

## 几株杆状病毒包涵体蛋白双向高压 电泳指纹图谱比较

周晓峰 叶林柏 刘年翠

(武汉大学病毒系, 武汉430072)

### 提 要

用蔗糖密度梯度离心提纯的 6 种昆虫病毒包涵体 (BsNPV<sub>1</sub>, BsNPV<sub>2</sub>, BtNPV, EpNPV, PrGV, PxGV) 经 DAS 碱解, 粗提纯的包涵体蛋白经 Sepharose-6B 柱层析和 Canalco-prep-disc 法进一步纯化后, 在 SDS-PAGE 中显示为一条分子量约 28,000d 的带。用常规双向免疫扩散法检查各种包涵体蛋白之间的差异, 结果表明血清学 BsNPV 与 BtNPV, PrGV 与 PxGV 之间都是不可分辨的。6 种包涵体蛋白的双向高压指纹图谱表明, 它们的指纹图谱都不同程度地存在着一些相同或十分相似的肽点。就每种病毒的指纹图谱又都是独特的, NPV 间相似性低于 GV 间相似性。我们认为 NPV 和 GV 的包涵体蛋白在结构上存在着一些相同的或相似的保守区域, 但不同种之间在整个一级结构上是有差异的。利用包涵体蛋白的指纹图谱鉴定杆状病毒是个灵敏可行的方法。

**关键词:** 包涵体蛋白 指纹图谱 双向扩散

1982 年国际病毒命名与分类委员会 (CPTV) 第四次报告中, 把所有昆虫病毒分为 9 个科: 杆状病毒科、痘病毒科、细小病毒科、弹状病毒科、呼肠孤病毒科、微核糖核酸科、松大蚕  $\beta$  病毒科、野田病毒科<sup>[1]</sup>。1984 年 S. Kawase 提出还应增加反转录病毒科、嵌柏样病毒科、多分节 DNA 病毒科, 但在种的分类上则基本上是以最初所分离的宿主来命名的, 但由于一种病毒可感染不同的宿主, 一种宿主又可能被不同的病毒感染, 因此认为以宿主作为病毒种的命名是不科学的, 它给昆虫病毒的分类造成极大的混乱<sup>[2]</sup>。

在昆虫病毒的识别鉴定中, 血清学技术 (如 Aoki<sup>[4]</sup>, Janade<sup>[5]</sup>, Krywienczak<sup>[6]</sup>, Bergold<sup>[4]</sup>, Summers<sup>[7]</sup> 等)、结构蛋白分析 (如 Summers<sup>[8]</sup>, Harrap<sup>[9]</sup>, Brown<sup>[10]</sup>, Tween<sup>[10, 10]</sup>, Smith<sup>[13]</sup>) 等都曾被用来区别不同种病毒, 这些方法都有各自的优点和局限。对杆状病毒包涵体蛋白一级结构的研究表明, 不同种病毒的包涵体蛋白具有一些共同的或相似的保守区域, 但都是各不相同的<sup>[11, 2]</sup>, 运用双向高压电泳技术比较包涵体蛋白的指纹图谱可以分辨不同的病毒而被用于病毒鉴定, 这方面国外已进行了初步探讨 (如 Summers, M. D., Smith G. E.<sup>[14][15]</sup>, Cibulsky<sup>[16]</sup> 等)。实践证明效果较好。此法的优点是简便、快速、样品用量少, 分辨率达到一个氨基酸的差异<sup>[18]</sup>。本文将报道我们所做的 6 种病毒包涵体蛋白的双向高压指纹图谱及其抗原交叉反应的结果。

本文于 1989 年 2 月 28 日收到。

## 材料与方 法

油桐尺蠖核型多角体湖北分离株 (BsNPV1), 茶毛虫 NPV (EpNPV), 茶云尺蠖 NPV (BtNPV), 菜青虫 GV (PrGV), 小菜蛾 GV (PxGV) 均由武汉大学病毒系昆虫室提供。

