

# 经柞蚕蛹连续继代的柞蚕核型多角体病毒酶解图谱分析

杨明辉 熊克娟 孙富林

(中国微生物菌种保藏管理委员会普通病毒中心,武汉)

谢秉泉 周怀民

(河南省云阳蚕业试验场,河南云阳)

**摘要** 本研究对五株不同地域分离的柞蚕核型多角体病毒(Ap NPV)在柞蚕蛹体内继代后的产物进行 EcoRI 和 Sall 酶解图谱比较分析。观察到经柞蚕蛹继代一次的五株病毒的 EcoRI 酶解图谱均相同;而 Sall 酶解图谱各有明显不同之处。其中二株病毒(ApNPV-3 和 Ap NPV-9)经柞蚕蛹继代 1 次与连续继代 26 次后的酶解图谱分析中,观察到,各样品的 EcoRI 酶解图谱仍相同,第 1 次与第 26 次的 ApNPV-9 的 Sall 酶解图谱也无明显差异。但第 1 次与第 26 次的 ApNPV-3 的 Sall 酶解图谱却有明显差异。结果提示:ApNPV DNA 的 Sall 酶切位点较 EcoRI 酶切位点易产生变异。本文认为 EcoRI 与 Sall 比较,EcoRI 较适用于检测其他 NPV 对 ApNPV 的污染,而 Sall 则较适用于 ApNPV 株间的差异检测。

**关键词** 柞蚕核型多角体病毒;限制性核酸内切酶;病毒保藏

从昆虫体内直接分离获得的核型多角体病毒常含有多种自然突变的病毒颗粒<sup>[1]</sup>。改变病毒继代的细胞环境,则与之相适应的自然突变颗粒迅速复制,最终在继代产物中占优势,致使原病毒种的某些遗传特性完全消失<sup>[2]</sup>。又由于幼虫体内可能存在潜伏型病毒感染<sup>[3]</sup>。采用替代寄主用于病毒继代增殖,可能有失去原毒种的危险<sup>[4]</sup>。对于病毒种保藏而言,病毒在继代中保持种的遗传稳定性是病毒种保藏的理论基础。维持病毒种的性状,特别是为人们所需的性状保持稳定是病毒种保藏的重要质量标准。建立适当的监测手段检出病毒继代产物的变异,是搞好病毒种保藏的技术前提。但是,目前克隆纯化技术和细胞培养或无毒幼虫饲养的条件都未在国内普及。直接使用幼虫体内分离获得的病毒种,通过感染幼虫进行病毒增殖,从而得到研究所需的病毒材料仍是生产、科研及病毒种保藏所常用的方法。因此,探讨非克隆病毒株在良好的继代条件下病毒基因组的稳定性,寻求适当的检测方法发现基因组的变异,对

病毒种的保藏,对病毒制剂的生产,病毒的开发和利用均是极有意义的。

本文以 EcoRI 和 Sall 酶解五个不同地域分离的经柞蚕蛹继代 1 次或继代 26 次的柞蚕核型多角体病毒(简称 NPV)的 DNA,探讨 EcoRI 和 Sall I 酶在 ApNPV 继代产物的质量监测中的实用性。

## 材料与 方法

### (一) 材料

1.柞蚕核型多角体病毒:ApNPV-3, 辽宁蚕业研究所分离于辽宁凤城。ApNPV-5,山东泰安市农业科学研究所分离于泰安。ApNPV-7,中国微生物菌种保藏管理委员会普通病毒中心分离于河南鲁山县。ApNPV-8,河南云阳蚕业试验场分离于河南云阳县。ApNPV-9,广西南宁蚕业指导所分离于南宁。ApNPV-3(26次),

照片由中科院武汉病毒所技术室帮助拍摄,谨致衷心的感谢。

为 ApNPV-3 的第 26 次继代产物。ApNPV-9 (26次), 为 ApNPV-9 的第 26 次继代产物。

2. 限制性核酸内切酶; EcoRI 和 SalI 购自华美生物工程公司。

3. DNA 溶解液: TE 缓冲液, pH8.0。

4. EcoRI 酶解缓冲液: Tris-HCl 100mmol/L, NaCl 50mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 10mmol/L, pH7.5 (37℃)。

5. SalI 酶解缓冲液: Tris-HCl 6mmol/L, NaCl 125mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 6mmol/L,  $\alpha$ -巯基乙醇 7mmol/L, pH8.0(37℃)。

