

## 亚洲小车蝗痘病毒增效因子的初步研究

李永丹, 赵朝阳, 王丽英

(中国农业大学植保学院昆虫学系, 北京, 100094)

Preliminary Study on the Enhancing Factor of *Oedaleus asiaticus* Entomopoxvirus

LI Yong-dan, ZHAO Chao-yang, WANG Li-ying

(Entomology Department, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** *Oedaleus asiaticus* entomopoxvirus (DaEPV) contains a factor which enhances the infection of *Metarhizium flavoviride* in the grasshopper *Oedaleus infernalis*. When the spheroids of OaEPV were dissolved with 2×SDS spheroid alkaline solution and centrifuged, the enhancing activity of the supernatant was 2.5 times higher than in the pellet. The enhancing activity of spheroid proteins depended on the alkali used to dissolve the spheroids. The greatest activity was detected with spheroid alkaline solution, followed with 0.02 mol/L NaOH, and none with 8 mol/L urea. Spheroid proteins were fractionated on a sephadex G-200 column. Two fractions were obtained and the second fraction had the enhancing activity. SDS-PAGE indicated the molecular weight of the active fraction was 40 kDa.

**Key words:** OaEPV; Spheroid protein; Enhancing factor

**摘要:** OaEPV 经 2×SDS 包涵体碱性裂解缓冲液裂解, 离心, 分别用上清液及沉淀与绿僵菌孢子混合感染黄胫小车蝗, 上清液的增效活性比沉淀大 2.5 倍。用三种不同方法 (2×SDS 包涵体碱性裂解法, 0.02 mol/L NaOH 裂解法, 8 mol/L 尿素裂解法) 裂解 OaEPV 所得蛋白液与绿僵菌混用, 生测结果表明, 包涵体裂解液法制备所得蛋白增效活性最高, NaOH 裂解法次之, 尿素裂解法制备的蛋白几乎没有增效活性。将 OaEPV 用包涵体碱性裂解液裂解后, 用葡聚糖 G-200 凝胶柱层析进行分离, 出现两个洗脱峰, 这两个峰的洗脱液浓缩后进行生物测定, 初步表明增效作用主要为第二个峰的蛋白片段。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 第二个峰的蛋白片段的分子量为 40 kDa 左右。

**关键词:** 亚洲小车蝗痘病毒; 包涵体蛋白; 增效因子

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 05-0478-04

1959 年, Tanada 首次描述了美洲粘虫 (*Pseudaletia unipuncta*) 的颗粒体病毒 (*Pseudaletia unipuncta granulosis virus*, PuGV) 对美洲粘虫核型多角体病毒 (*Pseudaletia unipuncta nuclear polyhedrosis virus*, PuNPV) 的增效作用<sup>[1]</sup>。1989 年, Zhu 等在 PuGV 的囊膜上鉴定并提纯一种具有增效作用的脂蛋白。随后在多种 GV 及 NPV 中发现了类似的增效因子。通过血清学及基因分析, GV 及 NPV 的增效因子都具有一定的相似性, 并将其统一定名为

增强素 (enhancin, En)<sup>[2]</sup>。

有关昆虫痘病毒 (Entomopoxvirus, EPV) 增效因子的第一个报道是 Xu 等发现草地粘虫痘病毒 (*Pseudaletia separata* EPV, PsEPV) 能促进草地粘虫颗粒体病毒 (*Pseudaletia separata* NPV, PsNPV) 对其寄主昆虫的感染, 并从 PsEPV 包涵体 (spheroid) 中提到一种分子量为 38 kDa 的增效蛋白。并对此蛋白进行了生化性质的测定, 证明此增效蛋白是一种糖蛋白, 虽然它与 GV 增效因子在血清学上没有同

收稿日期: 2003-03-04, 修回日期: 2003-04-15

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770512)

作者简介: 李永丹 (1966-), 女, 讲师, 在职博士。从事昆虫病理学研究。E-mail: yongdanli@cau.edu.cn Tel: 62891306

源性,但两者在氨基酸组分上却颇为相近,酸性氨基酸的含量都较高<sup>[3, 4]</sup>。

亚洲小车蝗痘病毒 (*Oedaleus asiaticus entomopoxvirus*, OaEPV) 是本实验室于 1994 年于内蒙草原蝗虫亚洲小车蝗上分离获得, 并对其形态、超微结构、生化特性、杀虫效果及包涵体蛋白基因等均进行了较详细的研究<sup>[5-10]</sup>。近年经多次实验证明, OaEPV 可以增强绿僵菌对蝗虫的感染, 因此认为 OaEPV 存在着增效因子, 本文即是对 OaEPV 增强因子的初步探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

