8423(9)

289-295

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

油桐尺蠖核型多角体病毒在Bs484细胞中的感染特性研究

徐旭士'谢天恩

(中国科学院武汉病毒研究所,武汉430071)

5476:13

提要

本文研究了油桐尺蠖核型多 角体 病毒 (简称 BsNPV) 在油桐尺蠖成虫 卵 巢 细 胞 系 (Bs484) 中的以下 感染特性: 1. 病毒接种传代3-4天的细胞时,病毒感染率最高; 2. 病毒接种量在一定范围内与感染细胞的多角体总产量平行; 3、病毒在细胞中连 续传代七次后其滴度无明显变化; 4. 病毒基因组在感染细胞后 6 小时左右开始合成,并于感染后 14 小时达到最大。 此外,本实验还发展了一种用于检测感染细胞中的病毒核酸的简便方法。

美麗問: BSNPV 感染 DNA: DNA杂交 这中国尺蠖; 校多的丰庆寿;

油桐尺蠖核型多角体病毒(BsNPV)是七十年代末在我国被发现的^[1],为杆状病毒科的成员。油桐尺蠖是茶树的重要害虫之一,对化学农药抵抗力强,但是BsNPV对这种害虫具有较强的感染力和致死作用,因而被作为病毒茶虫剂受到重视。十余年来对该病毒进行了广泛研究^[2,314,6]。为进一步探索可作为杀虫剂的BsNPV的应用价值与感染规律,本文对它的部分感染特性进行了研究,现将结果报道如下。

材料和方法

一、細胞、培养基和病毒

实验所用细胞为本所昆虫病毒室提供的油桐尺蠖成虫卵巢细胞系(Bs484)^[2],培养基为TC-100^[4],外加10%小牛血清和5%菌麻蚕血淋巴。培养细胞每3~4天传代一次。

病毒的来源: 一是由BsNPV添食感染健康油桐尺蠖幼虫4天后所收集的病虫血淋巴,经离心和过滤除菌后的滤液;另一就是将BsNPV感染的Bs484细胞培养物进行离心后所得到的上清。

二、病毒感染率和细胞多角体数的计算

1. 病毒感染后的细胞制成均匀的细胞悬液,用血球计数板计算感染细胞占 全部细胞的 百 分比,每个样品计数4次,然后取其平均值,此即病毒感染率。感染细胞以细胞核内出现多角体为 病变特征。

本文于1991年9月14日收到, 1992年3月15日修回。

^{*} 现在地址, 江西大学生物系微生物教研室, 南昌330047。

2. 病毒感染的细胞3000 r/m离心20分钟,细胞沉淀按 $Ken-ichiro</code>的方法<math>\frac{I^{7}I}{v}$ 收集多角体,用血球计数板算出每毫升培养物中的多角体数, 根据 $\frac{P1Be}{m1}$ $\Big/ \frac{m}{m1}$ 就可得出平均每个感染细胞中的多角体数。

三、TCID。過度

测定工作在24孔组织培养塑料板中进行。每孔加入0.5ml—定浓度的细胞,24小时后吸出培养基,每孔加入0.1ml 持测病毒液。病毒原液用无血清的TC-100培养基作10倍稀释,每个稀释度作8孔。加入病毒后于26℃吸附2小时,然后每孔加入0.5ml 新鲜培养基。26℃静置培养7天后计数,以细胞核内出现多角体为病变特征。所得结果用Reed-Muench方法【8】进行处理,从而得出每毫升病毒液中的TCID;。数。根据1TCID;。=0.69IU(感染单位)【8】的关系,病毒滴度可以用TCID;。/ml 或IU/ml来表示。

