

中红侧沟茧蜂多分 DNA 病毒基本特征研究*

李馨¹, 秦启联^{1**}, 丁翠¹, 刘海虹²

(1. 中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100080; 2. 中国农业大学电镜室, 北京 100094)

Characterization of *Microplitis mediator* PolydnavirusLI Xin¹, QIN Qi-lian^{1**}, DING Cui¹, LIU Hai-hong²

(1. State key Lab. of Integrated Management of Insect & Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China; 2. China Agricultural University, Beijing 100084, China)

Abstract: A polydnavirus (PDV) was purified by sucrose density gradient centrifugation from the calyx region of female parasitoid wasp *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). Negative stain technique showed that the virus was tadpole-like and measured 130 × 35 nm. A diverse protein profile of the virus' capsid proteins was displayed by SDS-PAGE. Its genome was composed of over 14 DNA molecules, which were different in molecular size and abundance. Molecular size of the genome was approximate 108 kbp calculated by patterns from six restrict endonucleases digestion. Micro-injection experiment with calyx fluid of the female wasps showed that the virus suppressed growth and development of host of the wasp.

Key words: Polydnavirus; *Microplitis mediator*; Parasitoid wasp

摘要: 本文首次报道中红侧沟茧蜂 (*Microplitis mediator*) 雌蜂卵巢中存在多分 DNA 病毒 (*Microplitis mediator* Polydnavirus, MmPDV), 初步研究了 MmPDV 形态和基本生理生化特征。利用蔗糖密度梯度超速离心分离纯化了 MmPDV 粒子, 电镜负染显示 PDV 粒子分三段, 带有一明显的尾部结构, 大小约为 130 × 35 nm; SDS-PAGE 电泳条带较多, 至少可以分辨出 26 个电泳条带, 表明病毒粒子衣壳蛋白复杂; 琼脂糖凝胶电泳显示 MmPDV 基因组至少由大小不同、丰度不等的 14 个 DNA 分子组成, 用 6 种内切酶 (*EcoR* I, *Hind* III, *Bss* H II, *Pst* I, *Bam* H I, *Bgl* I) 酶切 MmPDV 基因组后, 估算出 MmPDV 基因组大小约为 108 kb。用雌蜂输卵管液注射小地老虎幼虫, 注射后的小地老虎体重和龄期发育动态表明, MmPDV 具有抑制寄主生长发育的生理功能。

关键词: 多分 DNA 病毒; 中红侧沟茧蜂; 寄生蜂

中图分类号: S476.3 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2001)04-0373-04

多分 DNA 病毒 (Polydnavirus, PDV) 是一类共生于膜翅目茧蜂科和姬蜂科某些寄生蜂中性质特殊的昆虫病毒, 在雌蜂输卵管管细胞中复制, 当雌蜂产卵时, 随寄生蜂卵进入寄主体内, 在寄主脂肪体、血细胞等组织器官中表达基因产物, 但并不复制。

PDV 的基因组结构非常独特, 由大小不同的双链环状 DNA 分子构成, 如齿唇姬蜂 (*Campletis sonorensis*) 的 PDV 至少含有 28 种 DNA 分子, 而且这些 DNA 分子在基因组中的丰度不等, 是唯一的基因组由多分子组成的 DNA 病毒^[1]。研究表明, PDV 在寄生蜂成

收稿日期: 2001-01-03, 修回日期: 2001-04-04

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30000017); 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室开放课题 (9912)

作者简介: 李馨 (1976-), 女, 江苏徐州籍, 硕士研究生, 研究方向为昆虫病毒学。

** 通讯作者: 秦启联 (1967-), 男, 江苏南京籍, 副研究员, 博士, 研究方向为昆虫病毒学。

Correspondence author. Tel: 010-62611600, E-mail: qinql@panda.inz.ac.cn

功寄生的过程中发挥了非常重要的作用^[1,2]。对于PDV的研究,国内报道不多,本文首次报道了中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 雌蜂输卵管萼中存在PDV (*Microplitis mediator* PDV, MmPDV),并初步研究了其生化特征,为进一步研究这种性质特殊的昆虫病毒奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 实验昆虫

寄主粘虫 *Pseudaletia separata* 和小地老虎 *Agrotis ypsilon* 在本实验室饲养繁殖多代,中红侧沟茧蜂采自河北保定地区农田,在实验室繁殖多代^[3]。