亚洲小车蝗痘病毒 (OaEPV) 以黄胫小车蝗 (*Oedaleus infernalis*) 为寄主增殖获得。黄胫小车蝗 (*Oedaleus infernalis*) 由本实验室饲养。在无菌条件下, 挑取绿僵菌 (*Metarhizium flaroviride*) 到 PDA 培养基中, 25 °C 温箱中培养一星期左右, 收获孢子粉 4 °C 保存。

### 1.2 生物测定方法

将黄胫小车蝗 3 龄幼虫单头装入指型管, 饥饿 24 h, 并分数组, 分别接种如下: 空白对照组, 喂以纯净小麦叶片; 绿僵菌对照组, 喂以附有  $1 \times 10^5$  绿僵菌孢子的小麦叶片 (叶片大小为 5 mm<sup>2</sup>); 处理组, 喂以附有 10 μL OaEPV 裂解悬液 (或 10 μL 蛋白峰浓缩液) 和  $1 \times 10^5$  绿僵菌孢子混合物的小麦叶片。第 2 d, 将毒饵食光的作为试虫 (每组试虫 45 头, 三次重复), 分别混合入笼, 添加新鲜小麦叶片正常饲养, 每天观察记录死虫数。

### 1.3 几种 OaEPV 裂解液的制备

1.3.1 包涵体裂解缓冲液处理 OaEPV: 取  $1 \times 10^7$  纯化 OaEPV 包含体加入 2×SDS 包涵体碱性裂解缓冲液 (0.3 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.5 mol/L NaCl, 0.03 mol/L EDTA, 0.1 mol/L 2-巯基乙醇, pH 11.5) 1 mL, 37°C 水浴 30 min, 4 000 r/min 离心 5 min, 除去大的碎片。15 000 r/min 离心 15 min, 上清液, 装入透析袋中, 0.02

mol/L PBS (pH 8.0) 透析过夜, -20°C 保存备用。沉淀以 0.02 mol/L PBS (pH 8.0) 洗涤后, 加 1 mL 0.02 mol/L PBS (pH 8.0) 制成悬液, 4°C 保存。

1.3.2 NaOH 处理 OaEPV:  $1 \times 10^7$  纯化 OaEPV 包含体加入 0.02 mol/L NaOH 溶液 1 mL, 室温下裂解 2 h, 离心, 取上清, 0.02 mol/L PBS (pH 8.0) 透析过夜, -20°C 保存备用。

1.3.3 尿素裂解液处理 OaEPV:  $1 \times 10^7$  纯化 OaEPV 包含体加入 1 mL 8 mol/L 尿素裂解液 (0.1 mol/L PBS pH 7.8 配制, 含 0.2 mol/L SDS, 0.5 mol/L 2-巯基乙醇), 沸水浴 5 min, 离心, 取上清, 0.02 mol/L PBS (pH 8.0) 透析过夜, -20°C 保存备用。

### 1.4 葡聚糖 G-200 凝胶柱层析

取  $1 \times 10^8$  纯化 OaEPV 包含体加入 2×SDS 包涵体碱性裂解液 10 mL, 37°C 水浴 30 min, 离心, 取上清液, 0.02 mol/L PBS (pH 8.0) 透析过夜, 葡聚糖 G-200 凝胶柱层析, 以 0.02 mol/L PBS (pH 8.0) 洗脱, BIO-RAD 公司蛋白纯化系统检测分离, 收集的蛋白溶液, 浓缩至 10 mL, 透析过夜。-20°C 保存备用。

### 1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳

OaEPV 包涵体裂解液、病毒粒子悬液及层析回收的蛋白片段 5 μL 加等体积的 2×SDS 蛋白加样缓冲液, 沸水浴 3 min, 10% SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R-200 染色, 脱色后扫描照相。

## 2 结果与分析

### 2.1 OaEPV 包涵体蛋白溶液与病毒粒子的增效作用比较

将  $1 \times 10^7$  OaEPV 包涵体以 1 mL 2×SDS 包涵体碱性裂解缓冲液裂解, 低速离心后, 除去大的包涵体碎片, 再经高速离心, 上清液为包涵体蛋白溶液, 沉淀为病毒粒子和少量未裂解的包涵体碎片, 沉淀加 1 mL 0.02 mol/L PBS 制成悬液, 上清液及沉淀悬液分别以 10 μL 与  $1 \times 10^5$  绿僵菌孢子混合感染黄胫小车蝗, 生测结果见表 1, 上清液与绿僵菌混

