

两种杆状病毒的限制性消化和 p10 基因的定位*

黄永秀 齐义鹏 李凌云 金天全

(武汉大学病毒学研究所 武汉 430072)

摘要 以 5 和 6 种限制性内切酶分别消化昆虫杆状病毒 SeNPV 和 LsNPV DNA, 求出它们的基因组平均长 133kb 和 164kb。为了定位这两种杆状病毒的 p10 基因, 构建了含有 AcNPV p10 基因序列的两个探针载体 pAcHP106 和 pAcEP102。从探针载体回收 0.18kb 和 0.42kb 的 AcNPV p10 基因序列, 制备探针, 与 SeNPV 和 LsNPV 的酶切片段杂交, 得到清晰的杂交图谱, 准确的定位了这两种病毒的 p10 基因。

关键词 杆状病毒, p10 基因, 探针载体, 基因定位

目前, 人们一般采用杆状病毒的多角体蛋白基因(ocu)转移载体将外源毒素基因整合到病毒基因组上, 外源基因的插入引起 ocu 基因失活, 重组病毒失去了包涵体外壳, 口服感染率极低, 降低了重组病毒杀虫剂的效率。杆状病毒的另一个极晚期 p10 基因是一个高表达的非必需非结构基因, 用它取代 ocu 基因构建转移载体, 可使重组病毒的包涵体外壳完整保留, 适于作为基因工程病毒杀虫剂。

首稽尺蠖核型多角体病毒(Autograph California Nuclear Polyhedroses Virus, 简称 AcNPV)的 p10 基因定位在 Hind III-Q/EcoRI-P 片段上, 长 720bp, 编码区 282bp, 产生 93 个氨基酸, 分子量为 10138kDa 的蛋白^[1], 故称 p10 基因。Kuzio 于 1984 年^[2]发表了 AcNPV p10 基因的全序列, 黄杉毒蛾 NPV(简称 OpNPV)的 p10 基因全序列由 Rohrman 等测定^[3]。以 p10 基因转移载体进行基因工程病毒杀虫剂的研究也开展起来^[4,5]。但是, 由于杆状病毒间 p10 基因序列的同源性小于 5%^[1], 因此, 利用含有 p10 基因序列的片段或质粒作探针定位其他杆状病毒的 p10 基因, 成功率是很低的。为此, 我们构建了两个含有 AcNPV p10 基因编码序列的探针载体, 定位了两种杆状病毒的 p10 基因, 为利用我国特有的昆虫病毒的 p10 基因构建重组病毒杀虫剂打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

含有 AcNPV p10 基因 Hind III-Q 片段的质粒 pHIHdQ 由美国 L. Miller 教授赠送。AcNPV DNA 和甜菜夜蛾 NPV(简称 SeNPV)DNA 由美国 B. Federici 教授赠送。限制性内切酶从 Promega 公司和华美公司购买。随机引物标记(Random Primer Labeling)药盒购于 Promega 公司。 α -³²PdCTP 系 Promega 和北京福瑞公司产品。基因清洁药盒(Gene

* 国家自然科学基金、国家教委博士点基金和国家“八五”攻关课题资助项目。

本文于 1992 年 11 月 26 日收到。

Clean Kit) 购于 US Biochemical 公司。

1.2 方法

用煮沸法^[6]提取质粒 DNA, 按 Summers^[7]程序提取病毒粒子 DNA。用 Gene Clean 程序从琼脂糖纯化 DNA 片段, 以随机引物标记法进行探针标记, 按常规程序^[6]进行 DNA 重组、转化、筛选与 Southern 转膜杂交。

2 实验结果

2.1 SeNPV 和 LsNPV DNA 的酶谱分析

用 EcoR I 等 5 种内切酶消化 SeNPV DNA, Xho I 等 6 种内切酶消化粘虫 NPV (简称 LsNPV) DNA。根据各片段之和统计的 DNA 大小比较一致, SeNPV DNA 平均长 133kb; LsNPV DNA 为 164kb (表 1 和表 2)。

表 1 SeNPV DNA 的限制性消化及其片段大小
Table 1 Digestion of SeNPV DNA and its fragment size(kb)

