维普资讯 http://www.cqvip.com

276—282

8421(85)

第7卷第3期 中国病毒学 Vol.7 No.3
1992年9月 VIROLOGICA SINICA Sep.1992

茶毛虫核型多角体病毒的血清学特性

石正丽 张立人 陈棣华

（中国科学院武汉病毒研究所，武汉430071）

S476.13

提 要

用免疫双扩散、对流免疫电泳、酶联免疫吸附试验（ELISA），固相免疫电镜（SP-IEM）等技术，对茶毛虫核型多角体病毒（EpNPV）的抗原特性及与其它10种核型多角体病毒的血清学关系进行分析。结果表明，EpNPV粒子的抗血清只能与EpNPV粒子起反应，不与EpNPV的多角体蛋白及其它10种昆虫核型多角体病毒（NPV）粒子发生交叉反应；EpNPV多角体蛋白抗血清除了和其同源的多角体蛋白起反应外，还能和其它两种NPV的多角体蛋白起反应。以上结果说明了EpNPV的结构蛋白具有较高的抗原特异性，而多角体蛋白则没有种间特异性。同时将固相免疫电镜技术应用到昆虫病毒的血清学检测中，取得了较为理想的结果。

血清学特性

关键词：核型多角体病毒 血清学特异性 固相免疫电镜

茶毛虫 核多角体病 (毒)

茶毛虫核型多角体病毒（Euproctis pseudoconspersa NPV，简称EpNPV）近几年来作为一种病毒杀虫剂，在我国已广泛应用，对维护茶园具有良好的生态环境起着重要作用。前人对EpNPV的基本特性进行过若干研究[1-3]，但迄今为止，对其免疫特性的研究尚未见过报道，然而免疫特性是鉴定毒种的一个重要标准，在实践中又可用以检测该病毒的杀虫效果、在茶园中的残留量和病毒扩传范围，是调研病毒杀虫剂生态效益的手段之一。

本文采用了几种方法对EpNPV的免疫特性进行检测，了解与其它昆虫杆状病毒之间的亲缘关系，并对EpNPV粒子表面的结构与免疫反应的相关性加以分析和探讨。

材 料 与 方 法

一、病毒来源：EpNPV为福建省农科院茶叶研究所提供。茶尺蠖核型多角体病毒（EoNPV）斜纹夜蛾核型多角体病毒（PlNPV）、家蚕核型多角体病毒（BmNPV）、榨蚕核型多角体病毒（ApNPV）、蓖麻蚕核型多角体病毒（PcNPV）、灰茶尺蛾核型多角体病毒（EgNPV）、棉铃虫核型多角体病毒（HaNPV）、油桐尺蠖核型多角体病毒（BsNPV）、山楂粉蝶核型多角体病毒（Acr-NPV）和扁刺蛾核型多角体病毒（TsNPV）均为本实验室提供。

二、病毒多角体的提纯和碱解：收集感染EpNPV的典型病死幼虫，经研磨过滤，滤液经数次差速离心，获得多角体粗制品，再经40%—60%（W/W）蔗糖密度梯度离心，取出多角体带，

本文于1991年4月1日收到，12月20日修改。

维普资讯 http://www.cqvip.com

洗去蔗糖，可得纯净的多角体。多角体用0.1mol/L Na_2CO_3-0.01mol/L EDTA-0.1mol/L NaCl (pH10.5)的碱解液，30℃碱解，蒸馏水中止反应，3000r/m 15分钟除去未碱解的少量多角体，上清液以50,000g，4℃离心1小时，沉淀为病毒粒子，上清液为多角体蛋白。

三、多角体蛋白和病毒粒子的纯化：多角体蛋白的提纯参照 Bell[4] 的方法进行。取上清液中的多角体蛋白，等电点（pH5.5）沉淀，0.01mol/L pH9.0硼酸缓冲液溶解，Sepharose 6B 柱层析，0.01mol/L pH9.0硼酸缓冲液洗脱，UV-300型紫外分光光度计测其洗脱曲线和紫外吸收曲线。1%琼脂糖电泳测其纯度。

将超速离心提纯的病毒粒子用0.01mol/L pH9.0的硼酸缓冲液悬浮，经Sepharose 2B 层析，UV-300型紫外分光光度计测其洗脱曲线和紫外吸收曲线。电镜观察和琼脂糖电泳测其纯度。

