

两株粘虫核型多角体病毒理化性质的比较研究

罗怡珊 孙富林

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

提 要

电镜观察粘虫 (*Leucania separata*) 核型多角体病毒的不同株系内蒙株 (简称N株) 和阜阳株 (简称F株) 的多角体、病毒粒子及核衣壳在形态大小方面都没有很大差别, DNA分子大小也相近。但在 SDS-PAGE 多肽图谱及 DNA 酶切图谱上则表现出一定的差异。经 SDS-PAGE 所得病毒粒子多肽图谱 N 株有 17 条多肽, F 株有 19 条多肽。两株病毒 DNA 经 BamHI 酶切 N 株获得 7 条带, F 株则有 8 条带, 说明 DNA 酶切位点不尽相同。据此, 生化分析能更快速、准确地进行株系分类。

关键词: 粘虫核型多角体, 病毒粒子, SDS-PAGE, 病毒多肽图谱, 病毒核酸内切酶图谱

目前据病毒形态大小和免疫性等方法对同一种病毒的不同株系分类已不能满足分类学的要求。现在国外多用病毒的核酸及蛋白的生化分析区分种内的株系差别^[1-3]。本文着重报道同一种粘虫核型多角体病毒的两个不同地方株型态及理化性质的比较研究。

材料与方 法

(一) 多角体的纯化 从内蒙分离得到的粘虫多角体病毒 N 株和从安徽阜阳分离得到的粘虫多角体病毒 F 株分别感染 3—4 龄粘虫, 接种 6—7 天后收集死虫, 取典型病死虫体捣碎。三层纱布过滤后分别得到 N 株和 F 株的悬浮液。500r/m、4000r/m 差速离心后再经 40%—65% (W/V) 蔗糖梯度离心得到提纯的多角体^[1,4], 进行电镜观察。

(二) 病毒粒子的纯化 将纯化的多角体悬液 (10mg/ml) 加入等体积碱液 (0.1mol/L Na_2CO_3 , 0.1mol/L NaCl pH10.8) 降解数分钟后终止反应, 取少量样品制片负染后电镜观察。降解后的悬液经 4000 转/分低速去碎片及未降解的多角体, 再经 18,000r/m 离心 60 分钟, 沉淀物用少量 0.05mol/L Tris, pH7.6 悬浮再经 Sepharose 6B 柱层析收集得到纯化的病毒粒子^[1,4,5]。

(三) 病毒粒子的聚丙烯酰胺凝胶电泳 采用 Laemmli 不连续缓冲系统, 浓缩胶和分离胶浓度分别为 3% 和 9%。病毒粒子经处理后加样, 电泳约 4—5 小时, 再用 0.1% 考马斯亮兰 R_{250} 染色 1 小时, 染色后可见多肽图谱^[1,4,7]。

(四) DNA 提纯及电镜观察 用 SDS-酚法抽提 DNA^[6,9,10] 经冷乙醇沉淀 DNA 后悬于

本文于1987年9月22日收到

0.1mol/L TE 缓冲液中, 取少量 DNA 样品作单分子展层经铂-钨合金 10° 旋转摄影后电镜观察 DNA。

(五) DNA 紫外检测及 T_m 值测定 在 740 型紫外分光光度计上检测提纯的 DNA。在自动 T_m 测试仪上测试 T_m 值, 根据 T_m 值求出 (G+C) 含量^[9,10]。

(六) DNA 酶解反应及琼脂糖电泳 分别取 2 DNA、F 株和 N 株 DNA 5—10 μ g 分别加适量的 BamHI, 37 $^\circ$ C 水浴消化 2—3 小时, 0.7% 琼脂糖胶电泳 15 小时, 酶解缓冲液按文献^[12]的配方。

