

# 菜白蝶的一种新病毒

## III. 病毒核酸的特性

孙富林 陈明树 孙松柏

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

毕坎华 李小洁

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

1978 年从武汉市郊分离到一株菜白蝶新病毒。依照国际病毒分类标准, 对该病毒的生物学特性、形态结构<sup>[1,2]</sup>、生物物理和血清学性质<sup>[3,4]</sup>等进行了研究。试验结果证明, 这株病毒应归于细小病毒科中的密核病毒属<sup>[5]</sup>。本文报道该病毒的核酸特性。

### 材料与方 法

#### (一) 病毒提纯

采用差速及蔗糖梯度离心法<sup>[3]</sup>。

#### (二) 病毒核酸的快速释放及制片

取纯化的病毒悬液约 0.05ml, 加等体积无菌水溶解的 2% SDS 溶液, 置沸水浴 30、60、120 秒。分别将悬液滴在火棉胶-碳膜覆盖的铜网上, 立即用 2% 磷钨酸染液负染色或用铂钼金属投影。

#### (三) 病毒核酸的抽提

取纯化的病毒, 悬于适量的 0.1M NaCl、0.7 mM pH 7.6 磷酸缓冲液(以下简称 NPB)中, 使成 1mg 病毒/ml, 用等体积的 NPB 饱和酚于 55℃ 保温 60 分钟, 悬液经 13,000 转/分离心 10 分钟, 分层, 取水相, 用酚反复抽提 2—3 次, 再用氯仿: 丁醇 = 3:1(V/V) 萃取 2—3 次, 用乙醚去氯仿 1—2 次, 取水相于真空中抽去乙醚, 加 2—3 倍体积的 95% 冷乙醇沉淀核酸, 置 -20℃ 过夜, 离心收集沉淀, 加 125mM 醋酸钠, 70% 乙醇洗涤沉淀, 收集沉淀, 真空抽去乙醇, 加 50μl pH 7.2 NPB 溶解, 置冰箱备用。

#### (四) 核酸酶消化及电泳鉴定

1. DNA 酶溶液的配制: 取适量 DNA 酶, 溶于 0.01M 氯化镁中, 使成 5.9μg/μl。

2. RNA 酶溶液的配制: 取适量 RNA 酶, 溶于 5% pH 5.0 醋酸钠溶液中, 使成 5.04 μg/μl,

置 80℃ 水浴中处理 10—15 分钟, 灭活杂酶。

3. 对照用适量 λ 噬菌体 DNA 和酵母 RNA 溶液。

4. 酶消化及其鉴定: 取 2μl λ DNA 溶液, 5 μl 酵母 RNA, 7μl 菜青虫密核病毒核酸, 以上各取 2 份。一份分别加入 5μl 的 RNA 酶、DNA 酶, 置 37℃ 水浴 60 分钟, 然后各加原体积 1/4 的 50% 蔗糖、0.02% 溴酚蓝混匀; 另一份作为对照, 反应总体积约 20μl, 分别加样于 1.2% 含有 0.5 μg/ml 溴化乙锭的琼脂糖凝胶板, 电泳缓冲液用 1 × TBE(0.089M Tris-HCl pH8.3, 0.089M 硼酸, 0.0025 M EDTA), 胶板大小为 120 × 180 × 50mm, 水平电泳, 先预电泳 20mA 20 分钟, 调电流至 40 mA, 电泳 2—3 小时, 停止电泳, 置紫外灯分析仪下观察, 照相。

#### (五) 完整病毒颗粒甲醛反应吸收值变化的测定

取纯化的病毒悬液 (1.5mg/ml) 0.39ml, 加 1.6ml pH7.6 NPB, 再加 0.04ml 甲醛, 并设对照于 0、1、24 小时, 分别在日立 556 型分光光度计上测定扫描记录。

### 结 果

#### (一) 病毒核酸的快速释放制片

用 2% SDS 快速释放制片样品, 在电镜下观察, 可见有三种情况: 病毒颗粒刚刚释放核酸(图 1); 核酸完全脱离病毒蛋白外壳(图 2); 正、负单股核酸在高盐环境下正在杂交, 可见一端杂交, 一端尚未杂交(图 3)。

#### (二) 核酸的定性

本文于 1985 年 3 月 22 日收到。



图1 病毒颗粒正在释放核酸 ( $\times 82,500$ )

