

174-128

第13卷第2期
1998年6月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol 13 No 2
Jun. 1998

115

毛细管气相色谱分析昆虫病毒包涵体中的脂肪酸

朱湘民 郑大胜[√] 汤显春 夏祥明 宋冬林

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

S 476.14

关键词 核型多角体病毒, 颗粒体病毒, 脂肪酸, 毛细管气相色谱 **包涵体**

病毒脂肪酸的定性和定量, 可作为病毒分类鉴定的辅助证据。有关细胞脂肪酸的研究已有报道^[1-2], 但对病毒多角体 (polyhedrons) 和颗粒体 (granules) 中脂肪酸成份的研究尚未见报道。本研究在病毒单糖分析的基础上^[3], 用毛细管气相色谱法, 对 8 株 NPV 和 8 株 GV 中的脂肪酸种类和相对量进行了分析, 并用相应脂肪酸色谱峰的峰高比值来区分毒株间的异同, 对病毒脂肪酸在鉴别毒株中的作用进行了探讨。

材料与amp;方法

1 供试毒株

菜粉蝶颗粒体病毒中山株 PrGV-Z、成都株 PrGV-C、上海株 PrGV-S、武汉株 PrGV-W、榆次株 PrGV-Y; 白杨天社蛾颗粒体病毒湖北株 MaGV-H; 黄地老虎颗粒体病毒北京株 AsGV-B; 黄刺蛾颗粒体病毒四川株 XiGV-S; 家蚕核型多角体病毒浙江株 BmNPV-Z; 柞蚕核型多角体病毒河南株 ApNPV-H; 茶毛虫核型多角体病毒福建株 EpNPV-F、安庆株 EpNPV-A; 棉铃虫核型多角体病毒武汉株 HaNPV-W、美国株 HaNPV-M、山东株 HaNPV-S; 美国白蛾核型多角体病毒陕西株 HcNPV-S。

以上毒株均由中国菌种保藏委员会普通微生物(病毒)中心提供。

2 病毒样品的制备与提纯

按文献[4]的方法提纯病毒样品, 用 1.5% SDS 悬浮洗涤, 离心, 再用重蒸水洗涤, 离心后干燥备用。

3 病毒脂肪酸甲酯的制备与提纯

分别称取干燥的毒株样品 10 mg, 置 20 mL 磨口玻璃管内, 加 5% NaOH-甲醇溶液 5 mL, 加塞后于沸水中水浴 30 min; 冷却后用 6 mol/L HCl 调至 pH2, 加 15% BF₃-甲醇溶液 4 mL, 加塞后于沸水中水浴 30 min; 冷却后加饱和 NaCl 溶液 10 mL; 再用 8 mL 氯仿-正己烷(1:4)溶液提取两次, 合并提取液, 加无水硫酸钠 1 g, 静置后吸出上层溶液, 用 N₂ 吹干, 接着用重蒸正己烷溶解至 0.1 mL, 供色谱分析用。

分别配制 1 μg/mL 的 C_{16:0}~C_{20:0} 的各种直链饱和脂肪酸甲酯, 油酸甲酯和亚油酸甲酯的正己烷溶液作为标准脂肪酸甲酯试剂。

4 色谱条件

脂肪酸分析在 GC-9A 气相色谱仪上进行。色谱柱: 高效弹性石英毛细管 (CPI3 系列) (OV-101, 0.24 mm × 50 m), 程序升温: 120 °C $\xrightarrow{4\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}}$ 250 °C, N₂: 50 mL/min, H₂: 0.6 kg/cm², Air: 0.5 kg/cm², 尾吹: 40 mL/min, 分流比: 1:55, 汽化室温度 250 °C, FID: 250 °C, 纸速: 0.4 cm/min, 每个样品重复分析两次。

收稿日期: 1997-07-07, 修回日期: 1997-10-07

结果与讨论

依据各种脂肪酸在上述色谱条件下的保留时间,并对照标样中各脂肪酸峰与峰的相对距离,可确定各毒株中脂肪酸组成成份。表1是16株病毒脂肪酸的归一化色谱峰高值和某些相应峰高比值数据,以脂肪酸的碳原子数标定色谱峰号,尚未鉴定的色谱峰在表中以X表示。16株病毒脂肪酸成份以各种直链饱和脂肪酸为主,不饱和或带支链的异构体相对较少,以16烷酸的含量为最高。

