

## 黄地老虎颗粒体病毒的研究

### VI. 均一完整的 AsGV DNA 的制备和鉴定

曹 旭 裴美云 王小凤

(中国科学院微生物研究所, 北京)

艾秀莲 刘延娜 吴祖银 石玉瑚

(新疆农业科学院微生物研究所, 乌鲁木齐)

本文采用氯化铯密度梯度一步离心, 直接从纯化包涵体抽提出均一、完整的 AsGV (*Agrotis segetum granulosus virus*) DNA 分子。电镜观察和限制性内切酶二种方法测得 AsGV DNA 基因组大小为 112.0 kb。

**关键词** 黄地老虎颗粒体病毒; DNA 提取; 基因组大小

蛋白酶-SDS-酚法是制备昆虫杆状病毒 DNA 的常用方法。但抽提过程中酚或氯仿等去除蛋白的处理, 总会由于机械剪切, 导致固有分子构型的破坏。为了适应对其基因组结构和功能精细研究的要求, 仍须经氯化铯密度梯度离心进一步的纯化<sup>[1-3]</sup>。为此, 本文介绍用氯化铯密度梯度一步超离心就可以得到纯化的构型完整、分子均一的黄地老虎颗粒体病毒 (*Agrotis segetum granulosus virus* AsGV) DNA, 以及电镜与限制性内切酶二种方法测其分子量的结果。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 试剂

限制性内切酶(美国 BRL 公司), SDS (BDH 公司), 十二烷基肌氨酸钠盐 (Sarkosyl, Serva 公司), 蛋白酶 K (Merck 公司), 氯化铯(分析纯, 北京化工厂)和 DNA 酶(上海东风生化试剂厂)。

#### (二) 方法

##### 1. AsGV DNA 的提取:

(1) 蛋白酶-SDS-酚法<sup>[4]</sup>。

(2) 氯化铯密度梯度一步超离心法: 取 120

mg 纯化的包涵体<sup>[5]</sup>, 溶于 120ml 10mM Tris-HCl (pH 7.6)、10mM MgCl<sub>2</sub> 溶液, 加 4.8mg DNA 酶 (40μg/ml), 在 37℃ 保温 1 小时以去除污染 DNA, 然后加 1.2ml 0.5M EDTA, (pH8.0), 离心 (12,000rpm, 20 分钟), 收集包涵体。再将它溶于 54.5ml 0.05M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 在 37℃ 保温 1 小时。包涵体裂解后加入 0.6ml 1M Tris-HCl (pH 7.2), 0.6ml 0.5M EDTA (pH8.0) 和 8.0mg 蛋白酶 K, 在 37℃ 保温 15 分钟, 添加 3ml 20% SDS, 1.7ml 35% 十二烷基肌氨酸钠盐和 0.6ml β-巯基乙醇, 继续在 37℃ 保温 60 分钟后, 补加 4 mg 蛋白酶 K, 再保温 2 小时。此混合液就可以作为氯化铯一次梯度离心的样品。

使用 Beckman SW 40 离心头。每支 13.5ml 的离心管先装 1.5 ml 密度为 1.8 的 CsCl 溶液 (1.448g CsCl/ml TE 缓冲液, pH 8.0), 上层再加 1.5ml 密度为 1.65 的 CsCl 溶液(约 1g CsCl/ml TE 缓冲液, pH8.0) 形成不连续梯度, 铺加 10ml 样品液。在 15℃ 连续超离心 (35,000 r/min), 16 小时。不溶物及杂质沉淀到管底。包涵体裂解后的蛋白质, 由于分子量较大而不能进

本文于 1985 年 2 月 28 日收到。

电镜照片系中国科学院微生物研究所技术室拍摄, 特此致谢。

入 CsCl 密度梯度。纯的 AsGV DNA 沉降在密度 1.7 左右 (密度 1.65 和密度 1.8 CsCl 溶液交界处)。除去上层溶液。收集交界附近的溶液,对 1×TE 缓冲液 (pH 8.0)于冰箱中透析过夜。最后再用聚乙二醇(分子量 6000)干粉反透析,浓缩至适当浓度,分装后保存于低温冰箱备用。

