

148-154

15249(10)

## 木毒蛾核型多角体病毒形态结构及理化性质的研究

彭贵洪 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 352100)

Q965.8

**A** **摘要** 木毒蛾核型多角体病毒属昆虫杆状病毒科,核型多角体病毒属,多粒包埋型。在扫描电镜下,多角体呈不规则多面体,大小不一,平均直径为 1.40 $\mu$ m,病毒粒子杆状,大小约为 394 $\times$ 56nm,经 SDS-PAGE 分析,病毒多角体蛋白分子量为 30.5kD,病毒粒子结构蛋白由 19 条多肽组成,分子量范围在 88-17kD 之间。多角体富含 Glu、Val、Leu,而 Cys、Met、和 His 含量较少。其酸碱氨基酸之比为 1.26。病毒核酸为一环状 DNA,长度约为 38 $\mu$ m,经 Hind III、Pst I、EcoR I 和 Bgl I 单酶切以及 BamH I + Hind III、BamH I + Pst I、BamH I + Bgl I 和 XhoI + EcoR I 双酶切分析,DNA 总分子量约为 71.6 $\times$ 10<sup>6</sup>Daltons。

**关键词** 木毒蛾,核型多角体病毒,形态结构,生化特性

昆虫病毒

木毒蛾 (*Lymantria xyliana* Swinhoe) 属鳞翅目毒蛾科 (Lymantriidae), 是福建、广东等沿海木麻黄防护林的一种重要害虫。福建省林学院等单位从自然死亡的虫尸中, 分离出一种病毒, 经鉴定为木毒蛾核型多角体病毒 (*Lymantria xyliana* Swinhoe Nuclear Polyhedrosis Virus, 以下简称 LxNPV)<sup>[1]</sup>。人工感染试验表明该病毒具有较强的感染力。迄今为止, 有关该病毒的基本特性、血清学试验、精细结构及生化特性等尚未见报道。本文应用电子显微镜技术及生物化学方法, 对 LxNPV 的形态结构及某些生化特性进行了研究, 现将结果报道如下:

### 材料和方法

- 1 LxNPV 多角体的来源和提纯** LxNPV 感染致死亡的虫尸由福建宁德地区林业局提供。将虫尸匀浆, 差速及蔗糖梯度离心, 收集纯净多角体备用。
- 2 病毒粒子和多角体蛋白的制备** 取多角体悬液 (20mg/ml) 加等体积碱解液 (0.1mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-0.17mol/L NaCl-0.01mol/L EDTA pH10.8) 于室温下降解数分钟, 然后用 0.2mol/L HCl 调至 pH8.5 左右, 置于 20-60% (W/W) 蔗糖梯度上, 60000g 4 $^{\circ}$ C 离心 1.5 小时, 取上清 2/3 部分和病毒粒子带。用 1mol/L HCl 调上清液至 pH5.6 左右, 即得白色沉淀, 此为多角体蛋白。病毒粒子带经 50000g 1 小时脱糖后即得到病毒粒子。经紫外分光光度计检测其纯度。
- 3 电镜样品的制备及观察**
  - 3.1 病毒粒子和多角体的透射电镜及扫描电镜按常规方法进行。** 在 Hitachi H-7000FA 型透镜和 AMRa-1000B

扫描电镜下观察。

3.2 超薄切片的制备及观察 多角体悬液与2%琼脂混匀,凝固后按常规方法进行固定、脱水、浸透、包埋、聚合,样品在LKB-2128型超薄切片机上切制。经醋酸铀和柠檬酸铅溶液双染色后在电镜下观察。

3.3 病毒核酸展层 采用一步释放法,细胞色素C展层,在电镜下观察。

4 SDS-PAGE分析 多角体蛋白和病毒粒子结构多肽的组份和分子量测定按Summers<sup>[2]</sup>的方法进行。电泳采用Laemmli(1970)的不连续系统,标准蛋白分别采用Pharmacia产品和上海东风试剂厂产品。LxNPV结构多肽用常规方法进行染色,多角体蛋白采用银染色法染色<sup>[3]</sup>。