表 1 包涵体碱性裂解缓冲液裂解 OaEPV 上清液及沉淀的增效作用

Table 1 Enhancing Activity of Spheroid Protein and Virions

Treatment	No. death			Adjusted mortality			Enhancement(%)		
	5d	6d	7d	5d	6d	7d	5d	6d	7d
<i>M. flaroviride</i> spores	3	5	10	6.7	11.1	22.2	—	—	—
<i>M. flaroviride</i> spores +The supernatant	4	8	21	8.9	17.8	46.7	2.2	6.7	24.5
<i>M. flaroviride</i> spores +The pellet	3	7	13	6.7	15.6	28.9	0	4	7.0
Control	0	0	0	0	0	0	—	—	—

用的增效率 7d 为 24.5%，而沉淀与绿僵菌混用的增效率 7d 为 7%，上清液的增效活性比沉淀大 2.5 倍，初步证明 OaEPV 的增效活性是在包涵体蛋白中，而非在病毒粒子上。

## 2.2 不同裂解方法所得 OaEPV 包涵体蛋白对绿僵菌感染黄胫小车蝗的增效性比较

为了获得高活性的包涵体蛋白溶液，分别用三

种不同的裂解液各 1mL 裂解  $1 \times 10^7$  OaEPV 包涵体，分别用 10 $\mu$ L 与  $1 \times 10^5$  绿僵菌孢子混用，单头接种黄胫小车蝗 3 龄若虫。结果（表 2）表明，2 $\times$ SDS 包涵体碱性裂解液裂解制备的蛋白增效作用最为明显，7d 增效率为 20%，0.02MNaOH 裂解制备的蛋白也具有一定增效性，7d 增效率为 8.9%，而尿素裂解所得蛋白几乎没有增效性。

表 2 不同裂解方法所得 OaEPV 球状体蛋白的增效性比较  
Table 2 Enhancing Activity of Spheroid Proteins Dissolved in Various Ways

Treatment	No. death			Adjusted mortality			Enhancement(%)		
	5d	6d	7d	5d	6d	7d	5d	6d	7d
<i>M. flaroviride</i> spores	6	8	12	13.3	17.8	26.7	—	—	—
<i>M. flaroviride</i> spores + spheroid proteins (with spheroid alkaline solution)	7	14	21	15.5	31.1	46.7	2.2	13.3	20.0
<i>M. flaroviride</i> spores + spheroid proteins (with NaOH)	6	10	16	13.3	22.2	35.6	0	4.4	8.9
<i>M. flaroviride</i> spores + spheroid proteins (with urea)	6	8	13	13.3	17.8	28.9	0	0	2.2
Control	0	0	0	0	0	0	—	—	—

经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，结果表明，采用不同裂解方法获得的包涵体蛋白溶液不尽相同（图 1）。2 $\times$ SDS 包涵体碱性裂解液与 NaOH 裂解制备的包涵体蛋白明显为两个蛋白片段，但 NaOH 裂解效果较差，可能与裂解液中未加巯基乙醇有关。尿素裂解的包涵体蛋白主要为一条蛋白片段，分子量约为 105kDa，尿素可以抑制包涵体蛋白碱性蛋白酶的活性，这与本实验室早期研究所得结果相同。再者，2 $\times$ SDS 包涵体碱性裂解液裂解 OaEPV 所得沉淀的电泳图谱与早期研究的病毒粒子结构蛋白的电泳图谱很相近。

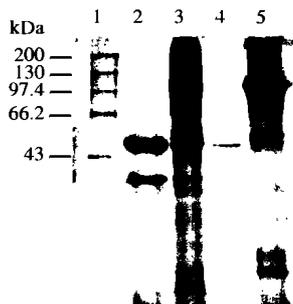


图 1 三种方法制备包涵体蛋白电泳图

1, Marker; 2, 包涵体碱性裂解液裂解 OaEPV 上清液; 3, 包涵体碱性裂解液裂解 OaEPV 沉淀; 4, NaOH 裂解 OaEPV; 5, 8mol/L 尿素裂解液 OaEPV.

Fig. 1 SDS-PAGE Patterns of Spheroid Proteins Dissolved in 3 different Ways

1, Marker; 2, Spheroid proteins dissolve with spheroid alkaline solution; 3, The virions; 4, Spheroid proteins dissolve with NaOH; 5, Spheroid proteins dissolve with urea.

