

棉铃虫核型多角体病毒的血清学研究

张光裕 黄文林 朱必春 周春莲

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

用提纯的棉铃虫核型多角体病毒(NPV)的多角体蛋白和病毒粒子免疫家兔制备抗血清, 用免疫扩散和对流免疫电泳对四株棉铃虫 NPV 的多角体蛋白和病毒粒子进行了血清学比较研究。四株棉铃虫 NPV 分为两个包埋类型: 单粒包埋型和多粒包埋型。Sol-43 株和 H. zca 株属前者, VHA-273 株和 XIA-10 株属后者。同一株 NPV 的多角体蛋白或病毒粒子只与它们同源抗血清有反应。它们之间无交叉反应, 表明同一株 NPV 的多角体蛋白和病毒粒子各具特异的抗原。四株 NPV 的多角体蛋白不仅与同源的多角体蛋白抗血清有反应, 而且也与异源的多角体蛋白抗血清有交叉反应, 说明四株 NPV 多角体蛋白具有共同的抗原。而四株病毒粒子与同源的病毒粒子抗血清有反应, 在它们之间无交叉反应, 表明四株 NPV 病毒粒子各具自己特异的抗原。

关键词 棉铃虫; 核型多角体病毒; 血清学试验

棉铃虫(*Heliothis armigera*) NPV因在生物防治上有重要意义, 而引起国内外的重视和较广泛的研究。我国已建立了常年生产棉铃虫 NPV 的方法, 并取得了较好的防治效果^[1]。随着生产和应用的发展, 需要对这种病毒进行多方面研究。我们对棉铃虫 NPV 感染某些动物进行了血清学检测^[2], 并对棉铃虫 NPV 的血清学性质作了进一步探讨。

Bell 和 Orlob^[3]对粉纹夜蛾(*Trichoplusia*)的血清学研究表明, 未经纯化的多角体蛋白和病毒粒子不仅与同源抗血清起反应, 并且也与异源抗血清起反应。纯化的多角体蛋白和病毒粒子只与同源抗血清起反应, 与异源的抗血清不发生反应。Singh 等(1979)^[4]对鳞翅目幼虫(大豆夜蛾、粉纹夜蛾和苜蓿夜蛾)四株 NPV (两株 SEV, 两株 MEV)的多角体蛋白和病毒粒子进行了血清学比较, SEV 和 MEV 多角体蛋白同它们的抗血清之间都有交叉反应, 但 SEV 和 MEV 病毒粒子同它们的抗血清

之间无交叉反应。棉铃虫也有两种包埋类型的 NPV^[5], 我们对四株棉铃虫 NPV (两株 SEV、两株 MEV) 进行了血清学研究, 现将结果报道如下:

材料和方法

(一) 四株棉铃虫核型多角体病毒来源

Sol-43 株系本所分离, 属于单粒包埋型。

H.zca 株系美国宾夕法尼亚大学 Yendol 教授赠给上海昆虫研究所, 由该所转赠我所, 属于单粒包埋型。

VHA-273 株系湖北省荆州地区微生物站和华中师范学院生物系生防组分离, 属于多粒包埋型。

XIA-10 株系湖北省襄阳地区微生物站分离, 属于多粒包埋型。

在试验前经 JEM-100C 电镜观察证实了上述四株病毒的包埋类型。

(二) 多角体的提纯和降解

将多角体悬液滴于人工饲料^[1]上, 感染 4 龄

本文于 1982 年 12 月 14 日收到。

武汉大学张翠华、刘波参加部分工作; 本所电镜室拍摄照片, 特此致谢。

期棉铃虫, 收集病毒感染致死虫体, 加 0.01M PBS 研磨, 脱脂棉过滤。滤液经 500—3000rpm 差速离心三个轮次, 称重, 配成多角体 100mg/ml 的悬浮液。制备蔗糖浓度为 50—70% (W/V) 的梯度溶液, 梯度差为 5%。加样至蔗糖溶液体积的 1/10, 3,000rpm 离心一小时, 收集位于蔗糖浓度为 60—65% 的乳白色多角体带, 镜检可见均一的多角体。洗涤两次, 即可获得纯净的多角体。

