

苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒在几株昆虫细胞内增殖的研究*

袁卫 朱国凯

(中国科学院上海昆虫研究所, 上海)

本文对苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (Ac NPV) 在几个新建昆虫细胞系内的增殖过程作了比较。其中 SIE-MSH-805、SIE-HAH-806 和 IPLB-SF-21AEC 细胞在病毒感染 96 小时后, 细胞上清液中的未埋入型病毒 (NOV) 含量可达到高峰; 测定 TCID₅₀ 分别为 1.5×10^7 /ml, 1.0×10^7 /ml 和 1.0×10^6 /ml。病毒感染 120 小时后, 90% 以上的细胞形成完整的多角体。据此认为, 上述三个细胞系是目前国内较为理想的离体系统, 可供用来增殖 Ac NPV。

关键词 苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒; 昆虫细胞系

自从 Goodwin^[1]首先在昆虫建株细胞内感染上了杆状病毒 (Baculovirus) 和 Hink^[2]成功地利用空斑法对杆状病毒作了定量测定后, 有关杆状病毒离体复制动态过程的研究得到了迅速的开展^[3]。最近, 在国内建株的昆虫细胞系上也建立起了杆状病毒——昆虫细胞离体系统^[4], 这为开展昆虫病理学, 以及利用杆状病毒作为组建外源基因载体的研究^[5], 特别是在离体系统内进行大量增殖杆状病毒制备出对农林害虫有防治作用的生物制剂^[6], 均显示出有价值的前景。本文对属于杆状病毒科 (Baculoviridae) A 亚组的苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒 (*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, Ac NPV) 在国内六个昆虫细胞系内的复制过程作了比较, 以期在这方面也能有一个新的探索。

材料和方法

(一) 细胞

1. 粘虫 (*Mythimna separata* Walker) 幼虫血细胞 SIE-MSH-805^[7]。
2. 棉铃虫 (*Heliothis armigera* Hubner) 幼

虫血细胞 SIE-HAH-806。

3. 棉铃虫卵巢组织 SIE-Ha-798^[8]。

4. 棉铃虫卵巢组织 SIE-Ha-806^[8]。

5. 茶尺蠖 (*Ectropis oblique* Warren) 蛹卵巢组织 SIE-EO-801^[9]。

6. 从来源于贪食夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 蛹卵巢组织 IPLB-SF-21AE 中克隆的 IPLB-SF-21AEC。

以上六个细胞系在我们实验室条件下已分瓶达 150 代次以上的记录。细胞传代方法均如前所述^[4]。

(二) 病毒

Ac NPV 由美国农业研究中心昆虫病理室提供。正式作接种和试验前, 先在 IPLB-SF-21AE 细胞中连续复制了 7 代, 取感染细胞上清液中的病毒粒子测定 TCID₅₀ 后备用。

(三) 观察方法

1. 在相差显微镜下观察多角体在细胞内形成的历程和感染细胞的百分率^[10]。

2. 50% 组织培养感染剂量 TCID₅₀ 滴定: 分别取接种 Ac NPV 后 2、6、12、18、24、36、48、72、

本文于 1987 年 1 月 22 日收到。

* 为中科院上海分院 1986 年青年鼓励基金资助课题。工作中得到任鸿林, 钟文恰同志帮助。曹明、徐祖国同志协助制作照片, 一并致谢。

96、120、168 和 336 小时后六个细胞系上清液作 TCID₅₀ 测定, 接种剂量 (m.o.i.) 为 1:10, 28℃ 培养。同时设 IPLB-SF-21AEC 细胞接种 Ac NPV 作对照^[11]。

3. 在扫描和透射电镜下的感染细胞显微结构变化的观察:

(1) 细胞表面的超微结构: 所有细胞系在感染病毒 48—96 小时后, 倾去上清液, 用 2.5% 戊二醛和 2% 四氧化锇固定, 然后用不同浓度酒精 (30% 至 100%) 脱水, 再置乙酸乙酯中过夜, 临界干燥, 喷涂上金后, 即置 DS-130 扫描电镜下观察。

