

## 黑胸大蠊(*Periplaneta fuliginosa*)病毒 的分离及某些特性

杨明辉 陈涛<sup>√</sup> 刘勇 梁世平  
王春生 夏克祥 孙富林

Q939.4

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

### 提 要

从黑胸大蠊(*Periplaneta fuliginosa*)自然罹病的虫尸中分离得到一株非包涵体病毒。将病毒悬液均匀拌入无菌饲料并供食154~169日龄黑胸大蠊健康若虫时,能使其感染、发病,死亡率可达98%以上。在电子显微镜下观察时,病毒为球形二十面体颗粒,直径约23nm。病毒悬液具有典型核蛋白紫外吸收光谱。病毒用DNase和RNase处理并经吡啶橙染色、二苯胺和苔黑酚试验及甲醛反应证明:该病毒含有单链DNA。以上特性与细小病毒科的特征有点类似。

关键词: 蜚蠊 黑胸大蠊病毒 单链DNA

蜚蠊(Cockroach)又名蟑螂。该虫种类繁多,遍布世界,其中黑胸大蠊(*Periplaneta fuliginosa*)在我国江南占有明显的种群优势。这类害虫不仅啃食衣物而且还传播多种疾病。本文分离获得的黑胸大蠊病毒(简称为PfV)与引起畜禽罹病的细小病毒的特性有某些相似性,因此,进一步研究该病毒的分类地位、探讨该病毒与某些脊椎动物疾病关系是极有意义的。

在国外,对黑胸大蠊病毒的研究曾有过初步鉴定报道<sup>[1]</sup>。在国内,该病毒曾进行首次报道<sup>[2]</sup>。本文报道其生物学和形态学性状及核酸类别等方面的部分工作。

## 材 料 和 方 法

### 一、材 料

1. 供试病毒 黑胸大蠊病毒(RfV)是从自然罹病和回接感染致死虫尸中分离和纯化获得。

本文于1991年8月30日收到,1992年1月11日修回

惠建客、刘时婉和邓红等同志对本研究提供过帮助,谨此致谢

家蚕浓核症病毒(BmDNV)和烟草花叶病毒(TMV),由中国菌保会普通病毒中心惠赠。

2. 核酸和酶 dsDNA和dsRNA由病毒中心惠赠, DNase和RNase分别购自上海生化厂和华美试剂公司。

3. 供试虫 系本组人工饲养的154—169日龄黑胸大蠊若虫。

## 二、方 法

1. 病毒的分离纯化参照钱元骏等<sup>[1]</sup>和毕坎华等<sup>[4]</sup>的方法。取一定数量黑胸大蠊病死虫尸,加入适量PBS(PH 7.2)研磨匀浆,最终每克虫尸加PBS 6毫升。匀浆经3500r/m离心30分钟,收集上清液。然后用12000r/m离心30分钟,吸取上清液,即得到分离的病毒(代号:HV)。在HV悬液中加入等体积预冷三氯甲烷,剧烈振荡1分钟,用4000r/m离心15分钟,收集水相,缓慢加入(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,边加边搅拌,使饱和度达到45%,静置2小时(4℃)后,以10000r/m离心30分钟,回收沉淀物,并溶于原体积1/15~20的PBS中,以15000rpm离心10分钟,取上清液置10—60%(W/V)线性蔗糖梯度,顶端经35000r/m离心3小时,取出病毒带,对PBS透析后即得到纯化病毒(代号:SV)。本试验中高速和梯度离心均在10℃进行。SV经紫外分光光度计和聚丙烯酰胺凝胶电泳分析检测病毒纯度。

2. 病毒感染测定:把60毫升HV悬液加入120克无菌饲料中,按每克饲料加入15μg青霉素和0.16%山梨酸的比列加入上述物质,拌匀,喂食154~169日龄的黑胸大蠊若虫。感染若虫在25~26℃温箱中饲养,并设对照组。从感染次日起,逐日检查并记录死虫数(非病毒致死者除外)。所得数据经数理统计处理并计算其死亡率。

