

# 三种茶树害虫核型多角体病毒蛋白性质的初步研究

张 益 民

(中国科学院武汉病毒研究所)

茶毛虫 (*Euproctis pseudoconspersa strand*)、油桐尺蠖 (*Buzura Suppressaria*) 和茶尺蠖 (*Ecotrips Obliqua*) 是茶树上三大主要害虫。经常在茶园內猖獗发生, 暴发成灾, 造成毁灭性损失。七十年代末, 在我国相继发现了它们的核型多角体病毒 (Nuclear Polyhedrosis Virus, 简称 NPV)<sup>[1-3]</sup>, 并且对它们的生物学性质作了详细报道, 但对三种病毒的蛋白性质报道甚少。本文的目的是比较三种 NPV 的结构多肽, 它有利于昆虫病毒交叉感染的研究, 以及病毒的分类鉴定, 并对病毒杀虫剂的应用也提供一定的依据。

## 材料与方 法

### (一) 材 料

1. 茶毛虫核型多角体病毒 (*EpNPV*): 由福建茶叶研究所供给。
2. 茶尺蠖核型多角体病毒 (*EcNPV*): 由安徽十字铺茶场实验站供给。
3. 油桐尺蠖核型多角体病毒 (*BsNPV*): 由本组分离。
4. 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺和四甲基乙二胺 (TEMED) 均为分析纯。
5. 标准蛋白: 细胞色素 C 分子量 12384 $\alpha$  (道尔顿); 糜蛋白酶原分子量 25700 $\alpha$ ; 鸡卵清蛋

白分子量 45000 $\alpha$ ; 牛血清蛋白分子量 68000 $\alpha$ 。

### (二) 方 法

1. 多角体的提纯: 三种病毒的多角体提纯均按 Summers<sup>[4]</sup>的方法进行。将收集的病虫尸体, 加水研磨后用交差离心得初步提纯的多角体。再用胰蛋白酶消化粘附于多角体上的蛋白, 将多角体用 0.1mg/ml 的胰蛋白酶液混合, 37 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟, 离心沉淀, 弃上清, 将多角体再用 1% SDS 45 $^{\circ}$ C 保温 45 分钟, 离心沉淀, 多角体再用蒸馏水洗涤 3 次。将洗后的多角体配成 20mg/ml 的悬液, 置 61.7% (W/W) 的蔗糖溶液上, 8000r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 30 分钟, 取出上层多角体, 再置于 43.9% (W/W) 的蔗糖溶液上 8000r/min, 离心 30 分钟多角体沉于底部, 最后用无菌水洗涤 2 次, 除去蔗糖得白色纯净的多角体。

### 2. 病毒粒子及多角体蛋白的制备:

(1) *EpNPV* 多角体蛋白及病毒粒子的纯化: 取 5ml 多角体 (15—20mg/ml) 液加入等体积 0.02M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -0.016M  $\text{NaCl}$  溶液, 30 $^{\circ}$ C 保温 60 分钟, 用蒸馏水稀释 7—10 倍, 使 pH 低于 8, 终止反应, 然后以 20000r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 2 小时, 取上清液, 用 0.2M 醋酸钠调 pH 至 5.7, 多角体蛋白沉于底部, 用碳酸钠溶液溶解, 置冰箱待用。20,000r/min 离心 2 小时沉淀部分即为病毒粒子, 用蒸馏水悬浮置冰箱待用。

(2) *Bs*NPV 与 *Eo*NPV 多角体蛋白的制备及病毒粒子的纯化: 按 Summers 等人<sup>[5]</sup>的方法进行。将多角体悬液 (20mg/ml) 加等体积 0.1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -0.16M NaCl (pH10.8) 于 30℃ 水浴中不断搅拌, 多角体逐渐降解 (*Bs*NPV 和 *Eo*NPV 分别为 20 分钟和 10 分钟), 用蒸馏水稀释 7—10 倍, 进行 10—50% (W/W) 蔗糖梯度离心, 50,000g 离心 1 小时, 上清液用滴管取出, 用 0.2M 醋酸钠调 pH 至 5.7, 得白色沉淀, 即为多角体蛋白, 使用前用碳酸钠溶解调 pH7.0。然后用滴管取出病毒粒子带, 放入透析袋中, 用蒸馏水透析过夜, 置冰箱备用

另外, *Eo*NPV 和 *Bs*NPV 两种多角体 72℃ 灭活 2 小时, 按它相应的方法处理, 收集多角体蛋白留电泳待测。

### 3. SDS-PAGE 法:

多角体蛋白及病毒粒子结构多肽成分的测定均按 Summers 方法<sup>[5]</sup>, 采取 SDS-PAGE 法进行分析。电泳样品加等体积的样品处理液于沸水浴中处理 3 分钟, 冷却后点样。样品处理液为: 0.025M Tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 5% 巯基乙醇, 50% 的蔗糖, 0.1% 溴酚蓝。

(1) 制胶: 电泳凝胶板大小为 13.7×11.7×0.1cm, 多角体蛋白分离胶浓度为 13%, 浓缩胶为 3%, 病毒粒子蛋白分离胶浓度为 11%, 浓缩胶浓度为 3%。

(2) 电泳: 电泳缓冲液浓度 0.025M Tris, 0.38M 甘氨酸; pH8.3, 含 0.1% SDS。当样品在浓缩胶中泳动时, 电流控制在 10mA, 当溴酚蓝走到分离胶界面后, 则将电流加大到 15mA, 恒压, 当溴酚蓝到达凝胶板顶端时, 电泳结束。