四、纯度鉴定：提纯的多角体蛋白及病毒粒子样品，分别用0.025mol/L 的巴比妥缓冲液配制的0.6% 和1% 的琼脂糖凝胶进行电泳。蛋白上样量为 10μl，病毒粒子为50μl，0.025mol/L pH 8.6 的巴比妥缓冲液为电泳缓冲液。考马斯亮蓝染色，醋酸脱色，未经柱层析的病毒粒子和蛋白作对照。

五、抗血清的制备：以纯化的多角体蛋白和病毒粒子作为抗原分别免疫雄性家兔。首次免疫时抗原与等量的完全福氏佐剂混合，肌肉多点注射；2周后进行第二次注射；然后每隔7天再注射抗原，共3次，分别为皮下、肌肉、耳静脉注射。6周后颈动脉放血，收集血清，测其效价，低温保存。

六、血清学检测：

病毒样品：EoNPV等10种昆虫核型多角体病毒粒子的提纯同上。

抗体：(1)兔抗EpNPV粒子抗血清。(2)兔抗EpNPV多角体蛋白抗血清。(3)辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG购于北京生物制品所。

为避免非特异性反应，病毒粒子的抗血清经多角体蛋白交叉吸收。

1、免疫双扩散：参照 Bell[4]、Harrap[5] 对几种昆虫病毒的免疫扩散试验，1% 凝胶中进行。

2、对流免疫电泳：采用常规方法，用0.6%和1%凝胶分别进行。

3、酶联免疫吸附试验：采用间接法测定，以聚乙烯微量滴定板作载体包被抗原，4℃过夜，PBS洗三次。加入兔抗茶毛虫病毒粒子抗血清，26℃ 2小时，洗涤三次。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG，26℃ 30分钟，2mol/L H_2SO_4 终止反应，出现黄色为阳性反应。

阳性对照：EpNPV粒子＋EpNPV粒子抗血清

阴性对照：抗原稀释液＋抗体稀释液

七、固相免疫电镜技术　富含A蛋白的金黄色葡萄球菌 26110株，购于北京生物制品检定所。

1、金黄色葡萄球菌A蛋白（简称 SPA）菌液的制备：按照 Kronall[6] 的方法进行，制成10%（W/W）菌液，4℃保存。

2、致敏菌液的制备：将上述10%的金黄色葡萄球菌菌液加等量的EpNPV抗血清，37℃水浴作用30分钟，制成2%的致敏菌液，4℃保存。

3、吸附病毒粒子：参照Kazt[7]方法。取上述致敏菌液0.5ml，5000r/m 2分钟，去上清液，加0.5ml病毒粒子，30℃水浴作用1小时，PBS洗三次，悬浮沉淀，取一滴于1% Formvar膜载网上，1%磷钨酸染色，JEM-100C型透射电镜观察。取上述复合物滴于覆盖Formvar的小盖玻片上吸附15分钟，吸取剩余样品，戊二醛-锇酸双固定，按常规方法脱水、干燥、喷金。在KYKYAMRAY-1000B型扫描电镜下观察。

维普资讯 http://www.cqvip.com

结 果 和 讨 论

一、病毒纯度鉴定

经差速离心、SDS 处理，蔗糖梯度离心提纯的多角体在电镜下观察到的是大小不一、形状不规则的多面体（图1）。

经超速离心，Sepharose 2B 层析纯化的病毒粒子，其紫外吸收曲线为典型 NPV 的曲线，$A_{260}/A_{280}=1.31$（图2），与Bell[4]和 Harrap[5]等人报道的结果一致，电镜观察为形状大小均一的杆状病毒粒子（图3）。

图1 EpNPV多角体扫描电镜图像

Fig 1. Scanning electron micrograph of EpNPV

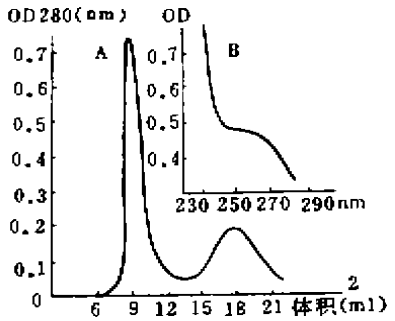

图2 (A)病毒粒子的Sepharose 2B层析纯化洗脱曲线（Ⅰ为病毒粒子峰，Ⅱ为蛋白峰）。
(B)病毒粒子的紫外吸收曲线。

Fig 2.(A)Elution curve of virions(peak 1) and polyhedron protein (peak 2) from Sepharose 2B
(B) UV absorption curve of virions