结 果

(一) 多角体病毒粒子及核衣壳的电镜观察

电镜观察纯化的 N、F 株多角体都呈五边形、六边形和多边形 (图 1)。病毒粒子

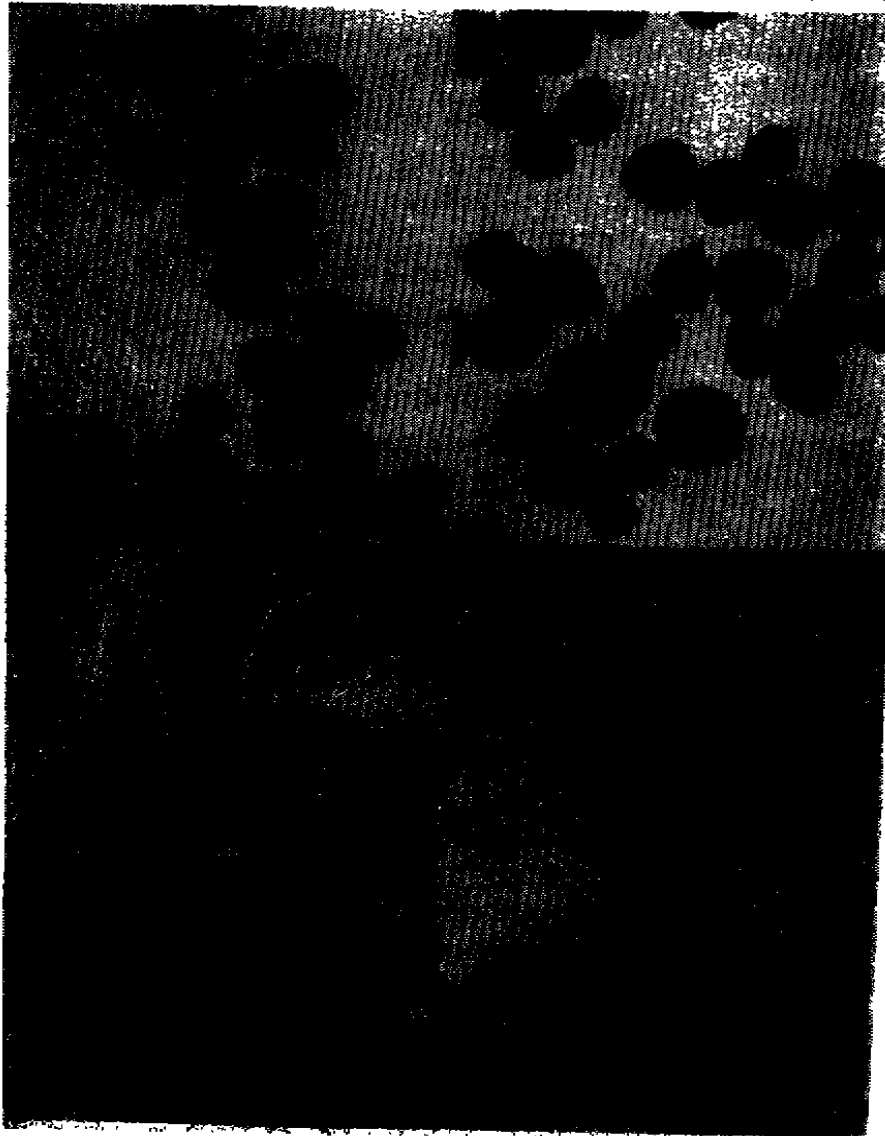


图1 经蔗糖梯度提纯的多角体

a. N株多角体 ($\times 5,400$) b. F株多角体 ($\times 6,600$)
Fig. 1 Purified NPV
a. NPV of N strain ($\times 5400$) b. NPV of F strain ($\times 6600$)

图2 电镜下的病毒粒子

提纯的多角体经碱液处理后得到病毒粒子和病毒束磷钨酸负染
a. N株病毒粒子 ($\times 3400$) b. F株病毒粒子 ($\times 3400$)

Fig 2 The virus particles

a. Virus particles of N strain ($\times 34000$) b. Virus particles of F strain ($\times 34000$)

都为杆状，并有帽状结构，为多粒包埋（图2）。病毒粒子进一步释放出核衣壳（图3）。多角体、病毒粒子和核衣壳大小见表1。

表1 两株病毒大小比较

Table 1 Dimension of the Polyhedra, Virus particles and Nucleocapsids

strain	多角体 (um) polyhedra	病毒粒子 (nm) virus particles		核衣壳 (nm) Nucleocapsids	
	直径 Diameter	长 Length	宽 Width	长 Length	宽 Width
N株 N strain	1.704	354.7	126.8	308.8	38.2
F株 F strain	1.622	387.2	126.4	284.5	37.8

