

## 研究报告

# 灰茶尺蛾核型多角体病毒的精细结构及生物学特性研究

陈棣华 钟卫洲 栗陶生 石正丽

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

**摘要** 在湖北省茶园害虫灰茶尺蛾 (*Ectropis grisescens* W.) 幼虫体内分离到一株核型多角体病毒, 属杆状病毒科单粒包埋型。多角体呈不规则的多面体, 平均大小为  $1.76\mu\text{m}$ 。病毒粒子平均大小为  $287 \times 65\text{nm}$ , 粒子两端有环状的相状结构。测量 EgNPV-DNA 的分子量约为  $34 \times 10^6$  道尔顿。生物毒力测定其  $\text{LD}_{50}$  为  $8.6 \times 10^3$  PIB/ml。

**关键词** 灰茶尺蛾核型多角体病毒; 形态结构; 生物学特性

灰茶尺蛾 (*Ectropis grisescens* W.) 属鳞翅目尺蛾科, 是近几年在湖北省茶园大量流行的害虫, 1988 年陈棣华等<sup>[1]</sup>首次在灰茶尺蛾幼虫体内发现核型多角体病毒 (简称 EgNPV), 现对该病毒的精细结构及若干生物学特性进行了研究。

## 材料和方法

### (一) 材料

室内饲养灰茶尺蛾幼虫。用  $2 \times 10^6$  PIB/ml EgNPV 涂抹茶树鲜叶饲养 3 龄幼虫, 幼虫感染后发病致死, 收集虫尸保存在 50% 甘油中, 贮于冰箱备用。

### (二) 多角体及病毒粒子的提取与纯化

将感染致死的虫尸研磨过滤, 滤液经反复差速离心得多角体粗制品, 再经 40—60% (W/W) 蔗糖密度梯度离心, 3000 r/min 2 小时, 取多角体沉淀带, 离心洗去蔗糖, 得到纯净的多角体。置于 4℃ 待用。

纯化的多角体加适量的 0.5 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ —0.16 mol/L NaCl 溶液, 室温下降解 10 分钟, 加入 5 倍体积蒸馏水中和, 用 6000 r/min 离心 20 分钟, 去沉淀。上清液经 14000 r/min 离心 20 分钟, 其沉淀即为病毒粒子。

### (三) 电镜样品制备

1. 纯化的多角体, 滴在覆盖有 Formvar 膜的铜片上, 经戊二醛固定, 常规脱水, 临界点

干燥处理, 黄金旋转喷镀, 用 KYKY-Amray-1000B 型扫描电镜观察。另外, 将多角体悬液滴在备有 Formvar 膜的铜网上, 在 JEM-100C 型透射电镜下观察。

2. 多角体按常规方法固定、脱水、包埋、聚合, 用 LKB-2128 型超薄切片机切片。透射电镜观察。

3. 核酸释放: 提纯的病毒粒子悬液, 用 5 倍的 0.5 mol/L 的尿素, 在室温下处理 8—10 小时, 取 30  $\mu\text{l}$  上述溶液加入 50  $\mu\text{l}$  2 mol/L 的醋酸铵, 10  $\mu\text{l}$  pH8.0, 0.5 mol/L 的 EDTA 和 10  $\mu\text{l}$  10 mg/ml 的细胞色素 C, 制成展层上相液, 用双蒸水为下相液, 进行单分子展层, 用 Formvar-碳膜的铜网沾取病毒核酸, 经处理后在钨-钼合金旋转投影, JEM-100C 电镜观察。

### (四) 感染试验

将 5 种 2—3 龄鳞翅目幼虫, 分别用 EgNPV 悬液 ( $1-2 \times 10^7$  PIB/ml) 涂抹叶片饲养, 统计其死亡率。

### (五) 毒力测定

用不同浓度的 EgNPV 病毒悬液分别涂抹鲜叶, 喂养 2 龄灰茶尺蛾幼虫, 按常规生物统计法<sup>[2]</sup>计算出  $\text{LC}_{50}$  及  $\text{LT}_{50}$ 。

