

茶尺蠖核型多角体病毒的血清学研究

赵怀宇 陈棣华 张立人

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

提 要

应用免疫扩散和酶联免疫吸附试验(ELISA)等方法, 研究了茶尺蠖核型多角体病毒(*boarmia Obligua NPV*)与其他6种昆虫杆状病毒的血清学关系。结果表明茶尺蠖核型多角体病毒的抗血清只能与茶尺蠖核型多角体病毒起反应, 而不与其他6种昆虫杆状病毒发生免疫反应。说明茶尺蠖核型多角体病毒和其他6种昆虫杆状病毒没有血清学关系。这一结果表示了茶尺蠖核型多角体病毒具有较高的特异性。

昆虫病毒, 特别是杆状病毒科的核型多角体病毒(NPV)和颗粒体病毒(GV), 在生防工作中发挥着重要的作用。通过免疫化学方法和酶联免疫吸附试验对核型多角体病毒的抗原性, 病毒特异性和昆虫杆状病毒之间的血清学关系进行研究, 在一定程度上可反映出其病毒的专一性情况。这样有助于了解病毒的防治范围, 同时也为病毒毒株的鉴定和环境保护等方面提供科学依据。

本文应用上述的免疫学方法, 对茶尺蠖核型多角体病毒的抗原性以及与其他昆虫杆状病毒之间的关系进行了研究。

材料与方法

茶尺蠖核型多角体病毒由安徽省十字铺茶场茶科所和中国农业科学院茶叶研究所提供。

1. 抗原的制备

(1) 茶尺蠖核型多角体病毒的收集及纯化: 收集人工感染茶尺蠖核型多角体病毒的病死幼虫, 以1:5加入蒸馏水将虫体磨碎, 再经纱布过滤, 滤液低速离心除去粗渣。上清液用3000 rpm离心30分钟, 沉淀物用蒸馏水悬浮, 这样反复离心数次, 可得到灰白色的多角体。用0.01 M 磷酸缓冲液(pH7.2)制备多角体悬液, 并加入胰凝乳蛋白酶, 最终浓度为0.1mg/ml, 在37℃下保温45分钟, 通过离心洗去蛋白酶。然后放在40—60% (W/W)蔗糖梯度上, 以4000rpm离心1.5小时, 或者以8000rpm离心30分钟。即形成三条沉

熊大风、张兴二位同志参加部份工作, 特此致谢

稿本1985年11月4日收到

沉淀，收集中间的多角体带、用离心的方法洗去蔗糖。即得到纯净的多角体病毒。

(2) 茶尺蠖多角体病毒粒子的分离与提纯：取已经提纯的多角体300 mg，加入15ml的磷酸缓冲液，充分浸湿。制成多角体悬液，再加入等体积的0.05M Na₂CO₃-0.1M NaCl溶液，混合后其pH为10.5-10.8。在4℃下降解，当降解到一定程度时，加入磷酸缓冲液使混合液呈中性。以3000rpm离心30分钟，除去未溶解的残渣。上清液再以50,000g离心1.5小时，温度4℃，其沉淀用少量0.01M磷酸缓冲液充分溶解。再以10,000g离心30分钟，除去不溶解的物质，可得到较纯的病毒粒子样品。然后通过Sephadex 2B柱层析进一步提纯。柱床1.5cm×30cm，用0.01M硼酸缓冲液(pH9.0)平衡，样品量为2ml，用上述缓冲液洗脱，流速为10ml/小时，分管收集。用730型紫外光分光光度计，在280nm波长，测其洗脱曲线。收集第一个峰，然后再测定紫外吸收曲线。通过电子显微镜观察和琼脂糖凝胶电泳鉴定其纯度。

(3) 琼脂糖凝胶电泳：分别制备1%和0.7%的琼脂糖凝胶，电泳缓冲液为0.01M硼酸缓冲液pH8.0，每个凝胶管加样品40微升，进行盘状电泳，时间为4小时，用0.25%考马氏亮兰染色，7.5%醋酸溶液脱色。以未经柱层析的病毒粒子样品作为对照。

