

黄地老虎颗粒体病毒 DNA 的基因文库和物理图谱

邱 并 生 裴 美 云

(中国科学院微生物研究所, 北京)

艾秀莲 石玉瑚 吴祖银

(新疆农业科学院微生物研究所, 乌鲁木齐)

利用 EMBL 4——携带多切点连接序列的 λ 取代载体, 建成了黄地老虎颗粒体病毒 (AsGV) DNA 基因文库, 并绘制出 AsGV DNA 基因组的物理图谱。

当体外包装效率达 3×10^7 pfu/ μ g DNA 时, *Sal* I 和 *Bam* HI 双酶完全酶切的 EMBL 4 和 *Bam* HI 部分酶切的 AsGV DNA, 按 2:1 的接头克分子比, 用 T4 连接酶连接后, 在 BHB 2688 与 2690 体系中进行体外包装, 再经在 L 95 和 ED 8654 中的转染和转导, 获得 1.5×10^3 噬菌斑。根据 Clarke 和 Carbon 公式, 筛选概率达到复盖 99% 的 AsGV 基因组只需 35 个重组噬菌斑。我们随机挑取了 35 个重组噬菌斑, 经快速琼脂糖凝胶电泳分析得到 13 个不同类型的重组噬菌斑, 以 32 P 标记的 AsGV DNA 为探针进行分子杂交, 确定了 *Bam* HI 在 AsGV DNA 基因组上位点的相邻位置。

关键词 黄地老虎颗粒体病毒 DNA; 基因文库; 物理图谱

了解杆状病毒基因的功能以及它们如何控制侵染等问题, 对于充分利用这类病毒的治虫效果是十分必要的。研究这些问题应该先从这类病毒基因组及其产物的定位和分析着手。但是, 至今只有苜蓿 Y 纹夜蛾核多角体病毒 (AcNPV) 提供了这方面较为充足的资料^[2-4, 6-8]。在颗粒体病毒方面, 其基因组的知识尚停留在限制性内切酶的酶解特性的比较上^[12]。过去我们已对黄地老虎颗粒体病毒 (AsGV) 作过较为系统的研究^[14-19]。本文利用 EMBL 4, 具有多位点接连序列的多用途的 λ 系列载体构建 AsGV DNA 基因文库以及绘制出 AsGV DNA 的 *Bam* HI 的物理图谱。

材料和方法

(一) 细菌菌株、噬菌体和酶的来源

溶源菌: BHB 2688 [λ Eam 4b red⁻

imm 434 cIts Sam 7)/ λ], BHB 2690 [λ N 205 (λ Dam 5b red⁻ imm 434 cIts Sam 7)/ λ]。

宿主菌: ED 8654 (Sup E Sup F trp R⁻ met B⁻ rK⁻ mK⁺), L 95 (Sup E Sup F tonA trpR⁻ metB⁻ rK⁻ mK⁺ (P₂))。

噬菌体: EMBL 4。

以上菌株和噬菌体均系 A. Skaeka 博士惠赠。

酶: *Bam* HI, *Sal* I, T4 DNA 连接酶 (中国科学院生物物理所生化试剂厂产品), DNA 酶 I (Sigma 产品), RNA 酶 A (上海东风生化试剂厂产品), 蛋白酶 K (E. merck 产品)。硝酸纤维素膜 BA85 (Shleicher & Schüll 产品)。X 光底片 (Kodak 产品), [α - 32 P] dCTP (Amersham 产品)。