3. 病死虫病症观察:若虫被感染后,仔细观察若虫取食、爬行、体态及体色变化。把罹病若虫及速冻处死健康对照若虫小心剥掉背部几丁质外壳,观其肠道、脂肪体、腿肌等组织的病变。并分别取样进行电子显微镜观察,以便初步确定病毒的寄生部位。

4. 病毒的形态及大小。将HV悬液和混有适量TMV(参照标准样品)的SV悬液,分别按常规方法制样,用2%PTA负染,在JEM—C100型电子显微镜下观察病毒的形态,并测其大小。

5. 病毒核酸的鉴别:

(1) 吡啶橙染色试验参考Mayor等人的方法<sup>[5]</sup>,在相同条件下分别用DNase和RNase消化Pfv的SV液样品及TMV、BmDNV、dsRNA和dsDNA样品。然后用0.01%吡啶橙染色,在2537Å紫外分析仪下查看其颜色。

(2) 二苯胺和苔黑酚试验基本上按改良的二苯胺及苔黑酚法进行<sup>[1]</sup>,在本试验中省掉了乙酸戊酯抽提,增加了dsRNA作苔黑酚阳性对照。

(3) 甲醛反应:参照K.Miura等人的方法<sup>[1]</sup>进行。在SV悬液中加入终量为1.8%的甲醛,密封,置37℃水浴,保温24小时,并以PBS代替甲醛作对照处理。用UV-300型分光光度计测定SV悬液加甲醛和加PBS样品的吸收光谱。

## 结 果

### 1. 黑胸大蠊病毒(Pfv)的感染及大小

(1) 病毒的感染性:从自然罹病虫尸分离得到的病毒可以感染不同日龄期的黑胸大蠊若虫,并引起发病。病毒感染154~169日龄的若虫,28天后致死率达98%以上(表1)。

表 1 黑胸大蠊若虫对PfV的敏感性  
Table 1 Susceptibility of *Periplaneta fuliginosa* Nymphs to PfV

组别 Group	龄期(日) Instar(day)	虫数 Number	死亡率(%) Percent mortality(%)
1	154—161	371	90
CK <sub>1</sub>	154—161	50	0
2	162—169	341	100
CK <sub>2</sub>	162—169	50	0

(2) 病毒的致病病症: PfV感染致病的黑胸大蠊若虫, 表现行动迟钝, 食欲减少, 部分试虫腹部肿胀(图1)。解剖虫尸可见消化道空而充气(图2—1), 腹部脂肪粗糙干燥, 症状与自然罹病死虫病症一致。健康对照若虫消化道内充满食物(图2—2), 腹