(4) 电子显微镜观察：经蔗糖梯度离心提纯的多角体，用碳-黄金旋转投影。提纯的病毒粒子用3%的磷钨酸(pH7.2)进行负染。上述二种样品分别在Dx-5型和JEM-100C型电子显微镜下观察。

2. 抗血清的制备 以提纯的病毒粒子作为抗原，免疫健康的雄性家兔，首次抗原与等量的完全福氏佐剂混合，皮下多点和静脉交替进行免疫，隔7天注射一次，共5次，总量为25 mg的抗原。耳静脉取血，测其效价。7周后颈动脉放血，收集血清并分装于小瓶内，冰箱中保存。对照家兔仅注射灭菌的生理盐水。

3. 多角体蛋白的制备 参照Bell^[1]提取多角体蛋白的方法进行的。

4. 琼脂免疫扩散试验 参考Bell^[1]和Harrap^[3]对几种昆虫病毒的免疫扩散试验。

5. 对流免疫电泳 用0.025M巴比妥缓冲液制备0.7%的琼脂糖凝胶板，pH8.6。打直径为3毫米的孔，抗原孔靠近负极，抗体孔靠近正极，电泳缓冲液为0.05M巴比妥缓冲液pH8.6电流为2—3mA/cm。电泳时间45分钟，观察结果。

6. 酶联免疫吸附试验 病毒样品：茶毛虫核多角体病毒(EpNPV)。油桐尺蠖核多角体病毒(BsNPV)。斜纹夜蛾核多角体病毒(PLNPV)。家蚕核多角体病毒(BmNPV)。蓖麻蚕核多角体病毒(PcNPV)。柞蚕核多角体病毒(ApNPV)。按前述的方法分别分离提纯其病毒粒子。

抗体：兔抗茶尺蠖核多角体病毒抗血清。

辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG。购于北京生物制品研究所。

方法：以聚苯乙烯微量滴定板作为载体。用包被缓冲液将待测抗原做1:200的稀释。每孔加入0.2ml，在冰箱中孵育过夜。除去孔中抗原液，用含有吐温-20的磷酸缓冲液(pH7.4)洗涤三次，每次5分钟，最后一次沥干。并加入用含有吐温-20的磷酸缓冲液稀释1:100的抗体0.2ml于孔内，37℃下保温2小时，同样方法洗涤三次。再加入稀释10⁻⁴的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG 0.2ml，37℃下保温3小时，用上述方法洗涤。再加入0.2ml新配制的酶的底物-邻苯二胺。室温下反应1小时。每孔加入2M H₂SO₄终

止反应。观察颜色，出现橙黄色为阳性反应。

对照：（1）抗原稀释液+抗体稀释液。

（2）茶尺蠖多角体病毒粒子+茶尺蠖病毒粒子抗血清。

（3）正常茶尺蠖幼虫血清+茶尺蠖多角体病毒粒子抗血清。

结 果

1. 病毒纯度的鉴定

茶尺蠖核多角体病毒经蔗糖梯度离心后，形成三条沉淀带，收集中间的多角体带[图2]。经Dx-5型扫描电子显微镜观察，多角体的形态完整，呈不规则的多面体，轮廓清晰，未发现有明显的杂质污染[图3]。

经差异离心提纯的病毒粒子样品，再经过Sephadex G-200柱层析，主要含有二个洗脱峰。收集第一个峰，其紫外吸收曲线呈平滑下降，无明显的谷和峰。这与Bell^[1]及Harrap^[2]等人所报道的昆虫杆状病毒粒子的紫外吸收曲线是一致的。[图1]。

提纯的病毒粒子样品在JEM-100C型电镜下观察，可看到大量而形态均一的杆状病毒粒子，并未发现其他杂质。[图4]

