158—163 6050(9)

维普资讯 http://www.cqvip.com

第8卷第2期 1993年6月 | 中国病毒学 VIROLOGICA SINICA | Vol.8 No.2 Jun. 1993

斜纹刺蛾核型多角体病毒及其核酸的限制性内切酶酶解分析

汤显春 梁世平 孙富林

（中国科学院武汉病毒研究所，武汉，430071）

S476.13

提 要

本文描述了从自然僵死的斜纹刺蛾（Oxyplax orhracea(moore)）幼虫中分离出一种核型多角体病毒。用快速简便方法提取核酸，经限制性内切酶EcoR Ⅰ、Hind Ⅲ酶解，获得该病毒核酸的酶解带谱。以λ DNA的EcoR Ⅰ酸解片段在凝胶中的迁移率与相应DNA片段分子量的对数值做标准曲线求得其平均分子量为102.09×10^6道尔顿，即为147.77kb。

关键词： 斜纹刺蛾核型多角体 形态学 限制性内切酶

斜纹刺蛾广泛地分布于我国华东、湘鄂、台湾、广东、广西、云南和印度、斯里兰卡、印度尼西亚等国家，危害柑桔和茶树等经济作物。在湖北地区一年发生两代。

一九八九年在鄂西北竹溪县林业局的柑桔园内发生自然死亡病虫，采回磨碎过滤，反复差异离心，蔗糖梯度提纯后，用伊红染色，在显微镜下观察，呈多角体状。再经电镜观察，进一步证实，确为核型多角体病毒。为了进一步证明分类鉴定准确性，本文着重对该病毒核酸性质进行研究，结果报告如下。

材料与方法

1. 病毒增殖及多角体病毒样品制备

斜纹刺蛾核型多角体病毒（*Oxyplax ochracea* moore Nuclear polyhedrosis virus，简称OoNPV）提纯后，挑选3—4龄健康幼虫感染病毒。获得典型病毒致死虫体，用研钵磨碎，四层纱布过滤，以500—3500r/m反复差异离心，再以45—65%蔗糖梯度离心获得纯净多角体，存4℃冰箱备用。取少许多角体稀释液悬滴于喷碳的福尔膜铜网上，自然干燥，置于JEM—100c透射电子显微镜下观察。另取少许喷碳铜网上，戊二醛固定，乙醇梯度脱水，醋酸异戊酯置换，二氧化碳临界点干燥，置SBC-2真空蒸发仪中进行旋转喷涂，用kyky Amray-1000B扫描电子显微镜进行观察。

2. 病毒粒子的提纯

取纯净OoNPV悬液加0.05mol/L $NaCO_3$—0.05mol/L NaCl（pH=10.8）1∶5，在28—30℃水浴中降解7—8 min后，悬液由浊变清，直至微微发蓝。然后用1N的HCl中和悬液调至pH

本文于1992年6月20日收到，10月16日修回。

维普资讯 http://www.cqvip.com

7.0左右，12000r/m离心10min，弃沉淀，取上清悬液滴于喷碳的福尔膜铜网上，磷钨酸负染色于JEM-100C透射电镜下观察。

3. 多角体病毒的超薄切片

取纯净OoNPV悬液，离心沉淀，用戊二醛和锇酸双固定，常规方法脱水，醋酸铀70%酒精溶液块染，苯二甲酸二丙烯酯包埋，切片后用醋酸铀染片，置电镜下观察，大部分多角体内涵物隐约可见。因此，再次采用单片熏蒸法熏片，将载片铜网倒置于盛有少许锇酸青霉素小瓶瓶口熏蒸1h左右，然后用醋酸铅重新染色，再置于JEM-100C透射电子显微镜下观察。

