

斜纹夜蛾 NPV 多角体基因的 克隆和部分测序*

曾庆** 龙肇新 王珣章 蒲垫龙

(中山大学昆虫学研究所/生物防治国家重点实验室, 广州 510275)

摘要 本文对 S1NPV 基因组作了酶解分析, 测得其基因组大小为 145kb, 并用双酶法确定了 S1NPV 基因组的 Hind III 和 Pst I 物理图谱. 以含 AcNPV 多角体基因的质粒 pAC-1 的 Sal I-C 片段为探针, 对 S1NPV DNA 酶切片段 southern 转印杂交结果, 初步判断多角体基因定位于 Pst I-B/C/D 片段、Bgl II-C/D 片段、BamHI-B/C 片段和 EcoRI-A/B 片段上, 且 S1NPV 与 AcNPV 多角体蛋白基因有 64% 的同源性. 而以大肠杆菌质粒 pUC 19 为载体对 S1NPV 的多角体基因试克隆, 得到带有 Bgl II-Pst I 双酶切片段的 2 个克隆子. 对这两个杂交阳性克隆子之一的核苷酸序列测定, 表明插入片段与 BmNPV 多角体基因上游序列亦有一定同源性.

关键词 斜纹夜蛾 NPV, 基因组, 酶解分析, 多角体基因, 克隆, 序列分析

分类号 Q81

斜纹夜蛾 (*Spodoptera litura*, S1) 核型多角体病毒 (S1NPV) 属杆状病毒科核型多角体病毒属的单核衣壳核型多角体病毒亚属^[1], 国内外对其生物学特性进行过研究并已作为生物杀虫剂在大田应用^[2,3]. 中山大学昆虫学研究所已经建立了斜纹夜蛾人工饲料大规模连续饲养和细胞离体培养等各种技术^[4,5]并在国内率先开展了组建斜纹夜蛾核型多角体病毒基因工程表达载体的可行性研究.

本文从 S1NPV 基因组的限制酶切分析入手, 初步总结出 S1NPV 基因组的 Hind III 和 Pst I 限制酶切物理图谱, 并对多角体蛋白基因进行了定位和克隆; 克隆质粒经部分测序并在计算机辅助下在核酸序列库中进行了同源性比较分析.

1 材料与方法

1.1 病毒

斜纹夜蛾 NPV 分离自广州市郊区感染的斜纹夜蛾幼虫^[6], 病毒的增殖、病毒 DNA 的

收稿日期: 1993-05-05

* 国家自然科学基金资助项目; ** 现在通讯地址: 广东省微生物研究所

分离提纯和酶切电泳按文献^(7,8)所述方法进行。

1.2 质粒构建

按 Maniatis 方法⁽⁹⁾。质粒 pUC 19 购自华美生物工程公司, pAC-1 由辽宁省蚕业研究所范琦先生提供, 系为苜蓿丫纹夜蛾 NPV (AcNPV) 基因组 EcoR I-1 片段插入 pAT 153 而构成的重组质粒⁽¹⁰⁾; 噬菌体 M13mp18 购自美国 New England Biolabs 公司, 限制性内切酶、连接酶等均为 New England Biolabs 公司和华美生物工程公司产品, 反应条件按厂家所附使用说明。

1.3 重组质粒的筛选与鉴定

利用质粒 (pUC 19) 和噬菌体 (M13mp18) 的选择标记进行筛选, 即在含 X-gal 的 LB 琼脂平板上挑选形成白色的菌落或白色噬菌斑, 而后通过酶切电泳分析鉴定重组子, 再通过 southern 转印杂交技术和序列测定技术予以确证。

1.4 DNA 分子杂交

按文献⁽⁹⁾和⁽¹¹⁾方法。主要试剂中, 甲酰胺为国产 AR 级试剂, 杂交前用混合床离子交换树脂处理。甲酰胺混合床离子交换树脂 (Ion Exchange Resin, MB-1) 购自美国 Serva 公司, 同位素及缺口翻译试剂盒 (Nick Translation Kit) 购自英国 Amersham 公司, 探针制备按 Amersham 公司缺口翻译试剂盒所提供的材料与方法进行。

1.5 DNA 序列测定

序列分析试剂为 New England Biolabs 公司产品。核苷酸序列测定采用 Sanger 的末端终止法⁽¹²⁾和 Messing 的 M13 克隆-模板系统⁽¹³⁾, 综合 Pharmacia, Biehringer Mannheim, Amersham, Biorad 和 United States Biochemical 等公司的操作手册操作。

2 结果

2.1 SINPV DNA 的酶解分析及其基因组的物理图谱

SINPV DNA 用 Hind III, Bgl II, Pst I, BamH I 和 EcoR I 消化后, 其中, SINPV DNA 经 Hind III, Pst I 和 Hind III + Pst I 完全酶解后, 分别得到8个、14个和22个片段 (图略), 各片段大小详见表1。由酶解片段大小累加总和计算的 SINPV 基因组大小约为145kb

