

## 家蚕细胞质多角体病毒及其 RNA\*

中国科学院微生物研究所病毒复制组

(北京)

江苏省蚕业研究所蚕病组

(镇江)

从感染细胞质多角体病毒 (CPV) 的家蚕的肠组织提取多角体, 经碱处理后从中提纯了 CPV。鉴定了 CPV 样品的紫外吸收特性、沉降性质, 并在电镜下观察了 CPV 粒子的形态。

从 CPV 提取的 RNA 经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定, 含有 10 个大小不同的片段。

侵染性试验表明 CPV 具有侵染性, 而 CPV-RNA 没有侵染性。

由细胞质多角体病毒 (Cytoplasmic polyhedrosis virus 简称 CPV) 引起的细胞质多角体病 (亦称胃肠型脓病) 是我国蚕业生产中危害很大的一种病害。家蚕感染 CPV 后, 食欲减退、口吐胃液、下痢。在胃液和粪便中都可观察到大量包涵病毒的立方体或二十面体的多角体。病蚕发育不良, 往往不能营茧化蛹, 大大减少蚕丝产量。迄今除了一些消毒预防措施之外, 尚无有效的治疗药剂。

家蚕细胞质多角体病毒是双链 RNA 病毒科 (Diplornaviruses 或 Reoviridae) 的成员之一, 它的基因组由 10 个大小不同的双链 RNA 片段组成<sup>[1,2]</sup>。病毒粒子本身带有 RNA 转录酶<sup>[3,4]</sup>, 该转录酶利用双链 RNA 中的一条链为模板, 合成病毒特异蛋白的信使 RNA<sup>[5]</sup>。在离体合成的条件下, 作为甲基给体的腺苷基-L-甲硫氨酸可以大大激活转录酶的活性<sup>[6]</sup>, 并已搞清所合成的 mRNA 的 5' 末端是具有甲基化碱基的封闭结构:  $m^7G^{\gamma}_{ppp}5'A_{mp}G_p \cdots$ 。这在现已大量发现的具有类似 5' 末端封闭结构的病毒 RNA、病毒的 mRNA 和真核细胞的 mRNA 中是第一个, 它为研究 mRNA 的

结构和功能提供了新的线索。由于 CPV 的这些结构上的特点, 它已经在病毒的增殖和遗传信息的传递研究中引起了人们浓厚的兴趣。

本文叙述了细胞质多角体病毒及其 RNA 的提纯方法, 并对 CPV 及 CPV-RNA 的一些基本性质进行了鉴定。

### 材料和方法

#### 一、多角体的制备

用 4—5 龄起蚕, 饲以喷洒多角体悬液的桑叶, 在 23°C 下培养 7—10 天后, 从病蚕取出发白色的中肠, 加蒸馏水研磨, 纱布过滤, 在滤液中加入等体积甘油贮于冰箱。

#### 二、细胞质多角体病毒 (CPV) 的提取和鉴定

1. CPV 的提取: 从多角体提取 CPV 的方法主要参考了 Miura 等 (1968)<sup>[1]</sup> 和 Lewandowski 等 (1969)<sup>[3]</sup> 的工作。在多角体悬液中加入 2 倍左右蒸馏水, 8000 × g 离心 10 分钟, 倾去上清,

本文于 1977 年 9 月 2 日收到。

\* 中国科学院生物物理研究所六室协助进行 CPV 电镜观察和沉降常数的测定。

如此洗涤 3—4 次。将洗好的多角体悬浮于 0.2M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  (pH 10.8) 的缓冲液中, 室温下裂解 1 小时。此时悬液逐渐变清, 用 2N HCl 调至 pH 7.2,  $12000 \times g$  离心 10 分钟除去不溶物质。

为进一步纯化 CPV 曾进行蔗糖密度梯度离心。制备 10—20% 的线性蔗糖梯度溶液 (于 pH 6.0, 0.1M 醋酸铵缓冲液中)。在 13 毫升蔗糖梯度溶液表面上细心复加 1—2 毫升 CPV 溶液。 $61000 \times g$  离心 90 分钟。在灯光下用弯曲的注射针取出乳白色的病毒带, 用蒸馏水稀释, 超离心沉降, 将病毒沉淀悬浮在 0.1M 醋酸铵缓冲液 (pH 6.0) 中。

**2. CPV 沉降常数的测定:** 0.5% CPV (0.1M 醋酸铵溶液) 在 UCAEA 分析超速离心机上,  $14^\circ\text{C}$  离心, 19800 转/分, 每隔 2 分钟拍照一次, 共拍 6 次。

**3. CPV 的电镜形态观察:** 样品用 2% 磷钨酸钾负染。用 2% 磷钨酸钾 (pH 7.0) 与等体积 0.5% 病毒溶液 (0.1M 醋酸铵溶液, pH 6.0) 混合。在覆有火棉胶膜的铜网上喷涂一层碳膜。把铜网膜朝下飘浮在混好的样品上片刻, 用滤纸条吸去铜网膜上多余的样品。在日立 HU-11 电镜下放大 4—5 万倍观察。

