

## 分月扇舟蛾颗粒体病毒的结构多肽

孟 小 林

(武汉大学病毒系, 武汉)

### 提 要

采用垂直板不连续SDS-PAGE分析了分月扇舟蛾(*Clossera anastomosis*简称Cas)颗粒体病毒的结构多肽, 结果表明, 经Sepharese-6B柱层析的颗粒体蛋白仅有一条主肽, 其分子量为 $32 \times 10^3d$ ; 病毒粒子的结构多肽至少有23种其分子量范围在 $13-85 \times 10^3d$ 之间。采用FAS染色法测得 $V_{P_{34}}$ 、 $V_{P_{31}}$ 、 $V_{P_{10}}$ 三条主带呈弱阳性反应, 可认为有糖蛋白存在的可能性。

颗粒体病毒(GV)属于杆状病毒科的B亚群, 自法国Paillot(1926)<sup>[9]</sup>首次在甘蓝粉蝶幼虫发现颗粒体病毒以来, 至今已报道有80多种鳞翅目昆虫都对GVs敏感, 目前, 国内外一些实验室采用SDS-PAGE对颗粒体病毒的结构多肽作了大量分析研究, 其结果表明, 包含体蛋白是由分子量为 $25-32 \times 10^3d$ 一条多肽所构成; 病毒粒子具有11—25种多肽, 分子量的范围在 $9-160 \times 10^3d$ 之间<sup>[6][21][22]</sup>。

Yamafuji(1959)<sup>[16]</sup>等最早提出杆状病毒的包含体蛋白制备中存在碱性蛋白酶活性, 这已被后来的许多工作者所证实<sup>[11][13]</sup>。Tweeten(1978)<sup>[13]</sup>发现印度谷螟GV(*Plodia interpunctella* GV)的蛋白酶处于病毒粒子的囊膜上, 分子量为 $14 \times 10^3d$ , 此酶能将包含体蛋白降解成许多小分子的多肽, 为了解决这个问题, Summers等(1975)<sup>[11]</sup>曾采用热灭活结合重金属离子处理, Yamamoto(1978)<sup>[17][18]</sup>采用EDTA结合低温碱解及用1MNaCl处理都达到了灭活或抑制蛋白酶活性的效果。

分月扇舟蛾属于鳞翅目, 舟蛾科<sup>[19]</sup>, 是我国扬树的主要害虫之一, 李亚杰等对CasGV的生物学性质曾作过初步研究, 目前还未见到有对其理化性质进行研究的报道。本文采用PAGE法对CasGV的结构多肽进行了分析, 其目的是为CasGV的分类鉴定及日后从事分子生物学工作提供一些实验数据。

本稿1985年12月4日收到

## 材料与 方法

### 1. 材料

(1) 病毒: 分月扇舟蛾颗粒体病毒毒种由武汉大学病毒系昆虫病毒研究室提供。

(2) 试剂: 丙烯酰胺 (Acr)、甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 由Flukc公司生产, Sepharose-6B由瑞士Phamacia 产, 十二烷基硫酸钠 (SDS) 由长沙东方红化工厂产, 经重结晶, 牛血清白蛋白、卵清白蛋白由中科院生物物理所产, 胰蛋白酶由 Difco 公司产, 细胞色素C 由上海酵母厂产。

### 2. 方法

#### (1) 颗粒体的制备与提纯

在实验室用分月扇舟蛾 GV 添食感染 2—3 龄分月扇舟蛾幼虫, 收集病死虫, 用组织匀浆器捣碎尸体, 加约 20 倍体积 0.01M 的 PBS (pH7.4) 稀释, 60 目尼龙纱过滤, 滤液经 2000rpm 离心 20 分钟, 上清液经 4000rpm 离心 2 小时, 沉淀用 PBS 悬浮, 重复上述差离心两次。将沉淀的颗粒体重新用适量 PBS 悬浮后, 置 30% 蔗糖溶液上, 4000 rpm 离心 2 小时, 沉淀物用经预冷终浓度为 0.1% (W/V) 的 SDS 水溶液悬浮, 随后置 35—55% (W/W) 的蔗糖梯度上, 4000rpm 离心 1 小时, 取乳白色颗粒体带, 加 PBS 稀释, 7500rpm 离心 15 分钟去蔗糖, 再将沉淀的颗粒体重复一次 SDS 处理及梯度离心, 最后将纯化的颗粒体用灭菌双蒸水稀释成 100 mg/ml (湿重), 置 -4 °C 冰箱备用。

