中 国 科 学
1984 年 9 月　　B 辑　　第 9 期

家蚕核多角体病毒基因库

忻纪厚　顾懋治　李敏棠　李载平
（中国科学院上海生物化学研究所）

摘　　要

本文报道家蚕核多角体病毒基因组 DNA 经限制性内切酶 SalI 酶解，琼脂糖凝胶电泳分离，得 0.70 至 10.0 kb 大小不同的 29 种片段．所得 DNA 片段与 SalI 酶解之质粒 pBR 322 DNA 进行体外重组后，经转化大肠杆菌 HB 101 菌株，获得带重组质粒克隆株．根据重组质粒 DNA 中 SalI 酶插入片段的分子量、Southern 法 DNA 杂交及多种限制性内切酶酶切点等方法鉴定，证明已将家蚕核多角体病毒 DNA 的 24 种不同大小的片段克隆在质粒 pBR 322 中．克隆的 DNA 片段总长度占病毒基因组 DNA 的百分之八十．

家蚕核多角体病毒（*Bombyx moni Nuclear Polyhedrosis* Virus），简称 BmNPV，属于昆虫杆状病毒．它是家蚕血液型脓病的病原体．这个病毒的基因组 DNA 之所以引人兴趣，不仅是为了应用的目的，如探求更有效的途径来防治这种蚕病，或是希望用昆虫杆状病毒作为一种生物防治杀虫剂．而且随着近年来分子遗传学的发展和 DNA 体外重组研究技术的进步，基因组大小在 100kb 以上的昆虫杆状病毒 DNA 已成为研究病毒基因组结构和真核基因表达调控的极好系统．对这些病毒基因组的结构和功能的深入了解，也将为把它们发展成为一种真核生物病毒运载体铺平道路．

文献中报道的昆虫杆状病毒已有四、五百种之多，但仅对少数几种有过较深入的分子遗传学方面的研究报道，主要研究集中在苜蓿尺蠖多角体病毒（Antographa californica）上．家蚕核多角体病毒 DNA 来源丰富，制备方便．人们对此病毒 DNA 的物理化学性质有所了解．对其基因组也进行过电子显微镜观察和酶切图谱分析[1]．为了进一步构作该病毒基因组的物理图谱和遗传图谱，研究病毒基因的表达和调控，建立该病毒的基因库是非常必要的．本文报道该病毒 DNA 限制酶 SalI 酶解片段在大肠杆菌质粒 pBR 322 中克隆的结果．

一、材料和方法

1. 培养基与试剂

L 培养基　每升含量蛋白胨 10g（Daigo 产品），酵母粉 5g（Difco 产品），氯化钠 5g，pH7.3.

L-固体琼脂培养基　同 L 培养基，每升另加 15g 琼脂粉．

本文 1983 年 4 月 21 日收到，1983 年 9 月 5 日收到修改稿．

抗菌素 四环素(TC)为上海第三制药厂出品，氨基苄青霉素(Amp)为上海第四制药厂出品；氯霉素为上海医药公司出品.

酶 限制性内切酶 SalI，BamHI，EcoRI 及 T_4DNA 连接酶由本室酶组提供；DNA 聚合酶 I 为 Boehriger 产品；牛胰 RNaseA，DNaseI 为 Sigma 产品.

其它 牛血清白蛋白、聚乙烯吡咯烷酮为 Sigma 产品；小牛胸腺 DNA 为上海牛奶公司产品，经水中溶涨，超声波切割，用酚抽提 1 次后备用，X 光胶片为上海 X 光胶片厂 II 型产品；增感屏为上海医疗器械电镀厂产品；硝酸纤维素膜为 Schleicher d Schiill 产品.

TE 缓冲液 10m*M* Tris-1m*M* EDTA，pH8.0.

2. 菌株，感受态菌的制备、DNA 离体重组和重组质粒的转化

用大肠杆菌 HB 101 株作为重组质粒 DNA 转化的受体菌. 受体菌生长在 L 培养基中. 收集菌体后，感受态菌按略加修改的 Dagert 方法[2]获得. 菌体悬浮于冰冷的 0.1 *M* 氯化钙溶液中，新鲜即使用. 或者加入十分之一体积的消毒甘油于上述悬浮之菌体中，— 70℃ 保存备用. 在此条件下，受体菌至少可以保存 5 个月.

DNA 离体重组和质粒转化按本实验室已发表方法略加修改进行[3]. 转化的样品与每 ml 含 25μg Amp 的 0.7% 顶层琼脂混合后，铺在每 ml 含 50μg Amp 的 L-固体琼脂培养基平板上，37℃ 培养过夜. 生长的菌落再在含药平板上筛选一次，选出抗 Amp，而对 TC 敏感的菌落，供 DNA 抽提鉴定用.