## 结果和讨论

### (一) 多角体的形态结构

多角体大多数呈多面体, 少数为正六面体。

表面较粗糙,大小差距较大,从  $1.31-2.76\mu\text{m}$ ,平均约为  $1.76\mu\text{m}$ (图 1-1)。多角体由一层多角体膜包裹,内含大量按晶格排列的多角体蛋白<sup>[3]</sup>,单粒包埋的病毒粒子随机散布其中。当用稀碱溶液处理到适度时,多角体蛋白已降解,可看到多角体膜内包含着大量病毒粒子(图 1-2)。因此属昆虫杆状病毒科(Baculoviridae) A 亚组,单粒包埋型。

## (二) 病毒粒子与核衣壳

病毒粒子呈杆状,两端钝圆,平均大小约为  $287 \times 65\text{nm}$ 。病毒粒子经高度放大后,在其两端均清晰可见有环状突起的帽状结构。推测也许与侵染宿主细胞时的识别位点有关,和一般的杆状病毒粒子相比,帽状结构特别明显<sup>[4]</sup>。并可观察到病毒粒子外围是一层双层膜结构的套膜,内有两端平切杆状的核衣壳。脱去套膜

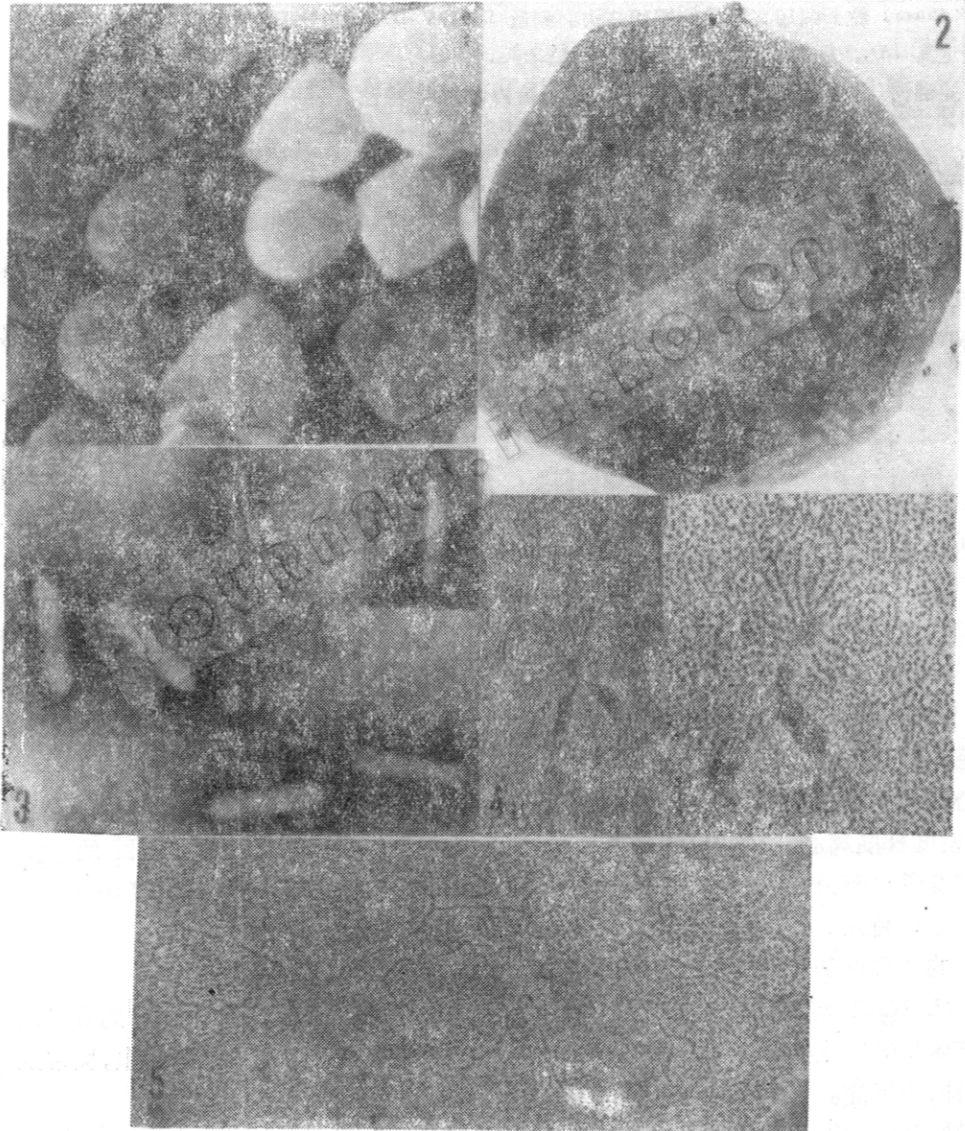


图 1 灰茶尺蠖病毒多角体形态结构图

1. 灰茶尺蠖病毒多角体(扫描电镜 $\times 8000$ ) 2. 碱解过程中的 EgNPV ( $\times 16700$ )
3. 病毒粒子顶端的环状结构( $\times 60000$ ): 环状结构,核衣壳及套膜
4. 正在释放核酸的病毒粒子; a( $\times 30000$ ), b( $\times 60000$ )
5. EgNPV 的环状 DNA 分子( $\times 39000$ )

后的核衣壳比病毒粒子柔软及略有伸展(图 1-3),核衣壳内含病毒核酸及衣壳蛋白。