(2) 病毒形态: 受病毒感染后的所有细胞系各在感染病毒 2、6、12、18、24、36、48、72、96、120、168、336 小时后, 经 500 × g 离心 15 分钟, 使细胞沉淀, 按常规方法进行固定包埋, 切成薄片, 染色后置 JEM-200CX 电镜下观察^[10]。

结 果

(一) 多角体在细胞内形成的历程和感染细胞百分率

SIE-MSH-805、SIE-HAH-806 和 IPLB-SF-21AEC 在感染 Ac NPV 48 小时后, 细胞核中就分别可以见到折光性极强

的多角体。这三个细胞系在感染 120 至 168 小时后, 90% 以上的细胞内都形成众多的多角体 (图版 I-1—6)。受感染的细胞在形态学上有明显的改变, SIE-MSH-805 从正常细胞的形态变为球形 (图版 I-1—2)。IPLB-SF-21AEC 则表现为细胞显著肿胀肿大, 形成的多角体亦丰富 (图版 I-5—6)。而 SIE-EO-801 细胞则不然, 感染后 72 小时仅少数细胞内可见到多角体, 168 小时后只有零星的细胞可以形成多角体, 即使维持至 336 小时后仍无增多趋势。SIE-Ha-798 和 806 细胞在感染后长达 168 小时, 也仅可在个别细胞中见到多角体。感染病毒后, 在各细胞系内多角体形成的差别如图 1 所示。

(二) 50% 组织培养感染剂量 (TCID₅₀) 测定

SIE-MSH-805、SIE-HAH-806 和 IPLB-SF-21AEC 在感染 48 小时后, 细胞上清液中的病毒粒子迅速剧增, 96 小时后 TCID₅₀ 可达最高值, 其滴度分别为 1.5×10^7 /ml, 1.0×10^7 /ml 和 1.0×10^6 /ml, 并可维持到 336 小时。而 SIE-EO-801 细胞

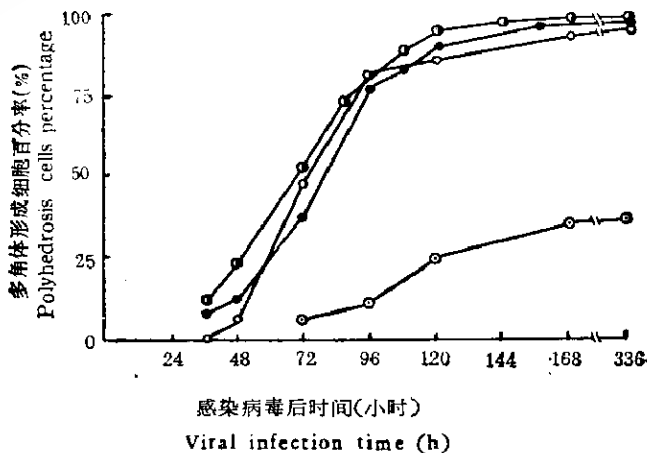
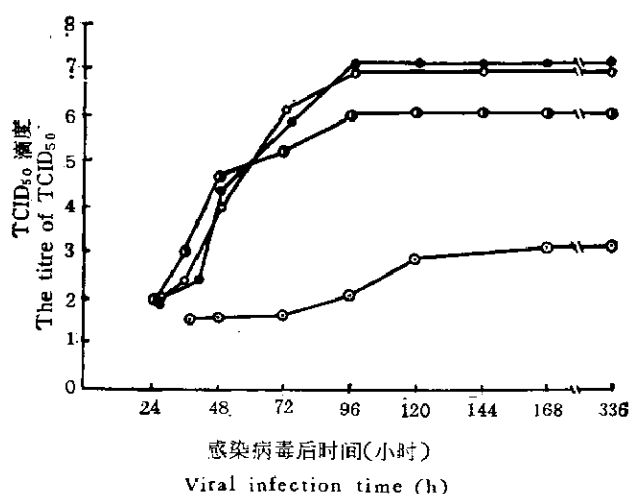


图 1 感染病毒后在各细胞内多角体形成的差别

Fig. 1 The difference of polyhedrosis in established insect cell lines after viral infection