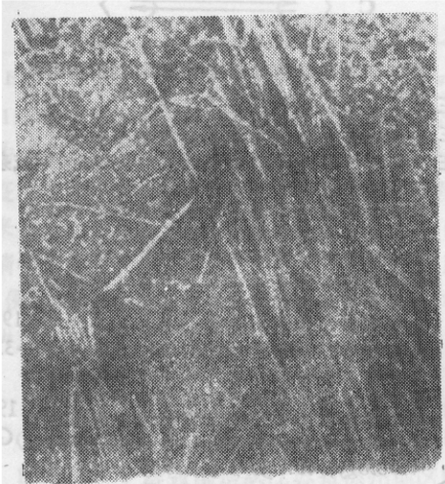


图2 病毒颗粒已完全释放核酸 ( $\times 82,500$ )



图3 病毒正、负单链核酸正在杂交 ( $\times 25,000$ )

酚抽提的核酸,经酶消化电泳观察,病毒核酸和 $\lambda$ 噬菌体 DNA 均被 DNA 酶消化而不被 RNA 酶消化,但对酵母 RNA 则相反。实验证明,菜白蝶细小病毒的核酸应是 DNA (图 4)。



图4 核酸经酶消化的电泳图

1.  $\lambda$  DNA
2.  $\lambda$  DNA + DNA 酶
3. RNA + DNA 酶
4. 样品核酸 + DNA 酶
5. 样品核酸
6.  $\lambda$  DNA + RNA 酶
7. RNA + RNA 酶
8. 样品核酸 + RNA 酶
9. RNA

### (三) 病毒颗粒的甲醛反应

经两次蔗糖梯度纯化的病毒颗粒悬液,加入 2% 甲醛后,在 0、1、24 小时分别用紫外分光光度计测定。扫描图示吸收值变化在 261—265nm 范围内,其最大吸收值在 265nm 处,吸收值在 11.6% (图 5)。

### 讨 论

昆虫密核病毒对于有害昆虫菜青虫和菜小卷叶蛾幼虫均有极强的致病性,本可作为杀虫剂,但由于该病毒还能感染脊椎动物细胞,所以不宜作杀虫剂。因此,在分类上研究这一病毒的特性就显得十分重要。目前发现的昆虫密核病毒为数不多,它在分类学上属于细小病毒科的密核病毒属。

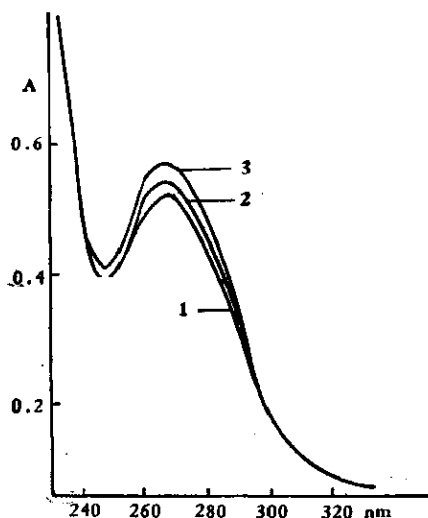


图5 菜白蝶病毒颗粒悬液加 2% 甲醛室温下吸收值的变化

1.0 时; 2.1 小时; 3.24 小时。

它的核酸是以特殊形式的正、负单股 DNA 分别存在于病毒颗粒内。在高浓度盐的条件下释放核酸, 正负股核酸杂交形成双链 DNA。为了研究单股核酸性质及其正负股核酸杂交过程, 我们试用了快速释放制片的方法, 获得了满意效果。观察到核酸释放初始, 全部脱出, 部分杂交, 全部杂交等过程。这对于核酸性质的研究有一定意义。从甲醛反应扫描图示, 也证明其核酸是以单链形式

包裹在病毒颗粒内 (图 6)。

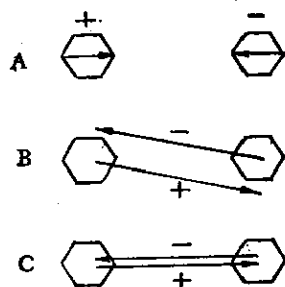


图6 菜白蝶病毒颗粒甲醛反应扫描图示

- A. 正负单股核酸分别包裹在颗粒内  
B. 在 0.07mM PBS 下释放核酸分别为单股  
C. 在 0.1 MNaCl 0.7mM NPB 下释放核酸形成杂交

## 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] 毕坎华等: 微生物学报, **23** (4): 309—321, 1983.
- [4] Fenner, F.: *Intervirology*, **7**: 1—116, 1976.
- [5] Kelly, D. C. and M. B. Harriet: *J. Gen. Virology*, **40**: 33—43, 1978.
- [6] Kelly, D. C. et al.: *J. Gen. Virology*, **21**: 396—407, 1977.
- [7] Sun Fulin et al.: *Int. Congr. Virology*, 5th (Abstracts), p. 369, 1981.