

薄荷伪造桥虫 NPV 感染斜纹夜蛾幼虫分离的一种新 NPV 特性的研究

袁明雄* 罗 经 杨学楼

(中国科学院武汉病毒研究所)

摘要 用薄荷伪造桥虫核型多角体病毒(*Argyrogamma agnata* NPV)(以下简称 *Aa* NPV)在室内感染斜纹夜蛾(*Prodenia litura*)幼虫,从死虫体内分离到一种 NPV。经电镜观察,多角体蛋白分析、病毒核酸的限制性内切酶酶解分析等研究,证明此多角体直径为 1.5—2.6 μ m,病毒粒子为杆状,其大小为 100—150 \times 420nm,病毒粒子为多粒包埋型。提纯的多角体蛋白只有一种多肽,分子量为 33,500d,提纯的病毒粒子的结构多肽至少有 15 种,其分子量范围为 15,600—78,300d。病毒核酸为双股 DNA,经 *Eco*RI、*Eco*RI + *Bam*HI 酶解可相应得 23 条和 28 条 DNA 片段,根据酶谱计算测得该病毒 DNA 的平均分子量为 74.09 \times 10⁶d, DNA 的 $T_m = 75.4^{\circ}\text{C}$, G + C 含量为 52.46%。将此病毒与薄荷伪造桥虫 NPV、斜纹夜蛾 NPV 部分特性进行比较,发现该病毒与薄荷伪造桥虫 NPV 截然不同,而与斜纹夜蛾 NPV 很相似,这种现象可能是潜伏感染所致。

关键词 薄荷伪造桥虫 NPV; POI NPV; 斜纹夜蛾 NPV; 潜伏感染

我们为了研究昆虫病毒与宿主之间的相互关系,在室内用薄荷伪造桥虫核型多角体病毒(简称 *Aa* NPV)感染斜纹夜蛾幼虫,发现斜纹夜蛾幼虫发病死亡并从死虫体内分离到核型多角体病毒。为查明新复制出来的病毒(暂称 POI NPV)是否为 *Aa* NPV,特对 POI NPV 的理化特性进行了研究,现将结果报道如下。

材 料 和 方 法

(一) 病毒

(1) 感染后新复制多角体病毒(POI NPV)的获得:三至四龄斜纹夜蛾幼虫共 750 条,其中感染组 500 条,用 *Aa* NPV 涂抹蓖麻叶添食感染,饲喂两次再喂无病毒叶子。对照组 250 条只喂无病毒叶子。饲养温度为 28—30 $^{\circ}\text{C}$,5—6 天后喂病毒的幼虫开始死亡,死亡的虫体肿胀,体色粉红,一触即流出白色浆液,经显微镜初步观察为多角体。对照组未见死虫,6—7 天后全部化蛹。

(2) 薄荷伪造桥虫核型多角体病毒(*Aa* NPV):南通县植保站供给多角体原种,经感染伪造桥虫幼虫后获得大量病毒。

(3) 斜纹夜蛾核型多角体病毒(*PINPV*):华中师范大学生物系提供。

(二) 多角体及病毒粒子的提取与纯化

收集病死虫研磨后加入灭菌蒸馏水,四层纱布过滤后,以 500r/min、4,000r/min 交叉离心及蔗糖梯度离心(40—60% w/v),获得纯多角体,电镜观察多角体形态和大小。

取少量多角体,加入 0.05M Na_2CO_3 + 0.05M NaCl (pH10.8)碱液,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15—20 分钟,用 0.1M PBS-HCl (pH2.0)调 pH 至 7.0。低速离心除去多角体碎片,上清液以 8,000r/min 离心 30 分钟,弃去沉淀。上清液经 Sepharose 2B 柱层析,收集的病毒粒子峰经 20,000r/min 离心 70 分钟,沉淀用 0.1M Tris-HCl pH 7.2 悬浮后备用。

(三) 多角体蛋白的提纯

按照 Tween^[1] 方法进行。多角体加入无菌双蒸水后置 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 2 小时,室温冷却后加入等体积的 0.17M Na_2CO_3 -0.05M

本所技术室协助拍摄照片,特此致谢!

