

2000-234 8 S476.13
蜀柏毒蛾核型多角体病毒结构多肽及基因组酶切分析赵小东¹, 周建华², 丁清泉^{1*}¹(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)²(四川省林业科学院, 成都 610081)

摘要:对蜀柏毒蛾核型多角体病毒(*Parocneria orientis* Nuclear polyhedrovirus, 简称 PaorNPV)形态结构、结构多肽、限制性内切酶图谱等特性进行了研究。采用不连续系统垂直板 SDS-PAGE 分析了 PaorNPV 的多角体蛋白、病毒粒子结构多肽。应用 5 种限制性内切酶对 PaorNPV 基因组 DNA 进行了酶切分析。结果表明:经热处理的多角体蛋白仅有一条带, 分子量为 31.5 kD, 不经热处理的多角体蛋白有三条带, 分子量分别为 31.5 kD、29.1 kD、28.6 kD; 病毒粒子包含有 25 种结构多肽, 分子量范围在 17.6-114.6 kD 之间。PaorNPV DNA 经 *Bam* H I, *Eco* R I, *Hind* III, *Pst* I 和 *Xho* I 酶切分别产生 9、12、12、12 和 14 条片段。基因组大小平均为 124.6 kb。

关键词:蜀柏毒蛾核型多角体病毒; 结构多肽; 内切酶图谱

中图分类号: S763.42 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2000)03-0249-06

蜀柏毒蛾(*Parocneria orientis* Chao)50年代初发现于四川省东部^[1], 是柏木林区危害十分严重的食叶害虫, 同时还危害侧柏、桧柏等树种。陈新文等从自然罹病死亡的幼虫中分离出一种病原病毒, 定名为蜀柏毒蛾核型多角体病毒(*Parocneria orientis* Nuclear polyhedrovirus)^[2]。该病毒对蜀柏毒蛾幼虫有较强毒力, 作为病毒杀虫剂进行大面积林间防治, 取得一定的防治效果^[3]。有关 PaorNPV 的蛋白及核酸的理化特性目前国内外尚无报道。本文对 PaorNPV 的多角体蛋白、结构多肽、基因组限制性内切酶图谱进行了研究, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

罹病虫体由四川省林业科学院提供, 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺为 Sigma 公司产品, Sepharose 6B 为 Pharmacia 公司产品, 琼脂糖为 BRL 公司产品, 各种限制性内切酶购自华美生物工程公司, 标准蛋白购自上海丽珠东风生物技术有限公司。

1.2 多角体的分离纯化

分离纯化参考文献^[2,4]并作如下改进: 病虫体经研磨、过滤和差速离心得到初步纯化的多角体。后者用 0.1 mg/mL 胰蛋白酶 37℃ 水浴 30 min, 离心后沉淀用等体积的 SMT 缓冲液(2% SDS, 0.2% 巯基乙醇, 0.1 mol/L EDTA)45℃ 水浴 30 min, 最后用溶菌酶 4℃ 作用 1 h 可得纯净的多角体。

1.3 多角体蛋白的制备 主要参照文献^[5]介绍的方法进行。

收稿日期: 1999-07-23, 修回日期: 2000-02-24

第一作者简介: 赵小东(1972年-), 男, 湖北黄冈人, 在读研究生, 研究方向: 分子病毒学。

* 通讯作者简介: 丁清泉(1951年-), 男, 湖北鄂州人, 研究员, 研究方向: 分子病毒学。

1.4 病毒粒子的制备 参照文献^{[2]、[6]}介绍的方法进行。

1.5 多角体蛋白及病毒粒子结构多肽的 SDS-PAGE 参照文献^[7]介绍的方法进行。

1.6 基因组 DNA 的提取及限制性内切酶酶切分析

基因组 DNA 的提取参照文献^[8]介绍的方法进行。酶切、电泳分别参照文献^{[8]、[9]}介绍的方法进行。

2 结果

2.1 多角体及病毒粒子的形态大小

多角体在光镜下呈折光性较强的小颗粒,经 JEM-100C 电镜观察,多角体形态多样,呈四边形、五边形、六边形以及近圆形,长度为 $0.8\sim 2.2\ \mu\text{m}$ (图 1)。多角体部分碱解可见其包埋多个病毒粒子(图 2),多角体完全碱解时释放出大量的病毒粒子,呈杆状,形态完整,大小为 $53\sim 70\ \text{nm} \times 333\sim 382\ \text{nm}$ (图 3)。