1.2 病毒粒子的分离纯化

参照 Backage *et al* (1994) 的方法^[2],乙醚麻醉雌蜂,在 Ringer's 生理盐水中,用尖嘴镊拉出卵巢,清洗后放入冰浴的 Ringer's,收集一定量的卵巢用微量玻璃匀浆器(体积为 100 μ L)匀浆,5 000r/min 离心 5min,沉淀用 Ringer's 回收多次,合并上清液共 1mL 左右,作为提纯 PDV 的样品。将样品铺在 25%~65% (w/v) 的蔗糖连接梯度上,360 000g (Hitachi CP70G, P50 转头,离心管容积 5mL),4 $^{\circ}$ C 下离心 4h,在约 42% 密度处有淡蓝色沉降带。收集此沉降带,加 5mL 双蒸水混匀,360 000g 离心 30min,洗去蔗糖,沉淀为纯化的 MmPDV 粒子。

1.3 病毒形态的电镜观察

将纯化的 MmPDV 用适量的蒸馏水稀释,毛细管吸取少量的稀释液滴在铜网上,2% 磷钨酸染色,自然风干,透射电镜 (JEM-2000EX) 观察。

1.4 病毒粒子衣壳蛋白的 SDS-PAGE 分析

纯化的病毒粒子配成 2.5mg/mL 的悬液,进行 SDS-PAGE 垂直板凝胶电泳。浓缩胶 4%,分离胶 9%,电泳槽为 Bio-Rad 公司的 MinProtein II,中等分子量标准蛋白购自 Promega 公司。病毒悬液加 3 倍 SDS 样品缓冲液,100 $^{\circ}$ C 煮沸 4min 变性后上样。恒流 30mA,电泳 1h,考马氏亮兰 R-250 染色。

1.5 MmPDV-DNA 的基因组电泳图谱和内切酶图谱

适量已纯化的 MmPDV 粒子加入等量的蛋白酶 K (100g/mL, 0.02g/mL, Tris, 0.01mol/mL, EDTA, 0.5%, SDS, pH7.8),50 $^{\circ}$ C 孵育 3h。酚,氯仿抽提,无水乙醇沉淀,-75 $^{\circ}$ C 过夜。70% 乙醇洗盐,离心,常温干燥后适量 TE (pH8.0) 溶解。基因组电泳琼脂糖凝胶浓度为 0.4%,内切酶电泳的凝胶浓度为 0.8%,电泳方法参照常规分子生物学实验手册。

1.6 萼液注射实验

解剖羽化 2~3d 的寄生蜂雌蜂,取出卵巢放入 Sf900 昆虫细胞培养液 (GIBCO RRL) 中,每对卵巢加培养液 20 μ L,用尖嘴镊撕破输卵管壁,将其中的萼液释放出,5 000rpm 离心 4min,上清为含萼液的 Sf900,用于注射小地老虎;含寄生蜂毒液的萼液是在上述制备的萼液中加入寄生蜂毒囊,并将毒囊撕破,离心后取上清得到。

注射实验用 4 龄初的小地老虎,设注射萼液、萼液加毒液、细胞培养液 Sf900 (对照) 三种处理,每处理注射 10 头昆虫,重复 3 次。注射时,将小地老虎浸没在蒸馏水中 10min 使其昏迷,吸水纸吸干体表,在解剖镜下,用拉细并标定的毛细管从第一对腹足之一注射 1 μ L 萼液,相当于 0.05 雌蜂当量。



图1 蔗糖密度梯度离心结果
A. 为主沉降带, B. 为次沉降带。

Fig.1 Sucrose gradient centrifugate profile
A, Predominant sedimentary band; B, Accessory sedimentary band.



图2 MmPDV 的形态

Fig.2 Negative stain of MmPDV virus capsid

2 结果

2.1 MmPDV 粒子的形态

利用蔗糖密度梯度超速离心技术可以有效地分离出 MmPDV, 然后从离心后的离心管上能够清晰地

区分出两条沉降带,将之分别称为主沉降带和次沉降带(图 1)。从形态、衣壳蛋白 SDS-PAGE 图谱和 DNA 琼脂糖凝胶电泳等几个特征上都证明两条沉降带物质都是 PDV 病毒粒子(见下文),至于两者密度不同的原因,有待进一步研究。MmPDV 粒子全体分为三段,具一圆形的头部和一细长的尾部(图 2),长约 130nm,宽约 35nm。大小、形态特征同已报道的其它寄主蜂 PDV 基本相符^[1,4]。

2.2 MmPDV 衣壳蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

蔗糖密度离心后可见到两条沉降带(图 1),负染结果显示两条沉降带都是 PDV 粒子,SDS-PAGE 电泳显示,两条沉降带的蛋白谱带一致(图 3),说明两条谱带 PDV 粒子衣壳蛋白之间没有区别。从图 3 可以看出,MmPDV 衣壳蛋白的种类非常丰富,至少可以分辨出 26 个电泳条带,从侧面说明 PDV 是一种非常复杂的昆虫病毒。