5 多角体蛋白氨基酸组成分析 将纯化的多角体在6N HCl 105℃条件下水解,其产物在Waters Pico-TAG™氨基酸分析仪上分析。

6 病毒核酸的限制性内切酶图谱 LxNPV-DNA由多角体经碱解后直接用饱和酚及氯仿抽提即得,限制性内切酶Hind III、Pst I、EcoR I、Xho I、BamH I、Bgl I均购自华美生物工程公司。酶切反应和琼脂凝胶电泳按Sambrook等(1989)的方法进行。以λDNA/Hind III片段作标准曲线,计算LxNPV-DNA各酶切片段的分子量和DNA的总分子量。

## 结果与分析

1 病毒多角体及病毒粒子的形态结构 在透射电镜下观察,LxNPV多角体大多为不规则多边形,在扫描电镜下观察,多角体表面光滑,有的表面有不同程度的尖状凸起,有别于其它昆虫核多角体。有些表面则较粗糙,系提纯过程中降解所致(图版-1)。多角体大小不一,其直径范围在0.75~2.04μm之间,平均直径为1.40μm。从多角体超薄切片中可观察到LxNPV属于多粒包埋型(MNPV)。每个病毒束内的病毒粒子含量多少不一,一般1~10个。

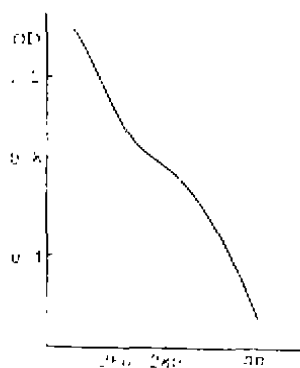


图1 LxNPV的紫外吸收曲线

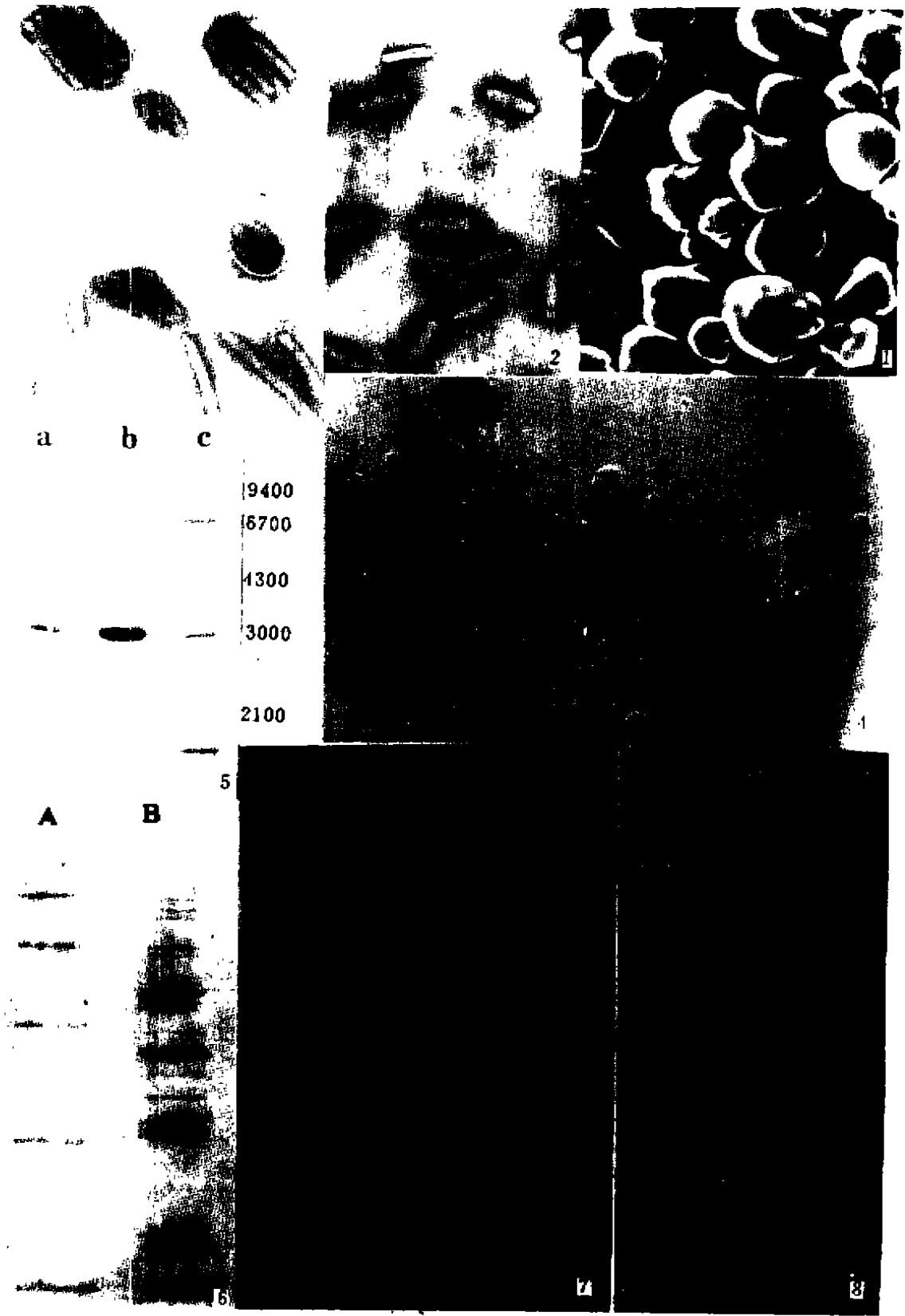
Fig. 1 Absorption curve of the LxNPV particle