Fragments 片段	EcoR I	Xho I	Hind III	Pst I	Bgl I
A	14.45	17.18	23.71	19.28	23.44
B	12.02	14.96	22.50	18.88	21.13
C	10.47	8.52	22.38	15.70	19.00
D	10.47	5.96	20.49	13.27	16.98
E	9.88	5.62	19.95	11.27	12.00
F	8.51	5.27	15.54	10.57	10.35
G	8.51	5.14	10.47	8.95	6.73
H	7.94	5.14		8.51	5.13
I	5.37	4.95		5.01	5.13
J	5.15	4.95		4.73	4.22
K	4.42	4.79		4.22	2.43
L	3.85	4.59		3.89	1.66
M	3.75	4.59		3.03	1.18
N	3.63	4.59		2.69	
O	3.47	4.42		2.69	
P	2.69	4.22		0.84	
Q	1.97	3.91			
R	1.97	3.76			
S	1.88	3.59			
T	1.68	3.20			
U	1.43	3.08			
V	1.32	1.82			
W	1.32	1.72			
X	1.20	1.48			
Y	1.17	1.36			
Z	0.98	1.17			
a	0.95	1.03			
b	0.75	0.95			
c	0.64	0.81			
d		0.69			
		0.61			
总计 Total(kb)	131.81	133.47	135.04	133.53	131.15

表 2 LsNPV DNA 的限制性消化及其片段大小
Table 2 Digestion of LsNPV DNA and its fragment size(kb)

片段 Fragments	Xho I	EcoR V	EcoR I	BamH I	Bgl I	Pst I
A	16.40	21.88	20.12	28.18	23.99	26.30
B	14.27	16.86	18.35	23.99	21.88	23.44
C	12.15	14.95	15.37	18.20	20.42	19.95
D	11.26	12.50	12.89	15.85	15.85	16.60
E	8.78	10.16	10.31	14.45	13.80	14.13
F	8.45	9.34	10.31	12.59	12.02	12.02
G	7.86	8.59	8.91	10.97	10.72	9.55
H	7.19	8.59	8.07	10.00	9.55	8.32
I	7.19	7.65	7.70	9.55	9.12	7.59
J	6.76	7.31	7.24	8.35	6.31	6.92
K	6.76	6.61	6.71	7.24	5.75	6.31
L	6.31	5.50	6.41	3.63	5.62	5.75
M	6.31	5.50	5.94		5.13	
N	5.84	4.83	5.45		4.17	
O	5.34	4.47	4.75			
P	4.94	4.27	4.75			
R	4.17	3.63	4.08			
S	3.78	3.39	3.64			
T	3.56	3.12	3.10			
U	3.51	2.78	2.93			
V	3.24		2.73			
W	2.99		2.73			
X	2.46					
总计 Total(kb)	161.90	166.64	173.2	163.60	164.3	157.4

2.2 p10 基因探针载体的构建(图 1)

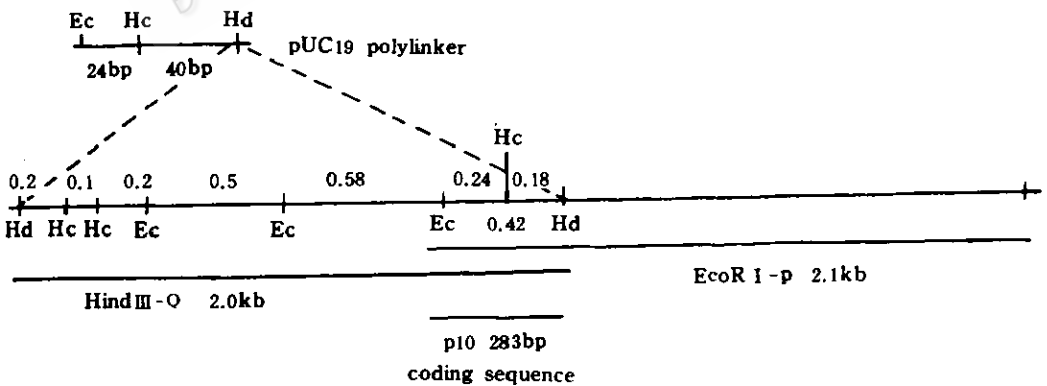


图 1 AcNPV p10 基因结构及其克隆战略

Fig. 1 AcNPV p10 gene structure and the strategy of its cloning

Hd;Hind III ;Hc;Hinc I ;Ec;EcoR I .

