

AcMNPV大立方形多角体 突变株突变位点的证实^{*}

林广云 王珣章 施先宗 龙蔡新 余奇理
(中山大学生物防治国家重点实验室, 广州 510275) (香港大学动物系)

摘要 纯化了3株在共转染后形成正常多角体的病毒株, 提取其病毒DNA, 并对其做了EcoRI、BglII酶切分析; 克隆含多角体蛋白基因的EcoRI I片段并进行序列测定, 证实了此病毒株为回复突变株。

关键词 杆状病毒, 多角体蛋白, 回复突变

分类号 Q 7

杆状病毒属杆状病毒科, 绝大部分以昆虫特别是鳞翅目 (Lepidoptera) 膜翅目 (Hymenoptera) 昆虫为寄主^[1]。多角体蛋白基因在病毒感染晚期大量表达, 但并非杆状病毒复制所必需的基因^[2]。近年来关于多角体蛋白基因的突变以引起多角体的形状与数量的改变的突变株已有报道^[3]。我们也曾经报道了1株多角体突变株, 定位了其突变位点为多角体蛋白基因第25位的氨基酸密码子由GGT变为GAT, 从而导致了该位氨基酸由甘氨酸 (Gly) 变为天冬氨酸 (Asp)^[4]。为了证实此氨基酸的突变是引起多角体变化的原因, 利用PCR技术扩增出突变株病毒多角体蛋白基因中从ATG到KpnI酶切位点包括突变碱基在内的部分多角体蛋白基因片段并将其克隆于转移载体质粒pEV5^[5]中, 与不形成多角体的重组病毒TnNPV-HBsD4 DNA共转染Sf细胞, 结果发现产生同样的大立方形多角体病毒^[4]的同时, 也出现了少量的正常多角体病毒。本文纯化了此病毒株并对其多角体蛋白基因进行序列测定, 以证实此正常多角体病毒为回复突变株, 从而进一步证实AcMNPV-TKmt5b^[4]第25位的氨基酸的突变是多角体突变的原因。

1 材料与方法

(1) 质粒与菌株: 质粒pBluscript SK由本室提供, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 转化受体菌DH5 α 和XL1-Blue为本室保存。

(2) 昆虫细胞、细胞培养基与病毒: 草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*, Sf9) 昆虫细胞引自英国自然环境研究委员会病毒研究所 (NERC, Institute of Virology, Oxford, England)。

细胞培养基为TC-100 (GIBCO产品) 培养基中补加10%的新生牛血清 (深圳光明

^{*} 广东省自然科学基金 (950036) 资助项目

收稿日期: 1997-01-30 林广云, 女, 30岁, 讲师

农场产品)。

含 TK 酶基因产生大立方体多角体的突变株 AcMN PV -TKmt5b 由本室构建^[4]。

(3) 酶类及试剂盒: 限制性内切酶 T4 DNA 连接酶购置于 GIBCO BRL 公司; DNA 测序试剂盒购置于 Phamacia 公司生产的 T7 SequencingTM Kit; 用于快速纯化 DNA 片段的 SephaglasTM Band Prep Kit 购置于 Phamacia 公司。

(4) 多角体蛋白基因的 PCR 引物: 由中国科学院上海细胞生物学研究所合成, 按每管 A₂₆₀ = 1.0 μg (干粉), 使用时将其稀释成 10 pmol/μL。引物序列为:

5' -GCA GAT CTA TGC CGG ATT ATT CAT AC-3'
Bg/II

(5) 病毒的纯化, 病毒 DNA 的提取, 酶切分析及共转染方法^[6]。

(6) DNA 的酶切、连接、转化^[7]。

2 结果

2.1 含突变多角体蛋白基因片段的质粒 DNA 与不形成多角体的病毒 TnNPV-HBsD 共转染昆虫细胞结果

重组质粒 pEV P1^[4] 带有被多角体蛋白启动子启动的含突变碱基的完整多角体蛋白基因。将质粒 pEV P1 DNA 与不形成多角体的重组病毒 TnNPV-HBsD4 DNA^[6] 共转染 Sf 细胞, 由于多角体蛋白基因侧翼部分进行了同源重组, 即被多角体蛋白启动子启动的乙肝表面抗原基因为含突变碱基的多角体蛋白基因所置换, 5 d 后观察到在感染细胞核中除有大