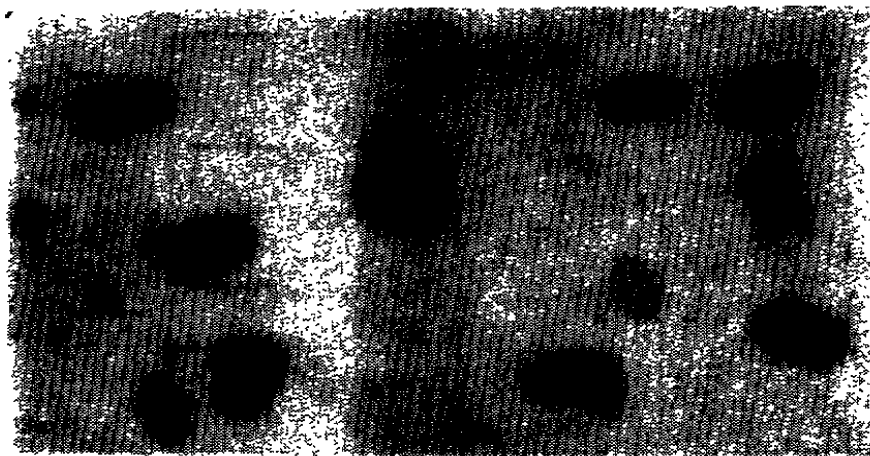


图3 电镜下的核衣壳

病毒粒子进一步碱解，磷钨酸负染后可见核衣壳
a. N株核衣壳 ($\times 20,000$) b. F株核衣壳 ($\times 26,000$)

Fig 3 The nucleocapsids

a. Capsid of N strain ($\times 20,000$) b. Capsid of F strain ($\times 26,000$)

(二) 病毒粒子的纯化

粗提纯的病毒粒子经 Sepharose 6B 柱层析后的洗脱曲线表明 N 株有 1 个峰（峰

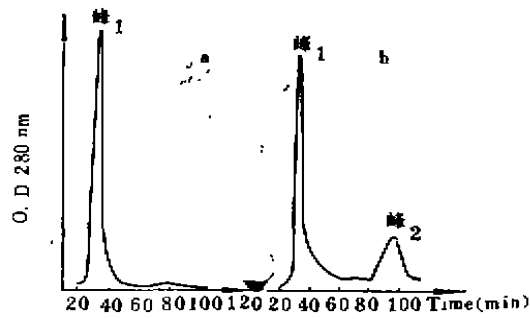


图4 病毒粒子经Sepharose 6B柱层析洗脱曲线
a. N株病毒粒子 b. F株病毒粒子
Fig 4 Elution profile of virus particles on Sepharose-6B
a. Virus particles of N strain
b. Virus particles of F strain

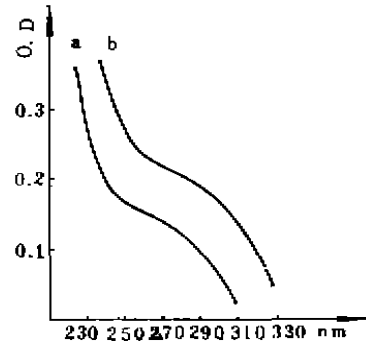


图5 N株峰1和F株峰1紫外吸收光谱
a. N株峰1 b. F株峰1
Fig 5 UV absorption spectrum of N strain peak 1 and F strain peak 1.
a. N strain peak 1
b. F strain peak 1



	S	N	F
92,500		— A	—
66,200	—	— B	—
		— C	—
		— D	—
		— E	—
		— F	—
45,000	—	— G	—
		— H	—
		— I	—
31,000		— J K	—
		— L	—
		— M	—
21,500		— N	—
		— O	—
14,400		— P	—
		— Q	—