4. 病毒核酸的提取

取500mgOoNPV加入2.5ml双蒸水，再加入4.5ml 0.05mol/L NaCl-0.01$NaCO_3$ pH10碱液，30℃水浴消化25—30min，使大部分多角体病毒彻底降解，悬液由混浊变半透明。加入10% SDS，终浓度为2%，再加等体积的水饱和酚，反复抽提至界面无蛋白质为止，用乙醚去酚数次，真空抽去乙醚。然后加入2.5倍无水冷乙醇沉淀核酸，加入乙醇后即可见丝状核酸出现，速用玻璃棒搅起核酸，再于70%乙醇中漂洗两次，玻棒搅起丝状物即核酸存放0.1×SSC溶液中。取少量核酸测纯度和含量，其余存冰箱备用。

5. 二苯胺显色法测定核酸含量[1]

准确称取干燥成粉沫状的OoNPV 100mg，加1ml无菌双蒸水充分溶解，再以1ml 1N的高氯酸（$HClO_4$），使高氯酸浓度为0.5N，70℃水浴30min充分搅动，20000g即14000r/m离心30min，去沉淀，收集上清液，沉淀物再悬浮于2ml0.5N高氯酸中重复处理2次，将3次抽提液合并，用二苯胺显色法测定核酸含量

DNA标准曲线的绘制：取4.5mg小牛胸腺DNA溶于0.01NNaOH溶液中，补双蒸水至10ml，定量吸取该DNA溶液与等体积1N高氯酸液混匀。70℃水浴30min，10支试管分5组，1组中加2ml水做对照，4组分别加0.4，0.8，1.5，2.0ml标准DNA溶液的高氯酸液，往各管中加二苯胺剂4ml混匀后60℃水浴1h，冷却后在岛津uv-300型紫外可见分光光度计测波长为595nm的吸收值。以测定系统中DNA实际浓度为横坐标，A595nm为纵坐标，绘制标准曲线。

OoNPV-DNA含量的测定：取无菌试管2支，分别装入上述样品抽提液1ml，加1ml无菌双蒸水，与标准曲线DNA同时测定A595nm值，从标准曲线中求得OoNPV-DNA浓度，按下式计算：

$$\text{DNA}(\mu g)/1mg\ \text{PIB}=\frac{C\times B\times V}{A\times W}$$

PIB＝多角体

C＝测定系统中DNA浓度（μg/ml）

B＝测定液体积（ml）

V＝样品水解抽提液总体积（ml）

A＝加入测定液中的抽提液体积（ml）

W＝称取多角体量（mg）

6. 琼脂糖凝胶电泳

限制性内切酶EcoR Ⅰ和标准λDNA购于华美生物公司，Hind Ⅲ德国进口。琼脂糖凝胶浓度为0.9%；电泳缓冲液为1×TBE（0.09mol/L Tris，0.09mol/L硼酸，0.0024mol/L EDTA，pH＝7.8），样本液为40%蔗糖，10%丙三醇，0.01溴酚蓝。电泳时电压为100V，18h后取出胶板在浓度为0.5μg/ml的EB液中染色40min，然后水洗数次去掉外部EB，在紫外检测分析仪下观察拍照，根据电泳带谱计算DNA各片段分子量[2]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

结 果

多角体及病毒粒子的形态

在电镜下多角体呈六角形二十面体，表面粗糙，有纹路，大小不均匀，最大的可达2.20μm，最小的仅0.67μm。平均大小均为1.19μm（图版Ⅱ 1）。经碱液处理的多角体释放出大量的杆状病毒粒子，粒子两端钝圆，一头略粗，大小均为90×358nm（图版Ⅴ 2）。

超薄切片多角体蛋白晶格清晰，呈方格型花纹，晶格间距为6.25nm，中间包被着病毒粒子，纹横截面均可清晰地看到核衣壳和病毒束，确证为单粒包埋核型多角体，用单片熏蒸法处理后的超薄切片，图象反差增加，细微结构清晰（图版Ⅴ 3，4）。

