

## 研究报告

# 华山松大小蠹痘病毒核酸和多肽研究

汤显春 孙富林

樊美珍 郭超

(中国科学院武汉病毒研究所)

(西北林学院林学系)

**摘要** 华山松大小蠹痘病毒 (*Dendroctonus armandi* Tsai et Li Virus 简称 DaEPV) 是近年发现的一种病毒, 但对其理化性质尚未见报道。我们对该病毒核酸和病毒蛋白进行了分析。提纯的核酸经紫外吸收光谱扫描其 O.D 值  $260/280=1.84$ 。电镜观察可见环状结构, 其分子量为  $70.46 \times 10^6$  道尔顿。DaEPV 蛋白同时采用不连续系统的 SDS-PAGE 凝胶电泳法测定为 7 条多肽。

**关键词** 痘病毒; 核酸; 蛋白多肽

## 材料与 方法

### (一) 材料

1986 年在陕西秦岭林区, 从自然死亡的华山松大小蠹虫分离到一株痘病毒, 经鉴定属于痘病毒科昆虫痘病毒属<sup>[1]</sup>。

### (二) 方法

1. 病毒的提取: 按常规方法提取病毒。将病虫尸加少量蒸馏水研磨、过滤、差异离心, 悬液经 G-5 型漏斗过滤, 滤液经非连续的蔗糖密度梯度 (65, 55, 45%, W/W 各 10ml) 与两次线性蔗糖密度梯度离心分离, 收集沉降带, 获得的病毒离心 3 次去蔗糖, 最后获得纯净乳白色沉淀物 (即病毒) 置 4℃ 冰箱备用。

2. 痘病毒粒子的提取: 取纯净病毒 0.5ml 加两倍体积碱液 (0.1mol/L  $\text{NaCO}_3$ -0.1mol/L NaCl, pH 10.8) 混匀, 置 35℃ 水浴 30 分钟。再加 5 倍体积的双蒸馏水稀释, 置 4℃ 冰箱存 3—4 小时后取出, 经 15000r/min 10℃ 离心 100 分钟。上清液 (病毒蛋白) 存冰箱, 沉淀为痘病毒粒子。

3. 痘病毒蛋白的制备: 取上述保存冰箱的上清液 165ml, 加 HCl 调 pH 至 5.74 左右, 3000r/min 离心 5 分钟, 弃上清, 沉淀加双蒸馏水至 3ml, 存冰箱至有明显分层时, 分别分层备用。

4. 核酸的制备: 取一定量的痘病毒粒子加入 5 倍 0.1mol/L  $\text{NaCO}_3$ -0.05mol/L NaCl, 然

后用 HCl 调 pH 9—10, 置室温下作用 25—30 分钟, 使病毒大部分降解, 悬液由混浊变乳白直至半透明。加入 10% SDS, 终浓度为 0.4%, 再加入等体积的水饱和酚, 反复抽提, 至界面无蛋白为止, 又加入 2.5 倍的冰冷乙醇反复漂洗后溶于 TE 缓冲液中, 存冰箱备用。

5. 病毒核酸电镜观察: 取核酸 0.01ml 加 0.1ml 2mol/L 醋酸铵及 0.01ml 3.8mg/ml 细胞色素 C, 配制展层液, 以水为下相液进行单层扩展, 用复有火棉胶-碳膜的铜网捞取展层中的核酸, 在无菌无水的乙醇中脱水 5 秒钟左右, 在 JEE-4 型喷涂仪上进行铂钨合金旋转投影, 电镜观察拍照。

6. 琼脂糖凝胶电泳, 内切酶分析: 限制性内切酶 EcoRI, BamHI 和标准  $\lambda$ DNA (购于华美生物公司)。

7. 痘病毒核衣壳蛋白结构多肽分析: 采用两相系统, 浓缩胶为 4%, 缓冲液 pH6.7 的 Tris-HCl, 分离胶为 10%, 缓冲系统 pH8.9 的 Tris-HCl, 电泳缓冲系统为 pH8.3 的 Tris-Gly。

国产标准蛋白系列: 磷酸化酶 B94K, 碳酸肝酶 30K, 牛血清白蛋白 67K, 烟草花叶病毒外壳蛋白 17.5K, 肌动蛋白 43K。

电泳电流为 10—35mA, 电泳时间 3.5 小时左右, 电泳后用 0.05% 的考马斯亮蓝 R250 染色过滤, 于 7.5% 乙酸-5% 甲醇中脱色。结果做工作曲线, 求样品蛋白多肽的分子量。

