

簡 報

家蚕脓病病毒脫氧核糖核酸感染性的初步探討*

高尙蔭 蔡宜权

(中国科学院武汉微生物研究所病毒室,武昌)

1956年 Schramm 氏^[1]和 Frankel-Conrat 氏^[2]分别发现烟草花叶病毒核糖核酸具有感染性,此后由若干植物和动物病毒也获得了感染性核糖核酸制备^[3-17],正如 Knight 氏^[18]最近指出:感染性核酸,除烟草花叶病毒的感染性核糖核酸外,并未经过严格的检定,很可能在制备中尚有蛋白质或其他感染性所需的物质存在。至于脫氧核糖核酸是否具有感染性问题,研究者能以噬菌体的脫氧核糖核酸感染赤裸原生质体而不能感染完整细菌来证明^[19-23],其他如多瘤病毒^[24]、Shope 乳头瘤病毒^[25]、SV₄₀ 因子^[26]和腺病毒的脫氧核糖核酸也证明具有感染性。然而,同样存在着相反的结果^[19,28,30]。

鉴于由多角体分离的脫氧核糖核酸是否具有感染性,其结果尚不一致。为此,我们进行了由家蚕核型脓病病毒分离脫氧核糖核酸并探讨其感染性的试验。

材料和方法

实验动物 全部试验采用之家蚕品种为“九×汗”,该品种家蚕口腔感染核型多角体或病毒与经环节间膜穿刺接种病毒均表现敏感。

试剂 酚,AR., 经双蒸后使用。乙醚,CP., 双蒸后用于本实验。

多角体制备 取五龄起蚕,用脓病蚕血液行环节间膜穿刺接种,俟发病后收集其血液与移除肠道后之蚕体,然后按 Bergold 氏^[31]法进行多角体的分离与提纯。

核酸的分离 基本上按 Gierer 和 Schramm 二氏^[1]方法进行,而以水楊酸鈉溶液^[32]代替磷酸盐缓冲液,其步骤如下:将多角体悬浮于 0.155M 水楊酸鈉溶液中,此悬液与等量之酚——0.155M

水楊酸鈉混合液(80%, V/V)混合,强烈振荡 8 分钟,继用 3,000rpm 10 分钟离心分层,上层液相再重复提取二次,时间分别为 5、3 分钟。留存于第三次上层液相之酚用等量乙醚抽提五次去除,乙醚则以导入氮气流来排除。

感染力测定 经饥饿 4 小时以上的三龄起蚕用于本实验,核酸制备经口腔强迫进食与环节间膜穿刺接种测定其感染力;而多角体则以十进稀释法冲淡后经口腔强迫进食测定之。被感染之家蚕观察二龄,LD₅₀ 按 Reed 和 Muench 二氏^[33]法计算。

蛋白质测定 按 Schuster 氏等^[34]法进行。

脫氧核糖核酸测定 按 Burton 氏^[35]法进行。

核酸制备的光谱吸收特性在 Jobin & Yvon 分光光度计上进行测定^[1]。

实验结果

提纯后之多角体按 Zevchova 氏^[36]法染。镜检,未发现可见之杂质存在,其形态呈六角或八角形。风干多角体用蒸馏水制成 1.0%(W/V) 的悬液。每头经口腔强迫进食 0.02 毫升,以测定其感染力,两次结果见表 1。

由表 1 可以看出,在本实验条件下 LD₅₀ 为 2—6.5 × 10⁻⁷ 克多角体。

脫氧核糖核酸制备液当加入双倍体积的

* 参加部分实验工作的还有吴远明、夏秀琴、余兰芬、丁梅卿、智再新等同志;镇江蚕业研究所保护系对多角体的收集及家蚕饲养工作给予大力支持,特此致谢。

本文为中国微生物学会 1963 年学术年会稿件。

1) 武汉药物检定所程竞芬先生在测定中给予技术上的协助特此致谢。

表 1 多角体的毒力測定

实验号	稀 释 度	感染头数	死亡头数	死亡百分数
1*	原液	15	15	100
	10 ⁻¹	15	15	100
	10 ⁻²	15	10	75
	10 ⁻³	15	5	25
	对照	5	0	0
2	原液	10	10	100
	10 ⁻¹	10	10	100
	10 ⁻²	10	10	100
	10 ⁻³	10	5	50
	对照	10	0	0

* 三組試驗之总和。

96%乙醇后，即見有絲状体出現，此絲状体經 3,000rpm 离心分出，再經 67%乙醇洗滌一次，重悬于 0.02M 磷酸盐緩冲液(pH 7.2)中(加至原始体积)。其中一部分用于核酸定量測定，另一部分則用于光譜吸收測定。后一測定的一次結果見图 1。

