维普资讯 http://www.cqvip.com



# 中国棉铃虫核型多角体病毒 VHA 273毒株多角体蛋白质某些理化特性的研究*

吴柏春

（华中师范大学生物系 武汉430070）

**提 要**

从 VHA273 病毒感染中国棉铃虫的典型病虫尸抽提纯化多角体。经碱解释放的多角体蛋白，用超速离心，Sepharose 6B 柱层析纯化，多种方法鉴定其纯度。SDS-PAGE 测出多角体蛋白亚基分子量 MW＝28,000±500d。等电聚焦电泳测出 7 条电泳带，其主带 pI5.78±0.02，次带pI5.35—6.25。氨基酸组成分析表明富含酸性氨基酸。Niles 兰染脂蛋白、甲苯胺兰染糖蛋白结果均呈阳性。

**关键词**：HaNPV VHA273 多角体蛋白

中国棉铃虫核型多角体病毒(HaNPV)$VHA_{273}$毒株，是我校十多年前筛选的，已作过一些研究，1981年通过了省级鉴定，可望发展成为商品化病毒杀虫剂[1]。关于棉铃虫核型多角体病毒杀虫剂的生产，中间试验已经成功。昆虫杆状病毒在生物防治、基因工程及基础研究方面潜力很大。全世界已发现1200余株昆虫病毒中，我国有200余株。七十年代，我国在鄂、苏、豫、冀、沪、鲁等地先后发现了 HaNPV。因此，运用各种生化技术研究昆虫病毒的生理生化特性，对昆虫病毒的分类鉴定、基因工程以及病毒与宿主间的关系的研究，特别是为病毒制剂的标准化提出鉴定指标是很有意义的。为此，本文报道$VHA_{273}$毒株多角体蛋白的纯化方法与某些理化特性，兼有理论与实用的价值。

## 材料与方法

### （一）多角体的抽提与纯化

用$VHA_{273}$毒种感染人工饲养的棉铃虫。典型病虫尸匀浆过滤，低速离心以抽提多角体，随之用淀粉酶、丙酮等处理，甘油（30—80%）浓度梯度低速离心，分层收集。继以胰蛋白酶（终浓度0.1mg/ml），SDS（终浓度1%）分别于37℃保温40分钟，蒸馏水洗三次后，经30—65%（w/w)蔗糖浓度梯度17000r/m 离心45分钟。取出多角体带除糖后，电镜（日立 H600-3）检查纯度，并制超薄切片电镜观察。

本文于1989年3月25日收到

*国家自然科学基金资助项目

鸣谢：本工作得到刘聚正教授、陈曲侯教授的关怀指导，电镜室魏林、魏华珊、王家坤，以及洪华珠、郭建军、姚汉超、赵进等同志的协助，谨志谢忱。

维普资讯 http://www.cqvip.com



**（二）碱解多角体、纯化多角体蛋白**

纯化的多角体悬液于70℃保温1.5—2.0h（也可用0.01mol/L $HgCl_2$ 室温过夜），以灭活可能存在的碱性蛋白酶[2,3]。用终浓度0.015mol/L $Na_2CO_3$-0.05mol/L NaCl-0.004mol/L EDTA（pH10.6）4℃保温0.5—1.0h。双蒸水稀释并滴加稀醋酸降至pH8.9，低速离心除去未碱解物后，高速离心（25000r/m-1.0h）除去病毒粒子。上清液用等电点法沉淀，溶于弱碱液中（pH8.9）成一定浓度，通过Sepharose 6B柱层析（0.8×30），恒流5—6滴/分钟，分部收集，于M750微量可见紫外分光光度计上测定洗脱曲线和吸收光谱，收集并浓缩多角体蛋白，吸收差法计算其浓度，低温储存备用。