LxNPV多角体在室温下随碱解程度的不同可释放出病毒束和病毒粒子。从图版-2中可以看出病毒束为短杆状,平均长度为361nm,宽度为139nm,病毒束的长度较为恒定,而其宽度则因所包含的病毒粒子数不同而有较大的变化,一般在110~167nm之间。在病毒束的一端不难观察到环状突起的帽状结构(Cap-like structure)。还可观察到病毒束的外膜由一层螺旋状排列的蛋白质亚基旋绕组成<sup>[6]</sup>。病毒粒子为杆状(图版-3),两端平整或钝圆,其大小较为恒定,统计表明其平均大小约为394×56nm。

2 病毒核酸的电镜观察 在透射电镜下,DNA是一环状大分子(图版-4)。经多个展层较

好的LxNPV分子测出其分子长度为 $38.0 \pm 5 \mu\text{m}$ ,分子量为 $74.86 \times 10^6$  Daltons。此结果与LxNPV的DNA酶切图谱中所测得的分子量基本相符。

3 多角体蛋白和病毒粒子的纯度测定 多角体蛋白经紫外分光光度计检测,在OD<sub>260nm</sub>处有一明显的吸收峰,其OD<sub>280</sub>/OD<sub>260</sub>=1.91。纯化后病毒粒子紫外吸收曲线呈平滑下降,在240~300nm之间无明显的吸收峰,其OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>=1.15,这与Bell<sup>[6]</sup>等人报道的昆虫杆状病毒粒子的紫外吸收曲线是一致的(图1)。



1. LxNPV 多角体扫描电镜(12200×)
  2. LxNPV 病毒束(24000× 2%PTA)
  3. LxNPV 病毒粒子(36000× 2%PTA)
  4. 完全展开的 LxNPV-DNA 大分子(13500×)
  5. 多角体蛋白的 SDS-PAGE 图谱
    - a. 灭活多角体蛋白 b. 未灭活的多角体蛋白 c. 标准蛋白
  6. LxNPV 结构多肽的 SDS-PAGE 图谱 A. 标准蛋白 B. LxNPV 结构多肽
  7. LxNPV-DNA 的单酶切图谱 a. Hind III b. Pst I c. Bgl I
  8. LxNPV-DNA 的双酶切片图谱 a. BamH I +Hind III b. BamH I +Pst I c. BamH I +Bgl I d. EcoR I +Xho I M.  $\lambda$ DNA/Hind III
1. Scanning electron micrograph of LxNPV polyhedra(12200×)
  2. Electron micrograph of virus bundles (24000× 2%PTA)
  3. Electron micrograph of virus particles (36000× 2%PTA)
  4. Micrograph of an entirely spreaded DNA from LxNPV(13500×)
  5. SDS-PAGE patterns of the LxNPV polyhedra a. Inactivated polyhedra b. Native polyhedra c. Standard proteins
  6. SDS-PAGE patterns of the LxNPV structural polypeptides A. Marker B. The LxNPV structural polypeptides
  7. Cleavage of LxNPV-DNA fragments with single restriction endonuclease
  8. Cleavage of LxNPV-DNA fragment with double endonucleases a. - BamH I +Hind III b. - BamH I +Pst I c. - BamH I +Bgl I d. - EcoR I +Xho I M- $\lambda$ DNA/Hind III