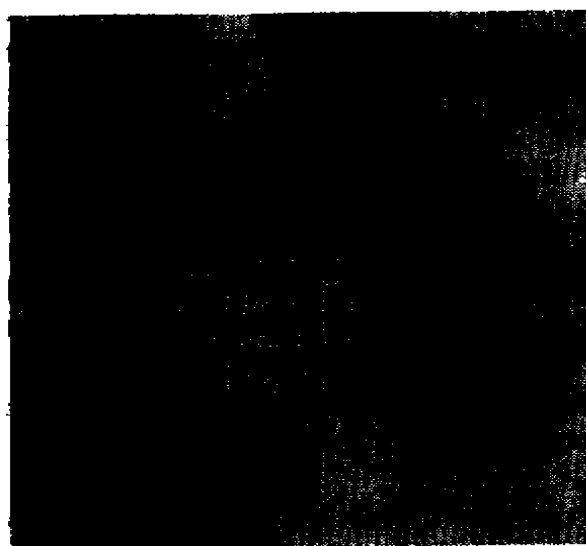


图 1 感染病毒后的黑胸大蠊若虫虫尸

1. 若虫腹部不肿胀
2. 若虫腹部肿胀

Fig 1 Dead nymphs of *P. fuliginosa* infected with virus

1. The abdomen of nymph appeared no swelling
2. Appeared swelling

图 2 黑胸大蠊若虫尸剖检

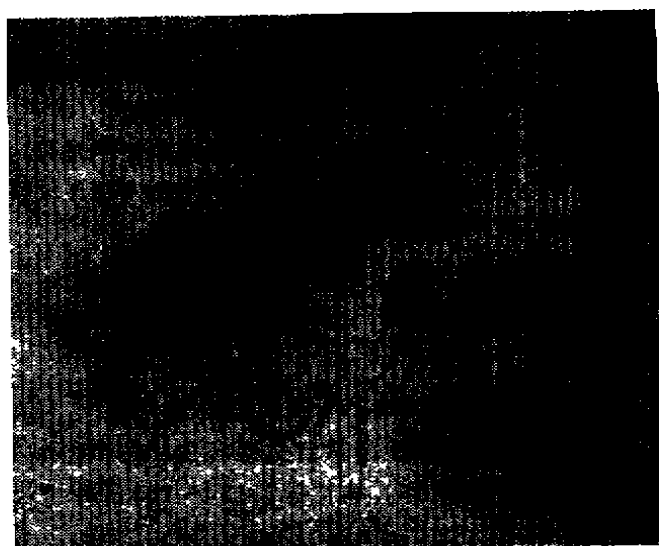
1. 患病若虫: 在胀气的消化道内食物

2. 健康若虫: 消化道内充满食物

Fig 2 The corpse autopsy of the *P. fuliginosa* nymphs

1. Sick: no any thing in the pneumatic diges tract

2. Healthy: foodful in the digest tract.



部脂肪细腻滑润。病虫尸不同组织采样, 经电子显微镜观察, 在腹部脂肪中最易看到病毒颗粒。

(3) 病毒的形态大小。在电子显微镜下观察到从感染致死虫尸中分离得到的病毒形态大小 (图 3 —b) 均与从自然罹病虫尸中分离得到的病毒形态大小相同 (图 3 —a) 病毒为球状杆状体颗粒, 其直径约 23nm。



图 3 黑胸大蠊病毒标尺: 100nm

- a. 原虫尸分离的病毒
- b. 回接感染虫尸中分离的病毒

Fig 3 *Periplaneta fuliginosa* Viruses Bar: 100nm

- a. Original virus
- b. Replicated virus

2. 黑胸大蠊病毒纯化后的分析

(1) UV 光谱分析: SV 悬液的吸收光谱呈典型的病毒 (核蛋白) 紫外吸收曲线 (图 4 — 2) 病毒的最大吸收波长为 262nm, 最小吸收波长为 240nm, OD260nm/OD280 ≈ 1.4。

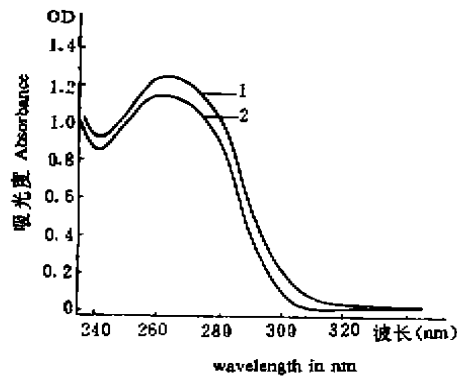


图 4 黑胸大蠊病毒吸光谱

- 1. 用甲醛处理后的病毒吸光谱
- 2. 未用甲醛处理的病毒吸光谱

Fig 4 Absorption spectrum of *P. fuliginosa* virus

- 1. Virus solution after resaction with formaldehyde
- 2. ck, Without added formaldehyde



图 5 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测提纯病毒的纯度

Fig 5 The purity of the purified virus with PAGE(8%) test

(2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, SV 悬液电泳后, 用考马斯亮兰染色, 仅看到一条蛋白染色带 (图 5)

### 3. 黑胸大蠊病毒核酸鉴别

#### (1) 病毒含 DNA

PfV 与二苯胺试验, 在 595nm 有吸收峰, 且呈现蓝色的阳性反应, PfV 苔黑酚作用, 在 670nm 处无吸收峰, 呈黄色的阴性反应, dsRNA 与苔黑酚反应作对照, 在 670nm 处有吸收峰, 呈草绿色阳性反应。