#### (2) 颗粒体蛋白的提纯

主要参照 Bell (1977)<sup>[1]</sup>、Tweeten (1980)<sup>[12]</sup> 的方法进行。将纯化的颗粒体用双蒸水稀释成 25mg/ml, 置 75 °C 水浴保温 2 小时, 冷却后, 加等体积 0.05M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-0.01M EDTA (pH10.6), 37 °C 水浴碱解 15 分钟, 加 5 倍体的双蒸水稀释终止碱解反应。悬液经 60000g 离心 1 小时, 上清颗粒体蛋白用 2 NHCl 调 pH 约 5.5 左右, 1000rpm 低速离心收集颗粒体蛋白沉淀。

蛋白沉淀用少许 0.01M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-0.05M NaCl (pH9.4) 缓冲液稀释解絮, 再经 Sepharose-6B 柱层析, 751 分光光度计检测蛋白紫外吸收, 收集蛋白峰 2, 重新调 pH 约 5.5 左右, 蛋白沉淀用缓冲液悬浮后, 置 -7 °C 冰箱备用,

#### (3) 分月扇舟蛾 GV 病毒粒子的提纯

主要参照 Tweeten (1980)<sup>[12]</sup> 的方法进行。用双蒸水将颗粒体稀释成 25mg/ml, 加等体积 0.05M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-0.01M EDTA 37 °C 水浴碱解 15 分钟, 加 5 倍体积双蒸水终止碱解反应, 4000rpm 离心 20 分钟除去未碱解的颗粒体, 上清液于 60,000g 离心 1 小时, 沉淀的病毒粒子加适量蒸馏水稀释, 置 25—55% (W/W) 的蔗糖梯度上, 70,000g 离心 1 小时, 收集病毒粒子带, 用蒸馏水稀释后再经 70,000g 离心 1 小时去蔗糖, 沉淀的病毒粒子用灭菌双蒸水稀释成 2 mg/ml<sup>[14]</sup>, 置 -7 °C 冰箱保存。

#### (4) SDS-PAGE

按Laemmli (1970)<sup>[7]</sup>的方法进行。样品加等体积的样品处理液,在沸水浴中处理5分钟,冷却后点样电泳,开始电泳时,电压为50V,30分钟后加至160V,10℃冰箱恒压4小时,电泳后的胶板置25%异丙醇-10%乙酸中固定过液,以0.25%考马斯亮兰染色1小时,于7.5%乙酸-5%甲醇中脱色。

颗粒体蛋白,病毒粒子结构多肽的分子量测定,采用Weber等(1969)<sup>[15]</sup>的方法进行。用已知分子量的标准蛋白(牛血清白蛋白MW68,000,卵清白蛋白MW43,000,胰蛋白酶MW23,300,细胞色素C MW11,700)的Rm值与其分子量的对数绘制工作曲线,求样品蛋白的分子量。

#### (5) 分月扇舟蛾颗粒体病毒粒子糖蛋白的测定。

按Fairbanks (1971)<sup>[5]</sup>的方法进行。电泳后的胶板在25%异丙醇-10%乙酸中浸泡过液,用1% $\text{HIO}_4$ 氧化2小时(避光),然后用1%三氯乙酸-10%乙酸洗涤3次,每次约2小时,再放入Shiffs试剂中4℃过夜,最后在0.1%偏重亚硫酸钠-0.01NHCl中反复浸洗,7.5%乙酸中保存。