(3) 样品固定: 凝胶取出后, 放入固定液中过夜, 固定液成分如下: 25% 异丙醇, 10% 乙酸。

(4) 染色: 固定后用 0.25% 考马斯亮蓝染色 1 小时。

(5) 脱色: 染色后用 7.5% 冰醋酸和 5% 甲醇脱色, 当脱色到基本清晰时, 放于 10% 的醋酸中保存。

### 4. 分子量的测定:

多角体蛋白和病毒粒子的结构多肽的分子量均按 Weber 和 Osborn<sup>[6]</sup>的方法测定。标准蛋白的迁移率和分子量的对数作图便得一条标准曲线 (图 1)。样品与标准蛋白在相同条件下进行电泳, 根据迁移率的大小, 从标准曲线求得分子量。

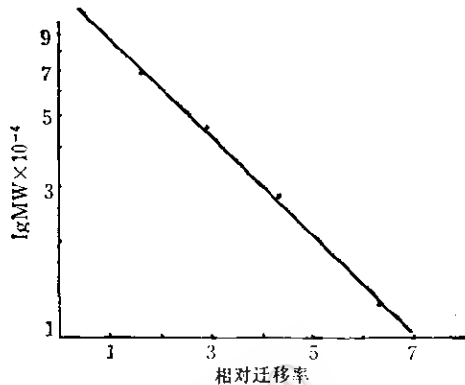


图 1 标准蛋白相对迁移率与分子量对数的直线关系

## 结果与讨论

### (一) 多角体蛋白的结构多肽分析

从图 1 标准曲线可计算出三种昆虫 NPV 的多角体蛋白分子量皆在 28000—29000 道尔顿左右。这和 Harrap 等<sup>[7]</sup>的实验是一致的。由于多角体蛋白分子较小, 故我们采用 13% 的分离胶。这样带型清晰, 比较准确。另外从图版 I-1 还可看到无论是 *Bs*NPV 或是 *Eo*NPV, 经 72℃, 灭活 2 小时以后, 多角体蛋白有一个主带和 1—2 个次带, 而未被加热灭活的多角体蛋白确有部分降解作用。未加热的 *Ep*NPV 多角体蛋白有 7 条次带, *Eo*NPV 有 5 条次带, *Bs*NPV 有 7 条次带。按 Harrap 等人<sup>[7]</sup>的观点, 用重金属盐类作抑制剂, 或低温降解都没有明显的降解作用, 所以证明有碱性蛋白酶作用, 而它的生物学意义至今尚无明确报道, 但有一点应当肯定, 因为昆虫的消化液是碱性的, 多角体才被降解。是否碱性蛋白酶在其中起一定的作用, 还需进一步研究, 这对病毒杀虫剂的应用是有一定意义的。

### (二) 病毒粒子的结构多肽分析

病毒粒子的结构多肽, 有的分子量较大, 故

表1 *EpNPV*, *EoNPV* 和 *BsNPV* 病毒粒子结构多肽分子量比较 (单位:  $10 \times 10^3$  道尔顿)

病毒	条带顺序号																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>EpNPV</i>	8.40	8.20	7.90	7.20	6.80	6.50	5.60	4.60	3.90	3.60	3.40	2.95	2.80	2.60	2.40	2.23	1.70	1.44
<i>EoNPV</i>	9.20	8.80	8.00	7.00	5.60	5.30	3.90	3.65	3.00	2.90	1.73	1.56						
<i>BsNPV</i>	9.00	8.80	6.60	6.30	5.60	4.20	3.90	3.70	3.10	2.90	2.70	2.15	1.95	1.60	1.50	1.30	1.05	

采用 11% 的分离胶。这样图谱清晰, 分离较好。从图版 I-2 可见三种 NPV 病毒粒子的结构多肽分子量和图谱不一样, 三种病毒粒子的分子量大小见表 1。

茶毛虫病毒粒子为 18 条带, 茶尺蠖病毒粒子为 12 条带, 油桐尺蠖病毒粒子为 17 条带。三种病毒粒子的图谱是不一样的。所以病毒粒子的结构多肽图谱可以作为病毒分类的指标<sup>[5]</sup>, 在病毒的分类鉴定中, 它和内切酶图谱具有同等的意义。但蛋白图谱分析使用药品较便宜, 容易在一般实验室中推广。因此它在病毒分类中可以被采用。对病毒杀虫剂的使用上, 在昆虫病毒中是否有交叉感染现象, 这一研究也有一定的意义。

从图版 I-2 还可以看出, 由于 *EoNPV*,

*BsNPV* 是用蔗糖梯度法离心, 所获得的病毒粒子其蛋白带型比较清晰, 而 *EpNPV* 是用差异离心法所获病毒粒子, 这样有少量的多角体蛋白混于其中, 两者不易区别, 但该方法简单, 带型亦清楚, 所以可被采用。

### 参 考 文 献

- [1] 福建农科院茶叶研究所植保室: 福建农业科技, **5**: 37—42, 1979。
- [2] 谢天恩等: 病毒学集刊(国庆专辑), p.17—20, 1979。
- [3] 赵焯烽等: 中国茶叶, **3**: 14—17, 1980。
- [4] Summers, M. D. and J. D. Paschke: *J. Invertebr. Pathol.* **16**: 227—240, 1970。
- [5] Summers, M. D. and G. E. Smith: *Virology*, **84**: 390—402, 1978。
- [6] Weber, K. and M. Osborn: *J. B. C.* **244**: 4406, 1969。
- [7] Harrap, K. A. et al.: *Virology*, **99**: 14—31, 1979