3. BmNPV病毒、病毒 DNA 及病毒 DNA 片段的制备

含 BmNPV 病毒的血淋巴由中国农业科学院蚕业研究所黄可威同志提供. 接种 BmNPV 之蚕种为苏三、秋三×苏四种.

病毒 DNA 基本按本实验室已发表之方法制备[1]. 再进一步用 Sepharose 2B 除去病毒 DNA 中的 RNA，加入少量氯仿至 DNA 样品，4℃ 保存备用.

以过量限制酶 SalI 在标准条件下完全酶解病毒 DNA，用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分离酶解片段，用 DE81 纸片法[4]按需要分段制备所需大小之 DNA 片段.

4. 重组质粒 DNA 的制备；DNA 电泳

按 H. C. Birnboim 和 Doly 方法制备质粒 DNA[5].

琼脂糖凝胶电泳液含 40m*M* Tris，20m*M* 醋酸钠，2m*M* EDTA，pH7.8. 电泳在水平潜水式电泳槽中进行.

5. BmNPV DNA 缺口翻译标记，Southern 转移和膜上 DNA-DNA 杂交

标记主要按 Risby 等人方法[6]. 反应系统中用一个 $\alpha[^{32}P]$-脱氧胞嘧啶核苷三磷酸标记物 15μCu (10mCi/ml; 800Ci/mg 分子). 标记的 ^{32}P-BmNPV DNA 的放射性比度在 2.5×10^7cpm/μg DNA 左右.

筛选所得重组质粒 DNA 经限制酶 SalI 水解之后，在琼脂糖凝胶中电泳展开. 电泳后凝胶中的 DNA 片段按 Southern 方法[7]转移至硝酸纤维素滤膜上. 滤膜上的 DNA 与标记探针的杂交按 Gergen 等人的方法进行[8].

二、结果与讨论

1. 病毒 DNA 限制性内切酶 SalI 酶酶解图谱

用 10 倍于 DNA μg 数的单位酶量，充分酶解 BmNPV DNA，分别在 0.7% 或 1.5% 二种浓度的琼脂糖凝胶电泳中可清楚地分出 29 条带（图 1）. 它们分别以符号 S_1—S_{29} 代表. 以条带的荧光强度和宽度判断，其中 S_{10}，S_{20}，S_{23}，S_{24}，S_{28} 和 S_{29} 含量大于一分子当量. 它可能包含二个或二个以上相同大小的片段，也可能由于一种片段在病毒 DNA 分子中重复出现. 因为，虽然昆虫杆状病毒基因组根据 DNA 复性动力学的测定，大部分是单一顺序[9]，但是从 Southern 杂交结果发现，某些片段之间有同源性[10]. 以 λ-DNA 的 HindIII 酶解片段和质粒 pBR322 DNA 的 Hinf I 酶解片段为分子量标准，根据片段的电泳迁移率，推算出各片段大小，结果见表 1. 其最小片段为 0.7kb，最大为 10.0kb. 其总和为 112.70kb. 结果与用其它限制酶酶解结果的平均值基本相同[1].

表 1　家蚕核多角体病毒 DNA SalI 酶解片段及其重组质粒

片段编号	片段大小(kb)	重 组 质 粒	克隆株数目
S_1	10.0	pBN 102	2
S_2	9.5	—	0
S_3	8.5	pBN 42	6
S_4	8.3	pBN 118	2
S_5	7.1	pBN 94	7
S_6	6.75	pBN 62	4
S_7	5.9	pBN 6	8
S_8	4.9	pBN 106	1
S_9	4.6	pBN 113	2
S_{10}	3.5(2)	pBN 24	5[1]
S_{11}	2.9	pBN 11	2
S_{12}	2.75	—	0
S_{13}	2.65	pBN 8	1
S_{14}	2.55	—	0
S_{15}	2.25	pBN 22	3
S_{16}	2.2	pBN 59	6
S_{17}	2.05	—	0
S_{18}	1.95	pBN 1	1
S_{19}	1.90	—	0
S_{20}	1.85(2)	pBN 21	1
S_{21}	1.6	pBN 57	1
S_{22}	1.5	pBN 64	1
S_{23}	1.4(2)	pBN 61，pBN 60[2]	4
S_{24}	1.25(2)	pBN 46	1
S_{25}	1.15	pBN 7	2
S_{26}	1.05	—	0
S_{27}	0.85	pBN 49	2
S_{28}	0.80(3)	pBN 56，pBN 43[2]	3
S_{29}	0.70(2)	—	0
总　和	112.70kb	88.40kb	

1) 5 个克隆株的重组质粒上的 EcoRI，BamHI 切点相同. 在片段总和统计中按二种计算.