经超速离心、等电点沉淀、Sepharose 6B层析纯化的多角体蛋白，其洗脱曲线只有一个峰，$A_{280}/A_{260}=1.64$（图4）。

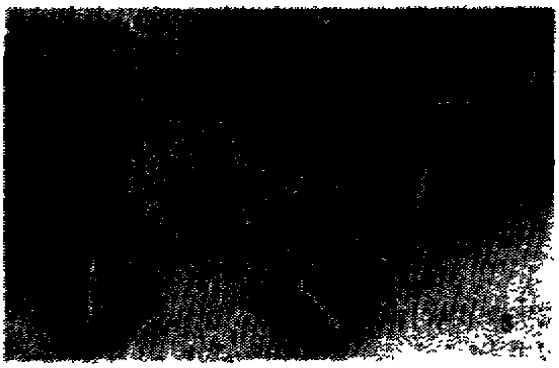

图3 病毒粒子×30,000

Fig 3 Electron micrograph of purified virions

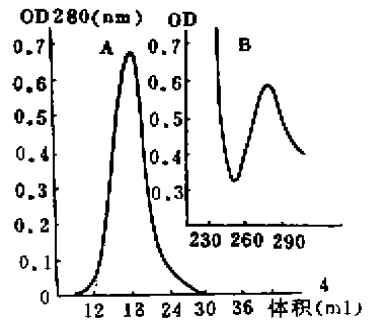

图4.(A)Sepharose 6B 柱层析洗脱曲线
(B)多角体蛋白的紫外吸收曲线

Fig 4.(A) Elutions curve of polyhedron protein from Sepharose 6B
(B) UA absorption curve of polyhedron protein

维普资讯 http://www.cqvip.com

在0.6%、1%凝胶中，经 Sepharose 2B 层析纯化的病毒粒子进行琼脂糖电泳，胶内只有病毒粒子带而无杂蛋白带，未经柱层析的病毒粒子电泳，胶内有杂蛋白带。经 Sepharose 6B 层析提纯的多角体蛋白电泳，胶内只有一清晰的蛋白带，未经柱层析的多角体蛋白电泳，胶内的带有长的拖尾。上述试验说明，病毒粒子和多角体蛋白作为抗原，已达到电泳纯度。

二、血清学试验

免疫扩散、对流免疫电泳试验结果如图5、图6所示。EpNPV 粒子的抗血清只与EpNPV粒子产生特异性沉淀线，而不与EpNPV多角体蛋白以及其它10种 NPV 粒子发生交叉反应；EpNPV多角体蛋白的抗血清不仅与同源多角体蛋白发生反应，也能与EoNPV、PlNPV的多角体蛋白产生沉淀线，而不与EpNPV粒子发生交叉反应。

图5　免疫双扩散实验

(1) EoNPV粒子　(2) PlNPV粒子　(3) AcrNPV粒子
(4) BsNPV粒子　(5) HaNPV粒子　(6) BmNPV粒子
(7) EgNPV粒子　(8) ApNPV粒子　(9) TsNPV粒子
(10) PcNPV粒子　(11) EpNPV粒子　(12) EpNPV抗血清
(13) EpNPV多角体蛋白　(14) EpNPV多角体蛋白抗血清
(15) EoNPV多角体蛋白　(16) plNPV多角体蛋白

Fig 5. Immunodiffusion test

(1) Virions of EoNPV　(2) Virions of PlNPV　(3) Virions of AcrNPV
(4) Virions of BsNPV　(5) Virions of HaNPV　(6) Virions of BmNPV
(7) Virions of EgNPV　(8) Virions of ApNPV　(9) Virions of TsNPV
(10) Virions of PcNPV　(11) Virions of EpNPV
(12) Antiserum of Virions (EpNPV)　(13) Polyhedron protein of EpNPV
(14) Antiserm of polyhedron protein (EpNPV)
(15) Polyhedron protein of EoNPV　(16) Polyhedron protein of PlNPV