取提纯的多角体 25mg, 加 1ml 0.05M NaCO_3 —0.05 M NaCl , pH11 在 $28^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 降解 2—3 小时, 3,000rpm 离心 30 分钟, 弃沉淀, 上清液用 40,000g 离心 1 小时, 将含多角体蛋白的上清液与沉淀的病毒粒子分开。

(三) 多角体蛋白和病毒粒子的纯化

在溶有多角体蛋白的上清液中加入饱和硫酸铵, 最终浓度达 40%, 置冰箱过夜, 离心后用 0.01M 硼酸缓冲液溶解, 再加饱和硫酸铵沉淀。先用蒸馏水透析一天, 再用 0.01M 硼酸缓冲液透析两天, 加迭氮化钠防腐, 最终迭氮化钠浓度达 0.1%, 置普通冰箱冰盒中保存, 作为免疫反应应用的多角体蛋白抗原。

So1-43 NPV 多角体蛋白抗原的柱层析: 用 $1.5 \times 70\text{cm}$ 的玻璃柱, 将 Sepharose 6B 制成 60cm 高的凝胶柱。柱床经 0.01M pH9.0 硼酸缓冲液平衡过夜后加样。每次上样 30mg/ml 多角体蛋白 8—9ml, 用 pH 9.0 硼酸缓冲液进行洗脱, 流速为 50ml/小时, 用 HD-76-6 型核酸-蛋白质检测仪进行自动检测记录和分部收集, 层析纯化后的各蛋白峰分别装入透析袋内, 外加蔗糖浓缩使蛋白含量为 10mg/ml, 作为反应应用的多角体蛋白抗原。

将高速离心沉淀的病毒粒子用 0.01M pH9.0 硼酸缓冲液悬浮, 3,000rpm 离心 30 分钟, 上清液经 40,000g 高速离心 1 小时, 重复三次, 最后沉降的病毒粒子加 0.01M 硼酸缓冲液悬浮, 加迭氮化钠置冰箱冰盒保存, 作为免疫和反应应用的病毒粒子抗原。用 JEM-100C 型电镜观察可见到完整的病毒粒子和脱掉套膜的核衣壳。

So1-43 NPV 病毒粒子抗原的柱层析: 用 $1.5 \times 35\text{cm}$ 的玻璃柱, 将 Sepharose 2B 制备成 30cm 高的凝胶柱。柱床经硼酸缓冲液平衡后, 加入 10mg/ml 的病毒粒子样品 3—5ml。用 0.01M

硼酸缓冲液洗脱, 流速为 30ml/小时。用 HD-76-6 型核酸-蛋白质检测仪自动检测记录和分部收集, 层析纯化后的病毒粒子, 用 751 型分光光度计测出含量, 装入透析袋内, 用蔗糖将病毒粒子浓缩至 10mg/ml, 作为反应应用的病毒粒子抗原。

(四) 抗血清的制备

将纯化的多角体蛋白和病毒粒子分别免疫家兔, 第一次加等量福氏完全佐剂, 以后各次不加佐剂。第一次试验免疫家兔三次, 皮下和胫窝淋巴结注射, 每次注射量 0.5ml, 间隔时间 5 天, 16 天后放血分离血清, 多角体蛋白抗血清效价 1:2,048。第二次试验免疫家兔五次。注射部位第一次足趾皮下和足掌肌肉, 第二、第三次皮下和胫窝淋巴结, 第四、第五次静脉注射。每只家兔每次注射多角体蛋白 10—20mg, 病毒粒子 5—9mg。最后一次注射后六天放血, 多角体蛋白抗血清效价 1:5120。

此外, 我们还用 So1-43 NPV 多角体免疫家兔, 制备多角体抗血清。静脉注射四次, 间隔时间 3—5 天, 每只家兔注射剂量 5—20mg。

(五) 血清学反应

1. 免疫扩散: 将 pH 8.2 0.04M 巴比妥缓冲液配制的 0.8% 琼脂倒入直径 6cm 平皿内, 琼脂层厚 3mm, 反应孔直径为 5mm, 孔距 5mm, 中心孔放抗体 30 μl (1:4 稀释), 周围孔放抗原 30 μl (4—7mg/ml), 28°C 扩散 24—48 小时, 观察结果。经 0.1% 氨基黑染色后拍照。

