维普资讯 http://www.cqvip.com

67—74 9126(11)

第10卷 第1期 中国病毒学 Vol. 10 No. 1
1995年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 1995

木毒蛾质型多角体病毒形态结构及理化特性的研究

田华松 张立人 陈棣华
(中国科学院武汉病毒研究所,武汉 430071)
陈尧顺
(福建省宁德地区林业局,宁德 351200)

S476.13
S482.7

A

提要 木毒蛾质型多角体病毒呈不规则多面体,大小差异较大,大多数在0.8~2.1μm之间;病毒粒子在多角体内随机分布,病毒粒子为正二十面体结构,有12个顶体,每个顶体上均有一个球状结构,平均直径约为60nm。经SDS-PAGE分析,多角体蛋白由一条分子量为31kD的主带及3条次带组成;病毒粒子结构蛋白由6条多肽组成,分子量在12.6~33kD之间。多角体蛋白富含天冬氨酸,谷氨酸及酪氨酸,而半胱氨酸和甲硫氨酸含量较少,其碱性氨基酸与酸性氨基酸之比为1.43。病毒核酸对RNase和DNase的稳定性试验及对甲醛的稳定性试验和吖啶橙染色试验,证明该核酸为双链RNA。其解链温度为87℃,由10个基因片段组成,分子量在2.46×10^6~0.35×10^6道尔顿之间,总分子量为14.42×10^6道尔顿,电镜分析研究显示该核酸长度在0.5μm、1.0μm和1.3μm处各有一个分布峰。

关键词 木毒蛾,质型多角体病毒,形态结构,理化特性

木毒蛾(*Lymantria xylina* Swinhoe)属鳞翅目,毒蛾科,是木麻黄(*Casuarina sp.*)的重要害虫之一。该虫严重危害福建等省沿海几十万亩木麻黄防护林,造成重大的经济损失。

木毒蛾质型多角体病毒(*Lymantria xylina* cytoplasmic polyhedrosis virus,简称LxCPV)可以感染木毒蛾幼虫使其发病致死,此病毒于1983年在福建省平潭县木麻黄林内自然发病死亡的木毒蛾幼虫进行调查时发现,属国内外首次报道[1]。人工感染试验证实LxCPV具有较强的感染力,因此,该病毒是一种有应用前景的病毒杀虫剂。

本文对木毒蛾CPV的形态结构和理化特征进行了研究,为CPV杀虫剂的研制及其在分类学上的地位提供了科学依据。

材料与方法

1 材料和试剂 木毒蛾CPV(简称LxCPV)由福建宁德地区林业局提供;家蚕CPV(简称BmCPV)由本实验室感染提供;RNase和DNase均购于华美生物技术公司;标准蛋白系中科院上海生化所东风生化试剂厂产品。

2 多角体的纯化 多角体纯化参照陈棣华等的方法[2]。

3 多角体蛋白的分离纯化 取多角体10mg(湿重)置70℃水浴中保温2小时。离心取沉淀,加1ml 0.2 mol/L Na_2CO_3-$NaHCO_3$(pH10.8)碱液[3],室温下碱解5分钟,然后用1N HCl调pH值至8左右,8000r/min离心5分

本文于1994年1月14日收到,2月30日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

钟，将上清液经100000g离心1.5小时，取上清液用1N HCl调pH值至6.0左右，置冰箱20分钟，低速离心得多角体蛋白沉淀，用蒸馏水洗涤沉淀两次，然后用pH7.6 0.1mol/L磷酸盐缓冲液溶解。

4 病毒粒子的分离纯化 LxCPV粒子的提纯参照Rayne C C[4]所报道的方法。

5 多角体和病毒粒子的电镜制样及观察 多角体扫描电镜制样按常规方法进行，于AMRAY-1000B型扫描电镜下观察，病毒粒子透射电镜制样亦按常规方法进行，于JEM-100C型电镜下观察。

