维普资讯 http://www.cqvip.com

第17卷1期
2002年2月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

17(1):73-76
February 2002

T_4 病毒科一个新成员的分离鉴定*

胡远扬，欧阳国杰，张珈敏，李莉，邬开朗，易福明，尹宜农
（武汉大学病毒研究所，湖北 武汉 430072）

The Isolation and Identification of A New Member of *Tetraviridae* Family from China

HU Yuan-yang, OUYANG Guo-jie, ZHANG Jia-min, LI Li, WU Kai-lang, YI Fu-ming, YIN Yi-nong,
(*Institute of Virology, Wuahn University, Wuhan* 430072, *China*)

Abstract: A New member of *Tetraviridae* family was found and isolated from *Dendrolimus punetatus* larvae in China. Purified virion is icosahedral spheroid with the diameter 44nm and 240 identical subunits in the particle with T=4 symmetry. The nucleic acid in the virion was determined to be single-stranded (ss) RNA by means of diphenylamine reaction, orcinol reaction and formaldehyde reaction. The viral RNA showed one band in agarose gel eletrophoresis (5.2kb). Using SDS-PAGE, there were a major polypeptide band of molecular weight 52 kD and a small polypeptide at 39kD. According to the viral taxonomic principle, the virus belongs to *Nudaurelia capensis* β-like viruses in *Tetraviridae*.

Key words: Tetravirus; Chemical properties; Viral taxon; *Dendrolimus punetatus*

摘要：从松毛虫中分离一种球状二十面体病毒粒子。病毒直径为44nm。通过低温冷冻电镜技术和计算机图像处理技术，研究了该病毒衣壳的三维结构。结果表明，病毒颗粒具双层结构，衣壳由240个亚基组成，分布于T=4的二十面体上。病毒核酸地衣酚反应呈阳性，联苯胺反应呈阴性结果。而紫外吸收实验则呈明显的单链特征，辅以酶消化实验的结果，证实该病毒为单链RNA病毒。琼脂糖电泳显示该病毒RNA分子大小约为5.2kb。SDS-聚丙烯酰胺电泳表明该病毒结构蛋白有一条大小约为52kD主带和一条弱带(39kD)。本病毒是T_4病毒科的一名新成员，这是我国首次报告的T_4病毒科的病毒。

关键词：T_4病毒；化学特性；分类；松毛虫
中图分类号：S763.7　**文章标识码**：A　**文章编号**：1003-5125(2002)01-0073-04

T_4病毒科(*Tetraviridae*)是以病毒衣壳特征分类的一组病毒。迄今发现，只有这一类病毒粒子的正20面体三角剖分数T=4，故将其独立成T_4病毒科并分设了两个正式命名的属；松天蛾β类似病毒和松天蛾ω类似病毒属。由于许多本科可能成员的分子生物学研究资料不完备，所以迄今真正确定为这二属的病毒为数不多。我国至今未见T_4科病毒的研究报告[1]。

近年来，本实验室在云南澄江地区华山松林的罹病马尾松毛虫中分离到一种非包涵体球状病毒。经过对其病毒衣壳结构、结构蛋白性质、核酸特性及分子量的分析研究，证实本病毒应该是T_4病毒科松天蛾β类似病毒属的一个新成员，我们将其暂名为松毛虫β病毒(Dendrolimus punetatus β virus, DpβV)。

国内外尚未见在马尾松毛虫中发现这类病毒的报告。现将研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试验病虫

收稿日期：2001-07-05，修回日期：2001-08-13
* 基金项目：国家自然科学基金资助项目(30170037)
作者简介：胡远扬(1949-)，男，湖北汉川籍，教授，硕士，从事病毒基础及应用研究

维普资讯 http://www.cqvip.com

本实验所用自然罹病马尾松幼虫采自云南澄江地区华山松林和云南松林中。

1.2 病毒分离提纯

主要参照 Nakagaki 方法进行[5]。罹病虫尸经匀浆过滤，差异离心，四氯化碳处理。45%(W/V)蔗糖单梯度 30 000r/min 3h 离心，20%～50%(W/V)蔗糖线性梯度 240 000r/min 2h 离心。分部收集，260nm 光吸收 UV 测定后，洗脱病毒带，得到纯病毒。

