

黄地老虎颗粒体病毒的研究

II. 包含体和病毒粒子的分离提纯与形态结构

王小凤 裴美云

(中国科学院微生物研究所, 北京)

石玉瑚 吴祖银

(新疆农业科学院微生物研究所, 乌鲁木齐)

本文介绍了 AsGV-XJ 包含体、病毒粒子的提纯方法及其形态结构。提纯的 AsGV-XJ 包含体在弱碱 ($0.05M$ Na_2CO_3 , $0.05M$ $NaCl$, $pH10.8$) 中, $20^\circ C$ 水解 2 小时, 释放出完整的病毒粒子, 再经超离心和 10—70% 蔗糖密度梯度离心可得提纯的病毒。完整的病毒粒子具有双层膜结构, 平均大小为 $310 \times 70nm$, 核衣壳平均大小为 $325 \times 45nm$ 。病毒沉降系数为 1,400S。并对病毒的紫外吸收特性和保存过程中的形态变化进行了讨论。

昆虫杆状病毒 (Baculovirus) 是大的双链 DNA 病毒。迄今为止已发现核多角体病毒 (NPV) 280 多种, 有关其形态结构、物化性质的资料很多。但在颗粒体病毒 (GV) 方面, 除甘兰粉蝶 (*Pieris brassicae*)^[1-4] 粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*)^[5] 等少数 GV 外, 人们对已分离到的 65 种 GV^[6] 的基本性质了解很少。1977 年以来, 我国新疆地区利用黄地老虎 (*Agrotis segetum* Schiff.) GV (以下简称 AsGV-XJ) 对常年危害的黄地老虎进行了大面积生物防治, 收到了很好的效果^[7,8]。我们对 AsGV-XJ 包含体和病毒粒子的分离提纯方法和形态结构、一些理化性质进行了研究, 为我国 GV 分离物提供了基本资料。

材料和方法

(一) 包含体的提纯

将人工经口感染 GV 的黄地老虎幼虫风干的虫体, 用生理盐水或 $0.1M$ 磷酸缓冲液 ($pH 7.0$) 浸泡, 经组织匀浆器充分研磨, 反复冻融三、四次、用尼龙布过滤, 滤液经 2000 转/分离心 10 分

钟, 弃沉淀, 上清在 10,000 转/分离心 30 分钟, 收集沉淀, 悬浮在蒸馏水中。如此高低速交叉离心数次, 即可得灰白色包含体的粗制品。为进一步纯化, 把浓缩的包含体用 10—70% (W/V) 的甘油梯度离心 (3200 转/分) 40 分钟或 20—70% 蔗糖梯度离心 (8000 转/分) 50 分钟^[9]。取出白色包含体带, 在透析袋中透析 24 小时, 除去甘油或蔗糖。再把包含体样品高速离心浓缩, 重复梯度离心三次。最终得到纯净浓缩的包含体, 冷冻干燥保存备用。

有机溶剂和胰蛋白酶对包含体的作用: 用等体积氯仿、乙醚、四氯化碳与部分提纯的包含体悬液混合振荡、分相。用氯仿、乙醚处理时取含包含体的水相, 用四氯化碳处理时, 包含体在四氯化碳与水相之间的界面处。丙酮可使包含体从其悬液中沉淀下来, 离心取包含体沉淀。在包含体悬液中 ($0.01M$ 磷酸缓冲液 $pH7.8$) 加入胰蛋白酶 (终浓度 $1 mg/ml$), $37^\circ C$ 保温 1 小时, 高速离心取包含体沉淀。

(二) 病毒粒子的提纯

把冷冻干燥的包含体用 $0.05M$ Na_2CO_3 和 $0.05M$ $NaCl$ ($pH 10.8$) 的弱碱溶液 ($10—15mg$

本文于 1981 年 3 月 19 日收到。

包含体/ml) 在 18—20℃ 水解 1.5—2 小时^[9-10], 在水解过程中轻摇数次, 白色包含体悬液逐渐澄清, 呈微黄色。水解完毕即移入冰浴, 并用 1N HCl 调 pH 到 8.0—8.5, 或用蒸馏水将水解液稀释 5—10 倍中止反应^[3]。低速离心除去不溶物质。上清液在 VAC-601 超离心机上 70,000 × g 离心 1 小时。收集病毒沉淀, 悬浮在 pH 8.0 的 0.0025M Na₂CO₃ 溶液中。为进一步纯化, 把上述病毒溶液再经 10—70% 蔗糖梯度 50,000 × g 离心 100 分钟。取出乳白色病毒带, 以蒸馏水稀释数倍, 再超离心浓缩病毒。

