

# 蓖麻蚕核型多角体囊膜的生化成分及元素分析

何启智 曾英武 王虹 卢文筠

(武汉大学病毒研究所生物化学研究室)

**摘要** 蓖麻蚕核型多角体病毒的多角体囊膜,于碱性溶液中差速离心,将基质蛋白与核衣壳分离。采用分光光度计分析,测得囊膜己糖含量为10.4%,戊糖含量为0.3%。用TVg100X-射线能谱仪测得以下元素百分含量为:Si 0.22%,P 0.11%,S 1.15%,Ca 0.78%,Mg 0.10%。使用240-B元素自动分析仪测得N13.8%,C10.14%,H5.2%。

**关键词** 核型多角体;囊膜

蓖麻蚕核型多角体病毒(*Attacus ricini* Nuclear Polyhedrosis Virus)(ArNPV)属杆状病毒科,是经济昆虫蓖麻蚕的重要病原体之一,危害很大。

昆虫病毒核型多角体囊膜(Polyhedra Envelop)(PE)的结构、生化成分及所含元素,目前人们了解的不多。Minion等<sup>[1]</sup>对棉铃虫的核型多角体囊膜进行研究,表明囊膜内含有大量糖类,其中以己糖和戊糖占绝大部分。而Harrap<sup>[2]</sup>认为多角体囊膜不是真正的生物膜,从超薄切片观察,没有显示出双层脂质结构。Pacchi<sup>[3]</sup>测定出膜中含有Si,并认为它主要起稳定作用。为了更好地探索昆虫核型多角体病毒的多角体囊膜,在多角体的结构与功能中所起的作用,我们对蓖麻蚕核型多角体囊膜(ArPE)的生化成分和元素组成进行了初步分析。

## 材料与方 法

### (一) 材料

- 1.蓖麻蚕核型多角体病毒:由本室提供。
- 2.试剂:所用化学试剂均为分析纯。蒽酮试剂是蒽酮溶于浓硫酸中,当日配制。

### (二) 方法

- 1.蓖麻蚕核型多角体的纯化:按文献[4,5]的方法纯化。蓖麻蚕核型多角体经差速离心,50%蔗糖梯度处理,40—80%甘油梯度离心。然后用蒸馏水洗四次,每次4000r/min离

心20min。将初步纯化的样品,再上一次甘油梯度和四次水洗。

2.囊膜的纯化:基本按文献[1]方法进行。取纯化的多角体,加入10ml 0.01mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2ml 0.1mol/L  $\text{NaCl}$  (pH10.5)及0.6ml 0.007mol/L  $\text{NaOH}$ 。在电磁搅拌器上搅拌13小时。12000r/min离心50min。保留沉淀,重新悬浮于上述溶液中,磁力搅拌4小时,12000r/min离心40min。沉淀用蒸馏水洗,12000r/min离心40min。水洗四次。所得纯化的多角体囊膜(浓度为8mg/ml)置冰箱保存。

3.多角体和囊膜的超薄切片及电镜观察:提纯的多角体及囊膜经超薄切片后,用日立600型电镜观察。

### 4.囊膜某些糖类的测定:

(1)己糖的测定:基本按文献[4]方法进行,测定囊膜中己糖含量。共取7支试管,1支加入1ml蒸馏水作对照。5支分别加入浓度为1mg/ml葡萄糖液0.10,0.30,0.50,0.70,0.90ml,各管再用蒸馏水加至1ml。另一支加入1ml纯化囊膜液(8mg/ml)。然后每管各加1ml浓盐酸和0.1ml 90%甲酸,缓慢加入新鲜配制的蒽酮试剂8ml。混合后,沸水浴12分钟。自来水冷却,置冰箱1小时,取出后继续搅拌10分钟,室温静置10分钟。630nm波长

本工作得到武汉大学测试中心电镜室张起麟老师的大力帮助和指导,特此致谢。

本文曾在中国生化学会第三次病毒生化学术会上交流。

测定光密度(OD)值。

(2) 戊糖的测定: 按文献[1]方法进行。5支试管中分别加入 0.1mg/ml 木糖溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0ml, 蒸馏水加至 1 ml。另取一支试管加入 1 ml 蒸馏水作空白对照。再取 1 支试管加入 1 ml 纯化的囊膜(8mg/ml)。以上共 7 支试管分别加入 3 ml  $\text{FeCl}_3 + \text{HCl}$  试剂(0.5ml 10%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶于 100ml 浓 HCl 中), 0.2ml 6% 地衣酚(用 95% 乙醇配制)。于沸水浴中放置 3 分钟, 取出用自来水冷却。665 nm 波长测其 OD 值。

#### 5. 囊膜的元素分析:

(1) 将提纯的囊膜, 置于 Hus-5GB 真空镀膜仪中旋转投影。仪器的投射角为  $30^\circ$ , 经过喷碳技术处理后, 用 TVg100X-射线能谱仪, 测定原子序数在 11 以上的有关元素的特征 X-射线及其 X-射线能谱图。并定量测定这些元素的百分含量。