油桐尺蠖核型多角体湖南分离株 (BsNPV2) 由长沙水利电力师范学院甘运颢副教授提供。

1. 包涵体纯化: 参照 Summers M.D (1975) 与 Smith G.E. (1975) [14] 的方法, 即用差异离心结合蔗糖密度梯度离心进行纯化。

2 包涵体蛋白的提取、纯化、蛋白定量: 参照 Summers M.D (1975) 和 Smith G.E. [14, 16] 的方法, 包涵体碱解前, 75℃ 水浴 2hr, 以钝化内源蛋白酶, 然后包涵体加等体积 DAS (稀碱性碱液) 碱解后, 62,000g 离心 1hr 除去病毒粒子。粗步纯化包涵体蛋白液用 1N HCl 调 PH 至 5.6 左右沉淀包涵体蛋白, 4℃ 冰箱放置 4 hr, 1,000r/m 离心 15 分钟, 蛋白沉淀用适量 0.01 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-0.002 mol/L EDTA, PH9.0 缓冲液溶解。以此为样品, 经 sepharose-6B 柱层析 (洗脱柱 1.7 × 22cm, 洗脱液 0.01 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-0.002 mol/L EDTA, PH9.0, 洗脱速度 0.8 ml/min) 和 pep kin 的 Canalco-prep-clise 制备电泳 [14] 作进一步纯化后, 按照 Laemmli (1970) 和 Maizel (1971) [17] 的方法, 于 SDS-PAGE 中检测包涵体蛋白纯度。蛋白浓度的测定用紫外吸收法, 按 (mg/ml) = 1.45OD<sub>280</sub> - 0.74OD<sub>260</sub> 公式计算。

3 肽样品制备—胰酶消化。用 0.25 mol/L NaHCO<sub>3</sub>-0.01 mol/L EDTA (pH9.0) 在试管中溶解的包涵体蛋白 (10 mg/ml) 1 ml 加 0.06 mg 结晶胰蛋白酶置 37℃ 温水浴中 18hr。

### 4 双向高压纸上电泳。

(1) 滤纸的处理: 新华 1 号滤纸切成 30 × 30 cm 大小, 在 0.1N HCl 中浸泡 12hr, 倾去 HCl 后在单蒸水中浸泡至中性, 再置无水乙醇中浸泡 1 ~ 2 hr, 取出风干。

(2) 点样: 100 μl 样品分多次点于上述处理的干燥滤纸上, 电热风吹干后, 用电极 buffer 湿润整张滤纸。

(3) 双向高压电泳: 滤纸平铺于有凹槽的有机玻璃板上, 两端浸入第一向电极缓冲液 (10% 吡啶-4% 乙酸, PH6.5)。倒入 90% 二甲苯-10% 四氯化碳配成的冷却液, 将滤纸浸入以防止电泳过程中滤纸温度升高和缓冲液蒸发, 1,200V 电泳 45 分钟。

滤纸取出风干, 用第二向电极缓冲液 (8% 乙酸-2% 甲酸, PH1.9) 依上述第一向同样处理, 但方向与第一向垂直 90 度。1,000V 电泳 60 分钟。取出风干。待显色处理。

(4) 鞣-茚三酮染色: 以 1% 茚三酮-0.1% 乙酸鞣将滤纸喷湿, 60℃ 烘箱中烘干显色。

### 5 血清学试验。

(1) 免疫及抗血清制备: 参照 Karl Habel (1969) [18] 的方法制备。

(2) 抗体浓缩: 参照赵永芳 (1982) [20] 的方法浓缩。

(3) 免疫双向扩散: 参照 Karl Habel 和 Norman P. Salzman (1969) [18] 的方法进行, 1% 琼脂糖, 内含 1/10,000 硫柳汞, 于 27℃ 扩散 24hr, 中间为抗体孔, 四周为抗原孔。