图6　对流免疫电泳（说明同上）

Fig 6. Counter-immunoelectrophoresis test

维普资讯 http://www.cqvip.com

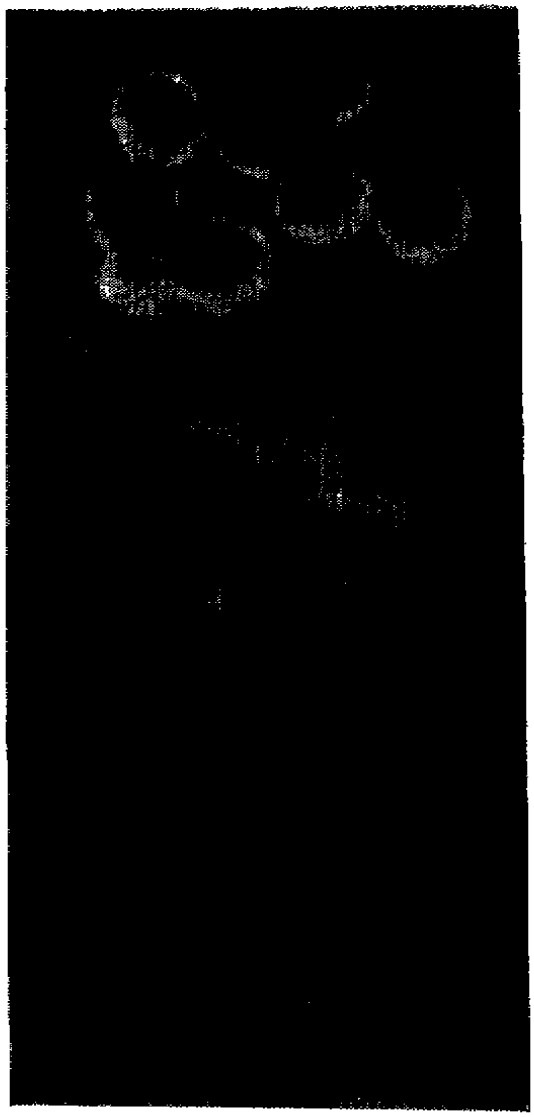

图7 固相免疫电镜技术

(a)不吸附病毒的葡萄球菌(b)和(c)被抗血清致敏的葡萄球菌吸附茶毛虫核型多角体病毒粒子。

Fig 7 Solid-phase immuno electron microscopic technique

(a)Control sample of the *S.aureus*

(b)and(c) *S.aureus* coated with antiserum to EpNPV

在对流免疫试验中，通过对不同浓度的凝胶电泳对比试验，发现凝胶浓度在0.6%—1%范围内，病毒粒子均可进入胶内，将免疫沉淀线切下研磨提取后，经电镜分别检测，观察到随着凝胶浓度增加，病毒粒子进胶的数量减少。因此我们认为，昆虫杆状病毒的对流免疫电泳和免疫扩散试验中，凝胶的最适浓度应以0.6%—0.7%为宜。

ELISA试验与免疫扩散、对流免疫电泳结果一致（见表1），而灵敏度提高125倍，故在检测田间防治效果及观察生态效应时，用ELISA法更具有灵敏、快速、简便等优点，易推广使用。

三，固相免疫电镜技术

在电镜下观察到，没有被抗血清致敏的葡萄球菌不吸附病毒粒子，被EpNPV粒子抗血清致敏的葡萄球菌则能吸附EpNPV粒子，而不吸附茶尺蠖核型多角体病毒粒子和斜纹夜蛾核型多角体病毒粒子(图7)。当抗原浓度不变时，抗血清稀释到1：1000仍有吸附作用，但吸附作用减弱，其灵敏度与ELISA相当。