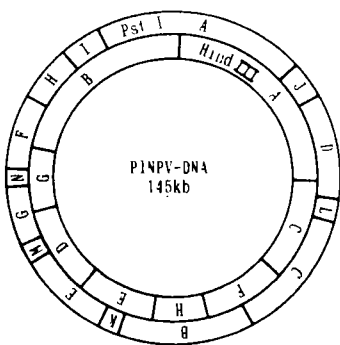


图1 PINPV 基因组的 Hind III 和 Pst I 物理图谱 (PINPV 即 SINPV)

Fig. 1 A physical map of SINPV genome for the Restriction enzyme Hind III and Pst I

(表1). 由于双酶解片段数目与两个单酶解的片段数之和相等, 因此设定无酶解片段的丢失. 在此基础上, 根据各片段的大小推测它们之间的重叠关系, 继而推测各连接组如表2所示. 综合各连接组, 得出了SINPV基因组 Hind III 和 Pst I 的物理图谱 (图1).

表1 SINPV DNA 各酶解片段的分子大小的近似值

Tab. 1 Size (kb) of SINPV DNA restriction fragments

Hind III 片段	大小 (kb)	Pst I 片段	大小 (kb)	Hind III + Pst I 双酶解片段	大小 (kb)
A	35.00	a	33.10	1	17.48
B	35.00	b	17.83	2	15.23
C	16.76	c	17.83	3	13.27
D	13.95	d	17.11	4	10.05
E	12.27	e	16.12	5	9.00
F	12.27	f	12.97	6	8.91
G	9.43	g	6.30	7	8.11
H	8.47	h	6.30	8	7.62
		i	4.97	9	7.62
		j	3.97	10	6.30
		k	3.20	11	5.95
		l	2.13	12	4.91
		m	2.07	13	4.24
		n	2.07	14	4.24
				15	3.97
				16	3.77
				17	3.20
				18	3.20
				19	2.94
				20	2.13
				21	2.07
				22	2.07
基因组大小	143.15		145.97		145.81

表2 SINPV DNA 双酶解片段与单酶解片段的重叠关系

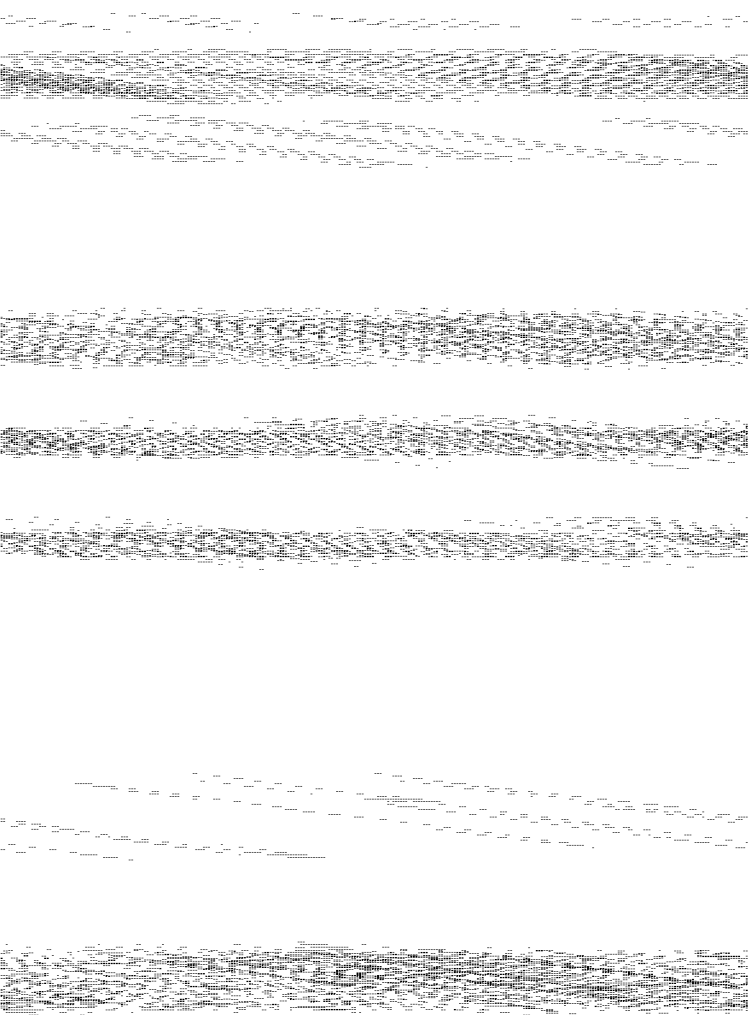
Tab. 2 A single and double digestion restriction fragments of overlapping