2) pBN 60 插入片段中有一个 EcoRI 切点，而 pBN 61 插入片段中没有 EcoRI 切点. pBN 56 插入片段中有一个 BamHI 切点，而 pBN 43 插入片段中，没有 BamHI 切点. 统计中按三种计算.

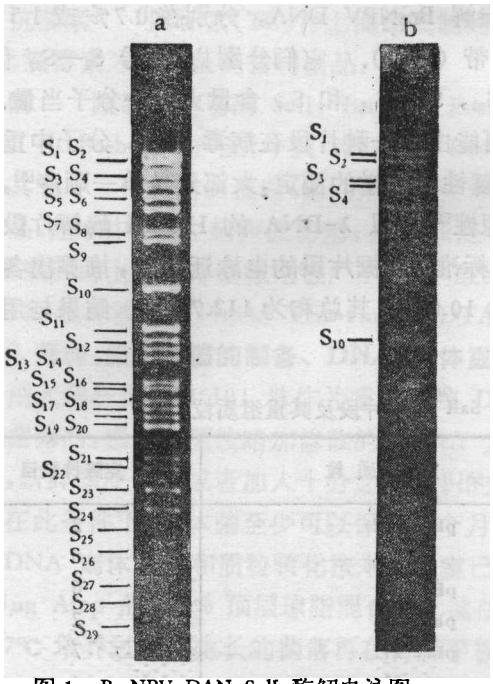

图 1 BmNPV DAN SalI 酶解电泳图
(a. 1.5% 琼脂糖凝胶; b. 0.7% 琼脂糖凝胶)

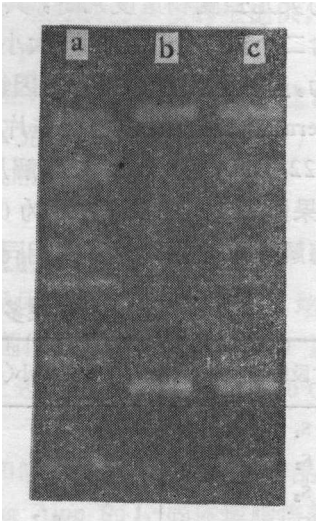

图 2 重组质粒 pBN 102 DNA 凝胶电泳图
(0.7% 琼脂糖凝胶. a. BmNPV DNA 的 SalI 酶解产物, 片段 S_1—S_{10}; b. pBN 102 DNA 的 SalI 酶解产物; c. 1 和 2 样品之混合物)

2. 病毒 DNA SalI 酶解片段克隆

用 SalI 酶解 BmNPV DNA 产生的 DNA 片段的完全混合物 (12μg/ml) 与 SalI 酶解质粒 pBR322 (3.6μg/ml) 进行离体重组,经抗生素筛选后,随机挑选出 68 个对四环素敏感而抗氨基苄青霉素的重组子,用快速碱性抽提法提取重组质粒 DNA, 经 SalI 酶解鉴定,其中 34 个质粒 DNA 中含有琼脂糖凝胶电泳中可见到的 SalI 酶插入片段. 从插入片段大小的统计结果看到,大部分克隆包含 4.6kb 以下的片段,而三分之二的大于 4.6kb 的片段没有被克隆. 产生这种结果的原因,一方面是由于大片段在总片段中占比例较少所致,另一方面也由于大片段被克隆的效率显然低于小片段的缘故,鉴于这种情况,为了能克隆更多种的大片段,我们进一步用 DE 81 纸片法从琼脂糖上分段纯化了 3.5 kb 以上的 DNA 片段(分为 S_1—S_4, S_4—S_{11} 或 S_1—S_{10} 三组),再将分段的大片段 DNA 混合物与质粒 pBR322 DNA 实行离体重组,经转化、筛选和酶切等步骤,又鉴定了 39 个重组子,其中除了 2 个重组子无 SalI 酶插入片段、一个重组子含 1kb 的 SalI 酶插入片段外,36 个重组子所含的 SalI 酶插入片段都大于 3.5kb. 其中包括 3.5kb 以上的 11 种片段中的 10 种片段, 仅剩 9.5kb S_2 片段没有被克隆. 从被克隆的片段种类的数量分布上看到(表 1),在同样实验条件下,随机挑选的重组子中,所包含的某种插入片段,多的可重复出现 8 次(S_7),而少至仅出现一次或零次(如 S_8 和 S_2). 已有实验证明[11], 环化的质粒 DNA 分子转化效率远大于同种的线性质粒分子的转化效率. 理论上就可以按被克隆片段的大小推算出最适环化反应浓度的条件[12]. 但从上述实验结果看来, DNA 片段被克隆的效率不仅只和片段大小这一因素有关, 其因素是复杂的. 在克隆其他昆虫核多角体病毒时,也有个别片段难以被克隆的情况发生[13].