图6 病毒粒子SDS-PAGE
电泳缓冲液为SDS·Tris·甘氨酸系统, pH8.3, 100, 3-4小时
S, SDS-PAGE低分子量标准蛋白
N, N株病毒粒子 F, F株病毒粒子
Fig 6 SDS-PAGE of virus particles
S, Standard proteins, Phosphorylase B (92,500)
BSA (66,200), Ovalbumin (45,000), Carbonic anhydrase (31,000),
Soybean trypsin inhibitor (21,500), Lysozyme (14,400).
N, Virus particles of N strain F, Virus particles of F strain

1.), F 株有两个峰(峰 1 和峰 2)(图 4)。两株病毒的峰 1 经测定具有典型病毒粒子紫外吸收光谱(图 5), 其 A_{260}/A_{280} N 株为 1.23, F 株为 1.25。

(三) 病毒粒子 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

病毒粒子经 SDS-PAGE 染色后可见 N 株病毒粒子共有 17 条多肽, 其中 I、P 为主肽, 其它为次肽。F 株病毒粒子共有 19 条多肽, 其中 n 为主肽, 其余为次肽。F 株比 N 株多 2 条带, 两株有 13 条多肽迁移率一样, 其它不一样(图 6 及表 2)。表 2 是根据标准蛋白带谱(图 6)分子量作出其工作曲线, 求出回归方程 $y = -0.4x + 5.1$, 算出 N、F 株多肽的分子量(表 2)。可看出它们的主肽分子量完全不一样。

表 2 病毒多肽分子量

Table 2 Molecular weights of the virus particles polypeptide

N 株 (N strain)		F 株 F (strain)	
病毒多肽 Virus polypeptide	分子量 MW	病毒多肽 virus polypeptide	分子量 MW
A	99125	a	99125
B	63095	b	63095
C	60591	c	60591
D	54954	d	54054
E	50118	e	53703
F	47863	f	50118
G	45709	g	48564
H	42659	h	47863
I	40738	i	43652
J	35481	j	42984
K	33884	k	41675
L	30200	l	40738
M	26915	m	33884
N	23988	n	30200
O	21380	o	26915
P	19055	p	23988
Q	14125	q	21380
		r	19055
		s	14125

(四) DNA 的电镜观察

电镜观察两株病毒 DNA, 可见呈线状、开环和超螺旋结构, 其中以开环及线状结构为多。N 株和 F 株的 DNA 长度平均分别为 $3.69 \times 10^5 \text{ \AA}$ 和 $3.67 \times 10^5 \text{ \AA}$, 分子量分别为 70.82×10^6 和 70.64×10^6 道尔顿(图 7)。

