

## 黄地老虎颗粒体病毒的研究

### IV 包涵体、病毒粒子蛋白及其血清学的特性

石玉珊 刘延娜 吴祖银

(新疆农业科学院微生物研究所, 乌鲁木齐)

王小凤 裴美云

(中国科学院微生物研究所, 北京)

利用反复调等电点的方法制备的 A:GV-XJ 的包涵体 A 和 B 蛋白在沉降分析中均达一个峰纯度。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示 A:GV-XJ 的包涵体 A 蛋白有三个条带, 其分子量分别为 32,000、25,500 和 22,000。B 蛋白和病毒粒子蛋白都由 11 个结构多肽组成, 其分子量范围分别为 100,000—22,500 和 95,000—12,000。我们还对 A:GV-XJ 的包涵体 A 蛋白作了氨基酸组成的分析。免疫扩散试验表明 A、B 蛋白和病毒粒子间均有血清学反应。

**关键词** 黄地老虎; 包涵体; 病毒粒子

昆虫杆状病毒 (Baculoviruses) 的一个显著特点是病毒粒子包埋在结晶的蛋白基质中, 尽管电镜的观察已很详细<sup>[1]</sup>, 但对其物化性质了解得还不够。此外包涵体蛋白与病毒粒子蛋白是否有血清学关系尚未有肯定的结论<sup>[2-4]</sup>。澄清这些问题将有助于阐明颗粒体病毒侵染与复制的分子机制。我们用聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫扩散等方法研究了黄地老虎颗粒体病毒新疆分离物 (Agrotis segetum granulosis virus 简称 A:GV-XJ) 的包涵体蛋白和病毒粒子蛋白的多肽组成和血清学等特性。

### 试验方法

#### (一) A:GV-XJ 的 A、B 蛋白和病毒粒子的制备

包涵体和病毒粒子(系指带囊膜的核衣壳)的提纯按前文方法进行<sup>[5]</sup>。提纯的包涵体在 0.05M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.05M NaCl 溶液(包涵体浓度 10 mg/ml)中 20℃ 水解 2 小时。将水解液的 pH 调至 8.0—8.5 后 105,000 ×g 超离心 1 小时。从上清

液中利用调整等电点<sup>[6,7]</sup>方法分离包涵体蛋白。当 pH 调至 5.5—5.8 时, 析出白色絮状物, 在 4℃ 冰箱中放置 2 小时后, 6,000 rpm 离心, 沉淀物即为 A 蛋白。再将上清液的 pH 调至 3.5—3.8, 又析出白色沉淀物, 也在 4℃ 下放置 2 小时, 令其充分沉淀, 同样离心, 沉淀即为 B 蛋白。以上 A、B 蛋白分别悬浮于蒸馏水中, 通过 3—4 次的反复调等电点, 纯化 A、B 蛋白, 然后分别冷冻干燥, 保存备用。

把上述超离心所得沉淀悬浮于蒸馏水 (pH 8.0) 中, 再经蔗糖梯度离心<sup>[8]</sup>纯化, 获得病毒粒子样品。

#### (二) A:GV-XJ 的包涵体 A、B 蛋白和病毒粒子蛋白的多肽分析

参照 Brown 等<sup>[9]</sup>的聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法, 凝胶柱直径 6mm, 长 8cm, 10% 丙烯酰胺(含 0.2% N'-N'-甲叉双丙烯酰胺), 0.075% 过硫酸铵, 0.06% 四甲基乙二胺和 0.1% 十二烷基磺酸钠, 0.05M 磷酸缓冲液 (pH 7.8)。

本文于 1982 年 12 月 6 日收到。

新疆农业科学院微生物研究所严民范同志参加部分工作; 中国科学院生物物理研究所协助分析超离心, 一并致谢。

样品 (1mg/ml) 在 1% 十二烷基硫酸钠, 1% 2-巯基乙醇的 0.05 M 磷酸钠缓冲液 (pH7.8) 中, 加入适量的溴酚蓝指示剂后, 经 100℃ 2min 降解, 每根胶的上样量为 60 μg, 电泳条件为 6mA, 5.5 小时。