## 结 果

### (一) 包涵体蛋白纯化:

BsNPV 包涵体蛋白经 Spharose-6B 柱层析, 洗脱曲线与包涵体蛋白紫外吸收曲线如图 1—4。峰 A 与 A' 经检测为病毒粒子峰, 峰 B 与 B' 为包涵体蛋白峰, 具有典型的

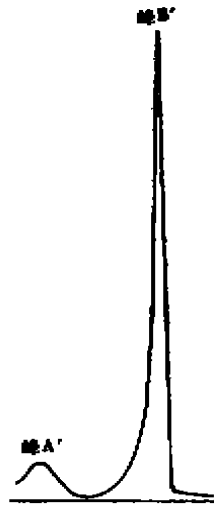


图1 湖南 B $\alpha$ NPV 包涵体蛋白经 Sepharose-6B 柱层析洗脱曲线

Fig 1. The elution pattern of Hunan B $\alpha$ NPV after Sepharose-6B Chromatography.



图2 湖北 B $\alpha$ NPV 包涵体蛋白经 Sepharose-6B 柱层析洗脱曲线

Fig 2. The elution pattern of Hubei B $\alpha$ NPV after Sepharose-6B Chromatography.

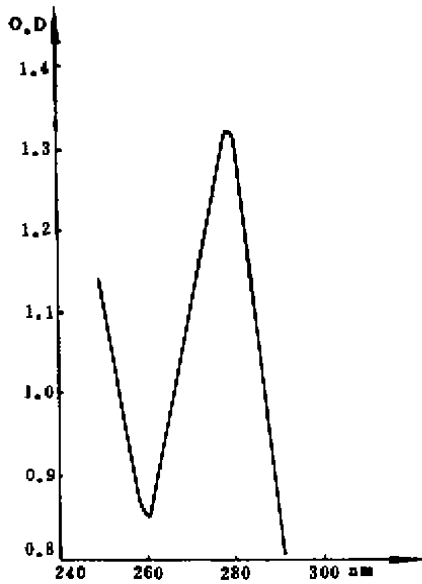


图3 湖南 B $\alpha$ NPV 包涵体蛋白经 Sepharose-6B 柱层析后 B' 峰紫外吸收曲线

$$OD_{280}/OD_{260}=1.60$$

Fig 3. The UV absorption pattern of B' peak after Sepharose-6B Chromatography.

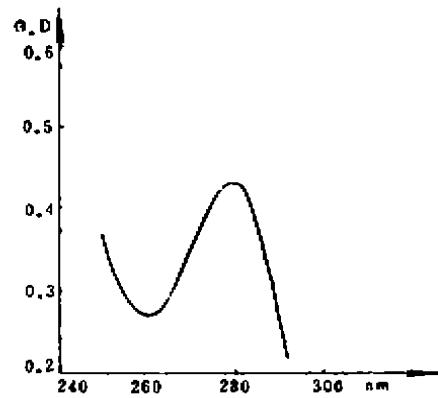


图4 湖北 B $\alpha$ NPV 包涵体蛋白经 Sepharose-6B 柱层析洗脱后 B 峰紫外吸收曲线

$$O.D_{280}/O.D_{260}=1.75$$

Fig 4. The UV absorption pattern of B peak after Sepharose-6B Chromatography.