1.3 电镜观察

2%PTA(磷钨酸)负染色，H－8100 透射电镜观察。

1.4 含水冷冻病毒样品制备及病毒三维结构重构

将提纯的病毒样品滴于多孔微筛铜网上。快速浸入被液氮冷却的液烷槽中的液态乙烷里，样品被快速冷冻后迅速转移到液氮之中并存放入低温样品盒，移至低温样品台(cryo-holder)后，插入透射电子显微镜中分析照像。

本研究使用加速电压为 400KV 的 JEOL4000 低温电镜，由中国科学院北京电镜室谌东华博士在北京和美国休斯顿医学院完成病毒衣壳三维重构照片拍摄及计算机图像处理。

本文采用欠焦对成像，曝光时间 1－2s，Kodak so-163 底片记录，zeiss SCAI 显微光密计扫描低温电镜照片。照片数值化后数据转换为 MRC 格式，三维重构软件为 UNIX 程序。

1.5 病毒结构蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

分离胶浓度为 10%，浓缩胶浓度为 3%。电泳电压为 100V，电泳时间 3.5h，考马斯亮兰和银染后，扫描和照像。

1.6 病毒核酸提取及特性鉴定

在 eppendorff 管中加入纯病毒，1/10 体积 10% SDS 及 1/80 体积蛋白酶 K，65℃水浴 30min。加入等体积 DEPC(焦碳酸二乙酯)水饱和的酚作用 10min，上相经酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)处理 2 次，无水乙醇沉淀，RNA 沉淀于 DEPC 处理过的双蒸水中，置－20℃备用。二苯胺反应，地衣酚反应，核酸酶反应均按常规方法进行。

1.7 病毒粒子甲醛反应及病毒核酸热变性紫外吸收实验

在提纯病毒粒子中加入甲醛至终浓度 10%。37℃处理，测定其 0h 和 15h 后的 220nm～300nm 的 UV 光吸收值。病毒核酸的热变性紫外吸收曲线测定处理样品温度为 100℃，10min。

2 结果

2.1 病毒粒子的分离及形态

在分析采集自云南澄江地区马尾松毛虫自然罹病死亡幼虫样品中，我们在电镜中同时观察到三种直径不同的病毒颗粒。其中大的颗粒直径 60nm，在病毒 20 面体的十二个顶点可见突起，经实验证实，它是马尾松毛虫质型多角体病毒(DpCPV)的病毒粒子(另文报告)。除了另一种直径为 22nm 的小型球状粒子外，数量最多的是直径约为 44nm 的非包涵体球体球状病毒颗粒。经过 20%～50%(W/V)蔗糖线性梯度离心，回收沉降带，离心洗脱后，可以获得大小均一的高浓度的病毒粒子。用纯化的病毒粒子感染高密度保护围中人工饲养的马尾松毛虫幼虫，可以从罹病马尾松毛虫中回收到同样形态大小的病毒粒子。

提纯的病毒粒子经 2% PTA 感染，在透射电子显微粒下显示高度的一致性(图 1)。病毒粒子呈近似球状的二十面体结构，直径为 44nm。

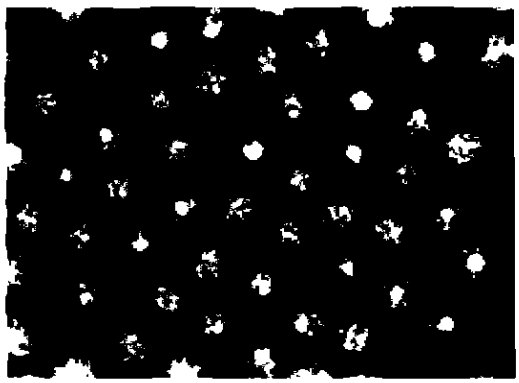

图 1 马尾松毛虫 T_4 病毒的负染色透射电子显微镜照片 (160 000×)

Fig.1 TEM Negative staining electron micrograph of Tetravirus from *Dendrolimus punetatus* (160 000×)

2.2 病毒结构蛋白分析

病毒结构蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图 2 所示。电泳凝胶中有一条主带和一条很弱的带。以标准蛋白质的迁移率作图，计算它们的分子量分别为 52kD 和 39kD(图 2A)。