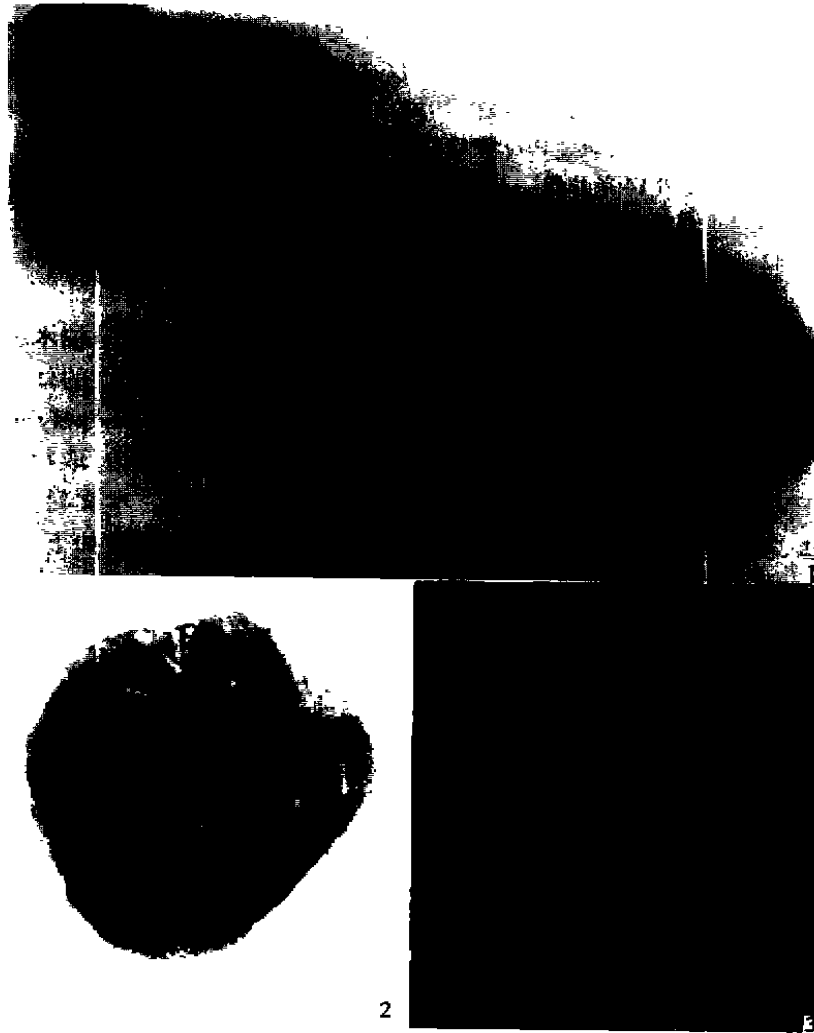


图 1 PaorNPV 多角体($\times 8000$)

图 2 部分碱解的多角体($\times 15000$)

图 3 PaorNPV 病毒粒子($\times 40000$)箭头所示为核壳体

Fig. 1 PaorNPV polyhedron($\times 8000$)

Fig. 2 Alkali-dissolved PaorNPV polyhedron ($\times 15000$)

Fig. 3 Virion of PaorNPV($\times 40000$) nucleocapsid is showed by arrow

2.2 多角体蛋白 SDS-PAGE 图谱

经热处理制备的多角体蛋白在 SDS-PAGE 图谱中仅有一条带(图 4), 分子量为 31.5 kD。而同样方法不经热处理制备的多角体蛋白在 SDS-PAGE 图谱中除了一条主带外, 还有两条弱带, 分子量分别为 31.5 kD、29.1 kD 和 28.6 kD。

