

蓖麻蚕核型多角体病毒 DNA 的物理图谱

马延高 王静怡 陈蔚梅 燕小安 卢文筠

(武汉大学病毒研究所)

昆虫的核型多角体病毒(NPV)属杆状病毒属(*Baculovirus*),具有 $70-100 \times 10^6$ 道尔顿的双链、环形以及超螺旋的基因组(Genome)。近年,国际上不少实验室以 NPV 为材料,从事病毒生物学、病毒遗传学的研究,其中以苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*) NPV 的研究最为集中。国内,严家骥等在蓖麻蚕(Ar) NPV-DNA,李载平等、马延高等在家蚕 NPV-DNA 方面分别从 DNA 的分离纯化,理化性质、酶切特性以及生物活性方面有较详细的研究。

从分子水平上研究一种基因组的规律,一般要先建立其物理图谱,因为就是如 NPV 这样低等的生物,其基因组也相当大,远远超出了迄今所能直接研究的分子量范围。限制性内切酶可以特定地切断基因组,由局部推导出基因组整体的结构和活动规律。

本文报道了我们关于 ArNPV-DNA 的物理图谱的研究结果。

材料和方法

1. 蓖麻蚕,病毒及 DNA 的制备 采用严家骥^[1]等的方法。

2. 单酶切与双酶切 单酶切基本上按照美国 BRL 公司的商品说明书介绍的方法。双酶切是在单酶切反应终止后加入 95% 的冷乙醇,于冰箱(4℃)放置 2—4 小时后用 TGL-161 型高速离心机离心 15 分钟;沉淀用 75% 冷乙醇洗后加入适量的第二个酶的缓冲液,4℃ 下充分溶解,再加入第二种酶,保温酶切。

3. 酶切片段的分离与交叉酶切

(1) 普通琼脂糖凝胶上片段的分离与回收。某些片段太大(超过 10×10^6 ; 见表 1),选用

多切口的酶切后,才能确定分子量。据 W. B. Allington 等^[2]介绍的经验,我们改进并制作了一种适于 DNA 酶切片段洗脱与浓缩用的装置(洗浓器)。在长波紫外灯下取出所需片段,置于洗浓器的样品放置端(该端和另一头的样品回收端均附有透析膜),用 5mM-Tris, 2.5mM 醋酸钠溶液充满洗浓器(约 10ml),置于电泳槽中,200V 电泳 4 小时,然后取出样品回收端底部约 200 μ l 的含片段溶液。回收的样品可不经任何再处理,即可用于酶切;回收率为 70—80%。

(2) 低熔点琼脂糖凝胶上片段的回收与交叉酶切 基本上按 G. E. Smith 等^[3]和 H. Schenabel 等^[4]的方法。

4. 分子量的测定

分子量较高的酶切片段,如 EcoRI,回收后,再分别以 Sal I 酶切,用文献[5]的方法求出完整 ArNPV-DNA 的分子量。ArNPV-DNA 被 Sal I 完全酶切,可检出 31 个片段^[6],其中绝大部在计算分子量工作曲线的直线部分。因此,可以认为用此法求得的分子量是比较准确的。

结 果

1. 单酶切与双酶切图型

ArNPV-DNA 分别用 Bgl II、EcoR I 和 Kpn I 单酶切成 5、10、14 个片段(图 1 中 1,3 和图 2 中 1, 3, 见封 3)。Bgl II 与 EcoR I 双酶切成 14 个可见的片段(图 1 中 2, 见封 3); EcoR I 与 Kpn I 双酶切成 18 个可见片段(图 2 中 2 见封 3)。