### (三) 病毒核酸

核型多角体病毒基因组均为闭环双链 DNA, DNA 以超螺旋形式存在核衣壳内,通过一步释放法,利用渗透压的骤然改变的原理,直接从病毒粒子中释放出 DNA 大分子。由于释放的程度或时间不一,可以观察到有的 DNA 分子正从病毒粒子中伸展出来(图 1-4a, b),而完全从病毒粒子中释放出来的 DNA 有线状、环状、超螺旋状三种。这是因为在处理过程中物理作用造成的,可以通过完全伸展的环状 DNA,按其长度计算出核酸的分子量<sup>[9]</sup>。从图 1-5 测量并计算出 EgNPV-DNA 的分子量约为  $34 \times 10^6$  道尔顿,较一般昆虫杆状病毒 DNA 分子量为小。这尚须今后与基因图谱中测出的分子量相互验证<sup>[6,7]</sup>。

### (四) 宿主范围

2 龄的茶尺蠖、家蚕、菜粉蝶、斜纹夜蛾和油桐尺蠖幼虫,经 EgNPV 感染,试验组与对

照组的死亡率相似。试验组的病死虫经镜检亦未见多角体。同时,将茶尺蠖核型多角体病毒感染 3 龄灰茶尺蛾,试验组的死亡率亦不比对照组高。因此, EgNPV 不能感染以上 5 种鳞翅目昆虫。

### (五) 生物毒力测定

2 龄幼虫其感染浓度与幼虫死亡回归直线方程为  $y = 0.1466 + 0.8178x$ ,  $r = 0.9696$ ,  $LC_{50} = 8.6 \times 10^5$  PIB/ml。当气温在 25℃ 左右,感染浓度为  $1.78 \times 10^8$  PIB/ml 时,2 龄幼虫  $LT_{50}$  为 5.5 天。

### 参 考 文 献

1. 陈棣华等: 茶叶科学, 9(1): 91—92, 1989.
2. 杨纪珂等: 应用生物统计, 第 303—317 页, 科学出版社, 北京, 1984.
3. Harrap, K. A.: Virology, 50(1): 114—132, 1972.
4. 张立人等: 中国科学, 4: 398—401, 1979.
5. 王学兰等: 科学通报, 28(24): 1524—1526, 1983.
6. Smith, G. E. et al.: Virology, 89(2): 517—527, 1978.
7. 陈棣华等: 病毒学报, 3(1): 69—75, 1987.