

黄地老虎颗粒体病毒的研究

V. 病毒 DNA 侵染性的初报

裴美云 王小凤

(中国科学院微生物研究所, 北京)

石玉瑚 刘延娜 吴祖银

(新疆农业科学院微生物研究所, 乌鲁木齐)

结 果

由表 1 和表 2 可以看出, 各种接种物除作为对照的无菌水、缓冲液和 AsGV 的包涵体 A、B 蛋白外, 均能使黄地老虎幼虫罹病致死。经 DNA 酶处理的 AsGV DNA 基本上丧失侵染性的结果, 对于 AsGV DNA 具有侵染性提供了直接证据。AsGV DNA 的侵染性在喂毒法测定中较低, 不及病毒粒子的 1/4。添加包涵体 B 蛋白, 其侵染性明显提高, 接近于病毒粒子的水平, 但是包涵体 A 蛋白无此功能(表 1)。AsGV DNA 的侵染性在注射法测定中较高, 只比病毒粒子低 1/4, 其发病时间也比其他接种物短, 添加包涵体 B 蛋白的增效作用不如喂毒法中显著。Yamamoto 和 Tanada^[4]研究杆状病毒的病毒囊膜的生化性质及其在侵染性中的作用时, 发现行军虫 GV 包涵体蛋白中的增效因子 (Synergistic factor)——一种磷脂蛋白, 它能增强囊膜病毒粒子对昆虫体内肠的附着能力, 从而有利于侵染。Burand 等人^[5]在研究棉铃虫核型多角体病毒(HzNPV) DNA 的侵染性时提出, HzNPV 结构蛋白对于侵染 TN-368 细胞株是必需的。因为 HzNPV DNA 不能使 TN-368 产生蚀斑, 而病毒粒子却可以。这些事例可能有助于解释 AsGV-XJ 包涵体 B 蛋白对其 DNA 侵染性的增效作用的机理。我们在前文报道过 AsGV-XJ 包涵体 B 蛋白和病毒粒子在多肽组成中有一些相似的组分。迄今, 我们只见到有关少数核型多角体病毒(家蚕 NPV, 苜蓿 Y 纹夜蛾 NPV 和棉

本文于 1984 年 7 月 31 日收到。

从新疆分离到的黄地老虎颗粒体病毒 (*Agrotis segetum Granulosis Virus* 简称 AsGV) 能制备一种有效的病毒杀虫剂^[1]。我们已研究过 AsGV 的形态和生化特性^[2-4]。现报道用喂毒法和注射法测定 AsGV DNA 侵染性的结果。

材料和方法

(一) AsGV 的抽提

将按前文方法纯化的 AsGV 病毒粒子^[1], 悬浮于 0.14M NaCl、0.01M 柠檬酸钠、0.05M EDTA pH7.0 的缓冲液(1mg/ml)。按 60μg 酶/mg 病毒粒子的浓度, 加到经 37℃ 预处理的蛋白酶(Pronase E, E. Merck)中, 37℃ 保温一小时, 添加 SDS 使终浓度为 1%, 37℃ 一小时后, 用饱和重蒸苯酚抽提 3 次, 重蒸乙醚除残存苯酚, 以二倍体积的重蒸乙醇沉淀水相中的 DNA, 沉淀经 70% 重蒸乙醇洗涤, 溶于 0.1×SSC 溶液。经紫外光谱标定 DNA 浓度后分装, 置冰箱冰冻保存备用^[4]。

(二) AsGV 包涵体 A、B 蛋白的制备

见前文^[1]。

(三) AsGV DNA 侵染性的测定

采用喂毒法和注射法。

1. 喂毒法: 将黄地老虎 3 龄幼虫饥饿 24 小时, 先喂以涂有不同接种物(表 1)的灰藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 叶片(水洗净并经紫外线消毒)。饲完再换新鲜叶片。饲虫温度为 28±1℃, 逐日记录发病情况。