(三) 包含体和病毒粒子的电镜观察

把样品滴在喷碳加固的火棉胶铜网上, 用 2% 磷钨酸钠 (pH 7.0) 负染, 在日立-H500 电镜下观察。

(四) 病毒粒子沉降系数测定

把病毒溶液 (2mg/ml, 溶于 0.0025M Na₂CO₃ (pH 8.0) 中, 病毒浓度的估算, 参考 Harrap 等人^[3]测定颗粒体病毒的消光值 $E_{260}^{1\%} = 11.00$) 在 UCA-1A 分析超离心机上进行沉降分析, 测定沉降系数。达速 10,490 转/分后, 每隔 1 分钟拍照一次。

试验结果

(一) 包含体和病毒粒子的形态结构

AsGV-XJ 包含体又称颗粒体, 外形大致为卵圆形, 平均大小 450 × 280nm。用弱碱处理 1 分钟, 即可见到位于包含体内的病毒粒子 (见图版 I-1)。

AsGV-XJ 包含体不溶于乙醚、丙酮、四氯化碳, 但用氯仿处理时包含体受破坏, 释放出核酸 (见图版 I-5)。胰蛋白酶在本试验条件下不破坏包含体。

包含体在 0.05M Na₂CO₃ 和 0.05M NaCl 溶液中 18—20℃ 水解 1.5—2 小时后, 释放出的病毒粒子是均一的略带弯曲的粗杆, 其两端呈圆形, 测量了 23 个病毒粒子的大小, 平均长度 310nm, 宽度 70nm, 这是带内外膜的完整病毒粒子。在其一端或两端经常观察到小突起 (见图版 I-2)。在

同样条件下把包含体的水解时间延长到 4 小时左右, 可得核衣壳——脱去外膜的细杆状病毒粒子 (见图版 I-3, 4), 又叫裸露的病毒粒子, 它包括核酸的髓核及内膜。测量了 31 个核衣壳的大小, 平均长度为 325nm, 宽度为 45nm。这可能是由于弯曲的核衣壳一旦失去外膜就伸直, 因而较原来双层膜的病毒粒子略长。Brown 等^[2]研究甘兰粉蝶 GV 和 Khosaka 等^[11]研究家蚕 (*Bombyx mori*) NPV 病毒粒子形态时也观察到上述类似情况。在负染的核衣壳上经常可见与轴线垂直的、排列整齐的带状结构 (见图版 I-4), 其两端有明显的电子致密点 (见图版 I-3), 并在其一端观察到吸盘状结构 (见图版 I-4)。以上结果表明 AsGV-XJ 病毒粒子有较为复杂的细微结构。

当水解条件控制不严时, 提纯的病毒样品中可能同时存在上述两种病毒粒子。

用氯仿处理 AsGV-XJ 包含体时, 观察到病毒杆状髓核的释放, 从其两端有长的 DNA 丝抽出 (见图版 I-5)。我们在 AsGV-XJ 超薄切片的研究中, 也观察到病毒粒子双层膜内电子致密的杆状髓核^[12]。

(二) 病毒粒子的紫外吸收特性

提纯病毒溶液的紫外吸收曲线 (见图 1) 在 260nm 处无明显吸收高峰, 从 250nm 处吸收值开始以平缓坡度下降, 在 250—280nm 之间变化不大, $A_{260}/A_{280} = 1.2—1.3$ 。AsGV-XJ 病毒粒子的紫外吸收特性与 Harrap 和 Longworth^[3]报道的甘兰粉蝶颗粒体病毒相似, 他们用中性去污剂 NP-40 处理病毒粒子, 得到的核衣壳样品在 260nm 附近有一不甚明显的峰。据文献报道^[13,14], 动、植物的弹状病毒 (Rhabdovirus) 如水疱性口膜炎病毒 (VSV), 分枝花椰菜坏死黄化病毒 (BNYV), 小麦条点花叶病毒 (WSMV) 等这类带有膜结构的大病毒,

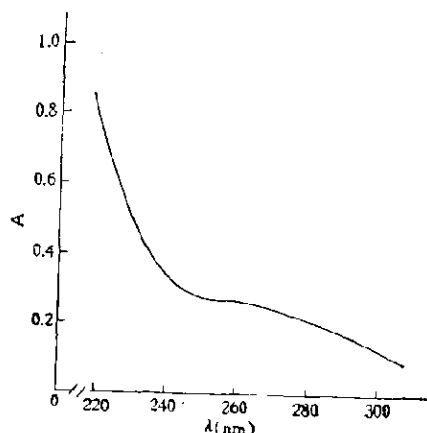


图1 AsGV-XJ 病毒粒子的紫外吸收光谱

Fig.1 UV absorption spectrum of virus particles of AsGV-XJ

可能由于其自身的光散射,因而缺乏典型的核蛋白吸收峰。昆虫杆状病毒在大小及结构方面与之相似,所以它们的紫外吸收性质可能有共同之处。

(三) 病毒粒子的沉降系数

AsGV-XJ 完整病毒粒子的沉降系数 $s_{w-20} = 1,400S$ (三次测定的平均值),分析超离心图峰见图版 I-8。文献中关于 GV 病毒粒子的沉降系数报道很少,已知的只有紫色卷叶蛾 (*Choristoneura murinana*) GV 的沉降系数 $1324S^{[15]}$ 。

