

黄地老虎颗粒体病毒 DNA 片段在枯草芽孢杆菌中的克隆

郭三堆 邱并生 *石玉瑚 裴美云

*刘延娜 *吴祖银 郭兴华 *王卫国

(中国科学院微生物研究所,北京)

*(新疆农科院微生物研究所,乌鲁木齐)

EcoRI 酶解的 AsGV-XJ DNA 和质粒 pUB 110 DNA, 经 T4 DNA 连接酶连接后, 转化枯草芽孢杆菌 BR 151 感受态细胞, 涂布在加有新霉素 (5 μ g/ml) 的完全培养基上。用琼脂糖凝胶电泳快速法检测抗新霉素转化子中的重组质粒。在 388 个转化子中得到 12 个较 pUB 110 DNA 分子量大的重组质粒。所有重组质粒均可与 ³²PdCTP 标记的 EcoRI 酶解 AsGV-XJ DNA 片段的探针进行分子杂交。通过琼脂糖凝胶电泳对重组质粒中插入 AsGV-XJ DNA 片段进行了测定。

关键词 黄地老虎颗粒体病毒 DNA 片段; 枯草芽孢杆菌; 克隆

黄地老虎是我国北方地区粮、棉、油、糖、菜等农作物的重要害虫之一。从新疆分离到的黄地老虎颗粒体病毒 (Agrotis segetum granulosis virus 简称 AsGV-XJ) 已成功地用于黄地老虎的防治^[1]。作者曾对 AsGV-XJ 在感病细胞中的超微结构、包涵体、病毒粒子 DNA 的纯化及其有关特性进行了研究^[2-4,6]。另外还利用酶标免疫技术监测感病幼虫各组织中的 AsGV^[5]。为了探索 AsGV-XJ 这类杆状病毒的杀虫机理和工业生产这种病毒制剂的可能性, 开辟扩大昆虫病毒在生物防治上的途径, 有必要利用基因工程, 对其进行分子生物学的研究。由于大肠杆菌仍是研究基因结构、克隆和表达的重要实验体系, 所以 Hermann, Lüberet 等人将苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒 (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus 简称 AcNPV) DNA 在大肠杆菌中克隆并绘制了 AcNPV DNA 的物理图谱^[7]。忻纪厚等通过 pBR 322 在大肠杆菌中建立了家蚕核多角体病毒的

基因库^[24], 武亚明等^[25]对油桐尺蠖核多角体病毒 DNA 的 Bam HI 酶解片段在大肠杆菌中进行了克隆。但人们也已看到大肠杆菌体系在实际应用上的局限性。枯草芽孢杆菌系非致病、格兰氏阳性、好气性的芽孢杆菌; 不产生内毒素, 无外膜, 不产生热源, 具有大量分泌胞外蛋白质的特性, 本身即工业用菌, 因此成为除大肠杆菌外, 在基因工程研究上用的最多的一种体系。近年来, 利用它作为受体, 克隆了原核生物的一些氨基酸基因^[11]、核黄素基因^[18]、淀粉酶基因和蛋白酶基因等^[16,21,19], 并将已在大肠杆菌中克隆的乙型肝炎核心抗原基因、口蹄疫抗原基因、人干扰素基因等重新克隆到枯草芽孢杆菌中去^[7,17]。但迄今尚未见

本文于 1983 年 12 月 12 日收到。

本工作得到中国科学院微生物研究所研究员 周家炽和杨望年先生的支持; 遗传所刘良式同志, 发育所金振华同志, 医学科学院抗生素研究所周锡璋同志等的帮助, 特此一并致谢。

文中所用缩写: trp 色氨酸; met 蛋氨酸; lys 赖氨酸; Neo 新霉素 Neo^r 对新霉素敏感; Neo^s 抗新霉素; kb 千碱基对。

到将昆虫病毒基因直接在枯草芽孢杆菌中克隆的报道。本文报道黄地老虎颗粒体病毒 DNA 片段在枯草芽孢杆菌中的克隆, 显示了枯草芽孢杆菌在昆虫病毒的基因工程中的价值。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 病毒: 新疆黄地老虎颗粒体病毒作为 DNA 给体。