核酸制备之最大吸收位于 257—259 毫微米波长范围内，最小吸收位于 231 毫微米波长处，因而制备呈現有核酸特有之光譜吸收特性(在所有

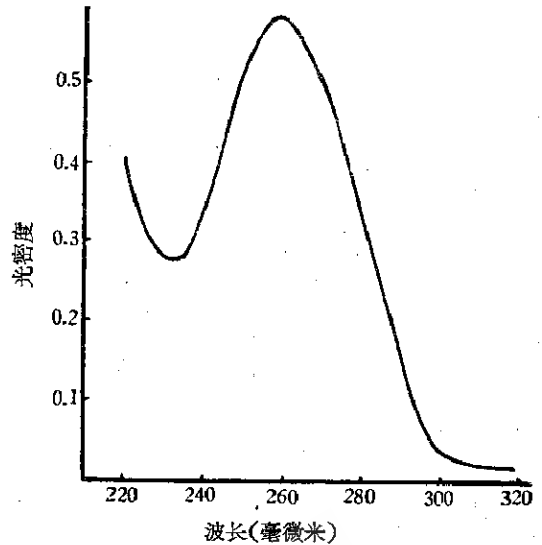


图 1 核酸制备的吸收光譜(0.02 M 磷酸盐緩冲液, pH7.2, 稀釋 5 倍)

測定中仅有一次例外，即 249 毫微米处出現一峯)。

未經乙醇处理之核酸制备直接用于蛋白質的檢定。試驗中未見有蛋白質特有之双縮脲反应，所以核酸制备中即使含有蛋白質也是极微量的。

核酸制备感染性的实验結果見表 2。

表 2 家蚕膿病病毒脱氧核糖核酸的感染性

实验号	制备温度 (°C)	脱氧核糖核酸 (微克/毫升)	感 染 途 径					
			口 腔			血 淋 巴		
			感染量 (毫升/头)	感染数	存活数	感染量 (毫升/头)	感染数	存活数
1	5—5.5	—	0.01	10	10	—	—	—
2	4.5—5	—	0.007	14	13*	0.005	10	10
3	4.5—5	—	0.008	10	10	0.002	7	7
4	8—8.5	100.3	0.0058	2	2	0.0013	8	8
5	7.5	210	0.008	13	13	0.0013	12	11**
6	7.5—8.5	154	0.008	9	9	—	—	—

* 真菌病引起死亡，鏡檢有少量多角体；

** 脓病引起死亡。

由表 2 可以看出，在本实验条件下 1.68 × 10⁻⁶ 克/头經口或 2.73 × 10⁻⁷ 克/头經环节間膜穿刺接种均未引起发病。

討 論

Bergold 氏从家蚕核型多角体中分离出的脱氧核糖核酸，其感染性用作者自己的話說是“令人窘感的低”，大約为原始活性的 0.0001%。Bergold 氏的实验結果^[29,37]至今尚未詳細报导。我們采

用与該作者类似的方法来提取同一类型病毒的脱氧核糖核酸，并未証实其結果。我們分离的核酸制备無論經口腔强迫进食或經环节間膜穿刺接种均未引起可見的外部病征。本实验用以注射家蚕的脱氧核糖核酸量較 Bergold 氏实验中所用者高 2.7 倍，較以完整病毒微粒导致感染时核酸的含量^[31]高 500,000—1,000,000 倍；口腔强迫进食的核酸量較同一情况下用多角体造成感染时核酸的含量高 300—1,000 倍。所以，我們試驗中的阴

性結果,不可能是由于用量不足所导致。

Ильяхенко 氏^[39]报导由 T_{2r}+ 噬菌体和 T₇ 噬菌体感染細菌分离的脫氧核糖核酸均不能使 *E. coli* B 原生质体感染。不久前, Babel 和 Wolff 二氏^[28]也报导了由牛痘病毒或其感染細胞分离感染性脫氧核糖核酸未获成功的实验。Гершензон 氏^[30]由 *Antheraca peryni* 多角体体中分离出的无蛋白质核酸,也发现沒有感染性。然而把其核酸制备与蛋白质混合并于注射前放置若干時間則約有 44% 的蛹死于多角体病,最近, Smull 和 Ludwig 二氏^[38]同样发现某些碱性蛋白质能够增加脊髓灰质炎病毒核糖核酸对 HeLa 細胞的感染力。在 Bergold 氏的核酸制备中作者提出含有某种蛋白质,而我們的制备給予阴性的双縮脲反应。因此,我們认为結果不同現在可能給予唯一的解释是:与两种制备中有否蛋白质相关。

