

蜀柏毒蛾核型多角体病毒基因文库的构建及几丁质酶基因的定位

赵小东¹, 周建华², 丁清泉^{1*}

(1. 中国科学武汉病毒研究所, 湖北武汉 430071; 2. 四川省林业科学院, 四川成都 610081)

Construction of Gene Library and Localization of Chitinase
Gene of *Parocneria orientalis* Nuclear polyhedrovirusZHAO Xiao-Dong¹, ZHOU Jian-hua², DING Qing-quan^{1**}

(1. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;

2. Sichuan Academy of Forest, Chengdu 610081, China)

Abstract: The gene library of *Parocneria orientalis* nuclear polyhedrovirus (PaorNPV) was partly constructed by cloning some fragments of *Bam*H I and *Eco*R I of PaorNPV genomic DNA into pGEM3Z(-) as a vector. Using the chitinase gene of *Hea*SNPV probed with [α -³²P]dCTP, the chitinase gene of PaorNPV was localized on the fragments of *Bam*H I-D, *Eco*R I-A, *Hind* III-A, *Pst* I-D and *Xho* I-G/H respectively. At the same time, the fragment of *Bam*H I-D containing the *chiA* has been cloned.

Key words: *Parocneria orientalis* nuclear polyhedrovirus; Gene library; Chitinase gene; Gene localization

关键词: 蜀柏毒蛾核型多角体病毒; 基因文库; 几丁质酶基因; 基因定位

中图分类号: S433.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)03-0286-03

蜀柏毒蛾 (*Parocneria orientalis* Chao) 是柏木、桧柏、干头柏等柏科树种的重要食叶害虫^[1], 到目前为止仅存在于我国。蜀柏毒蛾核型多角体病毒 (*Parocneria orientalis* nuclear polyhedrovirus, PaorNPV)^[2] 于 1991 年被分离, 该病毒对蜀柏毒蛾幼虫具有较强毒力, 已作为一种新型的生物农药初步应用于柏木林区害虫的防治上^[3]。对这种病毒已进行了一些研究, 包括生物活性测定, 形态结构, 理化特性, 限制性内切酶分析^[4,5]。为了进一步研究其分子生物学特性, 开发我国这种特有的病毒资源, 我们构建了部分 PaorNPV 基因组 DNA 片段的基因文库, 同时以中国棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒 (*Hea*SNPV) 几丁质酶基因作探针, 对 PaorNPV 几丁质酶基因进行了定位, 结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 病毒

蜀柏毒蛾核型多角体病毒 (ProNPV) 由四川省林业科学院提供。

1.2 质粒与菌株

质粒 pGEM-3Z(-) 和 DH5 α 为本室保存; 质粒 pCXW125 由本所陈新文教授惠赠, pCXW125 含有完整的 *Hea*SNPV *chiA* 基因。

1.3 病毒多角体及 DNA 的制备

参照文献^[6]进行。

1.4 病毒基因文库的构建

限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 购自华美生物工程公司, T4DNA 连接酶购自 TakaRa 公司。文库构建

收稿日期: 2000-08-25, 修回日期: 2000-12-07

作者简介: 赵小东 (1972-), 男, 湖北黄冈籍。从事分子病毒学研究, 现为预防医学科学院博士生。

** 通讯作者: 丁清泉 (1951-), 男, 湖北鄂州籍, 研究员, 从事分子病毒学研究。Correspondence author.

及鉴定方法参见文献^[7]进行。

1.5 DNA 酶切与电泳

限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III、*Pst* I 和 *Xho* I 为华美公司产品,琼脂糖凝胶浓度为 0.7%,缓冲液为 1×TAE(pH8.0),酶切、电泳方法参见文献^[8]进行。