4 SDS-PAGE 分析 从多角体蛋白的 SDS-PAGE 图谱中(图版-5)可见,在 72℃ 灭活 2 小时的 LxNPV 中,多角体蛋白仅有一条带,分子量为 30.5kD;未灭活的多角体,蛋白质除了分子量为 30.5kD 的主带外,还有几条分子量较小的次带,这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<sup>[2]</sup>所报道的结果是一致的。如果上样量加大,还可能出现一条分子量较大的弱带(约 60kD)。这条带一般认为是多角体蛋白主带的二聚体,因恰好为主带的两倍,这也说明 LxNPV 多角体蛋白可能是通过单体形成二聚体,再形成多聚体,继而形成蛋白质晶格的。

经 SDS-PAGE 分析,病毒粒子的结构蛋白至少含有 19 条多肽(图版-6)。其分子量范围在 17—88kD 之间,其中 g、k、n、o、s 为主带,分子量分别为 57、44.5、36.5、31 和 17.0kD。病毒粒子的结构多肽分子量见表 1。

表 1 LxNPV 结构多肽分子量表

Tab. 1 Molecular weights of the structural polypeptides

| 组分<br>Component   | a    | b    | c    | d    | e    | f    | g    | h    | i  | j    |
|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|------|
| 分子量<br>M. W. (kD) | 88   | 84.5 | 81.5 | 70   | 68.5 | 59.5 | 57   | 56   | 54 | 48.5 |
| 组分<br>Component   | k    | l    | m    | n    | o    | p    | q    | r    | s  |      |
| 分子量<br>M. W. (kD) | 44.5 | 40.5 | 37.5 | 36.5 | 31.0 | 21   | 19.5 | 18.5 | 17 |      |

5 多角体的氨基酸组成分析 LxNPV 多角体的氨基酸组成见表 2。从表中可以看出, LxNPV 富含谷氨酸、缬氨酸和亮氨酸, 而组氨酸、甲硫氨酸和半胱氨酸含量较少, 其中酸性氨基酸与碱性氨基酸含量之比为 1 : 26。

6 LxNPV-DNA 的限制性内切酶图谱 LxNPV-DNA 经 Hind III、Pst I、EcoR I、Bgl I 四种酶单酶切, 分别得到 9、21、20、25 条片段(图版-7); 经 BamH I + Hind III、BamH I + Pst I、BamH I + Bgl I 和 Xho I + EcoR I 四组双酶切, 分别得到 11、22、26、32 条片段(图版-8)。以  $\lambda$ DNA/Hind III 为标准, 计算出各酶切片段的分子量和 LxNPV-DNA 的总分子量。详见表 3 和表 4。