**（三）多角体蛋白的纯度鉴定**

1)根据多角体蛋白紫外吸收光谱，计算波峰、波谷吸收比值判定纯度。2)以纯化的多角体蛋白为抗原，常规免疫家兔后，与其同源抗血清进行琼脂糖凝胶双向扩散。3)修改Laemmli电泳系统[4]，进行非解离的聚丙烯酰胺凝胶电泳，即T=6%，系统与样品中皆不加SDS，加样约100μg，4mA/管恒流约3—4h，用Summers、M.D方法固定染色[5]。

**（四）多角体蛋白氨基酸成分分析**

将高度纯化的多角体蛋白晶体溶成30mg/ml，经HCl水解，在日立835-50型氨基酸分析仪自动分析。

**（五）SDS-PAGE测定多角体蛋白亚基分子量**

参照Laemmli电泳系统进行SDS-PAGE[4]。凝胶浓度10%或12.5%，标准蛋白是：牛血清白蛋白（67000），γ-球蛋白（H-50000，L-23500），卵清蛋白（43000），乳酸脱氢酶（36000），溶菌酶（14300）。样品液含2%SDS、5%巯基乙醇，10%甘油，0.0625mol/L Tris（pH6.7）及适量的溴酚兰。沸水处理3分钟，加样品30—50μg/孔，电流10mA/板，0.5h后升至18mA/板，恒流3—4h，固定染色方法见文献[6]。

**（六）凝胶等电聚焦电泳（IEF）测pI值**

参照应启龙介绍的方法略加修改[6]：凝胶浓度5.5%，含国产兼性离子载体（pH3—9）1%或2%。以电泳单点纯牛血清白蛋白作对照，加待测样品50—75μg，正负电极液分别为0.2%$H_2SO_4$和0.5%乙醇胺，恒压250V 3—4h至电流为零。凝胶的固定染色标准曲线制作及pI值的计算均依法进行。

**（七）染色法检测多角体蛋白的组分**

以高血脂症者血清为脂蛋白对照，与多角体蛋白同时进行SDS-PAGE，Nile's兰法染色[7]。以γ-球蛋白为糖蛋白对照，与多角体蛋白同时进行纸电泳或SDS-PAGE，用甲苯胺兰（Toluidine blue）法染色[8]。

## 结　果

(一)多角体的电镜观察

电镜观察证明，纯化的多角体边缘清晰，分散均匀，无宿主碎片或杂菌，无粘连物，形状典型。超薄切片电镜观察显示，甘油梯度上层多角体多呈单粒包埋型(sNPV)，中下层多角体呈多粒包埋型（mNPV），包埋的核衣壳2—7个不等[9]。据估计，mNPV约占90%以上。

(二)多角体蛋白的纯度

维普资讯 http://www.cqvip.com



多角体蛋白洗脱曲线如图1A，峰Ⅱ具有蛋白质典型的光谱特征，波峰为278nm，波谷为255nm，$A_{278}/A_{255}=1.8—2.0$。峰Ⅰ呈杆状病毒粒子光谱特征，如图1B所示。多角体蛋白与其同源抗血清的免疫反应可见一条沉淀线[18]。非解离系统的电泳结果仅呈一条电泳带。