2. ArNPV-DNA 分子量

用上述方法求得为 81.4×10^6 道尔顿(表

表1 ArNPV-DNA 酶切后所得片段及其分子量($\times 10^6$)*

Bgl II		Bgl II + EcoRI		EcoRI		EcoRI + KpnI		KpnI	
片段名称	分子量	片段名称	分子量	片段名称	分子量	片段名称	分子量	片段名称	分子量
B1	39.6	BE1	21.2	E1	27.17	EK 1	18.27	K1	21.1
B2	16.5								
B3	13.3			E2	11.5				
B4	10.7	BE2	10.52					K2	9.2
								K3	8.2
		BE3	8.1	E3	8.1				
				E4	7.8	EK 2	7.8	K4	7.7
		BE4	6.8	E5	6.8				
		BE5	6.3			EK 3	5.8	K5.6	5.8 $\times 2$
						EK 4	5.6		
		BE6.7	5.47 $\times 2$	E6.7	5.47 $\times 2$			K7.8	5.0 $\times 2$
						EK 5	4.75		
		BE8.9.10	4.35 $\times 3$	E8.9	4.35 $\times 2$	EK 6	4.35		
						EK 7	4.2		
						EK 8	3.8		
						EK 9	3.3		
						EK 10	2.8	K9.10	2.8 $\times 2$
						EK 11	2.5	K11	2.5
						EK 12.13	2.4 $\times 2$	K12	2.4
						EK 14	2.3	K13	2.3
						EK 15.16	2.2 $\times 2$		
						EK 17	1.3	K14	1.3
						EK 18	1.2		
B5	1.1	BE11	1.1						
		BE12	0.98						
		BE13	0.94						
		BE14	0.29	E10	0.29				
	81.2		80.22		81.3		77.17		81.9

* B、E、K、BE、EK 等分别代表 BglII, EcoRI, KpnI, BglII + EcoRI, EcoRI + KpnI 片段。

1)。

3. Bgl II 与 EcoRI 交叉酶切结果和 Bgl II 与 EcoRI 片段的排列顺序

Bgl II 与 EcoRI 交叉酶切后电泳分离情况分别见图 3 与 4 (封 3)。其交叉酶切结果见表 2。

(1) Bgl II 片段的排列顺序

由表 2 可见, B1 被 EcoRI 交叉酶切得到 BE1, BE2, BE4。其中 BE4 是 E5。BE1 和 BE2 为两个末端片段。E2 被 Bgl II 酶切时产生 BE2 和 BE12; B2 被 EcoRI 酶切时产生 BE6, BE7, BE8 和 BE12。因此 B1 和 B2 由 E2 “搭桥”而被确认彼此相连。E1 被 Bgl II 酶切, 产生 BE1、BE11 和 BE10, 其中 BE11 就是 B5。

表2 Bgl II 与 EcoRI 交叉酶切的结果

Bgl II 片段	用 EcoRI 交叉酶切后在双酶切电泳图上的位置	EcoRI 片段	用 Bgl II 交叉酶切后在双酶切电泳图上的位置
B1	BE1、BE2、BE4	E1	BE1、BE10、BE11
B2	BE6、BE7、BE8、BE12	E2	BE2、BE12
B3	BE3、BE10、BE13	E3	BE3
B4	BE5、BE9	E4	BE5、BE13
B5	BE11	E5	BE4
		E6	BE6
		E7	BE7
		E8	BE8
		E9	BE9
		E10	BE14

B3 被 EcoRI 酶切,产生 BE3, BE10 和 BE13。由于 E3 和 E4 迁移率相近,不能确定 BE3 是 E3 还是 E4。但 E3 为 KpnI 酶切获得 EK5 和 EK9 (见后文), EK5 来源于 K1, 而 K1 与 E1 大部分同源。所以可以断定 B1—B5—B3 这段顺序。余下的 B4 只能在 B3 与 B2 之间。因此, Bgl II 的 5 个片段的顺序为:

—B1-B2-B4-B3-B5—

由于在所用三种酶中 B1 片段分子量最大, 约占整个基因组的 50%, 所以采用 B1 的起点为原点(0%)来排列各种酶的各片段的顺序。

(2) EcoRI 片段的排列顺序

由表 1 可见 E5、E6、E7、E8、和 E10 上无 Bgl II 切口, 所以分别与 BE4、BE6、BE7、BE8、BE9、BE10 同源。用 Bgl II 酶切 E1、E2...E9 的结果也证实了这一点(表 2)。