## 结 果

### 1. CasGV颗粒体和病毒粒子的形态大小及纯度

按上述方法提纯的颗粒体,经电镜检查,其表面光滑,无破损,呈卵圆形,长径约370毫微米,短径约230—240毫微米。未检查到有宿主细胞碎片及杂质(图1),按上述方法提纯的病毒粒子,经电镜检查,病毒粒子呈杆状,大小均一形态较为完整(图2),长约200—210毫微米,短径约为30毫微米左右;以病毒粒子对紫外吸收的曲线来看(图3), $\lambda 230-300\text{nm}$ 呈平滑下降,在 $\lambda 260$ 处没有出现吸收峰, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的比值为1.3。

### 2. CasGV颗粒体蛋白的纯度及多肽分析

颗粒体蛋白经Sephrose-6B柱层析,其洗脱曲线及紫外吸收曲线如(图4),峰2具有典型的蛋白紫外吸收特征, $\text{OD}_{280}/\text{OD}_{260}=1.79$ ,为纯化的颗粒体蛋白。颗粒体蛋白经Sephrose-6B柱层析,在SDS-PAGE图谱中仅为一条带(图5),分子量为 $32 \times 10^3\text{d}$ 。

### 3. CasGV病毒粒子结构多肽分析

采用不连续系统SDS-PAGE测得该病毒粒子结构多肽有23条(图7),根据标准蛋白的工作曲线(图6),求得病毒粒子23种结构多肽的平均分子量(表1),分子量的范围为 $13-85 \times 10^3\text{d}$ 。其中Vp77、Vp71、Vp66、Vp61、Vp58、Vp48、Vp32、Vp30、Vp28、Vp26、Vp25为弱带;Vp34、Vp31、Vp19,为蛋白含量最高的主带,其它为弱强带。

采用PAS染色法,测得Vp34、Vp31、Vp19、三条主带及对照(辣根过氧化物酶)呈弱阳性反应。

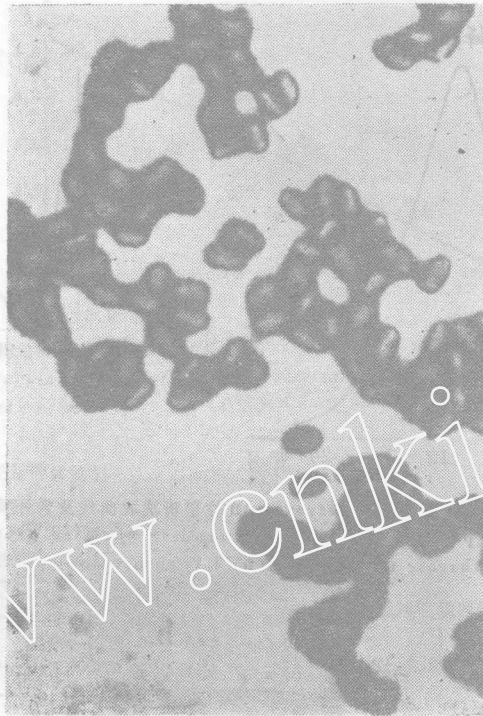
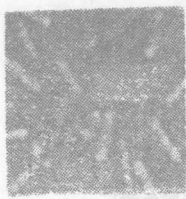


图1 Cas 颗粒体 (10000x)  
 Fig1 Cas GV (10000X)



图(2) CasGV 病毒粒子 (38000 x)  
 Fig2 Cas GV-Virion (38000X)