6 多角体超薄切片的制备及电镜观察 多角体按常规方法固定，脱水、包埋、LKB-2128型超薄切片机切片，铀、铅溶液双染色，然后在电镜下观察。

7 多角体蛋白和病毒粒子结构蛋白的SDS-PAGE电泳分析及其分子量测定 12%SDS-PAGE参照Summer[5]的方法。标准蛋白分子量分别为磷酸化酶B(94000)，牛血清白蛋白(67000)，肌动蛋白(43000)，磷酸酐酶(30000)，烟草花叶病毒外壳蛋白(17500)。多角体蛋白用铬银染色，病毒粒子结构蛋白用考马斯亮蓝R-250染色。

8 多角体蛋白氨基酸组成分析 取纯净多角体100mg，于6N HCl中45℃水解4小时，样品在Waters PICO.TAG氨基酸自动分析系统上分析。

9 LxCPV-RNA的提取 用SDS-热酚法抽提，基本上参照徐左宁[6]所报道的方法。

10 LxCPV RNA与甲醛反应 参照吕鸿声[7]描述的方法进行。

11 LxCPV RNA解链温度(Tm值)的测定 取80μg LxCPV-RNA溶于3ml 0.01×SSC缓冲液中，以1℃/分的速率升温，在Shimadze-UV-300型分光光度计中连续测定LxCPVRNA在升温过程中的OD_{260}值，绘制其热变性曲线。

12 LxCPV-RNA吖啶橙染色 将电泳后的凝胶板置于0.01%吖啶橙溶液中染色20分钟，用蒸馏水洗涤三次，于紫外灯下观察[2]。

13 LxCPV-RNA的凝胶电泳 3.5%的PAGE按Maniatis等[8]所报道的方法进行。

14 LxCPV-RNA的酶处理 基本上按文献[2,8]所报道的方法进行。

15 LxCPV的电镜分析 采用甲酰胺法进行LxCPV RNA展层，用无水乙醇脱水染色，旋转(角度8～10℃)喷镀钯铱合金，然后在HITACHI H-7000FA型电镜下观察。

结 果

1 木毒蛾质型多角体和病毒粒子的形态结构

1.1 多角体 木毒蛾质型多角体经扫描电镜观察，多角体为不规则的多面体，大小差异较大，平均直均为1.5μm，大多数在0.8～2.1μm之间(见图1)。

1.2 病毒粒子 病毒粒子为典型的正二十面体结构，大小较一致，平均直径为60nm，具有二层致密的正二十面体外壳蛋白，病毒粒子表面有十二个管状突起，即顶体(见图2)。图中完整的病毒粒子六个突起清晰可见，在每个管状突起顶端，可见一个球形结构。

1.3 多角体超薄切片 从多角体超薄切片中可观察到，病毒粒子在多角体内是随机分布的，病毒粒子之间保持一定距离。

2 木毒蛾质型多角体蛋白和病毒粒子结构多肽的物化性质

2.1 多角体蛋白和病毒粒子结构蛋白的组分

LxCPV多角体蛋白经SDS-PAGE可分离出四种多肽组分，主要的多肽组分为P_3，分子量为31000道尔顿(见图3，表1)。

LxCPV粒子经SDS-PAGE分析，可分离出六种多肽组分，分子量在12.6～33kD之间(见图4，表1)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

图1　LxCPV的扫描电镜(×7300)

Fig. 1　Scanning electron micrograph of LxCPV(×7300)

