

裂解气相色谱法和聚类分析在病毒识别中的应用研究*

汤显春 朱湘民 刘进学 夏祥明 陈 华**

(中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)

摘 要 应用裂解气相色谱法和系统聚类分析对 56 株不同地方分离株昆虫病毒(其中 NPV29 株, CPV11 株, GV16 株)进行了识别分析。利用欧氏距离系数的 8 种系统聚类算法所得聚类树状图谱, 结果表明, 通过裂解指纹图特征峰的分析, 可明显地区分 NPV、CPV、GV 彼此间的差异和相同亚群的不同分离株间的异同。用聚类分析进一步证明裂解气相色谱法对昆虫病毒识别的可行性, 从而为病毒的分类鉴定提供了准确、快速、重复性好的一种现代分析方法。

关键词 裂解气相色谱法, 昆虫病毒, 系统聚类分析

分类号 Q93-33

传统的病毒分类鉴定主要依靠其形态学、血清学、寄主范围、蛋白质以及理化特性和对有机溶剂的敏感性、核酸类型、结构及分子量、在细胞培养物上的特性以及流行病学特性等指标来进行。随着分析仪器和分析微生物学技术的发展, 在众多的现代分析技术中, 裂解气相色谱(Pyrolysis Gas Chromatography, 简称 PYGC)已广泛用于分析微生物和鉴别化学组成及结构复杂的生物大分子^[1~5]。大量研究证明, 由 PYGC 法绘制的指纹图对生物材料的鉴定、识别和分析, 已成为一种快速、灵敏、准确和重复性好的方法, 每种物质经过裂解得到的以化学成份为基础的指纹图, 经过酶解处理, 通常可将微生物鉴定到属、种或血清型, 也可区分被测生物大分子在化学组成和结构上的微小区别。我们首次用填充柱对 11 株昆虫病毒进行过分析鉴定^[6], 结果证明了 PYGC 分析鉴定昆虫病毒的可行性。用 PYGC 法对昆虫病毒进行系统分类鉴定, 迄今国内外尚无报道。

本研究采用 PYGC 法对 29 株核型多角体病毒(Nuclear polyhedrosis virus, 简称 NPV), 11 株质型多角体病毒(Cytoplasmic polyhedrosis virus, 简称 CPV), 16 株颗粒体病毒(Granulosis virus, 简称 GV)进行了 PYGC 分析, 并借助计算机进行了系统聚类分析。

1 材料和方法

1.1 病毒材料

1. 棉铃虫核型多角体病毒荆州株(*Heliothis armigera* virus)简称 HaNPV-Ji; 2. 棉铃虫核型多角体病毒新疆株简称 HaNPV-Xi; 3. 棉铃虫核型多角体病毒河南株简称 HaNPV-

