维普资讯 http://www.cqvip.com

76-83

第8卷第1期
1993年3月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.8 No.1
Mar. 1993

两株蓖麻蚕核型多角体病毒的比较研究

罗经 严银钫 杨学楼

(中国科学院武汉病毒研究所，武汉430071)

田泽君

(四川省林科院森保室，成都，610066)

提 要

本文描述来源不同的两株蓖麻蚕多角体病毒的形态特征和理化特性。一株为较长期饲喂马桑叶的蓖麻蚕从自然罹死的幼虫和蛹中分离的多角体病毒(简称ArscsNPV)；另一株为饲喂蓖麻叶的蓖麻蚕从幼虫分离的核型多角体病毒(简称ArNPV)。两株核型多角体病毒的形态大小略有差异，ArscsNPV多角体直径大小约0.7—1.9μm，最大的可达2.5μm；ArNPV多角体大小约1.2—2.0μm 最大的可达 2.9μm。两株 NPV 病毒粒子均为杆状，ArscsNPV病毒粒子大小平均为310×50nm；ArNPV 病毒粒子大小为 350×50nm。两株NPV均为多粒包埋型。两株NPV的多角体蛋白均为单一组分，ArscsNPV多角体蛋白分子量为27.5kd；ArNPV 多角体蛋白 分子量为28kd。两株 NPV 的病毒粒 子结构多 肽均含有21条多肽，其中各多肽分子量有所差异。ArscsNPV的病毒粒子多肽 分子量范围为11—130kd；ArNPV病毒粒子多肽分子量范围为11—96kd，其中有 11 种多肽分子量彼此相同包括两种主要多肽（54kd和33kd）。用SDS-苯酚提取的病毒核酸，经实验证明均为双链DNA 型使用几种内切酶酶解，求得两株 NPV 的核酸分子量，ArscsNPV 为52.4×10^6d；ArNPV为73.5×10^6d。

关键词：蓖麻蚕多角体病毒　形态特征　病毒粒子　蛋白多肽　病毒核酸

蓖麻蚕是我国养蚕业的一个重要资源。在我国四川、湖南、广西等地因地制宜，使用马桑叶饲喂蓖麻蚕。由于其蚕茧质地优良，马桑叶来源丰富，如今已成为山区人民脱贫致富的重要付业之一。1989年四川省饲养区发生大规模流行病，致使养蚕业受到重大损失。经我们分离纯化后研究确认其病原为多角体病毒。为了研究从这种饲喂马桑叶的蓖麻蚕分离的多角体病毒与蓖麻蚕多角体病毒之间的关系，我们对这两株NPV进行了形

本文于1991年9月17日收到，1992年4月7日修回。
本课题为国家自然科学基金资助项目之一。
本所电镜室协助拍摄电镜照片，特此致谢。

维普资讯 http://www.cqvip.com

态学和理化特性的比较研究。现将结果报道如下。

材料和方法

1. **病毒**：蓖麻蚕多角体病毒（*Philosamia Cynthia ricini Donovan Polyhedrosis Virus* 简称ArNPV）由武汉大学病毒系馈赠。

马桑蚕多角体病毒〔Philosamia Cynthia ricini (Sursum Coniatia Sinica) Polyhedrosis Virus简称Arscs NPV〕由四川省林科院森保室提供。

2. **多角体的分离纯化**：参照文献[1]介绍方法分离纯化。

3. **病毒粒子的分离纯化**：按文献[2]方法纯化超离心后获得的病毒粒子，再经Sepharose 2B柱层析后获得纯病毒粒子。

4. **多角体和病毒粒子电镜观察**：取纯多角体和纯病毒粒子经2%PTA负染色后于JEM-100型C电镜下观察。多角体超薄切片按文献[3]方法。

5. **多角体蛋白的分离纯化**：纯多角体于70℃2小时后加入碱液4℃20分钟，10000r/m离心15分钟，用0.5mol/L PB-HCl(pH2.0)调pH至7.0，置冰箱中2小时，再以3000r/m离心15分钟，收集多角体蛋白，用0.01mol/L Na_2CO_3-0.05mol/L NaCl pH9.0解絮后用Sepharose 6B柱层析，收集蛋白峰，将pH调至6.0冰箱静置，收集多角体蛋白，解絮后—20℃保存。