2. 对流免疫电泳: 将 pH 8.2 0.04M 巴比妥缓冲液配制的 0.8% 琼脂, 覆盖 $2.5 \times 7.5\text{cm}$ 的玻璃板, 琼脂层厚 3mm, 打孔并加 4—7mg/ml 的抗原 30 μl 及 1:4 稀释的抗体 30 μl 。用上述缓冲液作电泳液。电流每板 7mA, 在室温 13°C 下电泳 45 分钟, 观察结果。经 0.1% 氨基黑染色后拍照。

结 果

(一) 纯化的多角体蛋白质的检测

降解的 So1-43 NPV 多角体蛋白, 经饱和的硫酸铵沉淀透析后上 Sepharose 6B 柱层析, 显示出两个洗脱峰 (图 1A)。用 751 型分光光度计检测, 峰 2 是典型的蛋白质吸收峰 (图 1B), 在 275nm 处显示最

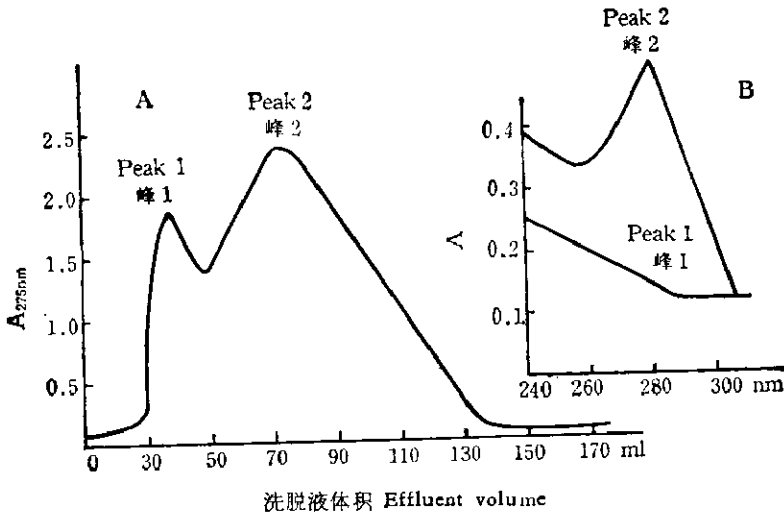


图1 Sol-43 NPV 多角体蛋白通过 Sepharose 6B 柱层析的洗脱曲线图

A: 显示出一个主峰(峰 2)和一个次峰(峰 1)
B: 两个峰的 UV 吸收光谱

Fig. 1 Elution profile of polyhedron protein of Sol-43 NPV chromatographed on Sepharose 6B shows a major peak (peak 2) a minor peak (peak 1) (A) and their UV absorbance spectra (B)

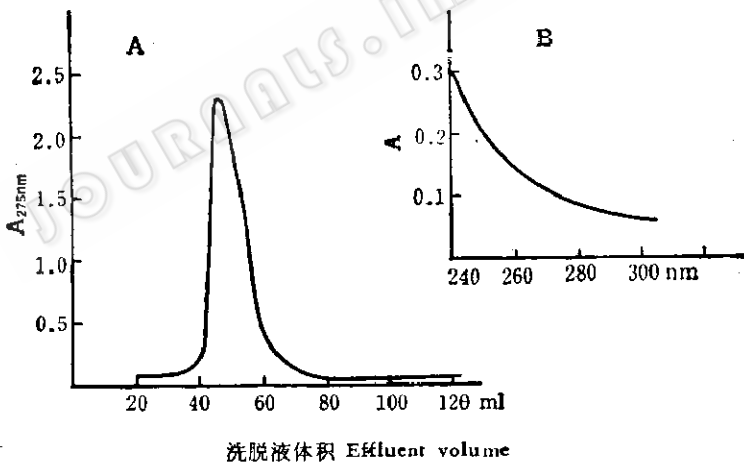


图2 Sol-43 NPV 病毒粒子通过 Sepharose 2B 柱层析的洗脱曲线图

A: 只显示一个峰 B: 该峰的 UV 吸收光谱

Fig. 2 Elution profile of virion Sol-43 NPV chromatographed on Sepharose 2B shows a single peak (A) and its UV absorbance spectrum (B)