* 现在华中理工大学生物工程系工作。

NaCl-0.01 M EDTA (pH 10.8) 碱性溶液, 于 28℃ 碱解 10 分钟, 加入 5 倍体积的双蒸水终止碱解。悬浮液于 20,000r/min 离心 1 小时, 上清液用 0.1 N HCl 调节 pH 至 6.0 左右, 置冰箱 1 小时后, 2,000r/min 离心 10 分钟, 收集多角体蛋白。蛋白重溶于 0.1 M PBS (pH 8.0), 4,000r/min 离心 5 分钟除去沉淀, 上清液经 Sepharose 6B 柱层析, 用蛋白-核酸检测仪在 280nm 处扫描收集分离峰, 依紫外吸收特性鉴定多角体蛋白收集液。

(四) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

采用 SDS-PAGE 系统, 按 Laemmli^[2] 介绍的方法进行电泳。多角体蛋白、病毒粒子结构多肽的分子量采用 Weber^[3] 的方法测定, 标准蛋白为: Phosphorylase B (92,500d), BSA (66,200d), Ovalbumin (45,000d), Carbonic anhydrase (31,000d), Soybean trypsin inhibitor (21,000d), Lysozyme (14,400d) 等。

(五) 病毒核酸的提取

按照罗经等^[4]介绍的方法进行提取。用紫外分光光度计测定纯度和含量, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 的均一性。

(六) DNA 的酶解和琼脂糖凝胶电泳

反应系统为 5 μ l 10 倍酶解缓冲液 (1 倍为 100mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 2mM α -巯基乙醇), 4 μ g DNA, 2~4u/ μ g DNA 内切酶, 于 37℃ 水浴保温 2 小时, 以 λ DNA 的 EcoRI 酶解片段作分子量标准。

采用 1% 琼脂糖凝胶平板电泳, 电泳缓冲液为 1 倍 TAE (0.04M Tris-HCl pH 8.0, 5mM NaAc, 1mM EDTA) 以 2v/cm 稳压电泳 14~18 小时, 紫外灯下观察电泳结果。

(七) DNA 的 T_m 值测定

按照林万明等^[5]介绍的方法测定。将溶于 0.1 倍 SSC 中的 DNA 溶液进行适当调整使其吸光率 (A_{260}) 在 0.20~0.40 之间, 放置比色皿中, 紫外分光光度计上从 25℃ 起逐渐升温, 记录各温度时 A_{260} 值, 直至 A_{260} 值不再明显上升为止。对于由温度上升时溶液膨胀所产生的影响予以校正。

结 果

(一) 多角体及病毒粒子形态及大小

提纯的多角体经电镜观察, 多角体形态完整, 呈四边形、五边形、六边形和不规则形态, 其直径为 1.5~2.6 μ m (图 1)。经碱解释放的病毒粒子为杆状, 多粒包埋型, 其大小为 100~150 \times 420nm (图 2)。

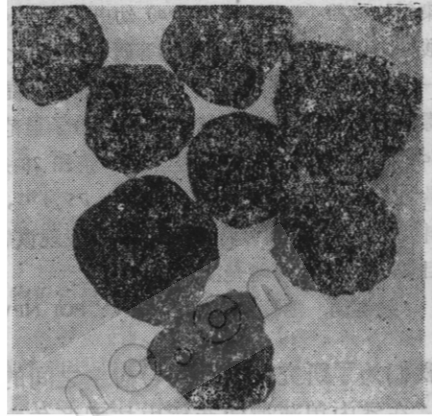


图 1 POI NPV 多角体的形态(10,000 \times)

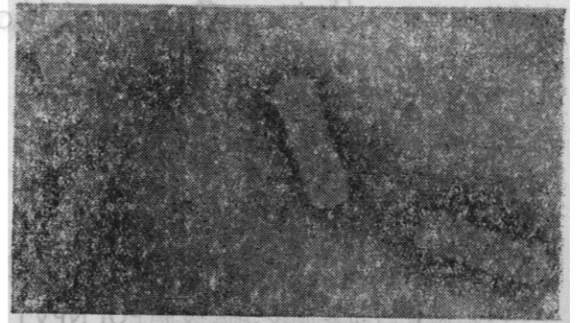


图 2 POI NPV 病毒粒子的形态(51,000 \times)