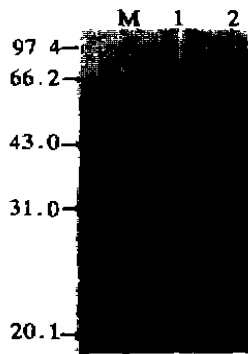


图 4 PaorNPV 多角体蛋白 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE of PaorNPV polyhedrin protein

M: 标准蛋白; 1. 热处理的多角体蛋白; 2. 未经热处理的多角体蛋白

M: the standard protein; 1. polyhedrin protein treated by heat

2. Polyhedrin protein untreated by heat

2.3 病毒粒子结构多肽 SDS-PAGE 图谱

采用 SDS-PAGE 检测 PaorNPV 病毒粒子结构多肽, 共包含有 25 种(图 5), 各结构多肽的分子量大小见表 1, 范围在 17.6~114.6 kD, 其中 VP5、VP6、VP7、VP13、VP15 和 VP16 为 6 条主带 VP1-4 和 VP8-12 为 9 条弱带。

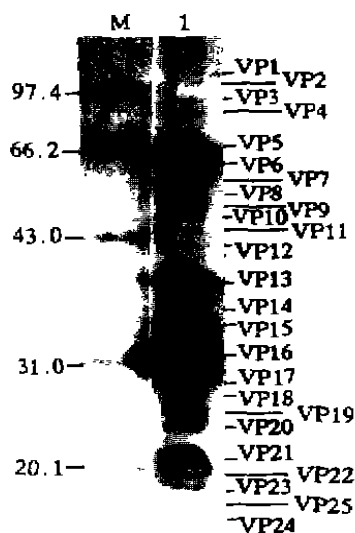


图 5 PaorNPV 病毒粒子结构多肽 SDS-PAGE

Fig.5 SDS-PAGE of PaorNPV structural polypeptides

M: 标准蛋白; 1: 病毒粒子结构多肽

M: The standard protein; 1: structural polypeptides

2.4 PaorNPV DNA 限制性内切酶图谱

PaorNPV DNA 用 *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III、*Pst* I 及 *Xho* I 消化后,经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 6。基因组 DNA 被 5 种限制性内切酶酶切产生的片段数分别为 9、12、12、12 和 14。以 λ DNA/*Hind* III 酶切片段为 Marker,作标准曲线计算出各酶切片段的长度,结果见表 2。根据各片段大小推算出 PaorNPV 基因组全长为 124.6 kb。分子量为 82.2×10^6 D。

3 讨论

高度纯化的多角体是进行 NPV 分子生物学实验的前提。由于本实验材料并非人工感染的病虫体,因而按照传统方法^[4-6]很难把细菌、宿主细胞碎片等杂质与多角体分开。实验中曾通过 10% ~ 50% 不连续蔗糖梯度离心,结果仍不理想。经长时间摸索总结用胰蛋白酶、SMT 缓冲液和溶菌酶相结合的方法处理初步提纯的

表 1 PaorNPV 病毒粒子结构多肽分子量大小(kD)
Table 1 Molecular weight of Paor NPV structural polypeptides

多肽编号 Polypeptide	分子量 Molecular weight
VP1	114.6
VP2	109.4
VP3	86.7
VP4	82.1
VP5	68.7
VP6	63.5
VP7	58.9
VP8	54.2
VP9	52.5
VP10	48.9
VP11	46.0
VP12	42.0
VP13	38.4
VP14	36.7
VP15	34.4
VP16	31.4
VP17	28.6
VP18	26.9
VP19	25.7
VP20	24.0
VP21	22.8
VP22	21.0
VP23	19.8
VP24	18.8
VP25	17.6