琼脂糖凝胶电泳：在1%浓度的凝胶中，提纯的病毒粒子聚集在凝胶的顶端，胶内无蛋白带。在0.7%浓度凝胶中，提纯的病毒粒子形成一条带。在相同的条件下，未经Sephadex G-200柱层析的病毒样品形成二条带，上面的是病毒粒子带，下面的为多角体蛋白带。[图5]

上述的实验结果说明病毒粒子作为抗原，已达到了免疫学要求的纯度。

2. 血清学试验

免疫扩散试验是在0.7%的琼脂糖凝胶中进行的，其试验结果如图6所示。茶尺蠖多角体病毒粒子抗血清只与茶尺蠖病毒粒子发生反应，形成一条沉淀带。而与茶尺蠖病毒的多角体蛋白不发生反应，故不形成沉淀带。说明二者无血清学关系。同时也说明了作为抗原的病

图1. (A) Sephadex G-200柱层析洗脱曲线。

I峰为病毒粒子。II峰为多角体蛋白。

(B) 病毒粒子的紫外吸收光谱。

Fig. 1. (A) Elution of virus particles (peak 1) and polyhedron protein (peak 2) from a Sephadex G-200 column.

(B) uv absorption spectra of virus particles (peak 1).

毒粒子中不含有多角体蛋白成份。

茶尺蠖多角体病毒粒子抗血清除了与相应的茶尺蠖病毒粒子形成沉淀带之外，不与茶毛虫核多角体病毒，油桐尺蠖核多角体病毒，斜纹夜蛾核多角体病毒，家蚕核多角体病毒，蓖麻蚕核多角体病毒，柞蚕核多角体病毒等六种杆状病毒形成沉淀带。说明茶尺蠖多角体病毒与其他6种杆状病毒之间缺少共同抗原决策簇，不能发生交叉反应。[图7(A)]

对流免疫电泳：在相同的条件下，茶尺蠖病毒粒子抗血清只与其茶尺蠖病毒粒子发

生免疫反应，而不与茶尺蠖病毒多角体蛋白发生免疫反应。同时，茶尺蠖病毒粒子抗血清不和茶毛虫病毒粒子，油桐尺蠖病毒粒子，斜纹夜蛾病毒粒子，家蚕病毒粒子，蓖麻蚕病毒粒子，柞蚕病毒粒子等6种昆虫杆状病毒发生交叉反应。[图7(B)]。

从上述的琼脂免疫扩散试验和对流免疫电泳二项试验结果来看，是一致的。说明茶尺蠖核多角体病毒具有较高的特异性。

酶联免疫吸附试验：应用酶联免疫吸附试验测定茶尺蠖核多角体病毒与上述6种昆虫杆状病毒免疫特异性，其结果如下表：

表1 茶尺蠖病毒抗血清与六种昆虫杆状病毒ELISA测定结果

Table 1. Results of Bo NPV antiserum and six kinds of insect baculoviruses by use of ELISA.

BoNPV 抗原 抗血清	E _p NPV	E _s NPV	P _L NPV	B _m NPV	P _c NPV	A _p NPV	Bo NPV	健 康 尺 虫 幼 虫 血 清
反 应	-	-	-	-	-	-	+	-

+ = Positive.

+ = 阳性

- = negative.

- = 阴性

从上表中可以看出：茶毛虫核多角体病毒(EPNPV)，油桐尺蠖核多角体病毒(BsNPV)，斜纹夜蛾核多角体病毒(PLNPV)家蚕核多角体病毒(EmNPV)，蓖麻蚕核多角体病毒(PcNPV)，柞蚕核多角体病毒(APNPV)等6种杆状病毒与茶尺蠖核多角体病毒(BoNPV)的抗血清呈阴性反应，只有茶尺蠖病毒与其同源抗血清呈阳性反应。这一结果和前述的免疫扩散试验及对流免疫电泳试验结果是一致的。更进一步证明茶尺蠖核多角体病毒有较高的特异性。

酶联免疫吸附试验与对流免疫电泳比较：

将作为抗原的茶尺蠖核多角体病毒原液作系列稀释，当抗原茶尺蠖的病毒稀释度为1:4时，对流免疫电泳结果是阳性。超过此稀释度其结果为阴性。而酶联免疫吸附试

表2 酶联免疫吸附试验和对流免疫电泳灵敏度比较

Table 2. The comparison between the sensibility of ELISA and counter-immuno-electrophoresis.

