

柞蚕核多角体病毒基因工程 载体的研究

I 柞蚕核多角体蛋白基因的克隆、定位及部分 DNA 序列分析

庄楚雄

(实验中心遗传工程研究室)

张秋福^{**} 钟文彪 黄自然

(蚕桑系)

摘要 本文报道了柞蚕核型多角体病毒 (*Antheraea pernyi* Nuclear Polyhedrosis Virus, ApNPV) DNA 的分离、纯化, ApNPV DNA 用限制性内切酶 PstI、BamHI 酶解分别出现 31、6 个片段, 用 Southern 转印杂交确定了核多角蛋白基因的大部分序列存在于 BamHI-E 及 PstI-C 片段上, 其大小分别为 7.8 Kb 和 6.7 Kb, PstI-C 片段经 BamHI 酶解后出现大小为 4.0 Kb 和 2.6 Kb 的两个片段, 将这两个片段克隆于 Bluescript 质粒中, 并分析了 4.0 Kb 片段其 PstI 端的部分 DNA 序列。

关键词 柞蚕核型多角体病毒; 基因定位; 基因克隆; 碱基序列分析

核型多角体病毒 (Nuclear Polyhedrosis Virus 简称 NPV) 其多角体蛋白基因是病毒晚期表达的基因中表达程度最高的基因之一, 它具有一个很强的启动子及调控序列。目前, 已先后测定了苜蓿银纹晚蛾 (*Autographa californica*, AC)^[10]、家蚕 (*Bombyx mori*, Bm)^[15]、柞蚕 (*Antheraea pernyi*, Ap)^[9,9] 等昆虫核型多角体病毒的多角体蛋白基因及其调控部分的核苷酸顺序, 为组建柞蚕核多角体蛋白基因工程载体提供了有益的资料。

国内昆虫核多角体病毒的分子生物学方面的研究也有一定的进展。对家蚕 BmNPV、蓖麻蚕 (*Philosamia cyonhia ricini*) PcNPV 及柞蚕 ApNPV 等病毒 DNA 进行了限制性内切酶酶谱分析^[2,3,6]。建立了 BmNPV 的基因文库^[1], 并确定了多角体蛋白基因的位置^[1]及其 DNA 的全序列^[7], 已在家蚕细胞株及蚕体内表达了乙型肝炎表面抗原^[11]。蒋明浩等组建了 AcNPV 的新载体^[10], 忻纪厚等^[8]及庞义等^[4]在昆虫细胞中用杆状病毒载体成功地表达了半乳糖苷酶基因的产物。

本文对柞蚕 NPV 核多角体蛋白基因进行了定位和克隆, 并测定了部分核苷酸序列, 为组建柞蚕 NPV 表达载体作准备。

• 本实验为农业部生物技术专题, 04-03 课题的部分研究内容。 •

•• 现在佛山市食品发展公司生化工厂工作

1989 年 11 月 8 日收稿

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 柞蚕蛹及柞蚕核多角体病毒由河南云阳蚕业试验场提供。

1.1.2 载体质粒和受体菌分别为 Bluescript (Bs) 质粒和大肠杆菌 DH5。

1.1.3 主要酶及试剂盒 PstI、BamHI、Hind III 均为 Biolab 产品, T4DNA 连接酶为华美产品, 缺口翻译系统及 DNA 序列分析系统为 Amersham 产品, 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I (Klenow) 为华美产品。

1.1.4 同位素 α -³²P-dATP、 α -³²P-dCTP 为 Amersham 产品。

1.2 方法

1.2.1 ApNPV-DNA 的纯化 按李敏棠^[3]的方法略加修改进行。

1.2.2 柞蚕 NPV 多角体蛋白基因的定位 柞蚕 NPV-DNA 分别经 PstI、BamHI 酶解后, 在 0.8% 琼脂糖凝胶中 80 伏电泳 6 h, 按 Southern 法^[10]将凝胶上 DNA 转移到硝酸纤维素膜上。杂交时, 探针 DNA 分别为 AcNPV-DNA 的 Hind III V、F 片段, 探针标记按 Riby 法^[17]进行。

1.2.3 柞蚕 NPV 多角体蛋白基因的克隆 (1) 目的 DNA 的回收。含多角体蛋白基因的 ApNPV-DNA 的 PstI-C 片段按冻融法进行回收。(2) 目的 DNA 的克隆。回收的 PstI-C 片段经 BamHI 酶解后, 与质粒 Bluescript 连接, 按 Maniatis 的方法^[18]转化到大肠杆菌 DH5 中。(3) 重组质粒的鉴定和分析, 从含有氨苄青霉素的麦康凯琼脂培养基上筛选阳性菌落, 按碱裂解法^[13]提取质粒, 纯化后进行酶切分析。

