

菜白蝶非包涵体病毒感染叙利亚金地鼠肾上皮细胞系 (BHKp 925) 的研究

周济川 柯丽华 彭可村 邓海凡

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

昆虫病毒感染体外培养的哺乳动物细胞, 获得成功的有大蜡螟 (*Galleria mellonella*) 浓核病毒 (Densonucleosis Virus) 感染小白鼠 L 细胞和小白鼠胚成纤维细胞^[1], 家蚕核型多角体病毒的 DNA 感染人羊膜 FL 细胞^[2]。我们从罹病死亡的菜白蝶 (*Pieris rapas* L.) 虫体中分离到的一株非包涵体病毒感染 BHKp 925 上皮细

胞时, 出现典型的细胞病变作用。现将研究结果介绍于下。

材 料 和 方 法

(一) 细胞与培养液

自建的 BHKp 925 细胞按常规方法传代。

蔡宜权同志对本工作作过指导, 陈丽德等参加部分工作。

培养液为含 0.25% 水解乳蛋白的 199 液 80%，56℃ 灭活 30 分钟的乳牛血清 20%，以 3.5% NaHCO₃ 调 pH 7.4 左右。

(二) 病毒分离及无菌处理

病毒分离参见文献[3]。

经电镜观察证明虫尸中含病毒粒子较多的样品，以 3500 rpm 离心 1 小时，取上清液，加青霉素、链霉素和卡那霉素各 500u/ml，置 37℃ 培养 4—5 天，观察有无杂菌生长，如有生长，依上法再行处理，直至无杂菌生长，置冰箱保存备用。

(三) 非包涵体病毒感染细胞试验

将长成单层的 19—21 以及 54 代的 BHKp 925 细胞用 Hank's 液洗一次，接种 0.2 ml 病毒原液和不同稀释度的病毒液于细胞单层上，室温吸附 1 小时后，吸出多余的病毒液，每瓶加入 1ml 新培养液，置 37℃ 静置培养。

(四) 病变细胞培养液添食感染健康菜白蝶幼虫

为了证实非包涵体病毒使 BHKp 925 细胞发生病变的特异性，将病变细胞的培养液(内含从细胞中释放出的病毒粒子)涂在新鲜菜叶的两面，添食 1—3 龄健康菜白蝶幼虫，每次换叶时添食，连续添食 3—4 次。同时设两个对照组：一组添食正常细胞培养液，另一组为正常健康幼虫。每天观察幼虫发病情况。

(五) 病变细胞培养液和正常细胞培养液的电镜观察

经 3 次连续冰冻与解冻的病变细胞培养液和正常细胞培养液，以 3000 rpm 离心 30 分钟，分别取上清进行电镜观察，有无病毒粒子存在。

实验结果

(一) 细胞病变特征

以非包涵体病毒感染的 BHKp925 上皮细胞，在 37℃ 培养 6 天左右，出现典型的细胞病变，胞核胀大，病毒在细胞核内形成内含物(图 1)，类似大蜡螟浓核病毒感染小白鼠 L 细胞^[1]和家蚕成纤维细胞^[4]时出现的细胞病变特征。以连续 10 倍稀释的病毒接种细胞时，随着稀