2.3 病毒核酸性质分析

2.3.1 联苯胺反应和地衣酚反应 提取的病毒核酸在联苯胺反应中为阴性结果，而对照 λDNA 在酸

维普资讯 http://www.cqvip.com

性环境中与二苯胺试剂加热产生兰色并在 595nm 波处有最大光吸收。提取的病毒核酸与地衣酚反应试剂作用后呈鲜绿色且反应产物在 670nm 处有最大光吸收，而 DNA 对照显示阴性。

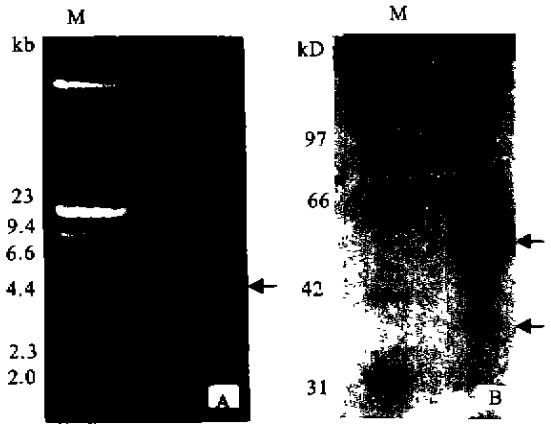

图2　马尾松毛虫 T_4 病毒结构蛋白和 RNA 的分析

A. 结构蛋白的 SDS-PAGE 分析；B. 病毒 RNA 琼脂糖凝胶电泳的分析。

Fig 2　Structural proteins and virus RNA of Tetravirus from *Dendrolimus punetatus* (kD)

A. SDS-PAGE of structural protein; B. Agarose gel electrophoresis of T_4 Virus RNA (bp)

核酸酶消化实验亦与上述结果完全吻合。在设置对照条件下，分别与用 DNase 和 RNase 消化病毒核酸后，立即进行琼脂糖凝胶电泳，结果证明病毒核酸经 DNase 作用不受影响，RNase 消化后没有在凝胶中出现，以上实验结果证实本病毒核酸是 RNA。

2.3.2　甲醛反应和热变性测定　病毒溶液中加入甲醛保温 15h 后，测定其紫外吸收曲线。结果显示，对照不经甲醛处理的样品，处理后的病毒液 260nm 处光吸收增加，且吸收峰向波长较大的位置移动(图3)。而将病毒核酸 100℃ 加热 10min 后，测定其紫外光吸收值，与加热前测定的紫外光吸收曲线基本没有变化，未产生增色效应。上述结果证实本病毒核酸是以单链形式存在。

2.3.3　病毒核酸的琼脂糖凝胶电泳　病毒核酸琼脂糖胶电泳采用 GIBCO 公司的 3-N-吗啡啉丙磺酸(MOPS)缓冲液作为电泳液，经 35V 35min 电泳，比较 λDNA/*Hin*dⅢ 电泳带，确定本病毒 RNA 分子量大小应为 5.2kb(图 2B)。

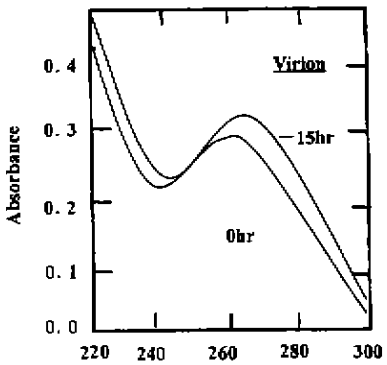

图3　马尾松毛虫 T_4 病毒甲醛反应 15 小时后的吸收光谱测定

Fig. 3　Effect of formaldehyde on the absorption spectrum of *Dendrolimus punetatus* T_4 Virus at zero time and 15h later

2.4　病毒的衣壳结构

利用 400KV 的 JEOL 4000 低温电镜和计算机图像处理技术，在 18Å 的分辨率水平上研究了病毒衣壳的三维结构。

病毒的三维结构是从欠焦范围为 0.9～3.1μm 的 1 043 个病毒颗粒，采用傅立叶—贝塞尔合成法进行三维重构而获得的。在三维重构中合并所有的病毒数据之前，对每个病毒颗粒数据进行了衬度传递函数和包络衰减函数的修正。使用的振幅衬度百分比 Q 为 8%，振幅衰减因子 B 为 120Å^2。为了避免噪音的影响，衬度传递函数 CTF 的绝对值小于 0.15 的相应病毒颗粒数据不用于三维重构。三维结构的有效分辨率通过 FRC 法确定。取 FRC 值为 0.5 时对应的分辨率为重构出的三维结构的有效分辨率。三维结构的分析与显示采用含有用户定制设计模块的 Explorer 三维显示软件包(NAG Inc., Downer's Grove, IL)。三维结构采用比平均密度高 1.2 个标准方差(1.2σ)的等高线密度显示。(Dp βv 冷冻含水电镜及病毒衣壳三维重构结果另文发表)。