* 中国科学院技条局资助项目。

** 湖北省公安厅刑侦科学研究所。

本文作者还有张世敏。

收稿日期: 1996-03-11

He; 4. 棉铃虫核型多角体病毒上海株简称 HaNPV-S; 5. 棉铃虫核型多角体病毒美国株简称 HaNPV-USA; 6. 棉铃虫核型多角体病毒武汉株简称 HaNPV-W; 7. 棉铃虫核型多角体病毒榆次株简称 HaNPV-Yu; 8. 茶毛虫核型多角体病毒陕西株 (*Euproctis pseudoconsperanuclear polyhedrosis virus*) 简称 EpNPV-Sh; 9. 茶毛虫核型多角体病毒铜仁株简称 EpNPV-To; 10. 茶毛虫核型多角体病毒福建株简称 EpNPV-Fu; 11. 茶毛虫核型多角体病毒安徽株简称 EpNPV-An; 12. 茶毛虫核型多角体病毒新胜株简称 EpNPV-Xi; 13. 茶毛虫核型多角体病毒成都株简称 EpNPV-Ch; 14. 茶毛虫核型多角体病毒恩施株简称 EpNPV-En; 15. 黄刺蛾核型多角体病毒广东株 (*Cnidocampa flavescens virus*) 简称 CtNPV-Gu; 16. 油桐尺蠖核型多角体病毒新胜株 (*Buzura sippre ssaria virus*) 简称 BsNPV-Xi; 17. 油桐尺蠖核型多角体病毒湖北株简称 BsNPV-Hu; 18. 云尺蠖核型多角体病毒湄潭株 (*Buzura thibetaria virus*) 简称 BtNPV-Me; 19. 云尺蠖核型多角体病毒沙平株简称 BtNPV-Sa; 20. 家蚕核型多角体病毒团风株 (*Bombyx mori virus*) 简称 BmNPV-Tu; 21. 中华金带蛾核型多角体病毒贵州株 (*Euproctes chinese virus*) 简称 EcNPV-Gu; 22. 榨蚕核型多角体病毒河南株 (*Antheraea pevngi virus*) 简称 ApNPV-He; 23. 斜纹夜蛾核型多角体病毒武汉株 (*Prodenialitara virus*) 简称 PiNPV-W; 24. 斜纹夜蛾核型多角体病毒天门株简称 PiNPV-Ti; 25. 扁刺蛾核型多角体病毒常德株 (*Thosea sinensis virus*) 简称 TsNPV-Ca; 26. 美国白蛾核型多角体病毒辽宁株 (*Hgphantria cunea virus*) 简称 HcNPV-L; 27. 美国白蛾核型多角体病毒陕西株简称 HcNPV-Sh; 28. 蓖麻蚕核型多角体病毒广东株 (*Philosamia cynthia risini virus*) 简称 PrNPV-Gu; 29. 斜纹刺蛾核型多角体病毒竹溪株 (*Oxyplax orhacea cmoore virus*) 简称 OoNPV-Zi; 30. 家蚕质型多角体病毒安康株 (*Bombyx mori virus*) BmCPV-AK; 31. 家蚕质型多角体病毒湖北株简称 BmCPV-Hu; 32. 家蚕质型多角体病毒四川株简称 BmCPV-Sc; 33. 家蚕质型多角体病毒安徽株简称 BmCPV-An; 34. 家蚕质型多角体病毒镇江株简称 BmCPV-Zn; 35. 家蚕质型多角体病毒浙江株简称 BmCPV-Zh; 36. 家蚕质型多角体病毒陕西株简称 BmCPV-Sh; 37. 家蚕质型多角体病毒团风株简称 BmCPV-Ta; 38. 家蚕质型多角体病毒苏州株简称 BmCPV-Su; 39. 家蚕质型多角体病毒重庆株简称 BmCPV-Ch; 40. 思茅松毛虫质型多角体病毒云南株 (*Den drolimus kikuchii virus*) 简称 DkCPV-Yu; 41. 黄地老虎颗粒体病毒北京株 (*Agrotis segtum granulosus virus*) 简称 AsGV-Bei; 42. 黄地老虎颗粒体病毒新疆株简称 AsGV-Xi; 43. 菜粉蝶颗粒体病毒武大株 (*Pieris rapae granulosus virus*) 简称 PrGV-Wd; 44. 菜粉蝶颗粒体病毒成都株简称 PrGV-Ch; 45. 菜粉蝶颗粒体病毒宜春株简称 PrGV-Yi; 46. 菜粉蝶颗粒体病毒中大株简称 PrGV-Zh; 47. 菜粉蝶颗粒体病毒武汉株简称 PrGV-W; 48. 菜粉蝶颗粒体病毒上海株简称 PrGV-Sh; 49. 茶蚕颗粒体病毒安徽株 (*Andraca bipanuctata granulosus virus*) 简称 AgGV-An; 50. 白杨天社蛾颗粒体病毒湖北株 (*Melalopha anachoreta virus*) 简称 MaGV-Hu; 51. 斜纹夜蛾颗粒体病毒陕西株简称 PiGV-Sa; 52. 黄刺蛾颗粒体病毒常德株 (*Xnidocampa flan virus*) 简称 XfGV-Ca; 53. 黄刺蛾颗粒体病毒湖北株简称 XfGV-Hu; 54. 黄刺蛾颗粒体病毒四川株简称 XfGV-Si; 55. 甘蓝夜蛾颗粒体病毒榆次株 (*Barathra brassicae virus*) 简称 BbGv-Yu. 病毒株由中国菌种保藏委员会普通病毒保藏中心提供。

