

418-425

11225(9)

第7卷第4期  
1992年12月中国病毒学  
VIROLOGICA SINICAVol. 7 No. 4  
Dec. 1992黄褐天幕毛虫核型多角体病毒的  
形态结构与某些生化特性的研究

张文军 陈棣华 张立人

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

张国贤

(内蒙古农牧学院农学系, 呼和浩特 010010)

5476.13

李淑琴

(内蒙古园艺科学研究所, 呼和浩特 010010)

## 提 要

黄褐天幕毛虫核型多角体病毒是一种多粒包埋型病毒。在扫描电镜下观察, 多角体呈不规则多面体, 大小不一致, 平均直径为 $1.30\mu\text{m}$ 。病毒粒子为杆状, 大小为 $366\times 90\text{nm}$ 。

病毒核酸为一环状DNA, 长度约为 $37.2\mu\text{m}$ 。经限制性内切酶酶解分析, DNA总分子量为 $77.1\times 10^4\text{D}$ 。病毒多角体蛋白富含ASP和Glu, 而His、Cys、Met含量较少。经SDS-PAGE分析, 多角体蛋白主带的分子量为 $30.2\text{KD}$ ; 病毒粒子含21条多肽, 分子量范围在 $16.5-107\text{KD}$ 之间。

关键词: 黄褐天幕毛虫 核型多角体病毒 多肽分析 DNA酶切图谱 亚克分子带

天幕毛虫; 昆虫病毒; 核多角体病毒

黄褐天幕毛虫 (*Malacosoma neustria testacea* Motschulsky) 是我国北方林业的重要害虫之一。可危害苹果、梨、桃、李、杏等多种果树, 及杨、柳、榆、桑等阔叶林木, 造成巨大的经济损失。一九八五年, 内蒙古农牧学院农学系分离并鉴定出一株黄褐天幕毛虫核型多角体病毒 (简称 MntNPV) <sup>[1]</sup>。早在一九六五年, 国外曾报道发现了 MntNPV <sup>[2]</sup>, 并进行了生物防治尝试和提高毒力的诱变 <sup>[3][4]</sup>, 国内也有些学者在该病毒的形态大小及生防方面作了一些工作 <sup>[1][5]</sup>, 但对该病毒的生化特性的研究在国内外均未见报道。本文应用电镜技术及生化方法对 MntNPV 的形态结构, 病毒结构蛋白, 多角体蛋白, 病毒核酸等进行了研究, 现将结果报道如下。

本文于1991年11月27日收到, 1992年5月9日修回。

## 材 料 与 方 法

(一) 病毒的来源及纯化 MntNPV感染致死的白尸由内蒙古农牧学院和中科院沈阳应用生态研究所提供。用MntNPV(I)和MntNPV(S)分别代表内蒙株和沈阳株。将虫尸捣碎过滤, 经数次差速离心, 0.5% SDS处理, 洗净后再经40—60%(W/W)蔗糖梯度离心, 4000r/m 1.5小时, 收集多角体带, 洗去蔗糖, 得纯净多角体, 4℃保存备用。

(二) 电镜样品的制备 (1)病毒多角体: 扫描电镜样品按下述方法制备, 将纯化的多角体悬液, 经离心沉淀于铜片上, 再经乙醇脱水, 自然干燥后在KyKy-1000B型扫描电镜下观察。(2)病毒束和病毒粒子: 取少量提纯的病毒束(梳子), 置于Formvar-碳膜的铜网上, 3%PTA染色。(3)病毒核酸展层: 采用一步释放法, 细胞色素C展层, 上述两样品均在JEM-100C型透射电镜下观察。

(三) 病毒粒子和多角体蛋白的制备 取多角体悬液(10mg/ml)3ml加入等体积的0.1mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -0.17mol/L NaCl(pH10.8)溶液, 室温下碱解15—20分钟, 置于20—60%(W/W)的蔗糖梯度上, 60000×g离心1.5小时, 分别小心取出上清液和病毒粒子带。用1N HCl将上清液调至pH5.6, 得白色沉淀, 即为多角体蛋白。用无菌水洗去病毒粒子带中的蔗糖, 50000×g离心1小时, 收集病毒粒子。经紫外分光光度计与电镜检测病毒粒子和多角体蛋白的纯度。