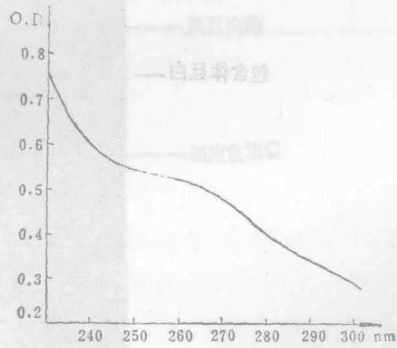


图3 Cas GV 病毒粒子紫外吸收曲线  
 Fig3 Virion of Cas GV UV absorption curve

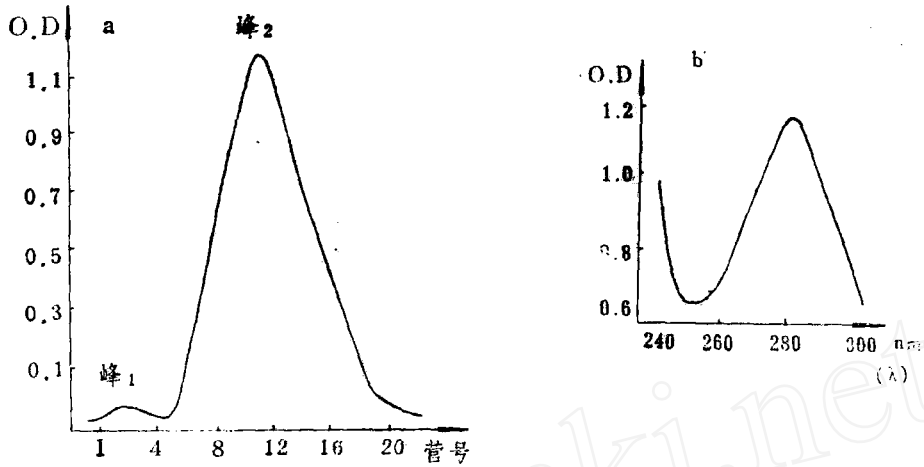


图4 Cas GV颗粒体蛋白经Sephacryl-6B柱层析洗脱曲线及紫外吸收特征(峰2)  
Fig 4 (a) Elution pattern obtained when crudely purified granulin was passed through a Sephacryl 6B column, (b) UV absorption spectra of peak 2.

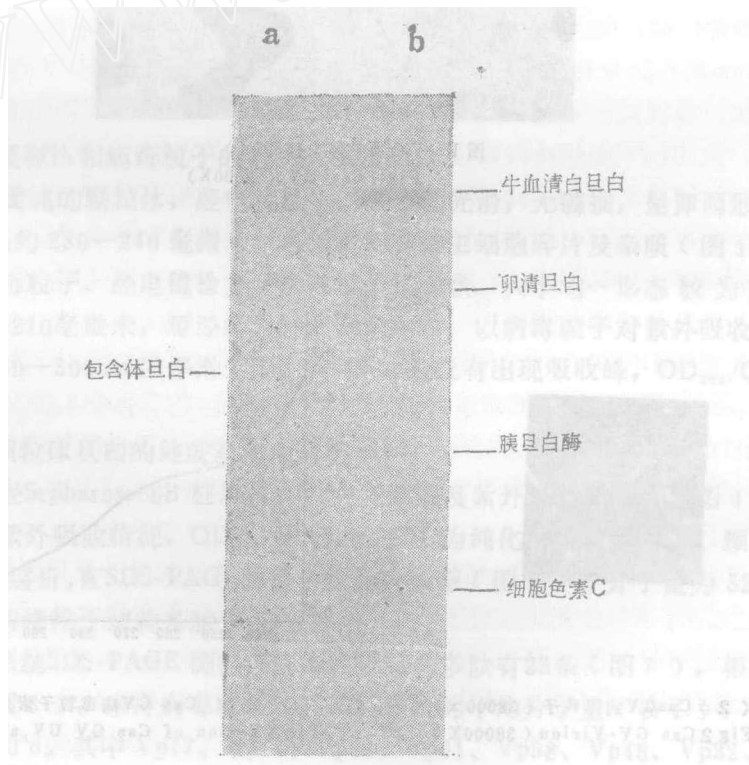


图5 CasGV颗粒体蛋白10%SDS-PAGE图谱  
a. 颗粒体蛋白带  
b. 标准蛋白带  
Fig (5) 10% SDS-PAGE spectra of Cas GV granulin  
a. Granulin band  
b. Standard protein bands,

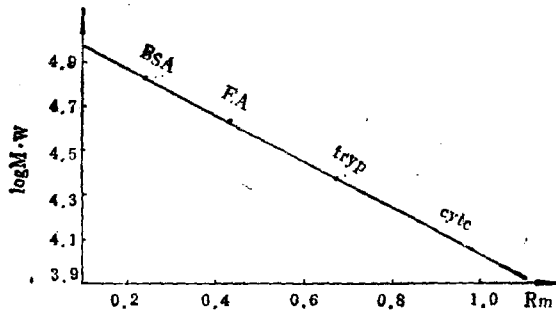


图6 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 标准蛋白相对迁移率 ( $R_m$ ) 与分子量对数的线状关系  
Fig 6 10% polyacrylamid slab gel electrophoresis line relation of standard protein relative migration  $R(m)$  with Log molecular weight.

