

# 四种限制性内切酶对美国白蛾核型 多角体病毒DNA酶解分析\*

韩一依 杨玲 于在林

(中国林业科学研究院林业研究所)

**摘要** 从HcNPV中直接分离提纯的DNA证明具有典型的紫外吸收光谱。经琼脂糖电泳后呈一条带谱。用限制性内切酶EcoR I、Pst I、Bgl II、Pvu II酶解,经琼脂糖平板电泳分别产生19、22、18、22条核酸片段。以 $\lambda$  DNA-EcoR I和 $\lambda$  DNA-Hind III片段作参考,计算出各片段分子量大小,积加得平均值为 $94.0445 \times 10^6$ 。

**关键词** 美国白蛾;核型多角体病毒;限制性内切酶

美国白蛾(*Hyphantria cunea* Drury)属鳞翅目灯蛾科,是一种重要的世界性检疫害虫。从1979年起,该虫先后在我国的辽宁省东部、山东半岛和陕西省被发现,对树木的危害极大。

何介田等利用病虫体上分离到的核型多角体病毒(HcNPV)来防治幼虫效果明显<sup>[1]</sup>。但有关HcNPV-DNA的生化特性和酶切图谱,迄今未见报道。为此,对HcNPV-DNA进行了分离和提纯,并用四种限制性内切酶进行酶解分析。现将结果报道如下。

## 一、材料和方法

### (一) 多角体的提纯

主要按于在林等文献<sup>[2]</sup>中所述方法进行。

### (二) HcNPV-DNA的分离纯化

提纯的多角体用0.5 M NaOH碱解,碱解后,用0.5 N HCl调至pH 8~9,加Pronase K至20  $\mu$ g/ml,37  $^{\circ}$ C保温3 h,加10% SDS至终浓度为1%,65  $^{\circ}$ C水浴5 min,冷却至室温。加等体积0.1 M T-E配制的饱和酚,轻轻摇动脱蛋白15 min,10 000 rpm 5 min,吸取上层清液,用饱和酚反复脱蛋白,离心,直至无蛋白层为止。上层清液再用氯仿:酚(1:1)抽取一次,氯仿:正丁醇(3:1)抽取1~2次。吸取上层清液后,加3 M NaAc调至终浓度0.5 M,混匀,加入2倍体积的预冷无水乙醇,轻轻混匀,冰盒中过夜。14 000 rpm 5 min,用70%预冷无水乙醇漂洗一次,离心,沉淀溶于0.02 M T-E中,置4  $^{\circ}$ C保存备用。

### (三) DNA的热熔曲线及增色效应

主要按于在林等文献<sup>[3]</sup>中所述方法进行。

本文于1988年11月2日收到。

\* 武汉大学病毒学与分子生物学系1988年毕业生杨书礼、钟海波于1988年3~6月在本所生化实验室实习,并参与部分工作。

#### • (四) DNA 的酶解反应

供试限制性内切酶 EcoR I、Pst I、Bgl II、Pvu II 均购自中国科学院生物物理所生化试剂厂。

酶解系统: EcoR I, Tris-HCl 100 mM, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.5.

Pst I, Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 牛血清白蛋白 100 μg/ml, pH 7.5.

Pvu II, Tris-HCl 6 mM, NaCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 6 mM, 2-巯基乙醇 7 mM, TritonX-100 0.01% (V/V), pH 7.4

Bgl II, 甘氨酸-NaOH 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 2-巯基乙醇 7 mM, pH 9.5

DNA 1 μg 用酶量为 2~10 单位, 以 λ DNA 为标准 DNA。

DNA 的酶解反应: 酶解反应系统总体积 30 μl, 37 °C 反应 3 h, 加终止液 (50 % 甘油, 0.1 M EDTA-Na, 0.5 % 溴酚蓝) 2 μl, 65 °C 水浴 5 min, 立即置冰浴中, 备电泳用。

#### (五) 琼脂糖电泳

用缓冲液配制 1 % 琼脂糖凝胶, 进行平板电泳。缓冲液为 89 mM Tris, 89 mM 硼酸, 25 mM EDTA-Na, pH 8.3。样品中加溴酚蓝指示剂。泳动电压为 50 V, 室温下电泳 5~6 h。电泳结束后用 0.5 μg/ml 的溴化乙锭 (EtBr) 染色 30 min, 紫外分析仪下观察, 加红色滤光片照相。

用 Hind III 及 EcoR I 酶解 λ DNA 的片段作为分子量标准, 根据各片段的分子量对数和迁移率成反比的关系, 绘制成标准曲线, 以此测定各酶解片段的分子量。