(二) 培养基

所用培养基详见文献^[10]。其中 NZCYM 培养基的 NZ 胶由蛋白胨代替。

(三) 供体 DNA 的制备

本文于 1985 年 4 月 8 日收到。

差速离心和甘油梯度离心纯化的 AsGV 包涵体^[11],先在 0.05M Na₂CO₃ pH 10.6 中, 37℃ 水解 1h。用 0.1N HCl 调 pH 至 8.0 后, 加终浓度为 50mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 20 mM EDTA, 50 μg/ml 蛋白酶 K 和 0.5% SDS, 65℃ 保温 1h。然后用不含蛋白酶 K 和 SDS 的上述缓冲液饱和的酚, 1:1 的酚和氯仿, 24:1 的氯仿和异戊醇各抽提一次。水相加 1/10 体积的 3M NaAc 和 2.5 倍体积的 95% 乙醇沉淀核酸, 再用 70% 乙醇洗二次, 抽干, 最后用 TE 溶液 (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA) 溶解, 小体积分装后, 在 -70℃ 冰箱中保存备用。

(四) 载体 DNA 的制备

经单斑分离纯化的 EMBL 4, 在敏感菌 ED 8654 中增殖^[10]。噬菌体的提纯采用聚乙二醇 6000 沉淀和甘油梯度离心相结合的方法。按 Anna-Maria 等人^[11]的方法从纯化的噬菌体中制备 EMBL 4 DNA。

(五) 包装液的制备

大肠杆菌的溶源菌株 BHB2688 和 BHB2690, 根据其对温度敏感的特性加以分离纯化后进行活化、诱导, 混合以及在低温下浓缩并悬浮在 CH 缓冲液 (内含 40mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM 精胺, 1mM 腐胺, 0.1% β-巯基乙醇, 7% DMSO)^[12]。此包装液分装后, 放置液氮中保存。

(六) 酶切、连接和包装

载体 EMBL 4 DNA 在过量的 BamHI 和 SalI

条件下进行完全酶切。目的基因 AsGV DNA 进行 BamHI 的部份酶切。然后根据载体与目的 DNA 片段的接头克分子比为 2:1 进行混合, 加 T4 连接酶于 12℃ 下连接 16 小时。经过连接的 DNA 与包装液进行体外包装。包装完毕后, 加一定量的 SM 溶液 (每 L 含 5.8g NaCl, 2g MgSO₄ · 7H₂O, 1M Tris-HCl (pH 7.5), 5ml 的 2% 明胶)。在 L₈₀ 中转染。再在含麦芽糖的软洋菜平板上培养, 一天后出现的噬菌斑, 即为重组噬菌体。

(七) 重组噬菌体的快速检测

随机挑取的重组噬菌体在 ED 8654 上进行小样增殖, 抽提 DNA^[10], 在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳上作快速测定。

(八) 重组噬菌体的分子杂交

将琼脂糖凝胶电泳分析出的不同类型的重组噬菌体 DNA 进行 BamHI 酶切, 在 0.8% 琼脂糖凝胶平板上电泳, 然后 EB 染色, 照相记录, 并把各片段 DNA 转移到硝酸纤维素膜上, 再与 α-³²P dCTP 标记的 AsGV DNA 探针作分子杂交。放射自显影检查重组噬菌体 DNA 中与 AsGV DNA 具有同源性的片段。

试验结果

(一) 包装液的体外包装效率

本试验共制备三批包装液, 体外包装效率见表 1。实验结果提示第三批的包装

表 1 不同批号包装液的体外包装效率

Table 1 Packaging efficiencies of packaging samples

稀释滴度 Titer	噬斑数 Numbers of plaque								
	No. 1			No. 2			No. 3		
	包装液 Packaging sample	包装液 +λDNA Packaging sample + λDNA	λ DNA	包装液 Packaging sample	包装液 +λ DNA Packaging sample + λDNA	λ DNA	包装液 Packaging sample	包装液 +λ DNA Packaging sample + λDNA	λ DNA
10 ⁻³	0	61	0	0	251	0	0	∞	0
10 ⁻²	0	1	0	0	3	0	0	234	0
10 ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	3	0