1.2 病毒样品增殖及纯化^[7]

1.3 裂解色谱分析条件

在带有 PyR-2A 管式炉裂解器和 CR₃A 色谱数据处理机的 Shimadzu Gc-9A 气相色谱仪上进行的。色谱柱: 交联OV-101, 24m, 内径 0.2mm, 程序升温: 开始 60℃, 保持 1min, 以 6℃/min 速率升至 180℃, 保留 20min 直至分析完毕。用微量注射器取纯净病毒悬液 15μl, 注入裂解器的铂舟中, 置红外灯 (500W) 的一定距离处烘约 10min。裂解温度预先稳定在 700℃, 进样前, 样品舟先在裂解炉进口处停留 2min, “PIPE”置 4 处, 裂解时间为 12s, 进样口 240℃, N₂: 500ml/min, H₂ 0.6kg/cm², 空气 0.5kg/cm², 尾吹 40ml/min, FID: 10¹ × ATTZ, 纸速 0.5cm/min, 按上述步骤, 每株病毒样品重复 3 次。

1.4 系统聚类分析

计算机程序用汇编语言完成, 在 COPAO386 微机及兼容机上进行。

1.4.1 原始数据矩阵的建立: 将毒株样品色谱图中选出一张, 确定每株在色谱数据处理机上绘制出的峰高百分数, 制成数据表, 即为供聚类分析用的原始数据矩阵。

1.4.2 系统聚类算法: 根据类与类之间的距离的定义不同, 一般分如下算法, 即最短距离法、中间距离法、最长距离法、类平均法、重心法、离差平方和法、平均距离法和可变法等。依据这 8 种计算类间距离的递推公式统一如下形式:

$$Gr = GPUGq.$$

$$DKr = apDKp + aqDKq + Bpq + r |DKp| - DKq$$

DKr 为类 GP 和 Gq 合并成 Gr, 后某一类 GK (K ≠ pq) Gr 间的距离, DKp 为类 GK 间的距离, DKq 为类 GK 与 Gq 间的距离, Dpq 为类 GP 与 Gq 间的距离。aP、aq、B 和 r 依算法不同而取不同的值^[8]。

2 结果和讨论

2.1 NPV 指纹图特征

以 EpNPV-An (图 1) 为例, 29 株 NPV 病毒均具有峰形相同的 50 个峰 [保留时间 (RT ± 0.05min) 可视为同一值], 每张指纹图中相应的第 11、12、14 号峰高呈递减趋势, 第 6 号峰低于第 8 号峰高。采用对应峰比值可将 29 株 NPV 的 19 个特征峰进行比较, 结果发现: EpNPV-Sh, EpNPV-F 和 EpNPV-An 有多项峰高比值数据相等或接近, 表明这三个分离物性质极相似。BtNPV-Sa 和 BtNPV-Me; EpNPV-Xi 和 EpNPV-En; HaNPV-He 和 HaNPV-G 也是性质极相似的三对分离物。