四、细胞总DNA的提取

培养细胞经离心和洗涤后,于细胞沉淀中加入0.1mg/ml的蛋白酶 k 溶液,在冰浴中摇动 1 小时,然后置37℃作用12小时。用酚抽提细胞裂解物,接着用氯仿抽混。上相语于缓冲液 A(0.5mol/L Tris-HCI, 0.5mmol/L EDTA, 10mmol/L NaCI, pH8.0)中4℃透析6小时,然后向透析袋内加入终浓度为20μg/ml的RNase A(使用前95℃加热10分钟)。混匀后转入缓冲液B(50mmol/L Tris-HCI, 0.5mmol/L EDTA, 10mmol/L NaCI, pH8.0)中37℃ 透析6小时,最后所得到的 DNA 样品于4℃保存备用。

五、B:NPB(各角体)及B:NPV基因组的摄取和纯化

- 1. 多角体的提取按Summers的方法[10]进行。
- 2. BaNPV基因组的提取参考李敏棠的方法[11]。提纯后的DNA经0.6% 琼脂糖电泳检查其完整性, 经EcoRl和Hind T酶切实验以检查其纯度,以备用于标记杂交探针。

六、BsNPV-DNA的a-**P-dCTP的标记制备杂交探针

BeNPV全基因组的^{3 *}P 标记按DUPONT公司的 Nick translation 说明 书 进行。 反应体 积为 15μl, 于14℃反应2小时,加入反应终止液后经Sephadex G50过程分部收集,将未掺入的 α-^{3 *}P-dCTP与标记DNA分离。

七、DNA: DNA斑点杂交

斑点杂交按蔡良琬[12]的方法进行。

结 果

一、Be484细胞传代 $1 \sim 6$ 天后,分别用一定量的病毒感染细胞,感染后的第4天在显微镜下计算病毒感染率。病毒浓度以感染复数 (Multiplicity of infection, MOI)表示,MOI=加入病毒的总滴度 (IU/ml)/细胞浓度 (cells/ml)。实验结果表明, 传代后 $3 \sim 4$ 天的细胞对病毒最为敏感,感染率最高,而传代后 $1 \sim 2$ 天和 6 天的细胞对病

V

毒的敏感性相同。结果还显示,感染前细胞数量随传代天数基本呈上升趋势,提示病毒 感染率与细胞浓度无关,见表1。

表 1. 病毒感染不同培养时间的细胞的病毒感染率比较

Tab 1. Comparison of rates of BsNPV infection in different cultural time cells inoculated with the virus

细胞传代后 天数	感染前细胞数 (×105/ml)	感染复数 MOI	感染4天后细胞数 (×105/ml) No.of cells in	感染细胞数 ('<10 ⁵ /ml) No.of infected cells	感染率 (%) infection rate
Days after	No of cells				
Passage	before infection		4th day post-		
			infection		
1	1.3	5,0	3.54	0.83	23.3
2	1.43	5.1	3.14	0.63	20.1
3	4,25	5,0	5.81	2.47	42.5
4	4.B6	5.2	5.15	2.06	40
5	5.25	4.8	4.93	1,59	32.2
6	4.75	5.2	3.25	0.67	20,5

二、取传代后第三天的细胞用不同浓度的病毒分别进行感染,感染后第7天计算感染率及多角体产量(单位体积的多角体数),实验结果列于表2。结果表明,病毒浓度在1~25MOI的范围内,多角体产量和病毒感染率随病毒接种量的增加而上升,当病毒浓度达到30MOI时,二者均明显下降,但是病毒感染率与多角体产量之间并不严格对等。从表2可以看出,病毒浓度为5MOI的感染率与10MOI的感染率几乎相差一倍,但二者

表 2. 不同的MOI值对病毒感染率及多角体产量的影响

Tab 2. The influence of different MOI on rate of the virus infection and yield of polyhedra

感染后细胞 数 (×10 ⁵ /ml)	感染复数	感染率 (%)	感染细胞数 (×10 ⁵ /ml)	多角体产量 (×105PIBs/ml)	平均多角体数/感染细胞
No. of cells after infection	моі	rate of infection	No. of infected cells	yield of polyhedra	average PIBs per infected cell
3.2	30	45	1.44	18.5	13
3.4	25	80.5	2.7	41.3	15
3.2	20	72.3	2,2	38.5	17
2.6	15	65.6	1,65	32.4	20
2.75	10	60.5	1,34	20.1	15
3.0	5	32.5	0.65	17,2	27
2.9	1	25	0.54	5.4	10