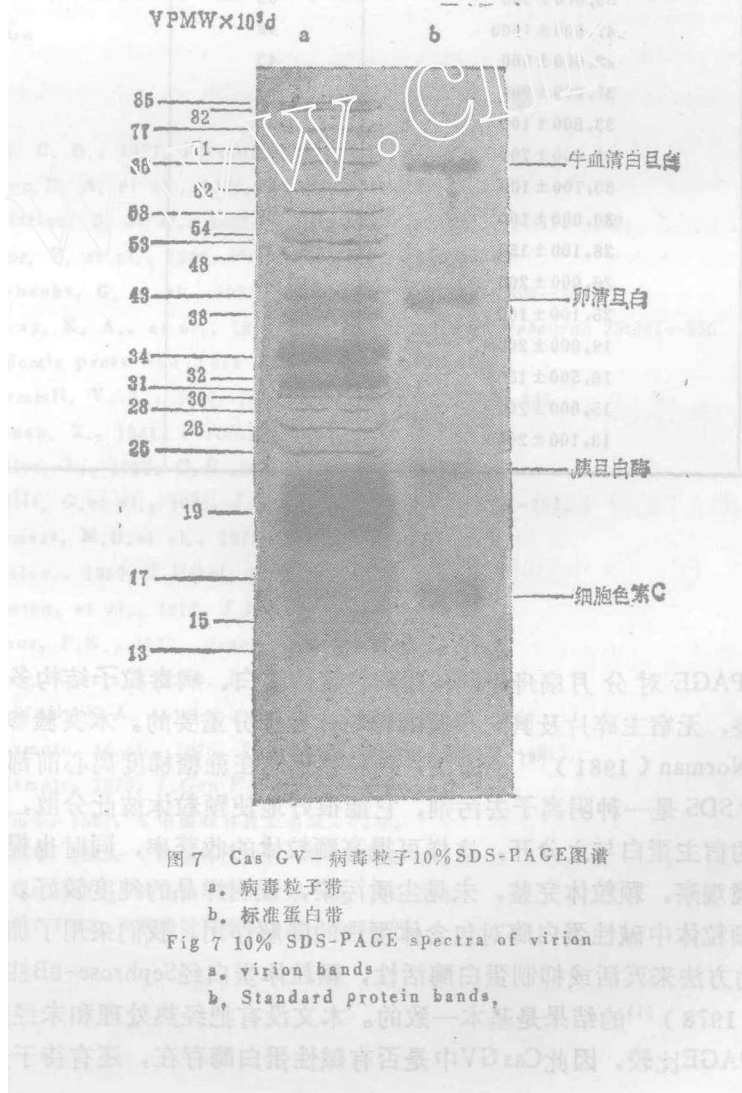


图7 Cas GV-病毒粒子10%SDS-PAGE图谱

- a. 病毒粒子带
- b. 标准蛋白带

Fig 7 10% SDS-PAGE spectra of virion

- a. virion bands
- b. Standard protein bands.