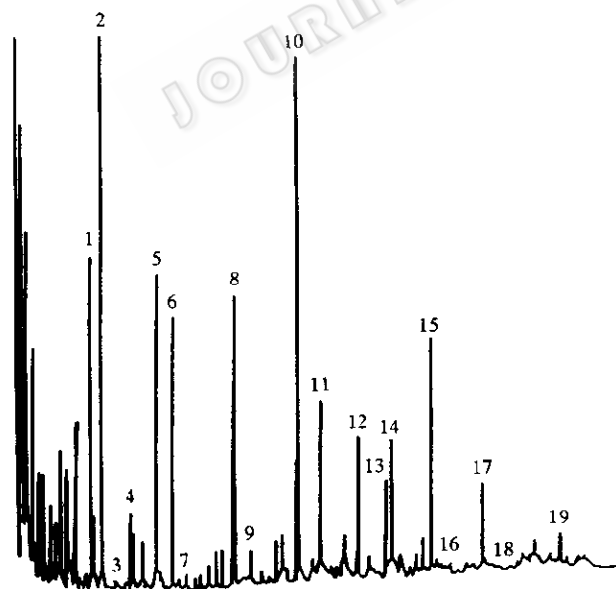


图1 EpNPV-An裂解色谱图

Fig. 1 Pyrochromatogram of EpNPV-An

2.2 CPV 指纹图特征

以 BmCPV-Su(图 2)为例,11 株 CPV 病毒同样具有峰形完全相同的 50 个峰,从每张图中选出 19 个特征峰进行比较,CPV 区别于 NPV 和 GV 显而易见的特征是第 10 号峰最高。整个图谱中的最高峰第 10 号和第 2 号其间包含着许多大小不同的峰。通过相应的峰高比值计算,发现: BmCPV-Si 和 BmCPV-Ta, BmCPV-Sh 和 BmCPV-Zh 性质极为相似。其他 CPV 都存在程度不同的相似性,但它们都是不同地方分离的各不相同的毒株。

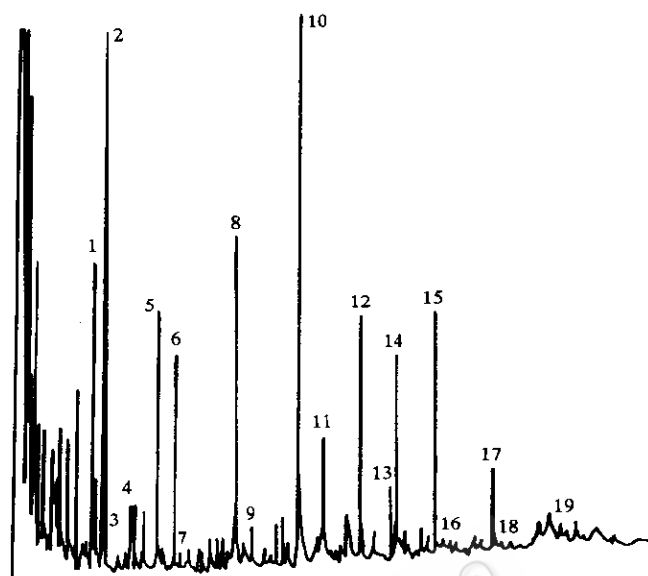


图2 BmCPV-Su裂解色谱图

Fig. 2 Pyrochromatogram of BmCPV-Su

2.3 GV 指纹图特征

以 PrGV-zh 株为例(图 3),16 株 GV 病毒具有完全相同的 50 个峰,它明显区别 NPV

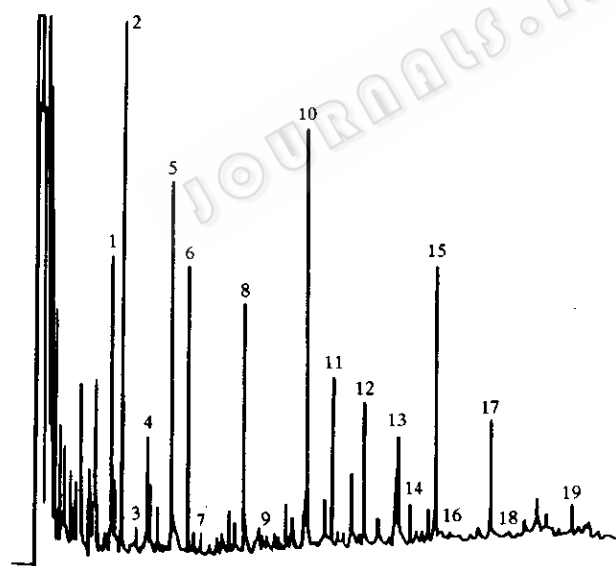


图3 PrGV-Zh裂解色谱图

Fig. 3 Pyrochromatogram of PrGV-Zh

的特点是:19 个特征峰中的第 5、6、8 号峰呈递减趋势。采用相应峰高比值法对 16 株 GV 进行比较,多项峰高比值数据相同或接近,可视为这些毒株性质相同。结果表明 PrGV-W 和 PrGV-Sh 是性质完全相同的两个不同地方分离株,从血清学性质、病毒粒子结构多肽的 SDS-PAGE 分析以及 DNA 酶切图谱都证明它们属同一毒株。PrGV-Zh、PrGV-Ch 和 MaGV-Hu 也是性质极为相似的。除此以外,其余毒株也存在不同程度的相似性。