(五) 提纯 DNA 的检测和 T_m 值测定

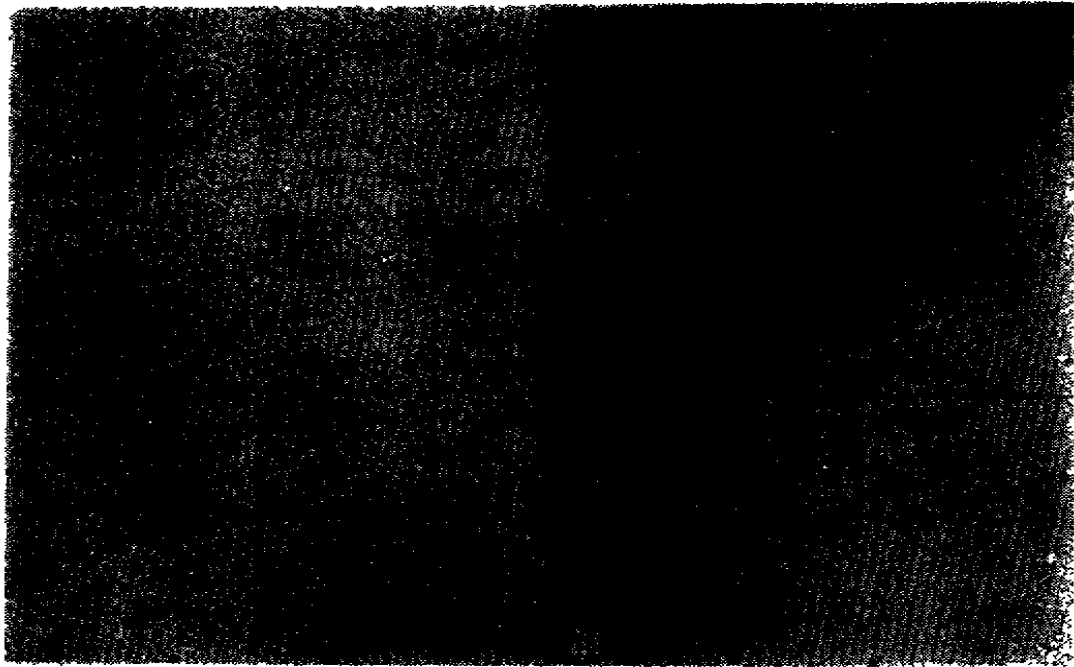


图7 DNA电镜观察
经SDS-酚法提纯DNA, 经单分子展层制样后观察
a, N株DNA ($\times 23,000$) b, F株DNA ($\times 12,400$)
Fig 7 purified DNA under electron microscope
a, N strain DNA ($\times 23,000$)
b, F strain DNA ($\times 12,400$)

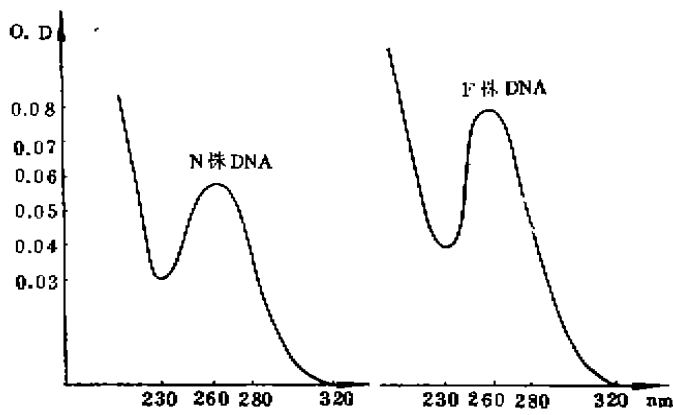


图8 DNA紫外扫描图谱
Fig. 8 UV absorption spectrum of
F strain DNA and N strain DNA

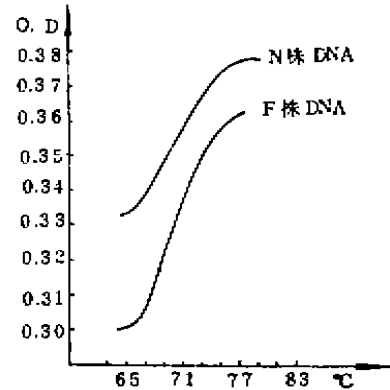


图9 DNA热变性曲线
Fig. 9 Thermal denaturation profile of N
strain DNA and F strain DNA

经SDS-酚法抽提的DNA紫外检测, 吸收光谱在260Å附近有最高吸收峰(图8), A_{260}/A_{280} 值N株为1.61, F株为1.73。

核酸样品溶解于0.1mol/L SSC 溶液中测得在不同温度下的吸光率。经校正后作出热变性曲线(图9)得到N株和F株DNA的 T_m 值, N株为70.2, F株为70.9。根据林万明^[8]等修改Mandel公式所得经验公式 $GC = (T_m - 53.5) \times 2.44$, 求得N株GC含量为40.7%, F株41.5%。

(六) DNA 酶解反应及酶切图谱

DNA经酶解后电泳, 溴化乙锭染色, 紫外照射下可见酶切图谱。BamHI 酶解N株和F株DNA, 结果F株比N株多e带。并且两株中的F和g带迁移率不同(图10)。