2. AsGV DNA 的电镜观察: 利用单分子展层技术,在电镜下观察分子构型并拍摄照片,经过放大,丈量其周长。除旋转投影角度改为 9 度,其它步骤见文献[6]。

3. AsGV DNA 的限制性内切酶酶解: 酶解条件按文献[7]所述,琼脂糖凝胶电泳按郭三堆等<sup>[8]</sup>方法进行。以 *Hind* III 酶解的 λDNA 为参照分子量,测出 AsGV DNA 的酶解片段的分子量,从而算出 AsGV DNA 的分子量。

结果与讨论

1. 本试验方法所得 AsGV DNA 的紫外吸收特性如图 1 所示。A<sub>250/280</sub> = 1.45, A<sub>max/min</sub> = 2.42。

2. 氯化铯密度梯度一步超离心的 AsGV DNA,在电镜下绝大多数呈紧密超线团状(图版 I-d, e, f) 少数为开环分子,很少见到断裂的线状分子。而用蛋白酶-SDS-酚法提取的 AsGV DNA,完整分子只占十分之一(n = 100 以上的计算结果),大多为大小不等的线状分子(图版 I-b, c)。Tjia 等<sup>[9]</sup>用 CsCl 密度梯度离心从粉纹夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞培养中提取的苜蓿 Y 纹夜蛾核多角体病毒 (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus) DNA 得到二个分部,环状超线团分子的部分只占线状分子分部的三分之一,Summers<sup>[10-12]</sup> 等人的结果大致也是如此。可见我们采用的氯化铯密度梯度一步超离心对于制备构型完整,分子均一的 AsGV DNA 是成功的。电镜观察并拍摄的 AsGV DNA 分子,其平均周长约为 39 μm,相当于 74.1 × 10<sup>6</sup> 道尔顿,即为 112.4kb。由于

丈量超线团分子的周长很难精确,因此估计的分子量尚需其它方法加以验证。

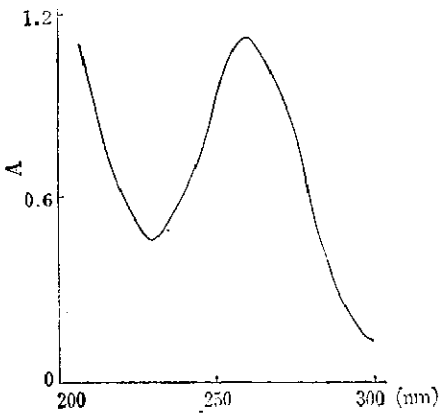


图 1 AsGV DNA 紫外吸收特性  
Fig. 1 The ultraviolet absorption of AsGV DNA

3. AsGV DNA 经 *Eco*RI 和 *Bam* HI 分别酶解产生大于 1kb 的片段数分别为 16 和 12。各片段的分子量列于表 1。由积加酶解片段的分子量得出 AsGV DNA 分子

表1 由限制性内切酶酶解测出 AsGV DNA 的分子量  
Table 1 AsGV DNA molecular weight determined by restriction endonuclease digestion

片段数 Segment No.	限制性内切酶	
	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI
1	19.5	17.0
2	16.8	13.8
3	14.4	13.0
4	11.5	10.8
5	11.2	10.4
6	8.7	9.0
7	7.3	8.6
8	6.8	8.4
9	5.7	7.0
10	4.2	3.9
11	3.0	3.6
12	2.8	3.1
13		2.4
14		2.1
15		1.8
16		1.2
总计 Total	111.9	116.1 (kb)

量分别为 116.3kb (*Eco*RI 酶解片段总和) 和 112.1kb (*Bam*HI 酶解片段的总和)。我们在枯草芽孢杆菌中克隆 AsGV DNA 的 *Eco*RI 酶解片段时,曾得到大小不同的 12 个重组质粒<sup>[8,13]</sup>。插入 AsGV DNA 的大小为 0.2—0.4kb, 其中小于 1kb 的有六个片段, 这种小分子量片段在琼脂糖凝胶电泳后 EB 染色不能检测出来。看来 AsGV DNA 的精确分子量最终有待其基因库的建立并加以校正。