电泳后, 凝胶用 0.25% 考马斯亮蓝 R250 [配在 50% 甲醇 (90 ml) 和冰醋酸 (10ml) 中] 染色固定 2h, 随之在 10% 甲醇和 10% 冰醋酸中脱色。

用作标定蛋白多肽分子量的参照蛋白有: 牛血清清蛋白 (68,000), 卵白蛋白 (43,000), 细胞色素 C (11,700) (英国 BDH Chemicals Ltd 产品)。以参照蛋白的分子量和泳动距离绘制标准曲线以确定各蛋白多肽的分子量。

**(三) AsGV-XJ 包涵体 A、B 蛋白及病毒粒子的抗血清制备及免疫扩散试验**

取包涵体、A、B 蛋白 (各 3mg) 和病毒粒子 (1.5 A260) 分别溶于 1ml pH 8.0 的生理盐水中, 与等量的 Freund 氏全佐剂乳化, 免疫家兔, 每 7 天静脉注射一次, 共注射三次, 最后一次的第 7 天采血制备抗血清。抗血清的效价: 包涵体和 A 蛋白为 1:1024, B 蛋白和病毒粒子为 1:512。用 1% 琼脂糖进行免疫扩散试验分析四种抗原之间的关系。

**(四) AsGV-XJ 包涵体 A、B 蛋白和病毒粒子的沉降分析**

样品均在微碱 (pH8.0) 的蒸馏水中, 浓度分别为 10 mg/ml 和 2 mg/ml, 在 UCA-IA 分析超离心机上进行, 离心速度 60,000 转/min 左右。

**(五) AsGV-XJ 包涵体 A 蛋白的氨基酸组成**

2 mg A 蛋白溶于 1ml 6NHCl 中, 于 110℃ 水解 24 小时后, 在 ULA-5 型氨基酸分析仪上进行氨基酸组成的测定。

**结果与讨论**

**(一) AsGV-XJ 包涵体 A、B 蛋白的沉降分析和紫外吸收特性**

沉降分析这些制剂都获得一个峰, 表明利用反复调等电点和蔗糖梯度离心分别提取的 A、B 蛋白 (图 1) 和病毒粒子<sup>(2)</sup> 已

达可供一般生化分析的纯度。

图 2 显示 A、B 蛋白的紫外吸收高峰在 280 毫微米, 是典型的蛋白吸收曲线。

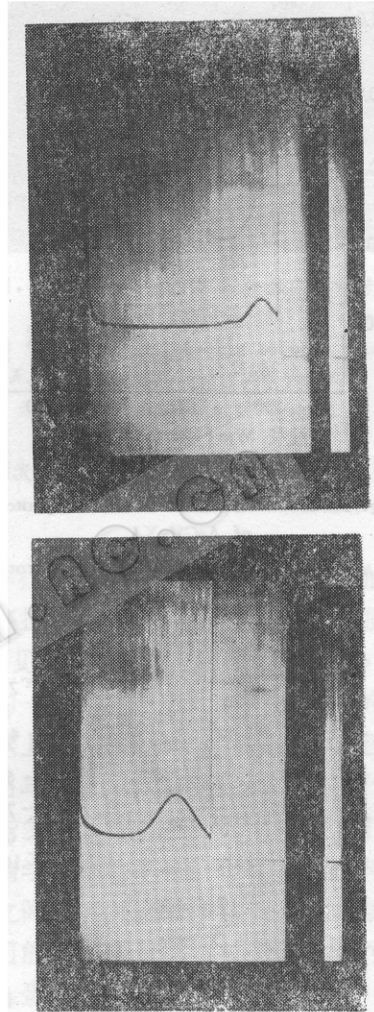


图 1 AsGV-XJ A、B 蛋白的分析超离心  
Fig. 1 Sedimentation pattern of A and B protein of AsGV-XJ  
上: A 蛋白 下: B 蛋白  
Top: A protein, Bottom B protein