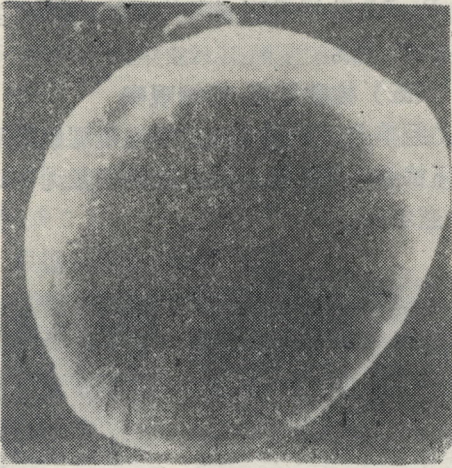


图1 DaEPV 形态,示椭圆形包涵体(3400×)

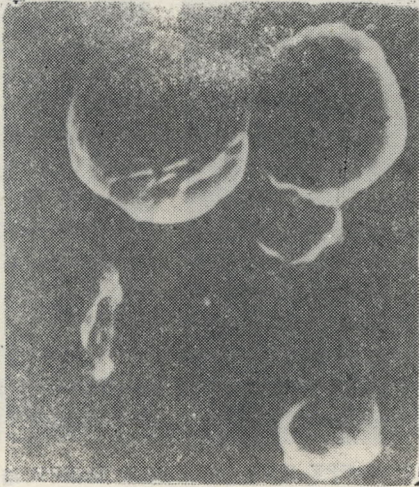


图2 DaEPV 球形包涵体(1140×)

## 结果与讨论

### (一) 华山松大小蠹病毒包涵体的形态

提纯的痘病毒包涵体经扫描电镜观察,有椭圆形和球形两种。椭圆形包涵体有明显的双层壁,水片下呈淡黄褐色,大小为  $6.275 \pm 0.567 \times 4.453 \pm 0.638 \mu\text{m}$ , 内无病毒粒子(图1)。球形包涵体无色,表面呈不规则的波纹状,大小为  $7.883 \pm 0.392 \mu\text{m}$ , 内有 8—40 颗病毒粒子(图2)。

### (二) 病毒粒子的形态

病毒粒子多为卵形,少为椭圆形,大小为  $208.33 \times 129 - 187.5 \times 104.2 \text{nm}$ , 外有两层膜



图3 DaEPV 组织包埋超薄切片,示病毒粒子一侧向内凹陷(1500×)

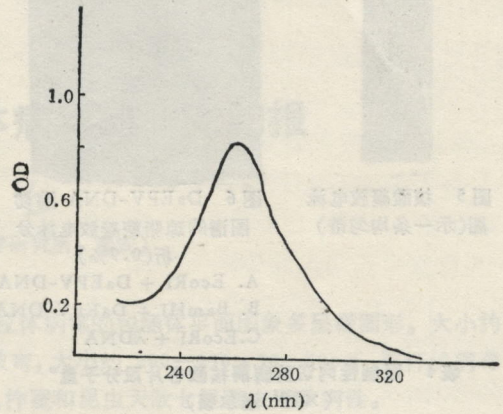


图4 DaEPV-DNA 紫外吸收峰

包被,一膜厚 21 埃,另一膜厚 30 埃。两膜之间有清楚的空隙。病毒核心呈典型的三层结构;有病毒粒子,一侧向内凹陷,略呈哑铃形(图3)。

### (三) 核酸的纯化

提取的核酸经紫外吸收光谱测定为典型的核酸峰,吸收光谱  $OD_{260}/OD_{280} = 1.84$ (图4)。核酸经琼脂糖凝胶上电泳 3 小时。溴化乙锭染色后呈一条均匀带(图5)。重复数次证明,所提核酸较纯。

### (四) 限制性内切酶酶解核酸带谱及分子量测定

在同一条件下,经限制性内切酶 *EcoRI* 酶解得到 17 条带的片段, *BamHI* 得到 7 条片段带,核酸各片段分子量见表 1。以标准  $\lambda$  DNA



