

中国棉铃虫核型多角体病毒 VHA₂₇₃ 原毒株及其克隆株的比较研究*

贾放, 徐佳, 聂英超, 肖杨, 周蕊, 李小青, 余泽华**

(华中师范大学昆虫学研究所, 湖北武汉, 430079)

Comparison of *Heliothis armigera* NPV VHA273 Wild Isolate with Its Clone*

JIA Fang, XU Jia, NIE Ying-chao, XIAO Yang, ZHOU Rui, LI Xiao-qing, YU Ze-hua**

(Institution of Entomology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: Wild HaNPV-VHA₂₇₃ Multi-nucleocapsid NPV and its clone Single-nucleocapsid NPV H₉ were compared on the shape and structure, biological activity, restriction pattern and structural polypeptide. The LC₅₀ values of the wild and clone isolates for early third instar *H. armigera* larvae were 2.987×10^4 PIBs/mL and 1.647×10^4 PIBs/mL respectively; The LT₅₀ values for 2×10^7 PIBs/mL concentration were 4.866 and 4.797 days respectively. Bioactivities of two isolates were similar. Assayed by SDS-PAGE, there were more difference between VHA₂₇₃ and H₉ structural polypeptides. Digested by *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* and *XbaI*, VHA₂₇₃ and H₉ genomes had some differences in their fragmentation profiles. This discovery will be helpful for revealing the factor what caused the Multi-nucleocapsid NPV and Single-nucleocapsid NPV's formed in molecular level.

Key words: *Heliothis armigera* nuclear polyhedrosis virus (HaNPV); Multi-nucleocapsid NPV (MNPV); Single-nucleocapsid NPV (SNPV); Bioactivity; Structural-polypeptide

摘要: 本文从形态结构、生物活性、核酸限制性内切酶图谱、结构多肽等方面对中国棉铃虫核型多角体病毒 (HaNPV)VHA₂₇₃ 多粒包埋型原毒株及其单粒包埋型克隆株 H₉ 进行了比较研究。它们对中国棉铃虫三龄初幼虫的 LC₅₀ 值分别为 2.987×10^4 PIBs/mL 和 1.647×10^4 PIBs/mL; 当感染剂量为 2×10^7 PIBs/mL 时, 其 LT₅₀ 值分别是 4.866d 和 4.797d。两个毒株的生物活性差别不大。经 SDS-PAGE 分析, 两毒株结构多肽图谱带型相差较大。两毒株基因组经 *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII* 和 *XbaI* 消化后, 得到的内切酶图谱表现为两毒株间有差别。这些差异的发现将有助于从分子水平揭示多粒包埋病毒和单粒包埋病毒形成原因。

关键词: 棉铃虫核型多角体病毒; 多粒包埋型核多角体病毒; 单粒包埋型核多角体病毒; 生物活性; 结构多肽

中图分类号: S43

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 03-0241-05

棉铃虫核多角体病毒能特异性感染棉铃虫, 已有效应用于棉铃虫的生物防治。我所于 1974 年分离得到一株中国棉铃虫核多角体病毒 (*Heliothis armigera* nuclear polyhedrosis virus, HaNPV) 强毒株 VHA₂₇₃, 为多粒包埋型; 此毒株经三轮空斑纯化得到克隆株 H₉, 为单粒包埋型。本文从形态结构、生物活性、结构多肽、核酸限制性内切酶图谱等方面对 HaNPV VHA₂₇₃ 原毒株及其克隆株 H₉ 进行了比较研究。目的在于揭示多粒包埋和单粒包埋核型多

角体病毒形成的原因, 并确定病毒的克隆是否导致病毒的理化性质和生物学特性的改变, 从而为深入了解杆状病毒的感染机制, 构建高毒力重组毒株提供有价值的资料。

1 材料和方法

1.1 病毒毒株

中国棉铃虫核型多角体病毒 (*Heliothis armigera* NPV)VHA₂₇₃ 原毒株为我实验室筛选分离,

收稿日期: 2002-09-23, 修回日期: 2002-11-18

* 基金项目: 国家自然科学基金资助 (39870039)

