

BmNPV CP 突变株基因文库的构建及 多角体蛋白基因的分离

储瑞银 王清华 林玉莲 陈长乐* 潘乃穗 陈章良

(北京大学生物系蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*, BmNPV) 属于杆状病毒科, 基因组为双链环状 DNA, 约 130 kb^[1]。由该病毒基因组编码的多角体蛋白在病毒感染后期大量表达形成结晶, 将病毒粒子包埋于其中, 对病毒粒子起保护作用。多角体形态受病毒基因组控制, 但也随宿主及环境条件的影响而改变^[2]。在离体培养条件下, 多角体会随病毒传代数的增加而导致形态的变异和数量的减少^[3]。对这些突变体所作的分析表明, 其基因组发生了宿主 DNA 的插入或碱基置换等变异^[4,5]。

普通 BmNPV 的多角体为六角形, 亦有四方形多角体的突变株 (Cubic polyhedra mutant, CP), 比较六角形与四方形两种 BmNPV 的 *EcoRI* 酶切图谱未发现变异 (储瑞银等, 待发表)。对野生型 BmNPV 基因组, 特别是多角体蛋白基因已进行了一系列结构与功能的研究^[6-9], 并且利用多角体蛋白基因的强启动子已经建立了 BmNPV 表达系统^[10-12], 但对 CP 株尚未在分子生物学水平上作深入的研究。为此, 我们构建了 BmNPV 四方形多角体突变株基因文库, 并分离了含多角体蛋白基因的克隆, 对它们进行了限制性内切酶图谱的分析, 现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

(一) 工具酶

限制性内切酶及其他工具酶为 Biolabs 产品。

(二) 菌株、质粒和病毒

大肠杆菌 DH5 α 为转化受体菌; 克隆及亚克隆用质粒为 pBluescript; BmNPV 四方形多角体突变株为苏州蚕桑专科学校分离和保存的毒种, BmNPV T3 株由前田进博士馈赠。

(三) 病毒 DNA 的制备

病毒多角体粗制品由苏州蚕桑专科学校提供, 经用 0.1% 的 SDS 洗 5 次 (低速离心, 弃去上清液) 得较纯多角体, 悬浮在去离子水中。纯多角体制剂加等体积的碱液 (0.03 mol/L Na₂CO₃; 0.05 mol/L NaCl), 室温下作用 10 分钟, 再加入 1/3 体积的 3 mol/L KAc, 离心 (10000 r/min, 10 分钟) 去沉淀, 上清液用苯酚抽提后, 经乙醇沉淀, 得病毒 DNA。

(四) 重组 DNA

DNA 的酶切、连接、转化等均按 Maniatis 等的方法^[13]。

结 果

(一) BmNPV 四方形多角体突变株基因文库的构建

用 *EcoRI* 酶解 BmNPV 四方形多角体突变株的 DNA 2 μ g, 与 *EcoRI* 酶解质粒 pBluescript

本文于 1991 年 6 月 28 日收到。

* 苏州蚕桑专科学校, 苏州 215151。

2 μ g 连接,转化感受态 DH5 α 受体菌。在含氨苄青霉素的麦康凯培养基上,得白色菌落约 500 个。白色菌落经小量扩增,煮沸法提取质粒 DNA, EcoRI 酶切鉴定,其中有 126 个含有插入片段,插入片段的大小为 0.5—15kb。病毒 DNA 有 20 条 EcoRI 酶切片段,由此估算,这 120 个含插入片段的重组子基本包含了 BmNPV 四方形多角体的全基因组。

(二) 多角体蛋白质基因的分离

以野生型 BmNPV 的多角体蛋白基因为探针,将白色菌落挑出,作原位杂交。500 个菌落有 5 个杂交呈阳性。将这 5 个阳性菌落扩增,快速制备质粒 DNA,用 EcoRI 酶切鉴定,均含有 EcoRI 10.6kb 插入片段,但其中的 pOCU104 除 10.6kb 的插入片段外,还有一 1.5kb 的插入片段。进一步将 pOCU102 和 pOCU104 用 Southern 杂交鉴定,10.6kb 的插入片段能与上述探针杂交,证实该片段含有多角体蛋白基因。

(三) 含多角体蛋白基因片段的物理图谱

用 BamHI、EcoRI、HindIII、PstI 和 XhoI 对 pOCU102 和 pOCU104 作了单酶和双酶酶切鉴定,结果见图版 1-1 和 2。根据酶切图谱,绘制了 pOCU102 和 pOCU104 插入片段的物理图谱(图 1)。与野生六角形多角体的 BmNPV 的相应片段比较发现,四方形多角体突变株在多角体蛋白结构基因上游增加了一个 XhoI 位点。pOCU104 除了在 10.6kb 片段 3' 端多了一段 EcoRI 1.5kb 片段外,其余 10.6kb 片段部分与 pOCU102 和 10.6kb 片段完全一样。

进一步亚克隆了 pOCU102 的 XhoI-BamHI 3.1kb 部分,得到亚克隆质粒 pOCUXB。进一步用 HpaI、HindIII、NdeI 和 XhoI 作了酶切分析,并绘制了其酶切图谱,结果未发现该区域的上述酶切位点有变化。