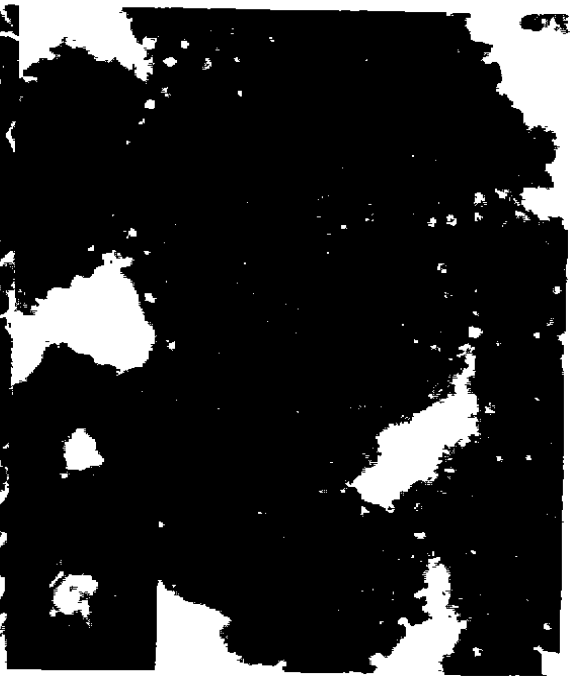

图2　LxCPV的电镜图像(×44000×220000 1%PTA)

Fig. 2　Electron micrograph of LxCPV (×44000×220000 1%PTA)

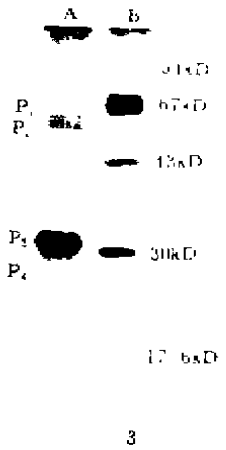

图3　LxCPV多角体蛋白的SDS-PAGE

A. 多角体蛋白　B. 分子量标准

Fig. 3　SDS-PAGE of the polypeptipes of LxCPV polyhedral proteins　A. LxCPV;　B. Makers

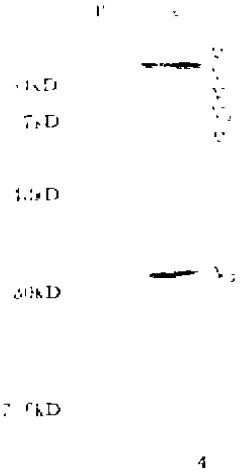

图4　LxCPV病毒粒子的SDS-PAGE

A. 病毒粒子　B. 分子量标准

Fig. 4　SDS-PAGE of the polypeptipes of LxCPV virions.

A. LxCPV;　B. Markers

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 多角体蛋白及病毒粒子结构多肽的分子量

Tab. 1 Molecular weights of the structural polypeptides and polyhedral proteins of LxCPV

多角体蛋白 Polyhedral proteins		病毒粒子结构多肽 Structural polypeptides of virions	
组分 Component	分子量 M. W.	组分 Component	分子量 M. W.
P1	64000	V1	126000
P2	61000	V2	116000
P3	31000	V3	84000
P4	26000	V4	78000
		V5	62000
		V6	33000

2.2 多角体蛋白的氨基酸组成分析 经氨基酸分析仪分析，所得LxCPV多角体氨基酸各组分的百分含量如表2所示。结果表明多角体蛋白富含天冬氨酸、谷氨酸，而甲硫氨酸和半胱氨酸含量较少。其碱性氨基酸与酸性氨基酸含量比值为1.43。

表2 LxCPV氨基酸组成分析

Tab. 2 Amino acid composition of LxCPV

氨基酸 Amino acid	百分比 Percent(g/100g)	摩尔数比 Molar ratio	摩尔数百分比 Molar percent
ASP *	13.76	104.24	15.63
GLU *	10.66	73.01	10.94
SER	4.12	39.24	5.88
GLY	4.12	54.93	8.23
HIS	4.15	26.60	3.99
ARG	7.12	40.69	6.10
THR	1.38	11.60	1.74
ALA	3.91	43.93	6.54
PRO	2.80	24.56	3.68
TYR	9.87	48.83	7.25
VAL	7.19	61.45	9.21
MET	0.14	0.88	0.13
CYS	0.09	0.74	0.11
ILE	4.17	31.83	4.77
LEU	5.61	42.82	6.42
PHE	3.71	22.48	3.37
LYS	5.84	39.73	5.96
总计 Total	88.64	667.11	100

