

两种提取菜粉蝶颗粒体病毒方法的比较

梁 东 瑞 张 起 麟

(武汉大学病毒研究所, 武汉)

为了有效的制备菜粉蝶 (*Pieris rapae*) 颗粒体病毒(简称 PrGV)杀虫剂。我们对丙酮-乳糖共沉和低速差速离心两种提取病毒的方法进行了比较。前者是以乳糖作为病毒包涵体表面的

保护层,利用有机溶剂-丙酮对脂类等有机物质溶解和降低溶液的介电常数等特性,使增加病毒表面不同电荷之间的引力,形成絮状沉淀物,使病毒从溶液中脱水沉降,制成粉状的干制品。

后者是依据病毒的大小和密度不同,在一定的离心场中和一定的时间内能以沉降的原理,借以制成冻干制品。实验中,我们参照 Dulmage 等所做的丙酮-乳糖共沉法和离心法提取粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 核型多角体病毒的结果^[1],并按照 David 和 Burges 等人的方法作了颗粒体计数^[2-3]。现将结果报告如下。

材 料 和 方 法

一、丙酮-乳糖共沉法提取病毒

取病虫 2,000 头称重后捣碎,以重量比加入 30—40 倍的 pH7.2, 0.15M 磷酸缓冲液 (PBS) 即每克病虫体需加 30—40ml PBS 稀释,然后于 60 目尼龙纱网中过滤,滤液在 1,500—2,000rpm 离心 15—20 分钟,弃去沉淀,上清液再于 3,800—4,000rpm 离心 90—120 分钟(即一轮次),弃上清液。沉淀物以 1:10 的重量比,加入 4—6% 的乳糖液(即 1 克沉淀物加 10ml 4—6% 乳糖液),于搅拌器中充分搅拌,使沉淀物均匀悬浮于溶液中,再缓缓加入 4 倍量丙酮,边加边搅拌 30 分钟,静置 10 分钟,用普通滤器抽滤或用 3500rpm 离心约 20 分钟,将抽滤物或沉淀物取出,再缓缓加适量丙酮,边加边搅拌 30 分钟,再抽滤或离心。如此重复 2—3 次即可获得灰白色的病毒块状物。所得的病毒经冷冻干燥或置干燥塔干燥,研磨过 100 目筛,称重,即为成品。提取过程如图 1。

也可不经离心处理,将病虫称重捣碎,按 1g 病虫体加 2ml 4—6% 乳糖溶液,搅拌 15—20 分钟,以尼龙纱网滤去残渣,再缓缓加入 4 倍丙酮,继续搅拌 30 分钟,以下操作过程与图 1 相同。

二、低速差速离心法提取病毒

将 2,000 头病虫称重后捣碎,如同上法加 PBS 过滤去渣,滤液经重复 3 个轮次离心,即得灰白色病毒沉淀。用吸水纸吸干沉淀表面水分,置干燥塔内干燥或冷冻真空干燥。

求病毒含水量时,先称取上述病毒沉淀若

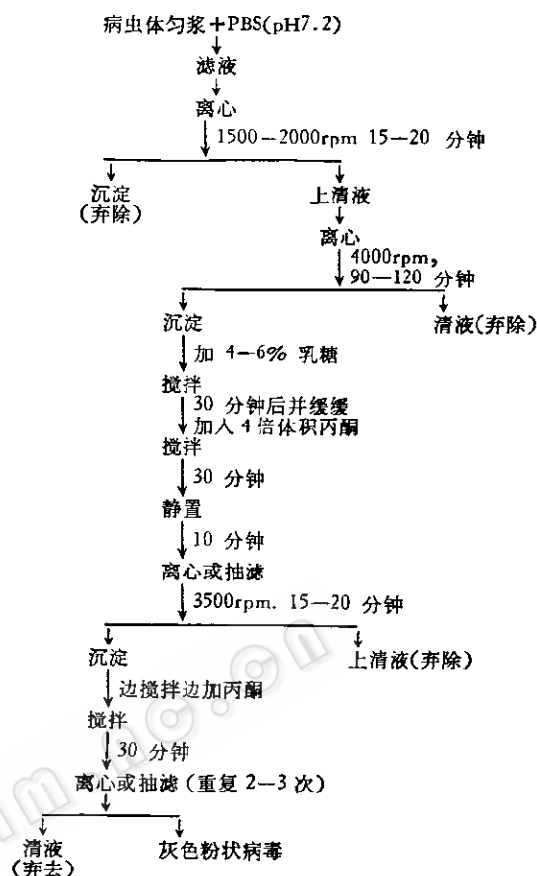


图 1 丙酮-乳糖共沉法提取 PrGV 过程

干,烘干后再称病毒干重,计算出所失水分即为病毒含水量。

结 果 和 讨 论

一、两种病毒提取方法的比较

1. 取 2,000 头总重量为 422g, 平均每头体重为 0.21g 的病虫体先用低速差速离心一个轮次后,再用丙酮-乳糖共沉法提取,所得病毒总量为 12.64g,平均每头感病死虫含病毒 6.32 mg。在电镜下观察病毒中含杂质较少。这样提取的病毒,经过毒力的生物测定,合格后可作为标准样品。