蛋白紫外吸收特征。最高和最低峰分别在 280nm 处和 260nm 处。

包涵体蛋白经 Sepharose-6B 柱层析与 Canaco-prep-disc 制备电泳纯化后, 于不连续 SDS-PAGE 中显示分子量在 28,000d 左右的 1 条带 (图略)。表明获得的包涵体蛋白为电泳纯。

(二)双向高压电泳指纹图谱:

图 5—10 显示 6 种病毒 (BsNPV<sub>1</sub>, BsNPV<sub>2</sub>, BtNPV, EpNPV, PxGV, PrGV) 包涵体蛋白双向高压电泳指纹图谱的结果。一般有近 30 个肽点, 其中酸性肽一般 7 个, 碱性肽 15 个, 中性肽 8 个。碱性肽迁移距离很短, 可能是因为酸性肽所带负电荷少, 加上滤纸对其有阻滞作用。碱性肽迁移范围一般在  $-\frac{1}{8} \sim -\frac{4}{5}$ , 而酸性肽迁移范围较广, 从  $\frac{1}{8} \sim 3.7$ 。

表 1-4 是这 6 种病毒包涵体蛋白的指纹图谱异同比较。由表可知 6 种病毒包涵体蛋白彼此间都有相同或相似的肽段。但 GV 与 GV 之相似率达 50%, NPV 与 NPV 相似

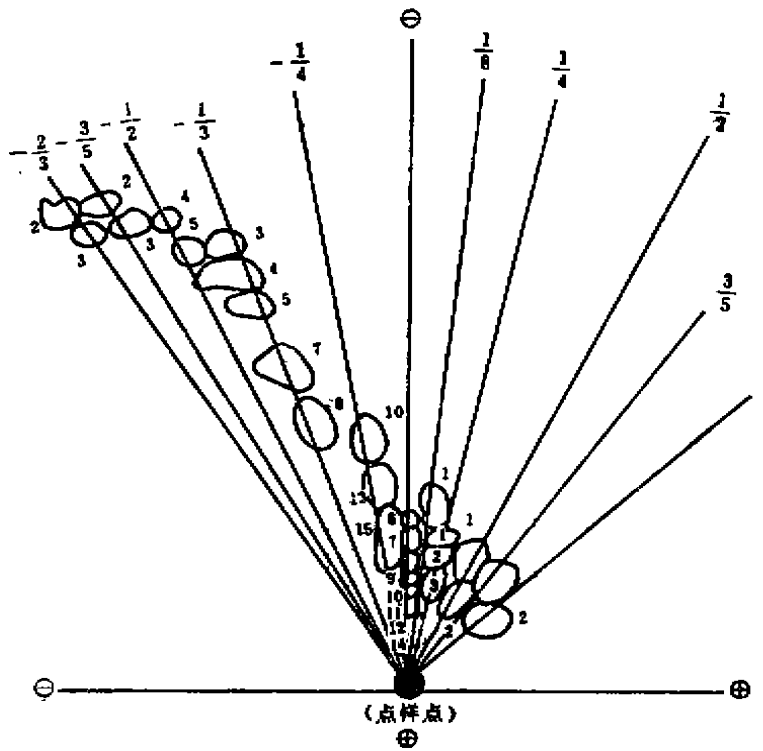


图 5 湖北大尺蠖 NPV 包涵体蛋白双向高压指纹图谱

Fig. 5. Fingerprint of two-dimensional high voltage electrophoresis of Hubei BsNPV polyderia.