(四) SDS—PAGE分析 多角体蛋白和病毒粒子结构多肽的组成和分子量测定按Summers<sup>[6]</sup>的方法进行, 电泳采用Laemmli(1970)的不连续系统, 标准蛋白购自上海东风试剂厂。

(五) 多角体蛋白氨基酸组成分析 将纯化的多角体在6NHCl 105℃条件下水解, 其产物在Waters Pico-tag氨基酸分析仪上分析。

(六) 病毒基因组的限制性内切酶图谱 病毒DNA采用饱和酚直接从多角体中抽提而得。限制性内切酶EcoRI, BamHI, BglI, HindIII, PstI, XhoI均购自华美生物工程公司, 酶切缓冲液为自配, 酶切反应和琼脂糖凝胶电泳按Maniatis(1982)的方法进行。以入DNA/Hind III片段作标准曲线, 计算MntNPV—DNA各酶切片段的分子量和DNA的总分子量。

## 结 果

一、病毒多角体和病毒粒子的形态结构, 在透射电镜下观察, 多角体呈不规则的四边形、五边形、六边形和近似圆形。在扫描电镜下观察, 多角体表面光滑, 大多呈不规则多面体(图1)。多角体大小不一, 直径范围在0.84—1.80μm之间, 平均直径为1.30μm。病毒束为短杆状, 两端钝圆, 其长度较恒定, 为400nm, 其宽度因所包含的病毒粒子数不同而有较大变化, 一般在100—210nm之间(图2)。病毒束中的病毒粒子为长杆状, 两端平截; 大小恒定, 为366×90nm。该病毒为多粒包埋型病毒(图3)。

二、病毒核酸的电镜观察 经透射电镜观察, DNA是一环状大分子(图4)。对多个环状DNA测量后发现其长度在 $32 \pm 5.2 \mu\text{m}$ 的范围内, 用最长的DNA分子折算总分子量为 $77.0 \times 10^6 \text{D}$ , 与DNA酶切图谱中所测得的总分子量基本相符。

三、病毒粒子与多角体蛋白的纯度测定 纯化后的病毒粒子在电镜下观察较为均一无其它碎片或杂质, 其紫外吸收曲线呈平滑下降, 在240—300nm之间无明显吸收峰, 其 $A_{260}/A_{280} = 1.32$ , 这与Bell<sup>[7]</sup>和 Harrap<sup>[9]</sup>等人报道的昆虫杆状病毒的病毒粒子紫外