1.2.4 ApNPV-DNA 序列分析 以纯化的双链重组质粒 Bluescript 作模板, 按质粒碱变性法^[12,13]进行 DNA 序列分析。

2 结果和分析

2.1 柞蚕核多角体病毒多角体蛋白基因的定位

纯化的 ApNPV-DNA 经 PstI 和 BamHI 酶切后, 电泳, 分别有 31 条和 6 条电泳区带, 按片段大小分别编号为 A、B、C、D……等。用 AcNPV-DNA 的 Hind III-V 片段作 Southern 转印杂交, 结果 PstI-C (6.7 kp) 及 BamHI-E (7.8 kp) 为阳性杂交片段。进而用 AcNPV-DNA 的 Hind III-F 片段作 Southern 转印杂交, 结果 BamHI-D (15 kb) 和 PstI-C (6.7 kb) 均为阳性杂交片段。因为 AcNPV-DNA 的 Hind III-V 片段含有大部分多角体蛋白基因的结构序列, 而 Hind III-F 片段含有多角体蛋白基因的调控序列和少部分结构序列。Southern 转印杂交的结果说明 ApNPV 多角体蛋白基因的全序列包含在 PstI-C 片段上, 而 BamHI-D 亦含有多角体蛋白基因的调控序列, 但 BamHI-E 只含有多角体蛋白基因的结构序列。

2.2 多角体蛋白基因的克隆与鉴定

回收的 ApNPV-DNA 的 PstI-C 片段经 BamHI 酶解后, 产生两个片段, 并与 PstI 及 BamHI 双酶解的 Bluescript 质粒重组, 转化于 DH5 中, 经筛选、抽提重组质粒进行酶

解分析,表明外源插入片段大小分别为 4.0 kb 和 2.7 kb,两者总长与 PstI—C (6.7 kb) 相符,说明 ApNPV—DNA 多角体蛋白基因初步克隆成功。

2.3 多角体蛋白基因的核苷酸序列分析

以含有 4.0 kb 插入片段的重组质粒作为测序模板,进行碱基序列分析,测得插入片段从 PstI 切口开始,沿 5'→3'的 124 个碱基序列。结果见图 1。

```

          40          10          20          30
5' GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGAACAGT ATTTGGTATC
          50          60          70          80
   TAGCAGCTCT  GCTTGAACC  AGTTACCTTC GGAAAAAGAG
          90         100         110         120
   TTGGTAAGCT  CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA
   GCGG . . . . . 3'
  
```

图1 核苷酸序列分析的结果

3 讨 论

昆虫核多角体病毒 NPV 其多角体蛋白基因的编码是非常保守的。目前,已报道的 AcNPV、BmNPV、OpNPV (*Orygia pseudotsugata* NPV, 黄杉毒蛾 NPV)、及 ApNPV 的多角体蛋白结构基因的同源性比较,与 ApNPV 的同源率分别为 77.5%、84%及 80%。因而可用已知的多角体蛋白基因片段探找未知的多角体蛋白基因片段。本实验采用 ApNPV—DNA 的 Hind III—V 片段及 Hind III—F 片段作探针,V 片段是多角体蛋白基因从 +250 bp 开始的 3'端片段,包括大部分多角体蛋白基因的结构序列^[18];F 片段是多角体蛋白基因从 +250 bp 开始的 5'端片段,包括小部分多角体蛋白基因的结构序列及整个的起始及调控部分^[18]。根据 Southern 转印杂交的结果证明 BamHID、E 分别包含有调控序列和结构序列,而 PstI—C 片段含有多角体蛋白基因的全序列。经进一步酶切分析表明,多角体蛋白基因的位置及其附近的酶切位点如图 2 所示。

今后,在构建 ApNPV 表达载体的研究中,应利用核酸 Bal 31 从 BamHI 切点一端逐个地降解,尽可能除去多角体蛋白基因起始密码 ATG 以后的序列,保持 5'端的完整性。通过酶解终止时间的选择得到一系列与启动子距离不同的片段,用 DNA 聚合酶 I 大片段修平末端,接上一个多聚接头及一段多角体基因 3'端非编码区序列,即可建成一系列转运载体系统。