表二表明, PfV、BmDENV、dsDNA、TMV 经 DNase 消化后吡啶橙染色, 前三者无荧光反应, 而 TMV 呈红色荧光。PfV、BmDENV、dsDNA 和 TMV 经 RNase 消化后吡啶橙染色, PfV、BmDENV 呈红色荧光, dsDNA 呈绿色荧光, 而 TMV 无荧光反应。上述二组试验证明病毒含 DNA。

#### (2) 病毒核酸为 ssDNA

PfV 经甲醛处理 (图 4-1) 与加 PBS 的 PfV 对照相比 (图 4-2) 最大吸收波长由原来的 262nm 移向 265nm, 最大吸收值增加 9.0%。

如表 2 所示, PfV、BmDENV、TMV 未经酶处理时 (CK), 经吡啶橙染色均呈现红色荧光而 dsDNA (CK) 为绿色荧光。以上二组试验结果均证明病毒含有单链核酸。

综上所述, PfV 含有 ssDNA。

表 2 几种病毒用 0.01% 吡啶橙的染色反应

Table 2 Staining properties of several viruses with 0.01% acridine orange

样品 Sample	染色特性 Staining properties		
	DNase	RNase	CK
分离的 PfV Isolated PfV	无 no	红色荧光 red fluorescence	红色荧光 red fluorescence
家蚕 DNV BmDENV	无 no	红色荧光 red fluorescence	红色荧光 red fluorescence
烟草花叶病毒 TMV	红色荧光 red fluorescence	无 no	红色荧光 red fluorescence
双链 DNA dsDNA	无 no	绿色荧光 green fluorescence	绿色荧光 green fluorescence

## 讨 论

黑胸大蠊病毒 (PfV) 为球状二十面体, 直径约 23nm, 经酶解-吡啶橙染色、二苯胺、苔黑酚试验及甲醛反应证明分离病毒含单链 DNA (ssDNA)。

分离病毒的致病症状与 Suto 等<sup>[1]</sup>报道的 PfV 致病病症曾有相似处, 亦有不同之处。如病毒致死的若虫并非全都腹部肿胀, 感病虫尸体色与健康对照体色无明显差别。这与 Suto 等人所报道的虫尸腹部肿胀, 感病后体色由棕褐色转变成乳白色的临床症状有所不同<sup>[1]</sup>。解剖病死虫尸, 无论腹部肿胀与否, 其消化道均空而充气, 但 Suto 等人均未提

及这一现象。上述差异并不排除若虫不同生理状态不尽一致的影响, 然而, 也不排除笔者所分离PfV与suto等人报道的PfV不同而引起致病性的差异。

### 参 考 文 献

- [1] Suto, C. et al., 1979, *Microbiol Immunol* 23(3): 207—211.  
 [2] 杨明辉等, 1991, 自然杂志, 14(6)479。  
 [3] 钱元骏等, 1981, 蚕业科学, 7(2)100—104。  
 [4] 毕坎华等, 1983, 微生物学报, 23(4)309—312。  
 [5] Mayor, H.D., and N.O.Hill, 1961, *Virology*, 14: 264—266。  
 [6] 朱俭等, 1981, 生物化学实验 P120—127, 上海科学技术出版社。  
 [7] Miura, K. et al, 1968, *Virology*, 2(10): 1211—1222.

## Isolation and Some Properties of *Periplaneta fuliginosa* Virus

Yang Ming-hui Chen Tao Liu Yong

Liang Shi-ping Wang Chun-sheng Xia Ke-xing Sun Fu-lin

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071)

Recently, we isolated a non-occluded virus from spontaneous mortal *Periplaneta fuliginosa* (Serville). The virus suspension was mixed in sterile food to feed healthy *P. fuliginosa* nymphs (of 154—169 days). The percent mortality of the nymphs which died with infected virus was over 98%. Under electronmicroscope the virus was isometric particle about 23nm in diameter. The ultraviolet absorption of the virus was as character as nucleoprotein. Purified virus suspension was used to distinguish the nucleic acid kinds of virus. The results of tests, which were diphenylamine-orcinol test, nuclease digestion, acridine orange staining and reaction with formaldehyde, proved that the virus contained single strand DNA. According to above properties, the virus is similar to Densovirus in a way.

**Key words,** Cockroach *Periplaneta fuliginosa* virus Single stranded DNA