通过不同种类和相同类型病毒脂肪酸成份的分析,不仅可以区分NPV与GV的不同,也可辨别同类型中的不同分离株。

1 GV脂肪酸色谱图特征(图1)

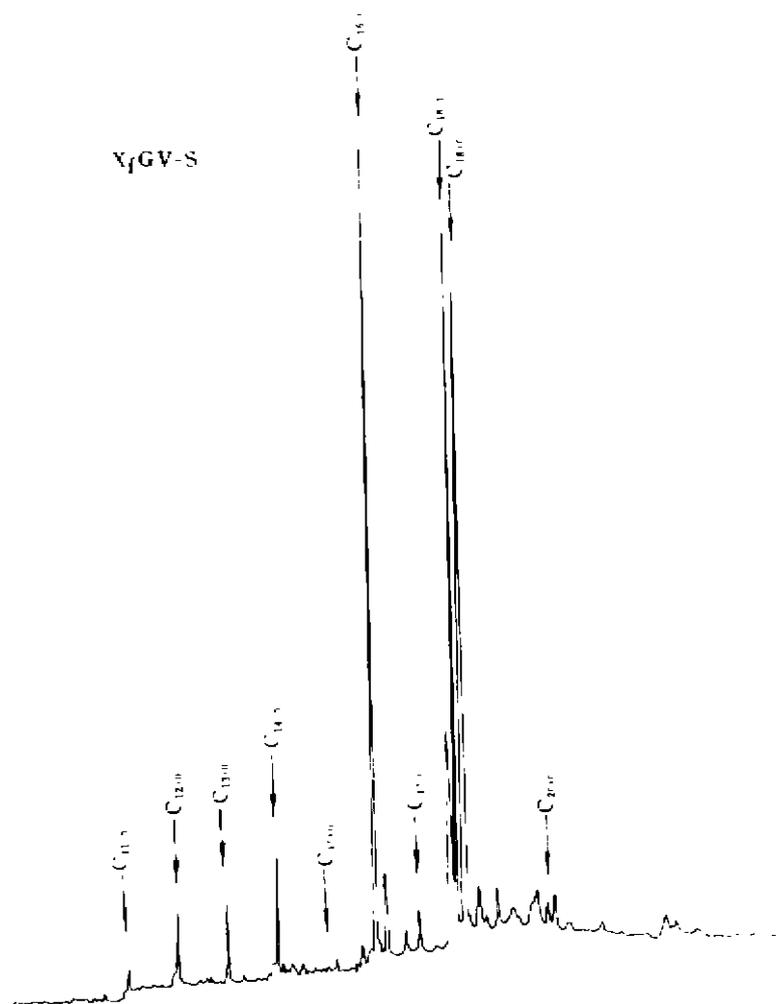


图1 颗粒体病毒脂肪酸气相色谱图
Fig.1 Gas chromatogram of GV fatty acids

在供试的 8 株 GV 脂肪酸指纹图中, $C_{16:0}$ 峰为最高峰, $C_{18:1}$ 峰都高于 $C_{18:0}$ 峰, 从相应峰的峰高比值数据(表 1)可以看出: PrGV-W, PrGV-C 和 PrGV-S 含有的 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{17:0}$ 和 $C_{20:0}$ 五种脂肪酸量的相对比值相等或近似相等, 说明它们是三个性质相同的分离株。从血清学分析鉴定结果发现这三个分离物颗粒表面抗原结构完全相同, 都具有 a 和 b 两种抗原成分, 属同一血清型^[4]。其他 5 株脂肪酸指纹图中各相应峰的峰高比值与上述 3 株各不相同, 表明是五株性质完全不同的分离株。它们的裂解色谱图聚类分析结果也证明了这点^[5]。