酶 联 吸 附 试 验	BoNPV 抗原稀释度 BoNPV 反 应 抗血清稀释度(1:200)	1 100	1 200	1 400	1 600	1 800	1 1000	1 1200
		+	+	+	+	+	-	-
对 流 免 疫 电 泳	BoNPV 抗原稀释度 BoNPV 反 应 抗血清稀释度 (1:5)	1	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	1/7
		+	+	+	+	-	-	-

验, 当抗原茶尺蠖病毒的稀释度为 1:800 时, 其结果仍然是阳性, 当稀释度大于 1:1000 时, 才呈阴性结果。由此可见酶联免疫吸附试验 (ELISA) 要比对流免疫电泳的灵敏度高约 200 倍。见表 II

讨 论

一般认为病毒粒子作为抗原要比包涵体即多角体有更高的特异性。我们采用经过提纯的病毒粒子作为抗原来研究茶尺蠖核多角体病毒与其他 6 种昆虫杆状病毒之间的血清学关系, 结果表明茶尺蠖核多角体病毒与其他 6 种昆虫杆状病毒不发生交叉反应, 这与 Faulkner^[2] 等用琼脂扩散方法检查甘兰尺蠖核多角体病毒抗体对家蚕核多角体病毒不起免疫反应的结果是相似的。说明茶尺蠖核多角体病毒有较高的特异性, 同黄解于^[8] 用完整多角体作为抗原所得结果亦是一致的。

抗原的纯度直接影响血清学结果的准确性, 采用恰当的分离提纯方法是至关重要的。已有资料报道用高速离心, 密度梯度离心和琼脂糖柱层析相结合的方法制备昆虫杆状病毒粒子样品, 对病毒粒子的完整性有一定程度的影响。这样制备的病毒粒子抗原中, 同时含有完整的病毒粒子和降解了的病毒粒子, 是混合抗原。为了获得高纯度的病毒粒子样品, 又要尽可能减少病毒粒子的降解, 把病毒粒子的破坏控制到最低程度, 达到免疫学所要求的纯度。蔗糖梯度离心方法是提纯病毒常用的方法之一, 工作中发现用蔗糖梯度离心提纯的病毒粒子有降解的情况, 分析可能是在洗去蔗糖的过程中, 由于渗透压的改变, 导致病毒粒子的破坏。在 Yarmamoto^[7] 等人的论文中也提出这一点。所以我们以差异离心的方法代替蔗糖梯度离心, 消除可能引起病毒降解的因素。

早些时候已有许多资料报道昆虫杆状病毒的多角体存在有碱性蛋白酶, 其最适 pH 9.5—10.5。Payne 等人^[6] 报道, 此种蛋白酶也存在于病毒粒子表面。为了不因酶的存在而影响病毒的降解, 应通过控制温度、调节 pH 以及用化学试剂处理等方法来抑制酶的活性、减少对病毒粒子完整性的影响。

酶联免疫吸附试验是近十余年发展起来的一种免疫学新技术, 其特点是灵敏度高特异性强, 可与放射免疫方法相媲美, 而此方法对人体无害。所以在医学农业以及微生物学病毒学的研究中广泛应用。Kelly 等人^[5] 应用 ELISA 方法测定棉铃虫体内的多角体病毒。我们应用此方法对 6 种昆虫杆状病毒测定的结果, 同样也表明了 ELISA 方法有上述特点。与常用的血清学方法所得试验结果是一致的。从本实验来看, 应用此方法既可提高灵敏度, 又可节省实验材料。