6. **多角体蛋白和病毒粒子多肽的SDS-PAGE**：按文献[4]系统垂直板型电泳。分离胶为10%，浓缩胶为4%。

分子量测定参照Weber和Osborn[5]方法进行。分子量标准蛋白采用上海东风生化试剂厂生产的成套分子量标准蛋白。

7. **病毒核酸的提取**：参照李敏棠[6]，罗经[7]方法进行。采用直接从多角体提取核酸的方法。

8. **核酸的二苯胺反应**：参照文献[8]方法进行。

9. **核酸的热变性紫外吸收**：取2ml核酸（约含40μg）样品，分成二份，一份于100℃中煮沸10分钟，冰浴骤冷。另一份作对照。于UV-300型紫外分光光度计上测A_{260}-A_{280}值。

10. **核酸的限制性内切酶酶解分析**：参照文献[7]方法进行。各内切酶均购自华美生物工程公司。

11. **核酸的RNase和DNase处理**：参照文献[8]方法进行。

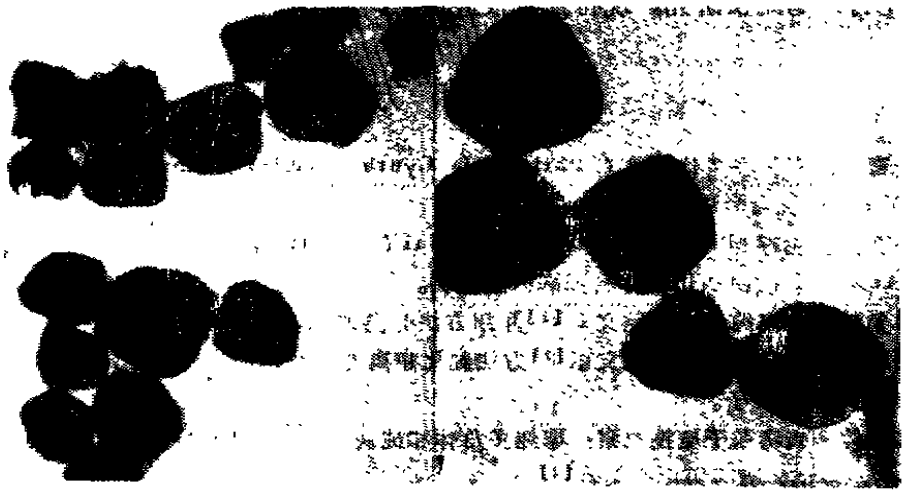
结　　果

一、多角体的形态和大小

在透视电镜下观察ArscsNPV多角体形态多呈三角形、四边形和多边形，其大小约0.7—1.9μm最大的可达2.5μm。ArNPV多角体形态多为四边形和多边形，其大小约1.2—2.0μm，最大的可达2.9μm（图1）。

在扫描电镜下，ArscsNPV多角体为不规则多面体，表面光滑。一个视野中有1/3以上数目的多角体表面可见许多有规则的裂缝和凹陷，这是病毒粒子包埋点。由于某种原因使病毒粒子脱落而形成的（图2a）。而ArNPV多角体其形态与ArscsNPV相似，但未观察到病毒粒子包埋点（图2b）。

维普资讯 http://www.cqvip.com



A. ArscsNPV 8200× B. ArNPV 9300×

图1. ArscsNPV多角体与ArNPV多角体形态

Fig.1 Polyhedrons morphology of Arscs NPV and ArNPV

A. Arscs NPV B. ArNPV

图2. ArscsNPV和ArNPV多角体扫描电镜观察

Fig.2 Electron scanning micrograph of Arscs NPV and ArNPV

以纯 ArscsNPV 多角体悬浮液（含 10^8 个/m）添食蓖麻蚕幼虫和喂马桑叶的蓖麻蚕幼虫以及家蚕幼虫等，7—10 天后引起蓖麻蚕 70—80%死亡率，用马桑叶饲养的蓖麻蚕100%死亡，不引起家蚕幼虫死亡，对照组无死亡。