6. 电泳缓冲液: Tris-HAC 400mmol/L, EDTA 20mmol/L, pH8.3(25℃)。

## (二) 方法

以穿刺接种方法感染健康柞蚕种蛹继代和增殖 ApNPV。除 ApNPV-3 和 ApNPV-9 经柞蚕蛹体连续继代 26 次外, 其他三株 ApNPV 均只经柞蚕蛹体继代增殖 1 次, 收集各 ApNPV 致死的柞蚕蛹, 按 ApNPV 纯化方法<sup>[4]</sup>提纯 NPV。在显微镜或电子显微镜下观察 NPV 的纯度。从 NPV 一步抽提 DNA<sup>[6]</sup>。DNA 在 TE 缓冲液内溶解后, 用紫外光波段扫描和琼脂糖凝胶电泳方法, 检查 DNA 的纯度。以每微克 DNA 加 14 单位内切酶, 37℃ 水浴酶解 1 小时。 $\lambda$  DNA 在同等条件下作酶解和电泳操作对照。

## 结 果

### (一) ApNPV 的多角体提纯

提纯的各 Ap NPV 多角体经显微镜及电泳观察, 样品纯净无杂菌污染。各病毒株的多角体形态无明显不同。多角体形态呈大小不一的三角形、四边形和少数不规则形。图 1 展示了 ApNPV-3 经继代第 1 次和第 26 次的多角体形态, 二者无显著形态差异。

### (二) ApNPV DNA 的抽提

从各 ApNPV 多角体直接抽提获得的 DNA 样品, 在紫外光波段的扫描曲线呈核酸吸收光谱的特征。最大吸收值在  $258 \pm 1 \text{ nm}$  波长, 最小吸收值在  $230-231 \text{ nm}$  波长,  $A_{260 \text{ nm}}/$

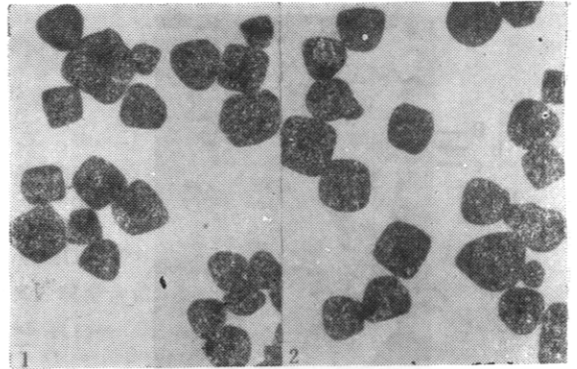


图 1 经连续继代后的 ApNPV-3 多角体形态

1. 第 1 次继代的多角体
2. 第 26 次继代的多角体

$A_{260 \text{ nm}} \geq 1.9$ 。各 DNA 样品经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 在胶内仅呈现一条 DNA 荧光带, 泳动位置与  $\lambda$  DNA 相当, 但在样品孔仍有 DNA 余留未进胶。此情况与严家琪等报道的现象<sup>[7]</sup>相似。

### (三) EcoRI 和 SalI 酶解图谱

1. EcoRI 酶解图谱: 图 2 所示不同地域来源的五株 Ap NPV DNA 的 EcoRI 酶解图谱相同; 经过柞蚕蛹体连续继代 26 次后的 Ap NPV-3 (26 次) 和 ApNPV-9 (26 次) 与各第 1 次继代的 ApNPV-3 和 Ap NPV-9 的 EcoRI 酶解图谱仍然保持一致, 重复三次所得酶解图谱相同。

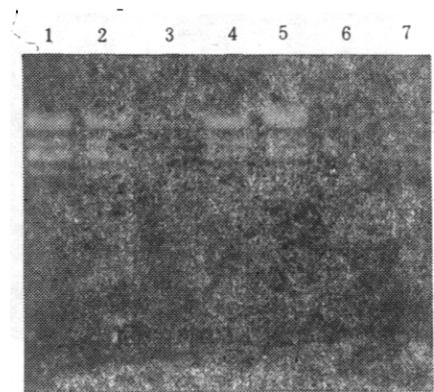


图 2 ApNPV 的 EcoRI 酶解图谱(1% 琼脂糖胶)

1. ApNPV-5
2. ApNPV-7
3. Ap NPV-8
4. Ap NPV-3
5. ApNPV-3(26 次)
6. ApNPV-9(26 次)
7. ApNPV-9

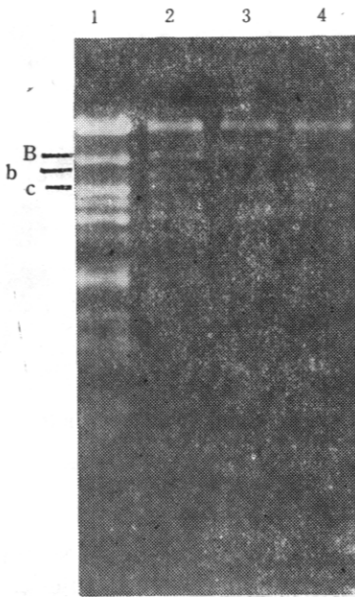


图3 连续继代26次后的 SalI 酶解图谱  
(1% 琼脂糖胶)