2 NPV 脂肪酸色谱图特征(图 2)

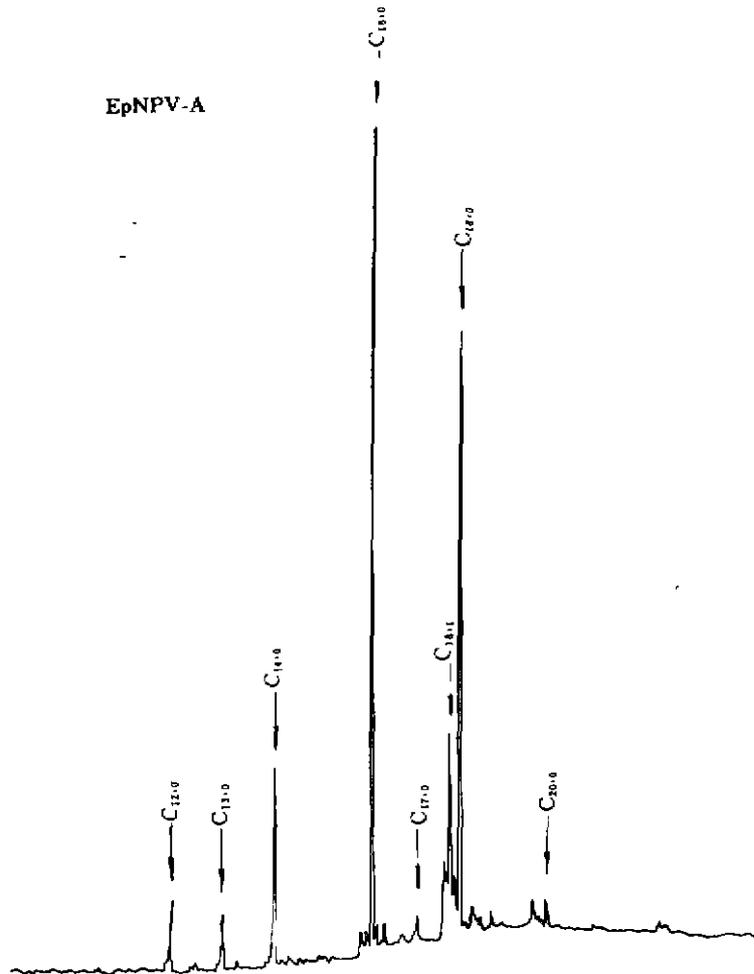


图 2 马型多角体病毒脂肪酸气相色谱图

Fig 2 Gas chromatogram of NPV fatty acids

在供试的 8 株 NPV 脂肪酸图谱中, $C_{16:0}$ 峰为最高峰, 它们区别于 GV 的显著特征是: 除了 BmNPV-Z 外, 所有的 $C_{18:0}$ 峰都高于 $C_{18:1}$ 峰, 这种图型特征是由 NPV 本身固有的性质所决定的。其中, EpNPV-A 和 EpNPV-F 的指纹图中相应峰的峰高比值相同或接近, 表明它们

表1 脂肪链归一化色谱数据及相应峰高比值数据(单位:厘米)
Table 1 Fully and chromatographic peak heights of
normal/ature (cm) and ratios of related peak heights

毒株	Chromatographic peak heights of fatty acids (cm)																	相应峰高比值				
	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃	C ₁₄	C ₁₅	C ₁₆	C ₁₇	C ₁₈	C ₁₉	C ₂₀	C ₂₁	C ₂₂	C ₂₃	C ₂₄	C ₂₅	C ₂₆	C ₁₆ /C ₁₈	C ₁₇ /C ₁₈	C ₂₀ /C ₁₈	^a C ₁₆ /C ₁₈	^b C ₁₆ /C ₁₈
BmNPV-Z	0.1	0.2	0.9	0.6	0.2	12.3	1.4	0.5	0.3	5.8	5.3	0.6	0.5	0.2	0.3	0.3	1.5	2.32	--	1.00	61.5	--
EpNPV-F	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	13.6	1.9	0.4	--	3.5	9.5	4.9	3.3	0.6	3.2	0.7	1.9	1.42	2.7	1.75	136	--
ApNPV-H	0.3	0.1	2.5	0.1	13.4	1.6	--	0.3	3.5	3.1	11.5	0.8	0.4	--	0.3	0.5	--	1.17	14.4	1.67	134	--
HeNPV-S	0.1	0.1	0.2	--	13.6	0.7	0.7	--	10.2	13.5	1.1	1.3	0.1	--	1.6	0.6	--	1.00	1.32	2.29	--	--
H ₁ NPV-W	1.4	1.2	1.7	0.1	7.5	0.9	0.6	0.3	0.2	3.6	3.6	0.3	--	0.1	--	--	--	2.08	1.0	1.67	75	--
H ₂ NPV-M	0.9	1.2	1.2	--	7.3	0.4	--	0.6	--	1.1	1.0	0.1	1.3	0.2	1.0	0.5	--	1.83	3.6	0.83	--	--
EpNPV-A	1.0	0.9	3.3	0.1	13.7	0.1	1.2	0.3	--	3.0	9.6	0.3	0.3	--	0.4	0.5	--	1.41	3.2	1.67	137	--
EpNPV-S	0.6	0.7	1.0	--	11.2	0.3	--	0.7	--	7.0	10.9	0.3	0.8	0.2	0.3	1.1	--	1.03	1.6	1.57	--	--
PkV-Z	0.2	0.1	0.6	--	17.3	1.0	--	0.6	--	14.0	8.2	0.5	0.3	--	0.4	--	--	2.11	0.59	0.67	--	--
PkV-W	0.2	0.1	0.5	--	11.1	0.9	--	0.2	--	10.4	5.2	0.3	0.3	--	0.2	--	--	2.13	0.50	1.00	--	--
PkV-C	--	0.1	0.3	--	14.0	0.9	--	0.3	--	15.2	6.9	0.1	--	--	0.3	--	--	2.03	0.46	1.00	--	--
MAV-H	--	0.2	0.5	--	9.3	0.5	--	0.1	--	6.4	6.4	--	--	--	0.3	--	--	1.45	1.00	3.00	--	--
AGV-B	--	0.3	0.3	0.6	--	13.5	0.5	--	0.3	--	10.2	5.5	--	--	0.2	--	--	2.45	0.54	0.67	--	--
PkV-S	--	0.2	0.2	0.5	--	11.0	0.6	0.2	--	10.3	5.1	--	--	--	0.2	--	--	2.16	0.50	1.00	--	--
PkV-Y	1.0	0.8	0.3	--	16.0	1.0	--	0.2	--	15.9	7.5	0.1	--	--	0.3	--	--	2.13	0.47	1.50	--	--
XkV-S	0.1	1.0	1.1	1.8	--	13.5	1.2	0.2	0.6	--	11.3	10.9	0.6	0.5	--	--	--	1.24	0.92	1.00	--	--