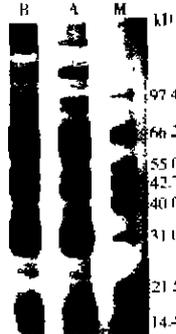


图 3 MmPDV 衣壳蛋白 SDS-PAGE 电泳

A, 主沉降带; B, 次沉降带; M, 分子量标准; 衣壳蛋白加样量为 10 μ g-

Fig.3 SDS-PAGE analysis of MmPDV capsid proteins

A, Predominant sedimentary band; B, Accessory sedimentary band; M, Standard protein. Loading amount of the capsid proteins is 10 μ g.

2.3 MmPDV 基因组特征

大小不等、丰度不同的双链环状的 DNA 分子组成的基因组是多分 DNA 病毒的重要特征,鉴定一个寄生蜂体内分离到的病毒是否为 PDV,最关键的一点是观察这种病毒的基因组是否由多个 DNA 分子构成^[5]。0.4% 琼脂糖电泳表明,MmPDV 基因组至少由 14 个 DNA 分子组成,而且各 DNA 分子的丰度差别很大,呈典型的多分 DNA 病毒基因组的特征(图 4)。同时,主沉降带和次沉降带的 DNA 电泳谱带特征一致,进一步说明两个沉降带的性质相同,都是 MmPDV。

利用 6 种限制性内切酶消化 MmPDV 基因组 DNA,以 *EcoR* I / *Hind* III 双酶切 λ DNA 作分子量标准,计算出 MmPDV 基因组平均分子量约为 108kb (图 5)。

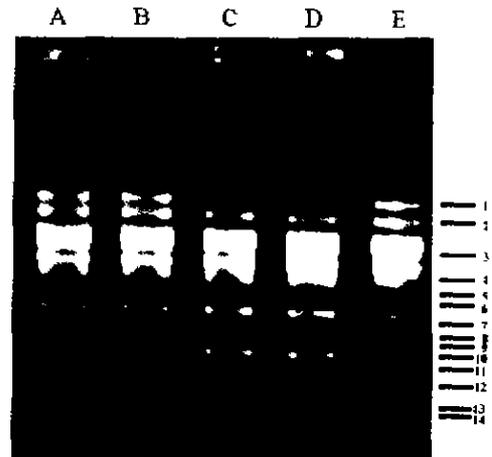


图 4 MmPDV 基因组图谱

A, B, 次沉降带的病毒粒子基因组; C, D, E, 主沉降带的基因组。

Fig.4 Agarose gel electrophoresis pattern of MmPDV genome A and B, Genome DNA from accessory sedimentary band; C, D and E, Genome DNA from predominant sedimentary band.

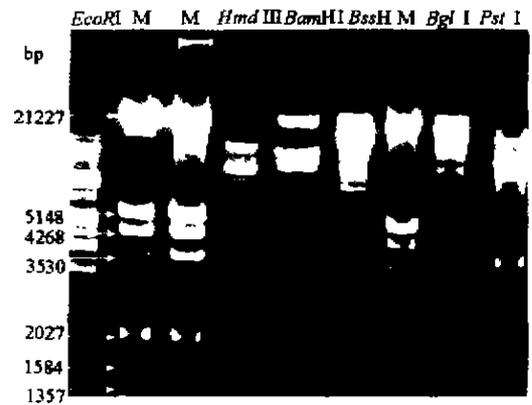


图 5 MmPDV 基因组不同内切酶图谱

(M. 分子量标准; 其它为内切酶名称)

Fig.5 Restriction endonuclease map of MmPDV genome M is molecular weight marker; the others are names of endonucleases.

2.4 MmPDV 的生理功能

寄生蜂的侧输卵管萼液中主要成分是 PDV, 研究表明,萼液的生理功能等同于 PDV^[6]。本实验用注射中红侧沟茧蜂萼液代替纯化的 MmPDV, 研究 PDV 对寄主生长发育的影响。图 6 和图 7 的结果说明,注射萼液后,小地老虎的生长发育都受到了很大的抑制,具体表现为体重低于注射细胞培养液的对照,龄期发育滞后于对照。寄生蜂的毒液协同 PDV 抑制寄主生长发育的生理功能,使之以较小的剂量