大的 UV 吸收值,在 255nm 处显示最小的 UV 吸收值。而峰 1 却不显示最大与最小的 UV 吸收值而呈一滑线(图 1B),电镜观察也未看到病毒粒子。

(二) 纯化的病毒粒子的检测

高速离心后沉降的 Sol-43 NPV 病毒粒子,经 Sepharose 2B 柱层析,只显示出一个洗脱峰(2A),751 型分光光度计检测,在 240—300nm 范围内无最大和最小 UV 吸收值,而呈一滑线(2B)。通过电镜

观察为纯化的病毒粒子。

(三) 血清学反应

1. 免疫扩散: 四株 NPV 多角体蛋白抗血清与同源的多角体蛋白抗原或异源的多角体蛋白抗原都发生反应形成沉淀带, 但与病毒粒子不发生反应 (图 3、4, 表 1)。四株 NPV 的多角体蛋白抗原与抗血清作用形成的沉淀线在顶角处相互融合。

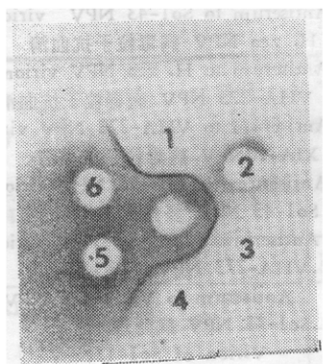


图 3 多角体蛋白抗血清免疫扩散试验
Fig. 3 Immunodiffusion of antiserum to protein of NPV

中心孔: Sol-43 NPV 蛋白抗血清
Antiserum to Sol-43 NPV protein

1. Sol-43 NPV 蛋白
Protein of Sol-43 NPV
2. H. zea NPV 蛋白
Protein of H. zea NPV
3. XIA-10 NPV 蛋白
Protein of XIA-10 NPV
4. VHA-273 NPV 蛋白
Protein of VHA-273 NPV

5. H. zea NPV 蛋白抗血清
Antiserum to H. zea NPV protein
6. VHA-273 NPV 蛋白抗血清,
Antiserum to VHA-273 NPV protein

四株 NPV 病毒粒子抗血清只与同源的病毒粒子抗原发生反应形成特异的沉淀带, 与异源的病毒粒子抗原或多角体蛋白抗原不发生反应 (图 5, 表 1)。

Sol-43 NPV 多角体蛋白抗血清与相应的多角体蛋白有反应, 与峰 2 也有反应, 但与峰 1 不发生反应, 与 Sol-43 NPV 病毒粒子也不发生反应 (图 3、4)。

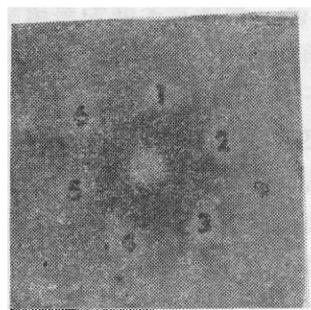


图 4 多角体蛋白抗血清免疫扩散试验

Fig. 4 Immunodiffusion of antiserum to protein of NPV
中心孔: Sol-43 NPV 蛋白抗血清
Antiserum to Sol-43 NPV protein
1. 峰 2 (6B 柱层析)
Peak 2 (column chromatography on Sepharose 6B)

2. 正常兔血清
Normal Rabbit serum
3. Sol-43 NPV 蛋白
Protein of Sol-43 NPV
4. H. zea NPV 病毒粒子
Virion of H. zea NPV
5. Sol-43 NPV 病毒粒子
Virion of Sol-43 NPV
6. 峰 1 (6B 柱层析)
Peak 1 (column chromatography on Sepharose 6B)

Peak 1 (column chromatography on Sepharose 6B)

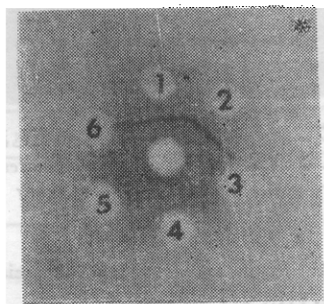


图 5 病毒粒子抗血清免疫扩散试验
Fig. 5 Immunodiffusion of antiserum to virion

中心孔: Sol-43 NPV 病毒粒子抗血清
Antiserum to Sol-43 NPV virion

1. Sol-43 NPV 病毒粒子
Sol-43 NPV virion
2. Sol-43 NPV 病毒粒子峰 (2B 柱层析)
Peak of Sol-43 NPV virion
(column chromatography on Sepharose 2B)
3. Sol-43 NPV 蛋白
Protein of Sol-43 NPV
4. H. zea NPV 蛋白
Protein of H. zea NPV
5. VHA-273 NPV 蛋白
Protein of VHA-273 NPV
6. XIA-10 NPV 蛋白
Protein of XIA-10 NPV