2. 注射法: 用消毒玻璃毛细管吸取各种接种物(表 2), 注射到 3 龄幼虫腹部体节中。其他与喂毒法相同。

表 1 喂毒法测定 A_sGV-XJ DNA 的侵染性

接种物种类*	喂毒虫数	感病虫数	化蛹虫数**/健康虫数	死亡率(%)
1. DNA (0.8μg/ml)	40	5	21/35	12.5
2. DNA (0.8μg/ml) +B 蛋白 (8μg/ml)	40	25	10/18	55.0
3. DNA (0.8μg/ml) +A 蛋白 (8μg/ml)	40	6	29/34	15.0
4. B 蛋白 (8μg/ml)	40	0	38/40	0
5. A 蛋白 (8μg/ml)	40	0	37/40	0
6. 病毒粒子 (10μg/ml)	40	35	0/5	70
7. 包涵体 (1mg/ml)	40	40	0	100
8. 无菌水	40	0	40/40	0

* 各种接种物均用无菌水配制。

** 不化蛹的虫体,经电镜检查未发现包涵体。

表 2 注射法测定 A_sGV-XJ DNA 的侵染性

接种物种类*	感 病 日 期 (天)											化蛹数	死亡虫数	死亡率 (%)
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
1. DNA (5μg/ml)	5	7	12	15	15	15						1	15/20	75
2. DNA (5μg/ml) + DNA 酶**	4	4	4	4								10	4/20	20
3. DNA (5μg/ml) + B 蛋白 (0.1mg/ml)	5	14	18	20	20								20/20	100
4. DNA (5μg/ml) + A 蛋白 (0.1mg/ml)	2	6	12	14	14	14							14/20	70
5. DNA (5μg/ml) + A、B 蛋白 (各 0.1mg/ml)	4	15	16	19	19								19/20	95
6. A、B 蛋白 (各 0.1mg/ml)	2	3	3	3								11	3/20	15
7. 病毒粒子 (0.1mg/ml)	4	5	18	18	20	20							20/20	100
8. 包涵体 (0.1mg/ml)			4	8	12	14	15	18	20				20/20	100
9. 缓冲液 (0.05M Tris-HCl, 0.01M EDTA pH7.0)	3***	3	3									14	3/20	15

* 各种接种物均悬浮于 0.05M Tris-HCl, 0.01M EDTA, pH 7.0 缓冲液, 均注射 3 龄幼虫 20 条, 每条虫的注射量为 5μl。

** 将 A_sGV-XJ DNA 与 DNA 酶(10μl/mg)溶于加含 0.01M MgCl₂ 的上述缓冲液, 于 37℃ 下, 保温 1 小时, 与 DNA 作用前, 酶液在 37℃ 下预处理 1 小时。*** 对照组死虫系注射损伤所致。在各接种物中, 都有这种情况, 因经 ELISA 法监测虫体无 A_sGV-XJ 存在。

铃虫 NPV 等) DNA 对同源宿主的幼虫、蛹和人的羊膜细胞或一些昆虫细胞株具有侵染性^[8-10] 的报道, 而在颗粒体病毒(GV)方面尚无先例。

参 考 文 献

- [1] 新疆农业科学院防治黄地老虎协作组: 微生物通报, 5(2): 1-2, 1978。
- [2] 徐绍华等: 微生物学报, 22(2): 123-125, 1982。
- [3] 王小凤等: 微生物学报, 23(1): 15-18, 1983。
- [4] 石玉瑚等: 微生物学报, 24(3): 230-235,

1984。

- [5] 裴美云等: 病毒学集刊, 1: 123-127, 1982。
- [6] Yamamoto, Y. and Y. Tanada: *J. Invert. Path.*, 32: 202-211, 1978。
- [7] Burand, J. P. et al.: *Virology*, 101: 286, 1980。
- [8] Onodera, K. et al.: *J. Mol. Biol.*, 13: 532-539, 1965。
- [9] Himmelen, M. et al.: *Virology*, 33: 507-512, 1967。
- [10] John, P. B. et al.: *Virology*, 101: 286-290, 1980。