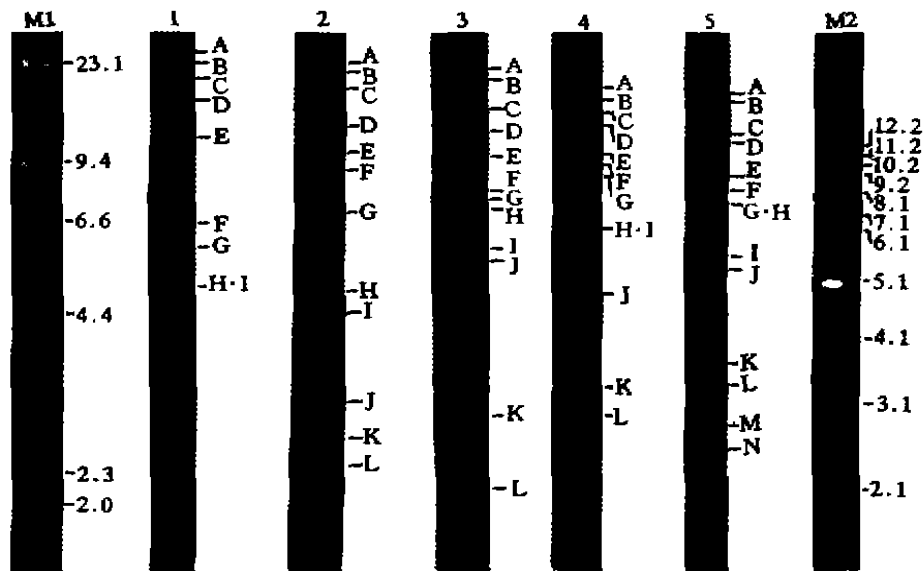


图 6 PaorNPV DNA 限制性内切酶图谱

1, 2, 3, 4, 5 分别为 PaorNPV DNA 用 *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III、*Pst* I 和 *Xho* I 消化
Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of PaorNPV genomic DNA
digestion with 1: *Bam*H I; 2: *Eco*R I; 3: *Hind* III; 4: *Pst* I and 5: *Xho* I restriction
endonucleases. M₁: λ DNA/*Hind* III; M₂: 1kb ladder

多角体悬液,经光镜及电镜检查效果很好,多角体纯度完全满足后继实验要求。表明该方法特别适合野外采集的 NPV 材料的分离和纯化。

许多学者认为在杆状病毒多角体蛋白制备过程中存在碱性蛋白酶活性^[10], Eppsitain^[11]认为碱性蛋白酶和多角体有一定的亲和性。该酶作用于多角体蛋白特定位点产生小的多肽^[12]。该酶活性能被 Ca^{2+} 、 Hg^{2+} 和加热所抑制^[13]。本实验采用 72℃ 加热 2 小时的方法灭活该酶,与不经热处理的结果相对照,发现在存在碱性蛋白酶活性的情况下,确实对多角体蛋白有一定的降解作用。

多角体蛋白亚基与病毒粒子结构多肽中的 VP16 有着非常近似的分子量。Summers 认为其原因有三种可能性:1)在制备病毒粒子过程中混杂有多角体蛋白;2)多角体蛋白是病毒粒子结构多肽的组成成分之一;3)多角体蛋白与病毒粒子结构多肽中的一种亚基有着近似的分子量。通过严格的实验他否定了第一种可能性^[14]。Bell 等^[15]在 TnSNPV 中发现高度纯化的多角体蛋白与病毒粒子结构多肽之间没有血清学关系,从而对第二种可能性提出质疑。因此两者之间仅存在分子量上的相似性,这有待进一步的实验去证实。

从 PaorNPV DNA 限制性内切酶图谱推算出该病毒基因组全长为 124.6 kb,比 HaSNPV 略小(130.1 kb)^[8]。有关 PaorNPV 基因组中 *polh* 基因、*chiA* 基因的定位及克隆等工作目前正在进行之中。