Met	Leu	Thr	Gln	Ile	Leu	Asp	Ala	Val	
ATG	TT	TTG	ACG	CAA	ATT	TTA	GAC	GCC	GTT
+1	20			30				40	

标记后作为放射性探针,与 SeNPV 的限制性片段杂交,采用各种方式均得不到杂交信号,而 AcNPV 阳性对照的杂交带却十分显著。因此,我们不得不构建 p10 基因全编码序列的探针载体。

AcNPV p10 基因全序列定位在 EcoR I -P 和 Hind III -Q 片的重叠区。用计算机程序找出 Hind III -Q 片段的限制性位点,设计出构建 p10 基因探针载体的方案(图 1)。

将质粒 pHIHdQ 的 Hind III -Q 片段亚克隆到 pUC19 的 Hind III 位点,得到重组质粒 pAcp10。再用 Hinc I 消化,则含 p10 基因编码序列的 0.18kb Hind III -Hinc I 片段被保留;以 EcoR I 消化,含有 p10 基因启动子和编码序列的 0.42kb Hind III -EcoR I 片段留在质粒上。将上述两种消化产物连接之后,即构建成 p10 基因的两个探针载体 pAcHp106 和 pAcEP102(图 2)。

2.3 两种杆状病毒 p10 基因的定位

用 Hind III /Hinc I 双酶消化探针载体 pAcHP106,回收 AcNPV p10 基因的 0.18kb 片段;用 Hind III /EcoR I 双酶消化探针载体 pAcEP102,回收 AcNPV p10 基因的 0.42kb 片段(图 3),制备放射性探针,与 SeNPV 和 LsNPV 的限制性片段进行 Southern blot 转膜杂交(图 4,5)。

根据杂交图谱,将两种杆状病毒含有 p10 基因序列的片段列入表 3。

从表 3 看出,SeNPV p10 基因都定位在 8 种内切酶的 2 个片段以上。其中 Hinc I 的 A、B 两片段只有 2.5 和 2.7kb,可以用于序列测定。LsNPV 的 p10 基因在 5 种内切酶片段上都有明显的杂交带,其中 EcoR V -M 片段是一个仅含有 p10 基因的单一片段,长 5.5kb,用于构建转移载体是有希望的。

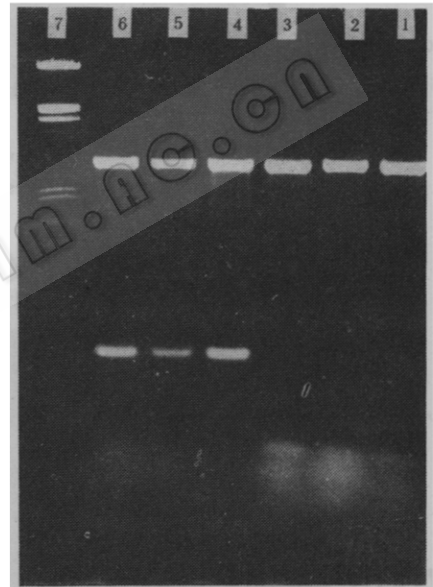


图 3 探针载体 pAcHP106, pAcEP102 的限制性消化和探针(0.18kb 和 0.42kb)回收

Fig. 3 Restriction digestion of pAcHP106, pAcEP102 DNA and recovery of probes(0.18kb and 0.42kb)

1—3. pAcHP106/Hind III + Hinc I; 4—6. pAcEP102/Hind III + EcoR I; 5. λ DNA/Hind III + EcoR I.

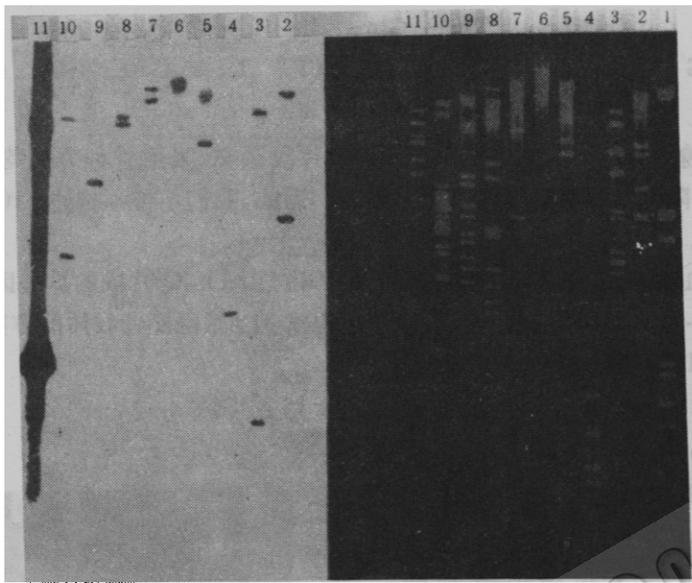


图4 SeNPV DNA 的限制性消化及 0.18kb 探针定位 p10 基因的 Southern 杂交

Fig. 4 Restriction digestion of SeNPV DNA and Southern hybridization for p10 gene location with 0.18kb probe

1. λDNA/EcoR I + Hind III ; 2. Bgl II ; 3. Xho I ; 4. Hinc II ; 5. Hind III ; 6. Sma I ;
7. Kpn I ; 8. Spn I ; 9. Xba I ; 10. EcoR I ; 11. AcNPV/Hind III .