表1 Cas GV病毒粒子结构多肽的分子量  
Table 1 Molecular Weights of virion structure polypeptide

| 多肽编号 | M · W         | VpM · W × 10 <sup>3</sup> d | 备 注                        |
|------|---------------|-----------------------------|----------------------------|
| 1    | 85,100 ± 100  | 85                          | 本结果为四次<br>PAGE 结果的<br>平均值。 |
| 2    | 82,200 ± 900  | 82                          |                            |
| 3    | 77,100 ± 400  | 77                          |                            |
| 4    | 71,000 ± 1500 | 71                          |                            |
| 5    | 66,000 ± 1500 | 66                          |                            |
| 6    | 61,600 ± 100  | 62                          |                            |
| 7    | 58,200 ± 600  | 58                          |                            |
| 8    | 54,300 ± 600  | 54                          |                            |
| 9    | 53,000 ± 500  | 53                          |                            |
| 10   | 47,600 ± 1900 | 48                          |                            |
| 11   | 42,600 ± 900  | 43                          |                            |
| 12   | 37,600 ± 200  | 38                          |                            |
| 13   | 33,300 ± 100  | 34                          |                            |
| 14   | 31,600 ± 700  | 32                          |                            |
| 15   | 30,700 ± 100  | 31                          |                            |
| 16   | 30,000 ± 100  | 30                          |                            |
| 17   | 28,100 ± 150  | 28                          |                            |
| 18   | 26,000 ± 200  | 26                          |                            |
| 19   | 25,100 ± 100  | 25                          |                            |
| 20   | 19,000 ± 2000 | 19                          |                            |
| 21   | 16,500 ± 1500 | 17                          |                            |
| 22   | 15,000 ± 2000 | 15                          |                            |
| 23   | 13,100 ± 2000 | 13                          |                            |

## 讨 论

采用 SDS-PAGE 对分月扇舟蛾颗粒体的包含体蛋白、病毒粒子结构多肽进行分析时,为提取完整,无宿主碎片及其它杂质的颗粒体是十分重要的。本实验参照 Christian (1981)<sup>[3]</sup>及 Norman (1981)<sup>[8]</sup>的方法,颗粒体每次在蔗糖梯度离心前都经 0.1% 的 SDS 处理,由对 SDS 是一种阴离子去污剂,它能很好地使颗粒体彼此分散,并能使吸附在颗粒体表面的宿主蛋白与之分开,这样可提高颗粒体的收获率,同时也提高了颗粒体的纯度。经电镜观察,颗粒体完整,未见尘质污染,证明样品的纯度较好。

为了防止颗粒体中碱性蛋白酶对包含体蛋白的降解作用,我们采用了加热和在碱解液中加入 EDTA 的方法来灭活或抑制蛋白酶活性,颗粒体蛋白经 Sephrose-6B 柱层析,其洗脱曲线与 Bell (1978)<sup>[11]</sup>的结果是基本一致的。本文没有把经热处理和未经热处理的包含体蛋白进行 PAGE 比较,因此 Cas GV 中是否有碱性蛋白酶存在,还有待于进一步研究讨论。

Phyllis (1981)<sup>[10]</sup> 采用PAS染色法证实了一星粘虫 (*Pseudaletia unipuncta*) 颗粒体其包含体蛋白和病毒粒子结构多肽中糖蛋白的存在, 作者并认为这种成份对于病毒宿主的特异性可能是重要的。Brown (1977)<sup>[2]</sup> 采用PAS法测定Cabbage White Butterfly GV病毒结构多肽中的糖蛋白则得到阴性结果, 由于PAS染色法还不是一种十分灵敏的方法, 为了提高检测的灵敏度, Dobos (1980)<sup>[4]</sup> 曾用 [<sup>14</sup>C] 标记的乙酰D-葡萄糖作体内标记, 发现 *Autographa californica* NPV 结构多肽中有6种糖蛋白, 但 Tweeten (1980)<sup>[12]</sup> 曾用体外 [<sup>3</sup>H] 标记和体内 [<sup>14</sup>C] 聚蔗糖和 [<sup>14</sup>C] 葡萄糖标记则未测出 *Plodia interpunctella* GV 中有糖蛋白存在。我们用PAS法染色发现 CasGV 中的 Vp24、Vp31、Vp19 三条主肽呈弱阳性反应, 认为有糖蛋白存在的可能性。由于PAS染色法其灵敏度的限制, 因此, 在 CaSGV 病毒粒子中一些弱带的糖蛋白可能未被检测出来, 如采用同位素标记可能会更灵敏一些。至于糖蛋白的定量和定位及其与宿主特异性的关系还需进一步研究。