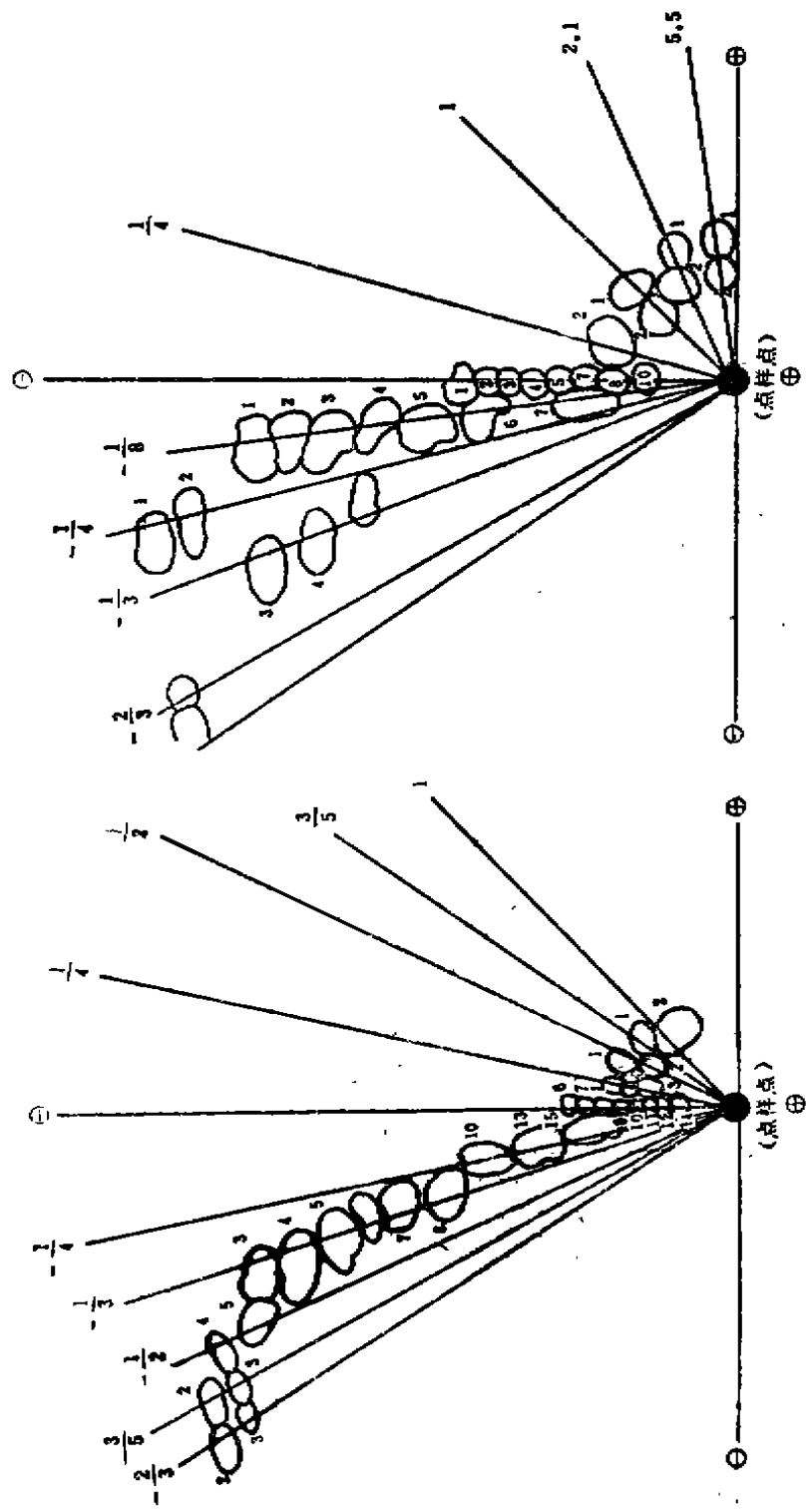


图6 湖南大尺蠖NPV包涵体蛋白双向高压指纹图谱  
Fig. 6. Fingerprint of two-dimensional high voltage electrophoresis of Hunan BaNPV Polyhedrin.

图7 茶云尺蠖NPV包涵体蛋白双向高压指纹图谱  
Fig. 7. Fingerprint of two-dimensional high voltage electrophoresis of EpNPV polyhedrin.