表 2 LxNPV 多角体氨基酸组成

Tab. 2 Amino acid composition of LxNPV

| 氨基酸<br>Amino acid | 百分比<br>Percentage(g/100g) | 摩尔数比<br>Molar ratio | 摩尔数百分比<br>Molar percentage |
|-------------------|---------------------------|---------------------|----------------------------|
| Asp *             | 5.68                      | 42.3                | 6.39                       |
| Glu *             | 12.73                     | 86.58               | 12.73                      |
| Ser               | 2.31                      | 21.98               | 3.30                       |
| Gly               | 2.76                      | 31.27               | 4.70                       |
| His               | 2.70                      | 17.42               | 2.62                       |
| Arg               | 6.98                      | 40.05               | 6.02                       |
| Thr               | 3.46                      | 29.04               | 4.36                       |
| Ala               | 3.08                      | 34.63               | 5.23                       |
| Pro               | 5.05                      | 43.86               | 6.59                       |
| Tyr               | 8.46                      | 46.73               | 7.02                       |
| Val               | 6.78                      | 57.92               | 8.70                       |
| Met               | 1.15                      | 7.69                | 1.16                       |
| Cys               | 0.07                      | 0.54                | 0.08                       |
| Ile               | 5.30                      | 44.45               | 6.68                       |
| Leu               | 8.35                      | 63.68               | 9.57                       |
| Phe               | 4.80                      | 29.07               | 4.37                       |
| Lys               | 4.93                      | 33.75               | 5.07                       |
| NH <sub>3</sub>   | 0.59                      | 34.41               | 5.17                       |
| 总计 Total          | 84.79                     | 665.6               | 100                        |

\* : 由于是酸解, Asp 只能是 Asp 与 Asn 之和, Glu 只能是 Glu 与 Gln 之和。

\* : Asp = Asp + Asn, Glu = Glu + Gln

## 讨 论

LxNPV 是一种很有应用价值的昆虫病毒资源。一方面, 在生物防治中, 由于昆虫杆状病毒的高度特异的宿主范围, 因此它可以引起天然的昆虫流行病。而对人、畜及其它植物无害<sup>[1]</sup>另一方面, 在分子病毒学上, 昆虫杆状病毒正日益显示出它巨大的应用前景。自从 Miller 和 Summers 以苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒为材料, 分别组建了昆虫杆状病毒基因工程载体, 并表达了  $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidase)和  $\beta$ -干扰素( $\beta$ -interferon)。目前, 利用杆状病毒多角体基因的强启动子(phg)建立起来的一种高效多用的载体宿主表达系统的研究在国内外愈来愈引人注目, LxNPV 也许能成为一个有前途的载体系统, 这有待于进一步开拓。

表3 LxNPV-DNA 单酶切片段分子量表( $\times 10^6$ Daltons)  
Tab.3 Molecular weights of LxNPV-DNA fragments digested  
with single restriction endonuclease ( $\times 10^6$ D)

| 片段号<br>Fragment | Hind III | Pst I  | EcoR I | Bgl I  |
|-----------------|----------|--------|--------|--------|
| 1               | 33.08    | 8.31   | 4.78   | 6.21×2 |
| 2               | 12.58    | 6.6    | 0.46   | 5.24×2 |
| 3               | 9.99     | 6.02   | 7.41*  | 4.28   |
| 4               | 5.24     | 4.67*  | 6.60   | 4.16×2 |
| 5               | 4.57     | 4.36   | 5.01   | 3.31×2 |
| 6               | 2.34     | 3.31×2 | 4.36*  | 3.16*  |
| 7               | 2.09     | 3.16   | 3.98   | 2.51×2 |
| 8               | 1.39     | 2.88×2 | 3.53   | 2.10   |
| 9               | 1.09     | 2.19   | 2.95   | 2.01   |
| 10              |          | 2.09×2 | 2.63   | 1.68   |
| 11              |          | 1.86   | 2.24   | 1.50   |
| 12              |          | 1.66   | 1.78   | 1.34   |
| 13              |          | 1.65   | 1.62   | 1.28   |
| 14              |          | 1.62×2 | 1.38   | 1.07   |
| 15              |          | 1.58   | 1.17   | 1.01   |
| 16              |          | 1.38   | 0.96   | 0.95   |
| 17              |          | 1.35   | 0.87   | 0.89   |
| 18              |          | 1.17   | 0.85   | 0.85   |
| 19              |          | 1.05   | 0.79   | 0.71   |
| 20              |          | 0.83   | 0.69   | 0.68   |
| 21              |          | 0.59   |        | 0.65   |
| 22              |          |        |        | 0.58   |
| 23              |          |        |        | 0.32   |
| 24              |          |        |        | 0.42   |
| 25              |          |        |        | 0.35   |
| 总计<br>Total     | 72.37    | 69.59  | 74.07  | 68.89  |