二、病毒粒子形态和大小

ArscsNPV病毒粒子呈杆状，两头平截，病毒粒子大小约300—310×50nm，同时可见病毒束，每束中核衣壳数目 1—4 个不等，病毒束长约400nm直径约50—70nm。ArNPV病毒粒子形态也呈杆状其大小约300－400×40－60nm（图 3）。

三、多角体的超薄切片观察

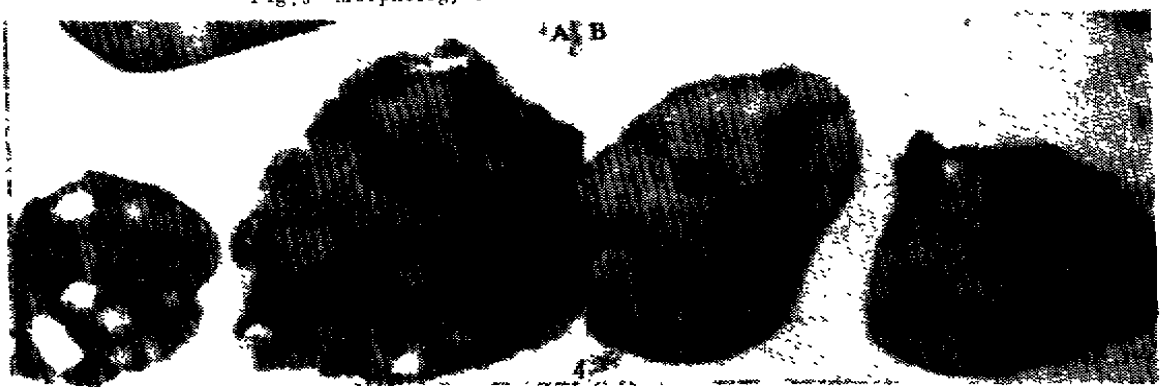
如图所示。ArscsNPV 多角体切片中可看到很多病毒束，每束中核衣壳数目有1—6个。同时也可看到很多空洞，这是病毒粒子包埋点。ArNPV多角体的超薄切片中也可看到病毒束，每束中核衣壳数目有1—9个。在切片中未见有病毒包埋点形成的空洞。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Arscs NPV 60000×　　ArNPV 70000×

图3. Arscs NPV与ArNPV病毒粒子形态

Fig.3 Morphology of virions of ArscsNPV and ArNPV



A.Arscs NPV 26000×　　B.ArNPV 26000×

图4.Arscs NPV和ArNPV多角体的超薄切片观察

Fig 4. The thin section on the polyhedrons of Arscs NPV and ArNPV

四、多角体蛋白和病毒粒子的紫外吸收特性：

提纯的多角体蛋白和病毒粒子具有典型的紫外吸收曲线(图5)。我们发现碱解时间过长的病毒粒子多为核衣壳，其紫外吸收曲线在A260—A280之间有明显的吸收峰(图5)。