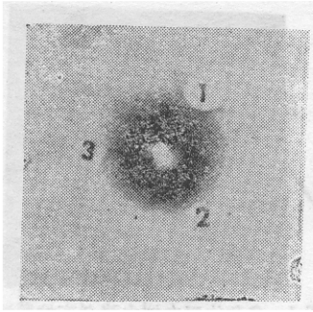


图6 多角体抗血清免疫扩散试验
Fig. 6 Immunodiffusion
of antiserum to NPV

中心孔: Sol-43 NPV 多角体抗血清
Antiserum to Sol-43 NPV

1. Sol-43 NPV 蛋白
Protein of Sol-43 NPV
2. Sol-43 NPV 病毒粒子
Virion of Sol-43 NPV
3. Sol-43 NPV 多角体
Sol-43 NPV

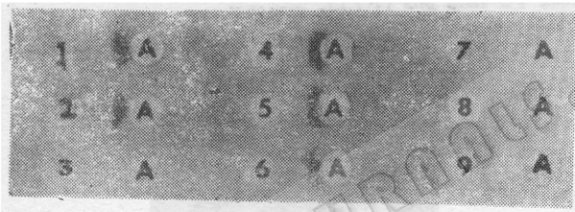


图7 多角体蛋白抗血清对流免疫电泳试验
Fig. 7 Counterimmunoelectrophoresis of
antiserum to protein of NPV

A. Sol-43 NPV 蛋白抗血清
Antiserum to Sol-43 NPV protein

1. VHA-273 NPV 蛋白
Protein of VHA-273 NPV
2. XIA-10 NPV 蛋白
Protein of XIA-10 NPV
3. Sol-43 NPV 病毒粒子
Virion of Sol-43 NPV
4. Sol-43 NPV 蛋白
Protein of Sol-43 NPV
5. 峰 2 (6B 柱层析)
Peak 2 (Column chromatography on Sepharose 6B)
6. H. zea NPV 蛋白
Protein of H. zea NPV
7. VHA-273 NPV 病毒粒子
Virion of VHA-273 NPV
8. 峰 1 (6B 柱层析)
Peak 1 (Column chromatography on Sepharose 6B)
9. H. zea NPV 病毒粒子
Virion of H. zea NPV

Peak 2 (Column chromatography on Sepharose 6B)

6. H. zea NPV 蛋白
Protein of H. zea NPV
7. VHA-273 NPV 病毒粒子
Virion of VHA-273 NPV
8. 峰 1 (6B 柱层析)
Peak 1 (Column chromatography on Sepharose 6B)
9. H. zea NPV 病毒粒子
Virion of H. zea NPV

Peak 1 (Column chromatography on Sepharose 6B)

9. H. zea NPV 病毒粒子
Virion of H. zea NPV

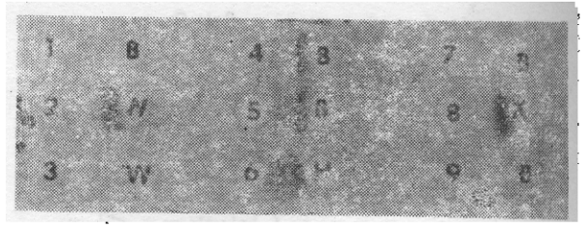


图8 病毒粒子抗血清对流免疫电泳试验
Fig. 8 Counterimmunoelectrophoresis
of antiserum to virion

B. Sol-43 NPV 病毒粒子抗血清

Antiserum to Sol-43 NPV virion

H. H. zea NPV 病毒粒子抗血清

Antiserum to H. zea NPV virion

W. VHA-273 NPV 病毒粒子抗血清

Antiserum to VHA-273 NPV virion

X. XIA-10 NPV 病毒粒子抗血清

Antiserum to XIA-10 NPV virion

N. Sol-43 NPV 多角体抗血清

Antiserum to Sol-43 NPV virion

1, 2. VHA-273 NPV 病毒粒子

Antiserum to VHA-273 NPV

3, 4. Sol-43 NPV 病毒粒子

Virion of Sol-43 NPV

5. Sol-43 NPV 病毒粒子峰 (2B 柱层析)

Peak of Sol-43 NPV virion

(Column chromatography on sepharose 2B)