Hind III 片段	与 Hind III 重叠的双酶解片段	Pst I 片段	与 Pst I 重叠的双酶解片段
A	1, 3, 15	a	1, 2
B	2, 6, 10, 13	b	7, 11, 18
C	4, 14, 20	c	4, 8
D	5, 19, 21	d	3, 14
E	9, 17, 18	e	5, 9
F	8, 11	f	6, 12
G	12, 16, 22	g	16, 19
H	7	h	10
		i	13
		j	15
		k	17
		l	20
		m	21
		n	22

2.2 SINPV 多角体蛋白基因的定位

考虑到核型多角体病毒的多角体蛋白基因具高保守性^[12~14], 因此用含 AcNPV 多角

片段規定的連續或稀疏
且易於理解的權重組
是該地將穩定在該地
， 般未重疊等， 不重復
質粒的轉化過程與專
端端端端端端端端
兩端快速配對與轉化
利比轉化過程與專
轉化過程與專轉化過程



NPV 杀虫剂时颇受注意的区域。因此,对这一基因的定位、克隆和分析是 NPV 分子生物学研究中最重要的工作之一。本文在一般酶解分析的基础上,对 S1NPV 多角体蛋白基因在其 DNA Bgl II, Pst I, BamH I 和 EcoR I 酶解图谱上同时进行定位,并对其进行了克隆和序列测定,这在国内尚属首次。

S1NPV DNA 通过 Hind III, Bgl II, Pst I, BamH I 和 EcoR I 的酶解分析,测得其平均分子量为 145kb,结果的重复性、一致性较好。诚然,由于这类病毒基因组庞大,对其 DNA 进行分子量测定,误差是不可避免的,尤其是通过酶解后琼脂糖凝胶水平电泳测定分子量,由于存在小分子量带丢失和大分子量带计算偏差大等因素,直接影响到对片段间重叠关系的推测,因此,用这种方法结合数学分析所得到的 NPV 基因组就可能有多种结果。本文在推测物理图谱时,也考虑了酶解片段间重叠、连接关系的多种可能性。经比较分析,我们认为表2所反映的单、双酶解片段间关系,可使得各单酶解片段的实测分子量,与所含双酶解片段分子量之和最为接近。我们所得到的 S1NPV (广州株)物理图谱与 S1NPV (武汉株)的物理图谱^[18]有所差别,这种差别是否恰好反映了不同株 S1NPV 基因组之间的结构差异,或仅由各自的测量、推算的偏差所引起,或两者兼而有之,有待进一步确定。

本文通过 southern 转印和分子杂交发现 S1NPV 多角体基因定位于 Bgl II - C/D 片段、Pst I - B/C/D 片段、BamH I - B/C 片段、ECOR I - A/B 和 I 片段上。在这里应当说明的是,在基因组物理图谱未确定以前,由于酶切电泳很难将 Bgl II - C 和 D 片段清晰分开,即两者的电泳迁移率基本一致,因此,所谓 C 和 D 片段在电泳分析水平上的意义是等同的,所以本文用 Bgl II - C/D 的方式表达 S1DNA 多角体蛋白基因在酶切电泳水平上的定位,而“S1NPV 多角体蛋白基因定位于 Bgl II - C/D 片段上”则表示有两种可能性存在:一为2个片段均有可能都是多角体蛋白基因位置之所在,也即该基因在其编码区及调控区内存在 Bgl II 切点;一为多角体蛋白基因定位于 C 或者 D 片段上,非此即彼。同样, BamH I - B/C, EcoR I - A/B, Pst I - B/C/D 的片段也存在相同的情况。由此可见, S1NPV 多角体蛋白基因均定位于几种酶的酶解大片段上,这些大片段经另一种酶消化后有可能得到含该基因的较小片段,因此,为避开克隆 DNA 大片段的困难,我们采用了 S1NPV DNA 的 Bgl II - Pst I 双酶切片随机克隆的策略。我们还在多次杂交试验中发现, AcNPV 多角体基因探针与 S1NPV 基因组相应区域仅能在 35℃、20% 甲酰胺这一非严格条件下呈弱阳性杂交反应,由此我们推断 S1NPV 与 AcNPV 多角体蛋白基因间同源性约为 64%。这一结论将有助于多角体蛋白基因的克隆及核苷酸序列测定工作。