**(二) AsGV-XJ 包涵体 A、B 蛋白和病毒粒子的多肽凝胶电泳**

提纯的病毒粒子蛋白约含 11 个多肽, 其中分子量为 35,000 和 12,250 的两个多肽含量较大。A 蛋白主要含分子量为 32,500、25,500 和 22,000 三个多肽, 其中

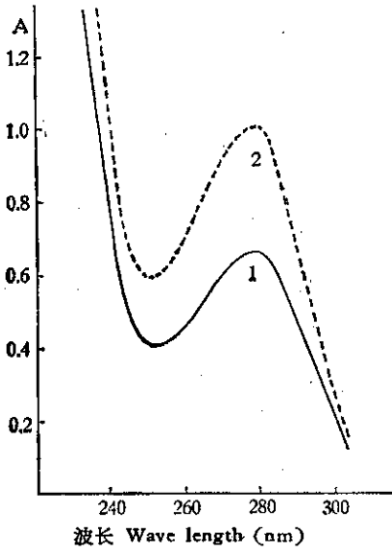


图 2 AsGV-XJ A、B 蛋白的紫外吸收光谱  
Fig. 2 UV absorption of A and B proteins of AsGV-XJ

1. A 蛋白 A protein 2. B 蛋白 B protein

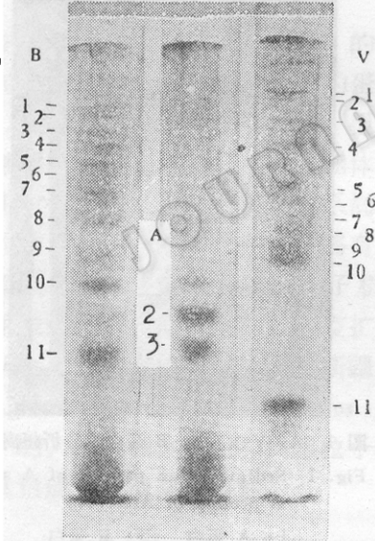


图 3 AsGV-XJ 包涵体 A、B 蛋白和病毒粒子蛋白的多肽分析

Fig. 3 Polypeptides analysis of proteins A, B from granulin and from enveloped nucleocapsid

10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳  
A, B. 包涵体 A, B 蛋白  
V. 病毒粒子蛋白

10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis  
A, B. Proteins A and B from granulin  
V. Protein from enveloped nucleocapsid

25,500 的肽含量最大。B 蛋白则约含 11 个多肽,其中分子量 32,500 和 22,000 的两个多肽与 A 蛋白中的相应多肽的分子量基本一致(图 3 和表 1)

表 1 AsGV-XJ 包涵体 A 蛋白、B 蛋白及病毒粒子蛋白的多肽的分子量

Table 1 Molecular weight of polypeptides of protein A and B from granulin and from enveloped nucleocapsid

A 蛋白多肽 polypeptides of protein A ( $\times 10^4$ )	B 蛋白多肽 polypeptides of protein B ( $\times 10^4$ )	病毒粒子蛋白多肽 polypeptides of enveloped nucleocapsid ( $\times 10^4$ )
A <sub>1</sub> 3.25	B <sub>1</sub> 10.10	V <sub>1</sub> 9.50
A <sub>2</sub> 2.55	B <sub>2</sub> 9.90	V <sub>2</sub> 9.30
A <sub>3</sub> 2.20	B <sub>3</sub> 8.60	V <sub>3</sub> 8.30
	B <sub>4</sub> 8.00	V <sub>4</sub> 6.80
	B <sub>5</sub> 6.80	V <sub>5</sub> 5.95
	B <sub>6</sub> 6.15	V <sub>6</sub> 5.80
	B <sub>7</sub> 5.20	V <sub>7</sub> 5.20
	B <sub>8</sub> 4.40	V <sub>8</sub> 4.40
	B <sub>9</sub> 3.85	V <sub>9</sub> 4.00
	B <sub>10</sub> 3.25	V <sub>10</sub> 3.50
	B <sub>11</sub> 2.25	V <sub>11</sub> 1.20