的多角体产量却相差甚小,这只说明病毒感染率不能确切反映实际多角体产量。另一方面,单位感染细胞的多角体数与病毒接种浓度之间未显示规律性对应关系,提示单位感染细胞的多角体数也不能作为多角体产量的指征。

三、将来自BsNPV添食感染后的病虫血淋巴的原始病毒液接种第49代细胞,三天后

取培养物上清液 3000r/m 离心20分钟,所得上清即为第零代病毒,其滴度为 10¹⁰⁻¹TCID₁₀/ml。用第零代病毒接种第50代细胞,三天后取培养物上清离心,所得上清即为第一代病

表 3. 胸毒连续传代后的消度变化

Tab 3. The change of viral titer by serial passage

病毒代数	感染前细胞数 (×10 ⁶ /ml)	感染滴度 (TC1D50/ml)	感染滴度的对数 lg(TC1D50) logarithmt of infective titre	
No.of	No of cells before infection	infective titre		
1	3.5	10:.56	5.26	
2	4.0	104.3	5,2	
9	3,65	10	5.3	
4	3,86	104.84	5.34	
5	4.15	104.8	5,0	
6	3,35	104-13	5.18	
7	4.1	106-86	4,95	

毒在前七次传代过程中的毒力是稳定的。

四、点杂交检测病毒DNA在感染细胞中的复制

斑点杂交 1,用20MOI浓度的病毒接种细胞,病毒于26℃吸附细胞 1 小时,此时计为bpi=o(hpi=hcurs postinfection,感染后小时数)。然后分别在hpi=3,4,7,8,9,10,11,12,14,16 等十个时间取出感染样品,从以上样品和正常细胞中分别提取细胞总DNA,将DNA样品点入硝酸纤维素膜,每一斑点的样品量均为10μJ。杂交结果见图 1。本次结果表明BsNPV-DNA在感染Bs484细胞后 4~7小时之间开始合成,并在感染后约14小时达到最大。考虑到4hpi和7hpi二个样品与探针杂交的亮度相差较大,故不能认为病毒基因组是在感染细胞后 7小时开始合成,而有可能开始于感染后 5 或 6 小时左右。

斑点杂交 2 。用5MOI浓度的病毒接种细胞,在hpi = 3,5,6,7,8,9等六个时间取样,分别提取细胞总DNA后进行点杂交,每一斑点的样品量为 5μ 1,图 2 为本次实验结果。杂交显示4hpi和5hpi二样品的斑点亮度相同,而5hpi和6hpi的亮度出现差异,提示BsNPV基因组的合成开始于感染细胞后约 6 小时,从而证实了上述对斑点杂交 1 所作的推测。

五、点杂交检测感染细胞中的病毒核酸: 将病毒感染的细胞(感染率: 约20%, 细胞浓度: $1.2-1.5\times10^8/ml$) 和健康细胞(浓度为 $2.1\times10^8/ml$) 分别 点入硝酸 纤维素膜, 经变性后与探针杂交, 每一斑点的细胞样品量为 5μ l, 另设一个病毒 DNA 点以作比较(含量约 0.4μ g), 杂交结果见图 3。结果表明,正常细胞 不能与探针杂交, 而感染细胞的杂交斑点明显,其中72hpi样品与探针杂交的敏感性与病毒DNA相近。

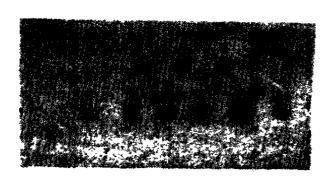


图 1. 杂交探针检测BaNPV在感染细胞中的基因组复制(1)

图中的阿拉伯数表示感染后小时数, N为正 常细胞核酸对照

Fig1. Result of hybridization probe test for replication of viral genome in BeNPV-infected cells (1)

Arabic numerals in the figure stand for hours postinfection (bpi), N. Nucleic scids of control cells.