\* 为亚克分子带 \* Submolecular fragments

从 LxNPV 结构多肽的 SDS-PAGE 图谱中可看出,该病毒的病毒粒子结构多肽很复杂。这种复杂性与 Summers<sup>[2]</sup> 等人所报道的其它昆虫杆状病毒的病毒粒子结构多肽的复杂性是一致的。一般认为昆虫杆状病毒的 11~26 种结构多肽分子量在 10~160kD 之间,并且有几种主要的多肽。本实验表明,LxNPV 也符合这些规律,其病毒粒子有 19 条系结构多肽,分子量范围在 17—88kD 之间,并且有 5 条主带。

根据 LxNPV 的氨基酸组成分析,LxNPV 的氨基酸组成与其它昆虫核型多角体病毒的氨基酸组成存在一些共性<sup>[9]</sup>,即富含 Glu,而 His、Met、Cys 含量较少。但我们也发现 LxNPV 的 Asp 含量却并非象其它核多角体病毒那样非常高。这说明核型多角体病毒的差异性,同时也反映出生物世界的多样性和复杂性。

在核酸电镜展层中,我们发现有线状、环状的 DNA 大分子,可能是不适当的处理造成的。但事实上 Summers 等<sup>[10]</sup> 用超离心沉降法,电镜分析法及复性动力学分析法研究了许多杆状病毒 DNA,结果表明它们都具有超螺旋、松弛环状和双链线状三种分子构象。所以,我们也可以认为电镜下观察到的线状 DNA 也是 LxNPV-DNA 的一种构象。

在 REN 谱分析中,我们见到有亚克分子带出现,关于这一点,国内外许多学者已做过讨论<sup>[11]</sup>,一般认为这是由于病毒基因组发生突变形亚系的缘故。我们在 DNA 分子展层中也发现每个完全展开的病毒 DNA 分子的长度有一定的差异( $38.0 \pm 5\mu\text{m}$ )。因此,亚系的混合在 DNA 限制性酶谱中就可能出现亚克分子带。

表 4 LxNPV-DNA 双酶切片段分子量( $\times 10^6$ )Tab. 4 Molecular weights of LxNPV-DNA fragments digested with double restriction endonucleases( $\times 10^6$ D)

| 片段号<br>Fragment | BamH I *<br>Hind III | BamH I *<br>Pst I | BamH I *<br>Bgl I | Xho I *<br>EcoR I |
|-----------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1               | 28.87×2              | 13.17             | 10.95             | 7.75              |
| 2               | 7.75                 | 12.58             | 6.91              | 6.02              |
| 3               | 5.24                 | 6.30              | 6.30 *            | 5.49              |
| 4               | 4.56                 | 5.88              | 5.49              | 4.46×2            |
| 5               | 3.16                 | 4.57              | 4.16              | 3.71×2            |
| 6               | 2.63                 | 4.16              | 3.76              | 2.63              |
| 7               | 2.09                 | 3.71              | 3.16              | 3.16              |
| 8               | 1.29                 | 3.08              | 2.95              | 2.63              |
| 9               | 0.93                 | 2.51              | 2.75              | 2.48 *            |
| 10              | 0.67                 | 2.19              | 2.63              | 2.09              |
| 11              | 0.74                 | 2.09              | 2.09              | 1.86              |
| 12              |                      | 1.74              | 1.66              | 1.73              |
| 13              |                      | 1.48              | 1.48              | 1.63              |
| 14              |                      | 1.41              | 1.42              | 1.52              |
| 15              |                      | 1.26              | 1.38              | 1.34              |
| 16              |                      | 1.17              | 1.23              | 0.95              |
| 17              |                      | 1.05              | 1.00              | 0.89              |
| 18              |                      | 1.00              | 0.87              | 0.87              |
| 19              |                      | 0.83              | 0.85              | 0.85              |
| 20              |                      | 0.79              | 0.83              | 0.83              |
| 21              |                      | 0.50              | 0.74              | 0.78              |
| 22              |                      | 0.42              | 0.69              | 0.76              |
| 23              |                      |                   | 0.59              | 0.72              |
| 24              |                      |                   | 0.51              | 0.52              |
| 25              |                      |                   | 0.36              | 0.42              |
| 26              |                      |                   | 0.34              | 0.41              |
| 27              |                      |                   |                   | 0.40              |
| 28              |                      |                   |                   | 0.39              |
| 29              |                      |                   |                   | 0.34              |
| 30              |                      |                   |                   | 0.26              |
| 31              |                      |                   |                   | 0.17              |
| 32              |                      |                   |                   | 0.13              |
| 总计<br>Total     | 71.00                | 71.89             | 71.40             | 69.47             |

