

## 油桐尺蠖核型多角体病毒的一种 对 *Bam*HI 不敏感的毒株

丁达明 李先强 周咏芝

(中国科学院武汉病毒所, 武汉)

已经分离到一种限制性内切酶不同于油桐尺蠖核型多角体病毒<sup>[1]</sup>广西株 (Buzura suppressaria Nuclear Polyhedrosis Virus Guong Xi 简称 BsNPV GX) 的新毒株——广东株 (BsNPV GD)。BsNPV GD DNA 全然不受 *Bam*HI 的作用。且 *Xho*I 图谱有变化, 但 BsNPV GD 和 GX 两者的 DNA, 都有相同的 *Pst*I、*Eco*RI 和 *Sma*I 酶谱, 这对于研究其结构、功能以及用限制性内切酶进行毒株识别、分离、纯化都有一定意义。

### 材料和方法

#### (一) 病毒及 DNA 的分离提纯

按常规方法从天然罹病致死的虫体中制备多角体, 用 pH10.5 的 0.05N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.05N NaCl 的碱溶液消化多角体释放病毒粒子, 用 45000 × g 离心沉淀病毒粒子。将病毒粒子悬浮于 50mM Tris-HCl (pH7.8), 1% SDS, 1mMEDTA, 27% 蔗糖和 500 μg/ml 蛋白酶 K, 37°C 保温 3 小时, 经苯酚

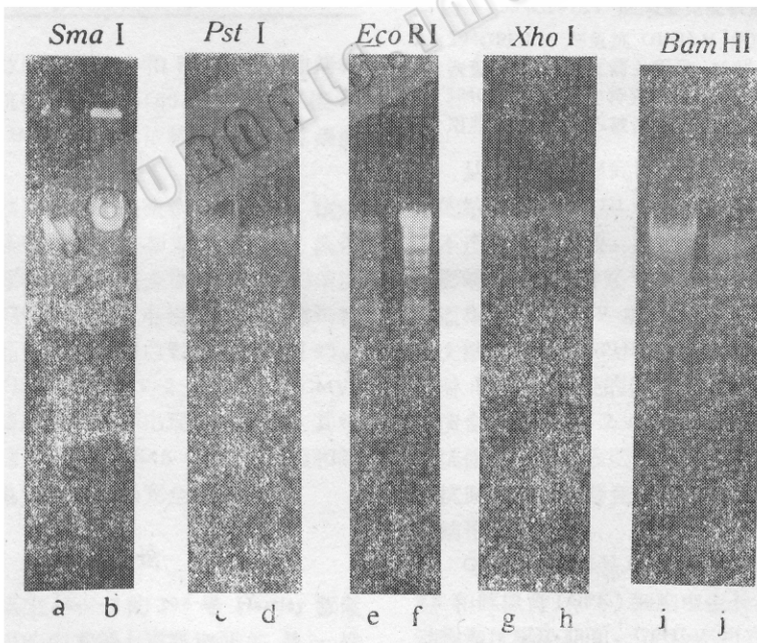


图1 BsNPVGD DNA 与 BsNPV GX DNA 的酶谱比较

BsNPV GD DNA (a,c,e) 的 *Sma*I、*Pst*I、*Eco*RI 酶谱与 BsNPV GX DNA (b,d,f) 的相同。BsNPV GD DNA (g) 的 *Xho*I 酶谱较 BsNPV GX DNA (h) 的多一条带。BsNPV GX DNA (i) 的 *Bam*HI 酶谱有 9 条带, 而 BsNPV GD DNA (j) 的 *Bam*HI 酶谱只有一条带。

抽提, 乙醇沉淀 DNA, 溶于适量缓冲液中备用<sup>[2]</sup>。

#### (二) 限制性内切酶分析及琼脂糖凝胶电泳

本文于 1984 年 3 月 23 日收到。

*Pst*I、*Bam*HI、*Sma*I、*Eco*RI、*Xho*I(上海东风试剂厂和 NEN、BRL 产品),除 *Sma*I 按特定条件作用外,一般采用 6mM Tris-HCl (pH7.5), 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT 缓冲液,消化的 DNA 在 0.7% 琼脂糖凝胶电泳板上电泳分离。