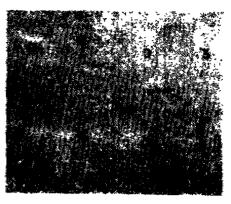


图 2. 杂交探针检测BsNPV在感染细胞中 的基因组复制(2),符号说明同图1 Fig2. Result No.2 of bybridization probe test for replication of viral genome in BsNPV-infected cell(2), The meaning of symbol is just the same as Fig.1

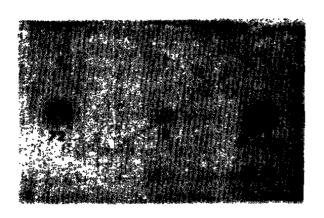


图 3. 斑点杂交检测感染细胞中的病毒核酸

箭头所指是正常细胞,72: 感染72小时的细胞 18, 感染18小时的细胞、S-DNA;

Banpv-DNA

Fig 3, Detection of viral nucleic acide of BenPV-infected cells by dotting hybridization, What arrow indicate is control cells, 72, the cells of 72 hpi, 18; the cells of 18 hpi, S-DNA:

Viral DNA

讨 论

一、以细胞核内多角体的出现为病变标准的病毒感染率并不是病毒一次感染后的结果,因为杆状病毒感染细胞后所释放出来的胞外病毒(ECV)^[10]还可进行水平传播。病毒感染是否成功,除了病毒活力因素外,细胞的生长活性也很重要。一般说来,细胞活性高,对病毒的敏感性就高,反之就低^[14]。通过对传代1~6天的细胞进行比较观察,发现传代3~4天的细胞形态一致,透明度好,并有一些正在分裂的细胞,说明细

Ļ

胞活性高,此时接种病毒,由于细胞整体水平对病毒的受性高,加之后续的二次和三次 感染,可使受染细胞增多,提高了病毒感染率。

二、杆状病毒感染细胞后所产生的子代病毒 有二种形式,非包涵体病毒(NOV)^[18] 和包涵体病毒(OV)。NOV和OV具有相同的基因组,但是在感染途径上行使不同的功能^[18]。由于包涵体病毒(即多角体)是昆虫病毒杀虫剂的有效成份, 因此本实验 仅考虑病毒接种浓度对多角体数量的影响。实验证实,多角体产量只是在一定范围内与病毒接种浓度平行,这与国外有关实验结论^[17]相符。然而在单个感染细胞中,产生的NOV与OV之间无严格的定量关系^[18],导致了感染细胞之间的多角体数的差异。 对任一种病毒接种浓度下的感染细胞进行观察,都发现有二种类型:一种细胞的核内含有较多的多角体,从数十个到上百个不等,另一种细胞的核内含有较少的多角体,一般只有几个。实验结果还指出,多角体产量在病毒接种浓度达到30MOI后明显下降,这是否提示BaNPV也存在自身干扰,尚需证实。