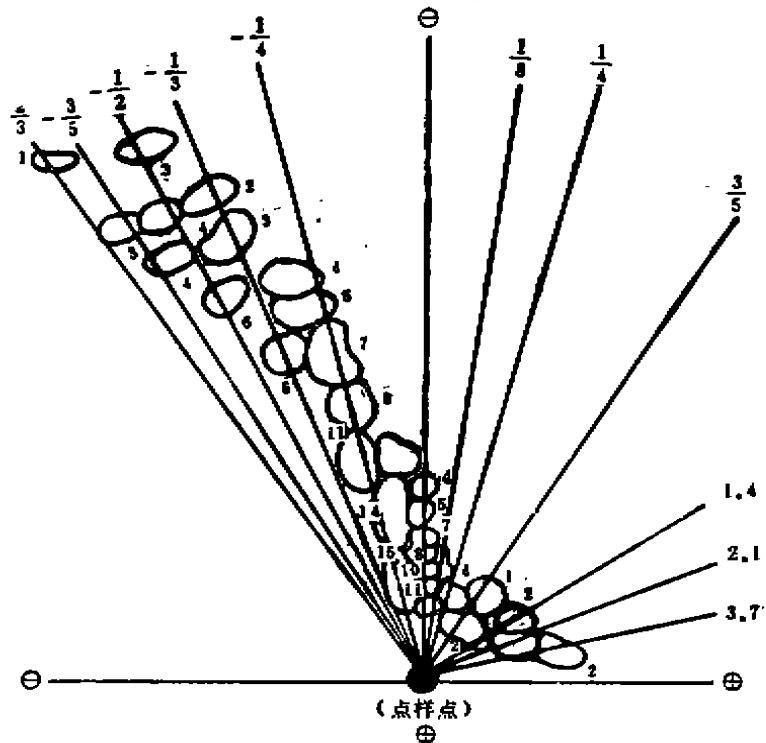


图 10 小菜蛾 GV 包涵体蛋白双向高压指纹图谱

Fig 10 Fingerprint of two-dimensional high voltage electrophoresis of PxGV granulin.

率约达 30%。NPV 和 GV 间相似率也约为 30%。湖北分离的 BsNPV 和湖南分离的 BsNPV 的包涵体蛋白指纹图谱比较, 除只有一个肽点不同外, 其余肽点位置都是相同的。而其余的几种病毒包涵体蛋白的指纹图谱之间都存在明显的相似性, 但又各具特色。

4 种包涵体蛋白 (BsNPVI, BtNPV, PxGV, PrGV) 抗原关系如表 5 所示。由表可知, 在血清学上 BsNPV 与 BtNPV 不可分辨, PxGV 与 PrGV 亦不可分辨。

## 讨 论

包涵体蛋白的高度纯化, 国外一般采用 Canaleo-prep-clise 法 (Summers, M. D and Smith, G. E, 1975<sup>[14]</sup>, Pepkin, et al, 1976<sup>[19]</sup>, Maraniak, J, E, 1978<sup>[10, 19]</sup>)。因其上样量并不低于柱层析, 结果纯度也高, 只是回收率仅约 60%<sup>[10]</sup>。Sephacrose-6B 柱层析因其分离球状蛋白和病毒的分子量极限在 10,000~4,000,000<sup>[20]</sup>, 因而对于存在的与包涵体蛋白分子量接近的病毒结构蛋白就难以分开。为避免病毒粒子蛋白成分污染, 控制包涵体的碱解以及抑制内源蛋白酶活性是重要的关键。

我们对几种杆状病毒包涵体蛋白的指纹图谱研究结果与 Summers, M, D (1976,

1978), Cibulsky(1977), Maraniak (1978) [12,16]等人结果相近。用胰蛋白酶消化蛋白质后,产生的肽点数目取决于蛋白质分子中精氨酸和赖氨酸这两种碱性氨基酸的数目。以30个肽点为准,则包涵体蛋白平均有29个碱性氨基酸。以氨基酸平均分子量110,包涵体蛋白平均分子量28,000计,则碱性氨基酸平均含量  $\frac{29 \times 110}{28,000} \approx 11.4\%$ 。与 Harrap (1976)<sup>[9]</sup>, Smith, G. E 和 Summers, M. D(1976)<sup>[11]</sup>, Summers, M. D(1975)<sup>[10]</sup>所报道的包涵体蛋白中碱性氨基酸含量为11~12%很吻合。

从图5~10和表1~4可知:这6种杆状病毒包涵体蛋白在一级结构上彼此存在相同区域。其包涵体蛋白的常规免疫扩散结果(表5)表明它们之间有较高度度的免疫

表1 相同肽数比较  
Table 1 Comparison of the same peptide.

