维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷4期 中国病毒学 16(4):390-392
2001年12月 VIROLOGICA SINICA December 2001

茶毛虫核型多角体病毒(EpNPV)多角体蛋白基因的定位及克隆

常国辉,陈绳亮**,罗保君,李天宪

(中国科学院武汉病毒研究所,湖北武汉 430071)

Location and Clone of the Polyhedrin Gene of *Ecproctis pseudoconspera* Nuclear Polyedrosis Virus

CHANG Guo-hui, CHEN Sheng-liang**, LUO Bao-jun, LI Tian-xian

(*Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of sciences, Wuhan* 430071, *China*)

Abstract: The polyhedrin gene of EpNPV was located on *Hin*d III-E, *Xba*I-B, *Eco*RI-J, *Kpn*I-A, *Pst*I-F, *Bam*H I-G fragments under stringent condition(68℃, in water), by using the DIG-labeled *Bam*H I-F fragment of AcMNPV-DNA as the probe. In order to sequence the EpNPV polyhedrin gene, the *Bam*H I-G fragment was cloned into pTZ19R vector. Then the fragment was digested by *Xba* I、*Hin*d III, and subcloned into pTZ19R.

Key words: *Euproctis pseudoconspera* Nuclear Polyhedrosis Virus (EpNPV); Polyhedrin gene; Localization; Molecular clone

关键词:茶毛虫核型多角体病毒;多角体蛋白基因;定位;克隆

中图分类号:S435.711 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-5125(2001)04-0390-03

茶毛虫核型多角体病毒(*Euproctis pseudoconspersa* Nuclear Polyhedrosis Virus 简称 EpMPV),属于杆状病毒科核型多角体病毒属,能使茶毛虫染病死亡。EpNPV 据报道最初由日本学者于 1957 年发现[1],随后在其它国家和地区也有相关报道[2];我国在贵州、湖北、广西和云南等地也有发现,并在 EpNPV 病毒杀虫剂的大田应用方面做了大量的工作,取得了一定的社会、经济和生态效益[3]。

本文以苜蓿丫纹夜蛾多粒包埋核型多角体病毒(*Autographa californica* MNPV,简称 AcMNPV)的多角体蛋白基因所在酶切片段(*Bam*H I-F 片段)为模板,用 DIG 标记制备探针,首次确定了 EpNPV 的多角体蛋白基因在 *Hin*d III-E 片段,*Xba*I-B 片段,*Eco*R I-J 片段,*Kpn*I-A 片段,*Pst*I-F 片段和 *Bam*H I-G 片段的位置,并对其中的 *Bam*HI-G 片段进行了克隆和亚克隆;这一结果的取得不仅为 EpNPV 进一步的分子生物学研究奠定了基础,而且对筛选和构建杆状病毒杀虫剂和杆状病毒表达载体都具有很重要的意义,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 茶毛虫核型多角体病毒(简称 EpNPV);苜蓿丫纹夜蛾多粒包埋核型多角体病毒(简称

收稿日期:2000-10-26,修回日期:2001-06-07

作者简介:常国辉,(1969-),男,河南省籍,助理研究员,硕士,研究方向为病毒分子生物学,现在北京军事医学科学院微生物流行病研究所工作。

** 通讯作者:陈绳亮(1944-),男,浙江省籍,副研究员,主要研究方向为病毒分类鉴定。

维普资讯 http://www.cqvip.com

AcMNPV);以上二株病毒皆为中国科学院武汉病毒研究所普通病毒保藏中心提供。

1.1.2 酶和试剂　限制性内切酶、连接酶为华美产品。DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I 为 B.M 产品。pTZ19R 质粒载体和大肠杆菌 DH5a 菌株由中国科学院武汉病毒所病毒室馈赠。

1.2 方法

1.2.1 病毒多角体纯化　病毒多角体的纯化参照文献[4],多角体计数后,分装于 1.5mL 离心管,-20℃保存备用。

1.2.2 病毒核酸的提取　核酸的提取参照文献[4],DNA 溶液于 4℃保存备用。

1.2.3 DNA 的限制性内切酶消化和电泳　消化和电泳参照文献[4]。

1.2.4 DNA 的 DIG 标记及 Southern 杂交　以 AcMNPV 的多角体蛋白基因所在片段为模板,用 DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit 1 进行探针制备。双面转膜及杂交依据文献[5]进行。

