

Физическое картирование генома вируса ядерного полиэдроза *Malacosoma neustria*

И. М. Кихно, Л. И. Строковская

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Составлена физическая карта кольцевого генома вируса ядерного полиэдроза *M. neustria*. Локализованы сайты для рестриктаз *BamHI*, *KpnI*, *PstI*. На карте локализован ген полиэдрина. Определен размер генома вируса, составляющий 139 тыс. п. н.

Введение. Вирус ядерного полиэдроза (ВЯП) *M. neustria* (*Mn*) относится к роду *Baculovirus* семейства *Baculoviridae*. Представители этого рода — ДНК-содержащие вирусы, поражающие насекомых рода *Lepidoptera*, *Diptera* и *Hymenoptera*. Характерной особенностью этих вирусов является наличие капсулы, состоящей из белка полиэдрина, в которую упакованы вирусные частицы. Бакуловирусы находят широкое применение как экологически чистые инсектициды [1]. Кроме того, они широко используются в качестве векторов для синтеза белковых препаратов в культурах клеток или в организмах насекомых [2]. В настоящее время для биотехнологического получения различных белков используются в основном наиболее изученные ВЯП *Autographa californica* и *Bombyx mori* [2, 3]. Остальные бакуловирусы применяются недостаточно широко из-за недостатка знаний об их молекулярно-генетической организации. Ранее в нашей лаборатории проведена работа по адаптации ВЯП *Mn* к культуре клеток *Antheraea pernyi* (*Ap*) линии *McAp-1* [4]. Значительная продуктивность полученной системы вирус — клетка, а также высокие показатели экспрессии полиэдрина, содержание которого на поздних стадиях инфицирования составляет 70 % от суммарного белка клетки, позволили рассматривать ее как перспективную для создания на бакуловирусного вектора. В нашей лаборатории был также локализован ген полиэдрина в одном из *EcoRI*-фрагментов вирусного генома [5] и осуществлено его полное сиквенирование [6]. Итогом пе-

речисленных работ стало создание транспортного вектора *pMPE-A* для наработки химерных рекомбинантных белков [7]. Использование вируса *Mn* клона *W1* в качестве вектора потребовало более детального изучения его молекулярно-генетической организации. В настоящем сообщении мы представляем физическую карту ВЯП *Mn*, позволяющую идентифицировать вирус и являющуюся первым этапом на пути дальнейшего молекулярно-биологического изучения его генома. Карта составлена для трех рестриктаз — *BamHI*, *KpnI* и *PstI* (для ориентации использованы данные по локализации гена полиэдрина).

Материалы и методы. Клетки и вирус. Клетки *Ap* линии *McAp-1* [8] выращивали на среде Грейса с добавлением инактивированной нагреванием 10 %-й эмбриональной сыворотки теленка. Вирус дикого типа *Mn* получен из личинки насекомого *M. neustria* [4]. Штамм *W1* ВЯП *Mn*, используемый нами, очищен трехкратным проведением через бляшку.

Гибридизация. Фрагменты вирусной ДНК, разделенные в 0,7 % агарозном геле, переносили на нейлоновый фильтр (Hybond-N, «Amersham», Великобритания) по методу Саузерна [9]. Зонд метили [^{32}P] α -dСТР, используя стандартный набор для мечения ДНК («Ферментас», Латвия).

Выделение ДНК. Препараты ДНК ВЯП *Mn* выделяли по методу, описанному в работе [10], с небольшими модификациями. ДНК получали непосредственно из инфицированных клеток культуры *McAp-1* без предварительного получения вирусных частиц. Для выделения одного препарата ДНК

отбирали $(5-10) \cdot 10^6$ клеток и суспендировали их в 100 мкл 0,05 М ЭДТА. К суспензии прибавляли равный объем двухкратного буфера (50 мМ ЭДТА, 0,5 мг/мл спермидина, 0,4 мг/мл бромистого этидия). При помощи нескольких капель NaOH доводили pH суспензии до 11,5. Нейтрализовали раствор прибавлением нескольких капель 0,1 М HCl. Прибавляли 10 мкл RNКазы А в концентрации 2 мг/мл и инкубировали лизат при 37 °С в течение 30 мин. Добавляли SDS до конечной концентрации 1 % и протеиназу К до конечной концентрации 1 мг/мл, инкубировали в течение ночи при 37 °С, экстрагировали 4 раза смесь фенол:хлороформ (1:1). ДНК осаждали этанолом.