由Kazt[7]等人建立起来的固相免疫电镜技术具有直观、灵敏度高、程序简便，用样量少等优点。其原理是利用金黄色葡萄球菌表面的A蛋白能和人及动物IgG的Fc片段有很强的亲和力作用，当菌体与抗血清孵育时，IgG分子结合到菌体表面，这种被抗体致敏的菌体与悬液中的相对应病毒在一起时，形成新的复合物，即病毒被吸附到结合在菌体上的抗体上。该技术在国内医学病毒应用上已有报道[8,9]，然而用于昆虫病毒的检测在国内外尚属首次报道，所得结果与血清学试验结果是一致的。同时从大量电镜观察中还发现病毒粒子的吸附位点位于两端，而病毒束吸附位点则分布于四周。此方法仅需微量抗原与抗体就能观察到满意的结果，且抗体纯度要求不高。所以我们认为在昆虫病毒免疫特性的研究中，采用此方法可获得比

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1　ELISA测定结果

Table 1　Result of ELISA

抗原 antigen	Eo NPV	Pl NPV	Bs NPV	Bm NPV	Ap NPV	Eg NPV	Ha NPV	Pc NPV	Acr NPV	Ts NPV	Ep NPV
EpNPV病毒粒子抗血清 antiserum of EpNPV virion	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+*

*为EpNPV粒子稀释1：1000仍阳性反应，而对流免疫电泳结果只有1：8稀释呈阳性反应。

较满意的结果。

五、在我国丘陵及山区茶园中，茶毛虫是茶树的主要害虫之一，且毒毛导致人体过敏，常使茶农叫苦不迭，使用茶毛虫病毒杀虫剂不仅使化学农药用量降低，同时施用病毒杀虫剂后2—3年内，茶毛虫数量显著减少，不再成灾，这是病毒侵染虫体产生的后期效应，由此产生良好的生态效益。通过血清学方法是普查及检测病毒杀虫剂的简易快速的手段，并将为病毒防治提供必需的理论数据。

参 考 文 献

〔1〕 李琮池，1983，昆虫病毒研究，10—12。

〔2〕 张益民，1986，微生物通报，13(5)：198。

〔3〕 陈棣华，1987，病毒学报，13(1)：70。

〔4〕 Bell, G.D.et al., 1977, *Virology*, 78：162.

〔5〕 Harrap, K.Y.et al., 1977, *Virology*, 79：14

〔6〕 Kronall, G.J.et al., 1973, *J.Med.Microbiology*, 6：187.

〔7〕 Kazt, D.et al., 1980, *J.Immunol.Methods*, 38：171.

〔8〕 张新生，1985，电子显微学报，4：14。

〔9〕 范辉宙，1989，中国免疫学杂志，52：102。

Immunity Studies on the Euproctis pseudoconspersa Nuclear Polyhedrosis Virus

Shi Zheng-li　Zhang Li-ren　Chen Di-hua

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

Methods such as immunodiffusion, counter-immunoelectrophoresis, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and solidphase immune electron microscopic (SPIEM) technique were used to study the antigenicity of EpNPV and *relationships between* EpNPV and other ten kinds of NPV. Results indicated that the antiserum of EpNPV reacted only with the purified particles of

EpNPV,and did not produce any immunoreaction with polyhedron protein and other ten kinds of NPV. Such tests suggested that there may be no serological relationships between them. The structural protein of EpNPV has a high specificity. The antiserum of polyhedron protein of EpNPV reacted not only with the polyhedron protein of EpNPV, but also with the polyhedron protein of EoNPV and PlNPV. Polyhedron protein of insect baculoviruses has no specificity.

Key word: Nuclear polyhedrosis virus Serological reaction Solidphase immune electron microscopic technique

书 讯

《中国菌种目录1992》(中英对照)是由中国微生物菌种保藏管理委员会组织所属的7个菌种保藏中心编写的，约80万字，主要介绍了病毒、细菌、放线菌、酵母菌、丝状真菌；介绍了每株菌的来源，分离基物，分离地，主要用途或特性，适宜的培养基和培养温度；介绍了每种甚至每株菌所需要适合其生长特殊组成的培养基。本书共收集了涉及普通、农、林、牧、渔、医学、食品、工业等微生物专业的有关菌种60685株，便于有关科研、教学、生产单位在利用微生物资源时，选择所需要的菌种。该书将于今年10月由机械工业出版社出版，定价69元，邮购请另加7元邮寄费，欢迎订购。汇款请邮局汇至：机械工业出版社一编室王中玉，地址：北京百万庄南里一号，邮政编码：100037。