作者简介: 贾放 (1970-), 女, 硕士研究生, 从事杆状病毒分子生物学研究。

** 通讯作者。Correspondence author.

为多粒包埋型 (MNPV), 命名为 HaNPV-VHA₂₇₃, 简称 VHA₂₇₃^[1]。克隆株是利用多粒包埋型 VHA₂₇₃ 感染 HZ-IB₃ 细胞, 经三轮空斑纯化所得, 为单粒包埋型, 命名为 HaNPV-VHA₂₇₃-H₉, 简称 H₉^[2]。

1.2 多角体的纯化和电镜观察

各病毒材料以喂饲法分别感染中国棉铃虫 3 龄初健康幼虫, 收集典型病死虫尸, 匀浆, 差速离心数次, 30%~60% (w/w) 蔗糖梯度 17 000r/min 离心 30min, 收集多角体沉淀带, 洗糖两次即得纯多角体, 用蒸馏水悬浮, 血球计数板计数后, 4℃ 冷藏备用。

取多角体沉淀用 4% 戊二醛预固定, 磷酸缓冲液漂洗, 1% 的锇酸固定, 经梯度乙醇脱水后, 用苯二甲酸二丙烯酯包埋, LKB-IV 型超薄切片机切片。醋酸铀和柠檬酸铅双染色, 在 HITACHI H-600 型透射电镜下观察并照相。

1.3 两毒株的毒力测定

虫卵由湖北省农科院 Bt 中心提供。28±1℃ 培养孵化, 待长至三龄初, 挑取体重相同的个体供生物测定用。

各毒株共设下列五种浓度用于感染: 2.0×10³ PIBs/mL, 2.0×10⁴ PIBs/mL, 2.0×10⁵ PIBs/mL, 2.0×10⁶ PIBs/mL, 2.0×10⁷ PIBs/mL。每浓度用虫 48 头。在饲料表面分别加入 30μL 不同浓度病毒悬液, 另设一组无病毒对照。从第三天起逐日记录死亡与存活虫数, 第 10 天结束试验。重复测定三次。死亡率在 15%~85% 之间的处理作数据统计。用 SigmaPlot 3.0 软件分析各毒株的死亡率几率值, 微机作图, 求出回归方程及各自的 LC₅₀、LT₅₀、相关系数及其 95% 的置信限。

1.4 病毒粒子的提纯

取多角体悬液 400μL, 12 000r/min 离心 1min, 吸弃上清, 将多角体用 200μL TE 悬浮 (pH7.4) 再加入 200μL 碱解液 (pH10.8), 于 10℃ 冰浴作用 15-20min (使多角体蛋白溶解), 0.5mol/L 乙酸调至 pH8.0, 5000r/min, 5℃, 离心 1min, 去除未碱解物, 上清液 25 000r/min 5℃ 离心 1h (上层为黄色清晰的多角体蛋白), 取沉淀, 悬浮于 TE (pH7.8), 30%-60% 蔗糖密度梯度 25000r/min 离心 1.5h, 收集白色病毒粒子带 (约在 42% 处), TE (pH7.8) 洗 2-3 次。TE 悬浮。

1.5 病毒粒子结构多肽的 SDS-PAGE 分析

参照 Leammli 不连续 SDS-PAGE 系统^[3]。采用 5% 浓缩胶, 12% 分离胶, 浓缩胶用 180v 电压, 分离胶用 150v 电压电泳。各样品上样前 100℃ 水浴煮沸 3min。银染^[4]。