由表 2 可见, B1+EcoRI 得到 BE1, BE4, BE2。其中 BE4 是 E5, 而 BE12 加上 BE2 等于 E2。BE12 同时是 E2 和 B2 经 Bgl II 或 EcoRI 酶切的末端片段, 故 E1—E5—E2 顺序可以确定。E1 被 Bgl II 酶切获得 BE1、BE10、BE11 三个片段。上面已经说明 BE10、BE13 与 E3 (相当于 BE3) 共同构成 B3, 而 BE13 同为 B3 和 E4 (B4 的一部分) 的末端, 所以可以确定 E1—E3—E4 这段顺序。B4 除含有 BE5 外, 还有 BE9 (相当于 E9)。因此, E9 与 E4 相连。余下 E6, E7, E8, 没有 Bgl II 切口, 又同在 B2 内, 所以不能测出它们的确切位置。

这样 EcoRI 片段的顺序可以归纳为:

—E1-E5-E2-(E6、E7、E8)-E9-E4-E3—

括号内片段的位置表示可以互换(下同); E10 由于无 Bgl II 切口, 分子量又太小, 未能排出。

4. EcoRI 与 KpnI 交叉酶切结果和 KpnI 片段的排列顺序。

电泳分离情况见图 5 (封 3), 其交叉酶切结果见表 3。

由表 1 和表 3 可见, E1 和 K1 均含有 EK1, 而 K1 又含有 EK5, 在 EcoRI 片段中正好 E3 含有该片段, 如前述 E1 与 E3 相邻。E1 还含有 EK3 和 EK10, 分别与 K5 和 K9 相同, 但 K5 和 K9 上没有 EcoRI 切口, 不能进一步定位。E3 除含有片段 EK5 外, 还含有 EK9 (相当于 K7), 所以这一段顺序应为—K7-K1-(K5、K9)—。E5 被 KpnI 酶切产生 EK4 和 EK17; EK17 相当于 K14。K2 被 EcoRI 酶切得到 EK4 和 EK8, 而 E2 中也含有 EK8, 说明 K2 可以“桥接”E5 与 E2, 揭示了前述 EcoRI 片段的部分顺序。此外, E2 还含有 EK13、EK14 和 EK12, 其中 EK13、EK14 分别与 K11 和 K12 相当, 而 EK12 可以在 K4 中找到, 因此这段 KpnI 片段的顺序可确定为—K14-K2-(K11, K12)—K4—。E4 已证明与 E3 相连, E4 相当于 EK2, 而 EK2 来源于 K3, K8 相当于 EK15 加 EK16, 又相当于 E9, 所以 K8 必与 K3 相连, K3 又必与 K7 相连。KpnI 片段只余下 K6, K13, K10, 的顺序尚不能确定。所以,

表3 KpnI 与 EcoRI 交叉酶切的结果

KpnI 片段	用 EcoRI 酶切后在双酶切电泳图上的位置	EcoRI 片段	用 KpnI 酶切后在双酶切电泳图上的位置
K1	EK1、EK5	E1	EK1、EK3、EK10
K2	EK4、EK8	E2	EK8、EK12、EK13、EK14
K3	EK2	E3	EK5、EK9
K4	EK7、EK12	E4	EK2
K5	EK3	E5	EK4、EK17
K6	EK6	E6	EK6
K7	EK9	E7	EK7、EK18
K8	EK15、EK16	E8	EK11
K9	EK10	E9	EK15、EK16
K10	EK11		
K11	EK13		
K12	EK14		
K13	EK18		
K14	EK17		

ArNPV-DNA KpnI 片段的顺序为:

—K1-(K5、K9)-K14-K2-(K11、K12)-K4-(K6、K10、K13)-K8-K3-K7—

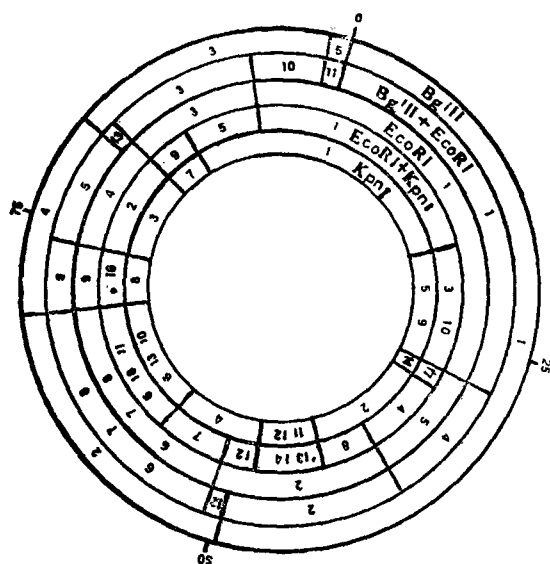


图6 ArNPV-DNA 的物理图谱

其中某些未能精确排出位置的 EcoRI、KpnI 片段间未用竖线隔开。

归纳上述结果可以得到 ArNPV-DNA 的 BgIII, EcoRI, KpnI 的物理图谱(图6)。图谱为环状,以完整 ArNPV 基因组为 100%,以其 1% 为一个图谱单位。

讨 论

ArNPV-DNA 的分子量与家蚕 NPV-DNA

的分子量近似^[5],均约为 81×10^6 道尔顿。要准确地断定一种 DNA 的分子量,目前还存在许多困难^[7],如片段太大(大于 10×10^6 道尔顿),太小(小于 0.2×10^6 道尔顿)和有相近或相同迁移距离的彼此难以分开的多带(二条以上)等。为了克服这些困难,我们除采用了片段回收再酶切以外,还采用多酶单酶切,双酶切,改变凝胶浓度,三酶切以及设计曲线方程等方法相互校正,因此得出的上述结果是较可靠的。

用交叉酶切法建造 DNA 的物理图谱比用双酶切,部分酶切法等具有明显的优点。因为在一般的情况下,它可以直接确定参加交叉酶切的两个酶的各片段的位置,只是在确定物理图谱的图距时才依靠片段的分子量。这就排除了目前测定片段分子量时的种种不利因素^[7]。

在分析片段之间的关系上交叉酶切的结果比双酶切的结果重要,因为根据交叉酶切后是否具有相同的末端片段可确定两个片段是否相连。如 B1 与 B2 之所以相连,由于 B2 被 EcoRI 酶切后产生有 BE12 末端片段,而 E2 为 BgIII 酶切也产生 BE12 末端片段,而 E2 大部与 B1 同源。依此类推,就可以客观地、准确地逐个确定它们的顺序。

E6 和 E7 分子量相同, 因此电泳分离中迁移率也相同; E8 和 E9 也属同样情况。它们在被 Bgl II 或 KpnI 酶切时, Bgl II 全没有切口, 达不到交叉的目的; KpnI 切口太多, 也无法分析。与此相反, E3 和 E4 虽然迁移距离相当, 但在交叉酶切中, Bgl II 可切割 E4, KpnI 可切割 E3, 因此, E3 和 E4 的位置可被确定。可见在利用此法作物理图谱时, 最好选择那些彼此可以交叉酶切而切口又不太多的酶。

K11、K12、K13 的迁移率几乎相同, 用 EcoRI 或 Bgl II 酶切之后谁被切割不能确定, 而且也不好确定切口数。从已查明的情况来看, 肯定切口不只一个, 即被切割数次, 片段越切越小, 以至在凝胶上无法捕捉到。这就是造成 EcoRI 与 KpnI 交叉酶切后 EK 带数不够, 总分子量偏小的主要原因。

NPV 基因组的物理图谱的建立, 是在分子水平上研究该基因组结构与功能的重要的第一步。它将有助于该基因组的转录, 翻译图谱的

建立, 有助于控制位点, 如它的复制起点和终点位置的确定, 有助于突变和重组位点的确定, 以及最终弄清在宿主环境中表现出的与各种生物功能有关的该基因组的结构次序。另外, 还将为阐明整个基因组的核苷酸序列提供方便, 为使 NPV-DNA 用于遗传工程技术中研究真核生物用的具有大容量的载体物质提供条件。