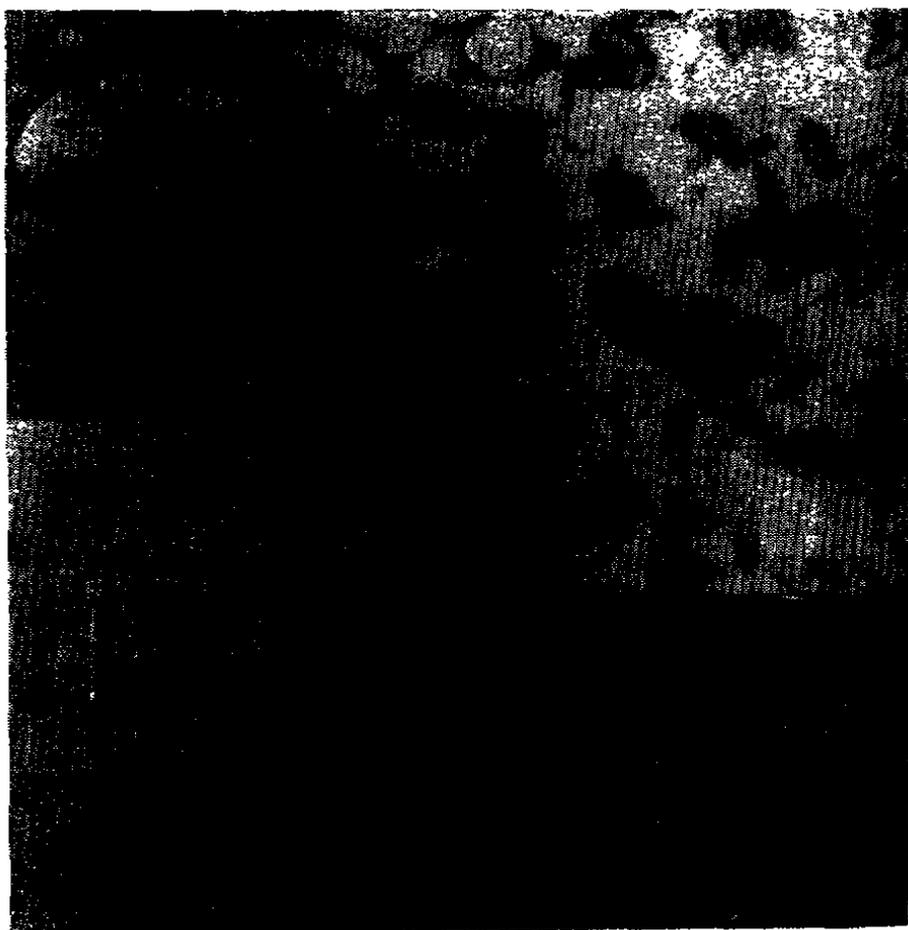


图1 MntNPV多角体扫描电镜像(6960X)

Fig.1 Scanning electron micrograph of MntNPV inclusion bodies(6960X)

图2 病毒束 3%PTA(20000X)

Fig.2 Micrograph of nucleocapsid bundles (20000X, 2%PTA)

图3 病毒束内的病毒粒子 3%PTA(80000X)

Fig.3 Nucleocapsides enveloped in the bundles (80000X, 3%PTA)

图4 完全展开的MntPV-DNA环状大分子(80000X)

Fig.4 Micrograph of an entirely spreaded covalently closed circular DNA from MntNPV.(8000X)

吸收曲线是一致的(图5)。多角体蛋白的紫外吸收曲线在280nm处有一明显吸收峰,其 $A_{280}/A_{260} = 1.97$ 。

四、多角体蛋白和病毒子粒结构多肽SDS-PAGE分析 从多角体蛋白的SDS-PAGE图中(图6)可见, MntNPV的多角体蛋白仅有一条主带,分子量为30.2KD。另外还有两条分子量较小的弱带,分子量分别为22.5KD和20KD,这两条弱带可能是多角体本身所含的碱性蛋白酶降解主带的产物,这与Summers(1978)<sup>[1]</sup>的结果一致。如果上样量

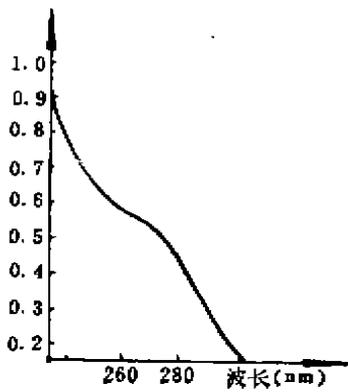


图 5 病毒粒子的紫外吸收曲线  
Fig.5 Absorption curve of MntNPV nucleocapsides



图 6 MntNPV多角体蛋白的SDS-PAGE图  
Fig.6 SDS-PAGE of the Polyhedrin from MntNPV

加大，还可看到一条分子量较大的弱带(60KD)，这条带被认为是多角体蛋白主带的二聚体，因为它的分子量刚好是主带的两倍。

经SDS-PAGE，病毒粒子结构蛋白含有21条多肽(图7)。其分子量范围在16.5—

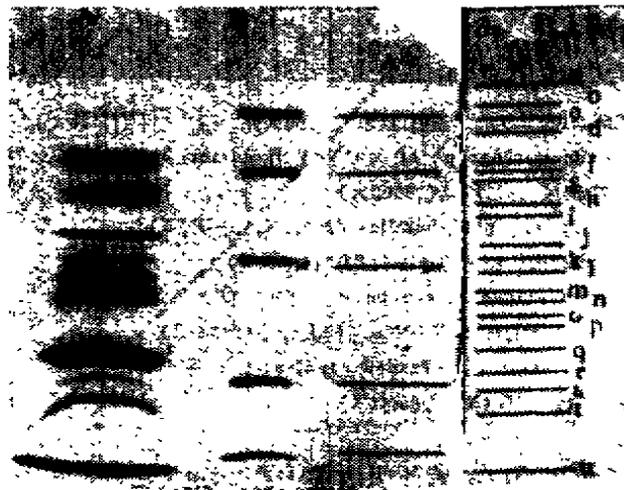


图 7 病毒粒子结构多肽的SDS-PAGE图  
Fig.7 SDS-PAGE of enveloped nucleocapsid structural Polypeptides