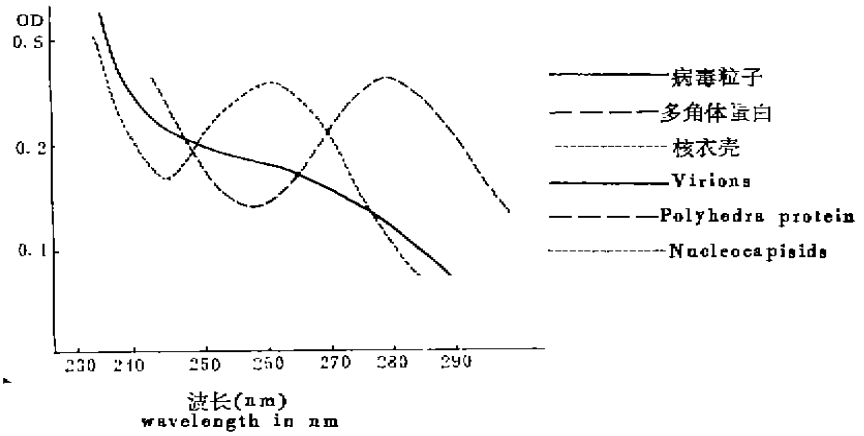


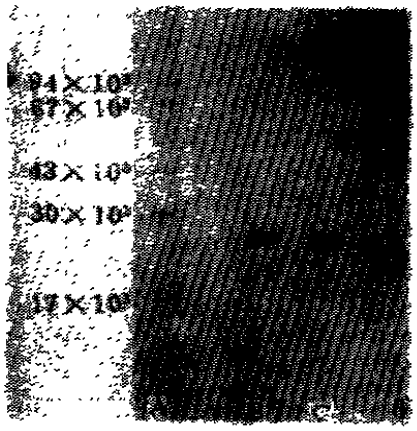
图.5 Arscs NPV病毒粒子、多角体蛋白、核衣壳的紫外吸收曲线

Fig.5 Absorption curve of ArscsNPV virion, polyhedron protein and nucleocapsids

维普资讯 http://www.cqvip.com

五、多角体蛋白及病毒粒子蛋白的SDS-PAGE：

Arscs NPV 和 ArNPV 多角体蛋白经 SDS-PAGE分析后，均呈现一条带，其分子量ArscsNPV为27.5kd，ArNPV为28.0kd（图6）。



A. 标准蛋白
A. Proteins marker
B. ArNPV多角体蛋白
B. polyhedron protein of ArNPV
C. Arscs NPV多角体蛋白
C. polyhedron protein of Arscs NPV

图6 多角体蛋白的SDS—PAGE
Fig.6. SDS—PAGE of polyhedron protein of Arscs NPV and ArNPV

用不连续凝胶系统SDS-PAGE分析后，ArscsNPV和ArNPV病毒粒子结构多肽均含有21条（图7）。两株NPV病毒粒子多肽分子量列于表1。从表1中可以看出 ArscsNPV和ArNPV结构多肽中有11条多肽分子量相同。这说明这两株NPV之间有亲缘关系。但是21条多肽中又有明显的差异，表明它们是不同的病毒株。

表1 ArscsNPV和 ArNPV病毒粒子结构多肽分子量
Tab 1. Molecular weights of virion polypeptides of ArscsNPV and ArNPV

Viruses 病毒 M.W分子量 No.编号	ArscsNPV	ArNPV
1	130	96
2	99.3	95
3	95.0	97
4	90.5	80
5	87.0	78
6	80.0	76
7	72.5	67
8	60.0	64
9	54.0	60
10	52.0	54
11	50.0	52
12	45.0	45
13	40.5	41.9
14	33.0	37
15	30.5	33
16	21.5	24
17	20.5	21.5
18	15.0	17.5
19	14.0	16
20	12.5	14
21	11.0	11

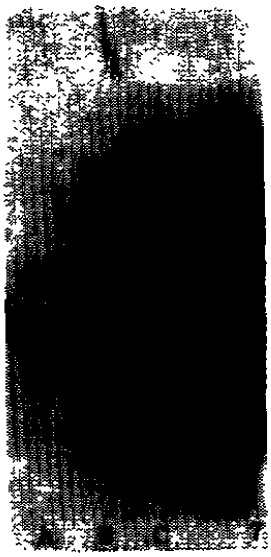


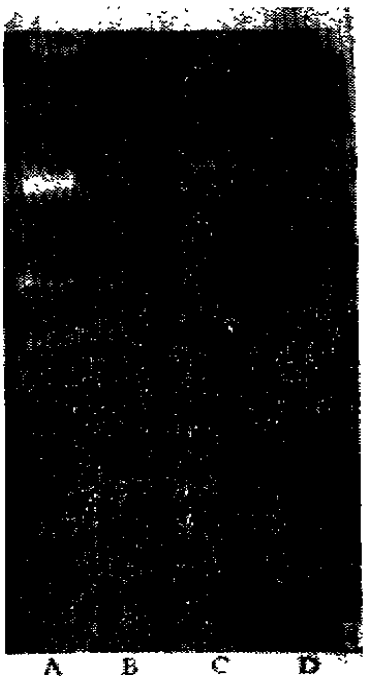
图7 Arscs NPV与ArNPV病毒粒子SDS-PAGE图谱
Fig.7 SDS-PAGE of virions polypeptides of Arscs NPV and ArNPV
A.标准蛋白 A.protein marker
B.ArNPV病毒粒子多肽
B.polypeptides of ArNPV virion
C.Arscs NPV 病毒粒子多肽
C.Polypeptides of Arscs NPA virion