研究结果表明，病毒颗粒直径为 44nm，具有双层结构；病毒颗粒外层衣壳共有 80 个结构相似的三聚体，这些三聚体包括 a、b、c、d 四种亚单元，分布在 T=4 的二十面体上；由强加二十面体对称性的三维重构获得的内层 RNA 核心具有 T=1 的二十面体结构(彩版Ⅲ图 4A，图 4B)。该病毒显示典型的 T_4 病毒科衣壳结构特征。

3　讨论

迄今发现的 T_4 病毒科成员的 20 面体等轴对称

维普资讯 http://www.cqvip.com

粒子直径35nm～38nm[1]。衣壳由240个相同的亚基排列形成T=4的表面对称。它们的一个主要多肽的相对分子量为60－70kD,因病毒种类而有所差异。本科病毒的一个属代表种松天蛾β病毒(NβV)的结构多肽有二种,一种是61kD,另一种为8kD。另一属的代表种松天蛾ω病毒(NωV)的结构多肽种类、大小几乎完全相同,一种是62kD,另一种为8kD[2],本病毒结构多肽的主要多肽略小于NβV、NωV,但另一条多肽带明显大于NβV、NωV。这种分子量略为39kD的蛋白带是否是分子量为20kD多肽的二聚体有待进一步分析证实。

将松毛虫中分离的T_4病毒的T_4病毒科所属代表病毒进行比较,(表1)其衣壳特性[3,4]和主要分类学特征几乎完全一致。病毒粒子为非包涵体;大小相近分别为40、41、44nm,球状20面体对称;衣壳20面体三角剖分数T=4,基因组为单链RNA且大小相近(5kb左右,亚基数均为240,结构多肽分别为2种(62kD,8kD)(61kD,8kD)(52kD,39kD)。

表1 松毛虫β病毒与T_4科病毒的比较

Table 1 A comparison of features between Dp β, Tetraviridae family

病毒	20面体对称性	亚基数	粒子大小(nm)	多肽组成	基因组结构
NωV	T=4	240	41	β(62kD) γ(8kD)	RNA_1(5kb) RNA_2(2.5kb)
NβV	T=4	240	39.7	β(61kD) γ(8kD)	RNA_1(5.4kb)
NpβV	T=4	240	44	52kD 39kD	RNA(5.2kb)

根据上述病毒分类数据可以判定,中国分离的马尾松毛虫β病毒可能是T_4病毒科松天蛾β类似病毒属的新成员。由于本病毒的形态大小基因组长度,结构多肽的分子量均与代表种有一定的差异,表明它不同于已报告的T_4科病毒。本病毒的分子生物学特征及基因组结构分析尚在进行中。

致谢 中国科学院北京电镜实验室郭可信院士给予本研究大力指导和支持。同实验室谌东华博士,美国休斯顿医学院周正洪博士完成本病毒衣壳三维结构重构,特此致谢。

参考文献

[1] 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学[M]. 北京:中国农业科学出版社,1998,462.

[2] Johnson J E, Munshi S, Lijas L, *et al*. Comparative studies of T=3 and T=4 icosahedral RNA insect viruses[J]. Arch Virol, 1994,9:497－512

[3] Olson V H, Baker T S, Johnson J E, *et al*. The Three-D imensional structure of frozen-hydrated *Nudaurelia capensis* β virus, a T=4 Insect Virus[J]. J Struc Biol, 1990,105:111-122

[4] Munshi S, Lijas L, Johnson J E, *et al*. The 2.8Å Structure of a T=4 animal virus and its implications for membrane translocation of RNA[J] J Mol Biol, 1996,261:1-10.

[5] Nakagaki M and Kawase S. DNA of a new parvo-like virus Isolated from the silkworm, *bombyx mori*[J]. *J Invert Pathol*, 1980, 35: 124－133.