

荨麻蛱蝶核型多角体病毒的分离鉴定

吴祖银 艾秀莲 石玉瑚

(新疆农业科学院微生物研究所, 乌鲁木齐)

毛美珍

(新疆石河子农学院, 石河子)

新疆乌鲁木齐南山和石河子南山等地的荨麻蛱蝶 (*Aglais urticae*) 幼虫流行一种病毒病。罹病幼虫虫体肿胀, 不食, 多数幼虫以尾足附物倒垂悬挂而死。这种现象有的绵延几百米甚至几千米。将自然罹病的虫尸经匀浆差速离心, 甘油或蔗糖密度梯度离心提取纯化, 饱和酚抽提 DNA, 单分子展层, 电镜观察。病毒包涵体呈多角形, 病毒粒子呈杆状, 病毒 DNA 分子呈超螺旋型。经研究确认为荨麻蛱蝶核型多角体病毒 (Nuclear polyhedrosis virus, 简称 AuNPV)。该病毒国内尚未见报道。

材料与方 法

(一) 样品来源

从乌鲁木齐南山和石河子地区南山的荨麻植物上, 采集自然感病死亡的荨麻蛱蝶幼虫样品, 加适量青、链霉素和甘油, 置冰箱保存。

(二) 病毒的分离纯化

将虫尸置组织捣碎机中匀浆, 过滤, 差速交叉离心, 蒸馏水洗涤收集病毒多角体。病毒粒子提纯参阅 Onodera^[1] 等方法。将病毒样品置 0.03MNa₂CO₃ 和 0.05MNaCl (pH11) 的缓冲液中, 在室温下碱水解 1 小时进行超速离心, 将沉淀物用甘油或蔗糖密度梯度离心, 获得纯化病毒粒子。

(三) 回接试验

将上述初步提纯的多角体病毒悬液, 涂布于荨麻叶子上, 在室内对健康幼虫作添食感染, 并设对照进行比较试验。

(四) 显微镜和电镜观察

将纯化的多角体病毒悬液涂布于载玻片上,

按什维佐娃 (Shvezova, 1955) 氏染色法进行染色, 在光学显微镜下观察其着色反应。并将提纯的多角体和病毒粒子滴在电镜铜网上, 用 1% 醋酸双氧铀负染, 日立 100CX 透射电镜观察。

(五) Au NPV DNA 的分离纯化

参考 Bell^[2] 和 Marmas^[4] 等方法, 将病毒粒子悬浮于 10 mMTris-HCl, 1mMEDTA, pH8 的缓冲液中, 加入 0.1MNaCO₃ 和 0.1 MNaCl, 水解后除去不溶物, 加入 1%SDS37℃ 裂解 1 小时, 加等体积饱和酚抽提三次, 水相加等体积乙醚抽提二次, 再用氯仿抽提一次, 置透析袋中进行透析, 便获得纯化的 DNA 悬液。

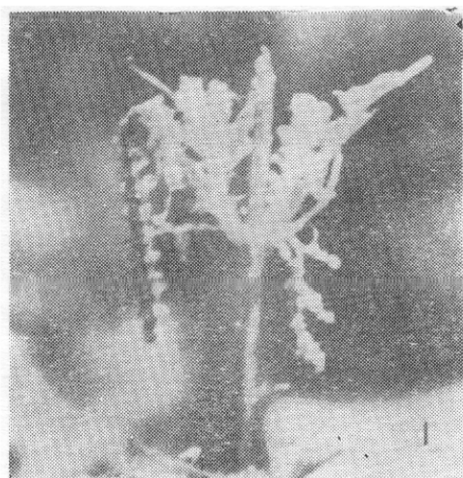


图 1 感染病毒病幼虫倒挂死亡症状

本文于 1986 年 3 月 4 日收到。

崔秀兰、赵恒、张超礼、王卫国、危信民和王忠萍等同志参加野外部分调查工作。承新疆农业科学院中心实验室拍摄电镜照片, 特此一并致谢。

结果和讨论

(一) 病征

经过多次现场调查, 荨麻蛱蝶幼虫患病毒病后, 多数以其尾足附物倒挂而死(图1)。将提纯的病毒包涵体进行室内回接喂毒试验, 吞食病毒的幼虫在3—4天内即显病, 行动缓慢, 体表略微肿胀, 死时亦呈倒挂状, 不久虫体组织液化, 褐色的病毒液外溢, 对照组无此病征。