2.4 系统聚类分析结果

将 56 株病毒经裂解得到的指纹图谱,在每张图谱上确定 19 个特征峰的对应位置,根据 CR3A 数据处理机绘出的峰高百分率值,建立各毒株原始数据矩阵,做聚类分析,经聚类得到的树状图谱(图 4)中,证明

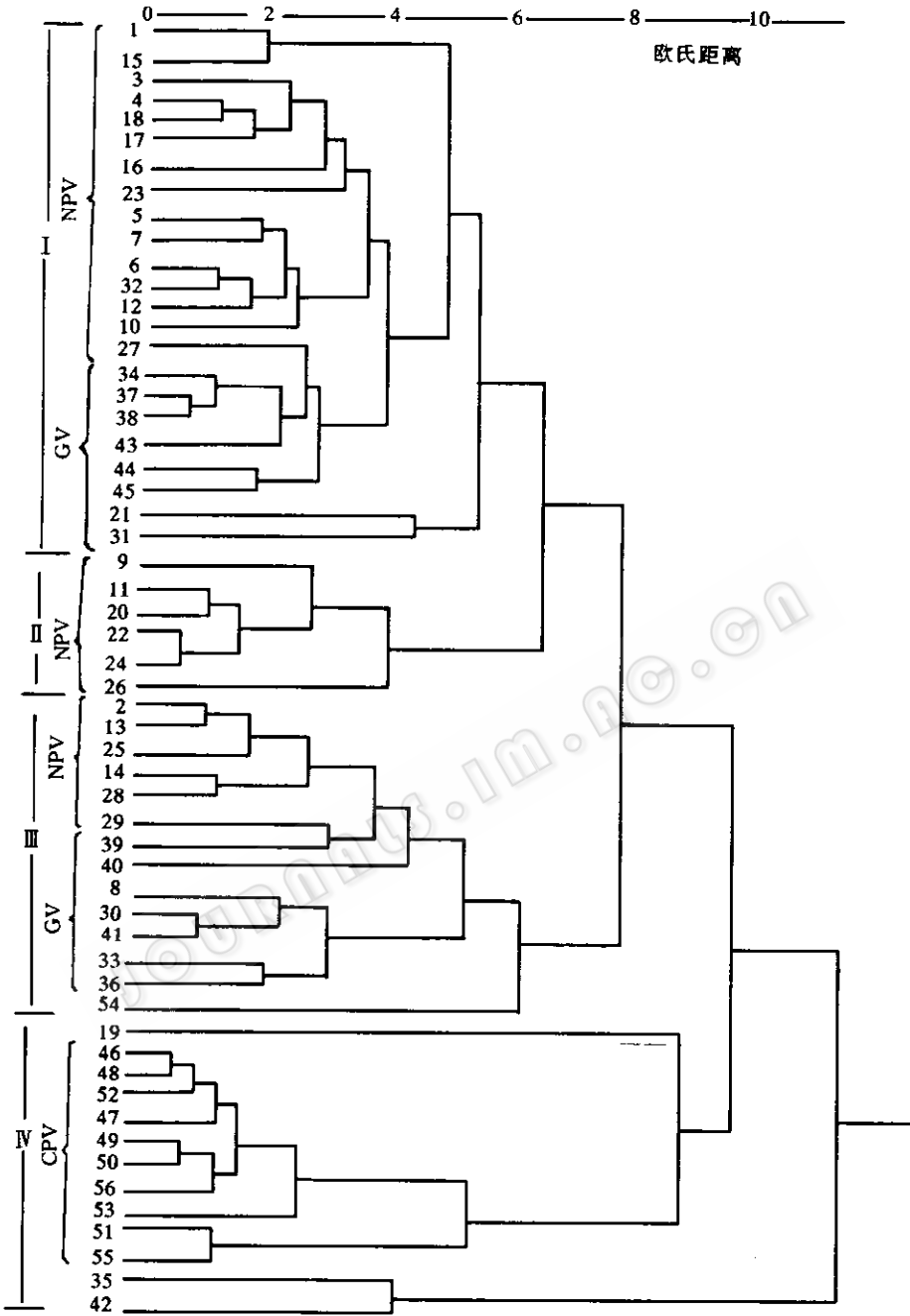


图4 56株病毒裂解指纹图经过聚类分析树状图谱
Fig. 4 Hiexachical casting and lgsis of 56 strains viruses pyroch romatogram

了各毒株的位置初步显示了彼此间的亲疏关系。用欧氏距离 6 以下整个树状谱可分为 4 群, 第一群主要为 NPV 和 GV 类群。第二群全部为性质各异的 NPV。第三群主要为性质各异的 GV 聚在一起, 性质不同的 NPV 也聚在一起。第四群全部为 CPV。较例外的是

BmCPV-Yu 与 CPV 群的关系远,而 BmNPV-Tu 则是另一类,PrGV-Yi 和 BbGV-Gu 与其他 GV 关系较远,其原因待进一步研究。

本研究对 56 株不同病毒进行裂解得到指纹图,再进行系统聚类分析,并从统计学观点分析了彼此间的亲疏关系,在一定程度上,为某些现有毒株的再认识和新毒株的分类鉴定提供了灵敏、快速、准确、重复性好的重要依据,并进一步证实了 PYGC 在鉴定病毒中的可行性。

系统聚类分析采用 8 种算法,在我们实验得到树状图谱中,采用平均法可较好的表示被试毒株模式识别的相互关系,除个别毒株外,性质相近似或类似的 NPV、GV 都各聚在一起。11 株 CPV 除 1 株外,其余全聚在一起,特征十分明显。

从毒株裂解的指纹图中,有的峰很强并也很稳定,但它们对识别毒株未必能提供较有价值的信息;而有的峰虽然很小,但具有很强的特征,对于这一些很小的峰,必须反复比较和辨认它们的位置,才能正确反映真实的相互关系。

参 考 文 献

- [1] Oyama V I. *Nature*, 1963, 200: 1058~1061.
- [2] Reiner E. *Am Rev Respir Dis*, 1966, 99: 750~752.
- [3] Reiner E. *Anal Chem*, 1972, 44: 1058~1059.
- [4] Merritt C J, Dipietro C. *J Chromatogr. Sci*, 1974, 12(11): 668~670.