1.6 PaorNPV 几丁质酶基因的杂交定位

Taq DNA 聚合酶购自上海生工公司,缺口平移标记试剂盒购自华美生物工程公司,PCR 引物由本所彭辉银教授惠赠。PaorNPV DNA 经 *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III、*Pst* I 和 *Xho* I 消化后从琼脂糖凝胶转移至硝酸纤维素滤膜。以 pCXWI25 为模板,PCR 扩增 HearSNPV *chi*A 基因。通过缺口平移试剂盒(Nick translation kit)对 PCR 扩增产物进行 [α -³²P]dCTP 标记,探针制备按试剂盒说明书进行。标记的 DNA 通过 Sephadex G-50 柱层析纯化。杂交按文献^[9]方法进行。

2 结果与讨论

2.1 基因组质粒文库

通过鸟枪法将 PaorNPV 基因组 DNA *Bam*H I 酶切片段中的 D、E、F、G、H、I 片段, *Eco*R I 酶切片段中的 C、D、E、F、G、H、I、J、K、L 片段克隆于质粒载体 pGEM-3Z(f-)中,结果见图 1 和图 2。该质粒文库的构建有利于各克隆片段的序列分析,为 PaorNPV 物理图谱的构建提供了基础。



图1 重组质粒的 *Bam*H I 酶切分析

Fig.1 Restriction analysis of *Bam*H I clone

1. PaorNPV DNA/*Bam*H I; 2~7, Digested recombinant plasmids with *Bam*H I; 8. pGEM-3Z(f-)/*Bam*H I.

2.2 PaorNPV 几丁质酶基因的定位

PaorNPV 基因组 DNA 经 5 种限制性内切酶消化(图 3A),电泳并转移至 Hybond N 膜上,与 [α -³²P]

dCTP 标记的 HearSNPV 几丁质酶基因杂交,在 -30℃ 放射自显影,显示出 5 条清晰的杂交带,见图 3B。依据杂交图谱和内切酶图谱中各条带的对应位置,将 PaorNPV 的几丁质酶基因定位在 *Bam*H I-D 片段, *Eco*R I-A 片段, *Hind* III-A 片段, *Pst* I-D 片段, *Xho* I-G/H 片段(G/H 为一组共迁移片段)上。其中 *Bam*H I-D 片段已被克隆至载体质粒 pGEM-3Z(f-)中。

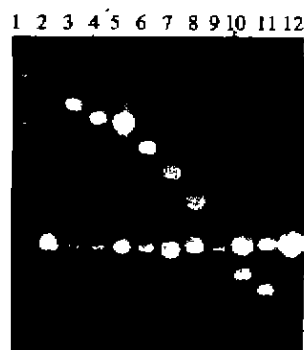


图2 重组质粒的 *Eco*R I 酶切分析

Fig.2 Restriction analysis of *Eco*R I clone

1. PaorNPV DNA/*Eco*R I; 2~7, Digested recombinant plasmids with *Eco*R I; 8. pGEM-3Z(f-)/*Eco*R I.

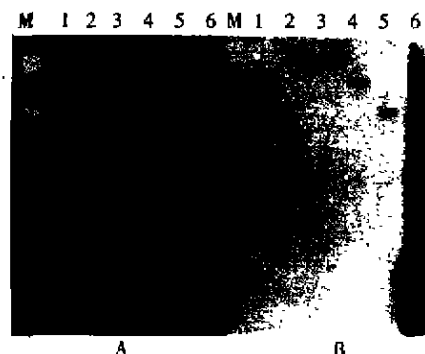


图3 PaorNPV 几丁质酶基因的定位

Fig.3 Localization of PaorNPV chitinase gene

A: Agarose gel electrophoresis of PaorNPV DNA digested with 5 restriction endonucleases; B: Southern blot hybridization. M, λ DNA/*Hind* III; 1, *Bam*H I; 2, *Eco*R I; 3, *Hind* III; 4, *Pst* I; 5, *Xho* I; 6, *chi*A of HearSNPV.