根据 Summers 等人<sup>[8]</sup>的研究,杆状病毒包涵体蛋白是一个单一的组分。利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶分析所报道的包括核多角体和颗粒体病毒在内的杆状病毒包涵体蛋白多肽分子量范围在 25,000 和 31,000 之间<sup>[10,11]</sup>。他们证实包涵体蛋白上结合着碱性蛋白酶,在包涵体碱水解时包涵体蛋白在其作用下可降解为小分子。Langridge 等人发现 Estigmen acrea 颗粒体病毒包涵体蛋白上结合着的碱性蛋白酶将组成包涵体蛋白的亚单位(分子量为 30,000)经过分子量为 29,000 和 27,000 的中间产物降解成分子量为 25,000 的产物<sup>[12]</sup>。至于 AsGV-XJ 包涵体 A 蛋白在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上分离成三个多肽是否也有类似酶的存在尚待确定。

迄今用聚丙烯酰胺凝胶电泳研究杆

表 2 AsGV-XJ 包涵体 A 蛋白的氨基酸组成

Table 2. Amino acid composition of protein A from granulin of AsGV-XJ

氨基酸种类	含量百分比	
	percentage ratio	
amino acid	AsGV-XJ	PbGV <sup>[6]</sup>
Lys	247.1	149.8
His	189.7	52.3
Arg	334.5	126.8
Asp	399.4	255.0
Thr	119.5	128.4
Ser	微量 trace	50.3
Glu	459.8	272.0
Pro	164.9	172.5
Gly	100.0	100.0
Ala	105.2	90.5
Cys	— —	59.2
Val	140.2	150.0
Met	— —	46.8
Ileu	193.1	140.2
Leu	304.6	228.0
Tyr	— —	— —
Phe	277.0	157.7

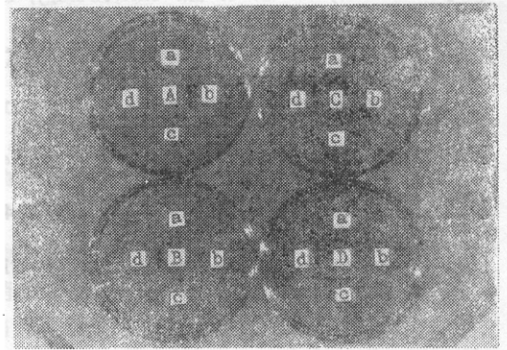


图 4 AsGV-XJ 包涵体 A、B 蛋白和病毒粒子蛋白的血清学关系

Fig. 4 Serological relationship between proteins A, B of granulin and Virus particles

A, B: 包涵体 A, B 蛋白

C: 包涵体

D: 病毒粒子

a, b, c, d 代表以上相应抗原的抗血清

粒子作抗原与上述各相应蛋白的抗血清进行免疫扩散试验表明它们之间均有血清学反应(见图 4)。这一结果与 Harrap 等人报道的一致<sup>[3]</sup>, 与 Bell 等人<sup>[4]</sup>报道的则不同。从上述的凝胶电泳分析看出, 包涵体 A 蛋白与 B 蛋白, B 蛋白与病毒粒子蛋白的某些多肽有相似性, 因而成为它们之间有血清学关系的基础。但是 A 蛋白与病毒粒子之间没有共同的多肽却有血清学反应, 可能的解释是病毒粒子样品沾污着少量的 A 蛋白。