(二) 多角体蛋白的提纯

多角体经碱解释放后, 获得的多角体蛋白经 Sepharose 6B 柱层析提纯, 洗脱曲线呈两个独立峰, 紫外吸收光谱鉴定峰 2 具有典型的蛋白质吸收特征, 其 $A_{275}/A_{255} = 1.73$, 为纯度较高的多角体蛋白 (图 3)。

(三) 病毒粒子的提纯

经 Sepharose 2B 柱层析, 洗脱液紫外吸收曲线呈两个独立峰。峰 1 $A_{260}/A_{280} = 1.22$, 为病毒粒子峰, 峰 2 $A_{275}/A_{255} = 1.64$, 为多角体

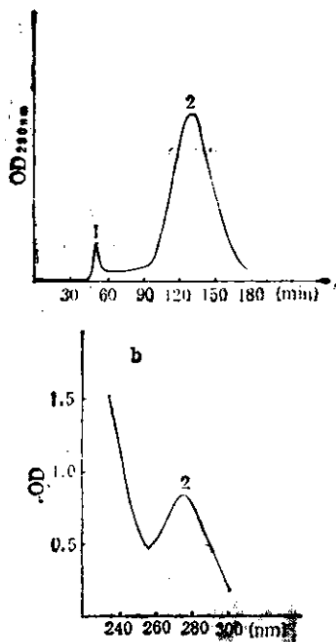


图3 (a) 多角体蛋白 Sephadex 6B 柱层析洗脱曲线 (示峰1、峰2)
(b) 多角体蛋白的紫外峰(示峰2)

蛋白峰。这和 Bell^[6]、Harrap^[7] 报道的结果相似(图4)。提纯的病毒粒子电镜观察形态完整

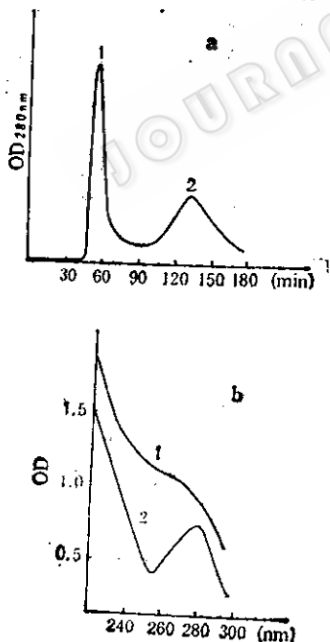


图4 (a) 病毒粒子的 Sephadex 2B 柱层析洗脱曲线 (示峰1、峰2)
(b) 峰1和峰2的紫外吸收曲线

(图5)。

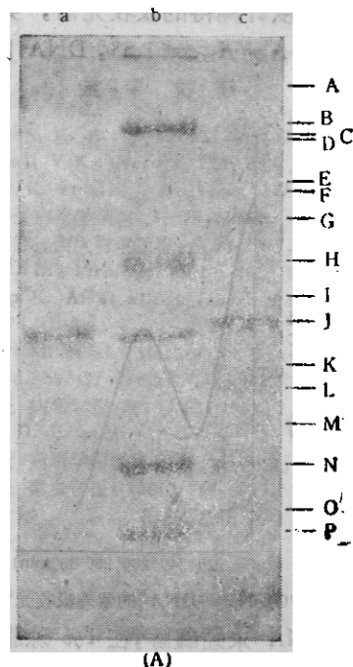


图5 提纯的病毒粒子(51000X)

(四) 病毒结构多肽的 SDS-PAGE 分析

用 SDS-PAGE 分析, 电泳图谱中多角体蛋白呈现一条主带, 病毒粒子呈现 16 条带(图6)。

采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行病毒结构多肽分子量的测定。以标准蛋白的相对迁移率(R_f)作为自变量, 应变量分子量的对数($\log M \cdot W$)与 R_f 自变量进行线性回归, 所得的回归方程是 $\log M \cdot W = 4.975 - 0.894R_f$, 其相关系数 $r = -0.9946$ 。根据回归方程和病毒结构