1. ApNPV-3 第一次继代物 2. ApNPV-3 第26次继代物(增加36片段)  
3. ApNPV-9 第一次继代物 4. ApNPV-9 第26次继代物

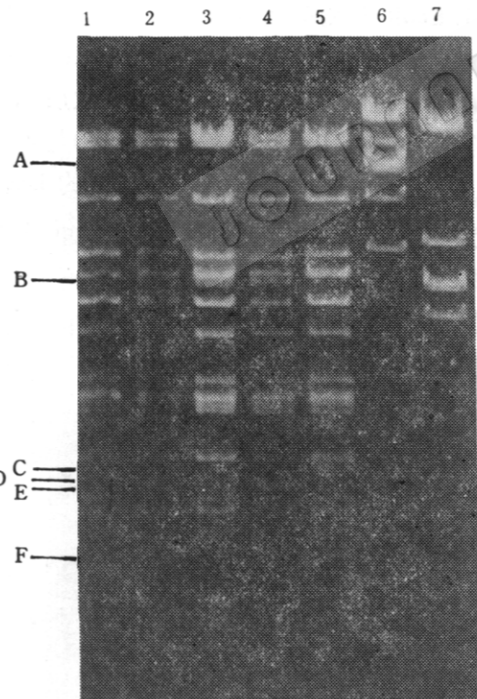


图4 ApNPV 不同地域分离株的 SalI 酶解图谱  
(0.7% 琼脂糖胶)

1. ApNPV-3(缺 A、B、C、E、F) 2. ApNPV-5(缺 A、C、F) 3. ApNPV-7(缺 F) 4. ApNPV-8(缺 A、C、F) 5. ApNPV-9(缺 A、B、D、E) 6. ApNPV-3 + EcoRI 7. λDNA + EcoRI

2. Sal I 酶切图谱: 图3展示了1%琼脂糖胶浓度时 ApNPV-3、ApNPV-9、ApNPV-3(26次)和 ApNPV-9(26次)的 DNA SalI酶解图谱。很明显地看出 ApNPV-3 (26次) DNA 的 SalI 酶解图谱在原毒种 Ap NPV-3 的 B、C 核酸片段之间增加了一条 DNA 片段 b。经多次重复仍证明 b 带的存在。而 ApNPV-9 (26次)与 ApNPV-9 的 SalI 酶解图谱无明显不同。

经柞蚕蛹体继代一次的不同地域来源的五株 ApNPV DNA 的 Sal I 酶解图谱也各有不同(图4), 差异表现在图中横线所示 DNA 片段的有无。

### 讨 论

对于 Ap NPV 的 EcoRI 酶解图谱分析指出, 无论病毒是来自不同地域或经过柞蚕蛹体的连续继代, DNA 的 EcoRI 酶解图谱均保持不变, 表现出 Ap NPV 基因组的遗传稳定性。因此, 以 EcoRI 酶解图谱作为 Ap NPV 种的一个鉴别指标, 应用于 ApNPV 的继代产物检测和宿主范围鉴定中是适宜的。

在 Ap NPV 的 Sal I 酶解图谱分析中看到, 不同地域来源的 ApNPV SalI 酶解图谱各有不同处。同一病毒 (ApNPV-3) 在良好的稳定的条件下连续继代26次, 病毒 DNA 的 Sal I 酶解图谱出现了明显变异。改变加酶量为 10U 和 20U, 降低琼脂糖浓度至 0.7%; 及重新抽提 DNA 进行 Sal I 酶解重复试验, 均证实变异的存在。可见 ApNPV DNA 上的 SalI 酶切位点易发生变异。另一株病毒 (ApNPV-9) 也在相同条件下经柞蚕蛹体内连续继代后, 病毒 DNA 的 SalI 酶解图谱仍保持与继代初始时一致。说明 ApNPV DNA 上的 SalI 酶切位点虽然易产生变异, 但仍具有相对的稳定性。所以, 用 Sal I 酶解 ApNPV 株的 DNA, 分析不同地域来源的病毒株的差异, 检测 ApNPV 继代产物的变异是适宜的。

鉴于同种病毒的不同地方株可能存在不同  
(下转第 220 页)

(上接第 200 页)

的遗传特性。例如毒力的强弱、混合感染时的增效或干涉作用等等，常被人们选择性地利用，因此收集保藏病毒的不同地域分离株是有意义的。ApNPV 的不同地域分离株，各具哪些可用的独特性状，尚待研究。因此，以本研究提出的以 EcoRI 和 SalI 酶解图谱作为 ApNPV 继代产物的一种检测指标是有实际意义的。

## 参 考 文 献

1. Brown S E et al.: *J. Gen. Virol.*, **66**:2431—2441, 1985.
2. Hitoshi Watanabe et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, **25**: 11—17, 1975.
3. Kislev N et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, **17**:199—202, 1971.
4. 罗经等: 病毒学报, **3**(1): 62—67, 1987.
5. 严家琪等: 病毒研究集刊(昆虫病毒专辑), 武汉大学出版社, 134, 137—138 页。1984。
6. 陈棣华等: 病毒学报, **3**(1): 69—72, 1987.