2 136 bp
1 530 bp



918 bp
91 bp

图 1 突变株病毒 DNA 的 EcoRI 酶切图谱 (箭头所指为 EcoRI 片段)

Fig. 1 The EcoRI map of mutant DNA
(a) TnNPV-Ra; (b) TnNPV-Rb;
(c) TnNPV-Rc; (d) TnNPV;
(e) 1 000 bp DNA ladder 相对分子质量

图 2 突变株病毒 DNA 的 Bg/II 酶切图谱

Fig. 1 The Bg/II map of mutant DNA
(a) 1 000 bp DNA ladder 相对分子质量;
(b) TnNPV-Ra; (c) TnNPV-Rb;
(d) TnNPV-Rc; (e) TnNPV

立方体多角体病毒出现^[4]外, 还有少量正常多角体.

2.2 突变株的纯化及酶切分析

利用空斑技术经过 4 轮空斑纯化得到 3 株形成正常多角体的病毒株, 分别命名为 TnNPV-Ra, TnNPV-Rb 及 TnNPV-Rc. 经 *x-gal* 检测无蓝色后提取此 3 株病毒的 DNA 并用 *Eco*RI 及 *Bgl*II 酶切, 结果表明与野生型病毒 DNA 的酶切结果相同 (如图 1, 2 所示).

2.3 突变株多角体蛋白基因的克隆

将 TnNPV-Ra, TnNPV-Rb 及 TnNPV-Rc DNA 用 *Eco*RI 酶切, 回收其含多角体蛋白基因的 I 片段, 再用 *Kpn*I 酶切此片段并将其克隆到用 *Eco*RI / *Kpn*I 双酶切的 pBlue-script 窗口中, 得 6 株重组质粒, 分别命名为 pRa1, pRa2, pRb1, pRb2, pRc1 及 pRc2. 用 *Eco*RI / *Kpn*I 双酶切鉴定重组质粒从而证实含多角体蛋白基因的 *Eco*RI I 片段已成功克隆到载体中.

2.4 突变株多角体蛋白基因的序列测定

采用双链测序法, 利用合成的多角体蛋白基因引物及 pBluescript 上的 T7 引物对重组质粒 pRa1, pRb1 及 pRc1 进行序列测定, 重组质粒 pRa2, pRb2 及 pRc2 用 pBluescript 上的 T7 引物进行序列测定, 共测定了包括多角体蛋白基因 ORF 全序列及部分侧翼约 900 bp, 并与野生型病毒的多角体蛋白基因的序列比较, 发现第 25 位的氨基酸密码子又从 GAT 突变回野生型的 GGT, 其余部分未变 (图 3). 这表明了共转染后所出现的少量正常多角体是由于少部分的重组病毒的多角体蛋白基因将原来的突变碱基又再突变回野生型的碱基. 此结果不但证实了此形成正常多角体的突变株是回复突变株, 更进一步证实了第 25 位的氨基酸的突变是造成多角体变化的原因.