注:a 冒号后为碳原子数, b 为双键数, c 未鉴定峰
Notes: a. The figure before the colon indicates the number of carbon atoms in the fatty acid chain, the one after the colon denotes the number of double bonds.
b. Unidentified peak

是两个性质非常相似的分离株(表1),该结果也被裂解色谱的模式识别所证实^[5]。同样从其他各株相应峰的峰高比值看,ApNPV-H的性质与EpNPV-F和EpNPV-A较接近,除此以外其它各株均为性质各异的分离株。

本研究用毛细管色谱对病毒的脂肪酸成分进行了首次分析尝试,成功地分析了它们共同的脂肪酸组成和相应脂肪酸峰高比值,进而区分了它们彼此间的异同,分析结果与血清学和裂解气相色谱结果相吻合。毛细管色谱法灵敏度高,样品用量少,分辨率高。由于标准品条件的限制,要分析所有的脂肪酸及异构体,目前仍有一定的困难。

病毒脂肪酸指纹图是模式识别病毒的依据之一,有助于研究和阐明病毒的生物学特性,可为不同分离株病毒的精细鉴定提供进一步佐证,这在分类学上具有一定的实际意义。

参 考 文 献

- 1 Drucker D B, Lee S M. Fatty acid Fingerprints of "*Streptococcus milleri*", *Streptococcus mitis*, and related species. *Int J Syst Bacteriol*, 1981, 31(3): 219-225
- 2 周方,朱厚础,唐光江等.细胞脂肪酸气相色谱图鉴别细菌的研究. *微生物学报*, 1987, 27(2): 95-104
- 3 朱湘民,曾昭睿,汤显春等.昆虫病毒多角体与颗粒体单糖色谱分析. *病毒学报*, 1994, 10(3): 278-284
- 4 朱湘民,汤显春,陈明树.用裂解气液色谱法鉴定昆虫包涵体病毒的初步研究. *病毒学报*, 1987, 3(4): 355-360
- 5 朱湘民,汤显春,刘进学等. PyGC 对昆虫包涵体病毒的模式识别. *分析测试学报*, 1995, 14(6): 37-42

Analysis of Fatty Acids in Inclusion Bodies of Insect Viruses by Capillary Gas Chromatography

Zhu Xiangmin Zheng Dasheng Tang Xianchun Xia Xiangming Song Donglin

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

Abstract A method for analysis of fatty acids in the insect inclusion body viruses by capillary gas chromatography was described. The main components of the fatty acid chromatogram were identified, showing that the fatty acids in the granulosis virus and nuclear polyhedrosis virus were mainly composed of undecanoic a., dodecanoic a., tridecanoic a., tetradecanoic a., hexadecanoic a., heptadecanoic a., octadecanoic a., eicosanoic a. and octadecanoic a. Based on the ratios of the related fatty-acid -peak heights among distinct chromatograms, the viruses were differentiated and identified. The conclusion was consistent with that of the virus monosaccharide and pyrolysis gas chromatography.

Key words Nuclear polyhedrosis virus, Granulosis virus, Fatty acids, Capillary gas chromatography