#### 参 考 文 献

- [1] Bell, C. D., 1977, *Virology* 78:162—172.
- [2] Brown D. A. et al., 1977, *Virology* 81:317—327.
- [3] Christian, B. et al., 1981, *J. Invertebr. Pathol.* 37:174—180.
- [4] Dobos, P. et al., 1980, *Virology* 103(2):446—464.
- [5] Fairbanks, G. et al., 1971, *Biochemistry* 10(30):2606—2617.
- [6] Harrap, K. A., et al., 1979, *Advances in Virus Research* 25:237—355  
Academic press New York San Francisco London
- [7] Laermli, V. K., 1970, *Nature (London)* 227:680—685.
- [8] Norman, E., 1981, *Virology* 155:173—181.
- [9] Phillot, A., 1926. *C.R. Acad. sci.* 182:180—182.
- [10] Payllis, G. et al., 1981, *J. Invertebr. Pathol.* 38:303—304.
- [11] Summers, M. D. et al., 1975, *J. Virol.* 16:1108.
- [12] Tweeten., 1980, *J. Virol.* 33:877—886.
- [13] Tweeten, et al., 1978, *J. Virol.* 26:702.
- [14] Verma, F. K., 1977, *Annal Biochem.* 82:362—371.
- [15] Weber, K. et al., 1969, *J. Biochemi.* 224:4406—4412.
- [16] Yamafuji, K. A. et al., 1959, *Enzymologica* 22:1—12.
- [17] Yamamoto, et al., 1978, *J. Invevrtor Patnol.* 32:202—211.
- [18] Yamamoto, 1979, *J. Gen Virol.* 45:371—381.
- [19] 杨秀元等, 1981. 《中国森林昆虫名录》P208.
- [20] 李亚杰等, 1981, 《林业科技通讯》第5期P23—24.
- [21] 潘约新, 1984, 《病毒研究集刊》第一集, 148—154.
- [22] 叶林柏, 1984, 《病毒研究集刊》第一集95—97.



## THE STRUCTURE POLYPEPTIDES FROM CLOSTERA ANASTOMOSIS GRANULOSIS VIRUS

Meng Xiao-lin

(Virology Department Wuhan University)

The structure polypeptides of Clostera anastomosis granulosis virus were studied by vertical slab SDS-PAGE. The result shows that Cas GV granulin passed through Sepharose-6 B consists of one major polypeptide component with an estimated molecular weight of  $32 \times 10^3$ d. The virus particle revealed at least composition of 23 bands with molecular weight ranging from 13 to  $85 \times 10^3$ d. 3 major polypeptide of virion were positively reacted by PAS staining detection and could have glycoproteins on the virion.

## 中华医学会湖北分会病毒学会成立

### THE FOUNDATION MEETING OF HUBEI VIROLOGY BRANCH OF CHINESE MEDICAL ASSOCIATION

中华医学会湖北分会病毒学会成立暨学术交流会，于1986年6月19日至21日在武昌东湖宾馆举行。出席本会议的代表来自本省高等医药院校、科研单位及地市、县级医疗防疫单位共100多人，共收到论文100多篇。

大会邀请了中华医学会付主任委员洪涛教授，中华医学会湖北分会会长，湖北省卫生厅付厅长金振涛同志，以及中华医学会湖北分会付会长，湖北医学院院长杨家齐同志参加会议，他们都专程赶来向大会祝贺。还有与湖北医学院病毒研究所协作的美国陆军医学传病学病研究所的James Ledue博士和James Meag博士也被邀请参加会议，并作了专题报告。

参加这次大会的还有老一辈的病毒学专家，也有年富力强的中青年病毒学工作者。他们欢聚一堂，畅所欲言，充分体现了病毒学是人材辈出，后继有人。与会代表一致表示要为祖国的病毒学研究赶超世界先进水平努力奋斗。大会在热烈的掌声中圆满结束。

向远耀