维普资讯 http://www.cqvip.com

六、ArscsNPV与ArNPV核酸的热变性特性：核酸经加热变性后经Ur分光光度计检测，ArscsNPV核酸加热前为A260＝0.259，加热后A260＝0.349，OD值增加了34.7%。ArNPV核酸加热前A260＝0.292，加热后A260＝0.398，OD值增加了36.3%。这表明两株NPV核酸均为双链DNA。

七、核酸酶酶解试验与二苯胺反应：Arscs NPV核酸经RNase和DNase酶解后，电泳证明可被DNase降解而不被RNase降解。ArNPV核酸经RNase和DNase酶解后也证明可被DNase酶解。两株病毒核酸与二苯胺试剂反应后，均呈现兰色的阳性反应，而酵母RNA则呈现阴性反应，此实验也证明Arscs NPV和ArNPV核酸均为双链DNA型。

八、核酸的限制性内切酶酶解分析：结果如图8、9所示。Arscs NPV DNA经EcoRI，BamHI和EcoRI＋BamHI酶解后分别获得5、5、10个片段，而ArNPV DNA则获得8和7个片段（双酶解未做）。以λDNA Hind Ⅲ酶解片段为标准分子量作标准曲线，从曲线上求得Arscs NPV DNA和ArNPV DNA分子量（表2）。从表2中获得Arscs NPV DNA平均分子量为52.4×10^6d ArNPV DNA平均分子量为73.5×10^6d。



A. DNA＋HindIII
B. ArscsNPV DNA＋EcoRI＋BamHI
C. ArscsNPV DNA＋BamHI
D. ArNPV DNA＋BamHI

图8. ArscsNPV DNA和ArNPV DNA的BamHI酶解图谱

Fig.8 Electrophoretogram of BamHI digestion fragments of ArscsNPV DNA and ArNPV DNA

A. λDNA＋HindIII
B. ArscsNPV DNA＋EcoRI
C. ArNPV DNA＋EcoRI

图9. ArscsNPV DNA和ArNPV DNA的EcoRI酶解图谱

Fig.9 Electrophoretogram of EcoRI digestion fragments of Arscs NPV DNA and ArNPV DNA

维普资讯 http://www.cqvip.com

表.2 Arscs NPV DNA和ArNPV DNA的RNE酶切片段分子量

Tab.2 The molecular weight of RNE digestion fragments of Arscs NPV DNA and ArNPV DNA

分子量M.W. 片段Fragments	病毒Viruses					
	Arscs NPV			ArNPV		
	EcoRI	BamHI	EcoR1+ BamHI	EcoR1	BamH1	EcoR1+ BamH1
1	17.9	18.5	7.5	17.9	17.3	—
2	16.0	14.3	7.2	16.0	14.3	—
3	8.6	10.5	6.7	12.4	11.1	—
4	5.7	4.9	6.2	8.6	8.3	—
5	4.3	3.6	5.3	7.4	7.5	—
6			4.9	6.2	6.2	—
7			4.6	5.7	3.6	—
8			4.4	4.3		
9			4.0			
10			3.6			
总和 Total	52.7	51.9	53.9	78.6	68.4	未做 ND

从表2可以看出EcoRI消化Arscs NPV DNA的5条带与ArNPV DNA的8条带中的五个片段分子量相同。BamHI消化的ArscsNPV DNA有两个片段与ArNPV DNA 7个片段中的两个片段分子量相同这表明两株NPV的核酸酶解图谱具有一定程度的相似性，但又有明显差别。

讨 论

ArscsNPV与ArNPV多角体形态在扫描电镜下略有差异，表现出ArscsNPV多角体表面有很多病毒粒子包埋点，这在其他多角体病毒中属少见。我们使用ArscsNPV多角体感染用马桑叶饲养的蓖麻蚕、蓖麻蚕和家蚕幼虫，结果7—10天可引起用马桑叶饲养的蓖麻蚕100%死亡，引起蓖麻蚕70%左右的死亡率，但不引起家蚕幼虫死亡。这说明ArscsNPV与ArNPV之间有一定的亲缘关系。引起蓖麻蚕70%死亡的多角体病毒与Arscs NPV的形态和理化特性是否相同，有待研究。