3 木毒蛾CPV基因组的理化特性

3.1 LxCPV基因组为分段的RNA基因组 将提纯的LxCPV核酸以BmCPV-RNA为对照，用3.5%PAGE，结果表明：LxCPV核酸与BmCPV-RNA带型类似，为十条带基因组(见图5)，将纯化的LxCPV核酸分别经RNase和DNase处理，电泳结果表明，该核酸经RNase处理后，凝胶中无带出现，经DNase处理后，凝胶中仍有十条带出现(见图6)。因此，可以确认LxCPV核酸为分段的RNA基因组组成。

维普资讯 http://www.cqvip.com

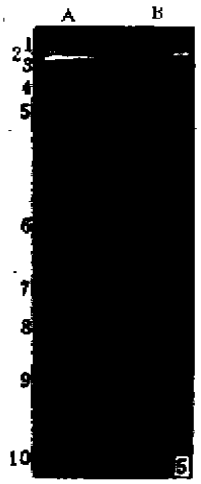

图5　LxCPV-RNA的凝胶电泳
A. LxCPV-RNA；B. BmCPV-RNA
Fig. 5　Polyacrylamide gel electrophoresis of LxCPV-RNA
A. LxCPV RNA，B. BmCPV RNA

图6　LxCPV-RNA的RNase和DNase处理 A. LxCPV-RNA＋RNase；B. LxCPV-RNA；C. LxCPV-RNA＋DNase
Fig. 6　PAGE of LxCPV RNA and controls with RNase and DNase. Note: A. LxCPV RNA treated with RNase, B. LxCPV RNA, C. LxCPV RNA treated with DNase.

3.2　LxCPV-RNA基因组的片段数目与分子量的测定　从图5中可以看出，LxCPV-RNA基因组可分为10个片段，这些片段可区分为大、中、小三个区域，与BmCPV-RNA的带型类似，这是呼肠孤病毒科基因组的特征之一。以BmCPV-RNA的分子量为参照，测得LxCPV-RNA基因组片段分子量大小在2.46×10^6～0.35×10^6道尔顿之间，总分子量为14.42×10^6道尔顿(见表3)。

表3　LxCPV基因组分子量
Tab. 3　Molecular weights of the RNA segments of　LxCPV

RNA片段 RNA segments	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	总计 Total
分子量 MW($\times10^6$)	2.46	2.35	2.25	2.09	1.80	1.09	0.83	0.63	0.56	0.35	14.42

3.3　LxCPV-RNA为双链结构

LxCPV-RNA与1.8%甲醛作用24小时后，紫外吸光度几乎没有增加，最大吸收波长亦未移动(见图7)因此LxCPV-RNA为双链结构。因为只有双链结构RNA分子内自由氨基基因被碱基配对所占据，才不能与甲醛起作用而产生增色效应。LxCPV-RNA经3.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳后，吖啶橙染色，在紫外光下观察其带呈绿色荧光，与对照的BmCPV-RNA相同，而烟草花叶病毒(TMV)RNA为红色荧光，这也证明LxCPV RNA为双链结构。

LxCPV-RNA溶于0.01×SSC溶液中，在紫外分光光度计中以1℃/分的速率连续升温，随

维普资讯 http://www.cqvip.com

着温度上升，其 OD_{260} 值在 65℃ 左右开始不断增加，呈现明显的增色效应。用 OD_{260} 值对温度作图(见图 8)，从热变性曲线上求得 LxCPV-RNA 的解链温度为 Tm＝87℃，这一结果进一步证实 LxCPV-RNA 为双链结构。

