

柞蚕核多角体病毒基因工程载体的研究^{*}

I 柞蚕核多角体病毒DNA限制性内切酶图谱

张秋福^{**} 黄自然

钟文彪

(蚕桑系)

(亚太地区蚕桑培训中心)

提 要

本文研究了柞蚕核多角体病毒的分离、纯化。纯化后的病毒DNA经限制性内切酶 *Pst* I、*Hind* III、*Bam*HI、*Xho* I、*Sal* I、*Eco*R I 及 *Eco*R I + *Bam*HI 等酶解后电泳分别形成 31、25、6、15、24、5 及 7 条区带。据内切酶图谱测算柞蚕核多角体病毒的分子量为 $75.15 \pm 2.3 \times 10^6$ 道尔顿。并比较了柞蚕、蓖麻蚕及家蚕等核多角体病毒的亲缘关系。

关键词 柞蚕；核多角体病毒；限制性内切酶图谱

引 言

1983年,美国Smith及Summers首次用苜蓿丫纹夜蛾 (*Autographa californica*) 核多角体病毒 (Nucleic polyhedrosis virus, NPV) 作载体,通过昆虫细胞培养,表达人的 β -干扰素取得成功^[14]。1985年,日本Maeda(前田)等用家蚕核多角体病毒 (BmNPV) 作载体,在家蚕幼虫体内表达人的 α -干扰素^[12]。近年来利用昆虫杆状病毒载体成功地生产近20种外源基因产物,包括白细胞介素-1及2,类胰岛素生长因子,乙型肝炎疫苗及艾滋病病毒gp₄₁蛋白疫苗等。最近,我国储瑞银等用BmNPV载体表达了肝炎病毒的表面抗原^[11]。

柞蚕 (*Antheraea pernyi*) 是我国重要的蚕业资源,利用柞蚕核多角体病毒 (ApNPV) 作载体,通过柞蚕细胞株或蚕蛹表达外源基因产物,将有深远的理论和实践意义。胡裕文等^[7,8]在ApNPV多角体蛋白基因定位及克隆方面进行了研究。本研究报道了ApNPV DNA的纯化及限制性内切酶图谱的试验结果,为构建基因文库及基因定位提供依据。

• 本文属农业部生物技术专题生04—03课题部分结果。试验中得到梅曼彤副教授、陈凤珍高级实验师及广东省微生物研究所叶玉坤副研究员等大力帮助和指导。河南省云阳蚕业试验场提供柞蚕茧及病毒作材料,均表谢忱。

• • 现在佛山食品公司生化厂

1989年11月8日收稿

材料和方法

(一) 材料

柞蚕蛹及柞蚕核多角体病毒多角体由河南省云阳蚕业试验场提供。

(二) 方法

1. 柞蚕核多角体病毒DNA的纯化。按严家琪等^[12]方法进行。

2. 柞蚕核多角体病毒DNA的限制性内切酶图谱测定, 按 Maniatis 等^[13]的方法进行。DNA酶解后的片段在0.7%琼脂糖凝胶电泳分离, 用时加入 λ DNA + EcoRI及Hind III片段作分子量标志。电压35伏, 电泳时间10小时以上。电泳完毕用0.5 μ g/ml 溴乙锭液染色, 在紫外光下拍照并估算各DNA带的分子量。

结果与讨论

(一) 柞蚕核多角体病毒DNA的纯化

经纯化的 ApNPV DNA, 用紫外分光光度计对波长 200~300nm 范围内的消光值作扫描, 结果见图 1。

从图1中可见, 在260nm处有典型吸收峰, A_{260nm}/A_{280nm} 的比值为 1.9; A_{260nm}/A_{270nm} 为 1.2。在0.7%琼脂糖凝胶电泳的胶板上只出现单一的DNA荧光带。说明本试验纯化的 ApNPV DNA为均一的组分, 纯度达到要求。

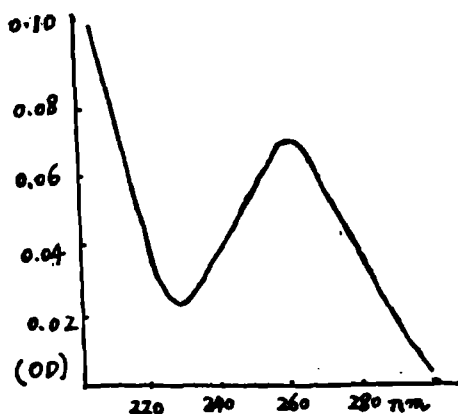


图1 柞蚕核多角体病毒DNA紫外吸收曲线图

(二) 柞蚕核多角体病毒DNA限制性内切酶图谱

ApNPV DNA经限制性内切酶酶解后电泳分离结果见图版 I (略)。根据 λ DNA-Hind III酶切片段分子量标准曲线测得各种限制性内切酶的酶解分子量, 列于表 1。试验结果表明 ApNPV DNA的PstI酶解图谱为31片段, HindIII为25片段, BamHI为6片段, XhoI为12片段, SalI为24片段, EcoRI为5片段以及BamHI+EcoRI为7片段。

用同一种内切酶酶解的DNA片段的分子量总和代表该种酶解的 ApNPV DNA分子量。以6种限制性内切酶解所获得的分子量平均值计算, 则 ApNPV DNA的分子量为 $75.15 \pm 2.30 \times 10^6$ 道尔顿。