● IPLB-SF-21AEC ○ SIE-HAH-806 ● SIE-MSH-805 ○ SIE-EO-801

图2 各细胞感染病毒后 $TCID_{50}$ 滴度的增长Fig. 2 Increased $TCID_{50}$ titre in established insect cell lines after viral infection

● IPLB-SF-21AEC ○ SIE-HAH-806 ● SIE-MSH-805 ○ SIE-EO-801

在感染 72 小时后上清液中的病毒粒子才开始出现, 168 小时后 $TCID_{50}$ 滴度也只达到 $1.2 \times 10^3/\text{ml}$ ($p < 0.05$)。但是 SIE-Ha-798 和 806 在感染 336 小时后细胞上清液中其 $TCID_{50}$ 滴度无明显的上升 ($p > 0.05$)。各细胞系感染病毒后 $TCID_{50}$ 滴度的增长情况见图 2。

(三) 细胞表面超微结构的变化

SIE-MSH-805、SIE-HAH-806 和 IPLB-SF-21AEC 在感染 48 至 96 小时后的细胞表面与正常细胞相比, 几乎全部失去纤细的微绒毛结构, 部分微绒毛融合成结节状突起 (图版 I-7—8), 细胞膜上布满微孔 (图版 I-9)。另外, SIE-EO-801、SIE-Ha-798 和 806 细胞表面正常微绒毛结构, 也都出现不同程度的改变。

(四) 病毒的发生

SIE-MSH-805、SIE-HAH-806 和 IPLB-SF-21AEC 细胞在感染早期出现病毒发生基质, 而且不断扩散并占据因受感染而膨胀的核大部。核衣壳在病毒发生基质边缘装配完毕后, 并衍生出来, 包被上套膜 (图版 II-10)。36 小时后在细胞核中增

殖出大量成熟的病毒杆, 它们以融合和芽突的方式, 穿透核膜和质膜释放至细胞外, 成为未埋入型病毒 (Nonoccluded Virus, NOV)。此时多角体开始形成, 并逐渐增多 (图版 II-11), 96 小时后可达高峰。已封套的病毒杆被禁锢于多角体之中成为埋入型病毒 (Occluded Virus, OV) (图版 II-12), 但是更多成熟的病毒杆则自由逸散在多角体外, 成为 NOV。在 SIE-MSH-805 和 SIE-HAH-806 细胞中形成多角体的数量不多, 产生的病毒以 NOV 形式为主; 而在 IPLB-SF-21AEC 细胞中形成多角体的量相对较多, 大多为 OV。受感染的一些 SIE-EO-801 和个别 SIE-Ha-798 及 806 细胞中亦可见到数量有限的多角体和病毒杆。但未见被包埋于多角体之中的病毒 (OV)。

讨 论

杆状病毒在离体建株细胞内的复制增殖动态引起了众多学者的广泛注意, 目前大多集中在具有广谱寄主的 Ac NPV。我们在 Ac NPV 对昆虫细胞系感染的基础

上,又深入研究了病毒的离体制备过程,从形成多角体细胞出现的时间和百分率,TCID₅₀测定,以及应用电镜对受感染细胞内病毒形态发生的观察,进一步论证了SIE-MSH-805、SIE-HAH-806和IPLB-SF-21AEC是国内目前较为理想的可供增殖Ac NPV的昆虫细胞系。

我们还发现,对Ac NPV敏感的SIE-MSH-805、SIE-HAH-806和IPLB-SF-21AEC细胞上清液中的NOV含量于感染96小时后达到高峰,而在电镜下观察到NOV大量释放至细胞外却提早在感染后48小时左右。因此,收获受感染细胞上清液中的NOV应在感染96小时后为宜。

OV和NOV是病毒在不同复制条件下所表现出的不同形式。杆状病毒主要以OV的形式在敏感寄主中持续作世代间的传播,并可在外界不利环境中较长时间地保持其感染力。一旦多角体被健康寄主摄入后,它可被寄主碱性消化液溶解,并释放出病毒。当病毒与敏感寄主中肠柱状上皮细胞融合,通过细胞吞饮作用,病毒进入到

细胞内时,病毒复制循环的新周期又重新开始,使寄主致病的病毒主要是以NOV形式在体内传播,使敏感组织受到感染。因此,在离体条件下如何大量增殖出主要是以OV形式存在的昆虫杆状病毒,应该说是应用离体细胞生产出有效病毒制剂中的一个值得重视的问题。