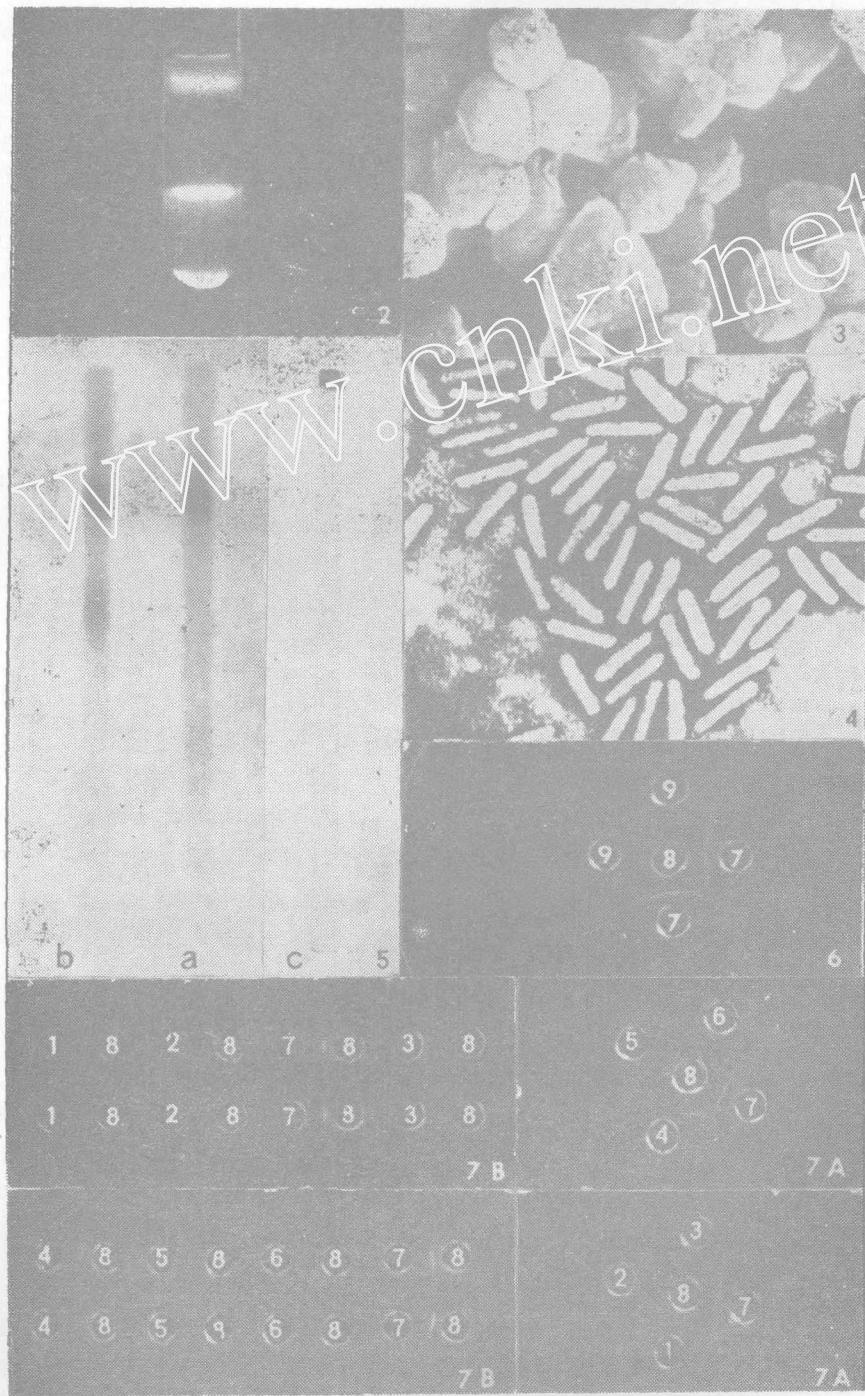


图 2 茶尺蠖多角体的蔗糖梯度离心

Fig. 2. Sucrose gradient centrifugation of BoNPV.