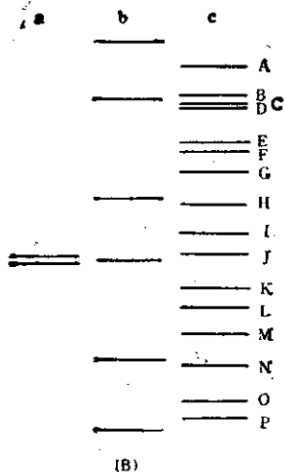


图6 (A)病毒结构多肽的 SDS-PAGE 电泳图,
(B)电泳图的示意图

a. 多角体蛋白 b. 标准蛋白 c. 病毒粒子蛋白

多肽的分子量为: A. 78,300 B. 70,500 C. 68,100
D. 67,500 E. 58,600 F. 55,200 G. 49,800 H.
42,300 I. 37,600 J. 33,500 K. 27,800 L. 26,600
M. 23,100 N. 20,100 O. 16,700 P. 15,000

多肽的相对迁移率 (R_f), 求得多角体蛋白多肽的分子量为 33,500d, 病毒粒子的 16 种多肽的分子量范围为 15,600—78,300d(图 6)。

(五) 病毒核酸的提取

经 SDS 和酚直接从多角体提取的 DNA 紫外分光光度计测得的吸收光谱, 具有 DNA 吸收特征, $A_{260}/A_{280} = 1.83$, DNA 比较纯(图 7)。

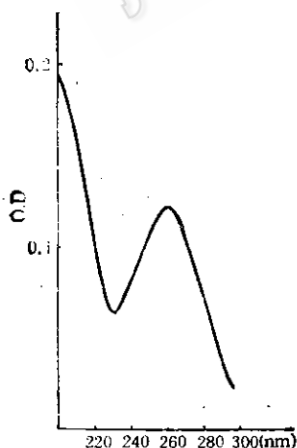


图7 POI NPV-DNA 的紫外吸收光谱曲线

此 DNA 未经酶解, 在 1% 琼脂糖凝胶板上电泳, 获得纯一荧光带, 说明此核酸不含宿主



图8 POI NPV-DNA 的电泳图(未酶解)

核酸(图 8)

(六) DNA 的酶解带谱及分子量

病毒 DNA 分别用 *EcoRI*、*EcoRI* + *Bam*HI 消化, 以 λ DNA 作标准在同样条件下消化, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 获得此 DNA 的酶解带谱 (图 9)。*EcoRI* 酶解 POI NPV-DNA 获得 23 条区带, 而用双酶解 (*EcoRI* + *Bam*HI) 则获得 28 条区带, *EcoRI* 酶解 *Pl* NPV-DNA 获得 22 条带以 λ DNA 的 *EcoRI* 酶解片段分

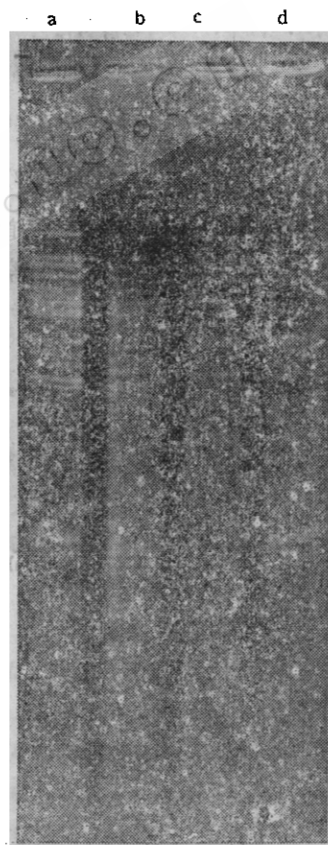


图9 DNA 酶解片段的电泳图谱

a. *EcoRI* 酶解 POI NPV-DNA
b. *EcoRI* 酶解 *Pl* NPV-DNA
c. *EcoRI* 酶解 λ DNA
d. *EcoRI* + *Bam*HI 酶解 POI NPV-DNA

子量的对数值与各片段的电泳迁移距离作工作曲线,从此曲线上求得 POI NPV-DNA 各酶解片段的分子量(图 9)。此病毒 DNA 的平均分子量为 74.09×10^6 d。PI NPV-DNA 的分子量为 74.42×10^6 d。