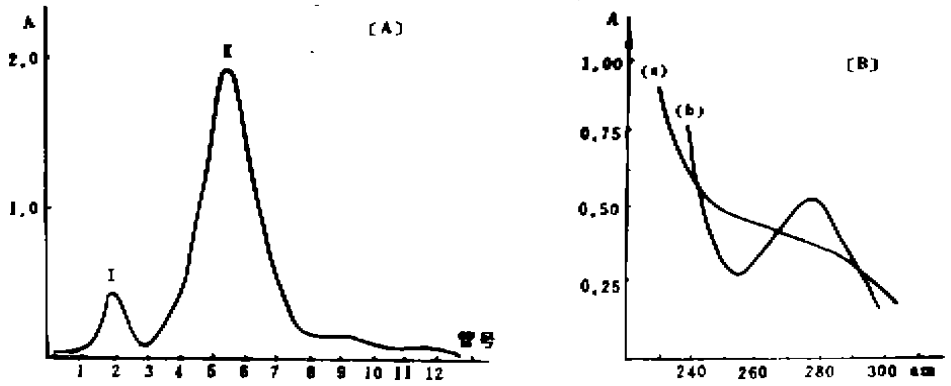



图1 $VHA_{273}$多角体蛋白琼脂糖6B柱层析洗脱曲线〔A〕及多角体蛋白和病毒粒子的紫外吸收光谱〔B〕

Fig1. 〔A〕 Elution pattern of $VHA_{273}$ polyhedrin through Sepharose 6B column chromotography 〔B〕 Ultraviolet spectrum of $VHA_{273}$ polyhedrin and virion

（三）多角体蛋白的氨基酸组成

纯化的多角体蛋白，经HCl水解，氨基酸分析仪分析两次，结果基本一致（表1）。

表1 $VHA_{273}$多角体蛋白的氨基酸组成

Table 1. Amino Acid Composition of $VHA_{273}$ Polyhedrin

| 氨基酸 Amino Acid | Asp | Thr | Ser | Glu | Gly | Ala | Cys | Val | Met | Ile | Leu | Tyr | Phe | Lys | His | Arg | Pro | Trp | Σ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| % | 4.49 | 1.25 | 1.25 | 4.40 | 0.92 | 1.01 | 0.33 | 2.35 | 0.66 | 1.55 | 2.79 | 2.65 | 2.61 | 2.59 | 0.86 | 2.66 | 1.83 | 未测 ND | 34.4 |

（四）多角体蛋白亚基分子量

经多次SDS-PAGE测定，标准蛋白线性关系很好，且$VHA_{273}$的sNPV与mNPV的多角体蛋白之电泳行为非常一致，其亚基MW＝28,000±500d（图2）。

（五）多角体蛋白的等电点

两性离子载体的工作曲线和牛血清白蛋白主带pI值（4.8—4.9）均符合文献报道[9,10]。sNPV与mNPV多角体蛋白的聚焦电泳的行为一致，其主带pI5.78±0.02，次带约6条带，pI5.35—6.25（图3，放大图略）。

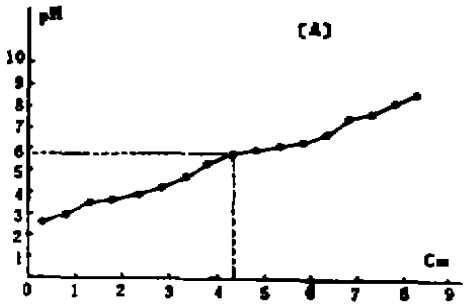
（六）多角体蛋白的组分

经脂蛋白特异的酸性Nile's兰法染高脂血清蛋白与多角体蛋白，均呈强阳性。糖蛋白特异的甲苯胺兰法染γ-球蛋白与多角体蛋白，亦均呈阳性反应。以上两法的空白对照均呈阴性。

维普资讯 http://www.cqvip.com

图2. $VHA_{273}$多角体蛋白的SDS-PAGE电泳图谱
a-牛血清白蛋白(67000) b-γ-球蛋白H链(50000)
c-卵清蛋白(43000) d-γ-球蛋白L链(23500)
e-溶菌酶(14300) f-乳酸脱氢酶(36000)
p-$HVA_{273}$多角体蛋白；1-sNPV、2-mNPV

Fig 2. SDS-PAGE Electrophoretogram of VHA273 polyhedrin
a. Bovine serum albumin(67000)
b. γ-globulin H strand(50000)
c. Ovalbumin(43,000)
d. γ-globulin L strand(23500)
e. Lysozyme(14300) f. Lactic dehydrogenase
p. VHA273(36000) polyhedrin;
1-sNPV. 2-mNPV