## 二、结果与讨论

### (一) 多角体的提纯

提纯的多角体经扫描电镜观察, 都比较均一, 表明提取的纯度是满意的 (图 1)。

### (二) HcNPV-DNA 的分离纯化

实验表明, 分离纯化后的 HcNPV-DNA 具有典型的紫外吸收曲线 (图 2)。1 % 琼脂糖凝胶平板电泳后, 用紫外分析仪观察, 呈一条带。



图 1 提纯的多角体

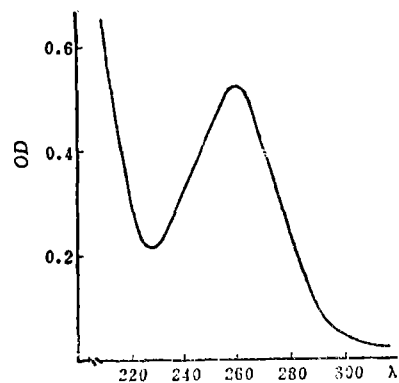


图 2 HcNPV-DNA 的紫外吸收光谱

### (三) DNA 的热熔曲线及增色效应

HcNPV-DNA 溶于  $0.1 \times \text{SSC}$  中, 测定其热熔曲线 (图 3)。DNA 的  $T_m$  值为  $78.6^\circ\text{C}$ , 根据 Mandel 等的公式:  $(G + C) \% = (T_m - 53.9) \times 244$ , 计算得 HcNPV-DNA 的 (G + C) 含量为 61%。

(四) HcNPV-DNA 的酶解反应

HcNPV-DNA 的酶解物经 1% 琼脂糖平板电泳后，观察到这几种酶分别切割 DNA 分子为 19、22、18、22 个 DNA 片段。用  $\lambda$  DNA 的 EcoR I、Hind III

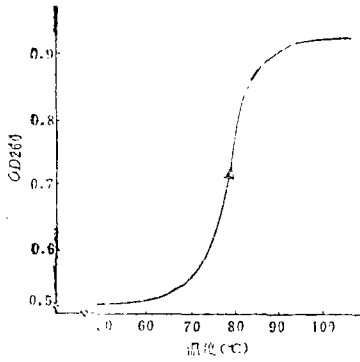


图3 HcNPV-DNA在0.1×SSC中的热变性曲线

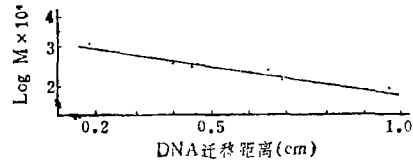


图4 测定DNA分子量工作曲线

酶解片段为标准分子量，用其对数值和相应各片段电泳迁移距离作图(图4)，得一工作曲线，再量取同一电泳条件下HcNPV-DNA 酶解后各片段电泳距离，从工作曲线纵轴上求出各片段分子量。四组DNA片段分子量分别为 EcoR I  $94.617 \times 10^6$ 、Pst I  $92.236 \times 10^6$ 、PVU II  $94.807 \times 10^6$ 、Bgl II  $94.518 \times 10^6$ ，其平均值为  $94.044 \times 10^6$ ，具体见图5及表1。

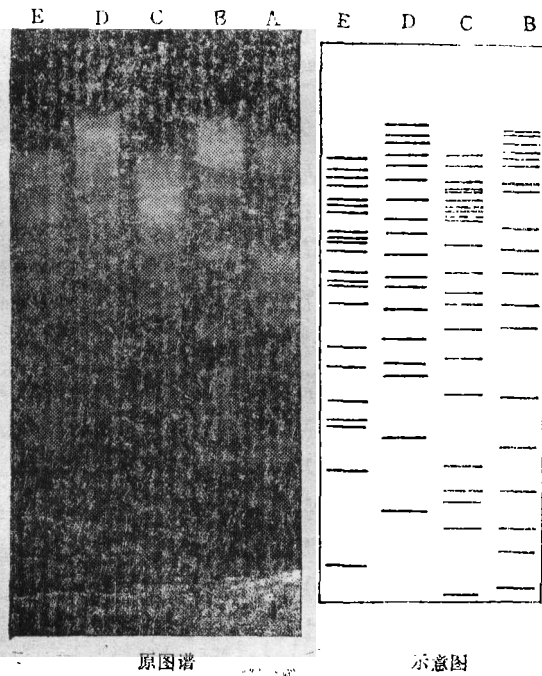


图5 HcNPV-DNA限制性内切酶切图谱  
A: 标准DNA ( $\lambda$  DNA)经EcoR I、Hind III 酶解图谱  
B: HcNPV-DNA经EcoR I 作用后呈19条带  
C: HcNPV-DNA经Pst I 作用后呈22条带  
D: HcNPV-DNA经Bgl II 作用后呈18条带  
E: HcNPV-DNA经PVU II 作用后呈22条带

