C]. 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 DNA 的特性[J]. 病毒学报, 1990, 6(4):352
- [5] 吴柏春. 中国棉铃虫核型多角体病毒 VHA273 毒株多角体蛋白质某些理化性质的研究[J]. 病毒学杂志, 1990, 3:234
- [6] 张光裕, 黄文林, 朱必春, 等. 棉铃虫核型病毒的血清学性质[J]. 微生物学报, 1985, 25(3):262
- [7] 林万明主编. PCR 技术操作和应用指南[M]. 第一版, 人民军医出版社, 1993:143
- [8] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162:156
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual [M]. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [10] Belyavsky A, Vinogradova T, Rajewsky K. PCR-based cDNA library construction general cDNA libraries at the level of a few cells [J]. Nucl Acids Res, 1989, 8(5):46
- [11] 潘美辉. 一种从琼脂糖凝胶中分离 DNA 的快速方法[J]. 基础医学与临床, 1997, 17(2):154

Construction of *Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrovirus cDNA Library During Latent Periods by Polymerase Chain Reaction

BAI Zhi-qiang, ZHANG You-qing

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: A general cDNA library which was from infected larvae during the latent periods has been constructed. The first cDNA strand was synthesized from total RNA by M-MLV transcriptase. After oligo(dG) tailing the cDNA was amplified by polymerase chain reaction. The double strands cDNA were ligated to pGEM-T easy vectors. Screening of cDNA library showed that the length of inserts was from 0.3 to 1.1 kilobases. The capacity of cDNA library was 1.66×10^5 clones. Moreover, the number of cDNA clones of HaNPV was more than 50%.

Key words: *Helicoverpa armigera* nuclear polyhedrovirus; Polymerase chain reaction; Clone cDNA library