107KD之间，其中 $\alpha$ ， $\nu$ ， $\mu$ 为主带，分子量分别为38，32和16.5KD。表1为病毒粒子各结构多肽的分子量。图8为病毒粒子结构多肽电泳色带的凝胶条扫描图。

表 1 MntNPV病毒粒子结构多肽分子量

Tab.1 Molecular weights(KD) of MntNPV-Virion Structural Polypeptides

多肽序号 No	分子量 MW(kd)	多肽序号 No	分子量 MW(kd)
a	107	L	43
b	100	m	39
c	94	n	38
d	86	o	37
e	73	p	38
f	70	Q	34
g	67	r	32
h	60	s	30
i	58	t	28
j	50	u	18.6
k	48		

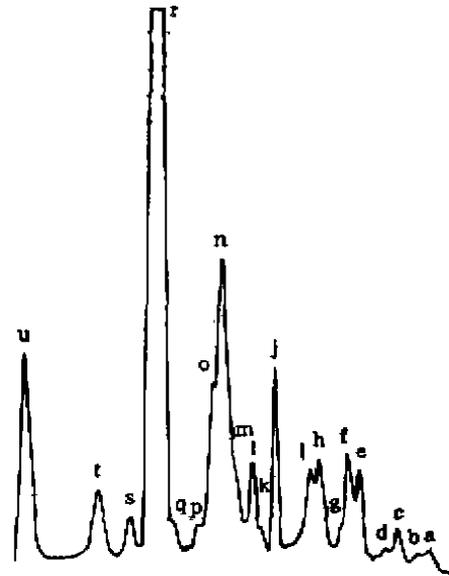


图 3 MntNPV病毒粒子结构多肽电泳色带的凝胶扫描图

Fig.3 Scanning monograph of electrophoretic gel profile of MntNPV nucleocapsid structural polypeptides

五、多角体蛋白的氨基酸组成分析 MntNPV多角体蛋白的氨基酸分析结果见表2。从表中可见，该蛋白含有较多的Asp, Glu, lys, Arg, leu。Asp与Glu二者之和约占总分子量的26%（摩尔百分含量），而His, Met, Cys的含量却很少。

表 2 MntNPV多角体蛋白的氨基酸含量表

Tab.2 Amino acid composition of MntNPV polyhedrin

氨基酸 Amino Acid	微克/毫升 μg/ml	毫克/毫升 10 <sup>-4</sup> μmol/L/ml	摩尔百分比 mol/L/%	百分含量 Percentage
ASP	88.1	659	14.1	10.83
GLu	83.0	534.4	12.1	10.21
Ser	17.5	166	3.5	2.15
GLy	15.7	209.3	4.4	1.93
His	12.5	80.8	1.8	1.54
Arg	61.0	350	7.7	7.5
Thr	25.3	212.3	4.5	3.11
ALa	20.2	227.5	4.9	2.49
Pro	37.1	314	6.7	4.31
Tyr	17.9	204	4.4	4.54
Met	1.8	22.2	0.7	0.39
Val	40.2	343.6	7.3	4.94
Cys	<0.008			<0.001
Ile	17.0	252	5.4	5.06
Leu	59.1	350	9.7	7.26
Lys	51.2	350.8	7.5	6.30
Phe	42.2	255.3	5.5	5.19
Trp	未分析			
NH <sub>3</sub>	未分析			
总数 Total	627.2	4671.3	99.98	77.08

六、MntNPV的DNA限制性内切酶图谱 MntNPV-DNA经EcoR I, BamH I, Hind III, Xho I, Pst I, Bgl I 六种酶单酶切, 分别得到15, 7, 12, 13, 8, 13条片段(图9); 经EcoR I + Xho I, BamH I + Pst I, BamH I + Bgl I, Hind III + Pst I 四组双酶切, 分别得到19, 12, 15, 13条片段(图10)。以λDNA/Hind III片段为标准, 计算出各酶切片段的分子量和MntNPV-DNA的总分子量, 见表3和表4。