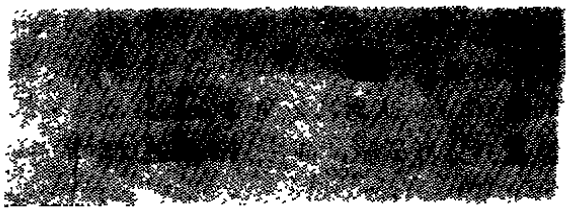



图3 $VHA_{273}$多角体蛋白的凝胶等电聚焦电泳
〔A〕标准曲线示多角体蛋白主带位置
〔B〕等电聚焦电泳图谱 1—牛血清白蛋白
2,3—分别为sNPV与mNPV多角体蛋白

Fig 3. Isoelectric focusing electrophoretogram
1-BSA, 2-sNPV polyhedrin, 3-mNPV polyhedrin

## 讨 论

### 一、多角体与多角体蛋白的高度纯化

样品的高度纯化是进行生化分析的前提。抽提的多角体虽经多次差速离心，但仍混有人工饲料中大量脂肪与淀粉颗粒。本实验用脂溶剂去脂肪，用淀粉酶去淀粉，用胰蛋白酶去杂蛋白，还兼用SDS处理多角体，证明效果良好。结合蔗糖梯度离心纯化多角体，经电镜检查，纯度合格。超薄切片的电镜观察表明，多粒包埋型的$VHA_{273}$原毒种经纯系虫体扩增后，虽绝大部分仍为mNPV，但确有少量sNPV型多角体产生。$VHA_{273}$毒株产生的sNPV与mNPV关系如何，有待进一步研究。

包涵体内可能存在内源性碱性蛋白酶[2,3,11,12]，本实验充分注意了这一点，采用了热灭活酶法和$Hg^{++}$处理法。柱层折纯化多角体蛋白的效果很好。洗脱曲线峰Ⅱ具有典型蛋白质的吸收光谱，波峰278nm，波谷255nm，且$A_{278}/A_{255}\approx1.8—2.0$。非解离系统的凝胶电泳呈一条带，免疫双向扩散呈一条沉淀线[16]。三种方法鉴定，原理各异而结果一致，充分证明该纯化的多角体蛋白在电泳和血清学水平上是纯净的。洗脱曲线有时

维普资讯 http://www.cqvip.com



出现峰Ⅰ，这与碱解多角体量过多、离心力偏小或离心时间偏短、层折上样过浓等因素有关。收集峰Ⅰ并浓缩测其光谱，曲线呈 Shoulder 式下降，表明呈杆状病毒粒子的光谱特征。

二、多角体蛋白亚基的分子量

大量文献表明，昆虫杆状病毒包涵体蛋白由一种亚基构成，亚基分子量为28000±2000d[5,13-15]。本实验重复多次测得 $VHA_{273}$ 多角体蛋白为一种亚基，分子量是28000±500d，非常符合文献值。而且，$VHA_{273}$ 毒株 sNPV 与 mNPV 的多角体蛋白亚基的分子量是一致的。

三、多角体蛋白的氨基酸组成与等电点

感染鳞翅目昆虫的杆状病毒，其包涵体蛋白的等电点偏低[13,14,16]。本实验经多次重复测出 $VHA_{273}$ 多角体蛋白的主带pI5.78±0.02；虽有六条次带，但pI值都偏低，本结果符合文献值，且 sNPV 与 mNPV 多角体蛋白等电点聚焦的电泳行为非常一致。Rohrmann, G.F. 认为，多角体蛋白等电点偏低，是因为富含酸性氨基酸[16]。本样品经氨基酸成分分析证明，酸性氨基酸的比例最高，约为碱性氨基酸的1.7倍，是等电点偏低的根本原因。