2. 菌株和质粒: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BR151 (*trp* C2 *met*B10 *Lys* 3 *Neo*^r) 作为受体菌株, 由美国 Spizizen 教授赠送。质粒 pUB 110 带有新霉素抗性基因 (*Neo*^r), 分子量为 4.5 千碱基对, 只有单一的 *Eco*RI 酶切位点, 作为克隆外源 DNA 片段的载体。

3. 酶和试剂: 限制性内切酶 *Eco*RI, T4 DNA 连接酶和枯草芽孢杆菌噬菌体 SphI DNA 系中国科学院微生物研究所工厂产品; 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I, DNA 酶 I 系 Sigma 公司产品; 硝酸纤维素滤膜 BA 85 系 Schleicher & Schüll 公司产品; X 光底片系 Kodak 公司产品; [α -³²P] dCTP 系 AmershamUK 产品。

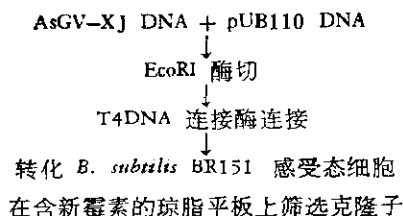
(二) 方法

1. 病毒 DNA 和质粒 DNA 的制备: AsGV-XJ DNA 直接从纯化的 AsGV-XJ 包涵体中提取。除在碱水解时加 1% 巯基乙醇外, 其他步骤与前文^[6]相同。质粒 DNA 制备, 先按 Canosi^[9]方法提取粗制品, 再经氯化铯密度梯度 40,000 转/分 (Beckman SW 40 转头) 超离心 48 小时纯化制得。两种 DNA 制剂经琼脂糖凝胶电泳鉴定为单一 DNA 区带, 达到适用纯度。分装后贮存于 -20℃ 冰箱中备用。

2. 感受态细胞的制备和保存: 按郭兴华等的方法^[10]制备感受态细胞, 加终浓度达 10% 的灭菌甘油, 在液氮中保存待用。

3. 克隆: 见下列克隆操作过程的略图。DNA 的酶切, 连接和转化的具体条件和方法详见文献^[11]。

4. 转化子检查: 用快速琼脂糖凝胶电泳检测重组质粒^[11]。



5. DNA-DNA 分子杂交: 用 α -³²PdCTP 将 *Eco*RI 酶解的 AsGV-XJ DNA 片段标记成探针, 与重组 DNA 进行分子点杂交和 Southern 法薄膜分子杂交^[12,13]。

6. 重组质粒分子量测定: 在琼脂糖凝胶电泳中测定重组质粒 DNA 分子量^[11]。标准分子量选用枯草芽孢杆菌噬菌体 SphI DNA 的 *Eco*RI 酶切片段^[14,15]。

结 果

(一) 重组质粒的建成

AsGV-XJ DNA 和 pUB 110 DNA 经 *Eco*RI 酶解后, 用 T4 DNA 连接酶连接, 然后对 *B. subtilis* BR151 感受态细胞进行转化。在 37℃ 水浴摇床中振荡培养 90—120 分钟后, 涂在加有 5 μ g/ml 新霉素的完全固体培养基平板上, 37℃ 温箱中培养 2—4 天。共长出 388 个抗新霉素转化子, 用快速凝胶电泳检查, 测得 12 株转化子, 其重组质粒 DNA 的迁移速度比 pUB 110 DNA 慢, 分子量较原载体大 (图版 1-1)。说明建成了 12 个带有 AsGV-XJ DNA 的 *Eco*RI 酶解片段的重组质粒。