2.3 几丁质酶基因在杆状病毒感染宿主昆虫导致虫体液体的过程中发挥着重要作用。该基因的缺失与否、表达水平的高低直接影响杀虫速度。同时该基因是一个高度保守的基因,在不同的核型多角体病毒中同源性较高^[10]。本实验采用 PCR 方法扩增到 HearSNPV 的几丁质酶基因,利用两者之间的同源性将 PaorNPV 几丁质酶基因定位在 *Bam*H I-D 片段, *Eco*R I-A 片段, *Hind* III-A 片段, *Pst* I-D 片段

和 *Xho* I-G/H 片段上,这对于该基因的序列分析和表达,进而揭示 NPV 间的亲缘关系和分子进化,以及将该基因的表达产物作为添加剂应用于林业害虫的生物防治具有重要的理论和实践意义。在实验过程中,作者曾试图通过用于扩增 *Hear*SNPV 几丁质酶基因的引物来扩增 *Paor*NPV 的几丁质酶基因,结果没有成功,表明在 *Paor*NPV 基因组上不存在与此引物相对应的同源序列。

参考文献

- [1] 四川省森林病虫普查办公室.四川省森林病虫普查报告[R]. 1982,30-33.
- [2] 陈新文,彭辉银,王根,等.蜀柏毒蛾核型多角体病毒的分离鉴定[J].中国病毒学,1991,6(4):379-381.
- [3] 周建华,唐孟佳,秦严昌,等.蜀柏毒蛾核型多角体病毒杀虫剂防治效果研究[J].四川林业科技,1992,13(4):31-32.
- [4] 吴洪广,徐志化,胡应知.蜀柏毒蛾 NPV 林间杀虫效果观测[J].森林害虫防治,1998,36-37.
- [5] 赵小东,周建华,丁清泉.蜀柏毒蛾核型多角体病毒结构多肽及限制性内切酶分析[J].中国病毒学,2000,15(3):249-254.
- [6] 李枚.中国棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒基因组结构及同源重复区域分析[D].武汉:中国科学院武汉病毒研究所.1998.
- [7] Cochran MA, Carstens EB, Eaton BT, et al. Molecular cloning and physical mapping of restriction endonuclease fragments of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus DNA [J]. J Virol, 1982, 41 (3):940-946.
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning[M]. 2nd, New York: CSH press, 1989
- [9] 彭辉银,李星,张双民,等.中国棉铃虫核型多角体病毒几丁质酶基因的定位与克隆[J].中国病毒学,1998,13(2):139-143.
- [10] 张双民.中国棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒几丁质酶基因的克隆和序列分析[D].武汉:中国科学院武汉病毒研究所, 1998.

欢迎订阅 欢迎投稿

《应用与环境生物学报》(双月刊)

ISSN 1006-687X
刊号 CN 51-1482/Q 邮发代号:62-15

本刊是中国科学院主管、中国科学院成都生物研究所主办、科学出版社出版、国内外公开发行的全国性学术科技期刊(学报级),是我国应用生物学和环境生物学的核心刊物.主要报道我国应用生物学、环境生物学及相关科学领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的成果,包括研究论文、研究简报和本刊邀约的综述或述评.读者对象主要为本学科的科研人员、大专院校师生和科研管理干部.本刊获中国科学院科学出版基金资助.

《应用与环境生物学报》为双月刊(1999年由季刊改为双月刊).双月25日出版,每期96页,2001年起改为大16开,高档铜板纸印刷.定价仍为每期11.00元,年定价66.00元.全国各地邮局(所)均可订阅.新订户可向本刊编辑部补购1995、1996、1997、1998、1999、2000年各卷(卷价分别为32.00元、44.00元、44.00元、44.00元、66.00元、66.00元和66.00元).以及1999年增刊(环境微生物学研究),订价每册22.00元.编辑部地址:成都市人民南路4段9号,中国科学院成都生物研究所学报编辑部.邮编:610041 电话:(028)5229903, 5237341(联系人:刘东渝)