图 3 提纯的茶尺蠖多角体

Fig. 3. Electron micrograph of purified polyhedra.

图 4 提纯的茶尺蠖病毒粒子

Fig. 4. Electron micrograph of purified virus particles.

图 5 凝胶电泳图

a. 经 Sepharose 2B 纯化的病毒粒子在 0.7% 琼脂糖凝胶中电泳图

b. 经离心方法纯化的病毒粒子在 0.7% 琼脂糖凝胶中电泳图

c. 经 Sepharose 2B 纯化的病毒粒子在 1% 琼脂糖凝胶中电泳图

Fig. 5. Electrophoretogram.

a. Virus particles was purified by Sepharose 2B column chromatography in 0.7% agarose.

b. Virus particles Was purified by centrifugation in 0.7% agarose.

c. Virus particles Was purified by Sepharose 2B column chromatography in 1% agarose.

图 6 免疫扩散试验

(7) 茶尺蠖病毒粒子 (9) 茶尺蠖多角体蛋白

(8) 茶尺蠖病毒抗血清

Fig. 6. Immunodiffusion test.

(7) virus particles of Bo NPV.

(8) antiserum of virus particles (Bo NPV).

(9) polyhedron protein of BoNPV.

图 7 (A) 免疫扩散试验

(B) 对流免疫电泳

(1) 茶毛虫病毒粒子 (2) 油桐尺蠖病毒粒子

(3) 斜纹夜蛾病毒粒子 (4) 家蚕病毒粒子

(5) 莴麻蚕病毒粒子 (6) 桑蚕病毒粒子

(7) 茶尺蠖病毒粒子 (8) 茶尺蠖病毒抗血清

Fig. 7. (A) Immunodiffusion test

(B) Countimmunolectrophoresis

(1) virus particles of Ep NPV

(2) virus particles of Bs NPV

(3) virus particles of β 1 NPV

(4) virus particles of Bm NPV

(5) virus particles of γ c NPV

(6) virus particles of Ap NPV

(7) virus particles of Bo NPV

(8) antiserum of virus particles (Bo NPV)

参考文献

- [1] Bell, C. D. et al., 1977, *Virology* 78:162—172.
- [2] Faulkner, P. et al., 1972, *Virology* 50:920—924.
- [3] Harrap, K. A. et al., 1977, *Virology* 78:14—31.
- [4] Harrap, K. A. et al., 1974, *J. Invertebr. Pathol.* 24:55—62.
- [5] Kelly, O. C. et al., 1978, *J. Gen. Virol.* 40:465—469.
- [6] Payne, C. C. et al., 1978, *J. Virology* 26:84—92.
- [7] Yamamoto, T. et al., 1979, *J. Invertebr. Pathol.* 34:312—314.
- [8] 黄解于, 1983. 昆虫学研究集刊 3:137—143。

SEROLOGICAL STUDIES ON THE NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS OF BOARMIA OBLIQUA

Chao Huai-yu Chen Di-hua Zhang Li-ren

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuchang*)

Serological relationships of the nuclear polyhedrosis virus of *Boarmia Obliqua* with other six kinds of insect baculoviruses, namely, those of *Euproctis Pseudoconspersa*, *Buzura suppressria Prodenia litura*, *Bombyx mori Philosamia cynhtia ricini* and *Antheraea pernyi*, were studied by common serological methods such as counter-immuno-electrophoresis and immunodiffusion, and otherwise by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results obtained in the present study indicated that the anti-serum of the nuclear polyhedrosis virus of *Boarmia obliqua* reacted only with the purified particles of the above mentioned virus, and did not produce any immunoreaction with the other six kinds of insect baculoviruses. Such tests suggested that there may be no serological relationship between them, and the nuclear polyhedrosis virus *Boarmia obliqua* of has a high specificity in this aspect.