(二) 重组质粒的确定

为了确证重组质粒 DNA 是由 AsGV-XJ DNA 片段和质粒 pUB110 DNA 重组而成, 将重组质粒 DNA 再次进行 *Eco*RI 酶切检查和 DNA-DNA 分子杂交鉴定。首先将重组质粒 DNA, pUB 110 DNA 和 AsGV-XJ DNA 同时用 *Eco*RI 酶解, 以 pUB 110 DNA 和 AsGV-XJ DNA 为对照, 进行琼脂糖凝胶平板电泳。图版 1-2 显示重组质粒 DNA 出现两条带, 一条与

pUB 110 DNA 处在同一位置, 另一条与 EcoRI 酶解 AsGV-XJ DNA 中的相应片段处在同一位置。将 EcoRI 酶解的 AsGV-XJ DNA 片段通过缺口转译, 用 [α - 32 P] dCTP 标记成探针, 与预先经过碱变性处理点在硝酸纤维素滤膜上的 12 个重组质粒 DNA 进行分子杂交, 然后将已杂交的硝酸纤维素滤膜与 X 光底片一起置于 -70℃ 中放射自显影, 分子斑点杂交证明, 除 pUB 110 对照不能杂交外, 所有重组质粒都能杂交(图版 I-4)。随机选出 5 个重组质粒 DNA, 经过 EcoRI 酶解后, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳, 然后用 Southern 薄膜吸附转移 (Southern blotting) 方法与上述探针进行 DNA-DNA 分子杂交, 除 pUB 110 DNA 和 pB-AsGV-XJ 57 分子量小的重组质粒不能杂交外, 得到了与分子斑点杂交

相同的结果(图版 I-3)。从而进一步验证重组质粒所带的外源 DNA 片段来自 AsGV-XJ DNA。

(三) 插入 AsGV-XJ DNA 片段分子量的测定

选用噬菌体 SppI DNA 的 EcoRI 酶解片段为标准分子量, 与重组质粒 DNA, AsGV-XJ DNA 和 pUB 110 DNA 的各个 EcoRI 酶解片段, 同时在水平琼脂糖凝胶中进行电泳, 溴化乙锭染色后, 在紫外光下照像, 测出各 DNA 片段的迁移率。由噬菌体 SppI DNA 15 条片段的迁移率绘测出与其分子量的对数所呈的标准曲线(图 1)。由此测出重组质粒中插入 AsGV-XJ DNA 的大小。表 1 和图版 II 列出 12 个重组质粒所带的 AsGV-XJ DNA 的大小。

A. SppI DNA 的 EcoRI 酶解片段分子量

Molecular weight of the fragments of SppI DNA

片段数 fragment No.	分子量 M. W. (kb)
1	7.82
2	6.97
3	5.86
4	4.67
5	3.38
6	2.68
7	1.90
8	1.80
9	1.45
10	1.33
11	1.09
12	0.88
13	0.66
14	0.48
15	0.35

B. SppI DNA EcoRI 酶解片段在琼脂糖凝胶电泳中的迁移率

Mobility of SppI DNA in agarose gel electrophoresis

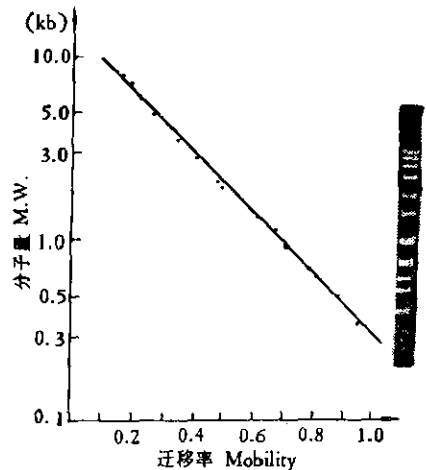


图 1 SppI DNA 的 EcoRI 酶解片段的分子量和其迁移率

Fig. 1 The curve of molecular weight and the mobility of SppI DNA fragments digested with EcoRI

表 1 重组质粒中插入 AsGV-XJ DNA 的分子量

Table 1 Molecular weight of AsGV-XJ DNA fragments inserted into recombinant plasmids