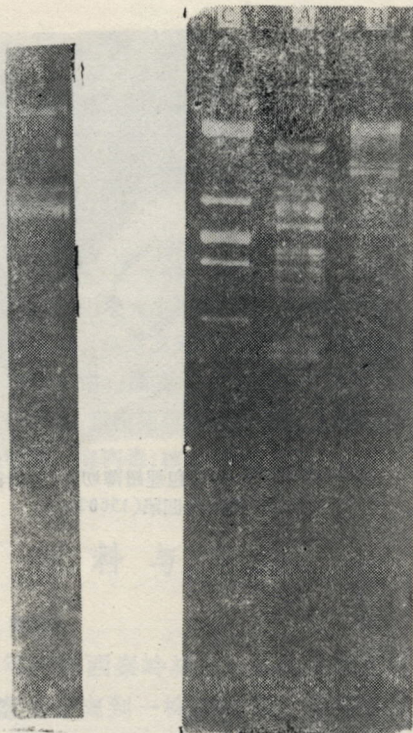


图5 核酸凝胶电泳图(示一条均匀带)

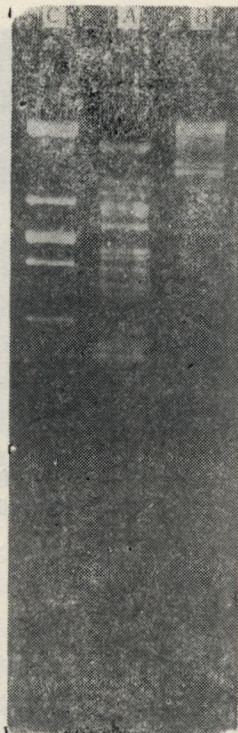


图6 DaEPV-DNA 酶切图谱的琼脂糖凝胶电泳分析(0.9%)  
A. EcoRI + DaEPV-DNA  
B. BamHI + DaEPV-DNA  
C. EcoRI +  $\lambda$ DNA

表1 限制性内切酶解核酸各片段分子量\*  
( $\times 10^4$  道尔顿)

片段	DaEPV-DNA + EcoRI	DaEPV-DNA + BamHI
A	13.18	26.40
B	6.47	21.78
C	5.49	8.13
D	4.90	7.59
E	4.69	4.37
F	4.47	3.89
G	4.07	2.04
H	3.50	
I	3.32	
J	3.12	
K	3.01	
L	2.76	
M	2.67	
N	2.10	
O	1.93	
P	1.86	
Q	1.81	
Sum	69.34	74.20

\* DaEPV-DNA 平均分子量为  $71.77 \times 10^4$  道尔顿

与 EcoRI 酶解得到 6 条片段带(图 6),多次重复均为一致。

### (五) 核酸展层、电镜观察

经单分子膜展层,透射电镜观察核酸可见呈环状结构(图 7)。计算其分子量为  $70.46 \times 10^6$  道尔顿。

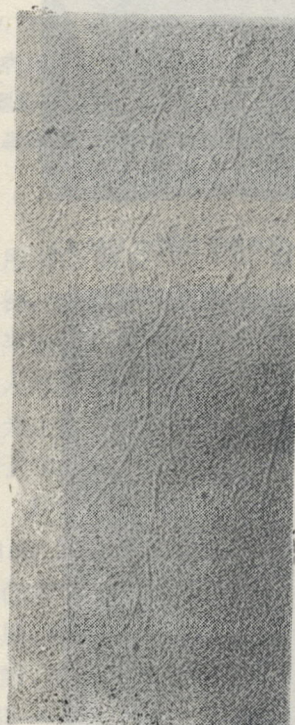


图7 DaEPV-DNA 单分子膜展层呈环状结构(33500 $\times$ )

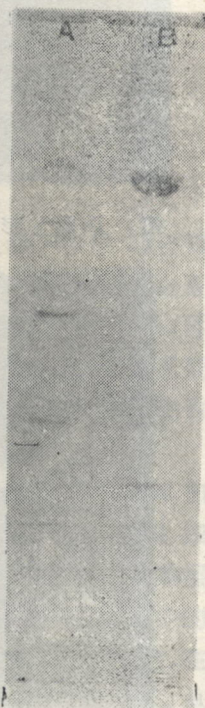


图8 DaEPV 结构蛋白的 SPS-PAGE (10%)  
A. 标准蛋白 B. DaEPV 结构蛋白

表2 DaEPV 蛋白多肽带迁移情况(前延 6.66 cm)