核酸的纯度和酶解带谱及分子量

提取的核酸经紫外分光光度计检测呈现典型的DNA吸收峰（图5），其A260/280为1.88，证明核酸纯度较高。

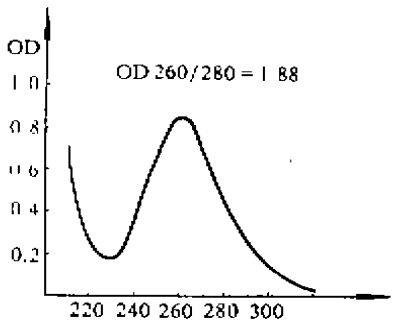

图 5 OoNPV-DNA 紫外吸收扫描图

Fig. 5 Ultraviolet absorbance curve of OoNPV-DNA

图 6 OoNPV-DNA 核酸带

Fig. 6 The band of OoNPV-DNA undigested by restriction endonuclease

取核酸DNA 20μl，不经酶解，加入5μl甘油—溴酚蓝液，以1%琼脂糖凝胶电泳得到单一带谱（图6），证明该核酸DNA不含宿主核酸。

OoNPV-DNA在同一条件下经限制性内切酶酶解HindⅢ得到8条带谱，EcoRⅠ得到15条带谱（图7）。以EcoRⅠ酶解λDNA，各片段在凝胶电泳中的迁移距离与相应

维普资讯 http://www.cqvip.com

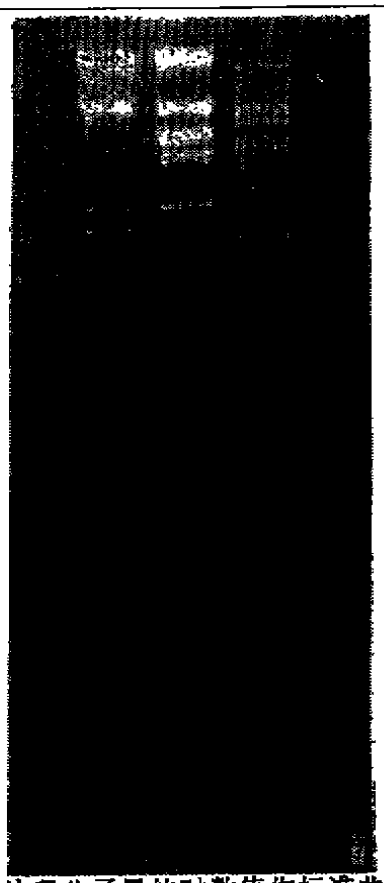

图 7　OoNPV-DNA 各酶解电泳带图谱

Fig. 7　The map of OoNPV-DNA digested by several restriction endonuclease

A　HindⅣ+OoNPV-DNA

B　EcoR I +λDNA

C　EcoR I +OoNPV-DNA

各片段分子量的对数值作标准曲线（图 8），从标准曲线上查出该核酸各片段分子量，各酶解片段分子量总和，求得 OoNPV-DNA 平均分子量为 102.09×10^6 道尔顿，即 147.77kb。