(二) 光学显微镜检查

将提纯稀释的病毒悬液涂片, 干燥, 固定, 1%NaOH 处理1分钟, 水洗, 5%伊红染色, 镜检, 多角体呈鲜红色, 表现出核多角体病毒的特征。

(三) 电子显微镜观察

在透射电子显微镜下, 核多角体为不规则的五、六边形, 有的边角不明显, 呈钝圆状。多角体的面积大小不等, 大的 $1840 \times 1640 \text{ nm}$, 小的 $720 \times 860 \text{ nm}$, 平均为 $1040 \times 1180 \text{ nm}$ 。病毒粒子呈杆状, 两边平行, 并可见碱解出的核衣壳(如箭头所指)。病毒粒子平均长度为 325 nm , 宽度为 76 nm (图2、3)。

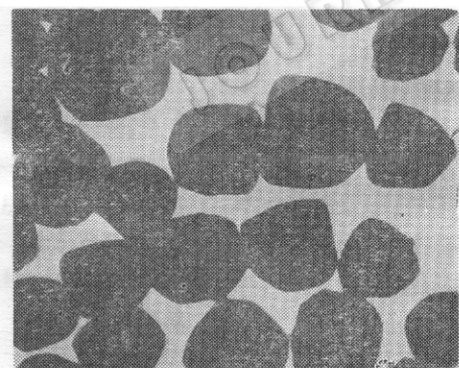


图2 AuNPV 包涵体电镜图像 ($13,000\times$)

(四) AuNPV DNA 的紫外特性和形态特征

提纯的 DNA 悬液经紫外光吸光度(A)的测定, 在 240 nm 处为最低峰, 在 260 nm 处有明显吸收高峰。DNA 的 260 nm 与 280 nm 吸光度值之比为 1.8, DNA 浓度为 $88.48 \mu\text{g/ml}$ 。

在透射电镜下可看到 AuNPV 的 DNA 分子, 其形态为线状和超线团状构型, 为双链开环或闭

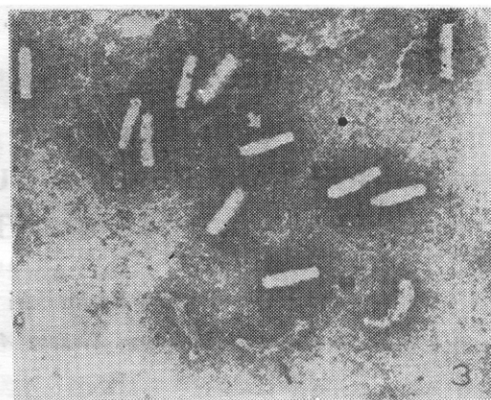


图3 AuNPV 粒子和核衣壳的电镜照片 ($22,000\times$)



图4 AuNPV DNA 分子闭环超螺旋构型 ($20,000\times$)

环分子(图4)。经测量 DNA 分子周长和估算, 其分子量为 71×10^6 道尔顿。

根据上述观察结果, 参照国际病毒分类与命名系统^[2], 该病毒应属于杆状病毒科 (Baculoviridae), 杆状病毒属 (Baculovirus), 亚组 A 中的一个种, 即 AuNPV/ 乌鲁木齐/82。

参考文献

- [1] Onodera, K. et al.: *J. Mol. Biol.*, 13: 532—539, 1965.
- [2] P. 怀尔狄编著 (廖延雄等译): 《病毒的分类与命名》, 科学出版社, 北京, 第134—135页,

1980,

[3] Bell, C. D. et al.: *Virology*, 78: 162—172,

1977.

[4] Marmus, J.: *J. Mol. Biol.*, 3: 208—218, 1961.

STUDY ON ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *AGLAIS URTICAE* NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS

Wu Zuyin Ai Xiulian Shi Yuhu

(Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Ürümqi)

Mao Meizhen

(Agricultural College of Shihezi, Shihezi)

A nuclear polyhedrosis virus was isolated from the *Aglaia urticae* larvae in Xinjiang China in 1983. The virus inclusion body was polyhedrosis shape measuring 1040×1180 nm,

virus particle was rod shape measuring 76×325 nm. The MW of virus DNA was 71×10^6 dalton.