(四) 病毒的保存

GV 包含体有高度稳定性,其侵染性在一般条件下保存数年不变。相比之下, GV 病毒粒子的稳定性却较差,如悬浮介质,保存温度,冻融处理等均影响病毒粒子的完整性。用 $0.02M$ 磷酸缓冲液 (pH7.0) 或蒸馏水悬浮的病毒粒子容易聚集成杆状或降解。在 $0.0025M$ 碳酸钠溶液 (pH8.0) 中病毒粒子可较好的维持其分散性和完整性。这与 Harrap 和 Longworth^[1] 的报道一致。悬浮在稀碱溶液中的病毒在 $4^{\circ}C$ 保存一周后即开始逐步降解,粗杆状病毒粒子沿横轴对折、弯曲,最后变成球形,有些病

毒粒子脱去外膜变为核衣壳,后者又可脱去内膜释放出核酸物质的片断 (见图版 I-6)。保存过程中也可见病毒粒子首尾相接成长杆,并相互粘着形成树枝状 (见图版 I-7),病毒杆之间的界线已模糊不清。病毒放在 $-15^{\circ}C$ 和液氮内冰冻保存虽可维持完整性,却经不起多次冻融。

讨 论

AsGV 是国外较早报道的颗粒体病毒之一^{—[16]}, Shvedchikova 等^[17]曾在电镜下观察了 AsGV-XJ 包含体的碱水解液中病毒粒子及 DNA 髓核的形态。关于提纯的 AsGV 理化性质的研究尚未见报道。

我们用提纯的 AsGV-XJ 样品进行了形态、结构、理化性质方面的研究。提纯包含体与病毒粒子的形态、结构和超薄切片的观察结果一致^[12]。但在提纯的完整病毒粒子和核衣壳两端观察到一些细微结构。一些 NPV 如家蚕 NPV^[11], 苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) NPV^[6], *Anthelae varia* NPV^[18] 等核衣壳的一端或两端有明显的突起,又叫结构极,并具有末端聚合趋势^[6]。关于 GV 的报道不一,如甘兰粉蝶 GV 核衣壳上无附属物^[2],而银纹夜蛾 GV 的核衣壳两端有某种结构^[6]。AsGV-XJ 不仅在核衣壳上,而且在完整病毒粒子两端有细微结构。昆虫杆状病毒粒子上的这一类结构的功能可能类似于噬菌体的尾部,在吸附侵染寄主过程中起作用。

Shvetchikova 等人^[16]认为西伯利亚松毛虫 (*Dendrolimus sibiricus*) GV 和 AsGV 的 DNA 髓核在病毒粒子中以复杂的超螺旋形式存在。我们对 AsGV-XJ 病毒髓核的观察支持了这种推论。一些人认为昆虫杆状病毒的髓核由 DNA 和蛋白构成,并没想了不同的构型^[1]。因此,这仍然是值得深入研究的问题。

在 AsGV-XJ 病毒粒子提纯过程中包含体的碱水解是最关键的一步,为使包含体同步释放出完整病毒粒子,需要掌握适当的碱浓度,水解温度和时间,其中以温度最重要。AsGV-XJ 包含体对碱水解温度较敏感,在 25—35℃ 之间弱碱下水解 20 分钟,大部分释放的病毒粒子发生降解。