### 结果和讨论

对广西株和广东株病毒 DNA 进行限制性内切酶分析表明: 两种 DNA 的 *Sma*I、*Eco*RI 以及 *Pst*I 均相同(图 1)。*Xho*I 作用后, BsNPV GX 株较 BsNPV GD 株 DNA 少一条带,但酶谱基本相似(图 1)。特别的是 BsNPV GD 株 DNA 全然不受 *Bam*HI 的作用,而 *Bam*HI 在 BsNPV GX 株 DNA 分子上却有 9 个切点,产生 9 个片段(图 1)。

我们用已知有数个切点的限制性内切酶 *Pst*I 和 *Bam*HI 分别与只产生一条带的 *Sma*I 同时酶解 BsNPV GX 株 DNA,进行琼脂糖凝胶电泳(图 2), *Pst*I + *Sma*I 酶谱比 *Pst*I 多一条带, *Bam*HI + *Sma*I 酶谱比 *Bam*HI 多一条带,确定为单切点酶。

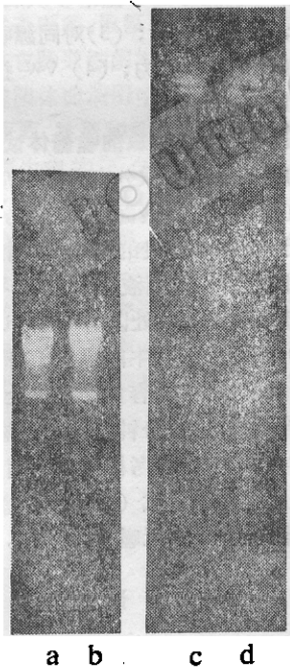


图 2 BsNPV GX 株 DNA 的 *Pst*I + *Sma*I 酶谱 (a) 与 *Pst*I 酶谱 (b), *Bam*HI + *Sma*I 酶谱 (c) 与 *Bam*HI 酶谱 (d)

因为,对于环状 DNA 来说,双酶消化所产生的片段数等于两酶作用位点之和。类似的试验证明, *Bam*HI 在 BsNPV GD 株 DNA 分子上无切点(未列图片)。

为了确切证明 BsNPV GD 株 DNA 不受 *Bam*HI 的作用,乃是由该 DNA 没有 *Bam*HI 的识别位点,曾分别考察了 *Bam*HI 的活性,作用条件和作用时间, DNA 的质量,限制性内切酶的二次酶解以及反应混合物中是否存在其它抑制因子等,均无异常现象,图 1 的 i 和 j 是在同一条件下的一次试验,便是一个良好的佐证。

在未进行更深入的研究之前,尚无法详细的讨论这些结果的含意,至少可以指出的是:

1. 用单酶与双酶比较判断限制性内切酶是单切点还是无切点直接、明瞭、切实可行。

2. BsNPV DNA 上单切点 *Sma*I 无疑适合作物理图谱的参比点<sup>[3]</sup>,也是昆虫杆状病毒基因组作为克隆载体的插入位点。

3. 由于 BsNPV GX 株和 GD 株的 *Xho*I 和 *Bam*HI 酶切图谱的差异,从而可能对 BsNPV GD 株和 GX 株进行分子识别。如果两株混杂,可用限制性内切酶消化 GX 株纯化 GD 株。

4. DNA 分子上的变化往往可能带来生物性状的变化,其中某些变化还可能是强弱毒株的差异所在,它们无疑是研究 DNA 结构功能的良好材料。

5. *Bam*HI 的识别顺序是 -GGATCC-,而在 BsNPV GD 株中全部消失,这个顺序竟仿佛是个高频突变点(热点),也许它连接一个短的 G 或 C 顺序,如果是这样,则可假定 BsNPV GD 株的 GC 含量和 T<sub>m</sub> 值均有可能高于 BsNPV GX 株。

6. 与 *Bam*HI 识别位点相同的限制性内切酶尚有 *Bst*I、*Bam*KI、*Bam*NI 和 *Bam*FI 等,如有条件时,用这些酶加以验证,是值得今后深入研究时考察的。

### 参 考 文 献

- [1] 李金照等: 病毒学集刊, 3: 125—135, 1983。
- [2] Tjia, S. et al.: *Virology*, 99: 399—409, 1977.
- [3] Ding Daming et al.: Abstracts, Sixth International Congress of Virology, p. 339, 1985.