1.2.5 EpNPV 多角体蛋白基因的克隆和亚克隆　多角体蛋白基因的克隆:依据对基因定位结果的分析,用 Freeze-Squeeze 方案从电泳琼脂糖回收 EpNPV-DNA 的 *Bam*HI-G 片段,依据文献[5]方法将其克隆到载体 pTZ19R 上,获得阳性克隆。亚克隆:分别提取重组质粒和载体 pTZ19R 的 DNA,分别用 *Bam*H I+ *Xba*I 和 *Bam*H I+ *Hin*d III 对其进行双酶切,获得亚克隆,方法同上。

2 结果与讨论

2.1 EpNPV 多角体蛋白基因的定位

按 Freeze-Squeeze 方案从电泳琼脂糖中回收 AcMNPV 的多角体蛋白基因所在电泳带(*Bam*HI-H 片段,1.9kb)[6],用 DIG 试剂盒进行体外标记,分别与 AcMNPV-DNA 的 *Bam*HI 和 EpNPV-DNA 的 *Hin*d III、*Xba*I、*Eco*R I、*Kpn*I *Pst*I、*Bam*H I 酶切物电泳带印迹,于 68℃的水浴中温育 14-16h,结果如图(1)。图(1)显示,在 AcMNPV-DNA 酶切图谱的 *Bam*H I-F 片段有明显的杂交信号,这与王根以及刘明富等人的研究结果基本一致[7,8];同时在 EpNPV-DNA 酶切图谱的 *Hin*d III-E 片段、*Xba*I-B 片段,*Eco*R I-J 片段;*Kpn*I-A 片段,*Pst*I-A 片段,*Pst*I-F 片段和 *Bam*H I-G 片段都有明显的杂交信号。

2.2 EpNPV 多角体蛋白基因的克隆和亚克隆

按 Freeze-squeeze 方案从电泳琼脂糖中回收 EpNPV-DNA 的 *Bam*H I-G 片段,克隆至载体 pTZ19R。在此基础上分别用 *Bam*H I + *Xba*I 和 *Bam*H I + *Hin*d III 对其进行双酶切,利用质粒载体 pTZ19R 对其进行了亚克隆。酶切电泳分析和杂交结果如图(2)。

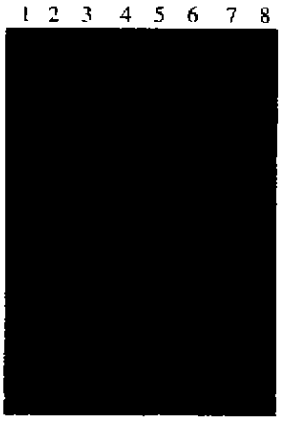

图1　DIG 标记的探针与 NPV-DNA 印迹杂交结果

Fig.1　Hybridization of NPV - DNA digested by restrictive enzymes with DIG - labeled DNA fragment probe

1, AcMNPV - DNA + *Bam*H I; 2, EpMNPV - DNA + *Hin*d III; 3, EpMNPV - DNA + *Xba*I; 4, EpMNPV - DNA + *Eco*R I; 5, EpMNPV - DNA + *Kpn*I; 6, λDNA/*Hin*d III + *Bam*H I + *Eco*R I; 7, EpNPV - DNA + *Pst*I; 8, EpNPV - DNA + *Bam*H I.