用提纯的 AsGV-XJ 病毒粒子,经口饲毒方式侵染健康黄地老虎幼虫,证明有侵染性。

参 考 文 献

- [1] David, W. A. L.: *Adv. Virus Res.*, **22**: 112—160, 1978.
- [2] Brown, D. A. et al.: *Virology*, **81**: 317—327, 1977.
- [3] Harrap, K. A. et al.: *J. Invertebrate Pathol.*, **24**: 55—62, 1974.
- [4] Longworth, J. F. et al.: *J. Invertebrate Pathol.*, **19**: 42—50, 1972.
- [5] Summers, M. D. et al.: *J. Invertebrate Pathol.*, **16**: 227—240, 1970.
- [6] Summers, M. D.: Baeuloviruses (Baeuloviridae), In the Atlas of Insect and Plant Viruses, Including Mycoplasma viruses and Viroids, ed. by Karl Maramorosch, Vol. 8 of Ultrastructure in Biological Systems, Academia Press, New York San Francisco London, 1977.
- [7] 新疆农业科学院农业科学研究所微生物室、植保室,新疆化学研究所生化室病毒组:微生物学报, **18** (4): 355—356, 1978.
- [8] 新疆农业科学院农业科学研究所防治黄地老虎协作组:微生物学通报, **5** (2): 1—2, 1978.
- [9] Huger, A.: Granuloses of Insects. In Insect Pathology. An Advanced Treatise, Vol. 1, p. 531—575, ed. by Edward, A. Steinhaus, 1963.
- [10] Bergold, G. H.: The Nature of Nuclear-Polyhedrosis Viruses, In Insect Pathology, An Advanced Treatise, Vol. 1, p. 413—456, ed. by Edward, A. Steinhaus, 1963.
- [11] Khosaka, T. et al.: *J. Virol.*, **7**: 267—273, 1971.
- [12] 徐绍华等:微生物学报, **22** (2): 123—125, 1982.
- [13] Liu, M. T. et al.: *Virology*, **48**: 30—40, 1972.
- [14] Sinha, R. C. et al.: *Phytopath. Z.*, **87**: 314—323, 1976.
- [15] 川瀬茂実: ウィルスと昆虫, 东京, 南江堂, 1976.
- [16] Paillot, A.: *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **201**: 1062—1064, 1935.
- [17] Shvedchikova, N. G. et al.: *J. Invertebrate Pathol.*, **18**: 25—32, 1971.
- [18] Teakle, R. E.: *J. Invertebrate Pathol.*, **14**: 18—27, 1969.

图 版 说 明

1. 提纯的 AsGV-XJ 包含体, 0.05M Na₂CO₃, 20℃水解 1 分钟(×24,000)。
2. 提纯的 AsGV-XJ 完整病毒粒子, 箭头指两端小突起(×31,500), 左下角为放大的病毒粒子(×110,250)。
3. 提纯的 AsGV-XJ 核衣壳(×30,000)。
4. 正在脱外膜的核衣壳, 箭头 a: 吸盘状结构, b: 外膜(×105,000)。
5. AsGV-XJ 包含体经氯仿处理后释放出病毒 DNA 髓核(×42,000)。
6. AsGV-XJ 病毒粒子在 4℃ 下储存两周后形态变化, 箭头 a: 完整病毒粒子, b: 弯曲成球形的病毒粒子, c: 核衣壳, d: 内膜, e: 髓核片断(×24,000)。
7. 病毒粒子聚合成树枝状(×42,000)。
8. AsGV-XJ 病毒粒子分析超离心图谱。
1. Capsules of AsGV-XJ digested with 0.05M Na₂CO₃ containing 0.05M NaCl pH 10.8 for 1 min.
2. Intact virus particles of AsGV-XJ, note protrusions on both ends of virus particles. The inset shows an magnified virus particle.
3. Purified nucleocapsid of AsGV-XJ.
4. Nucleocapsid of AsGV-XJ releasing from outer membrane: a. sucker on one end of nucleocapsid, b. outer membrane.
5. DNA core released from virus particle produced from capsule treated with chloroform.
6. Morphological changes of virus particles after storage for two weeks at 4℃, a. intact virus particle, b. curved form of intact virus particle, c. nucleocapsid, d. inner membrane, e. segments of broken virus core material.
7. Virus particles on storage at 4℃ polymerized into long branches.
8. Sedimentation pattern of virus particles of AsGV-XJ.

THE STUDY OF GRANULOSIS VIRUS OF *AGROTIS SEGETUM*

II. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CAPSULES AND VIRUS PARTICLES OF GRANULOSIS VIRUS OF *AGROTIS SEGETUM*

Wang Xiaofeng Pei Meiyun

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Shi Yuhu Wu Zuyun

(*Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumqi*)

This paper is a continuation of the previous study on ultrastructure of granulositis virus of cut worm (*Agrotis segetum* Schiff.), isolated from Xinjiang of China (designated as AsGV-XJ). The present work deals with the study of methods of purification of capsules and virus particles of AsGV-XJ. The capsules were purified by low and high differential centrifugation and glycerol gradient centrifugation. The virus particles were released from purified capsules by digestion with weak alkali 0.05 M Na₂CO₃ containing 0.05 M NaCl (pH 10.8) at 20°C for one to two hours. It was further purified by ultracentrifugation and 10—70% sucrose gradient centrifugation. It was determined under

the electron microscope that the virus is rod shaped and it has two membrane layers, the outer and inner membranes. The average size of intact virus particles is about 310×70 nm and that of nucleocapsid is about 325×45 nm. It is interesting to point out that the short protrusions at one or two ends of the intact virus particles were frequently observed and at one end of nucleocapsid something like sucker was visible. These characteristics may be special for AsGV-XJ.

The sedimentation coefficient of intact virus particles is determined to be 1,400 S. Its UV absorbance and morphological changes in process of storage have also been discussed.