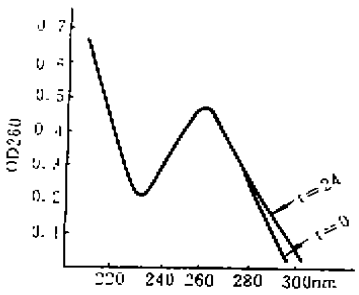

图 7 LxCPV-RNA 对甲醛的稳定性实验

Fig. 7 The stability test of LxCPV RNA to formaldehyde

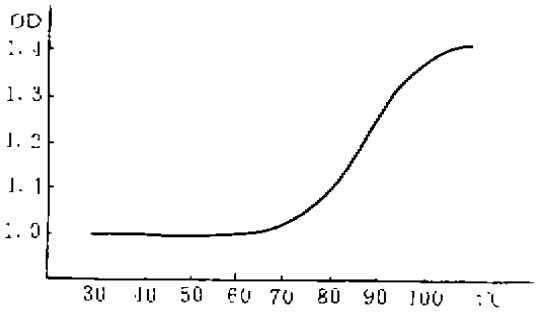

图 8 LxCPV-RNA 的热变性曲线

Fig. 8 Thermal denaturation profile in 0.01×SSC of LxCPV RNA

3.4 LxCPV-RNA 的电镜分析 按甲酰胺法进行核酸展层制样，在电镜下观察到 LxCPV-RNA 是长短不一的线状片段(见图 9)，根据核酸的长短，可计算出 LxCPV-RNA 的长度分布在 0.5μm、1.0μm、1.3μm 处各有一个分布峰(见图 10)，这一结果与电泳结果出现大、中、小三个区域相符合。

图 9 LxCPV-RNA 的电镜照片(×40000)

Fig. 9 Electron micrograph of LxCPV RNA(×40000)

维普资讯 http://www.cqvip.com

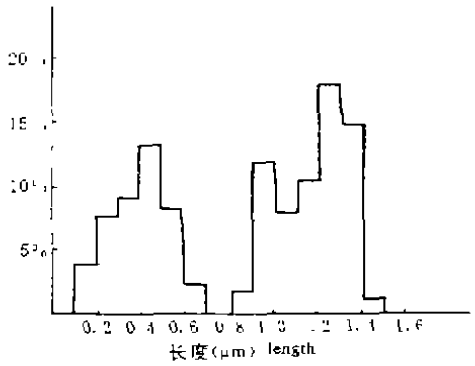

图10　LxCPV-RNA片段长度分布图(测量465条RNA片段)

Fig. 10　Length distribution of LxCPV RNA filaments observed in electron micrographs (465 filaments were measured)

讨　论

本文对木毒蛾质型多角体病毒的形态结构及理化特性进行了研究，证明LxCPV为双链的分段RNA基因组病毒，属呼肠孤病毒科质型多角体病毒群。

LxCPV RNA基因组带型与BmCPV RNA类似，都是十条带，而且第二条带和第三条带分子量非常接近。按照分子量大小都可以分为三个区域：第一、二、三条带可分为一个区，第四、五条带可分为一个区，其余的五条带可分为一个区，而且LxCPV RNA基因组电泳带型与电镜分析一致。根据Payne和Rivers[9]按质型多角体RNA-PAGE带型分类，LxCPV和BmCPV为同一类型，都同属于第一型(type I)。

LxCPV粒子的电镜分析表明，该病毒粒子大小均一，为正二十面体结构，具有二层致密的正二十面体衣壳，并以十二个管状结构连接内外两壳的相应亚基，外壳的亚基均有一个由管状结构组成的突起，每个突起上还有一个球状结构，这一结构与前人研究报道的有关家蚕CPV粒子的超微结构类似[10]。据推测，这些突起，尤其是其末端球状结构的功能可能是识别、吸附昆虫中肠细胞并释放CPV的遗传物质RNA，注射入宿主细胞而引起宿主感染。

木毒蛾质型多角体蛋白和病毒粒子结构多肽SDS-PAGE分析表明，LxCPB蛋白及其病毒粒子结构多肽与BmCPV[3]差异较大，LxCPB蛋白为四条结构多肽，而BmCPV为五条。LxCPV粒子结构多肽为六条，而BmCPV为五条。根据多角体蛋白的氨基酸组成分析，LxCPB蛋白氨基酸含量与Kawase[11]报道的有关BmCPB蛋白氨基酸含量有相似之处，它们都富含天冬氨酸和谷氨酸，而甲硫氨酸和半胱氨酸含量较少。但是它们的碱性氨基酸与酸性氨基酸含量比值存在差异。