表1 HcNPV-DNA经四种酶切后得各片段分子量( $\times 10^6$ )

| 片段号  | EcoR I  | Pst I  | PVU II | Bgl II |
|------|---------|--------|--------|--------|
| 1    | 10.233  | 8.318  | 8.128  | 10.233 |
| 2    | 10.000  | 7.943  | 7.943  | 10.000 |
| 3    | 9.550   | 7.079  | 7.413  | 9.550  |
| 4    | 8.318   | 6.607  | 6.607  | 8.318  |
| 5    | 8.128   | 6.456  | 6.310  | 7.943  |
| 6    | 7.943   | 6.310  | 6.166  | 7.079  |
| 7    | 7.709   | 6.166  | 5.888  | 6.310  |
| 8    | 6.456   | 6.026  | 5.623  | 5.248  |
| 9    | 5.129   | 5.248  | 5.012  | 5.012  |
| 10   | 4.570   | 4.786  | 4.786  | 4.467  |
| 11   | 3.981   | 4.073  | 4.365  | 3.981  |
| 12   | 3.236   | 3.981  | 3.981  | 3.548  |
| 13   | 2.818   | 3.388  | 3.802  | 3.162  |
| 14   | 1.950   | 3.236  | 3.631  | 2.570  |
| 15   | 1.479   | 2.884  | 3.236  | 2.400  |
| 16   | 1.175   | 2.400  | 2.512  | 2.089  |
| 17   | 0.977   | 1.995  | 2.239  | 1.585  |
| 18   | 0.871   | 1.318  | 1.905  | 1.023  |
| 19   | 0.724   | 1.202  | 1.622  |        |
| 20   |         | 1.096  | 1.585  |        |
| 21   |         | 1.000  | 1.259  |        |
| 22   |         | 0.724  | 0.794  |        |
| 总分子量 | 94.617  | 92.236 | 94.807 | 94.518 |
| 平均值  | 94.0445 |        |        |        |

从美国白蛾NPV-DNA的分子量来看,与多数核型多角体杆状病毒DNA比较,属较高的一类,而且由这些酶切电泳图谱可以看出该病毒基因组是相当复杂的。

利用对NPV-DNA酶切片段的积加可以估算NPV-DNA的分子量。此方法简便、快速,接近于该DNA的自然分子量。此外,以 $\lambda$ DNA的EcoR I和Hind III的酶切片段为分子量标准所绘制的工作曲线呈直线,且酶解后的样品DNA片段在工作曲线上查得的相应的分子量值均在直线范围内,3次重复试验结果基本一致,故其测定结果是可靠的。

核酸是遗传信息的携带者,并参与这些信息在细胞内的表达,从而促进代谢过程及其控制。利用限制性内切酶作用点的碱基特异性,酶解DNA就可得到具有一定序列的片段。不同的DNA经同一内切酶作用产生的酶解片段的数目和大小都不相同。利用限制性内切酶酶解图谱可以研究杆状病毒的同源性。本项研究首次采用4种限制性内切酶对美国白蛾NPV-DNA进行酶解分析,得到了特征性的单酶解谱型,为今后进一步在分子、亚分子水平上研究该病毒DNA的结构与功能作了良好的开端。

### 参 考 文 献

- [1] 何介田等,1981,美国白蛾研究初报,林业科技通讯,(5):27~30。  
 [2] 于在林等,1987,杨尺蠖核型多角体病毒的提纯及某些理化性质的分析,林业科学,23(2):221~225。  
 [3] 于在林等,1986,杨尺蠖核型多角体病毒的DNA特性,病毒学报,2(4):344~350。

## RESTRICTION ENDONUCLEASE ANALYSIS OF *HYPHANTRIA CUNEA* NPV

Han Yinong Yang Ling Yu Zailin

(The Research Institute of Forestry CAF)

**Abstract** Viral DNA was isolated directly from the nuclear polyhedrosis virus of *Hyphantria cunea*. Viral DNA showed a single band on the agarose gel. Digestion of HcNPV-DNA with EcoR I, Pst I, Bgl II, and PVU II resulted in 19, 22, 18 and 22 fragments on agarose gel electrophoresis respectively. The molecular weights of the fragments are determined with  $\lambda$ DNA-EcoRI and  $\lambda$ DNA-Hind III fragments as reference, and using this method the mean molecular weight of HcNPV<sub>2</sub>DNA is calculated to be about  $94.044 \times 10^3$  daltons.

**Key words** *Hyphantria cunea*; nuclear polyhedrosis virus; restriction endonuclease