Arscs NPV与ArNPV病毒粒子结构多肽的SDS-PAGE分析表明：Arscs NPV有11条多肽与ArNPV多肽的分子量相同，但还有10条多肽分子量不相同。说明两株NPV有一定的亲缘关系，又有区别的病毒。Harrap[1]和Summers[11]曾对多种杆状病毒结构多肽进行比较研究，结果表明在亲缘关系密切的病毒种之间，其病毒粒子结构多肽具有相似性，但不同病毒又各有独特的结构多肽成份，因此病毒粒子结构多肽具有种的特异性。

从内切酶酶解分析结果也表明ArscsNPV DNA与ArNPV DNA之间具有一定的相似性。用EcoRI消化的ArNPV DNA八个片段中有五个片段与Arscs NPV DNA的EcoRI酶解的五个片段分子量相同，BamHI酶解的Arscs NPV和ArNPV DNA其中有两个片段

维普资讯 http://www.cqvip.com

分子量相同。因此我们认为Arscs NPV与 Ar NPV 在形态结构与理化特性上有相似性又有明显差异，这可能是不同地区分离株之间的差异；也可能是宿主生理条件发生变化，多角体病毒适应新的宿主生理条件而发生的基因重组（如缺失）所致，是何种原因引起的有待进一步证实。

参 考 文 献

〔1〕 罗经等，1986，《病毒学杂志》1(2)：24。
〔2〕 袁明雄等，1988，《微生物学通报》15(4)：145。
〔3〕 谭业平等编，1990，《昆虫病毒学》P.245。
〔4〕 Laemmli, U.K.1970, *Nature* (London)227：680.
〔5〕 Weber K. et al.1969, *J.Biol.Chem.*244：4406.
〔6〕 李敏棠等，1981，《科学通报》22：1391。
〔7〕 罗经等，1987，《病毒学报》3(1)：62。
〔8〕 张龙翔等编，1981，《生化实验方法和技术》人民教育出版社P.219。
〔9〕 Rubistein R.1976, *Virology*, 69：323.
〔10〕 Harrap K.A.1977, *Virology*, 79：4.
〔11〕 Summer W.D.et al.1979, *J.Virol.*30：328.

Comparative Studies on Two Strains of Nuclear Polyhedrosis Viruses of Philosamia Cynthia ricini (Attacus ricini)

Luo Jing Yan Yingfang Yang Xuelou

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

In this paper the morphological characteristics and biochemical properties of two strains of Attacus ricini nuclear polyhedrosis virus isolated from different sources were described. One strain of Attacus ricini was fed with leaves of Coriatia Sinica for many years (the vernacular name: Coriatia sinica silkworm), and virus was obtained from larvae and pupae. The other strain of Attacus ricini was fed with leaves and virus was obtained from larvae of Attacus ricini. Morphology of polyhedra was slightly different between Arscs NPV and ArNPV. The size of polyhedra of ArscsNPV was 0.7-1.9 μm, and that of ArNPV polyhedra was 1.2—2.0 μm. The virions of Arscs NPV and ArNPV were both rod shaped and with size of 310×50 nm and 350×50 nm, respectively. Arscs NPV and ArNPV were multiply embedded. The surface of polyhedra of Arscs NPV were studied with cavities left over by the virion embedment. The single structural polypeptide was resolved as polyhedrin from Arscs NPV and ArNPV and with molecular weight 27.5kd and 28kd, respectively. Virions of both viruses contain 21 polypeptides. Molecular weight of polypeptides of Arscs NPV were 11-130kd, and ArNPV were 11—96kd, of which, eleven polypeptides of the same with each other. The viral genomes of Arscs NPV and ArNPV were dsDNA, with molecular weight of 52.4×10^6d and 73.5×10^6d, respectively.

Key words: Philosamia Cynthia ricini NPV Morphologic characteristic Virion polypeptide Viral nucleic acid