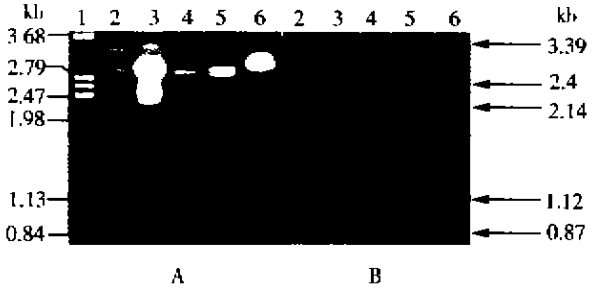

图2　EpNPV 多角体蛋白基因的克隆和亚克隆

A,酶切分析;B,印迹杂交。

Fig.2　B. Clone and subclone of EpNPV polyhedrin gene

1, λDNA/*Hin*d III + *Bam*H I + *Eco*R I; 2, pGH17 + *Bam*H I; 3, pGHX12 + *Bam*H I + *Xba*I; 4, pGHX11 + *Bam*H I + *Xba*I; 5, pGHY8 + *Bam*H I + *Hin*d III; 6, pGHY7 + *Bam*H I + *Hin*d III.

图2显示,EpNPV 多角体蛋白基因所在的 *Bam*H I-G 片段已被克隆到质粒载体 pTZ19R,获得插入外源片段大小为 3.39kb 的重组质粒 pGH17;同时也得到了 EpNPV-DNA *Bam*H I-G 片段双酶切后部分片段的亚克隆 pGHX12、pGHY11、pGHY8 和 pGHY7,亚克隆片段大小分别为 2.4kb、2.14kb、1.12kb和0.87kb。

维普资讯 http://www.cqvip.com

本实验以 AcMNPV 的多角体蛋白基因所在的 DNA 酶切片段为模板，利用 DIG 试剂盒进行标记，通过杂交，首次确定了 EpNPV 的多角体蛋白基因在6条酶切片段的位置。这一实验结果与关于 HsSNPV[7][9]和 BusuSNPV[8][10]以及 AcMNPV[6]多角体蛋白基因的报道基本一致。杂交结果中出现了一些非特异性的信号，这是 DIG 杂交技术比较难以掌握和有待进一步改进的关键；可通过多次的预实验以确定适当的实验条件，并且在实验中设置合适的阴性和阳性对照，以使结果的准确度提高。从本实验的结果来看，以 AcMNPV 的多角体蛋白基因所在的 DNA 酶切片段为模板制备的探针，能够和 EpNPV-DNA 酶切片段产生杂交信号，说明多角体蛋白基因在核型多角体病毒中的保守性较高。此结果与前人的报道基本吻合[11,12]。

参考文献

[1] Aizawa keio.折带黄毒蛾和茶黄毒蛾的多角体病毒的论证[J]. 生物学文摘－昆虫学部分，1960，20:6－8.

[2] 中国农林学院情报所.国外科技(林业)资料[J]. 1976.5－7

[3] 武汉大学病毒研究所，中国昆虫病毒资源与生防研究组.中国昆虫病毒图谱[M].长沙：湖南科学技术出版社，1986.28－30.

[4] 常国辉，陈绳亮，李天宪，等.两株茶毛虫核型多角体病毒的酶切图谱分析及同源性测定[J]. 武汉大学学报(自然科学版)，1998，44:81－84.

[5] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T, *et al*, Molecular cloning, A laboratory manual, 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

[6] Oeilly D R, Miller L K, luckow V A. Baculovirus Expression Vectors. A Laboratory Manual. [M]. New York: Freeman Company, 1992.

[7] 王报，张传溪，金伟，等.棉铃虫核型多角体病毒基因组限制性内切酶酶切图谱及其多角体蛋白基因的定位[J]. 应用与环境生物学报，1996，2(4):387－392.

[8] 刘明富，胡志红，金锋，等.油桐尺蠖核型多角体病毒多角体蛋白基因的定位和克隆[J]. 中国病毒学，1992，7:80－84.

[9] 陈新文，胡志红 Vlak，J M.中国棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒多角体蛋白的序列分析[J]. 中国病毒学，1997，12(4):346－353.

[10] Hu Zhihong, Lui MingFu, Jin Feng. Nucleotide sequence of the Buzura suppresa-aria single nucleicapsid nuclear polyhedrosis virus polyhedrin gene[J]. J Gen Virol, 1993, 74:1917－1602.

[11] Rohrmann G F. Polyhedrin stricture [J]. J Gen Virol, 1986, 62:137－143.

[12] Zantto, P M A, Keasing B D, *et al*. Phylogynetic interralation-ships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations[J]. J Invert(insect) Pathol, 1993. 62:147－164.