- [5] 周 方, 王菊英, 王给山, 高树德. 科学通报, 1984, 29(22): 139~141.
- [6] 朱湘民, 汤显春, 陈明树. 病毒学报, 1987, 31(4): 355~360.
- [7] 汤显春, 梁世平, 孙富林. 中国病毒学, 1993, 8(2): 158~163.
- [8] 方开泰, 潘恩沛. 聚类分析. 北京: 地质出版社, 1982.

APPLCATION OF PYGC AND THE HIERARCHICAL CLUSTERING ANALYSIS TO RECOGNIZATION OF VIRUSES

Tang Xianchun Zhu Xiangmin Lin Jinxue

Xia Xiangmin Chen Hua

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy, Wuhan 430071)

Abstract The pyrolysis gas chromatography of 29 strains nuclear polyhedrosis viruses, 11 strains cytoplasmic polyhedrosis viruses and 16 strains granulosus viruses were performed on a shimadzu GV-9A capillary gas chromatography equipped with a pyrolyser model PYR-2A. The differences among the inclusion bodies of NPV, CPV and GV could clearly be distinguished and also be identified through analysis of fingerprinting the hierarchical clustering analysis of GC. This procedure has provided a useful method for the classification and identification of viruses.

Key words Pyrolysis gas chromatography, Insect virus, Hierarchical clustering analysis