3. 重组质粒 DNA 的鉴定

对筛选到的重组质粒 DNA 采用 3 种方法进行分类和鉴定，以确证它们是否真正包含来自病毒 DNA 的各种片段.

插入片段大小的检测　　用 SalI 酶酶解重组质粒 DNA，用琼脂糖凝胶电泳检查是否包含非质粒运载体的插入片段. 如果有 SalI 酶插入片段，则以 BmNPV DNA SalI 酶酶解片段为标准，电泳比较插入片段的大小. 由于被克隆的 DNA 片段种类繁多，有些片段大小很接近，造成判断插入片段归属之困难. 我们将一份适量的重组质粒 DNA 酶解样品与病毒 DNA 酶解样品混合后，同时走电泳展开 DNA 片段. 然后从特定条带荧光强度的增加就可准确地确定该插入片段的归属. 图 2 给出确定 S_1 插入片段归属的电泳结果. 图 3 是不同重组质粒 DNA 酶解产物混合物的电泳图谱，它完全再现了对应的一条病毒 DNA SalI 酶解片段的电泳图谱. 用这样的方法，从分子大小上确定了重组质粒 DNA 中所含插入的病毒 DNA 片段的所属.

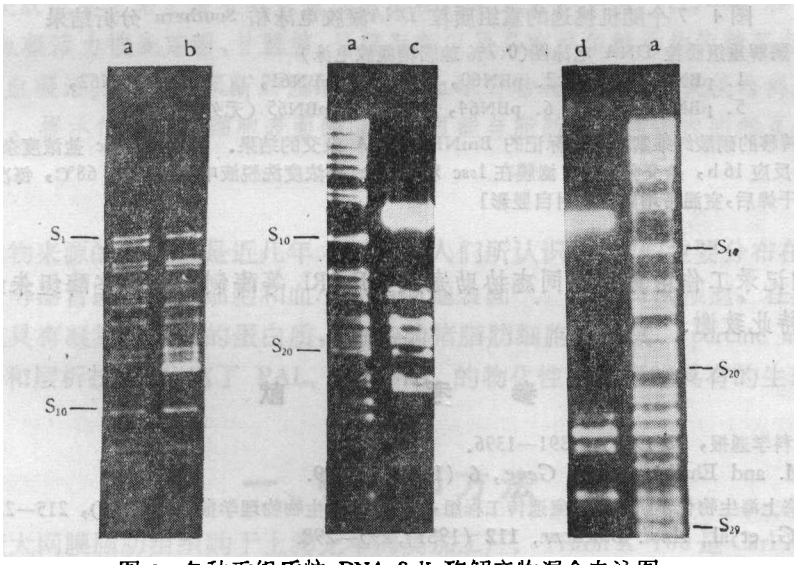

图 3　各种重组质粒 DNA SalI 酶解产物混合电泳图

(0.7% 琼脂糖凝胶. a. BmNPV DNA SalI 酶酶解产物. b. 对应表 1 中 S_1，S_3—S_{11} 10 个重组质粒的 DNA SalI 酶解产物混合物. c. 对应表 1 中 S_{13}，S_{15}—S_{16}，S_{18}，S_{20}—S_{22} 9 个重组质粒的 DNA SalI 酶解产物混合物. d. 对应表 1 中 S_{23}—S_{25}，S_{27}，S_{28} 5 个重组质粒的 DNA SalI 酶解产物混合物)

杂交检测　　用 ^{32}P 缺口翻译标记的病毒 DNA 作探针与转移在硝酸纤维素滤膜上的 SalI 酶解得到的各个重组质粒的插入片段杂交. 图 4 给出重组质粒 pBN59 至 pBN61 的结果作为例子. 结果表明，绝大多数插入片段与探针杂交都显正结果.