严家骥教授给予热情指导, 余运萍同志提供蓖麻蚕核型多角体, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 严家骥等:《病毒学集刊》, 第 1 期, p. 153—161, 1982.
- [2] Allington, W. B. et al.: *Anal. Biochem.*, **85**, 188—196, 1978.
- [3] Smith, G. E. et al.: *J. Virol.*, **45**, 215—225, 1983.
- [4] Schnabel, H. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **188**, 370—377, 1982.
- [5] 马延高等:《病毒学集刊》, 第 3 期, p. 141—147, 1983.
- [6] 胡国律等:《病毒学研究集刊》, 第 1 期, p. 88—91, 1984.
- [7] Miller, L.K. et al.: *J. Virol.*, **29**, 1044—1054, 1979.

[本文于 1983 年 12 月 28 日收到]

甲酸棉酚对奶牛精子的泳动及活率的影响

沈子威 陆祖荫

(清华大学生物科学和技术学研究室)

宋传琳 孙厚钧 陶晓峰

(清华大学水利系激光小组)

近几年已广泛地应用准弹性光散射方法研究微生物的泳动, 此法采用 He-Ne 激光器作为单色光源, 当激光束被移动的微粒散射时产生多普勒频移, 然后根据所得到的频率谱进行分析, 可以得到有关微粒运动的信息, 本工作即用此法研究甲酸棉酚对奶牛精子的泳动及其活率的影响,

甲酸棉酚是从棉子中提炼出来的一种口服避孕药。我们将甲酸棉酚直接与奶牛精子接触, 再用准弹性光散射方法研究它对精子活力的影响, 以便探讨甲酸棉酚作用于精子的机

理。

一、样品制备

甲酸棉酚粉加生理盐水, 反复摇晃, 形成悬浮液。本实验所用的悬浮液浓度为 2mg/ml。

冷冻精子(由北京奶牛研究所提供), 呈颗粒状, 存放在 -96℃ 的液氮罐中。取一粒黄豆大的冷冻精液颗粒, 放入 2ml 2.9% 的柠檬酸钠溶液内融化, 再加生理盐水 2ml 稀释。

取悬浮液和以上溶液各 0.6ml, 均匀混合; 混合后的甲酸棉酚浓度为 1mg/ml。

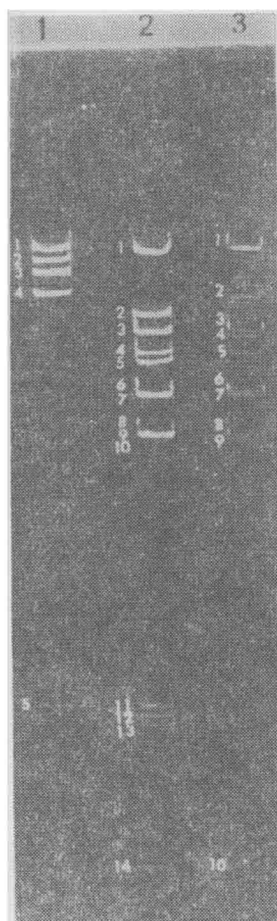


图 1 ArNPV-DNA 的限制性内切酶酶切后的电泳图(一)

1. ArNPV-DNA + BglII。2. ArNPV-DNA + (BglII + EcoRI)。3. ArNPV-DNA + EcoRI。

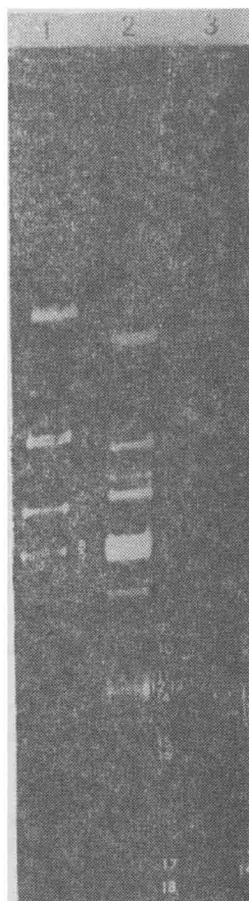


图 2 ArNPV-DNA 的限制性内切酶酶切后的电泳图(二)