参 考 文 献

- [1] Goodwin, R.H. et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, 16:284—288, 1970.
- [2] Hink, W. F. et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, 22:168—174, 1973.
- [3] Lynn, D.Z. et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, 35:234—240, 1980.
- [4] 朱国凯等: 昆虫学研究集刊, 4: 145—149, 1984.
- [5] Smith, G.E. et al.: *Molecular and Cellular Biology*, 3:2156—2165, 1983.
- [6] Entwistle, P.F.: *Biocontrol News and Information*, 4:203—226, 1983.
- [7] 沈立美等: 昆虫学研究集刊, 3: 123—128, 1983.
- [8] 杨淑艳等: 昆虫学研究集刊, 3: 129—136, 1983.
- [9] 刘栖干等: 昆虫学研究集刊, 2: 123—128, 1982.
- [10] 裘卫等: 昆虫学研究集刊, 6: 129—134, 1986.
- [11] 裘卫等: 病毒学报, 3: 259—263, 1987.

STUDIES ON *AUTOGRAPHA CALIFORNICA* NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS (Ac NPV) MULTIPLIED IN INSECT CELL LINES

Qiu Wei Zhu Guokai

(Shanghai Institute of Entomology Academia Sinica, Shanghai)

The replication of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (Ac NPV) was compared in several insect cell lines. Among them SIE-MSH-805, SIE-HAH-806 and IPLB-SF-21AEC were the more sensitive cell lines for the replication of Ac NPV in our observation. The maxima of Ac NPV nonoccluded virus in cell suspension were $1.5 \times 10^7/\text{ml}$, $1.0 \times 10^7/\text{ml}$ and $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ respectively by

TCID₅₀ assay in 96 hours post-infection, and more than 90% of the cells formed polyhedrons in 120 hours postinfection. These three cell lines were the most promising ones in China as *in vitro* systems to replicate Ac NPV.

Key words

Ac NPV; Insect cell lines

图 版 说 明

图版 I

1. SIE-MSH-805 细胞($\times 1056$)
2. 感染病毒后 120 小时,细胞核内形成的多角体($\times 1056$)
3. SIE-HAH-806 细胞($\times 1056$)
4. 感染病毒后 120 小时,细胞核内形成的多角体($\times 1056$)
5. IPLB-SF-21AEC 细胞($\times 1056$)
6. 感染病毒后 120 小时,细胞核内多角体形成($\times 1056$)
7. IPLB-SF-21AEC 细胞($\times 5010$)
8. 感染病毒 96 小时,细胞表面出现结节($\times 3040$)
9. 布满微孔($\times 10040$)

图版 II.

10. 病毒感染早期在细胞核中出现病毒发生基质($\times 18000$)
 11. 感染病毒 72 小时后,细胞核中的多角体($\times 12000$)
 12. 埋入型病毒($\times 29000$)
- NOV = 未埋入型病毒 OV = 埋入型病毒 P = 多角体 V = 病毒
VS = 病毒发生基质

Explanation of plates

Plate I

1. SIE-MSH-805 cells ($\times 1056$)
2. Viral infection after 120h, polyhedrons in the cell nuclei ($\times 1056$)
3. SIE-HAH-806 cells ($\times 1056$)
4. Viral infection after 120h, polyhedrons in the cell nuclei ($\times 1056$)
5. IPLB-SF-21AEC cells ($\times 1056$)
6. Viral infection after 120h, polyhedrons in the cell nuclei ($\times 1056$)
7. IPLB-SF-21AEC ($\times 5010$)
8. Viral infection after 96h, Knobs-like on the cell surface
9. Micro-pores on the cell surface ($\times 10040$)

Plate II

10. Early viral infection, virogenic stroma in the nuclei ($\times 18000$)
 11. Viral infection after 72h, polyhedrons in the cell nuclei ($\times 12000$)
 12. Occluded virus ($\times 29000$)
- NOV = Nonoccluded virus OV = Occluded virus
P = Polyhedrons V = Virus VS = Virogenic stroma