

## 用分光光度法对纯净颗粒体液浓度的测量\*

杨明辉 黎 智 杨伏生 赵 林

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

戴彩云 郑茂材

(贵州省茶叶科学研究所, 湄潭)

## 提 要

警纹鸣夜蛾颗粒体病毒(简称AeGV)、小菜粉蝶颗粒体病毒(PrGV)、茶蚕颗粒体病毒(AbGV)和分月扇舟蛾颗粒体病毒(CasGV)是在形态结构及生物学特性上有显著差异的颗粒体病毒。本文以这四种颗粒体病毒为代表,用统计学方法分析纯净的颗粒体悬浮液在270nm波长处的浓度(C,  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )与吸光度( $A_{270\text{nm}}$ )的相关性,探讨分光光度法测量颗粒体悬浮液浓度的共用方程式,所有结论均以95%的概率水平为判断依据。本研究证明:颗粒体浓度在10—50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内时,不同种的颗粒体浓度-吸光度定量关系可以用同一方程式表达。因此,可将该经验式用于快速测定纯净颗粒体悬浮液的浓度,该公式写作为:  $A_{270\text{nm}} = 0.018 + 0.0109C \mu\text{g}/\text{ml} \quad (0.1 \leq A \leq 0.6)$

**关键词:** 颗粒体病毒 颗粒体 统计分析 分光光度法 浓度测定

纯净的昆虫病毒包涵体悬浮液的计量方法,一般采用显微镜下计数法。但是颗粒体病毒包涵体的大小一般在  $300-511 \times 119-350\text{nm}^{(1)}$ ,不能以通常用的血球计数板在显微镜下计数,必需使用Petroff-Hauser计数器在相差显微镜下计数<sup>(2)</sup>,或在电子显微镜下计数<sup>(3)</sup>。当不具备以上计数条件时,则未知浓度的颗粒体液的定量分析将变得十分麻烦。

分光光度法具有快速、灵敏、准确等优点,早已广泛地应用于病毒的蛋白质、核酸,病毒粒子、核衣壳的定量或定性分析<sup>(4,5)</sup>。但采用分光光度法对昆虫病毒的包涵体液作定量分析手段,仅胡国律等人曾在蓖麻蚕核型多角体病毒的研究中试用<sup>(6)</sup>,可惜未报道该病毒的消光值,他人无法应用于蓖麻蚕核型多角体的定量中。应用分光光度法于颗粒体液的定量分析,至今未见有正式报道。本实验选用形态结构差异显著的四种颗粒体病毒:警纹鸣夜蛾颗粒体病毒(AeGV)、小菜粉蝶颗粒体病毒(PrGV)、茶蚕颗粒体病毒(AbGV)和分月扇舟蛾颗粒体病毒(CasGV)为代表,用统计学方法分析四种颗粒体浓度(C)与吸光度(A)的定量关系,以95%的概率水平作为分析结果判断的依据,推导出适于颗粒体液浓度测定的经验公式。

本文于1990年3月26日收到,1991年2月7日修回。

\* 中科院武汉病毒所孙富林研究员对本文提出宝贵的修改意见,阚远钧老师帮助称量AeGV标准样品,谨此一并致谢!

## 材 料 和 方 法

### 一、材料

1. 仪器 UV-300双光束/差式/双波长分光光度计, 日本岛津公司产品, TG328A 电光分析天平, 感量0.1mg, 上海天平仪器厂产品。

2. 病毒材料: 中国菌保会普通病毒中心保藏的病毒种。AeGV, 宿主为夜蛾科幼虫, 颗粒体一般为椭圆形, 大小  $374-780 \times 312-450\text{nm}$ , 每颗粒体含1—2个病毒杆<sup>[7]</sup>; 还有多种异形颗粒, 最长者 $3.3\mu$ , 不含病毒杆<sup>[8]</sup>。PrGV: 宿主粉蝶科幼虫, 颗粒体呈椭圆形, 表面和边缘不甚整齐, 大小为  $330-500 \times 200-290\text{nm}$ , 有砖形及其他形态的异形颗粒体可见<sup>[9]</sup>。CasGV: 宿主为舟蛾科幼虫, 颗粒体呈长椭圆形, 平均大小  $650 \times 350\text{nm}$ <sup>[10]</sup>, AbGV: 宿主为蚕蛾科幼虫, 颗粒体椭圆形, 大小为  $300-350 \times 150-200\text{nm}$ <sup>[11]</sup>。