距离(cm)	标准蛋白分子量(K)	MR*	DaEPV 蛋白多肽		
			距离(cm)	MR*	分子量(K)
1.23	94	0.185	2.20	0.330	58.5
1.88	67	0.282	2.25	0.338	56.5
2.64	43	0.396	2.32	0.348	54.5
3.84	30	0.577	4.87	0.731	39.5
5.26	17.5	0.790	3.00	0.450	21.6
			5.26	0.790	18.5
			6.10	0.916	10.5

\* MR: 迁移率=距离/前延

### (六) DaEPV 核衣壳蛋白多肽

DaEPV 核衣壳蛋白同时采用不连续系统 SDS-PAGE 凝胶电泳法测定结果为 7 条多肽 (图 8)。

求待测 DaEPV 蛋白的分子量,以 DaEPV 蛋白多肽的相对迁移率在标准蛋白曲线上查分子量(表 2)。

根据标准蛋白回归方程

$$y = 0.8199 - 0.0074334X$$

DaEPV-DNA 经限制性内切酶酶解分析,测出分子量为  $71.77 \times 10^6$  道尔顿,与电镜展层计算,分子量为  $70.46 \times 10^6$  道尔顿,结果基本一致。

DaEPV 蛋白多肽的结果,由于标准蛋白系

列的差异而不太稳定。但正如国内外许多报道的那样,蛋白和核酸生化分析在病毒分类工作中有极其重要的意义<sup>[2-4]</sup>。

本实验对 DaEPV 蛋白和核酸理化性质的分析,为进一步研究该病毒的各种性质提供了必要的依据。

## 参 考 文 献

1. 樊美珍等: 杀虫微生物, 1: 140—141, 1987.
2. Keith A H et al.: Virology, 79:14—16, 1977.
3. Keith D and Summers M O; Virology, 112:190—197, 1981.
4. John O.K. et al.: Virology, 113: 381—392, 1982.

# 宽边小黄粉蝶颗粒体病毒的研究初报

孙 发 仁

(山东省泰安市农业科学研究所, 泰安)

**摘要** 宽边小黄粉蝶 (*Eurema hecabe* L.) 颗粒体病毒的包涵体平面图象多呈椭圆形, 大小约  $300-500 \times 150-300 \mu\text{m}$ , 病毒粒子杆状, 两端圆滑, 微弯, 大小约  $200-250 \times 50-60 \text{nm}$ , 属杆状病毒属 (*Baculovirus*) B 亚组。此株病毒对经济昆虫家蚕、柞蚕和昆虫天敌七星瓢虫无致病性。

**关键词** 宽边小黄粉蝶; 颗粒体病毒

宽边小黄粉蝶 (*Eurema hecabe* Linnaeus) 属鳞翅目粉蝶科 (*Pieridae*)。幼虫主要危害胡枝子、合欢、云实、皂荚、山扁豆、合萌和苜蓿等豆科植物<sup>[1]</sup>。1980 年 7 月, 在泰山发现自然患病死亡的宽边小黄粉蝶幼虫, 经采集、分离鉴定, 其病原体是一种颗粒体病毒。室内经多次感染 2—4 龄的宽边小黄粉蝶幼虫, 其致死力均在 90% 以上, 且寄主专一性强, 对菜粉蝶 (*Pieris rapae* Linnaeus)、云斑粉蝶 (*Pontia daplidice* Linnaeus)、黄粉蝶 (*Colias hyale* Linnaeus)、银纹夜蛾 (*Plusia agnata* Staudinger)、甘蓝夜蛾 (*Barathra brassicae* Linnaeus)、杨毒蛾 (*Leucoma salicis* Linnaeus)、柞蚕 (*Antheraea pernyi* Guérin-Méneville)、家蚕 (*Bombyx mori* Linnaeus) 和七星瓢虫 (*Coccinella septempu-*

*nctata*) 9 种鳞翅目幼虫, 均未获得交叉感染。

本文着重报道该株病毒的分离和形态观察结果。

## 材 料 和 方 法

### (一) 材料来源和保存

将从野外采回自然患病的宽边小黄粉蝶幼虫尸体捣烂, 加无菌水浸泡, 然后多层纱布过滤, 其滤液加青霉素和链霉素 (各 2000u/ml) 处理 12 小时, 对 2—3 龄宽边小黄粉蝶进行沾食感染, 收集明显表现病毒病症状的病虫保存于 50% 甘油或冰箱中。

承中国人民解放军济南军区总后勤医院电镜室协助 拍摄电镜照片, 特此致谢。