1.6 病毒基因组 DNA 的提取及限制性内切酶分析

1.6.1 病毒基因组 DNA 的提取: 取纯净多角体用 TE (pH8.0) 悬浮, 再加入等体积碱解液, 37℃ 水浴碱解至溶液清亮, 用醋酸调 pH 至 7-8, 碱解产物加入 SDS, 蛋白酶 K, 37℃ 作用 3h, 用酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 抽提 3 次, 用氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提一次后, 上清液加 2 倍体积的冰乙醇沉淀 DNA 2h 或过夜, 离心, 沉淀用 70% 乙醇漂洗, 37℃ 干燥后, 加 TE 溶解, 4℃ 保存备用。

1.6.2 限制性内切酶消化及电泳: 分别用 *EcoR* I, *BamH* I, *Hind* III 和 *Xba* I 消化基因组 DNA, 内切酶购自宝生物工程公司。酶切和电泳具体方法参照文献^[4]进行, 琼脂糖水平平板凝胶电泳, 0.7% 琼脂糖凝胶, 0.5×TBE 电极缓冲液。

2 结果

2.1 两种毒株多角体的形态观察

电镜观察结果显示, VHA₂₇₃ 毒株既有多粒包埋型多角体 (图 1), 又有单粒包埋型多角体。VHA₂₇₃ 毒株的这种包埋特性与吴伯春等的报道一致^[1]。H₉ 毒株为单粒包埋型多角体 (图 2), 与杨忠报道一致^[2]。



图 1 VHA₂₇₃ 多粒包埋型
Fig.1 VHA₂₇₃-MNPV



图 2 H₉ 单粒包埋型
Fig.2 H₉-SNPV

2.2 两种毒株的毒力测定

测定结果表明, VHA₂₇₃ 和 H₉ 两毒株对中国棉铃虫三龄初幼虫 LC₅₀ 值十分接近, 分别为 2.987×10⁴ PIBs/mL 和 1.647×10⁴ PIBs/mL, 95% 置信限分别 1.232×10⁴-7.241×10⁴ 和 4.440×10³-6.110×10⁴。对应的函数图像如图 3 所示。用 2×10⁷ PIBs/mL 的剂量感染三龄初棉铃虫幼虫, 其感染天数对数与死亡几率值之间的回归方程、r 值及对应的函数图像见图 4。发现在此浓度下, VHA₂₇₃ 和 H₉ 两毒株使幼虫死亡的 LT₅₀ 值极其相近, 分别为 4.866d 和 4.797d, 95% 置信限分别 4.499-5.262 和 4.444-5.179。通过以上毒力比较表明两毒株虽包埋型不同, 但毒力差别不大。

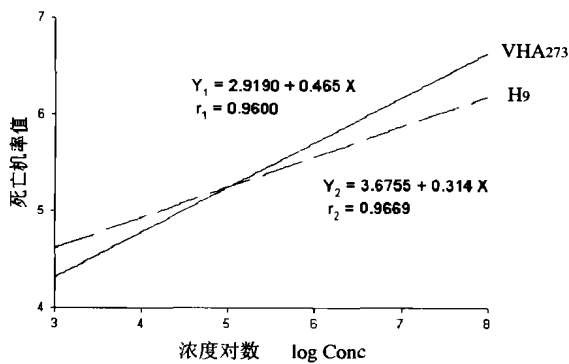


图 3 VHA₂₇₃ 和 H₉ 毒株

分别感染 3 龄初棉铃虫幼虫, 感染浓度对数值与死亡几率值的回归直线。

Fig.3 Regressions of log dosage of VHA₂₇₃ and H₉ isolates on mortality probits

Early third instar *H.armigera* larvae respectively

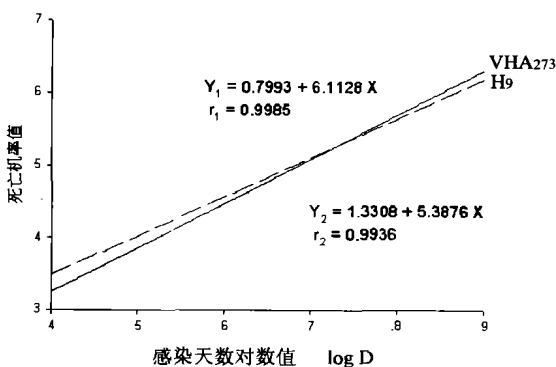


图 4 VHA₂₇₃ 和 H₉ 毒株感染天数对数与死亡几率值的回归直线

在 2×10⁷ PIBs/mL 浓度下, 分别感染 3 龄初棉铃虫幼虫

Fig.4 Regressions of log days of VHA₂₇₃ and H₉ isolates on mortality probits

Early third instar *H.armigera* larvae respectively for 2×10⁷ PIBs/mL concentration