### 三、CPV-RNA 的提取及凝胶电泳

**1. CPV-RNA 的提取:** 基本上根据 Lewandowski 等<sup>[3]</sup>的方法。在 CPV 溶液中加入 1% SDS,  $45^\circ\text{C}$  保温 10 分钟后, 加入 2 倍体积 80% 水饱和酚, 振荡 10 分钟,  $3000$  转/分离心 10 分钟, 取水相。再用等体积酚和 1/2 体积酚各处理一次。所得水相加入 2—3 倍体积的重蒸乙醚除酚, 再用二倍体积的 NaCl 饱和的 95% 乙醇沉淀 RNA, 用玻棒可搅起丝状 RNA 沉淀。用 70% 乙醇洗两次, 最后溶于 0.0155M (1.5mM 氯化钠, 0.15mM 柠檬酸钠, pH 7.0) 或电泳 E 缓冲液中。

**2. CPV-RNA 的圆管聚丙烯酰胺凝胶电泳:** 基本上根据 Leoning<sup>[3]</sup>的方法, 采用 E 缓冲液系统 (40mM Tris-20mM 醋酸钠-2mM EDTA- $\text{Na}_2$ , pH 7.8) 和两种浓度的凝胶。

(1) 2.0% 丙烯酰胺 + 0.1% 甲叉双丙烯酰胺 + 0.3% 琼脂糖<sup>[3]</sup>, 凝胶管直径 6 毫米, 胶长 8 厘米, 电泳 2.5 小时, 电流 5 毫安/管, 电压 70 伏。

(2) 3% 丙烯酰胺 + 0.15% 甲叉双丙烯酰胺, 凝胶管大小及胶长同上, 电泳 4 小时, 电流 5 毫安/管, 电压 70 伏。

CPV-RNA 的加样量 15—20 微克。电泳后在 1N 醋酸中固定 15 分钟, 在紫外扫描仪 (Joyce Loebel UV Scanner) 上用 265 毫微米波长的紫外光扫描, 或在 0.05% 甲苯胺兰 (1N 醋酸中) 染色 15 分钟, 自来水脱色过夜。

### 四、CPV 及 CPV-RNA 生物活性的测定

测定 CPV 和 CPV-RNA 的侵染性采用 4 龄或 5 龄起蚕体腔注射 (背部第 7—8 节间) 和蚁蚕添食经口接种两种方法。体腔注射每头蚕接种 0.01 毫升 CPV 或 CPV-RNA 的 PBS (0.01M 磷酸盐缓冲液, pH 7.0, 0.85% NaCl) 溶液, 蚁蚕添食试验每 30 头饲以表面涂有 0.02 毫升上述溶液的  $1.5 \times 1.5$  厘米<sup>2</sup> 的桑叶。接种后 1、2 天内用氯霉素添食喂养, 随后正常饲养, 观察发病情况。

CPV 的半致死剂量 ( $\text{LD}_{50}$ ) 用 2 龄起蚕添食经口接种测定, 每 20 头饲以共涂有 0.05 毫升病毒溶液的 2 片  $1.5 \times 1.5$  厘米<sup>2</sup> 的桑叶。所用蚕种皆为东 34 × 603。

## 结 果

### 一、CPV 的提取和鉴定

(一) CPV 的紫外吸收曲线: 把得到的 CPV 溶液作一定稀释后测定 220 毫微米—290 毫微米的吸收光谱。CPV 在蔗糖密度梯度离心前后的紫外吸收曲线最高峰均在 260 毫微米, 最低均在 240 毫微米。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值为 1.4—1.5。S. Miyajima 等人 (1969)<sup>[10]</sup> 报告 CPV 的紫外吸收 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 在 1.51—1.60 之间。

从图 1 可见, 蔗糖密度梯度离心前后 CPV 的紫外吸收比值无明显改变。沉降常数 S 值测定, 电镜检查及部分侵染性测定等试验均用未经蔗糖密度梯度离心提纯的 CPV 样品。试验证明这些 CPV 样品基本上是均