6, 7. H. zea NPV 病毒粒子

Virion of H. zea NPV

8, 9. XIA-10 NPV 病毒粒子

Virion of XIA-10 NPV

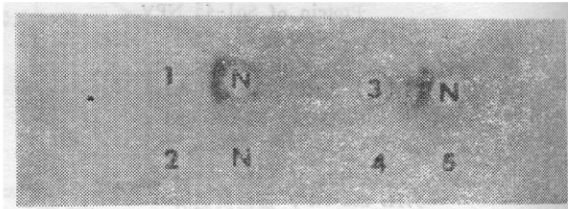


图9 多角体抗血清对流免疫电泳试验

Fig. 9 Counterimmunoelectrophoresis
of antiserum to NPV

N. Sol-43 NPV 多角体抗血清

Antiserum to Sol-43 NPV

1. Sol-43 NPV 蛋白

Protein of Sol-43 NPV

2. Sol-43 NPV 多角体

Sol-43 NPV

3, 4. Sol-43 NPV 病毒粒子

Virion of Sol-43 NPV

5. 正常兔血清

Normal rabbit serum

Sol-43 NPV 的多角体抗血清与它的

多角体蛋白和病毒粒子都能发生反应形成沉淀带，但与完整的多角体作用时不发生反应(图6)。可能由于多角体分子量比较大，在胶中不能泳动所致。

2. 对流免疫电泳：对流免疫电泳与免疫扩散试验的结果一致(图7—9，表1)。Sol-43 NPV 多角体蛋白抗血清与其相应

的抗原作用形成两条沉淀带，与其它三株 NPV 多角体蛋白作用也能形成两条沉淀带。但 Sol-43 NPV 的病毒粒子抗血清与其相应的病毒抗原作用形成四条沉淀带。Sol-43 NPV 多角体抗血清与 Sol-43 NPV 多角体蛋白作用形成两条沉淀带，而与其病毒粒子作用形成三条沉淀带。

表1 四株棉铃虫 NPV 免疫扩散和对流免疫电泳试验结果
Table 1 The results of immunodiffusion and counterimmunoelectrophoresis of four NPVs of the cotton bollworm

抗血清 Antisera		抗原 Antigen	VHA-273 NPV		XIA-10 NPV		H. zea NPV		Sol-43 NPV	
			P ^r	V	P ^r	V	P ^r	V	P ^r	V
VHA-273 NPV	P ^r		+	-	+	-	+	-	+	-
	V		-	+	-	-	-	-	-	-
XIA-10 NPV	P ^r		+	-	+	-	+	-	+	-
	V		-	-	-	+	-	-	-	-
H. zea NPV	P ^r		+	-	+	-	+	-	+	-
	V		-	-	-	-	-	+	-	-
Sol-43 NPV	P ^r		+	-	+	-	+	-	+	+
	V		-	-	-	-	-	-	-	+
	P								+	+
正常兔血清 Normal rabbit sera			-	-	-	-	-	-	-	-

注：+：阳性 positive -：阴性 negative
P^r：多角体蛋白 polyhedron protein P：多角体 polyhedron V：病毒粒子 virion

讨 论

试验结果证明，每一株棉铃虫 NPV 多角体蛋白抗血清和病毒粒子抗血清，只能与它们各自同源的抗原发生反应形成沉淀带，而不发生交叉反应。说明多角体蛋白和病毒粒子各具有特异的抗原决定簇。但完整的多角体抗血清即可与病毒粒子发生反应，又可与多角体蛋白发生反应。这一试验结果与 Bell 和 Orlob^[3] 的一致。四株 NPV 的多角体蛋白抗血清，不仅与同源