2.3 病毒粒子结构多肽的比较

两毒株病毒粒子结构多肽经 12%SDS-PAGE 分析, 所得图谱见图 5。各组分分子量列表于 1。结果表明原毒株和克隆株结构多肽的带型及蛋白含量存在明显差别。原毒株比克隆株多出了 58.8kDa、38.8kDa 和 36.2kDa 三个片段, 并且原毒株的 36.2kDa 片段含量特别大。克隆株比原毒株多出了 66.9kDa、37.4kDa 和 35.8kDa 三个片段, 另外克隆株 88.2kDa、56kDa 和 49.5kDa 蛋白的含量都比原毒株相应的蛋白含量高。说明多粒包埋的 VHA₂₇₃ 和单粒包埋的 H₉ 是由有差别的病毒粒子结构多肽组成。

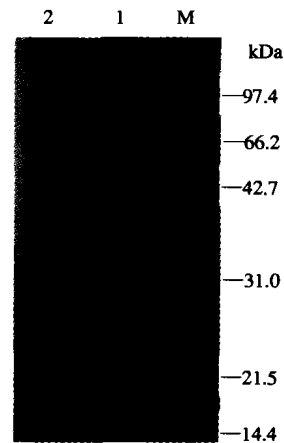


图 5 两毒株病毒粒子结构多肽的 SDS-PAGE 图谱

Fig.5 SDS-PAGE of two isolates structural polypeptides 1, VHA₂₇₃; 2, H₉; M, The standard proteins.

表 1 两毒株病毒粒子结构多肽分子量 (kDa)

Table 1 Molcular weight of the structureal Polypeptides of two isolates (kDa)

Polypeptides	VHA ₂₇₃	H ₉
A	94.5	94.5
B	93	93
C	88.2(little)	88.2
D	72.5	72.5
e	69.3	69.3
f	58.5	66.9
g	56.(little)	56(more)
h	49.5(little)	49.5(more)
i	41.3	41.3
j	38.8	37.4
k	36.2(most)	35.8
l	32.5	32.5
m	29.9	29.9
n	28.5	28.5
o	24.7	24.7
p	23.5	23.5
q	18.7	18.7
r	17.0	17.0
s	16.4	16.4
t	15.5	15.5

2.4 基因组限制性内切酶图谱的比较

用 *EcoR* I, *BamH* I, *Hind* III 和 *Xba* I 分别消化原毒株 VHA273 和克隆株 H9, 经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 所得图谱见图 6。各片段的大小见表 2。

结果表明多粒包埋的 VHA273 与单粒包埋的 H9 有许多不相同的限制性酶切片段。原毒株大小约为 129kb, 克隆株大小约为 124.9kb。用 *EcoR* I 酶切 VHA273, 克隆株比原毒株少了一个 3.7kb 片段; 用 *BamH* I 酶切, 克隆株比原毒株少了一条 3.3kb 片段, 多一条 1.1kb 片段; 用 *Hind* III 酶切, 克隆株比原毒株少了一条 4.4kb 片段; 用 *Xba* I 酶切, 克隆株比原毒株少了 2.5kb、2.1kb、0.8kb、0.7kb 四个片段。