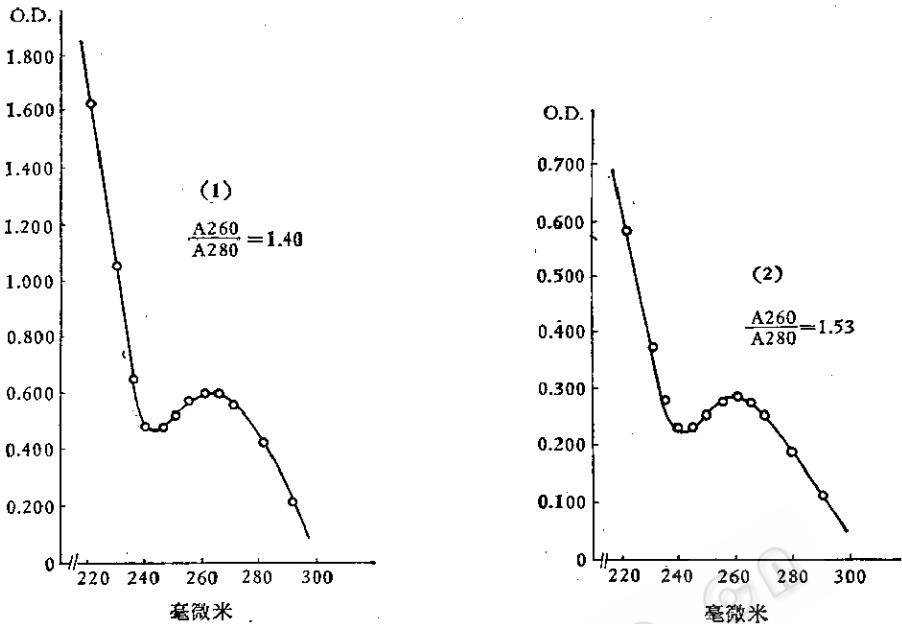


图1 CPV 的紫外吸收图谱

(1) 蔗糖梯度离心前 (2) 蔗糖梯度离心后

一的。因此,在 CPV 的紫外吸收比值正常时即可用于一般试验。CPV 浓度的测定根据  $A_{260}^{0.1\%} = 3.7$  计算<sup>[11]</sup>。

(二) CPV 的沉降分析: 通过超离心沉降分析,得出 2 个峰,其中一个小峰逐渐扩散变得不明显(见图版 I-1),通过计算测定出  $S_{w,20}$  分别为 410s 和 126s,前者为 CPV,后者的量极微小,可能是失去 RNA 的 CPV 空壳。Miyajima 等人(1969)<sup>[10]</sup>测出 CPV 两个部分的  $S_{w,20}$  值分别为 415s 和 260s。

(三) CPV 形态观察: 根据文献报道<sup>[12]</sup> CPV 颗粒直径 60 毫微米,形状是 20 面体,突出的特征是在 20 面体顶端有放射状突起,整个病毒粒子共有 12 个突起,从平面上可看到 6 个,每个突起中心呈管状,可释放出核酸。我们制备的病毒样品在电镜下放大 5 万倍时(图版 I-2,光学放大至 130,000 倍)同样可清楚地看到 6 边形的病毒粒子及从它顶点放射出的 6 个突起。同时,也见到少数病毒颗粒只有外壳。根据

放大倍数计算出的病毒颗粒大小为 55 毫微米—60 毫微米。

## 二、CPV-RNA 的提取

### (一) CPV-RNA 的紫外吸收曲线:

CPV-RNA 溶液作一定稀释后测定 220 毫微米—290 毫微米的紫外吸收曲线,最高吸收在 258 毫微米,最低吸收在 232 毫微米,  $OD_{258}/OD_{232} = 2.16$ ,  $OD_{258}/OD_{280} = 1.93$ 。

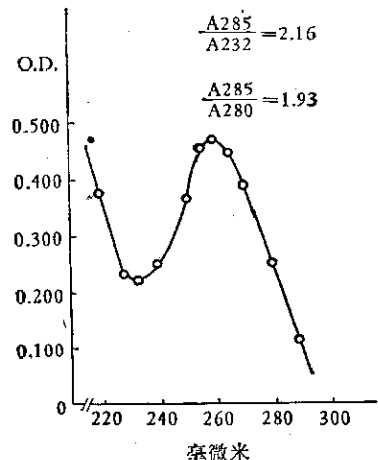


图2 CPV-RNA 的紫外吸收曲线

CPV-RNA 的最高与最低吸收比值和文献报道是一致的(图2)。根据 CPV-RNA 的含磷量(8.59%)及磷的克分子消光系数  $E(p)=6600$ , 计算出 CPV-RNA 的消光系数  $A_{260}^{0.1\%}=18$ 。

(二) CPV-RNA 的凝胶电泳: 从 3% 和 2% (后者加琼脂糖) 聚丙烯酰胺凝胶电泳后的紫外扫描和染色结果, 可清楚地分辨出 CPV-RNA 的 9 个片段。用 3% 聚丙烯酰胺凝胶得到的分辨率较好(见图3)。同一批或不同批的 CPV-RNA 多次电泳结果, 其重复性很好, 表明 CPV-RNA 的不连续性不是随机断裂的结果, 而由于它结构上的特异性。