	肽数				相同肽数					
	酸性肽	碱性肽	中性肽	总数	湖北 BsNPV	湖南 BsNPV	茶毛虫 NPV	茶云尺蠖 NPV	小菜蛾 GV	菜青虫 GV
湖北BsNPV	8	14	8	30		29	7	8	9	9
湖南BsNPV	7	15	8	30	29		7	8	10	8
茶毛虫NPV	7	15	6	28	7	7		8	11	8
茶云尺蠖NPV	7	14	9	30	8	8	8		9	9
小菜蛾GV	6	16	7	29	9	10	11	9		14
小青虫GV	7	13	8	28	9	8	8	9	14	

表2 碱性肽段比较  
Table 2 Comparison of basic peptides.

Protein	Peptide No.												
	-1/8			-1/4			-1/3		-1/2	-3/5		-2/3	-4/5
	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
湖北BsNPV													
湖南BsNPV													
茶毛虫NPV													
茶云尺蠖NPV													
小菜蛾GV													
菜青虫GV													

注:每个标志(+或0)表示肽在一特定线上的线性顺序,余下同。  
+ = 具有相同迁移的肽段  
0 = 迁移率很接近,但在测量上有些不同。

交叉反应,说明它们之间含部分相同的抗原决定簇。但这6种包涵体蛋白指纹图谱又各不相同。PxGV与PrGV 28个肽中有14个不同;BsNPV与BtNPV 30个肽中有22个不同;湖南BsNPV与湖北BsNPV相比,仅一个肽段不同,可能是一级结构中缺失或更换了一或数个碱性氨基酸。结果表明指纹图谱的分辨率大大高于常规的血清学技术。如



表 3 酸性肽段比较  
Table 3 Comparison of acidic peptides.

Protein	Peptide No										
	1 4	1 8	1 3	1 2	3 5	2 3	1	1.4	2.1	3.7	5.5
湖北BsNPV	1274	12	1	12	12	1	12	12	12	12	12
河南BsNPV	+++	+		++			-				
茶毛虫NPV	+++			++	+		+				
茶云尺蠖NPV	+			+		+	+	++			
小菜蛾GV							++				++
菜青虫GV	+					+			+	+	+

表 4 中性肽段比较  
Table 4 Comparison of neutral peptides.

Protein	Peptide No													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
湖北BsNPV						+	+	0	+	+	+	+		+
河南BsNPV						+	+	0	+	+	+	+		+
茶毛虫NPV			+	0	+		+	+						+
茶云尺蠖NPV	+	+	+	+	+	+	+	+		+				
小菜蛾GV				+	+		+	+		+	+		+	
菜青虫GV			+	+	+		0	+	+		+	+		

表 5 抗原抗体交叉反应图表  
Table 5 Diagram showing reaction between different antigens and antibodies

抗原 抗体	茶云尺蠖NPV (2)	菜青虫GV (3)	小菜蛾GV (4)	大尺蠖NPV (5)	图 示	图 片
茶云尺蠖NPV (2)	++	未作	+	++		
菜青虫GV (3)	未作	++	++	+		
大尺蠖NPV (5)	++	+	+	++		

++=交叉点愈合, 血清学上抗原相同。

+ =交叉点不愈合, 血清学上抗原稍有不同。

AcMNPV 和 RoMNPV 其结构蛋白谱显示不出差异 (Summers, M. D and Smith, G. E, 1977), Norman, E. Crook<sup>[23]</sup>用 XhoI 制备其 DNA 内切酶谱时发现它们仅一条带有区