酶切检测　　如结果与讨论中所述，以条带的荧光强度和宽度判断，S_{10} 等 6 种大小的片段，其含量大于一分子当量. 当这些片段被克隆时，就有可能得到插入片段大小相同、与同位素标记的病毒 DNA 探针杂交结果为正的两种或两种以上的不同种克隆. 当我们用 EcoRI，BamHI 等限制酶酶解归属 S_{23} 和 S_{28} 的克隆 DNA 时，的确发现这些酶的切点在某些克隆间有差异. 我们将有差异的克隆列为不同种的病毒片段的克隆.

经上述 3 种方法鉴定表明，我们至少已将 24 种不同大小的家蚕核多角体病毒 DNA 片段克隆在质粒 pBR322 中，克隆的 DNA 片段总和占病毒基因组的百分之八十左右.

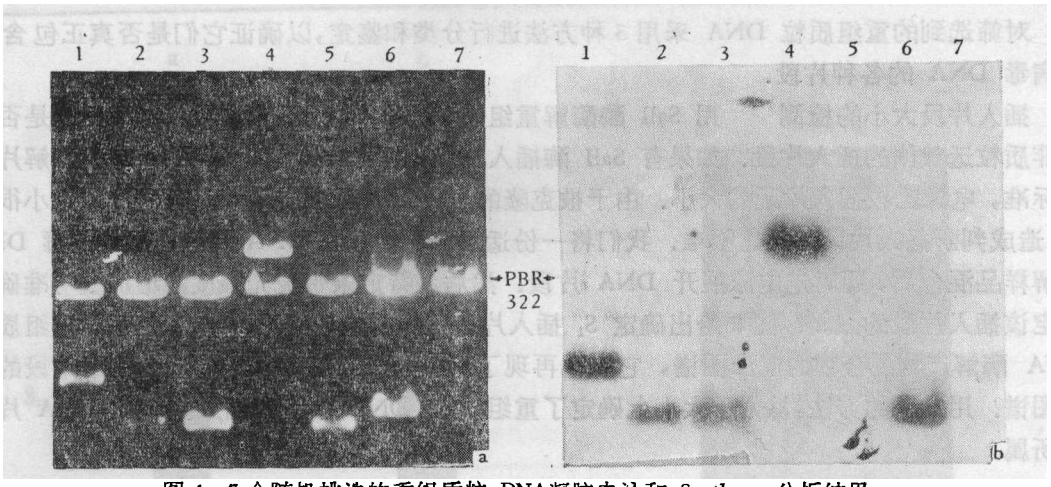

图 4 7 个随机挑选的重组质粒 DNA凝胶电泳和 Southern 分析结果

[a. SalI 酶解重组质粒 DNA 电泳图(0.7% 琼脂糖凝胶电泳)
1. pBN59, 2. pBN60, 3. pBN61, 4. pBN62,
5. pBN63, 6. pBN64, 7. pBN65 (无外源片段)

b. a 图转移的硝酸纤维素滤膜与标记的 BmNPN DNA 杂交的结果. 条件在 4ssc 盐浓度杂交液中, 68℃ 反应 16 h, 杂交完毕后, 滤膜在 1ssc 和 0.1ssc 盐浓度洗脱液中各洗三次, 68℃, 每次 30min. 滤膜干燥后, 室温带增感屏放射自显影]

本文照相记录工作由戴培棣同志协助完成, EcoRI 等酶制剂由本室酶组朱绳祖、陆惠芬等同志提供, 特此致谢.

参 考 文 献

[1] 李敏棠等, 科学通报, **22**(1981), 1391—1396.
[2] Dagert, M. and Ehrlich, S. D., *Gene.*, **6** (1976), 23—29.
[3] 中国科学院上海生物化学研究所七室遗传工程组, 生物化学与生物物理学报, **11**(1979), 215—222.
[4] Dretzen, G. et al., *Anal. Biochem.*, **112** (1981), 295—298.
[5] Birnboim, H. C. et al., *Nucleic Acids Res.*, **7** (1979), 1513—1523.
[6] Rigby, P. W. J. et al., *J. Mol. Biol.*, **113** (1977), 237—251.
[7] Southern, E. M., *ibid.*, **98** (1975), 503—517.
[8] Gergen, J. P. et al., *Nucleic Acids Res.*, **7** (1980), 2115—2136.
[9] Rohrmann, G. F., *Virology*, **83** (1978), 213—217.
[10] Cochran, M. A. et al., *J. Virol.*, **41** (1982), 940—946.
[11] Cohen S. N., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70** (1973), 3240.
[12] Dugaiczyk, A. et al., *J. Mol. Biol.*, **96** (1975), 174—184.
[13] Lubbert, H .et al., *Gene.*, **16** (1981), 343—345.