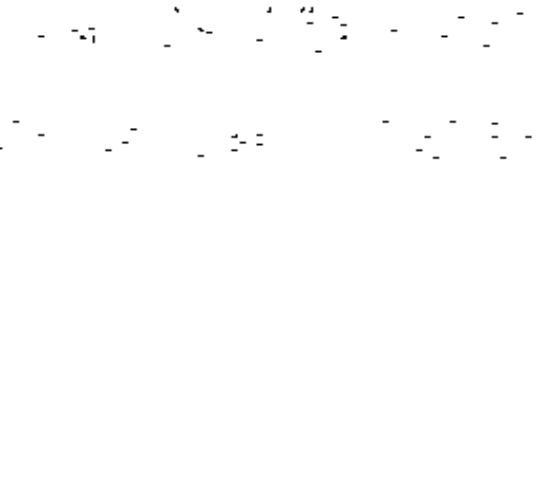


图 3 回复突变株病毒 DNA 的部分多角体蛋白基因的测序相片 (箭头所指为回复突变碱基)

Fig. 3 Sequencing results of partial polyhedrin gene of reverse mutant DNA

(a) TnNPV-Ra; (b) TnNPV-Rb;
(c) TnNPV-Rc

3 讨论

将克隆了突变的多角体蛋白基因的重组

质粒 pEV P1^[4]与不形成多角体的病毒 *TnNPV-HBsD4* DNA 共转染 *Sf* 9 细胞, 结果得到的重组病毒仍然产生大立方体多角体表型^[4]. 由于出发株病毒 *TnNPV-HBsD4* 是不能形成多角体的, 因此在共转染后所出现的大立方体多角体则应与所克隆到的含突变碱基的完整多角体蛋白基因有关. 与此同时, 共转染结果, 亦产生少量正常多角体表型的重组病毒. 纯化了正常多角体表型的病毒共 3 株, 克隆了其多角体蛋白基因并对其进行了全基因序列测定, 结果发现, 原来已突变的编码第 25 位的天冬氨酸的密码子 (GAT) 又突变回了甘氨酸

的密码子 (GGT). 即正常多角体表型的毒株的多角体蛋白基因与野生型病毒的多角体蛋白基因的序列是相同的, 从而证实了正常多角体病毒株为回复突变株. 这一结果为第 25 位氨基酸从甘氨酸突变为天冬氨酸是多角体突变的原因提供了极为有利的证据. 为何在共转染时又有回复突变发生, 本文认为, 共转染时的同源重组是 DNA 发生突变的高发时期, 而离 N 末端越近的氨基酸发生突变机率越高^[8], 恰好突变病毒株发生唯一突变的碱基很靠近 N-末端. 因此病毒自身将其一部分回复到野生型是可能的.

参 考 文 献

- 1 Miller L K. The genetics of Baculoviruses. In Granados P R, Federici B A, eds. The Biology of Baculoviruses. Fla: CRC Press, 1986. 217~ 238
- 2 Miller L K. A virus vector for genetic engineering in invertebrates. In Panopoulos N, eds. Genetic Engineering in the Plant Sciences, New York Praeger, 1981. 203~ 224
- 3 储瑞银, 王清华, 林玉莲, 等. BmNPV CP 突变株基因文库的构建及多角体蛋白基因的分离. 微生物学报, 1992, 32 (5): 376~ 379
- 4 林广云, 王珣章, 龙繁新, 等. 苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (AcMNPV) 大立方多角体突变株的分子生物学研究. 病毒学报, 1997, 13 (2): 151~ 158
- 5 Rankia C, Ooi B G, Miller L. Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression. Gene, 1988, 70 39~ 50
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. 2nd ed. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 7 Summers M D, Smith G E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin, 1987, no. 1555
- 8 O'Reilly D R, Miller L K, Luckow V A. Baculovirus expression vectors, a laboratory manual. New York W H Freeman, 1994

Identification of the Mutation Site of *AcMNPV* Big Cubic Mutant

Lin Guangyun* Wang Xunzhang Shi Xianzhong Long Qingxin Yu Qili

Abstract Three strains of recombinant virus which produce normal polyhedra after co-transfection was plaque-purified. Viral DNA was analyzed with *EcoRI* and *BglII*; The *EcoRI* I fragments which cover the polyhedrin gene were cloned and sequenced. It is thus proved that these viruses were reverse mutant.

Keywords baculovirus, polyhedrin, reverse mutation

* State Key Laboratory for Bio-control, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China