

菜白蝶的一种新病毒

II. 病毒的生物物理、血清学性质

毕坎华 李小洁

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

陈明树 孙富林

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

用氯仿-丁醇处理和差速超速离心, 再经两次蔗糖密度梯度离心, 纯化了这株菜白蝶病毒。病毒沉降系数约 132 S。在氯化铯中的浮力密度为 1.39 g/cm^3 。在相同条件下测定, 健康菜白蝶幼虫蛋白沉降系数分别为 16 S、38 S、76 S, 而被病毒感染的死幼虫则为 17 S、62 S、127 S。

纯化的和部分纯的病毒与抗部分纯病毒血清, 在 0.9% 琼脂糖中双扩散反应时, 纯化病毒出现一条沉淀线, 并与部分纯病毒两条沉淀线之一的两端相融合。当粗提取的健康幼虫蛋白和纯化的病毒与抗部分纯病毒血清反应时, 纯化病毒产生一条独立的沉淀线, 而不与健康幼虫蛋白沉淀线融合, 呈现典型的不一致反应。

在以前工作^[1-3]的基础上, 实验证明, 这株菜白蝶 (*Pieris rapae*) 病毒的特性和蜡螟的密(核)病毒极其相似^[4]。按照国际病毒分类标准^[5], 这株病毒应属于细小病毒科密病毒属。

本文报道这株菜白蝶病毒的提纯方法、生物物理和血清学特性。

材料和方法

(一) 病毒提纯

利用乳化器将人工感染该病毒致死的幼虫置于 0.1 MPBS (0.1 M NaCl, 7 mM 磷酸钠, pH 7.4) 溶液中乳化, 溶液中还含有 1% 2-巯基乙醇。用 Omega 1 型超速离心机 $6 \times 100 \text{ ml}$ 转头离心 (10,000 rpm) 10 分钟, 除去大颗粒。

上清液中加入等体积的氯仿-丁醇 (1:1) 剧烈摇动, 离心 (10,000 rpm 7 分钟) 分相, 除去脂肪。水相再经 17,000 rpm 离心 50 分钟, 除去沉淀。

上清液在 Omega 1 离心机 $8 \times 50 \text{ ml}$ 转头离心 (37,000 rpm) 2 小时, 沉淀病毒。沉淀物悬浮于原体积半量的 0.1 M PBS 溶液中, 经 10,000

rpm 离心 7 分钟, 除去不溶物, 上清液再经 37,000 rpm 离心 2 小时。沉淀物最后悬浮于 0.1 M PBS 溶液中, 为部分纯化病毒。

蔗糖密度梯度离心: 用 DGF-U 型密度梯度仪制备 9—45% 线性蔗糖梯度, 溶剂为 0.1 M PBS。约 5 mg/ml 浓度的部分纯病毒样品 0.3 ml 置于梯度液上部, 梯度管在 Hitachi 80 P 型超速离心机 RPS-40 T 转头离心 (37,000 rpm) 3.5 小时。离心后, 将梯度管用梯度制备仪和 Uvicord III 型流动监测仪记录 10 滴一管分部收集。用不连续对流免疫电泳方法测定病毒的分部。合并病毒部分, 装透析袋在冰箱内对 0.1 M PBS 溶液透析。

用制备部分纯病毒的方法提取菜白蝶幼虫蛋白, 作为对照。

(二) 沉降系数的测定

在 UCA-1A 分析超离心机上 (20℃), 利用 Schlieren 和紫外吸收光谱双光路, 测定病毒和幼虫蛋白的沉降系数。

本文于 1982 年 2 月 4 日收到。

门绍杰同志协助电镜观察, 翁兆葵同志参加部分血清学工作。

(三) 浮力密度的测定

取 0.6 ml 病毒悬液加到 1.391 g/cm³ 浓度的氯化铯溶液中, 用 13 mm 离心杯, 45,000 rpm 离心 5.5—6 小时, 直至沉降区带稳定在梯度的一定位置, 测定这一位置氯化铯的密度。

(四) 血清学分析

在 Longworth 等^[4]制备血清免疫方法的基础上进行了改良。三周时间内给予部分纯病毒、幼虫蛋白各 3 mg, 分别免疫家兔。两次加等体积福氏佐剂, 背侧皮下二点注射, 一次静脉注射。最后一次注射两周后放血, 从免疫到采血间隔为四周。用此法分别制备了抗部分纯病毒、抗幼虫蛋白的血清。