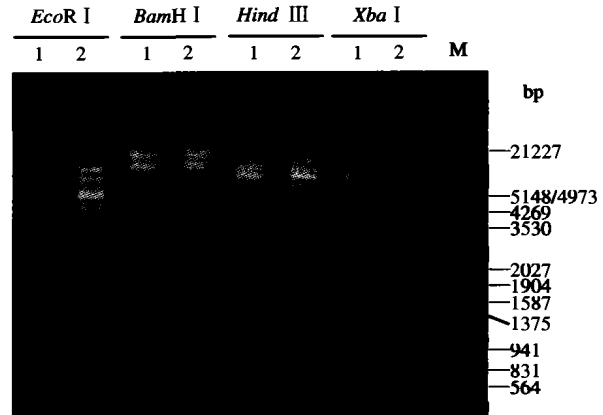


图 6 两毒株基因组限制性内切酶图谱
Fig.6 Engyme digestion fragments of two isolates genome
1, VHA273; 2, H9; M, λ DNA/*Hind* III+*EcoR* I.

表 2 两毒株基因组限制性酶切片断 (kb)

Table 2 Restriction fragments of two isolates genome (kb)

Fragments	VHA273				H9			
	<i>EcoR</i> I	<i>BamH</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Xba</i> I	<i>EcoR</i> I	<i>BamH</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Xba</i> I
A	17.1	36.9	20.3	19.8	17.1	36.9	20.3	19.8
B	16.9	32	17.2	17.1	16.9	32	17.2	17.1
C	12.5	14.3	16.1	12.1	12.5	14.3	16.1	12.1
D	11.2	14.1	16.1	11.8	11.2	14.1	16.1	10.4
E	7.9	12.7	12.4	10.4	7.9	12.7	12.4	9.0
F	7.1	7.7	10.4	9.0	7.1	7.7	10.4	8.2
g	7.0	4.0	10.1	8.2	7.0	4.0	10.1	6.8
h	6.9	3.3	9.9	6.8	6.9	1.9	9.9	6.2
i	6.2	1.9	8.5	6.2	6.2	1.8	8.5	4.1
j	5.8	1.8	4.4	4.1	5.8	1.3	3.2	3.5
k	5.3	1.3	3.2	3.5	5.3	1.1	2.7	2.9
l	4.7		2.7	2.9	4.7		1.6	1.8
m	4.3		1.6	2.5	4.3			1.6
n	3.7			2.1	3.5			1.1
o	3.5			1.8	3.1			1.0
p	3.1			1.6	2.8			
q	2.8			1.1	1.7			
r	1.7			1.0	1.1			
s	1.1			0.8	0.8			
t	0.8			0.7				
Total (kb)	129.6	130.0	132.9	123.5	125.9	127.8	128.5	117.4
Average (kb)		129					124.9	

3 讨论

实验结果表明, 多粒包埋型原毒株 VHA273 经空斑纯化后成为单粒包埋型, 两者对虫体的毒力相似, 但它们的病毒粒子结构多肽表现出明显区别, 基因组酶切片段也有较多不同。

毒力测定结果显示, 原毒株 VHA273 和克隆株 H9 分别感染 3 龄初幼虫, 其 LC_{50} 分别为 2.987×10^4 PIBs/mL 和 1.647×10^4 PIBs/mL, 当用 2×10^7 PIBs/mL 感染 3 龄初幼虫, 其 LT_{50} 分别为 4.866d 和 4.797d, 说明原毒株与克隆株毒力差别很小, 也进而表明病毒经空斑纯化克隆, 未影响其对虫体的感染力。本实

验的 MNPV 型原毒株和 SNPV 型克隆株的毒力差别不大这一结果, 与孙修炼等^[5]人报道棉铃虫 SNPV 的毒力明显高于棉铃虫 MNPV 的结论有差别。也许本实验克隆出的 H9 与野生型棉铃虫 SNPV 的有一定差别。另外, 不同工作者各自进行的独立测定结果很难比较, 这是由于因虫种、虫龄、测定方法和测定条件的不同而结果有很大的变化。本试验对两个毒株进行同步测定, 能够比较真实的反应出各毒株的毒力差别。