不同方法测定大菜粉蝶颗粒体病毒 (*Pieris brassicae* GV)<sup>[14]</sup>, 印度谷螟颗粒体病毒 (*Plodia interpunctella* GV)<sup>[15]</sup>, 草地夜蛾颗粒体病毒 (*Spodoptera frugiperda* GV)<sup>[16-17]</sup> 和粉纹夜蛾颗粒体病毒 (*Trichoplusia ni* GV)<sup>[18]</sup> DNA 的分子量是不尽一致的, 但其差异幅度不大。Shvedchikova 等<sup>[19]</sup>用电镜方法, 报道 AsGV DNA 的分子量为  $30 \times 10^6$  道尔顿不够精确。因为 Miller 等<sup>[20]</sup>根据 GV 和 NPV DNA 的大量资料指出杆状病毒 DNA 分子量范围在 100—120 或 80—120kb。由于我们改进了抽提 AsGV DNA 的方法, 用二种测定方法提供了 AsGV DNA 分子量的可靠数据。

## 参 考 文 献

- [1] Summer, M. D. and D. L. Anderson: *J. Virology*, 9: 710—713, 1972.
- [2] Burnard, M. L. et al.: *Virology*, 96: 633—639, 1979.
- [3] Burgess, S.: *J. Gen. Virology*, 37: 501—510, 1977.
- [4] 裴美云等: 微生物学报, 25(2): 179—180, 1985.
- [5] 王小凤等: 微生物学报, 23(1): 15—19, 1983.
- [6] 裴美云等: 病毒学集刊, 1: 123—127, 1982.
- [7] Maniatis, T. et al.: *Molecular cloning A laboratory manual*, Cold spring Harbor laboratory, p. 104, 1982.
- [8] 郭三堆等: 微生物学报, 25(1): 38—44, 1985.
- [9] Tjia, S. et al.: *Virology*, 99: 399—409, 1979.
- [10] Summer, M. D. and D. L. Anderson: *Virology*, 50: 459—471, 1972.
- [11] Summer, M. D. and J. D. Paschke: *J. Invertebr. Pathol.*, 16: 227—240, 1970.
- [12] Kathteen A. et al.: *Microbiol. Rev.*, 45: 379—408, 1981.
- [13] 郭三堆等: 生物工程学报, 1: 26—31, 1985.
- [14] Brown D. H. et al.: *Virology*, 81: 317—327, 1977.
- [15] Tanada Y. et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, 26: 99—104, 1975.
- [16] Tweeken, K. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75: 3574—3578, 1977.
- [17] Summer, M. D. et al.: *J. Virology*, 12: 1336—1346, 1973.
- [18] Smith, G. E. and M. D. Summer: *Virology*, 89: 517—527, 1978.
- [19] Shvedchikova, N. G. and L. M. Tarasevich: *J. Invertebr. Pathol.*, 18: 25—32, 1971.
- [20] Miller, L. K. et al.: *Science*, 219: 715—721, 1983.

# STUDY ON GRANULOSIS VIRUS OF AGROTIS SEGETUM (AsGV)

## VI. THE PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF HOMOLOGOUS AND UNIFORM DNA MOLECULES

Cao Xu Pei Meiyun Wang Xiaofeng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Ai Xiulian Liu Yanna Wu Zuyin Shi Yuhu

(Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumqi)

The homologous and uniform DNA molecules of AsGV were prepared from capsules by one step of cesium chloride gradients equilibrium centrifugation. Electron microscopic observation and restriction enzymes digestion provided an estimate of 112 kb for the size of AsGV DNA

genome.

### Key words

Agrotis segetum granulosis virus;  
Extraction of DNA; Size of genome

### 图 版 说 明

Explanation of plates

a. AsGV DNA 二种限制性内切酶的琼脂糖凝胶电泳

a. Agarose gel electrophoresis pattern of restriction endonuclease digestion of AsGV DNA

1. DNA *Hin* dIII

3. AsGV DNA *Bam*HI

4. AsGV DNA *Eco*RI

b,c. SDS-蛋白酶-酚抽提的 AsGV DNA 线状分子

b,c. Linear molecule of AsGV DNA extracted by SDS-protase-phenol from capsules,

b.  $\times 18,000$ ; c.  $\times 21,000$

d,e,f. 氯化铯密度梯度一步超离心抽提的 AsGV DNA 超线团分子

d,e,f. Supercoil molecule of AsGV DNA extracted by one step cesium chloride gradients equilibrium centrifugation from capsules, d.  $\times 21,000$ ; e.  $\times 30,000$ ; f.  $\times 24,000$