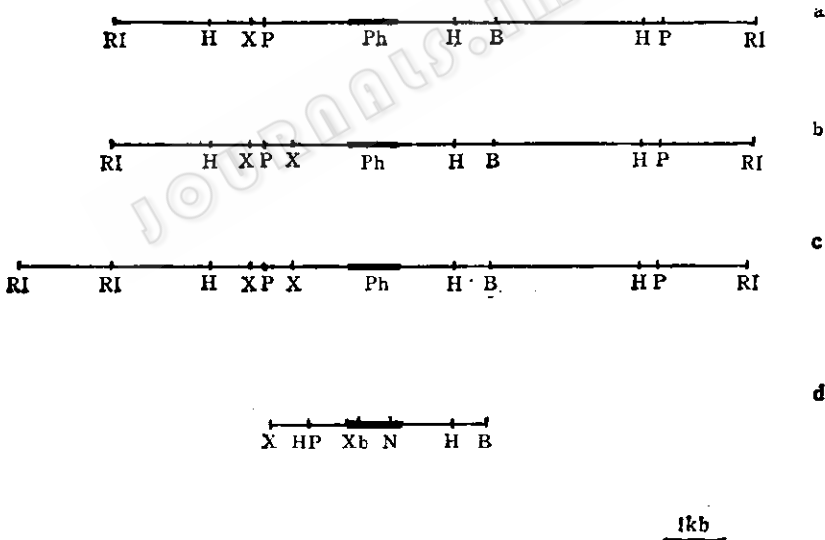


图1 质粒 pOCU102、pOCU104 及 pOCUXB 插入片段的物理图谱

a. BmNPV T3 株含多角体基因的 EcoRI 片段; b. pOCU102; c. pOCU104; d. pOCUXB

RI: EcoRI; H: Hind III; X: XhoI; B: BamHI; P: PstI

Hp: HpaI; Xb: XbaI; N: NdeI; ph: polyhedrin gene

讨 论

已发现的昆虫核型多角体病毒有 400 种以上,早期核型多角体病毒作为生物杀虫剂吸引了众多的

学者对其作了深入的研究。近年来, AcNPV 和 BmNPV 由于作为基因工程的高效表达载体而受到普遍重视。蛋白质的一级结构决定了其高级结构, 我们试图从 BmNPV 四方形多角体突变株基因结构的分析入手, 解开其变异的机制。

BmNPV 四方形多角体突变株感染的家蚕细胞一般含有 4—6 个多角体, 多角体大而匀整。显示了该突变株在作为基因工程载体方面具有潜在的优势。本实验通过其基因文库的构建和多角体蛋白基因的分离为上述两方面的工作打下了基础。进而, 作为基因工程的载体, 外源基因的表达与多角体蛋白质一样受病毒基因组其他因子的调控, 阐明多角体蛋白一级结构与多角体结晶高级结构间的关系, 对于进一步研究外源基因在昆虫细胞中积累方式也有参照意义。

参 考 文 献

- [1] Maeda, S.: *Ann. Rev. Entomol.*, 34: 1989.
- [2] 吕鸿声: 昆虫病毒与昆虫病毒病, 第 85—151 页, 科学出版社, 北京, 1982 年。
- [3] Fraser, M. J.: *Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture*, Academic Press, INC. 1987.
- [4] Miller, P. W. et al.: *Nature (London)* 289: 253—258, 1982.
- [5] Fraser, M. J., et al.: *Virology*, 117: 366—378, 1982.
- [6] Iatrou, K., et al.: *J. Virol.*, 54: 436—445, 1985.
- [7] Rohman, G. F.: *J. Gen. Virol.*, 67: 1499—1513, 1986.
- [8] Maeda, S. et al.: *Nature*, 315: 592—594, 1985.
- [9] 周金涛等: 生物化学与生物物理学报, 20: 486—491, 1988。
- [10] Maeda, S. et al.: *Proc. Jpn. Acad.*, 60: 423—426, 1984.
- [11] 储瑞银等: 生物化学与生物物理学报, 22: 385—390, 1990。
- [12] 储瑞银等: 科学通报, 11: 869—890, 1991。
- [13] Maniatis, S. et al.: *Molecular Cloning*, p. 86—268. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

图 版 说 明

1. 质粒 pOCU102 的酶切分析

a. PstI/XhoI; b. HindIII/XhoI; c. HindIII/PstI; d. EcoRI/XhoI; e. EcoRI/PstI; f. EcoRI/HindIII; g. BamHI/XhoI; h. BamHI/PstI; i. BamHI/HindIII; j. BamHI/EcoRI; k. PstI; l. HindIII; m. EcoRI; n. λ -HindIII 标准分子量

2. 质粒 pOCU104 的酶切分析

a. BamHI; b. EcoRI; c. HindIII; d. PstI; e. XhoI; f. BamHI/EcoRI; g. BamHI/HindIII; h. BamHI/PstI; i. BamHI/XhoI; j. EcoRI/HindIII; k. EcoRI/PstI; l. EcoRI/XhoI; m. HindIII/PstI; n. HindIII/XhoI; o. PstI/XhoI; p. λ -HindIII 标准分子量

CONSTRUCTION OF THE GENOMIC LIBRARY OF CUBIODAL POLYHEDRA MUTANT OF BOMBYX MORI NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS AND ISOLATION OF THE POLYHEDRIN GENE

Chu Ruiyin Wang Qinghua Lin Yulian Chen Changle*

Pan Naisui Chen Zhangliang

(National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, Department of Biology, Beijing University, Beijing 100871)

A mutant with cubiodal polyhedra which isolated from wild type *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus with that of hexagonal polyhedra was used as a experimental material. By using alkali lysis procedure, the viral DNA fragments were cloned into plasmid pBluescript. Five recombinants containing polyhedrin gene were selected through in situ hybridization. The inserted 10.6Kb fragment was mapped and an additional Xho I site was found upstream of the polyhedrin gene.

Key words Nuclear polyhedrosis virus; Genomic library; *Bombyx mori*