### 二、方法:

以提纯颗粒体的常规方法纯化病毒材料。显微镜下检查样品, 15个视野无杂菌杂质, 电镜下证实样品纯净, 病毒形态完整。将纯净颗粒体沉淀在 $50^{\circ}\text{C}$ 干至恒重, 在TG328A电光分析天平上, 以减量法称取样品, 每份称量不少于10mg。AeGV, PrGV, CasGV各称取六份干粉, AbGV称取二份干粉样品。样品以蒸馏水浸泡、搅拌, 确保颗粒体混和均匀, 准确稀释成10、20、30、……、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内所需的已知浓度样品。以微量分析天平称取AeGV样品一份, 准确稀释配制成10、15、20……50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 九个标准浓度样品用于定量公式准确性的验证。吸光度的测量条件为光程1cm, 狭缝2nm。吸收光谱扫描速度300nm/分, 响应0.05秒。

### 三、统计分析应用

以95%概率水平为判断依据, 分析以下问题:

1. 在预备试验中寻求灵敏度和准确度高的测量波长, 颗粒体浓度与吸光度成直线正相关的浓度范围。
2. 寻求AeGV、PrGV的浓度-吸光度关系的共用回归式。
3. 用AeGV标准浓度样品检验共用回归式的准确性。
4. 用未参与共用回归式推导的另二种GV: AbGV和CasGV的已知浓度样品验证共用回归式的适用性。
5. 分析本定量方法与称重-稀释标准方法间的系统误差的显著性。

## 结 果

### 一、已知浓度样品的吸光度测定数据

由预备试验, 选定270nm为适宜的测定波长, 浓度范围选定在10—80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 内。四种颗粒体的A<sub>270nm</sub>数据列于表1。AeGV、PrGV、CasGV均为六份称样的平均值, AbGV为二份称样的平均值。

### 二、AeGV和PrGV共用回归式的推导

在不同浓度范围内, 二种病毒的浓度-吸光度回归式差异显著性分析比较数据如表2。

表 1 GV对270nm波长处的吸光度数据  
Table 1 The Data on A270nm of GV at Different Concentrations

已知浓度(μg/ml) Known concentrations	10	20	30	40	50	60	70	80	相关系数(r) Correlation coefficient
AeGV	0.116	0.230	0.331	0.443	0.530	0.617	0.697	0.775	0.997
PrGV	0.137	0.252	0.365	0.473	0.575	0.652	0.751	-	0.998
CsGV	0.130	0.245	0.381	0.454	0.556	0.652	0.735	0.825	0.999
AbGV	0.133	0.248	0.348	0.459	0.557	0.638	0.732	-	0.997

表 2 PrGV与AeGV比较统计分析数据  
Table 2 The Data of Statistical Analysis on Comparison of PrGV with AeGV

病 毒 Virus	PrGV	AeGV	PrGV	AeGV
浓度范围(μg/ml) Range of Concentration	20~80	20~80	10~50	10~50
吸光度范围 Range of absorbance	0.2~0.8	0.2~0.8	0.1~0.6	0.1~0.6
样品组数(n) Number of virus group	6	7	6	5
平均浓度( $\bar{x}$ ) Average concentration	45	50	30	30
平均吸光度( $\bar{y}$ ) Average absorbance	0.512	0.518	0.380	0.330
$\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$	1750	2600	1000	1000
回归方程 Regression equation	$Y_1 = 0.064 + 0.00995x_1$	$Y_2 = 0.064 + 0.00908x_2$	$Y_3 = 0.031 + 0.01097x_3$	$Y_4 = 0.018 + 0.0104x_4$
相关系数 Correlation coefficient	0.999	0.998	0.989	0.999
标准差 Standard deviation	0.01033	0.01399	0.0049	0.0116
方差分析 Analysis of variance	1625.2	1181.1	5080.7	589.0
二方差比较 Comparison of two variances		F=1.83		F=5.7
合并方差 Merger variance		$(12.3 \times 10^{-3})^2$		$(9 \times 10^{-3})^2$
二系数比较 Comparison of coefficients		$S = 3.59 \times 10^{-6}$ $t = 2.36$		$S = 4.05 \times 10^{-4}$ $t = 1.4$
二常数比较 Comparison of constants				$S = 0.01$ $t = 1.3$