\* 亚克分子带

\* Submolecular fragments

## 参 考 文 献

- 1 福建林学院林学系,等.木毒蛾核型多角体病毒的初步研究,昆虫学报,1980;23(2):184—187
- 2 M. D. Summers G. E. Smith Baculovirus structural polypeptides. Virol, 1978, 84: 390—402
- 3 林栖凤,凝胶中痕量蛋白质和核酸银染色法.病毒学杂志,1985;1(3):80—84
- 4 Kawamoto F, Asayama T. Studies on the arrangement patterns of nucleocapsids within the envelopes of nuclear-polyhedrosis virus in the fat-body cell of the Brown Tail Moth, *Euproctis similis*. J Invert Pathol 1975; 26: 47—55
- 5 张立人,邓海凡,张世敏,等.斜纹夜蛾核型多角体病毒形态与结构,中国科学,1979;4: 398—401

- 6 Bell C D, Orbob G B. Serological Studies on virions and polyhedron protein of a nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Virology*, 1977, 77: 162—172
- 7 Koolov E A, Sidorova N M, Serebryani S B. Proteolytic cleavage of polyhedral protein during dissolution of inclusion bodies of the nuclear polyhedrosis virus of *Bombix mori* and *Galleria mellonella* under alkaline conditions. *J Invertebr Pathol*, 1975, 25: 97—101
- 8 Tweeten K A, Bulla L A, Consigli R A. Characterization of an alkaline protease associated with a granulocytosis virus of *Plodia interpunctella*. *J Virol*, 1978, 26: 702
- 9 张立人. 中国昆虫病毒电镜图谱. 北京: 北京科学出版社, 1988
- 10 Jurkovicava M, Tourwv J H, Sussenbach J S, et al. Characterization of the nuclear polyhedrosis virus DNS of *Alozophyes orana* and of *Heratira brassicae*. *Virology*, 1979, 93: 8
- 11 陈稼华, 赵怀玉, 张立人. 三种昆虫核型多角体病毒 DNA 的限制性内切酶解分析. *病毒学报*, 1987, 3(1): 69—75

## Morphology and Biochemical Characteristics of the Nuclear Polyhedrosis Virus of *Lymantria xyliana* Swinhoe

Peng Guibang Zhang Liren Chen Dihua

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

Chen Yaoshun

(Nande Forestry Bureau, Fujian 352100)

*Lymantria xyliana* Swinhoe nuclear polyhedrosis virus (LxNPV) is a kind of multi-embedded baculovirus. Scanning electron microscope (SEM) showed that the LxNPV inclusion bodies were irregular polyhedra with different sizes. The average diameter of the polyhedra was 1.40 μm. A lot of rod-shaped virions which had a mean size of 394 × 56 nm were released from polyhedra when they were decomposed by alkali. The virus genome was a circular DNA macromolecule with length of 38.0 μm. SDS-PAGE showed that polyhedrin had only one major polypeptide band with a molecular weight of 30.5 kD. Whereas virions had at least 19 polypeptide bands with M. W. ranging from 88~17 kD. The protein from LxNPV is rich in Glu, Arg and Leu, but poor in Cys, Met and His. The ratio of basic amino acid to acidic amino acid is 1:1.26. The LxNPV-DNA was analyzed by Hind III, Pst I, EcoR I, Xho I, Bgl I, BamH I. The M. W. of every fragment was determined. The total M. W. of LxNPV genome is 71.6 × 10<sup>6</sup> Daltons.

**Key words** *Lymantria xyliana* Swinhoe, Nuclear polyhedrosis virus, Fine structure, Biochemical characteristics