液的体外包装效率达到 3×10^7 PFU/ μ g DNA, 符合实验要求, 可以进行 AsGV DNA 基因文库的构建。

(二) AsGV DNA 基因文库的构建

AsGV DNA 用 *Bam* HI 部分酶切后与载体 EMBL4 DNA 连接后进行体外包装, 得到 1.5×10^3 PFU/ μ g AsGV DNA。根据 Clarke 和 Carbon 公式^[10] $N = \ln(1 - P) / \ln(1 - f/G)$, 其中 P 是预期概率, f 是插入 DNA 片段大小, G 是外源基因组的大小, N 为所需重组子数。理论上若选 P 为 0.99, 置换 AsGV DNA 片段取下限值 $f = 15$ kb。AsGV DNA 基因组大小约 120kb^[17], 则重组子数 $N = \ln(1 - 0.99) / \ln(1 - 1.5 \times 10^4 / 1.2 \times 10^5) = 35$ (PFU), 即筛选概率 35 个噬菌斑就达到覆盖 99% 的 AsGV DNA 基因组。我们得到的 1.5×10^3 噬菌斑, 足以满足建立 AsGV DNA 基因文库的要求。

(三) 重组噬菌体的鉴定

随机挑取的 35 个噬菌斑, 经小样增殖, 快速抽提 DNA, 在 *Bam* HI 酶切后,

表 2 AsGV DNA 的 *Bam* HI 和 *Eco* RI 酶切片段的大小

Table 2 Size of *Bam* HI and *Eco* RI restriction fragments of AsGV DNA

片段 Fragment	<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI
A	19.5	17.0
B	16.8	13.8
C	14.4	13.0
D	11.5	10.8
E	11.2	10.4
F	8.7	9.0
G	7.3	8.6
H	6.8	8.4
I	5.7	7.0
J	4.2	3.9
K	3.0	3.6
L	2.8	3.1
M		2.4
N		2.1
O		1.8
P		1.2
总计 Total (kb)	111.9	116.1

进行快速凝胶电泳分析。得到 13 个不同类型的重组噬菌体。其 DNA 与缺口转译的 ³²P 标记的 AsGV DNA 探针进行分子

表 3 各重组噬菌体中插入 AsGV DNA 的 *Bam* HI 酶切片段数及各片段大小

Table 3 Size and number of insert restriction fragments of *Bam*HI-AsGV DNA in recombiinant phages

重组噬菌编号 No. of recombi- nant phage	插入 AsGV DNA <i>Bam</i> HI 酶切片段数 Number of insert restriction fragment of <i>Bam</i> HI-AsGV DNA	各片段的代号 Designated letter of each fragment	各片段的大小 Size of each fra- gment (kb)	重组噬菌体中插入 AsGV DNA 的大小 Size of insert AsGV DNA in recombinant phage (kb)
6	3	C, D, M	14.4, 11.5, 2.4	28.3
12	2	E, J	11.2, 4.2	15.4
13	3	H, I, L	6.8, 5.7, 2.8	15.3
15	1	C	14.4	14.4
16	3	A, F, G	19.5, 8.7, 7.3	35.5
23	2	A, F	19.5, 8.7	28.2
25	3	E, J, K	11.2, 4.2, 3.0	18.4
27	2	C, J	14.4, 4.2	18.6
28	3	E, G, K	11.2, 7.3, 3.0	21.5
29	2	D, I	11.5, 5.7	17.5
31	3	B, F, H	16.8, 8.7, 6.8	32.3
32	2	E, K	11.2, 3.0	14.2
34	3	C, J, M	14.4, 4.2, 2.4	21.0

杂交证明所有重组噬菌体中的插入 DNA 片段都为 AsGV DNA *Bam* HI 酶切片段相对应的片段(图版 I, A—D)。现将 AsGV DNA 的 *Bam* HI 和 *Eco* RI 酶切片段的大小以及各重组噬菌体中插入 AsGV DNA 的 *Bam* HI 片段数与各片段大小^[17] 分别列于表 2 与表 3。由表 3 看出重组噬菌体中插入 AsGV DNA 的大小由 14.2—35.5 kb。但大多数的插入片段在 23kb 之内。符合 EMBL 4 的容量特点^[1]。