别。但比较它们的包涵体蛋白指纹图谱, 可知其 32 个肽段中有 12 个不同 (Summers, M.D, Smith, G.E., 1975, 1978<sup>[14, 15]</sup>)。

蛋白质指纹图谱技术是一种灵敏度较高的技术, 具有经济、简便、快速的特点。它适用于分析昆虫病毒结构多肽。如与血清学技术、核酸内切酶技术相结合有利于更精确地鉴定各种杆状病毒。

### 参 考 文 献

- [1] 吕鸿声, 1982, 昆虫病毒与昆虫病毒病, 科学出版社。
- [2] 梁东瑞, 1986, 中国昆虫病毒图谱, 湖南科学技术出版社。
- [3] 武汉大学病毒系, 1980, 病毒分类学, 武汉大学出版社, P<sub>20</sub>。
- [5] Krywienczak, J and Bergold, G.H., 1962, *J. Insect Pathol* 4: 185—194.
- [5] Janada, Y., 1954, *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 47: 533—574.
- [6] Krywienczak, J et al., 1985, *Virology* 5: 476—480.
- [7] Summers, M.D and Hoops, P., 1980, *Virology* 103: 89—98.
- [8] Summers, M.D, and Smith, G.D.E., 1977, *Virology* Vol 84, No 1—2.
- [9] Keith, Harzap., 1977, *Virology*, Vol 79 No 1—2.
- [10] Brown, 1984, *Virology*, Vol 136—137 No 1—2.
- [11] Summers, M.D and Smith, G.E., 1979, *Virology*, Vol 30 No 1—3.
- [12] Summers, M.D and Smith, G.E., 1978, *Virology*, Vol 89 No 1—2.
- [13] Norman, B. Crook, 1985, *J. General Virology* Vol 66 Part 9—12.
- [14] Summers, M.D, 1975/1976, *Intervirology* 6: 168—180.
- [15] Summers, M.D, 1978, *Pathology* 32: 196—201.
- [16] Maraniak, J.E, 1978, *J. Intervirology* 32: 196—201.
- [17] Laemmli, J.K., 1970, *Nature (London)*: *Fundamental Techniques in Virology*. Academic Press.
- [18] Summers, M.D., 1975, *J. Virol* 16: 1108—1116.
- [19] 赵永芳, , 生物化学技术, 武汉大学生物系生物化学教研室。
- [20] Norman, E. Crook., 1985, *J. General Virology* Vol 66, Part 9—12.

## Comparative Study of the Fingerprinting Map of Granulins and Polyhedrins

Zhou Xiao-feng Yie Ling-bai Liou Nian-cun

(Dept. of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072)

Six kinds of baculoviruses (BsNPV 1, BsNPV 2, BtNPV, EpNPV, PrGV, PxGV) are purified by centrifugation using sucrose gradient. Roughly purified granulins and polyhedrins are obtained by having the inclusion body solubilized in dilute alkaline saline after possible alkaline protease activity is inhibited. Then granulins and polyhedrins in highly pure form are obtained by using

Sephrose-6B chromatography and SDS-polyacrylamide prep-disc (Canalco). Each kind of granulins and polyhedrins shows only one band on SDS-PAGE using the procedures of Laemmli. And the granulins and polyhedrins exhibit an estimated MW of 28, 000. Two dimensional high-voltage electrophoresis (HVE) of highly purified granulins and polyhedrins preparations reveals relatness as well as differences among the proteins assessed by electrophoretic migration patterns. Double diffusion analysis shows cross-reaction between different granulins and polyhedrins. For example, PxGV can not be distinguished from PrGV and neither can BsNPV be distinguished from BtNPV. But using HVE technique, all of them can be distinguished from each other easily. According to these results, we suggest that the HVE technique be an excellent method in the classification and identification of baculoviruses.

**Key words,** Nuclear polyhedrin Fingerprint Double diffusion