不连续对流免疫电泳: 利用微量血清技术进行琼脂糖不连续对流免疫电泳测定病毒分布, 其方法与文献^[7]稍有不同: 在 7×9 cm 玻璃板上, 用移液管取 0.9% 的琼脂糖, 溶于 0.015 M 巴比妥钠 (pH 8.6) 缓冲液 20 ml 中, 覆盖于玻璃板上。待胶凝固后, 用 4 mm 直径打孔器, 成对打孔, 孔间距为 3 mm。每排 10 对共 4 排。每板可测定 40 管样品。蔗糖梯度离心后, 分部收集样品 (每管 10 滴), 约 50 管。除去前 10 管。胶板阴极端孔加抗原, 按孔序编号, 每管取一滴加入。阳极端加抗血清。电泳槽缓冲液为 0.075 M 巴比妥钠 (pH 8.6), 约 1,000 ml。5 V/cm, 45—60 分钟。

微量琼脂糖双扩散法测定抗原特性: 用直径 4 mm 打孔器, 打孔成梅花状排列, 周孔与中心孔距为 4 mm。中心孔为抗血清, 周孔分别加入病毒和健康幼虫蛋白抗原。

结 果

(一) 蔗糖梯度离心

第一次蔗糖梯度离心后的样品, 用不连续对流免疫电泳测定的结果表明: 第 27—42 管均出现沉淀线, 但 27—34 管与抗幼虫蛋白血清和抗病毒血清均有反应, 35—42 管则仅与抗病毒血清反应 (图 1)。将这部分集中浓缩, 经第二次蔗糖梯度离心后, 紫外监测显示为 1 个峰, 所得到的纯化病毒制品, 经免疫学检测只与抗病毒血清反应。

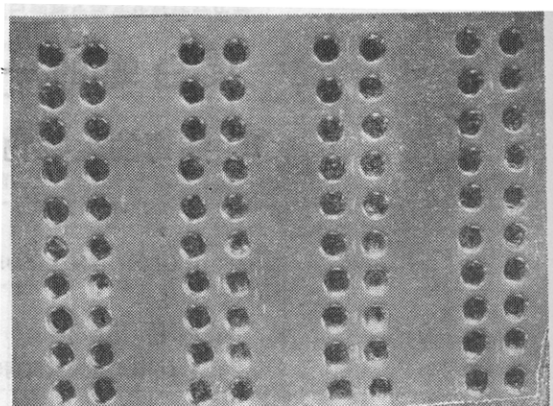


图 1 不连续对流免疫电泳测定

Fig. 1 Discontinuous counter-immunoelectrophoresis of sucrose gradient fractions containing virus

(二) 沉降系数的测定

用分析离心机测定健康幼虫体蛋白有 3 个组分, 其沉降系数分别为 16S、38 S 76S (图 2)。

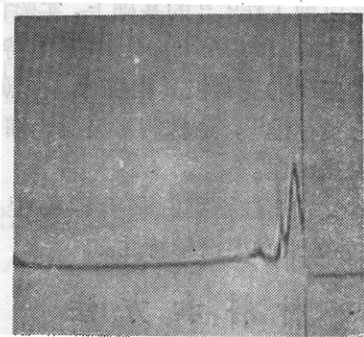


图 2 健康幼虫体蛋白沉降图

Fig. 2 Three components were observed in the extract from healthy larvae with sedimentation coefficient of 16S, 38 S and 76 S respectively

而部分纯病毒三个组分的 $s_{20,w}$ 为 17、62 和 127 (图 3)。17 S 为健康虫体蛋白, 具很强的抗原性。部分纯病毒经两次蔗糖速度区带离心后, 得到的纯病毒 $s_{20,w}$ 为 132 (图 4)。

(三) 浮力密度

用分析离心机测定纯化病毒的浮力密

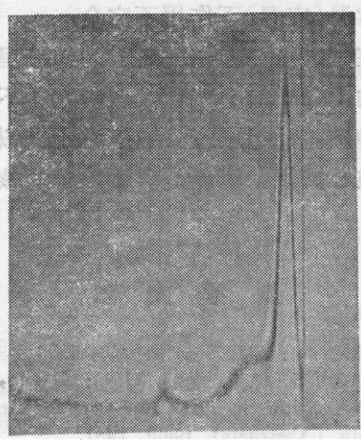


图3 部分纯病毒沉降图

Fig. 3 Three components were observed in the extract from infected larvae with sedimentation coefficient of 17S, 62S and 127S respectively



图4 两次蔗糖梯度离心纯化的病毒沉降图

Fig. 4 Sedimentation analysis of virus purified by two circles of sucrose gradient centrifugation

度,在氯化铯中其浮力密度约为 $1.39\text{g}/\text{cm}^3$ 。

(四) 病毒的抗原特性

部分纯病毒制备物和抗部分纯病毒血清反应时,在胶里形成双沉淀线。提纯的病毒和部分纯病毒样品,同时置于抗原孔扩散时,前者产生一条与后者相连接的沉淀线,但部分纯病毒的另一条沉淀线是独立和互不连接的(图5)。当部分纯病毒抗血清经昆虫蛋白抗原充分吸收后,它对部分纯病毒和提纯病毒仅产生一条沉淀线,不与健虫提取物反应。当提取的健虫蛋白