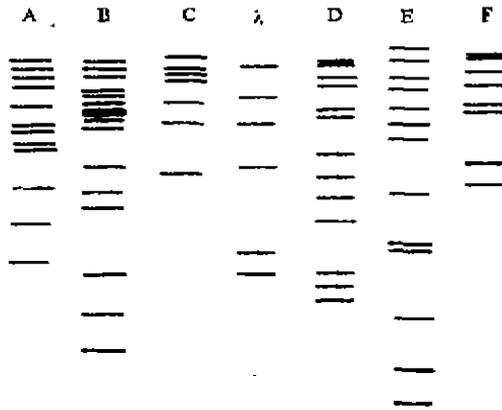
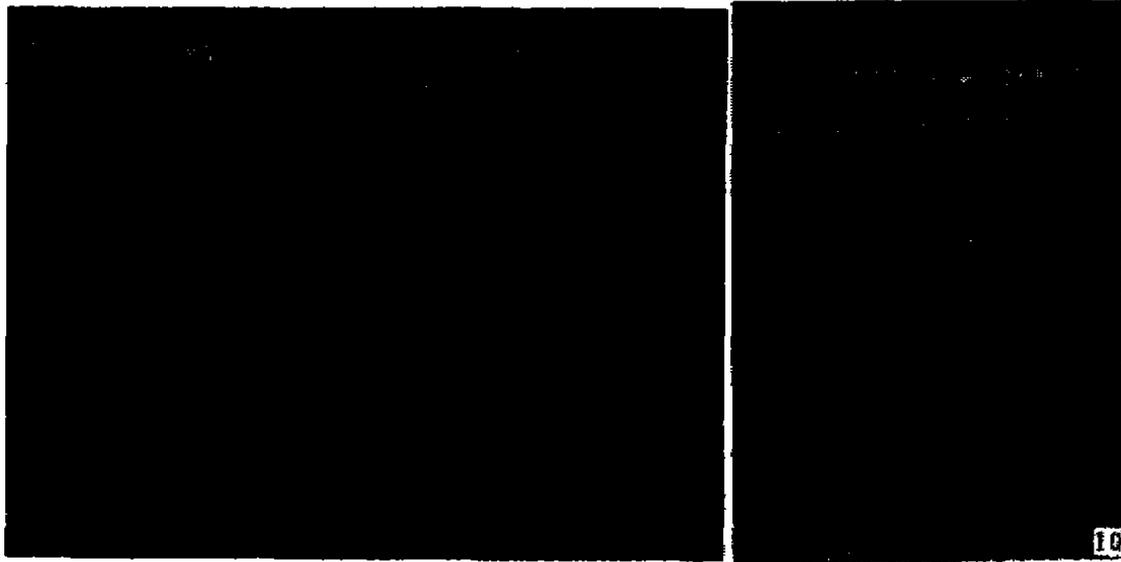


图9 MntNPV(I)和(S)-DNA的单酶切图谱  
Fig.9 Cleavage of MntNPV(I) & (S)-DNA fragments with single restriction endonuclease  
A-(I)/HindIII frag, B-(I)/EcoR1 frag, C-(I)/BamH I frag, D-(I)/Bgl frag, E-(I)/Xho I frag, F-(I)/Pst I frag, λ-λDNA/HindIII frag.

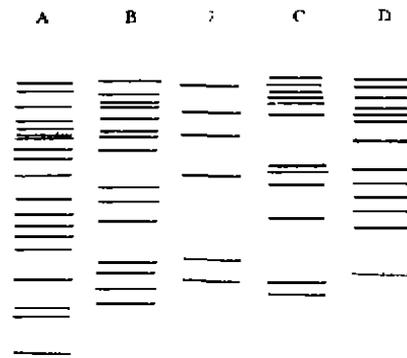


图10 MntNPV(I)-DNA的双酶切图谱  
Fig.10 Cleavage of MntNPV(I)-DNA fragments with double restriction endonucleases  
A-EcoR I + Xho I, B-Bgl I + BamH I, λ-λDNA/HindIII fragments, C-BamH I + Pst I, D-Pst I + HindIII,