的多角体蛋白抗原发生反应形成沉淀带，而且也与异源的多角体蛋白抗原发生反应形成沉淀带，说明四株 NPV 多角体蛋白具有共同的抗原决定簇。但病毒粒子抗血清只能与同源的病毒粒子抗原发生反应形成沉淀带，而与异源的病毒粒子抗原不发生反应，不形成沉淀带，说明四株 NPV 的病毒粒子各具有它们特异的抗原决定簇。这一试验结果与 Singh 等^[4] 基本一致。我们可以利用血清学方法，对杆状病毒进行血清学分类鉴定。同一包埋型的 NPV 从形态

结构无法辨认,但在血清学上表现出差异。

Singh 等试验指出, SEV 多角体蛋白与它们的抗血清形成两条沉淀带,四株 NPV 多角体蛋白与 MEV 多角体蛋白抗血清只有一条沉淀带, SEV 及 MEV 病毒粒子间没有血清学差异。我们的试验中未见到 SEV 与 MEV 多角体蛋白之间的血清学差异, Sol-43 SEV 多角体蛋白抗血清既可与自己的蛋白抗原形成两条沉淀带,也可与 MEV 多角体蛋白形成两条沉淀带。SEV 与 MEV 病毒粒子之间都不发生反应,说明它们有血清学差异。

经核酸蛋白质检测仪自动检测记录下两个层析峰。峰 2 经 751 分光光度计检测,呈典型蛋白质 UV 吸收曲线。而峰 1 在 275nm 处无最大 UV 吸收值,在 255nm 处也无最小 UV 吸收值,呈一滑线。峰 2 与多角体蛋白抗血清有特异的血清学反应,而峰 1 与多角体蛋白抗血清无血清学反应。峰 1 是何种物质有待进一步研究。

多角体经碱降解后,用酸中和到 pH7.2 制备的病毒粒子,不仅与病毒粒子抗血清发生反应,也与多角体蛋白抗血清发生反

应。因为 pH7.2 接近 pH 5.5 多角体蛋白质的等电点。高速离心时病毒粒子下沉,多角体蛋白也下沉,达不到分离的目的。多角体降解后不用酸中和制备的病毒粒子,不经 Sepharose 2B 柱层析,与病毒粒子抗血清呈现特异的血清学反应,而与多角体蛋白抗血清不发生反应。

核型多角体病毒经碱降解 2—3 小时后释放的病毒粒子抗原包含完整的病毒粒子、核衣壳及其降解病毒颗粒,如脱下来的套膜以及核衣壳破裂释放出来的核蛋白或核酸。当 Sol-43 NPV 病毒粒子抗原与其相应的抗血清作用时,可看到四条沉淀带。说明病毒粒子抗原,不是单一的抗原成分。

参 考 文 献

- [1] 张光裕等: 植物保护学报, 8 (4): 235—240, 1981。
- [2] 黄文林等: 病毒学集刊, 3: 159—163, 1983。
- [3] Bell, C. D. and C. B. Orlob: *Virology*, 78: 162—172, 1977。
- [4] Singh, S.P.: *J. Invertebr. Pathol.*, 33: 19—30, 1979。
- [5] 张光裕等: 病毒学集刊, 3: 63—74, 1983。

SEROLOGICAL STUDIES ON POLYHEDRON PROTEIN AND VIRIONS FROM THE NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUSES (NPV) OF THE COTTON BOLLWORM, *HELIOTHIS ARMIGERA*

Zhang Guangyu Huang Wenlin Zhu Biehun
Zhou Chunlian

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Antisera were obtained by immunizing rabbits with purified preparations of polyhedron protein or virions from NPV of the cotton bollworm. Serological comparison of polyhedron protein and virions from four NPVs of the *Heliothis armigera* was done by immunodiffusion and counterimmunoelectrophoresis. Four NPVs were divided into two groups, singly and multiply embedded virus types (SEV and MEV). Sol-43 NPV and H. zea NPV belong to SEV. VHA-273 strain and XIA-10 strain of NPV belong to MEV. The polyhedron proteins and virions from same strain of NPV only reacted with homologous antisera and no cross-reactions were found. These results suggest that poly-

hedron proteins and virions from each strain of NPV have specific antigens respectively. The fact that polyhedron proteins from four NPVs not only reacted with homologous antisera but also with heterologous antisera indicated that they share a common antigen.

Virions from four NPVs only reacted with homologous antisera and no cross-reactions with each other were observed. This result shows that each of them has specific antigen.

Key words

Heliothis armigera; Nuclear polyhedron viruses; Serological test