(四) AsGV DNA 的 *Bam* HI 酶切物理图谱

13 个不同类型的重组噬菌体 DNA, *Bam* HI 酶切后, 经过 ³²P 标记 AsGV DNA 探针的分子杂交鉴定, 可以标定出 AsGV DNA 的 *Bam* HI 酶切片段的相邻位置。例如 28 号重组噬菌体中 AsGV DNA 的

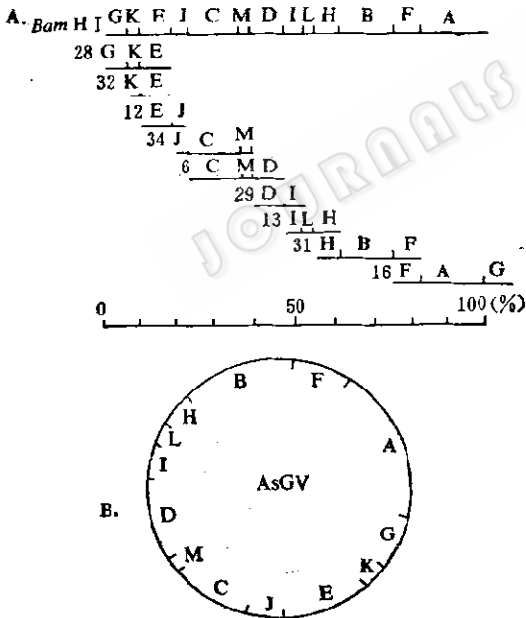


图 1 AsGV DNA 的 *Bam* HI 物理图谱

A. 以线状分子表示 B. 以环状分子表示

Fig. 1 Physical map of AsGV DNA for the restriction endonuclease *Bam*HI

A is presented in linear form, B is presented in circular form.

3 个 *Bam* HI 酶切片段 E, G 和 K, 其 E 和 K 在 32 号重组噬菌体中重复出现, 所以确定了这三个片段相邻位置是 GKE。AsGV DNA 的 *Bam* HI 酶切的 9 个片段(图 1), 以此类推绘制出基因组的物理图谱(图版 I, A—B)。由物理图谱进一步确定出 AsGV DNA 基因组的大小为 114.7 kb 左右。与电泳法和限制性内切酶解法估算出的 DNA 分子量相符。

讨 论

由于颗粒体病毒至今未能在细胞培养中侵染与复制, 大大影响了对它的基因组结构与功能的研究进程^[13]。我们通过 AsGV DNA 基因文库的建立, 绘制一个限制性内切酶的物理图谱可以为颗粒体病毒基因组的进一步研究打下基础。目前在核多角体病毒方面, 编码 AcNPV 的多角体蛋白的基因位点不仅作为该基因组物理图谱的零点^[12], 并可作为探针确定其它核多角体病毒, 例如棉铃虫核多角体病毒(H₂NPV)^[9]基因组物理图谱的零点。Rohnann 等人^[11]对七种杆状病毒的包涵体蛋白进行了分析, 发现至少有 6 个大的相同区, 不同的比例很少。编码包涵体蛋白的基因应有相当的序列同源性。因此可以用克隆化的多角体蛋白基因作为探针试探确定 AsGV DNA 上包涵体蛋白基因的位置。

另外限制性内切酶的部分酶切及双酶或三酶的酶切是测定 DNA, 包括昆虫病毒基因在内的物理图谱的常用方法。由于必须通过单、双酶, 甚至三酶酶切片段的比较才能确定各片段的端点, 试验步骤十分繁杂, 试剂和酶的耗量也大。本试验利用 EMBL 4 的多位点连接序列区域, 采用 *Sal* I 和 *Bam* HI 两酶完全酶切, 确保仅有左右臂具有粘性末端, 免去分离左右臂的步骤, 又排除了内源置换片段的自行连接,