表3 MatNPV(1)-DNA单酶切片段的分子量( $1 \times 10^6$ D)Tab. 3 Molecular Weights of Single Restriction Endonuclease Fragments of MatNPV-DNA, ( $1 \times 10^6$ D)

片段号 Fragment	BamHI	EcoRI	BglI	HindIII	PstI	XhoI
A	25.0	17.0	17.8	20.4	18.2	21.4
B	15.5	12.2	15.5	14.1	18.2	15.5
C	12.8	8.5	11.0	10.0	13.8	10.7
D	9.9	6.4	9.1	7.1	9.7	8.1
E	6.1	5.9	5.7*	4.7	6.0*	5.6
F	5.0	5.6*	4.7	4.0	5.5	4.6
G	2.3	3.0	3.2	3.8	3.2	3.9
H		4.5*	2.6	3.5*	3.0	2.3
I		4.2	2.3	3.3		1.7
J		2.8	2.6	2.1		1.6*
K		2.2	1.3	2.0		0.8
L		2.0	1.1	1.4		0.5
M		1.3	0.8			0.3
N		0.8				
O		0.3				
总数 Total	77.1	78.8	77.2	76.5	77.3	77.1

\*为亚克分子带

\*Submolecular Fragments.

表4 MatNPV-DNA双酶切片段分子量表( $1 \times 10^6$ D)Tab. 4 Molecular Weights of Double Restriction Endonuclease Fragments of MatNPV-DNA, ( $1 \times 10^6$ D)

片段号 Fragment	EcoRI+XhoI	BamHI+BglI	BamHI+PstI	HindIII+PstI
A	10.2	17.8	18.2	17.0
B	11.0	11.2	15.7	13.8
C	7.6	9.1	13.8*	9.5
D	5.4	8.9	8.9	7.1
E	4.7	5.8	6.0	6.4*
F	4.4*	4.7	3.2	3.0
G	4.2	4.3	3.0	3.7
H	3.55	3.6	2.5	3.1
I	3.4	2.5	2.5	2.9
J	2.6	2.3	2.0	2.7
K	2.5	2.0	1.8	2.5
L	2.1	1.5	1.1	2.0
M	1.9	1.8		1.4
N	1.7	1.2		
O	1.6	1.1		
P	1.2			
Q	0.9			
R	0.6			
S	0.3			
总数 Total	76.05	76.4	77.8	77.2

\*亚克分子带

\*Submular Fragments.

## 讨 论

从黄褐天幕毛虫核型多角体病毒的形态结构和生物学特性来看,该病毒的多角体和病毒粒子的形态及大小都与绝大多数其它的昆虫杆状病毒非常相似<sup>(8)</sup>,该病毒感染宿主后致死较快,死亡率较高<sup>(1)</sup>,在果树林业害虫的生物防治上具有很好应用前景。

Rohrmann (1984, 1986) 和 Smith (1982) 等人对多种昆虫NPV的基因组进行了深入研究后发现:昆虫NPV的整个基因组是相当保守的,而多角体蛋白基因是所有NPV基因中最保守的<sup>(11)(13)</sup>。从MntNPV的多角体蛋白的氨基酸组成来看,该蛋白富含 Asp 和 Glu,二者之和约占分子量的26%,而His, Met, Cys 的含量却很少。这一结果与其它昆虫NPV的多角体蛋白的氨基酸组成是非常接近的<sup>(8)(9)(11)</sup>。这也证实了昆虫NPV编码多角体蛋白的基因的保守性,并提示该基因在漫长的进化过程中可能存在同源性。

MntNPV 的病毒粒子的结构多肽非常复杂,这与许多其它昆虫NPV的病毒粒子结构多肽的复杂性是一致的<sup>(4)(8)</sup>。一般认为昆虫杆状病毒粒子有11—26种结构多肽,分子量范围在10—160KD之间,并有几种主要多肽,其中分子量在10—20KD之间的有一种,分子量在30—40KD之间的至少有一种<sup>(10)</sup>。MntNPV的病毒粒子有21种结构多肽,范围在16.5—107KD之间,并且也有三种主要多肽,其中分子量在10—20KD之间的是16.5KD带,在30—40KD之间的是38KD带和32KD带。这几种主要多肽在多种NPV中分子量都很相近。