对打点杂交阳性的重组质粒之一进行的核苷酸序列测定的结果,插入片段与 BmNPV 多角体基因上游序列有一定同源性,但由于 S1NPV 与 AcNPV 和 BmNPV 多角体蛋白基因之间核苷酸序列的同源性都不高,而 NPV 的多角体基因、p10 基因、核衣壳基因等晚期基因的 5' 调控区中的启动子和增强子序列又都具有一定的同源性,因此,我们认为测得的序列最可能是 S1NPV 基因组中靠近多角体蛋白基因的一段非编码的调控区。但这个结论仍有待今后对该片段下游的 DNA 序列的测定、比较和分析来证实。

参 考 文 献

- 1 Fauquet C; Mayo MA. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*. 1991, supplement 2: 64
- 2 邓日强, 谢伟东, 王珣章等. 斜纹夜蛾核型多角体病毒在传代细胞系中增殖的研究. 杀虫微生物(第三卷). 武汉: 华中师大出版社, 1991. 124~128
- 3 刘复生, 陈其津, 龙紫新等. 斜纹夜蛾核型多角体病毒杀虫剂防治蔬菜上斜纹夜蛾的应用效果. 杀虫微生物(第三卷). 武汉: 华中师大出版社, 1991. 141~146
- 4 蒲蛰龙, 陈其津, 刘复生等. 斜纹夜蛾核型多角体病毒杀虫剂中试生产及应用, 全国生物防治学术讨论会论文集. 北京: 中国农科院生物防治研究所, 1991. 187~188
- 5 谢伟东, 曲士芮, 王珣章等. 斜纹夜蛾传代细胞系的建立及核型多角体病毒感染研究. 中山大学学报(自然科学版), 1988, 27(3): 113~116
- 6 蒲蛰龙, 昆虫病毒的研究. 北京: 科学技术文献出版社, 1982. 1~9
- 7 龙紫新, 王珣章, 谢伟东等. 乙型肝炎病毒表面抗原基因在昆虫体系中的表达. 生物工程学报, 1991, 7(1): 37~46
- 8 王珣章, 谢伟东, 龙紫新等. 形成多角体的杆状病毒载体系统的建立. 病毒学报, 1991, 7(3): 253~261
- 9 Maniatis, T et al. In *Molecular cloning, A laboratory manual*. edited by Cold Spring Harbor Laboratory, NY; CSH. 1982. 151~153
- 10 Smith G E et al. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedrin and 10 000-molecular weight protein. *J Virol*, 1983, 45: 215~225
- 11 Howly P M et al. A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. *J Biol Chem*, 1979, 254(11): 4876~4883
- 12 Leisy D, Rohrmann G, Beaudreau G. The nucleotide sequence of the polyhedrin gene from the multicapsid baculovirus of *Orgyia pseudotsugata*. *Virology*, 1986, 153: 280~288
- 13 Rohrmann G F. Polyhedrin structure. *J Gen Virol*, 1986, 67: 1499~1503
- 14 Akiyoshi D et al. Cloning and sequencing of the granulin gene from the *Trichoplusia m* granulosis virus. *Virology*, 1985, 141: 328~332
- 15 Hyman R W et al. DNA base sequence homology between coliphages T7 and ϕ I and between T3 and ϕ I as determined by heteroduplex mapping in the electron microscope. *J Mol Biol*, 1973, 77: 189~196
- 16 Thompson J P, Nath J. Elucidation of the β -Genome donor to *Triticum turgidum* by unique- and repeated-sequence DNA hybridization. *Biochem Genet*, 1986, 24(1/2): 39~50
- 17 Latrou K, Witkiewicz H. Polyhedrin gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol*, 1985, 54: 436~445
- 18 冯美珍, 蔡宜权. 斜纹夜蛾核型多角体病毒基因组的物理图谱. 病毒学报, 1990, 6: 56~61

Clone and Partial Nucleotide Sequence of the *Spodoptera litura* Nuclear Polyhedrosis Virus Polyhedrin Gene

Zeng Qing* Long Qingxun Wang Xunzhang Pu Zhelong

Abstract A restriction endonuclease map was determined for the *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus (SINPV) genome. The order of the fragments generated by the enzymes Hind III and Pst I was analysed using double digestion of the total genome and digested of isolated restriction fragments. The location of the polyhedrin gene was then determined using a cloned polyhedrin gene from the *Autographa californica* NPV as a hybridization probe. The SINPV polyhedrin gene was located on Pst I - B/C/D, BamH I - B/C and EcoR I - A/B fragments. A fragment containing this gene was cloned and the partial nucleotide sequence of a 1.0 kb fragment was determined which contained the polyhedrin reading frame or/and some flanking sequences. This gene was demonstrated 64% nucleotide sequence homology to the AcNPV polyhedrin gene and 53.6% ~ 59.6% nucleotide sequence homology to the *Bombyx mori* NPV polyhedrin gene.

Keywords SINPV, polyhedrin gene, restriction enzyme analysis, cloning and sequence analysis

* Research Institute of Entomology, Zhongshan University, Guangzhou 510275