发挥较大的效能^[7]。然而本注射实验中并没有看出中红侧沟茧蜂雌蜂毒液具有协同 MmPDV 的效能, 其中的原因还有待研究。

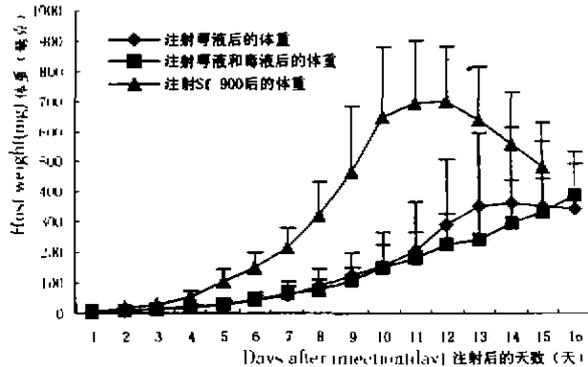


图6 注射毒液后小地老虎体重的动态
注:注射前小地老虎平均体重 7.6 ± 1.8 mg

Fig. 6 Host weight dynamics after injection

Note: average host weight is 7.6 ± 1.8 mg before injection;

- ◆ Host weight after calyx fluid injection;
- Host weight after calyx fluid and venom injection;
- ▲ Host weight after S6900 injection.

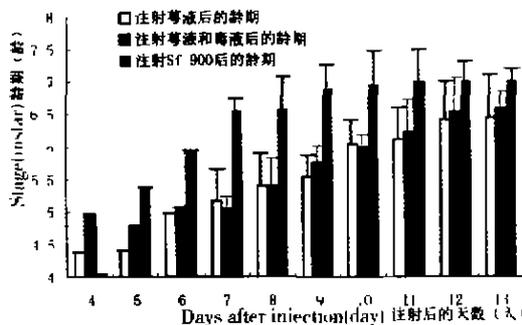


图7 注射 PDV 后小地老龄期的变化

Fig. 7 Host instar dynamics after PDV injection

- Instar after calyx fluid injection
- Instar after calyx fluid and venom injection
- Instar after S6900 injection

3 讨论

已有的研究表明,姬蜂和茧蜂 PDV 的 DNA 分子数目多达十几到几十,而且对于同一种寄生蜂,由于种群、取材时间、实验条件等的不同,很可能产生不同的 DNA 电泳条带数^[8]。从图 4 看出, MmPDV 基因组各 DNA 分子间的丰度(各条带的染色深度)

差别极大,有些条带 DNA 含量极微,尽管本实验利用浓度很低的琼脂糖凝胶(0.4%)进行电泳,区分出 14 个 DNA 条带,然而仍不排除 MmPDV 基因组含有多于 14 个 DNA 分子的可能。

注射实验中,注射毒液和注射毒液加毒液的处理间差别很小,几乎看不出毒液对 PDV 有协同作用,这一结果有两种可能:(1)中红侧沟茧蜂雌蜂的毒液对 PDV 没有协同作用;(2)由于注射剂量方面的原因,毒液的协同作用没有显露出来。从实验设计上,更可能是后一种原因,实验用 0.05 的雌蜂当量注射寄主,这个剂量可能太高,掩盖了毒液所起的生理作用。

致谢:文中照片由中国科学院生物研究所吴国庆先生拍摄,谨表谢意。

参考文献

- [1] Stoltz D B. The polydnavirus life cycle. Beckage NE, Thompson SN, Federici BA (eds), In Parasites and Pathogens of Insects [M]. Academic Press, San Diego, 1993, 167 - 187.
- [2] Beckage N E, Tan F F, Schleifer K W, et al. Characterization and biological effects of *Cotesia congregata* polydnavirus on host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 1994, 26: 165 - 195.
- [3] 秦启联, 龚和, 丁翠, 王方海. 中红侧沟茧蜂在粘虫体内的发育及畸形细胞发生 [J]. 昆虫学报, 2000, 42: 280 - 285.
- [4] Stoltz D B, Vinson S B. Viruses and parasitism in insects [J]. Adv Virus Res. 1997, 24: 125 - 171.
- [5] Stoltz D B, Krell P, Summers M D, et al. Polydnaviridae: A proposed new family of insect viruses with segmented, double-stranded, circular DNA genomes [J]. Intervirology, 1984, 21: 1 - 4.
- [6] Strand M R, Dover B A. Developmental disruption of *Pseudoplusia includens* and *Heliothis virescens* larvae by the calyx fluid and venom of *Microplitis demolitor* [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 1991, 18: 131 - 145.
- [7] Soller M, Lanzrein B. Polydnavirus and venom of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* (Braconidae) induce developmental arrest in the prepupa of its host *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) [M]. Journal of Insect Physiology, 1991, 42: 471 - 481.
- [8] Grossniklaus - Burgin C, Cornat J L, Lanzrein B. Ecdysone metabolism in the host parasitoid system *Trichoplusia ni* [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 1989, 11: 79 - 92.