我们对黄褐天幕毛虫核型多角体病毒的内蒙分离株MntNPV(I)和沈阳分离株MntNPV(S)进行了基因组的限制性内切酶图谱的分析比较,发现它们的DNA的BamHI酶切片段的数目和大小基本相同;但在EcoRI片段中,沈阳株的E片段和G片段比内蒙株的相应片段弱得多(图9),经多次实验,结果仍然如此。造成这一现象的原因可能是MntNPV(S)是由几个亚系混合组成的。

在DNA的限制性内切酶图谱分析中,有亚克分子带的出现。这一现象在许多昆虫NPV中都曾出现过<sup>(12)</sup>。这可能是由于野生型病毒并不是由一个纯系组成,而是由几个亚系组成的混合物。我们在DNA分子展层中也发现几乎每个完全展开的病毒DNA分子的长度都彼此有差异( $32 \pm 5 \mu\text{m}$ ),提示野生型病毒可能是由混合系组成。这种混合系的DNA分子在限制性内切酶图谱中就可能出现亚克分子带。

## 参 考 文 献

- [1] 张国贤等, 1986, 内蒙古农牧学院学报, 7(2): 1—4.
- [2] Stairs, C.R., 1965, *J. Invert. Pathol.*, 7(4): 427.
- [3] Smirnov, W.A., 1967, *J. Invert. Pathol.*, 9: 265.
- [4] Magnoler, A., 1975, *J. Invert. Pathol.*, 25: 343.
- [5] 张立人主编, 1988, 《中国昆虫病毒电子显微镜图谱》, 图版11—13, P9—12, 科学出版社.
- [6] Summers, M.D. et al., 1978, *Virology*, 84: 390.
- [7] Bell, C.D., 1977, *Virology*, 78: 192.

- [8] Harrap, K.A., 1979, *Adv. Virus Res.*, 25: 273.  
 [9] 刘小英等, 1989, *病毒学报*, 5(2): 150.  
 [10] Maskos C.B. & Miltenburger H.G., 1981, *J. Invert. Pathol.*, 37: 174.  
 [11] Rohrmann G.F. 1986, *J. Gen. Virol.*, 67: 1198.  
 [12] 陈棣华, 1987, *病毒学报*, 3(1): 69.  
 [13] Smith G.E. 1982, *Virology*, 123: 393.

## Morphology and Biochemical Characteristics of the Nuclear Polyhedrosis Virus of *Malacosoma neustria testacea*

Zhang Wen-jun Chen Di-hua Zhang Li-ren

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

Zhang Guo-xing

(Inner Mongolia College of Agriculture & Animal Husbandry,  
Huhehaote, 010010)

Li Shuo-qin

(Inner Mongolia Horticulture Science Institute, HuHehaote 010010)

*Malacosoma neustria testacea* nuclear polyhedrosis virus (MntNPV) is a kind of multi-embedded baculovirus. Scanning EM shows that MntNPV inclusion bodies are irregular polyhedra with different sizes. The average diameter of polyhedra is 1.3 $\mu$ m. Virions have a mean size of 366x90nm. The virus genome is a circular DNA macromolecule with length of 37.2 $\mu$ m.

SDS-PAGE exhibits that polyhedrin has only one major polypeptide with MW of 30.2KD. Virions have at least 21 polypeptide bands with MW ranged from 16.5KD to 107KD. Like other insect NPVs, MntNPV polyhedrin also contains more Asp, Glu, Arg and Leu, less His, Met, and Cys. This result suggests that the genes of polyhedrin in many NPVs may have a conservative sequence.

The DNA of MntNPV has been analyzed by REM with EcoRI, BamHI, HindIII, BglI, PstI, XhoI. The MW of every fragment has been determined. Total MW of MntNPV genome is 77.1x10 daltons.

**Key words:** *Malacosoma neustria testacea* Nuclear Polyhedrosis Virus Amino Acid Composition Analysis Restriction Endonuclease Map Submolecular Fragment