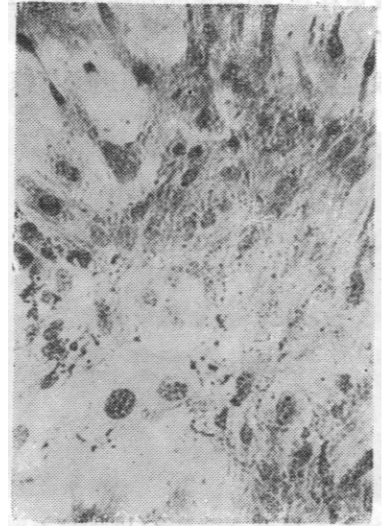


图 1 菜白蝶非包涵体病毒感染 BHKp 925 上皮细胞，580×

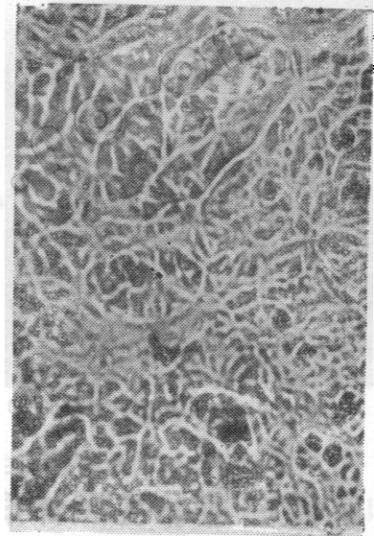


图 2 正常 BHKp925 上皮细胞，580×

度的加大，其病变作用逐步减弱，到 10⁻³ 时细胞病变作用消失。未感染非包涵体病毒的正常细胞始终未出现病理变化(图 2)。

(二) 添食感染后幼虫罹病情况

以病变细胞培养液添食感染 1—3 龄健康菜白蝶幼虫后，罹病幼虫起初厌食，急躁，盲爬，发育不正常，随着病情加重，4 天左右死亡，死亡率达 30—50%，虫尸呈褐色，尸体表面呈皱褶性萎缩。

为了证实病毒引起幼虫罹病死亡的特异性，将虫尸按文献[3]的方法分离病毒，经电镜

观察证实虫尸中均存在有与原始病毒形态相同的病毒粒子,共观察了5次,但每次的病毒含量有所差异,最多的一个视野中有20个病毒粒子,少的有6个粒子。添食正常细胞培养液的幼虫除一头死于病菌外,其他均存活(见表1)。

表1 病变细胞培养液添食感染后菜白蝶幼虫的死亡情况

	试验次数	试验虫数(头)	虫龄	处理方法	添食次数	死亡始期(天)	死亡虫数(头)	死亡率(%)
试验组	1	10	1-3	病变细胞培养液原液	3	4	4	40
	2	10	1-3		3	4	5	50
	3	10	2-3		3	4	3	30
	4	10	1-3		3	4	5	50
	5	20	2-3		4	5	6	30
对照组	1	10	1-3	正常细胞培养液	3	0	0	0
	2	10	1-3		3	8	1*	10
	3	10	1-3		3	0	0	0
	4	10	1-3	正常幼虫	3	0	0	0
	5	10	1-3		3	0	0	0

* 死于病菌

(三) 病变和正常细胞培养液的电镜观察

3次连续冰冻与解冻的病变细胞培养液证实存在有与原始病毒形态相同的病毒粒子(未浓缩提纯)(图3)。以同法处理的正常细胞培养液则无。

(四) 非包涵体病毒传代后毒力的变化

非包涵体病毒在BHKp925细胞中传代时,接种病变细胞培养液0.5 ml,前五代中每代均出现与原始病毒相同的细胞病变特征,并分离到相同的病毒粒子。随着毒种传代数的增加,其细胞病变作用逐步减弱,传五代时出现微弱细胞病变,传至6代以后细胞病变消失。但在经浓缩的培养液中仍有病毒粒子。

讨 论

本试验用电镜观察病变细胞培养液(包括毒种传代的病变细胞培养液)证明其中存在有与原始病毒形态相同的病毒粒子。病变细胞培养液添食感染健康菜白蝶幼虫时,导致幼虫罹病死亡,从虫尸中又能分离到相同的病毒粒子。由此证明菜白蝶非包涵体病毒对BHKp925上皮细胞引起的细胞病变作用是有特异性的。这一试验的成功不仅说明该病毒不宜用作杀虫剂,同时对其他已作为杀虫剂的昆虫病毒对人畜的安全效果应予以严格的检查和评价。



图3 病变细胞培养液中分离到与原始病毒形态相同的病毒粒子(未浓缩提纯),69000×

参 考 文 献

- [1] Kurstak, E.: *Adv. Virus Res.*, 17: 207-241, 1972.
- [2] Himeno, M. et al.: *Virology*, 33: 507-512, 1967.
- [3] 孙富林等: *微生物学报*, 21(1): 41-44, 1981.
- [4] Vago, C. and Luciani, L.: *Experientia*, 21: 393-394, 1965.