二苯胺显色法测定 OoNPV-DNA 含量结果为7.07μg/mg PIB。其标准曲线回归方程为

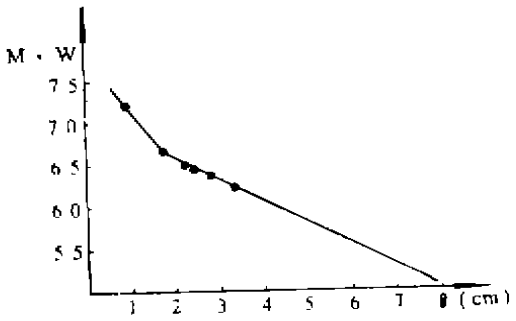

图 8　EcoRI-DNA迁移距离与分子量的关系曲线

Fig. 8　The standard curve of molecular weight and mobility of DNA in agarose

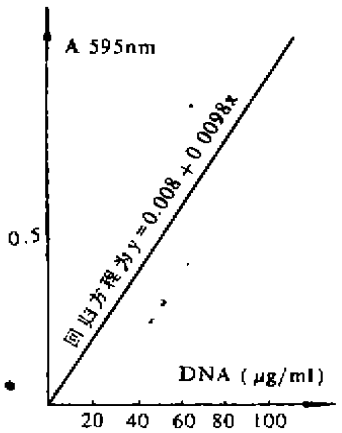

图 9　二苯胺法测定OoNPV-DNA含量的标准曲线

Fig. 9　Standard curve of OoNPV-DNA content determined by diphenylamine method

维普资讯 http://www.cqvip.com

$$y = 0.008 + 0.0098x$$ （图 9）

表 1 OoNPV-DNA 各酶解片段的分子量

Tab. 1 Molecular weight of each OoNPV-DNA fragmants

片 段	OoNPV-DNA+HindⅢ		OoNPV-DNA+EcoRⅠ	
	$\times 10^6$	Kb	$\times 10^6$	Kb
1	26.49	38.39	20.95	30.36
2	23.90	34.63	18.30	26.52
3	18.60	29.95	14.20	20.57
4	14.59	21.14	9.00	13.04
5	10.44	15.13	7.40	10.72
6	8.97	12.99	6.10	8.84
7	3.20	4.37	4.43	6.42
8	1.70	2.46	3.90	5.66
9			3.19	4.62
10			2.19	3.17
11			2.13	3.08
12			1.90	2.75
13			1.60	2.31
14			0.59	0.85
15			0.40	0.57
总 计	107.89	156.06	99.28	139.47

讨 论

斜纹刺蛾多角体病毒是国内首次分离的又一株核型多角体病毒，国外未见报道。从感染症状，病毒侵染部位，多角体在细胞核中形成：多角体经伊红染色，在显微镜下为粉红色，呈六角形，方圆形等，大小不一。负染后，置电镜观察，多角体表面粗糙，大小不整齐。降解后的病毒粒子呈杆状等一系列结果，参照国际病毒分类和命名系统，该病毒属杆状病毒属（Baculovirus）A 亚群中的一员，定名为斜纹刺蛾核型多角体病毒简称 OoNPV。

用二苯胺试剂反应为阳性，证明 OoNPV 核酸遗传物质为 DNA。测得OoNPV-DNA 含量为7.07μg/mg PIB。

提纯的 OoNPV-DNA 用1%琼脂糖凝胶电泳法检查结果为整齐一条带，重复数次均一致，证明提取 DNA 较纯。

将提纯的 OoNPV-DNA 用 EcoRⅠ和 HindⅢ两种限制性内切酶酶解片段分子量积加后，平均分子量为102.09×10^6道尔顿，即 147.77kb。

以上各实验结果均符合一般核酸特性，证明对该病毒命名是正确的。该病毒的分离为我国的病毒资源和病毒杀虫剂的制备，增加了一株新毒源。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

〔1〕 北京大学生物系遗传学教研室，1983，遗传学实验方法与技术，高等教育出版社，P68—70。
〔2〕 Puhler, A. 1984, Advanced Molecular Genetics, Berlin: Springer-Verlag Press. p290.

A Study on the NPV of Oxyplax ochracea and Analysis of Its DNA Map with Restriction Endonucleases

Tang Xianchun　Liang Shiping　Sun Fulin

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

The morphology of *Oxyplax ochracea* (Moore) Nuclear Polyhedrosis Virus (OoNPV) isolated from naturally infected larvae is described in this paper. The endonuclease digestion map of OoNPV-DNA is obtained by restriction endonucleases EcoRI and HindⅢ digesting, The average molecular weight of OoNPV is 102.09×10^6d, i.e. 147.77kb.

Key words: *Oxyplax ochracea*; Nuclear Polyhedrosis Virus Morphology　Restriction endonucleases map