关于脫氧核糖核酸感染性的阳性和阴性結果,目前难以作出圓滿的解释。若干可能性虽已为 Babel 和 Wolff 二氏提出和討論,但要弄清这一問題还有待进一步的工作。

小 結

由家蚕核型多角体分离出脫氧核糖核酸,經口腔强迫进食和环节間膜穿刺接种法感染家蚕,結果表明离体核酸无感染性。

参 考 文 献

- [1] Gierer, A., and Schramm, G.: *Nature*, 177: 702, 1956.
- [2] Frcankel-Conrat, H.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 78:882, 1956.
- [3] Colter, J. S., Bird, H. H., Moyer, A. W. and Brown, R. A.: *Viol.*, 4:522, 1957.
- [4] Wecker, E., and Schäfer, W.: *Z. Naturforsch.*, 12b:415, 1957.
- [5] Alexander, H. E., Koch, G., Mountain, I. M. and Van Damme, O.: *J. Expt. Med.*, 108: 493, 1958.
- [6] Cheng, P. Y.: *Nature*, 181:1800, 1958.
- [7] Huppert, J. and Sander, F. K.: *Nature*, 182:515, 1958.
- [8] Ada, G. L. & Anderson, S. G.: *Nature*, 183:799, 1959.
- [9] Brown, F., and Steward, D. L.: *Viol.*, 7: 408, 1959.
- [10] Franklin, R. M., Wecker, F., & Henry, C.: *Viol.*, 7:220, 1959.
- [11] Holland, J. J., McLoren, L. C. & Syvertin, J. T.: *J. Expt. Med.*, 110:65, 1959.
- [12] Kaper, J. M. & Steere, R. L.: *Viol.*, 7: 127, 1959.
- [13] Liebenow, W. O., Schmidt, D.: *Acta Virol.*, 3:168, 1959.
- [14] Muassab, H. F.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 45: 897, 1959.
- [15] Sokol, F., Libikova, H. & Zemla, J.: *Nature*, 184:1581, 1959.
- [16] Sprunt, K., Redman, W. M. & Alexander, H. F.: *Proc. Soc. Biol. Med.*, 101:604, 1959.
- [17] 柳元元、詹美云、許兆祥、柳晨华、关学勤: 微生物学报, 8:231, 1962.
- [18] Knight, C. A.: "Chemistry of Viruses" Springer-Verlag, Wien p. 108, 1963.
- [19] Mayer, F., et al., *J. Biol. Chem.*, 236:41, 1961.
- [20] Buchrach, H. L.: *Biochem. Biophys., Res. Communication*, 1:356, 1959.
- [21] Guthrie, G. D. & Sinsheimer, R.: *J. Mol. Biol.*, 2:297, 1960.
- [22] Hofschneider, P. H.: *Z. Naturforsch.*, 15b: 441, 1960.
- [23] Wahl, R., Huppert, J. & Emerigue-Blum, L.: *Compt. rendu.*, 250:4227.
- [24] Dimayorea, G. A., Eddy, B. E., Stewart, S. E., Hunter, W. S., Friend, C. & Bendich, A.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 45:1806, 1959.
- [25] Ito, Y.: *Viol.*, 12:596, 1960.
- [26] Gerber, P.: *Viol.*, 16:96, 1962.
- [27] Portocalà, R.: *Rev. Sci. Med. (Romanian Peoples' Republic)*, 6:91, 1961.
- [28] Babel, H. C., & Wolff, D. A.: *Nature*, 197: 867, 1963.
- [29] Bergold, G. H.: *Trans. 1st. Internatl. Conf. Inset. Path. & Biol. Control*, p. 193 and 268, 1958.
- [30] Гершензон, С. М.: Бюлетель, М. О-ва. Ист. Природы, Отд. Биолог, 61:99, 1956.
- [31] Bergold, G. H.: *Adv. virus Res.*, 1:91, 1953.
- [32] Kirby, K. S.: *Biochem. J.*, 62:31, 1956.
- [33] Reed, L. J. & Muench, H.: *Amer. J. Hyg.*, 27:493, 1938.
- [34] Schuster, H., et al.: *Z. Naturforsch.*, 11b: 340, 1956.
- [35] Burton, K.: *Biochem. J.*, 61:473, 1955.
- [36] Zevechova: in "The control of Silkworm Pathogens", p. 78 (in Chinese), 1957.
- [37] Bergold, G. H.: in "The Virns" (Ed. Burnet & Stanley), Vol. 1, p. 520, Academic Press, N.Y.
- [38] Smull, C. E. & Ludwig, E. H.: *J. Bact.*, 84:1035, 1962.
- [39] Ильяхенко, Б. Н.: Вопросы Вирусологии, 2:152, 1962.