Электрофорез в агарозном геле и рестрикционный анализ. ДНК обрабатывали рестриктазами *Bam*HI, *Kpn*I и *Pst*I отдельно и в комбинации и подвергали электрофорезу в 0,7 %-м агарозном геле, используя трис-боратную буферную систему [11]. Молекулярные массы фрагментов определяли, сравнивая с маркерной ДНК фага λ , расщеп-

Таблица 1
Размеры рестрикционных фрагментов генома ВЯП *Mn*

Фрагмент	<i>Bam</i> HI	<i>Kpn</i> I	<i>Pst</i> I
A	68,1*	54,8*	44,1*
B	21,4*	27,0	22,0*
C	17,2*	21,2*	21,0
D	8,9	15,4*	17,2*
E	6,6	6,3	14,0
F	6,3	5,2	8,7
G	6,3	4,6	4,7
H	4,1	3,4	4,0
I	—	0,9	2,9
Мол. масса.	138,9	138,7	138,6

Примечание. Размеры фрагментов даны в тыс. п. н. *Фрагменты, размер которых определен как сумма размеров меньших фрагментов, полученных в результате переварки вгеномной рестриктазой.

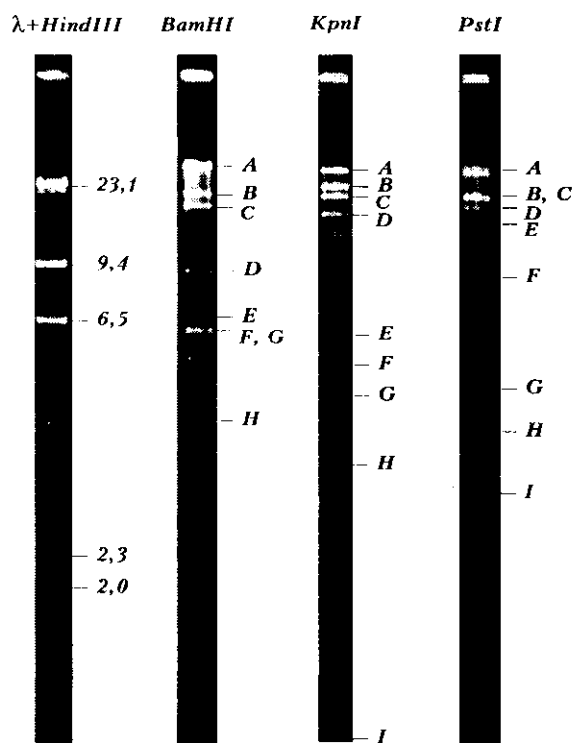


Рис. 1. Электрофореграмма ДНК ВЯП *Mn*, обработанной различными рестриктазами. Цифрами обозначены размеры фрагментов в тыс. п. н.

ленной рестриктазами *Hind*III, *Eco*RI, *Hind*III + *Eco*RI.

Результаты и обсуждение. Рестрикционный анализ ДНК ВЯП *Mn*. Как отмечалось выше, в нашей лаборатории получен индивидуальный генотипический вариант ВЯП *Mn*, ставший исходным при работе по молекулярно-структурному изучению генома этого вируса. Особенностью данного клона является то, что после нескольких пассажей в культуре клеток *Ar* он приобретает признаки гетерогенности. Гетерогенность вирусной популяции обнаруживалась в появлении новых минорных полос на электрофореграммах вирусной ДНК, обработанной различными рестриктазами. Эффект восстановления полной гомогенности вирусной популяции наблюдался при выделении анализируемой вирусной ДНК из клеток, трансфицированных ДНК вируса гетерогенной популяции. В дальнейшем для построения физической карты ВЯП *Mn* мы использовали именно такие гомогенные препараты ДНК вируса, полученные из трансфицированных клеток. ДНК ВЯП *Mn* подвергалась переварке рестриктазами *Bam*HI, *Kpn*I и *Pst*I. Электрофоретический профиль генома ВЯП *Mn*, переваренного этими ферментами, представлен на рис. 1. Субмолекулярные полосы отсутствуют на электрофореграммах, что доказывает гомогенность вирусных препаратов. Фрагменты каждой обработки были обозначены буквами в алфавитном порядке. При