等电聚焦电泳的分辨率极高，是研究蛋白质微观不均一性的有力工具[6]。本结果说明，虽然多角体蛋白纯度很高，但也存在微观上的不均一性。实验中的各种处理，致使某些蛋白分子构象发生改变。如过硫酸铵、两性离子载体，可能侵犯蛋白分子的敏感部位，暴露出疏水区中某些基团，形成荷电性不同的电荷异构体[10,14,15]。虽然两性离子载体有可能造成假象，但在实验中已通过改变加样部位和两性离子载体浓度的办法加以排除。故笔者认为，等电聚焦电泳出现多条带，主要是电荷异构体所致。

四、多角体蛋白的复合组分

酸性 Nile's 兰染色法，是相当特异而灵敏的脂蛋白染色法。本实验多次得出强阳性结果，说明 $VHA_{273}$ 多角体蛋白含有类脂成分。用甲苯胺兰染糖蛋白，结果均呈阳性，亦说明该多角体蛋白含有糖组分，与 Epstein 和 Harrap 的报道相符[12,17]。一般认为，病毒的糖蛋白与病毒感染宿主和多角体降解有关[17]，但含类脂成分的报道罕见，其作用也不清楚，有待进一研究。

## 参 考 文 献

〔1〕湖北省荆州地区微生物所，华中师范学院生物系。沙市市自动化应用技术所，1981，《鉴定会资料汇编》。
〔2〕Langridge, W.H.R. et al., 1981 *Virology* 114: 595-600.
〔3〕林栖凤、卢文筠，1987，病毒学杂志，3：55-60.
〔4〕Laemmli, U.K., 1970 *Nature* 227：680-686.
〔5〕Summers, M.D. et al., 1978 *Virology* 84：390-402.
〔6〕刘培福等，1978，仪器分析及其在分子生物学中的应用，第三册p55.
〔7〕蒋作君、沈一平，1986，生物化学与生物物理学进展，3：65.
〔8〕华家柽等编译，1982，实用蛋白质化学技术，p54.
〔9〕吴怕春，1988，病毒学报，4(4)：373-375.
〔10〕Salamane, M.R. and williamson, A.R., 1977, *Biochem.J.* 122：93-99.

维普资讯 http://www.cqvip.com



(11)Summers, M.D. and Hoops, P., 1982 *Virology* 103: 89—98.
(12)Epstein, D.A. and Thoma, J.A., 1977 *Biochem. J.* 167: 321-332.
(13)Croizier, G. and Croizier., L. 1977 *Arch. Virol.* 55(3): 247-250.
(14)Scharnhorst, D. W. and Weaver, R.F., 1980 *Virology* 102(2): 468-472.
(15)Allaway, G.P. and Payne, C.C., 1983 *Arch. Virol.* 76: 43-54.
(16)Rohrmann, G.E. et al., 1977 *Biochemistry* 16(8): 1631-1634.
(17)Harrap, K.A. and Longworth, J.C., 1974 *J.Investeb.Pathol.*24: 55-62.
(18)吴柏春，1990，华中师范大学学报（自然科学版）2.

# The Study of Some Physico-Chemical Properties of the Polyhedrin of Heliothis armigera Nuclear Polyhedrosis Virus VHA-273 Strain

Wu Bo-chun

(*Hua Zong Normal University, Wuhan*, 430070)

Polyhedra were extracted from the cadavers of *Heliothis armigera* infected with VHA-273 strain of *Heliothis armigera* nuclear polyhedrosis virus. Observation under electron microscope showed that the polyhedra consisted of mNPV (90%) and sNPV(10%).

The purity of polyhedrin purified by serial procedures was confirmed by immunological and electrophoresis methods. When the isoelectric point of the polyhedrin was determined by isoelectric focusing electrophoresis, 7 bands appeared, with a major band at pI5.78±0.02 and minor bands at pI5.35—6.25.

The molecular weight of the polyhedrin subunit is 28000±500 dalton by SDS-PAGE. Amino acid analysis showed that acidic amino acids prodominate. When stained with Nile's blue and Toluidine blue, the polyhedrin showed positive reaction.

Key words: *Heliothis armigera* nuclear polyhedrosis virus VHA-273 Polyhedrin