纵观上述，LxCPV的发现，对于质型多角体病毒群的研究有着重要的参考意义。同时，对沿海海防林——木麻黄的防护将提供必要的理论依据。

致谢　张建红同志参加部分工作，特致谢意。

参 考 文 献

1　陈尧顺. 木毒蛾质型多角体病毒的研究. 福建林学院学报，1987，7(1)：17—20

2　陈建华，栗陶生，张立人. 松茸毒蛾质型多角体病毒的生物化学特性. 病毒学报，1989，5(4)：370—377

3　Payne C C, Kalmakoff. Biochemical properties of polyhedra and virus particles of the cytoplasmic polyhedrosis virus of *Bombyx*

维普资讯 http://www.cqvip.com

nali. J Intervirology, 1974;4:354—364

4 Payne C C, Biochemical and Serological studies of a cytoplasmic polyhedrosis virus from Aretia caja: a naturally-occurring mixture of two virus types. J Gen Virol 1976; 30:357—369

5 Summers M D, Smith G E. Baculovirus structural polypeptides. Virol. 1978;84:390—402

6 徐左宇、苏德明. 棉铃虫质型多角体病毒的某些生物物理和生物化学特性. 病毒学报, 1986;2(4):335—343

7 吕鸿声, 昆虫病毒与昆虫病毒病. 科学出版社, 1982:133

8 Maniatis T Fritsh E F, Sambrood J. Molecular cloing—a laboratory mannal, Cold Spring Harber Laboratory Press, 1987: 156

9 Payne C C River C F. A provisional classfication of cytoplasmic polyhedrosis viruses based on the size of the RNA genome segments. J Gen Virol, 1976;33:71—85

10 张立人主编. 中国昆虫病毒电子显微镜图谱. 科学出版社, 1988:26—28

11 Kawase S. The amino-acid composition of Virusees and their polyhedron proteins of the polyhedroses of the silkworm, *Bombyx mori*(Linnaeus) J Insect Pathol, 1964;6:156—164

The Fine Structure and Some Biophysical and Biochemical Characteristics of a Cytoplasmic Polyhedrosis Virus from *Lymantria xylina* Swinhoe

Tian Huasong* Zhang Liren* Chen Dihua* Chen Yaoshun**

*(*Wuhan Istitute of Virology, Academia Sinica, Wuhan* 430071)

**(*Ninde Forestry Bureau, Fujian* 352100)

The *Lymantria xylina* Swinhoe cytoplasmic polyhedra shows a quite difference ranging from 0.8 to 2.1μm in diameter. The virions were randomly distributed in a polyhedron. The virions show icosahedron, and about 60 nm in diameter with 12 spikes. By the analysis of SDS-PAGE, the polyhedral proteins contain one major band (31000 Dalton) and three minor bands. The virion has 6 polypeptides ranging from 12600 to 33000 Daltons. The protein from LxCPV is rich in aspartic acid, glutamic acid and tyrosine, but poorer in cystein and methionine. The ratio of basic amino to acidic amino is 1.43. By the stability test of the LxCPV RNA to RNase, DNase and formaldehyde, the staining reaction of acridine orange, the RNA is demontrated as double-strand RNA(dsRNA) with a Tm of 87℃. The RNA genome consists of ten molecular mass from 2.46 to 0.35 MD. and with a totol estimated molecular mass of 14.42 MD. Three distributive peaks of LxCPV RNA segments contour length are found at 0.5μm, 1.0μm and 1.3μm respectively by electron microscopic analysis.

Key words *Lymantria xylina* Swinhoe, Cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV), Fine structure, Biophysical and biochemical characteristics