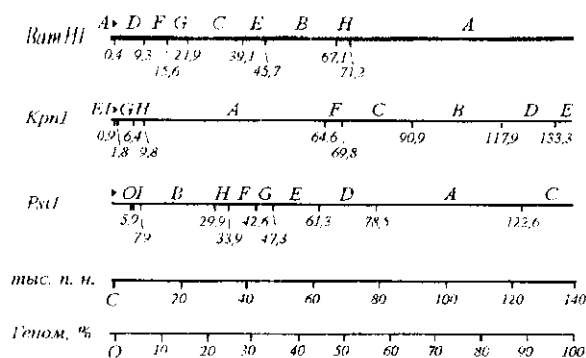


Рис. 2. Физическая карта генома ВЯП Мп для рестриктаз *BamHI*, *KpnI* и *PstI*. Буквы соответствуют фрагментам приведенным на рис. 1 и в табл. 1. Стрелка указывает расположение и направление гена полиэдрина

обработке рестриктазой *BamHI* получены 8 фрагментов, при обработке *KpnI* — 9 при обработке *PstI* — 9 фрагментов. Размер этих фрагментов представлен в табл. 1. Высокомолекулярные фрагменты *BamHI* — А, В, С; *KpnI* — А, С, D; *PstI* — А, В, С, D были дополнительно обработаны рестриктазами *PstI*, *KpnI*, *BamHI*, *EcoRI*. Их размер определен как сумма размеров полученных фрагментов. Кроме того, нами было осуществлено совместное переваривание вирусной ДНК рестриктазами *BamHI* + *KpnI*; *BamHI* + *PstI*; *KpnI* + *PstI* для уточнения некоторых деталей при картировании. Размер полного генома вычислен из суммы размеров фрагментов, полученных при действии каждой из рестриктаз, и подтвержден сравнением с суммой

Таблица 2
Результаты блот-гибридизации рестрицированной ДНК ВЯП Мп с зондами на основе фрагментов генома этого вируса

32Р меченный <i>BamHI</i> -фрагмент	Фрагменты, гибридизующиеся с зондом	
	<i>KpnI</i>	<i>PstI</i>
А	В, С, D, I	А, С, D
В	А, F	D, E, G
С	А	В, H, F
D	G, H	С, I
E	А	F, G
FG	А	В
Н	С, F	D

размеров фрагментов, полученных в результате совместных переварок. Он составил приблизительно 139 тыс. п. н.

Картирование генома ВЯП Мп. Из-за достаточно большого количества сайтов узнавания для рестриктаз *BamHI*, *KpnI*, *PstI* на геноме ВЯП Мп построить карту на основании только измерений длин фрагментов при простых и совместных переварках не удалось. Поэтому *BamHI*-фрагменты вирусного генома были выделены из геля, помечены и использованы в качестве зонда в реакции гибридизации с вирусной ДНК, расщепленной рестриктазами *KpnI* и *PstI*. Результаты блот-гибридизации представлены в табл. 2. На основании этих данных была построена физическая карта генома вируса для всех трех рестриктаз (рис. 2). Локализация соответствующих сайтов рестрикции была подтверждена прямым сравнением размеров фрагментов, полученных в результате простых и совместных переварок ДНК. Согласно предложению Влака и Смита [12], наименьший фрагмент, содержащий полный ген полиэдрина, избирается в качестве нулевой точки при картировании ДНК ВЯП. Как было показано ранее в работах нашей лаборатории, при обработке ДНК ВЯП Мп различными рестриктазами наименьшим фрагментом, включающим ген полиэдрина, является *BglII*-фрагмент размером 5,1 тыс. п. н. Данные по картированию сайтов для рестриктазы *BglII* на геноме ВЯП Мп нами не приводятся, поскольку требуют еще некоторых уточнений. Однако эти данные позволили нам соотносить *BglII*-фрагмент, включающий ген полиэдрина, с картой вирусного генома для рестриктаз *BamHI*, *KpnI*, *PstI*. Этот фрагмент был избран нами как нулевая точка линеаризованной карты кольцевого вирусного генома.