转 化 子 Transformant	重组质粒 recombinant plasmid	插入 AsGV-XJ DNA 的分子量 molecular weight of fragment (kb)
BR151-AsGV-XJ 5	pB-AsGV-XJ 5	~0.35
BR151-AsGV-XJ 10	pB-AsGV-XJ 10	~1.15
PR151-AsGV-XJ 16	pB-AsGV-XJ 16	~1.25
BR151-AsGV-XJ 27	pB-AsGV-XJ 27	~2.60
BR151-AsGV-XJ 31	pB-AsGV-XJ 31	~0.20
BR151-AsGV-XJ 57	pB-AsGV-XJ 57	~0.50
BR151-AsGV-XJ 59	pB-AsGV-XJ 59	~2.50
BR151-AsGV-XJ 86	pB-AsGV-XJ 86	~1.20
BR151-AsGV-XJ 90	pB-AsGV-XJ 90	~4.00
BR151-AsGV-XJ122	pB-AsGV-XJ 122	~0.88
BR151-AsGV-XJ126	pB-AsGV-XJ 126	~0.70
BR151-AsGV-XJ133	pB-AsGV-XJ 133	~0.78

讨 论

1. 将随机选出的 5 个分子量不同的重组质粒 DNA 进行 Southern 法薄膜吸附转移杂交,发现 pB-AsGV-XJ57 由于分子小,不易在 0.45μ 纤维素滤膜上吸附,而未出现杂交斑点,与文献报道相符^[23]。对 12 个重组质粒进行 DNA-DNA 斑点杂交时,虽然用于杂交的各个样品的 DNA 量相同,其显影度却随着 DNA 片段分子量的大小而递增。尽管小分子量的 DNA 片段与探针 DNA 杂交的相对量略低,仍被检测出来。

2. 带有外源 DNA 片段的重组质粒,转化 *B. subtilis* BR 151 感受态细胞后,在含有新霉素 ($5\mu\text{g/ml}$) 的培养基上生长速度 (2—4 天)较原 pUB 110 转化 BR 151 感受态细胞的生长速度 (18 小时)慢,郭三堆等也曾有报道^[11]。这种现象说明重组质粒上所编码的抗药性基因的表达可能比 pUB 110 要更困难些。因此,为了得到较多的转化子,重组质粒转化感受态细胞后,将培养时间延长,使抗药性基因充分表

达,再涂在含有抗生素的平皿上进行选择培养。在 pUB 110 质粒上的 EcoRI 位点,只要带上外源 DNA 片段,无论是原核生物的 DNA 片段 (水解淀粉芽孢杆菌 *Lys-3* 基因片段),还是昆虫病毒 AsGV-XJ DNA 片段所组成的重组质粒,转化感受态细胞生长速度慢很可能是一种普遍现象,也是有待进一步研究的问题。

3. 用电泳测定各 DNA 片段的分子量时,未加误差校正值,但 pUB 110 DNA 经 EcoRI 酶解后,在本实验条件下测得分子量为 4.45kb,其实际分子量为 4.5kb,误差范围约为 $\pm 0.05\text{kb}$ 。AsGV-XJ DNA 的 EcoRI 酶解片段经琼脂糖凝胶电泳测出其总分子量约为 100kb。在凝胶电泳中很难观察出太小的片段,而克隆所得的重组质粒却能捕捉出来。如 pB-AsGV-XJ 5, pB-AsGV-XJ 31 和 pB-AsGV-XJ 57 所携带的 AsGV-XJ DNA 的分子量为 0.35 kb, 0.2 kb 和 0.5 kb。由此可推断 AsGV-XJ DNA 的实际分子量较本实验条件下的测定值略大。另外重组质粒 pB-AsGV-XJ 10 与 pB-AsGV-XJ 16, pB-AsGV-XJ27

与 pB-AsGV-XJ 59 以及 pB-AsGV-XJ 126 与 pB-AsGV-XJ 133 所插入的 AsGV-XJ DNA 的大小很相似,也可能就是同一片段。虽然作者已在枯草芽孢杆菌中克隆了 AsGV-XJ 的 EcoRI 酶解片段占总片段数的 50%,但克隆的 AsGV-XJ DNA 的总量只占整个分子的 16% 左右。