(七) POI NPV-DNA 的 T_m 值

在进行热变性温度的测定时,由于液体升温体积会膨胀,必须将各温度时溶液的吸光率校正为 25℃ 时的吸光率,用校正值除以 25℃ 时的吸光率即为相对吸光率,作出温度-相对吸光率曲线即热变性曲线(图 10),并从热变性曲

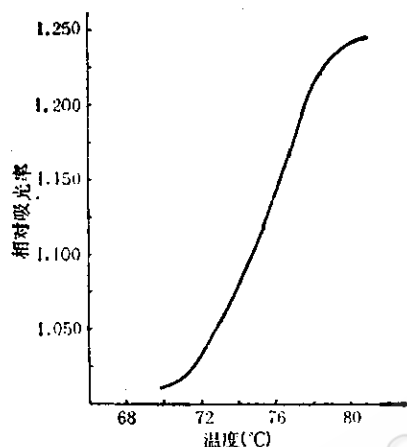


图 10 POI NPV-DNA 在 $0.1 \times \text{SSC}$ 中的变性曲线

线上求得此 DNA 的 $T_m = 75.4^\circ\text{C}$ 。由于 T_m 值反映了 DNA 中 G+C 含量,根据 Mandel^[8] 介绍的计算公式 $(G+C)\% = (T_m - 53.9) \times 2.44$,求得 POI NPV-DNA 中的 G+C 含量为 52.46%。

讨 论

用 Aa NPV 感染斜纹夜蛾幼虫获得的 POI NPV 具有核型多角体病毒特征。通过以上各技术方法对该病毒的研究及根据现有资料将 POI NPV 与 Aa NPV 和 PI NPV 进行部分特性的比较,结果发现,从多角体形态、大

小、包埋类型及病毒粒子的大小和 DNA 分子量诸方面看,POI NPV 与 PI NPV 都很相似,POI NPV 与 PI NPV 的 DNA 的 Eco RI 带谱也很相似^[9]。通过分子杂交,检测 POI NPV、PI NPV 及 Aa NPV 三种病毒核酸的同源性,结果表明 Aa NPV-DNA 不与 PI NPV、POI NPV 的 DNA 杂交,而 POI NPV-DNA 却与 PI NPV-DNA 完全杂交^[9],这说明 POI NPV 与 PI NPV 十分相似。尽管在某些理化特性上,他们之间略有差异,这可能是我们实验中所使用的 PI NPV 与诱发出来的 POI NPV 之间是株间存在的差异。

潜伏感染是否存在,很多科学家作过报道^{[10],[11],[12]},他们的研究发现和我们实验室用 Aa NPV 感染斜纹夜蛾幼虫,获得类似斜纹夜蛾 NPV 的结果一致,说明潜伏感染可能存在。至于 NPV 潜伏感染的存在形式、诱发机制等问题,有待进行深入研究。

至于多角体蛋白在 PAGE 中电泳呈现一条多肽主带,在电泳带谱中还出现另一条分子量较小的带,这条带的出现很可能是由于多角体蛋白在保存或操作过程中被降解所致,而碱性蛋白酶的降解作用,由于热的预处理似可排除。

参 考 文 献

- [1] Tweeten, K. A.: *J. Virol.* 26: 702, 1978.
- [2] Laemmli V.K.: *Nature*, 227: 680, 1970.
- [3] Weber K. et al.: *J. Biochem.* 224: 4406, 1969.
- [4] 罗经等: 病毒学杂志, 1: 78, 1986.
- [5] 林万明等: 微生物学通报, 8(5): 245, 1981.
- [6] Bell C. D.: *Virology* 78(1): 162, 1977.
- [7] Harrap K. A. et al.: *J. Invert. Pathol.* 24 (1): 55, 1974.
- [8] Mandel M. et al.: *Method in Enzymology* Vol. 12B (ed. by Grossman L.) 1968.
- [9] 罗经等: 病毒学报, 3(1): 62, 1987.
- [10] Smith G. E. et al.: *J. Virol.* 33: 311, 1979.
- [11] 刘年翠: 病毒学研究集刊 1: 57, 1984.
- [12] 戴冠群: 昆虫学报, 16(1): 89, 1973.