提高了重组率。同时外源片段的插入, 替换 EMBL 4 的 *rec* 和 *gam* 基因, 由不能在 P_2 溶源菌生长的 Spi^+ 表型, 转变成 Spi^- 表型, 即在 L 95 菌上形成噬菌斑都是重组噬菌体^[1], 因此大大简化了建立基因文库的工作量。根据我们在 AsGV DNA 上运用的经验, 在昆虫杆状病毒方面可以广泛采用。

参 考 文 献

- [1] Anna-Maria Frischauf et al.: *J. Mol. Biol.*, **170**: 827—842, 1983.
- [2] Arif, B and W. Doerfler: *EMBO J.*, **3**: 525—529, 1984.
- [3] Cochran M. A. and P. Faulkner: *J. Virology* **45**: 961—970, 1983.
- [4] Esche H. H. et al.: *EMBO J.* **1**: 1629—1633, 1982.
- [5] Hans-Richard Rackwitz et al.: *Gene*, **30**: 195—200, 1984.
- [6] Hooft Van Iddekinge B. J. L. et al.: *Virology*, **131**: 561—565, 1983.
- [7] Lubbert H. and W. Doerfler, *J. Virology*, **50**: 497—506, 1984.
- [8] Lubbert H. et al.: *Gene*: **16**: 343—345, 1981.
- [9] Knell J. D. and M. D. Summers: *J. Virology*, **65**: 445—450, 1984.
- [10] Maniatis T. et al.: *Molecular cloning, A Laboratory Manual*, p. 247—308, 1982.
- [11] Rohmann G.: *Invertebrate Pathology and Microbioal Control XVth Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology*, Brighton p. 226—232, 1982.
- [12] Smith G. E.: *J. Virology*, **45**: 215—225, 1983.
- [13] Tweeten K. A. et al.: *Microbiological Reviews*, **45**: 379—408, 1981.
- [14] 徐绍华等: *微生物学报*, **22**: 123—125, 1982.
- [15] 王小凤等: *微生物学报*, **23**: 15—18, 1983.
- [16] 石玉湖等: *微生物学报*, **24**: 230—234, 1984.
- [17] 曹旭等: *微生物学报*, **26**(1): 31—34, 1986.
- [18] 郭三堆等: *微生物学报*, **25**(1): 38—44, 1985.
- [19] 郭三堆等: *生物工程学报*, **1**(3): 26—31, 1985.

THE GENOMIC LIBRARIES AND PHYSICAL MAP OF AGROTIS SEGETUM GRANULOSIS VIRUS

Qiu Bingsheng Pei Meiyun

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Ai Xiulian Shi Yuhu Wu Zuyun

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

Using a lambda replacement vector EMBL4, which contained polylinker sequences flanking the middle fragment and a large capacity, we have constructed genomic libraries and physical map of *Agrotis segetum granulosis virus* (AsGV) with *Bam*HI. When efficiency of packaging in vitro of DNA preparation yielded 3×10^7 PFU/ μ g DNA, vector DNA was digested to completion with *Bam*HI and *Sal*I, then was ligated by T4 ligase to AsGV DNA partially digested with *Bam*HI. The recombinant DNA was packaged in vitro and plated on L95. 1.5×10^3 recombinant phages have obtained by this procedures, extremely exceeded the requirement of construction genomic libraries of AsGV DNA. According to the formula of Clark and Carbon $N = \ln(1-P)/\ln(1-f/G)$, while

the fragments of AsGV DNA (MW=120 kb) were size as 15 kb in vitro packaging, 35 recombinant phages can covered 99% genome of AsGV DNA. 13 different types of recombinant phages from 35 plaques randomly screened and amplified under conditions selecting against spi^- phages were analyzed on 0.8% agarose gel and hybridized to AsGV DNA labeled with ^{32}P dCTP. After gel electrophoresis and autoradiography, the physical map of AsGV DNA with *Bam*HI can be directly determined.

Key words

Agrotis segetam granulosis virus
DNA; Genomic libraries; Physical map