参 考 文 献

- [1] 新疆农业科学院防治黄地老虎协作组: 微生物学报, 18(4): 355—356, 1978。
- [2] 徐绍华等: 微生物学报, 22(2): 123—125, 1978。
- [3] 王小凤等: 微生物学报, 23(1): 15—18, 1983。
- [4] 石玉珊等: 微生物学报, 24(3): 230—234, 1984。
- [5] 石玉珊等: 细胞生物学杂志, 5: 13—16, 1983。
- [6] 裴美云等: 微生物学报, (待发表)。
- [7] Kimer, H. et al.: *Nature*, 293(8): 481—482, 1981。
- [8] Hermann, L. et al.: *Gene*, 16: 343—345, 1981。
- [9] Canosi, U. et al.: *Mol. Gen. Genet*, 166: 259—267, 1978。
- [10] 郭兴华等: 微生物学报, 22(3): 263—268, 1982。
- [11] 郭三堆等: 遗传学报,
- [12] Liu Liang-shi et al.: *Mol. Gen. Genet*, 188: 27—36, 1982。
- [13] Kourilsky, P. H. et al.: *Bioclimate*, 56: 1215—1221, 1974。
- [14] Morelli, et al.: *Mol. Gen. Genet*, 164: 93—97, 1978。
- [15] 郑文尧: 微生物学通报, 11(5): 229, 1984。
- [16] Palva, L.: *Gene*, 19: 81—87, 1982。
- [17] Palva, L. et al.: *Gene*, 22: 229—235, 1983。
- [18] Рабинович, И. М., и др.: ДАН, СССР, 233: 1459—1461, 1978。
- [19] Anonymous, *Newswatch*: 3(15): 8, 1982。
McGrawhill's Biotechnology,
- [20] Anonymous, *Newswatch*: 3(14): 1, 1983。
McGrawhill's Biotechnology,
- [21] Karen, L. K.: *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 8(2): 153, 1983。
- [22] Birnboim, H. C. and Doly, J.: *Nucl. Acid. Res.*, 7: 1513—1523, 1979。
- [23] Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning A Laboratory*, p383. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982。
- [24] 忻纪厚等: <基因的结构、克隆和表达学术讨论会>论文摘要汇编, 中国生物化学会, 西安, 1983 年, 第 50 页。
- [25] 武亚明等: <基因的结构、克隆和表达学术讨论会>论文摘要汇编, 中国生物化学会, 西安, 1983 年, 第 59 页。

CLONING OF FRAGMENTS OF AGROTIS SEGETUM GRANULOSIS VIRUS IN *BACILLUS SUBTILIS*

Guo Sandui Qiu Bingsheng *Shi Yuhu Pei Meiyun

*Wu Zuyun *Liu Yena Guo Xinghua *Wang Weiguo

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

*(Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi)

Fragments of the DNA of *Agrotis segetum* granulosis virus isolated from Xinjiang, China (designed as AsGV-XJ) can be cloned in *Bacillus subtilis*. The AsGV-XJ DNA and pUB 110 DNA were digested with *EcoRI* restriction endonuclease, ligated with T4 DNA ligase, then transformed into *B. subtilis* BR 151 competent cells. The transformants were plated onto BPY medium containing neomycin 5µg/ml. The molecular weights of the 12 recombinant plasmids isolated from 388 transfor-

ants were larger than that of pUB 110 plasmid determined by rapid electrophoresis in slab agarose gels. All of recombinant DNA clones were identified as the fragments of AsGV-XJ DNA digested with *EcoRI* by the Southern dot and blot transfer hybridization. Size of the fragments inserted into recombinant plasmids were ranged from 0.2 to 4 kb.