状病毒的病毒粒子结构多肽数都由十几到二十左右组成, 其分子量从 12,000—160,000<sup>[9-11,13-16]</sup>。AsGV-XJ 病毒粒子的结构多肽属于较少的一类。AsGV-XJ 包涵体 B 蛋白的多肽组成, 从分子量上判断与病毒粒子的结构多肽有相似的一部分。

### (三) AsGV-XJ 包涵体 A 蛋白的氨基酸组成

表 2 列出 A 蛋白的 15 种氨基酸含量。其中 Lys、His、Arg、Asp 和 Glu 等氨基酸含量较高。与甘蓝菜粉蝶颗粒体病毒 (*Pieris brassicae* (L.) *granulosis virus*) 包涵体 A 蛋白的组成很不相同<sup>[17,18,6]</sup>。因此包涵体 A 蛋白的氨基酸组成可能具有种属的特异性。

### (四) AsGV-XJ 包涵体 A、B 蛋白和病毒粒子的血清学关系

用完整包涵体、A 蛋白、B 蛋白和病毒

### 参 考 文 献

- [1] Arnott, H. J. et al.: *J. Ultrastr. Res.*, 21: 251—68, 1968.
- [2] Krywienzyk, J. et al.: *J. Insect Path.*, 2: 118—23, 1960.
- [3] Harrap, K. A. et al.: *Virology*, 78: 14—31, 1977.
- [4] Bell et al.: *Virology*, 79: 162—72, 1977.
- [5] 王小凤等, 微生物学报, 23(1): 15—19, 1983.
- [6] Longworth, J. F. et al.: *J. of Invertebr. Path.*, 19: 42—53, 1972.
- [7] Brown, D. A. et al.: *Virology*, 81: 317—327, 1977.

- [8] Summers, M. D. et al.: *Intervirology*, **6**: 168—180, 1975.
- [9] Summers, M. D. et al.: *Virology*, **84**: 390—402, 1978.
- [10] Croizier, G. et al.: *Archives of virology*, **55**: 247—50, 1978.
- [11] David, W. A. L.: *Advances in virus Research*, **22**: 55—106, 1978.
- [12] Langride, W. H. R. et al.: *Virology*, **114**: 595—600, 1981.
- [13] Yanamoto, T. et al.: *Virology*, **94**: 71—81, 1979.
- [14] McCarthy, W. J. et al.: *J. Invertebr. Path.*, **28**: 57—65, 1976a.
- [15] Padhi, S. B. et al.: *Intervirology*, **4**: 333—45, 1975.
- [16] Young, S. Y. et al.: *J. Invertebr. Path.*, **22**: 471—472, 1973.
- [17] Wellington, E. F., *Biochem. Biophys. acta*, **7**: 238—243, 1951.
- [18] Wellington, E. F., *Biochim.*, **57**: 334—38, 1954.

## THE STUDY OF GRANULOSIS VIRUS OF *AGROTIS SEGETUM* IV. CHARACTERIZATION OF GRANULIN AND PROTEINS OF ENVELOPED NUCLEOCAPSID AND THEIR SEROLOGIC RELATIONSHIPS

Shi Yuhu Liu Yana Wu Zuyin

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

Wang Xiaofeng Pei Meiyun

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

The granulin of AsGV-XJ was extracted from supernatant of ultracentrifugation of alkali digested capsules. Protein A and B were isolated by the adjustment of isoelectrical points and were identified as a single peak with ultracentrifugal sedimentation. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed that protein A consisted of three polypeptides with molecular weights of 32,000, 25,000 and 22,000, respectively. Protein B and protein of enveloped nucleocapsid was consisted of 11 structural polypeptides with

molecular weights ranging from 100,000 to 22,500 and 95,000 to 12,000, respectively. The analysis of amino acids composition of protein A showed that the amount of several amino acids such as Lys, His, Arg, Asp and Glu is higher than others. Immunodiffusion test indicated that protein A, B and enveloped nucleocapsid are related with each other.

### Key words

*Agrotis segetum*; Enveloped nucleocapsid; Granulosis virus