2. 用丙酮-乳糖共沉法(不经差速离心)由 1,000 头病死的总重量为 210g 的虫体所提取的病毒总量为 19.92g,平均每头病虫含病毒 19.92 mg。比先经一个轮次低速差速离心所得的病

表 1 不同提取菜粉蝶颗粒体病毒方法的比较

提 取 方 法	病 死 虫 (头)	虫体总重 (g)	平均体重 (g/头)	GV 总量 干重 (g)	平均每头含 GV 干重(mg)	比 重 GV重/虫体重
低速差速离心法 (三轮次)	4000	844	0.21	25.2	6.3	2.98
丙酮-乳糖共沉法 (先低速差速离心一轮次)	2000	422	0.21	12.64	6.32	2.99
丙酮-乳糖共沉法 (直接法)	1000	210	0.21	19.92	19.92	9.48

毒量高 3 倍,从电镜中观察可见较多的病虫体细胞碎片等杂质。

3. 用低速差速离心的 4,000 头病死虫体,总体重为 844g,共提取病毒 25.2g,每头病虫含病毒 6.3mg,经电镜观察,病毒比较纯净。

从表 1 可以看出,用低速差速离心法和丙酮-乳糖共沉法(先经一轮次低速差速离心)所得的病毒量基本上相等,可能由于差速离心法经三轮次洗涤杂质较少,病毒较纯净,沉淀物的比重相对的较共沉法大。而直接用丙酮-乳糖共沉法所得的病毒比先经一轮次低速差速离心所得的病毒量高 3 倍,这是因为未经离心去沉渣,病毒中尚有大量杂质和细胞碎片所致。但是采用这种共沉法提取病毒作为病毒杀虫剂材料,还是一种较好的方法,既可免去离心操作又可节省人力和时间,丙酮还可用水浴蒸馏法回收再用。但作为进一步的研究材料,无论哪种方法所得病毒都需要进一步提纯^[5-6]。而且都不可能将 PrGV 全部沉降,一般产率为 80—95%。

将低速差速离心所得的病毒用烘干法测定其含水量为 35%。

将丙酮-乳糖共沉法(经一轮次离心)和低速差速离心法提取的制品,经冰箱保存两个月后,分别取 GV 含量为 1×10^{-6} mg/ml 浓度感染 2—3 龄菜青虫,结果 10 天内幼虫死亡率分别为 73.3% 和 72.8%。表明两种方法提取的病毒其毒力并无显著差异,丙酮对 PrGV 活力无损。经过连续 7 个月的 LC_{50} 测定,毒力比较稳定,其 LC_{50} 的变化范围在 6.72—6.94 之间^[7]。而且这些制品的颗粒体病毒都容易重悬浮于水中。因而可将丙酮-乳糖共沉法(经一轮次离心)提取的制品作为病毒毒力生物测定的标准样品。

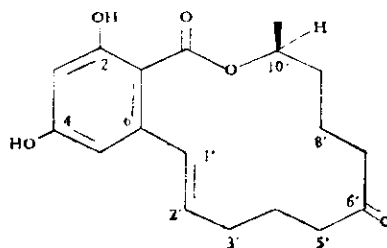
二、病毒的显微计数

取 10mg 低速差速离心提取的病毒样品,再经蔗糖梯度超速离心提纯后^[2],用 Petroff-Hausser 计数器在相差显微镜下计数,结果每 mg 病毒含颗粒体数为 9.8×10^8 个。从 4,000 头病死虫用低速差速离心法提取的病毒,每头平均含病毒 6.3mg,所以每头病虫含颗粒体数为 6.2×10^9 个。此结果与 Hostetter 等人对 PrGV 所获得的计数结果 6×10^9 Capsules/头相符^[4]。


参 考 文 献

- [1] Dulmage, H. T., A. J. Martinez and J. A. Carrea: *J. Invert. Pathol.*, **16**, 80—83, 1970.
- [2] David, W. A. L. and B. O. C. Gardiner: *J. Invert. Pathol.*, **9** 555—562, 1967.
- [3] Burges, H. D. and N. W. Hussey: *Microbial Control of Insects and Mites*. 广东农林学院林学系等译《昆虫和螨类的微生物防治》,科学出版社,北京,1977, pp 338—341 和 382—388.
- [4] Hostetter, D. L. et al.: *Environ. Entomol.*, **2** (6): 1109—1111, 1973.
- [5] 刘年翠、梁东瑞、张起麟: 武汉大学学报(自然科学版), 1981 年第 2 期, pp. 49—51.
- [6] 汪涛、叶林柏、刘年翠: 武汉大学学报(自然科学版), 1981 年第 2 期, pp. 61—67.
- [7] 刘年翠、梁东瑞: 武汉大学学报(自然科学版), 1981 年第 2 期, pp. 69—75.

更正: 本刊 10 卷 2 期,“霉玉米粉中赤霉烯酮的分离、提纯和鉴定”一文中图 1,应为下图。



高等院校教学



编者按：目前微生物学科涉及应用的方面甚多，涉及的实验技术也很多，单凭口授和阅读的方式教学，不但课时不足，效果也差。南开大学杨文博老师大胆尝试使用电化教学手段，是一个很好的开始。我们认为这一手段颇值得深入探索。希望大家开动机器，在微生物学教学中创出更多的新路子，开创出一个新局面。