(2) 将 ArPE 精确称量后, 置于 240-B 元素自动分析仪, 测定 N、C、H 的百分含量。

## 结 果

### (一) 纯化的 Ar NPV 和 ArPE 的形态结构

纯化的蓖麻蚕核型多角体经超薄切片, 在电镜下可观察到外周的囊膜。膜内为基质蛋白。病毒粒子成束状, 散布于基质蛋白间(图

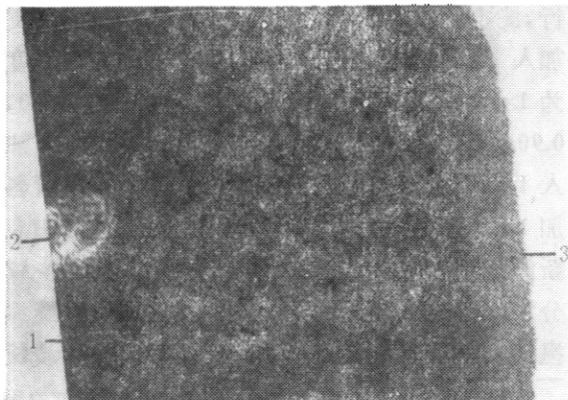


图1 Ar NPV 局部放大(示外层囊膜, 50000X)

1. 基质蛋白 2. 病毒束 3. 囊膜

1)。纯化的囊膜经超薄切片, 在电镜下可见到其形状为环形, 囊膜内的基质蛋白及病毒粒子已不存在(图2)。结果将纯化的囊膜在高倍电镜下观察, 可清楚地看到囊膜的内外两侧为电子致密度高的结构, 中间为电子致密度低的一层, 类似生物膜(图3)。

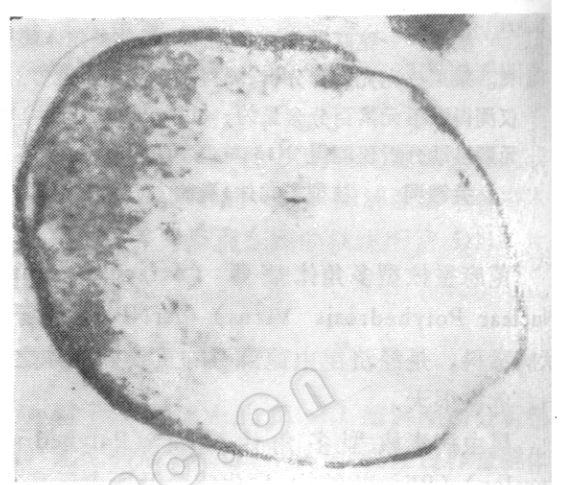


图2 纯化的 ArPE 完整超薄切片(84000X)

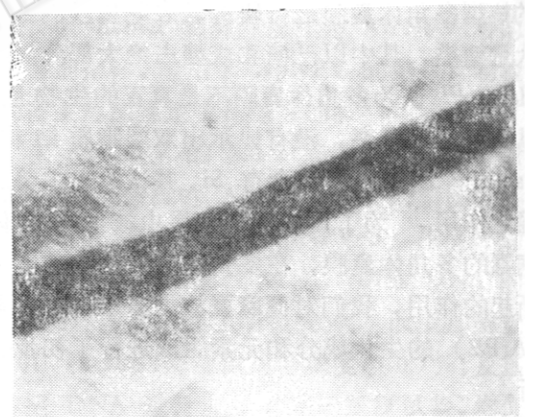


图3 ArPE 局部放大(示囊膜的电子致密层, 100000X)

### (二) 囊膜己糖含量的测定

用分光光度计 OD 630nm 波长, 测得处理后的 ArPE 样品的 OD 值为 0.196。从标准曲线上, 查得己糖含量为 0.83mg/ml。因囊膜浓度为 8mg/ml, 则每毫克 ArPE 含 103.8 $\mu$ g 己糖, 其百分含量为 10.4%。

### (三) 囊膜戊糖含量的测定

用分光光度计 OD 665nm 波长, 测得经处理后的 ArPE 样品的 OD 值为 0.049。从

木糖(戊糖)的标准曲线上,查得戊糖含量为 0.0275mg/ml。根据囊膜的浓度为 8mg/ml,即 8mg ArPE 含 0.0275mg 戊糖,则每毫克 ArPE 含 3.4 $\mu$ g 戊糖,其百分含量为 0.3%。

#### (四) ArPE 的元素分析

(1) 使用 TVg100 X-射线能谱仪测定 ArPE 中原子序数在 11 以上的有关元素。其中 Si 含量为 0.22%, P 0.11%, S 1.15%, Ca 0.28%, Mg 0.10%。

(2) 使用 240-B 元素自动分析仪,测定 ArPE 含 N 13.8%, C 10.14%, H 5.2%。

## 讨 论

核型多角体囊膜的存在与否,曾是一个有争议的问题。将核型多角体溶解于弱碱溶液中,经电镜观察,常发现剩下一个囊状的膜。有人认为可能是由于提纯过程中人为造成的。但近年来,从舞毒蛾、蛱蝶、斜纹夜蛾、棉铃虫等的研究,均证明了囊膜的存在。通过负染技术和高倍电镜观察,不仅证明了多角体膜状结构的

囊膜存在,而且观察到多角体囊膜内外两侧为电子致密度高的结构,中间为电子致密度低的一层。

由于仪器条件的限制,本文只测定了囊膜内原子序数为 11 以上的 8 种元素 Si、P、S、Ca、Mg、N、C、H 的百分含量。以及囊膜内己糖和戊糖的含量。

从上述结果看,囊膜内不仅含有较多糖类,从元素分析看,含 N 量也很高,表明囊膜含有较多的蛋白质。但囊膜的成分是以糖类为主还是以蛋白质为主,尚待进一步研究。

## 参 考 文 献

1. Minion F C et al.: *J. Invertebr. pathol.*, **34**:303—307, 1979.
2. Harrap KA: *Virology*, **50**:114—123, 1972.
3. Paothi S B et al.: *J. Invertebr. pathol.*, **28**:137—142, 1976.
4. Hess R T et al.: *J. Invertebr. pathology*, **43**:1—10, 1984.
5. 严家骥等: 病毒学集刊(第一集), 133—135 页, 1984.