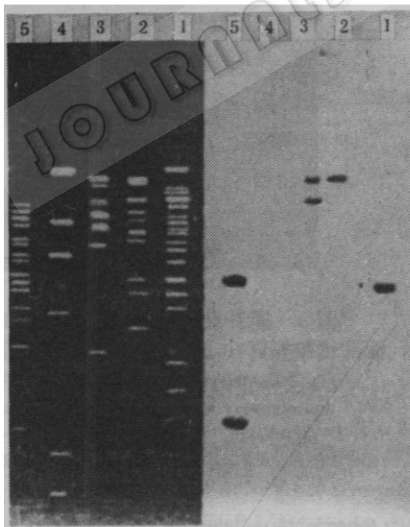


图5 LsNPV DNA 的限制性消化及 0.42kb 探针定位 p10 基因的 Southern 杂交

Fig. 5 Restriction digestion of LsNPV DNA and Southern hybridization for p10 gene location with 0.42kb probe
1. EcoRV ; 2. Bgl II ; 3. BamHI ; 4. λDNA/Hind III ; 5. Xho I .

表3 含有 p10 基因序列的片段
Table 3 Fragments containing p10 gene sequence

酶 Enzyme	SeNPV	LsNPV
Bgl II	A, H	A
Xho I	C, P	L, X
Hinc II	A(2.7), B(2.5)	
EcoRV		M(5.5)
Kpn I	A, B	
BamHI		A, C
Xba I	A, D, F	
Hid II	C, F	
Sph I	A, D, E	
EcoR I	A, V	C, E

3 讨论

根据 DNA 序列的同源性进行杂交,定位另一有机体的某个等位基因是分子生物学中普遍采用的方法。但是,如果所用探针除该基因本身序列外,还含有非基因旁侧序列,往往容易产生非特异性杂交,给人们以假象。用几十个碱基的合成探针,对于同源性在 50% 以下的等位基因(如杆状病毒的 p10 基因)也得不到正确结果。因此,构建含有 p10 基因编码区的探针载体是十分必要的。

我们构建了 AcNPV p10 基因的两个探针载体,通过对两种杆状病毒 p10 基因定位的实际应用都得到了满意结果。AcNPV 阳性对照上,除 p10 基因显出很强的杂交信号外,其余片段也得到了不同程度的杂交信号。我们认为,其原因有二:首先,在实验中,为了加强这种同源性很低的等位基因的杂交,我们不得不使用很高比放的探针(10⁷cpm 以上);其次,据报道^[8],AcNPV 基因组上有很多同源区(hr),这可能就是 AcNPV 阳性对照的整个泳道均被杂交的原因。

重组质粒 pAcEP102 除用作探针载体外,由于有 5' 启动子序列,ATG,下游+60bp 和 151bp 处分别有 Hinc I 和 Bgl I 两个单一位点,也可作为转移载体表达外源基因或构建重组病毒杀虫剂。

参 考 文 献

- [1] 齐义鹏. 病毒学报,1990,6(4):383—390.
- [2] Kuzio J *et al.* *Virology*,1984,139:414—418.
- [3] Leisy D L. *Virology*,1986,153:157—167.
- [4] Mccutchen B F *et al.* *Biotechnology*,1991,9:848—851.
- [5] Merryweather A T *et al.* *J Gen Virology*,1990,71:1535—1554.
- [6] 齐义鹏,等. 基因工程原理和方法. 成都:四川大学出版社,1988,181.
- [7] Summer M D, Smith G E. *A Manual of Methods for Baculovirus Vector and Insect cell culture procedures*, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin,1987. No. 1555.
- [8] Carstem E *et al.* *J Gen Virology*,1987,68:901.

RESTRICTION DIGESTION OF TWO KIND OF BACULOVIRUSES AND THE LOCATION OF THEIR p10 GENES

Huang Yongxiu Qi Yipeng Li Lingyun Jin Tianquan

(Department of Virology, Wuhan University, Wuhan, 430072)

Abstract The length of SeNPV and LsNPV genomes DNA were calculated to be 133kb and 164kb respectively, according to digestion with 5—8 restriction endonucleases. In order to map p10 gene in Baculoviruses DNA by pure probe, two probe vectors, pAcHP106 and pAcEP102, were constructed with 3'-0.18kb and 3'-0.18kb+5'-0.24kb (coding sequence and promoter) from AcNPV p10 gene. The p10 genes of both baculoviruses, SeNPV and LsNPV, are located with 0.18kb and 0.42kb probes produced by random primer labeling.

Key words Baculovirus, p10 gene; Gene location, Probe vector