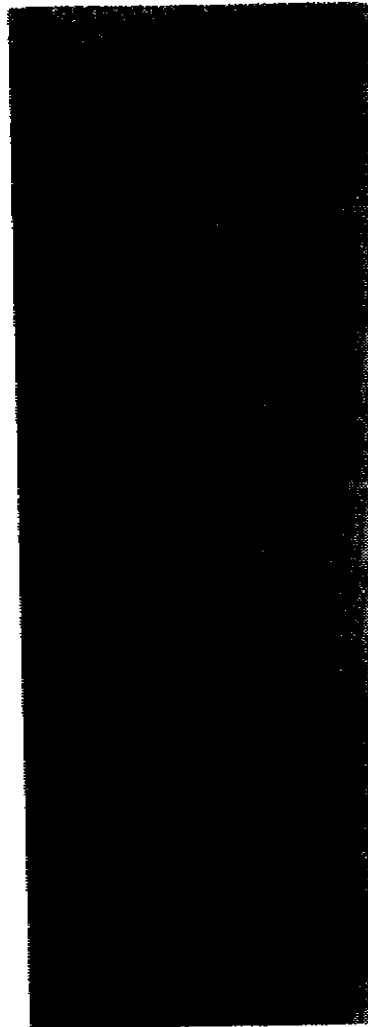


图10 DNA酶切图谱

电泳缓冲液 0.09mol/L TBE.

电泳 30mA, 14—15小时.

Fig. 10 BamHI Restriction

map of N and F DNA

讨 论

N株及F株核型多角体病毒是在不同的地区粘虫体内分离得到的, 按昆虫病毒分类命名的习惯都属于同一种粘虫多角体病毒的不同地方株^[13]。通过上述实验可知这两个

不同的地方株其形态大小基本相同。图 6 和表 2 说明尽管病毒粒子多肽带大部分迁移率一样, 但有少数明显不同, 并且他们的主肽分子量不一样。在核酸提取过程中, 我们用纯化的多角体作材料, 得到纯化的 DNA, 测得两株 DNA 的 T_m 值不同, 说明它们的碱基组成不同, 这一点在后面的酶切图谱中也得到证实。

本实验通过对 N 株和 F 株的比较研究可知它们在形态方面很相似, 我们还初步作了两株病毒粒子作抗原的免疫扩散实验, 证明他们的抗原性相同, 而它们的蛋白质多肽结构和 DNA 酶切位点却表现出明显不同。因此从这些不同方面去进行同一种病毒的不同株系分类显然是必要的。正如国外许多分类学专家提出的那样^[1-3], 蛋白和核酸的生化分析在分类工作上将有着重要意义。

参 考 文 献

- [1] Keith A. H. et al., 1977 *Virology* 79: 14—16.
- [2] John, D. K. et al., 1982, *Virology*, 112: 381—392.
- [3] Keith, D. and Summers, M. D., 1981, *Virology*, 112: 190—197.
- [4] Summers, M. D. et al., 1978, *Virology*, 84: 390—402.
- [5] 武汉大学病毒系“病毒学研究集刊”, 第一集: 190—201.
- [6] Rohrman, C. F. et al., 1982, *J. Invertib. Pathol.*, 40: 237—241.
- [7] Larmmlt, U. K. et al., 1970, *Nature*, 227, 680—685.
- [8] 林万明, 1981, 微生物学通报, 8(5): 245—247.
- [9] Summers, M. D. et al., 1973, *J. Inverted. pathol.* 12: 1366.
- [10] 孙松柏等, 1985, 华中农学院学报 4(2), 75—80
- [11] Robert, J. C. et al., 1977, *J. Inverteb. Pathol.* 29: 182—191.
- [12] Maniatis, T. et al., 1982, *Molecular Cloning*, America, CSH.
- [13] Matthews, R. E. F., 1982, *Classification and Nomenclature of Virus Switzerland*, p. 52.

The Comparison on Physical and Chemical Characterization of Two Nuclear Polyhedrosis Virus from *Leucania separata*

Luo Yi-shan Sun Fu-lin

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Two strains, N and F, of nuclear polyhedrosis virus were isolated from infected *Leucania separata* in different places. The morphology of these two strains is identical, but their biochemical properties are different. The SDS-PAGE map showed 17 polypeptides bands for N strain and 19 bands for F strain. The BamHI restriction map showed 7 fragments for DNA of N strain and 8 fragments for DNA of F strain.

Key words, *Leucania separata* NPV, Virus particle,
SDS-PAGE map of Virus polypeptides,
Restriction map of virus DNA.