柞蚕、蓖麻蚕及家蚕均受相应的核多角体病毒感染。据报道家蚕BmNPV DNA的分子量为 74.7×10^6 道尔顿^[37], 蓖麻蚕PcNPV DNA为 73×10^6 道尔顿^[4] 与本文报道的 ApNPV DNA 75.15×10^6 道尔顿相近似。智再新等^[10]从血清学方面研究了以上三种NPV的亲缘关系, 发现它们之间有某些相同的抗原性, 认为这三种NPV的亲缘是相近的。

表1 ApNPV—DNA的限制性内酶酶切片段 (10°道尔顿)

片段	PStI	HindIII	BamHI	XhoI	SalI	EcoRI	BamHI+EcoRI
A	6.31	10.00	15.86	14.13	11.75	15.00×2	10.47×2
B	5.02	8.91	14.45	12.75	8.13	12.02	9.55×2
C	4.68	7.08	12.59×2	12.29	5.50	10.47×2	7.08
D	4.17	5.89	9.55	11.75	5.01	7.94	5.62×2
E	3.98	4.68	5.25	9.25	4.47	5.01	5.01×2
F	3.55	4.17	3.16	5.45	3.80		3.16
G	3.16	4.17		4.79	3.16		2.69
H	2.95	3.98		2.51	2.51		
I	2.90	2.82		2.21	2.34×2		
J	2.85	2.51		1.74	2.09×2		
K	2.81	2.51		1.25	1.91		
L	2.41×2	2.24		1.20	1.66×2		
M	2.24×2	2.09			1.59		
N	2.05	2.09			1.51		
O	2.00	2.00			1.41		
P	1.91	1.78			1.26×2		
Q	1.78	1.59			1.20×2		
R	1.59	1.48			0.91		
S	1.51×2	1.00×2			0.83		
T	1.32	0.95			0.79		
U	1.26×2	0.85			0.71		
V	1.21	0.63			0.60		
W	1.15	0.51			0.53		
X	1.10	0.47			0.48		
Y	0.97	0.37					
Z	0.83						
a	0.76						
b	0.66						
c	0.56						
d	0.50×2						
e	0.45						
总和	75.29	75.78	73.45	79.32	72.20	75.91	74.23

本研究从以上三种NPV DNA限制性内切酶图谱作比较则发现它们之间有较大的差异, 现将有关资料列于表2。

表2 柞蚕、蓖麻蚕及家蚕被多角体病毒DNA限制性内切酶酶解片段的比较

限制性内切酶	柞蚕ApNPVDNA 片段数	蓖麻蚕PcNPVDNA 片段数	家蚕BmNPVDNA片段数
EcoRI	5	8	21 (1)
BamHI	6	6	7 (1)
PstI	31	25	14 (5)
SalI	24	20	29 (6)
XhoI	12	16	
HindIII	25	18	
EcoRI+BamHI	7	9	17 (1)

括号内数字是引用文献

从表2分析ApNPV及PcNPV之间的相同性较多,如EcoRI, BamHI及EcoRI+BamHI的酶解DNA片段数均较少;而HindⅢ、XhoI、SalI及PstI片段则较多。说明柞蚕、蓖麻蚕等属大蚕蛾科宿主的NPV的结构与属家蚕蛾科宿主的NPV的亲缘关系较远是可以理解的。实践证明这三种NPV对不同的异种宿主是互不感染的。

引用文献

- 〔1〕 马延高等. 病毒学集刊, 1984, 1:212-216
- 〔2〕 严家琪等. 病毒学刊, 1988, 1:133-138
- 〔3〕 李敏棠等. 蚕业科学, 1985, 11(1):52-54
- 〔4〕 李敏棠等. 科学通报, 1981, 22:1391-1396
- 〔5〕 李敏棠等. 昆虫学报, 1986, 29(2):121-125
- 〔6〕 忻纪厚等. 中国科学B辑, 1985, 9:805-810
- 〔7〕 胡裕文等. 病毒学报, 1987, 3(2):156-162
- 〔8〕 胡裕文等. 病毒学报, 1988, 4(1):88-90
- 〔9〕 胡国律等. 病毒学集刊, 1984, 1:144-147
- 〔10〕 智再新等. 病毒学集刊, 1987, 5:235-240
- 〔11〕 储瑞银, 中国科学报, 1989, 7月18日
- 〔12〕 Maeda, S., et. al., 1985, Nature, 315, 592-594.
- 〔13〕 Maniatis, T., et. al., 1982, Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 〔14〕 Smith, G. E., et al., 1983, Mol. Cell Biol., 3:2156-2165

STUDIES ON THE GENETIC ENGINEERING VECTOR, THE
NUCLEIC POLYHEDROSIS VIRUS FROM THE CHINESE OAK

SILKWORM Antheraea pernyi

I. DNA RESTRICTION ENDONUCLEASE PATTERNS OF THE
POLYHEDRIN GENE FROM Antheraea pernyi

Zhang Qiufu Huang Ziran Zhong Wenbiao

(South China Agricultural University)

ABSTRACT

Viral DNA was isolated from the nuclear polyhedrosis virus of the Chinese oak silkworm, Antheraea pernyi. The results of restriction endonuclease digestion revealed that PstI, Hind-III, XhoI, SalI, EcoRI and EcoRI+BamHI cleaved the ApNPV DNA into 31, 25, 6, 15, 24, 5 and 7 fragments, respectively. By lambda DNA fragments as standard, the mean molecular weight of ApNPV DNA obtained by summation of the molecular weights of the fragments was about $75.15 \pm 2.3 \times 10^6$ daltons. Comparison between the DNA of ApNPV and Plisamia cynthia ricini NPV and Bombyx mori NPV.

Key word: Antheraea pernyi, Nuclear polyhedrosis virus, Restriction endonuclease pattern