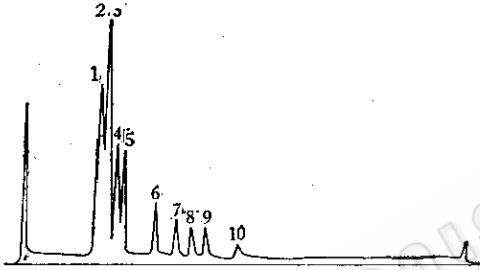


图3 CPV-RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳紫外扫描图谱

图左端为胶顶, 凝胶浓度: 丙烯酰胺 3%, 甲叉双丙烯酰胺 0.15%。电泳条件: 电流 5 毫安/管, 电压 70 伏, 电泳时间 4 小时。

根据文献报道 CPV-RNA 包含 10 个等克分子片段, 总分子量是  $1.46 \times 10^{7[2]}$ , 每个 RNA 片段的分子量为  $0.3 \times 10^6 - 3 \times 10^6$  不等。根据每个片段的分子量和峰面积比可以推测出凝胶电泳扫描图上的第二个峰包含两个片段。

关于确定 CPV-RNA 双链性质的试验, 如  $T_m$  值, 对 RNase 的抗性, 对甲醛的抗性等, Miura 等<sup>[1]</sup> 已有过较全面的报道。

### 三、CPV 和 CPV-RNA 生物活性的测定

试验结果表明 CPV 的体腔注射(每头

四龄蚕接种 10 微升含 0.16 微克 CPV) 和添食经口接种(平均每头蚁蚕接种 0.01 微克 CPV) 都能引起胃肠型脓病, 体腔注射的发病率为 75—100%, 蚁蚕添食接种的发病率为 85—95%。CPV-RNA 的体腔注射(每头蚕接种 10 微升, 含 10 微克 CPV-RNA) 和蚁蚕添食经口接种(平均每头蚁蚕接种 0.87 微克 CPV-RNA) 都不使蚕感病, 此结果与 Kawase 等人的报道<sup>[13]</sup> 相反, 与 Lewandowski 等人(1969)<sup>[3]</sup> 和 Kawase (1971)<sup>[14]</sup> 的报道一致。

用 2 龄起蚕添食经口接种的方法测定了蔗糖密度梯度离心提纯前、后的 CPV 的半致死剂量,  $LD_{50}$  分别为 0.59 毫微克/头和 0.21 毫微克/头。

### 参 考 资 料

- [1] Miura, K. I. et al.: *J. Virol.*, 2: 1211—1222, 1968.
- [2] Kawata, I. F., K. I. Miura: *J. Mol. Biol.*, 51: 247—253, 1970.
- [3] Lewandowski, L. J. et al.: *J. Virol.*, 4: 857—865, 1969.
- [4] Shimotohno, K., K. I. Miura: *Virology*, 53: 283—286, 1973.
- [5] Shimotohno, K., K. I. Miura: *J. Mol. Biol.*, 86: 21—30, 1974.
- [6] Furuichi, Y.: *Nucleic Acid Res.*, 1: 809—822, 1974.
- [7] Furuichi, Y., K. I. Miura: *Nature*, 253: 374—376, 1975.
- [8] Loening, U. E.: *Biochem. J.*, 102: 251—257, 1967.
- [9] Bourque, D. P. et al.: *J. Chrom.*, 56: 79—86, 1971.
- [10] Miyajima, S.: *J. Invert. Pathol.*, 13: 296—302, 1969.
- [11] Miyajima, S.: 日本蚕丝学杂志, 45: 89—90, 1976.
- [12] Miura, K. I. et al.: *J. Invert. Pathol.*, 14: 262—265, 1969.
- [13] Kawase, S., S. Miyajima: *J. Invert. Pathol.*, 11: 63—69, 1968.
- [14] Kawase, S.: *The Cytoplasmic Polyhedrosis Virus of the Silkworm* (eds. H. Aruga and Y. Tanada), Univ. Tokyo Press, Tokyo, 1971.

## **CYTOPLASMIC POLYHEDROSIS VIRUS AND ITS RNA OF THE LARVAE OF *BOMBYX MORI***

Research Group of Virus Replication, Institute of Microbiology, Academia Sinica  
(Beijing)

Section of Silkworm Pathology, Jiangsu Institute of Sericulture  
(Zhenjiang)

The CPV was purified from the alkali-treated polyhedra isolated from midguts of infected silkworm (*Bombyx mori*) larvae. The UV absorption characteristic and sedimentation property of CPV were described. The shape of the virions were observed by electron microscopy.

It was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis that the CPV-RNA preparation purified from CPV contained ten segments of different sizes.

The infectivity tests have revealed that the CPV was infective, but CPV-RNA wasn't.