由表2可看出,在20—80 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内,二回归系数的差异有显著意义,表明不同种的颗粒体浓度-吸光度关系式不能用同一回归式表达。而在10—50 $\mu\text{g/ml}$ ,即吸光度在0.1—0.6范围内,二病毒种的回归关系式差异无显著意义,表明在此范围内,颗粒体病毒种的差异不足以影响用同一回归关系式表达不同种的GV浓度-吸光度的定量关系。求出AeGV与PrGV的共用回归式为: $y = 0.018 + 0.0109X$

三、共用回归式95%置信限及准确确性检测:

1. 95%置信限

上限  $y_1 = 0.036 + 0.0109X$  下限  $y_2 = 0.0109X$

2. 准确性检测:以AeGV 9个不同标准浓度样品用本分光光度法求出测量值,与标准值比较计算相对误差,结果如表3。

表3 共用公式准确性检测  
Table.3 Tests for Accuracy of the Common Equation

AeGV标准浓度 $\mu\text{g/ml}$ Standard concentrations of AeGV	10	15	20	25	30	35	40	45	50
A270 光吸度 A270nm absorbences	0.140	0.186	0.254	0.289	0.348	0.405	0.445	0.497	0.548
测量浓度( $\mu\text{g/ml}$ ) Measured values of the concentrations	11.19	15.40	21.55	24.86	30.28	35.50	39.27	43.90	48.60
相对误差(%) Relative error	11.9	2.7	8.3	0.6	0.9	1.4	1.8	2.4	2.8

四、共用回归式的实用性检验:

以AbGV和CasGV已知浓度样品检验共用回归式的适用性如表4。

表4 共用公式通用性的检验  
Table.4 Examinations on Suitability of the Common Equation

已知浓度( $\mu\text{g/ml}$ ) Known concentrations	95%置信区间( $\mu\text{g/ml}$ ) The 95% confidence interval	AbGV测量值 The measured values of AbGV		CasGV测量值 The measured values of CasGV	
		A270nm 浓度( $\mu\text{g/ml}$ )	A270nm 浓度( $\mu\text{g/ml}$ )	A270nm 浓度( $\mu\text{g/ml}$ )	A270nm 浓度( $\mu\text{g/ml}$ )
10	11.65—8.35	0.133	10.55	0.130	10.27
20	21.55—18.35	0.248	21.10	0.245	20.83
30	31.65—28.35	0.348	30.28	0.351	31.47
40	41.55—38.35	0.459	40.46	0.454	40.00
50	51.65—48.35	0.557	49.45	0.558	49.35

二病毒已知样品的测量值无一例外地分别落在各测量点的95%可信限内,可见该共用回归式对不同种的颗粒体病毒具有实用意义。

五、系统误差分析：将表 3、4 中的标准和已知浓度值设为  $y'$ ，相对应的测量值设为  $x'$ ，用回归分析法检查本分光光度法与称重-稀释法之间的系统误差，分析数据如表 5。

表 5 系统误差分析  
Table 5 Analysis of Systematic Error

病 毒 Virus	回归式 Regression equation	标准差 Standard deviation			显著性测验 Tests of significance		临界值 The critical value $t_{0.05}$
		Se*	Sa*	Sb*	ta*	tb*	
AeGV	$y' = 0.41 + 1.05x'$	2.2	1.89	0.06	0.21	0.85	2.37
AbGV	$y' = 1.27 + 1.029x'$	0.75	0.81	0.024	1.96	1.25	3.18
GasGV	$y' = 1.15 + 1.021x'$	0.88	0.95	0.029	1.21	0.86	3.18

\* a, Constant. b, Coefficient. e, Regression equation.

从表 5 中三种病毒的  $t_a$ 、 $t_b$  值均小于相应的  $t_{0.05}$  临界值，说明二种方法间不存在显著系统误差。因此，综上所述，在 270nm 波长下，测定纯净的颗粒体悬浮液浓度，将未知液吸光度限制在 0.1 至 0.6 的范围内，则吸光度与浓度间存在如下关系：

$$A_{270\text{nm}} = 0.018 + 0.0109C \quad \mu\text{g/ml} \quad (0.1 \leq A \leq 0.6).$$

## 讨 论

本研究中对 GV 浓度测定共用公式的实用性验证结果指出，在所限定的波长和吸光度范围内，吸光度的大小随样品的浓度大小而变化，受病毒种的不同和颗粒体形态结构差异的影响不显著。因缺少 Strains, G. R. 1964 年所报道的一种特殊形态的 GV—呈方形的云杉卷叶蛾 GV 对该公式进行验证，因此，不能肯定该公式也毫无例外地适用于该 GV。但本研究选用的四种病毒的形态结构基本代表了现已发表的其他 GV 的形态结构，因此，作为相对量测定的经验式，该公式仍具有广泛的实用意义。