三、就特定的病毒- 离体细胞而言,病毒传代 过程中的滴度变化可能与三方面的原因有关。其一,细胞活性直接影响病毒的吸附和复制。实验中,我们在 TC-100 的基础上,外加终浓度为0.2%的健康油桐尺蠖幼虫血淋巴,发现细胞在其中生长 很好, 从而克服了昆虫体外细胞生长不稳定所造成的影响。其二,病毒经过连续传代后易引起遗传变异,变异范围包括病毒形态、宿主范围、空斑形伏及毒力等[10],其中 毒力的变 异往往产生弱毒株。其三,病毒传代的初始接种浓度也影响病毒的感染力,有关报道说,当用高浓度的病毒在细胞培养中连续传代后,其感染力明显下降[20],原因 是产生了 缺陷干扰颗粒,这是一种亚基因组病毒颗粒,需要同源亲本病毒才能复制,但其复制常导致辅助病毒的消耗,这种干扰的结果使得病毒感染力降低[21]。正是干扰现象的存在使得同一病毒由于初始接种浓度的差别而导致传代后的病毒 滴度 变化有可能完全不同。实际上昆虫病毒传代的滴度变化是一个比较复杂的问题,据文献报道,一株昆虫病毒在前十次传代中滴度无变化[22],而后人将该病毒继续传代二十次后则发现滴度显著下降[28]。因此,在本实验传代的基础上对 BaNPV 继续传代,其滴度是否会有大的变化,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 谢天恩等, 1979, 病毒学集刊创刊号, 17-20。
- [2] 中科院武汉病毒研究所等,1985,油桐尺蠖核型多角体病毒杀虫剂的研制及应用成果鉴定资料。
- 〔3〕 武汉大学病毒研究所等,1986,中国昆虫病毒图谱,胡南科学技术出版社,第13-16页。
- (4) 刘年翠,孟小林,1986,病毒学杂志 1:48-52。
- (5) 丁达明,武亚明,1986,病毒学杂志 1:31-35。
- (b) Gardiner, G.R.et al., 1975, J. Invertebr. Pathol. 25: 363-370.
- (7) Ken-ichiro, Y. et al, 1982, J. Invertebr. Pathol. 39:185-191.
- (8) John, P.et al., 1985, Cell and tissue culture, 3rd edition 138-225.
- (9) Karl, M. 1985, Viral Insectioides for Biological Control 685-687.
- (10) Summers, M.D. et al., 1976, J. Virol. 17: 962-972.
- (11) 李敏棠等, 1981, 科学通报22, 第1391页。
- (12) 蔡良琬, 1987, 核酸研究技术上册, 科学出版社, 第234-245页。
- (13) Fraser, M. J. et al., 1983, J. Virol. 47: 287-300.
- (14) Knudson, D. L. 1974, J. Virol. 14: 934-944.
- (15) Loy, E.V. et al., 1976, J. Virol. 19: 820-832.
- (18) 田波等1986, 病毒与农业, 科学出版社, 第21页。
- (17) William, J. M. ot al., 1980, J. Invertebr. Pathol. 36: 48-51.
- (18) Pennock, G. et el., 1984. Molecular and Cellular Biology 4(3): 3531-3538
- [197 Fields, B. N. et el., 1985. Virology, Raven Press, New York, pp114-146
- [20 Matthews, R.E.F., 1982, Intervirology 17:1-25.
- (21) 姓云德, 1990, 分子病毒学, 学苑出版社, 第329-384页。
- [22] Granados, R.R., 1981, Intervirology 16:71-79
- (23) Yamade, K.et al., 1982, J. Invertebr. Pathol. 39: 113-121
- [24] Owens, R.A., 1981, Science 23: 870-671.
- [25] Barker, J. M., 1985, J. Virol. Methods 10: 87-98.
- (26) Ward, V.K., 1987, J. Virol. Methods 15: 65-73.
- (27) Kelly, D.C., 1982, J.Gen. Virol, 63:1-13.
- (28) Tijs, S.T.et al., 1979, Virology 99: 399-409.
- (29) Flore, P.H. et al., 1987, J. Gen. Virol. 68: 2025-2031.

Study on the Infective Characters of Buzura suppressaria Nuclear Polyhedrosis Virus in BS484 Cell Line

Xu Xu-shi Xie Tian-en

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

This thesis reported the following infective characters of Buzura suppressaria nuclear polyhedrosis virus (BsNPV) in Bs484 cell line, 1. The viral infection rate was the highest when the virus was inoculated in Bs484 cells had been subcultured for 3—4 days, 2. The viral inoculating quantities paralleled the total yield of polyhedra in virus-infected cells in certain range, 3. The viral titre had no significant change after BsNPV was serially passaged for seven times in Bs484 cells, 4. The synthesis of the viral genome began about 6 hours postinfection in BsNPV-infected cells and reached the maximum around 14 hours postinfection. In addition, this experiment also developed a handy method for checking viral nucleic acids in virus-infected cells.

Key words. BsNPV Infection DNA | DNA hybridization