1. ArNPV-DNA + EcoRI
2. ArNPV-DNA (EcoRI + KpnI)。
3. ArNPV-DNA + KpnI。

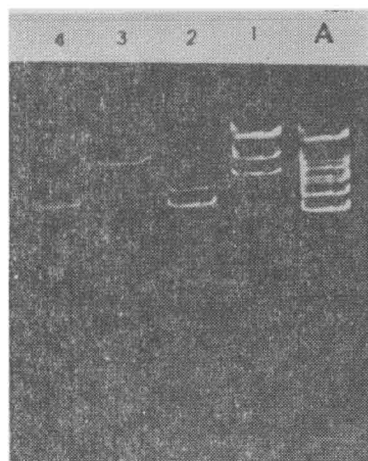


图 3 ArNPV-DNA 的 BglII 片段用 EcoRI 酶切后的电泳结果

A 为 ArNPV-DNA + (BglII + EcoRI); 1,2,3,4 分别为 B1、B2、B3、B4。

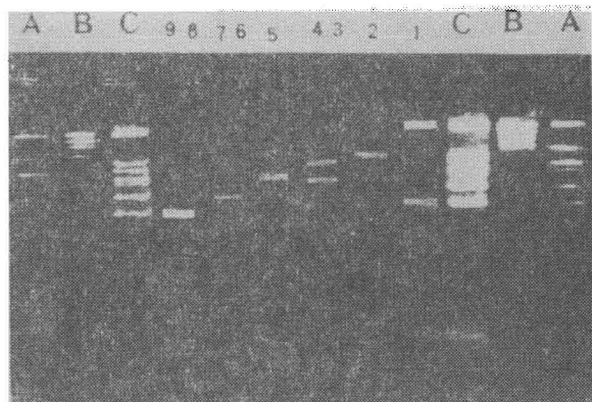


图 4 ArNPV-DNA 的 EcoRI 片段用 BglII 酶切后的电泳结果

A: ArNPV-DNA + EcoRI B: ArNPV-DNA + BglII C: ArNPV-DNA + (BglII + EcoRI) 1—9 代表 E1, E2, ..., E9; (3, 4)、(6, 7) 和 (8, 9) 同从凝胶上取出再酶切。

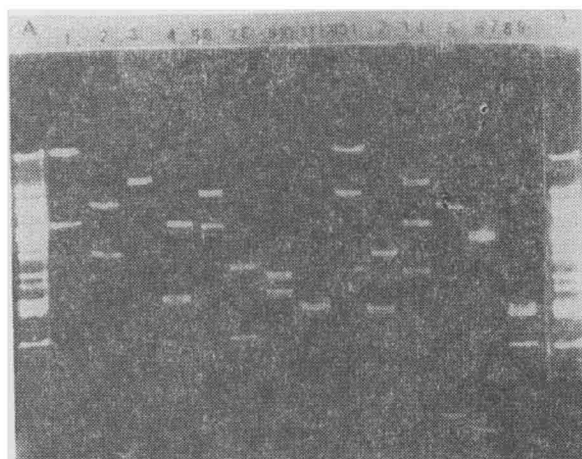


图 5 ArNPV-DNA 经 EcoRI 与 KpnI 交叉酶切后的电泳结果

1. A 为 ArNPV-DNA + (KpnI + EcoRI) 2. 1—13 表示 K1、K2、K3……K13; (5, 6) 表示两个片段一起被 EcoRI 酶切, 下同。3. 1—9 表示 E1, E2, E3……E9。

* 左右两组分别为用一步法和 Greene 法制备的 PstI。每组从左至右有四个样品, 它们依次为: 1. pBR322DNA, 2. pBR322DNA + PstI, 3. 样品 2 + T₄DNA 连接酶。4. 样品 3 + PstI。

“一步肝素琼脂糖亲和层析法分离纯化限制性核酸内切酶 PstI 一文的图 1、2”



图 1 过量酶切反应与常量酶切反应的电泳图谱比较

自上而下依次为一步法制备的酶样 3 微升和 60 微升的酶切图谱与 Greene 法制备的酶样 3 微升和 60 微升的酶切图谱