致谢 本文的电镜观察工作得到本所电镜室邓红、袁爱华两位老师的帮助,特表示感谢。

参 考 文 献

- [1] 何礼.蜀柏毒蛾生物学特性及防治[J].昆虫知识,1998,35(2):90-93
- [2] 陈新文,彭辉银,王根,等.蜀柏毒蛾核型多角体病毒的分离鉴定[J].中国病毒学,1991,6(4):379-381
- [3] 周建华,唐孟佳,秦严昌,等.蜀柏毒蛾核型多角体病毒杀虫剂防治效果研究[J].四川林业科技,1992,13(4):31-32
- [4] 王根,张传溪,金伟,等.棉铃虫核型多角体病毒基因组限制酶酶切分析及其多角体基因的定位[J].应用与环境生物学报,1996,2(4):387-392
- [5] 刘年翠,孟小林.油桐尺蠖核型多角体病毒结构多肽的分析[J].病毒学杂志,1988,1:48-52
- [6] 孙修炼,张光裕.棉铃虫核型多角体病毒四个分离株的比较研究[J].中国病毒学,1994,9(4):309-318
- [7] Leammli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage 7[J]. Nature 1970, 227:680-685
- [8] 李牧.中国棉铃虫单粒包埋核型多角体病毒基因组结构及同源重复区分析[D].武汉:中国科学院武汉病毒所,1998
- [9] Sambrook J, Rristch EF, Manatis T. Molecular Cloning, 2nd, CHS Press, 1989

表 2 PaorNPV DNA 限制性内切酶片段大小(kb)

Table 2 Sizes of PaorNPV DNA restriction fragments

片段 Fragment	Bam H I	EcoR I	Hind III	Pst I	Xho I
A	27.5	25.6	24.5	20.6	20.3
B	25.5	23.6	21.7	18.6	18.6
C	21.6	20.0	15.8	15.7	13.8
D	17.4	14.4	13.2	14.1	12.5
E	12.4	10.6	10.1	10.8	8.9
F	6.7	9.2	7.9	9.6	8.5
G	5.8	7.2	7.6	9.0	7.8
H	5.0	4.9	7.0	6.3	7.8
I	4.9	4.4	5.7	6.3	5.7
J		3.3	5.6	4.7	5.4
K		2.7	3.0	3.4	3.7
L		2.4	2.1	3.0	3.4
M					2.8
N					2.5
Total	126.8	128.3	124.2	122.1	121.7
Average	124.6				

- [10] Eppstein DA, Thoma TA, Scott HA. Degradation of matrix protein from a nuclear polyhedrosis virus of *Trichoplusia ni* by an endogenous protease [J]. *Virology*, 1975, 67:591 - 594
- [11] Eppstein DA, Thoma JA. Alkaline protease associated with matrix protein of a virus infecting the cabbage looper [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1975, 62:478 - 584
- [12] Keith AH, Payne CC. The properties of three baculoviruses from closely related hosts [J]. *Virology*, 1977, 79:14 - 31
- [13] Payne CC, Kacmakoff J. Alkaline protease associated with virus particles of nuclear polyhedrosis virus: assay, purification and properties [J]. *J Virol*, 1978, 26:84 - 92
- [14] Summer MD, Smith GE. Baculovirus, structural polypeptides [J]. *virology*, 1978, 84:390 - 402
- [15] Bell CD, Orlob GB. Serological studies on virions and polyhedron protein of a nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* [J]. *Virology*, 1977, 78:162 - 172

Analysis of Structural Polypeptides and Restriction Patterns of *Parocneria orientalis* Nuclear polyhedrovirus

ZHAO Xiao-dong¹, ZHOU Jian-hua², DING Qing-quan¹

¹(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

²(Sichuan Academy of Forest, Chengdu 610081)

Abstract: The shape, structure, structural polypeptides and restriction pattern of *Parocneria orientalis* Nuclear polyhedrovirus (PaorNPV) was studied. Assayed by vertical slab SDS-PAGE, polyhedrin treated by heat contained a single polypeptide with molecular weight of 31.5 kD, while polyhedrin untreated by heat contained three polypeptides with molecular weight of 31.5 kD, 29.1 kD, 28.6 kD respectively; virion contained 25 structural polypeptides with molecular weight range from 17.6 kD to 114.6 kD. Digestion of PaorNPV DNA with restriction endonucleases, *Bam*H I, *Eco*R I, *Hind* III, *Pst* I and *Xho* I, resulted in 9, 12, 12, 12 and 14 fragments, respectively. The PaorNPV genome was about 124.6 kilobasepairs (kb).

Key words: *Parocneria orientalis* Nuclear polyhedrovirus (PaorNPV), Structural polypeptides, Restriction endonucleas pattern