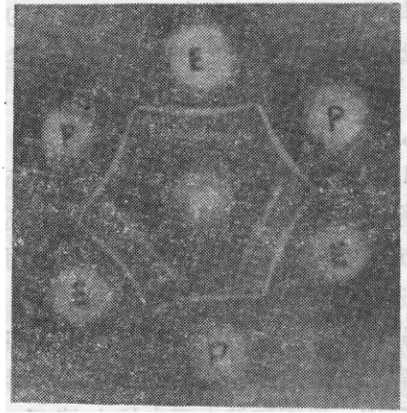


图5 琼脂糖双扩散反应

中心孔为抗部分纯病毒血清, E 孔为部分纯病毒, P 孔为纯化病毒

Fig. 5 Immunoprecipitation test with antiserum against partially purified virus in the central well, purified virus (P) and a crude extract of dead infected larvae (E) in alternate outer wells.

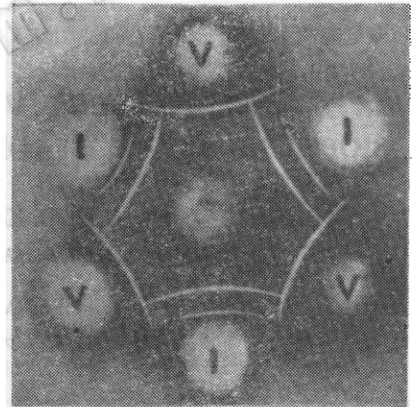


图6 琼脂糖双扩散反应

中心孔血清同图5, I 为健康幼虫蛋白, V 为纯化病毒

Fig. 6 Immunoprecipitation test with antiserum against partially purified virus in the central well, insect protein (I) and virus (V) in alternate outer wells

和提纯病毒放在抗原孔,对部分纯病毒抗血清反应时,产生独立和互不连接的沉淀线,呈现典型的不一致反应(图6)。

讨 论

菜白蝶的 16 S、38 S、76 S 蛋白沉降

系数与蜡螟幼虫蛋白的相近。被感染的菜白蝶幼虫部分纯病毒制备物中存在 17S、62S, 此外尚出现健虫蛋白所没有的 127S 抗原。

17S 抗原仅与昆虫蛋白抗血清反应。不与经吸收后的部分纯病毒抗血清反应。62S 抗原能与昆虫蛋白抗血清和经作用后的部分纯病毒抗血清反应, 因此, 62S 抗原组分是一混合抗原。127S 抗原能和部分纯病毒抗血清和作用后的部分纯病毒抗血清反应, 但不和健虫蛋白抗血清反应, 127S 抗原明显为病毒粒子所独有。

我们首次用不连续对流免疫电泳方法, 确定病毒分部的位置, 获得了较满意的结果。实验中还发现, 部分纯病毒抗体与虫体蛋白作用时, 需在 45°C 水浴中进行,

而在常温(室温)下作用不完全。

在一次氯化铯梯度离心的样品里, 观察到约 10 nm 的小粒子, 这些粒子不与以上两种抗血清起反应。这些粒子类似乙型肝炎核心抗原, 可能是病毒粒子的核心抗原。

参 考 文 献

- [1] 孙富林等: 自然杂志, 3: 320, 1980.
- [2] 孙富林等: 微生物学报, 21(1): 41—44, 1981.
- [3] Sun Fulin et al.: Int. Congr. Virology, 5th (Abstracts), p369, 1981.
- [4] Kurstak, E.: Adv. Virus Res., 17: 207—241, 1972.
- [5] Fenner, F.: Intervirology, 7: 1—116, 1976.
- [6] Longworth, J. F. et al.: Gen. Virology, 3: 167—174, 1968.
- [7] Wallis, C. and J. L. Melnick: Applied Microbiology, 21: 867—869, 1971.

A NEW INSECT VIRUS OF *PIERIS RAPAE*

II. BIOPHYSICAL AND SEROLOGICAL PROPERTIES OF THE VIRUS

Bi Kanhua Li Xiaojie

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing)

Chen Mingshu Sun Fulin

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

A new insect virus of *Pieris rapae* was purified with chloroformbutanol treatment followed by differential centrifugation and sucrose gradient centrifugation. The sedimentation coefficient of virion was approximately 132S, and it banded at a density of 1.39 g/cm³ in CsCl.

The sedimentation coefficients of the protein components from the healthy larvae were 16S, 38S, 76S, while those from dead infected larvae were 17S, 62S, 127S respectively. The last component (127S) contain-

ed the virus.

Both purified virus and partially purified virus preparations from dead infected larvae gave a corresponding precipitation line in gel when tested with the antiserum against partially purified virus. When crude extracts of healthy larvae and purified virus were tested with antiserum against partially purified virus, the pure virus produced a precipitation line which did not join to that formed by healthy extract.