Построение физической карты позволило идентифицировать вирусный штамм, на основе которого в нашей лаборатории создана бакуловirusная система экспрессии. Наличие карты открывает возможность в дальнейшем приступить к более тонкому изучению структуры генома ВЯП Мп, исследовать генотипические варианты данного вируса. Построение физической карты может послужить отправной точкой при изучении полиморфизма вирусной популяции, наблюдаемое нами в созданной системе вирус — клетка.

И. М. Кихно, Л. И. Строковська

Фізичне картування геному вірусу ядерного поліедрузу *Malacosoma neustria*

Резюме

Складено фізичну карту кільцевого геному вірусу ядерного поліедрузу *M. neustria*. Локалізовано сайти для рестриктаз

BamHI, KpnI, PstI. На карті локалізовано ген поліедрина. Визначено розмір вірусного геному, що складає 139 тис. п. н.

I. M. Kikhno, L. I. Strokovskaya

Physical mapping of *Malacosoma neustria* nuclear polyhedrosis virus genome

Summary

A physical map of the circular M. neustria nuclear polyhedrosis virus genome was constructed. The complete order of BamHI, KpnI and PstI restriction enzyme sites was determined. The polyhedrin gene was localized on the map. The size of the viral DNA was calculated to be about 139 kbp.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Granados R. R., Federici B. A. The biology of baculoviruses // Practical application for insect control.— Boca Raton: CRC press, 1986, Vol. 2.—P.
2. Miller L. K. Baculovirus as gene expression vectors // Ann. Rev. Microbiol.—1988.—42, N 2.—P. 177—199.
3. Maeda S. Gene transfer vectors of a baculovirus. Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus, and their use for expression of foreign genes in insect cells // Invertebrate Cell Systems and Applications / Ed. J. Mitsuhashi.— Boca Raton: CRC press, 1984.—Vol. 1.—P. 167—181.
4. Скуратовская И. Н., Строковская Л. И., Комиссаренко С. В., Менделев Н. В. Структура и функция генома ВЯП *Malacosoma neustria* // Цитология и генетика.—1986.—20, № 1.—С. 31—36.
5. Строковская Л. И., Веселовский О. В., Кихно И. М., Мирюта Н. Ю. Клонирование гена полиедрина вируса

ядерного полиедроза *Malacosoma neustria* // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 3.—С. 81—83.

6. Строковская Л. И., Петренко А. И., Соломко А. П. Нуклеотидная последовательность гена полиедрина ВЯП *Malacosoma neustria* // Биополимеры и клетка.—1994.—10, № 5.—С. 105.
7. Строковская Л. И., Кихно И. М., Веселовский О. В. и др. Экспрессионный вектор на основе вируса ядерного полиедроза *Malacosoma neustria* // Там же.—1990.—6, № 3.—С. 84—89.
8. Сухорада Е. М., Канюка В. Ю., Милосердова В. Д. Размножение вируса ядерного полиедроза кольчатого шелкопряда при длительном пассировании в клетках перевиваемых линий насекомых // Эпизоопазоген. вирусы и их практ. значение.— Киев: Наук. думка.—1981.—С. 44—50.
9. Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // J. Mol. Biol.—98, N 2.—P. 503.
10. Черепенко Е. И., Мартыненко Е. И. Простой метод выделения бакуловирусной ДНК // Молекуляр. биология.—1985.—19, № 8.—С. 1519—1524.
11. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning: a Laboratory Manual.— New York: Cold Spring Harbor Lab., 1982.—452 p.
12. Vlak J. M., Smith G. E. Orientation of the genome of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: a proposal // J. Virol.—1982.—41, N 11.—P. 1118—1121.

УДК 578.841.1:577.113
Поступила в редакцию 08.07.96