Key words

Fragments of the DNA of *Agrotis segetum* granulosis virus; *B. subtilis*; Clone

图版说明

Explanation of plates

图版 I

Plate I

1. 12 个重组质粒琼脂糖凝胶电泳图 1% 琼脂糖凝胶, 在水平电泳装置上用 TEA 缓冲液 (40mM Tris-HCl; 40mM 醋酸钠; pH 7.5; 2mM Na₂ EDTA) 30V, 28 mA 电泳 18 小时, EB 染色后紫外光下照像

1. Gel electrophoresis of 12 recombinant plasmids. Recombinant plasmids were electrophoresis in horizontal 1% agarose gel in 40 mM Tris-acetate/2mM Na₂ EDTA (pH 7.5) for 18 hrs at 30V, 28mA. Gels stained with 1μg ml⁻¹ ethidium bromide for 15min were photographed under UV.

CCC 为共价闭环环状分子; OC 为开环分子

1. pB-AsGV-XJ31; 2. pB-AsGV-XJ 5; 3. pB-AsGV-XJ 57; 4. pB-AsGV-XJ 126; 5. pB-AsGV-XJ 133; 6. pB-AsGV-XJ 122; 7. pB-AsGV-XJ 10; 8. pB-AsGV-XJ86; 9. pB-AsGV-XJ 16; 10. pB-AsGV-XJ 59; 11. pB-AsGV-XJ-27; 12. pB-AsGV-XJ 90; 13. pUB 110.

2. EcoRI 酶解重组质粒 DNA 后, 在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳条件同图版 I-1

2. Recombinant plasmids isolated from minicultures of various clones and AsGV-XJ DNA were digested with endonuclease EcoRI. Electrophoresis was carried out 0.8% agarose gels as Plate I

3. 重组质粒 DNA 分子的 Southern 法吸附转移杂交图

3. DNAs in the gels were transferred to nitrocellulose filter and hybridized with the radiolabeled probe made from the total fragments of AsGV-XJ DNA digested with EcoRI. Nitrocellulose-bound DNA fragments which were hybridized with radiolabeled probe were detected by autoradiography as Southern blotting

1. AsGV-XJ DNA; 2. pB-AsGV-XJ 90; 3. pB-AsGV-XJ59; 4. pB-AsGV-XJ 10; 5. pB-AsGV-XJ 126; 6. pB-AsGV-XJ 57; 7. pUB 110

4. 各个重组质粒 DNA 经过碱变性后, 点加在硝酸纤维素膜上, 与探针进行原位杂交

4. Molecular spot hybridization of recombinant plasmid DNA All of the recombinant plasmids were denatured by NaOH, then spotted on the nitrocellulose filter, hybridization with probe DNA and autoradiography

1. pUB110; 2. pB-AsGV-XJ5; 3. pB-AsGV-XJ 57; 4. pB-AsGV-XJ31; 5. pB-AsGV-XJ 126; 6. pB-AsGV-XJ 133; 7. pB-AsGV-XJ 122; 8. pB-AsGV-XJ 10; 9. pB-AsGV-XJ 86; 10. pB-AsGV-XJ 16; 11. pB-AsGV-XJ 59; 12. pB-AsGV-XJ 27; 13. pB-AsGV-XJ90; 14. AsGV-XJ

图版 II

Plate II

各重组质粒 DNA 的 EcoRI 酶解电泳图在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 电泳条件同图版 I-1

1.2% agarose gel electrophoresis of 12 recombinant plasmids DNA were digested by EcoRI. Electrophoresis condition were the same as Plate I

A. 1. pB-AsGV-XJ 126; 2. pB-AsGV-XJ 86; 3. SppI; 4. pUB 110

B. 1. SppI; 2 pUB110; 3. pB-AsGV-XJ27; 4. pB-AsGV-XJ 133

C. 1. pUB 110; 2 pB-AsGV-XJ 57; 3. pB-AsGV-XJ 31; 4. SppI

D. 1. pUB 110; 2. pB-AsGV-XJ 5; 3. SppI

E. 1. pUB 110; 2. pB-AsGV-XJ 16; 3. pB-AsGV-XJ 10; 4. pB-AsGV-XJ 122; 5. AsGV-XJ 6. pB-AsGV-XJ 59; 7. pB-AsGV-XJ 27; 8. pB-AsGV-XJ 90; 9. SppI