## 2.3 包涵体碱性裂解液处理所得包涵体蛋白片段增效性比较

取  $1 \times 10^8$  纯化 OaEPV 包含体，经 10 mL 2 $\times$ SDS 包涵体碱性裂解液裂解，0.02 mol/L PBS (pH 8.0) 透析，用葡聚糖 G-200 凝胶柱层析，BIO-RAD 公司蛋白纯化系统检测分离。获得的洗脱曲线，可见两个明显的蛋白峰（图 2）。

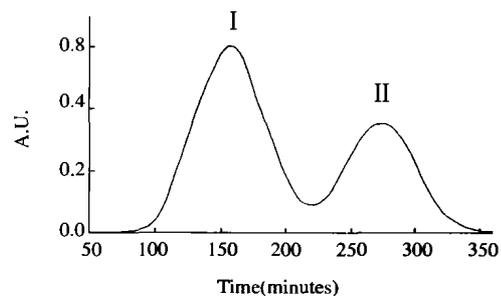


图 2 经葡聚糖 G-200 柱洗脱的蛋白片段

Fig.2 Fractionation of Spheroid Proteins on a Sephadex Column

两个蛋白峰分别收集，浓缩至 10 mL，0.02 mol/L PBS (pH 8.0) 透析后，各以 10  $\mu$ L 与  $1 \times 10^5$  绿僵菌混用，感染黄胫小车蝗 3 龄若虫进行生测，结果表明（表 3），蛋白 II 峰增效作用明显，7d 增效率为 20%，蛋白 I 峰增效作用不明显，7d 增效率只有 2.2%。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析，峰 II 的蛋白片段分子量为 40 kDa（图 3）。

表 3 两个包涵体蛋白片段的增效活性

Table 3 Enhancing Activity of Peaks Obtained by Sephadex Chromatography

Treatment	No. death			Adjusted mortality			Enhancement(%)		
	5d	6d	7d	5d	6d	7d	5d	6d	7d
<i>M. flaroviride</i> spores	4	7	11	8.9	15.6	24.4	—	—	—
<i>M. flaroviride</i> spores + The protein peak I	5	8	12	11.1	17.8	26.6	2.2	2.2	2.2
<i>M. flaroviride</i> spores + The protein peak II	7	14	20	15.5	31.1	44.4	6.6	15.5	20.0
Control	0	0	0	0	0	0	—	—	—

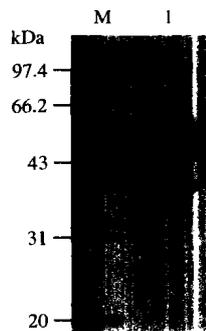


图 3 浓缩后蛋白峰 II 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE Pattern of the Second

M, Protein Peak; I, Peak II.

根据实验可以确定 OaEPV 的增效因子在包涵体蛋白上, 分子量约为 40kDa。这与 Xu 等报道的草地粘虫痘病毒增效因子相似。至于 OaEPV 对绿僵菌感染寄主的增效机理推测很可能也与杆状病毒相似, 这些工作正在进一步研究中。

## 参考文献

[1] Tanada T. Synergism between two virus of the armyworm, *Pseudaletia*

*unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera Noctuidae) [J]. *Invert Pathol*, 1959, 1: 215-231.

- [2] 廖玲洁, 彭建新, 洪华珠, 等. 昆虫病毒增强蛋白的研究新进展[J]. 中国生物防治, 1999, 15(1): 41-44.
- [3] Xu J, Hukuhara T. Enhanced infection of a nuclear polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia separata*, by a factor in the spheroids of an Entomopoxvirus [J]. *Invert Pathol*, 1992, 60: 259-264.
- [4] Xu J, Hukuhara T. Biochemical properties of enhancing factor of an entomopoxvirus [J]. *Invert Pathol*, 1994, 63: 14-18.
- [5] 高灵旺, 王丽英, 谢克勉, 等. 亚洲小车蝗田间杀虫效果[J]. 中国生物防治, 1997, 13(4): 157-158.
- [6] 王丽英. 我国草原蝗虫痘病毒资源调查 [J]. 中国农业科学, 1994, 27(4): 60-63.
- [7] 王丽英, 王思芳, 任钢, 等. 经黄胫小车蝗增殖的亚洲小车蝗痘病毒 DNA 和结构蛋白特性 [J]. 病毒学报, 1995, 11(4): 351-355.
- [8] 王思芳, 王丽英, 等. 亚洲小车蝗痘病毒室内杀虫效果[J]. 中国生物防治, 1995, 13(1): 17-19.
- [9] 赵朝阳. 球状体蛋白基因克隆测序及增效性[D]. 北京: 中国农业大学, 2000.
- [10] Wang L Y, Ren G, Wang S F, et al. Studies on the morphology and development of the entomopoxvirus from *Oedaleus asiaticus* produced in *Oedaleus infernalis*[J]. *Entomologia Sinica*, 1995, 2(4): 321-329.