虽然显微镜下计数法计数样品稍多时，常使操作者目力难支，而且张友清对核型多角体病毒显微计数的误差分析认为：该方法误差较大，即使按照规范操作程序，计数同一样品，同一操作者的计数变异系数在 10.10~19.55%<sup>[12]</sup>。但是该计量方法具有适用于众多种类微生物液体样品计量的优点，因此，作为一种相对量的测定方法，显微计数方法为生物工作者广泛应用。分光光度法是一种准确、灵敏、迅速的定量分析方法，已广泛应用于不同学科的定量分析中。本 GV 液浓度计量分析方法以分光光度计代替操作者的目力进行 GV 液的计量分析，无疑使测定数据的精密度和灵敏度提高。在本计量方法的研究中，使用了 UV-300 分光光度计，该仪器性能优良，为公式的推导提供了可靠的测定数据。以 AeGV 的标准样品检验共用公式的可靠性，其相对误差在 11.9~0.6% (见表 3)，该测定方法所得结果与标准称样-稀释样品间不存在显著系统误差 (见表 5)。若以感量为 0.002mg 的微量分析天平直接称量 10—50 $\mu\text{g}$  样品，理论上相对误差应为 20—4.0%，以此为限，可以认为本测定方法具有可靠性。因此，可以认为，作为纯净 GV 液相对量

的定量分析法, 本研究提供的方法具有灵敏性, 可靠性, 测定迅速而操作简便的优点。

### 参 考 文 献

- (1) 吕鸿声, 1982, 昆虫病毒与昆虫病毒病, 第102-3页, 科学出版社。
- (2) 梁东瑞, 张起麟, 1983, 微生物学报, 10(3): 138-140。
- (3) K.哈伯尔 N.P.萨尔兹曼, 1976, 病毒学基本技术, 第273-5页, 科学出版社。
- (4) 刘小英、陈棟华, 张立人, 1989, 病毒学报, 5(2): 150-5。
- (5) 曹旭等, 1986, 微生物学报, 29(1): 31-4。
- (6) 胡国律等, 1984, 病毒研究集刊, 第一集, 昆虫病毒研究专辑, 144-7, 武汉大学病毒系编, 武汉大学出版社。
- (7) 中国微生物菌种管理委员会, 1983, 中国菌种目录, 第6页, 轻工业出版社。
- (8) 朱国凯等, 1980, 昆虫学集刊, 第一集, 111-3, 中国科学院上海昆虫研究所编, 上海科学技术出版社。
- (9) 梁东瑞等, 1986, 中国昆虫病毒图谱, 第78页, 湖南科学技术出版社。
- (10) 郑茂材等, 1985, 茶叶科学, 5(2): 29-37。
- (11) 陈锦锈等, 1983, 微生物学通报, 10(2): 50-2。
- (12) 张友清, 1983, 微生物学通报, 9(3): 142。

## Study on Estimation of the Pure Granules Suspension Concentration by Spectrophotometry

Yang Ming-hui et al

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

Dai Cai-yun et al

(Institute of Tea, Guizhou Province, Meitan)

*Agrotis exclamationis* granulosis virus (AeGV), *Andraca bipunctata* GV (AbGV), *Clostera anastomosis* GV (CasGV) and *Pieris rapae* GV (PrGV) are much different in morphological and biological characteristics. The four viruses were chosen as the representations of the granulosis viruses in our study. Statistical method was used to analyse the correlation between the absorbances(A) at the wavelength of 270nm and the cocentrations(C) of pure granulosis viruses suspensions solutions in order to search for a common equation that is able to estimate granules concentration. All of the conclusions were decided to depend on 95% probability. The study showed when the concentrations are in the range from 10 to 50 $\mu$ g/ml, the quantitative relationship between absorbances at 270nm and concentrations of different strains granules is expressed with an alike common equation. Thus, this common equation can be used as an experimental equation to calculate the concentration of pure granu-

losis virus suspension fastly by spectrophotometry. This empirical formula is  
 $A_{270nm} = 0.018 + 0.0109C \mu g/ml \quad (0.1 \leq A \leq 0.6)$ .

**Key words:** Granulosis virus    Granules    Statistical analysis  
Spectrophotometry    Estimation of concentration