对两者的病毒粒子结构多肽分析表明, 它们的病毒粒子结构多肽有较大差别。克隆株与原毒株相比, 既有结构多肽带的缺失, 也有新结构多肽带的出现, 并且图谱显示它们的蛋白含量也有较大变化。其基因组酶切分析也表明两毒株酶切片段存在差异。克隆株与原毒株相比, 既有原毒株所具有的某些片段的丢失, 也有新片段的出现。这些酶切片段的差异, 可能是多粒包埋型的 VHA273 毒株在细胞克隆过程中, 其基因组 DNA 发生随机的点突变而改变了酶的识别序列, 或者是 DNA 片段的缺失或插入造成 (有报道表明利用空斑纯化技术得到的克隆株可能失去一些基因片段^[6])。它们基因组的差异相应的导致病毒粒子结构多肽的差异。例如 DNA 片段的插入或丢失可能导致基因组 DNA 序列重排, 出现新的蛋白或丢失某些蛋白。如果新获得的蛋白或丢失的蛋白为调控因子, 将抑制或增强某些蛋白的表达而引起这些蛋白含量的变化。总之, 基因组的改变, 会使其酶切图谱改变, 最终导致蛋白种类和含量的变化, 表现在 SDS-PAGE 分析图谱上。

在杆状病毒成熟过程中, 决定其囊膜包埋的核衣壳数目的因素目前尚不清楚, 此类报道也不多见。本实验结果反映多粒包埋型 VHA273 和单粒包埋型 H9, 两者在分子水平上存在诸多不同。如上所述, 它们之间差异的酶切片段和结构多肽带中, 很可能存在与病毒包埋型直接相关的基因和蛋白。是

导致多粒包埋型毒株经细胞克隆最终转变为单粒包埋型毒株的原因。进一步实验可把原毒株与克隆株酶切片段中存在差异的片段进行定向缺失, 构建重组病毒, 观察其病毒粒子的形态结构变化, 找出决定病毒包埋型的基因, 并将其在病毒基因组中定位。从而初步揭示囊膜包埋核衣壳数目的机制。

本实验的 VHA273 毒株和 H9 毒株的基因组限制性内切酶图谱分别与吴柏春^[7]和杨忠^[2]报道的条带数目和大小有所差异。VHA273 毒株病毒粒子结构多肽图谱与吴柏春^[8]报道的也有所不同。由于这类病毒基因组庞大, 对其 DNA 进行分子量测定, 存在小分子量带分辨不出而丢失, 大分子量带的迁移率不易测准, 及大小非常相近的片段互相重叠而造成判断上的失误等因素, 测量误差是不可避免的

参考文献

- [1] 华中师院生物系昆虫病毒组. VHA273 病毒的电镜观察简报 [J]. 华中师院学报 (自然科学版), 1977, 11 (1): 24
- [2] 杨忠, 黎路林, 洪华珠. 中国棉铃虫核型多角体病毒 VHA273 毒株的克隆及基因组物理图谱 [J]. 中国生物防治, 1996, 12(4): 150-155
- [3] Leamli U K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage 7 [J]. Nature (London), 1970, 227: 680-685
- [4] Sambrook J, Fritsch, E F, Maniatis T. Molecular Cloning [M], 2nd ed. CHS Press, 1989
- [5] 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, 12(4): 309-318
- [6] Munoz D M, Arif B, Krell P J, et al. Genomic variation among *in vivo* cloned genotypes of a Spanish field isolate of the nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua* (Se MNPV). Abstract of 29th Annual Meeting of SIP, Cordoba, Spain. 1996, 56
- [7] 吴柏春, 王行国. 中国棉铃虫核型多角体病毒 VHA273 毒株 DNA 的特性 [J]. 病毒学报, 1990, 6 (4): 352-357
- [8] 吴柏春. 中国棉铃虫核型多角体病毒 VHA273 毒株病毒粒子结构蛋白及超微结构的研究 [J]. 华中师范大学学报 (自然科学版), 1994, 28 (3): 383-387