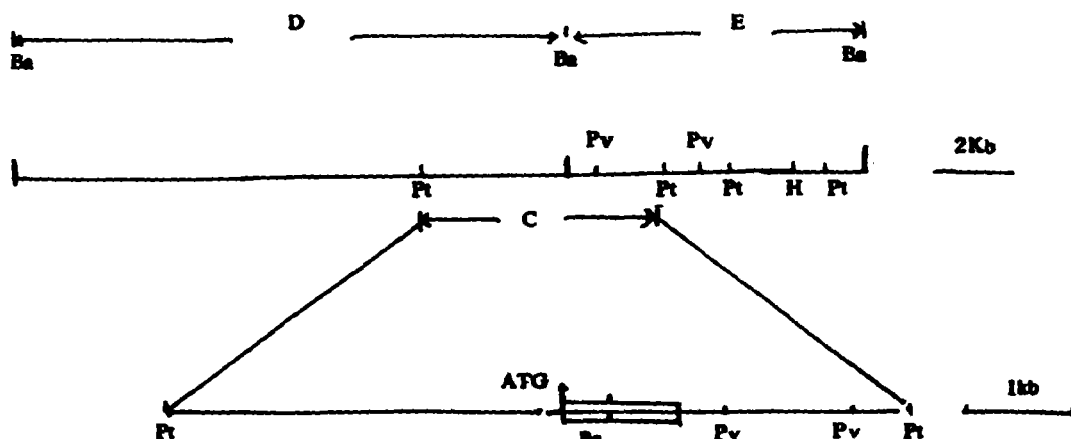


图2 作蚕核多角体蛋白基因酶切位点示意图

D: ApNPV DNA BamHI-D 片段; E: ApNPV DNA BamHI-E 片段; C: ApNPV DNA PstI-C 片段; Pt: PstI; Ba: BamHI; Pv: PvuII; H: HindIII.
方框示多角体蛋白基因, ATG 为起始密码。

参 考 文 献

- 1 王珩, 忻纪厚, 顾慈治, 李载平. 中国科学 (B 辑), 1985 (3): 245~251
- 2 李敏棠, 戴培梓, 忻纪厚, 李载平, 黄可威, 陆有华. 蚕业科学, 1985, 11 (1): 52~54
- 3 李敏棠, 戴培梓, 李载平, 黄可威, 陆有华. 科学通报, 1981, (22): 191~1396
- 4 庞义, 谢伟东, 龙警新, 陈其津, 王南章, 蒋登龙. 中山大学学报, 1987 (2): 104~106
- 5 忻纪厚, 李敏棠, 杨冠珍, 蒋明浩. 生物化学与生物物理学报, 1987, 19 (1): 75~77
- 6 陈稼华等. 病毒学报, 1987, 3 (3): 35~38
- 7 周金寿, 甘人宝, 李敏棠, 李载平, 忻纪厚. 生物化学与生物物理学报, 1988, 20 (5): 486~491
- 8 胡裕文, 范琦, 张春发, 侯云德, 李广泽. 病毒学报, 1987, 3 (2): 156~162
- 9 胡裕文, 范琦, 张春发, 侯云德, 李广泽. 病毒学报, 1988, 4 (1): 88~90
- 10 蒋明浩, 杨冠珍, 李敏棠, 干科达, 忻纪厚. 生物工程学报, 1988, 4 (2): 98~103
- 11 储瑞银. 中国科学报, 1989-07-18
- 12 Haltiner, M., Kempe, T., Nucleic Acid Res. 1985, 13 (3): 1015
- 13 Hattori, M., Sakaki, Y., Anal. Biochem. 1986, 152: 232
- 14 Ish-Horowitz, D., Burke, J.F., Nucleic Acid Res. 1981, 9: 2989
- 15 Maeda, S., Gene, 1987, 22: 356
- 16 Maniatis, T., et al., Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 167~169
- 17 Rigby, P.W.J., Rhodes, D.C., Berg, P., J. Mol. Biol. 1977, 113: 237
- 18 Smith, G.E., Summers, M.D., Mol. Cell Biol. 1983, 3: 2156
- 19 Southern, E., J. Mol. Biol. 1975, 98: 503

CLONING AND SEQUENCING OF POLYHEDRIN GENE OF *Antheraea pernyi*
NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS

Zhuang Chuxiong Zhang Qiufu Zhong Wenbiao Huang Ziran

(South China Agricultural University)

Abstract Viral DNA was extracted from the nuclear polyhedrosis virus (NPV) of the Chinese oak silkworm (*Antheraea pernyi*) and digested with restriction endonucleases PstI and BamHI; 31 and 6 restriction fragments were obtained, respectively.

It was determined that the polyhedrin gene was located on the BamHI—E and PstI—C restriction fragments of ApNPV DNA by Southern hybridization with AcNPV polyhedrin gene fragment (HindIII—V restriction fragment of AcNPV) as DNA probe. The sizes of BamHI—C and PstI—C restriction fragments were 7.8 kb and 6.7 kb, respectively.

After digestion with BamHI, the 6.7 kb PstI—C restriction fragment produced two fragments of 4.0 and 2.7 kb. The two restriction fragment were recombined with Bluescript plasmid and used to transform *E. coli* DH5. One of the resulting recombined plasmids containing the 4.0 kb restriction fragment was sequenced, a 124 bp DNA sequence of PstI—C restriction fragment was determined.

Key Words Chinese oak silkworm; *Antheraea pernyi*; Nuclear polyhedrosis virus; gene cloning