

# 芹菜夜蛾 NPV 离体复制的研究

彭建新 惠丰立 杨凯 陈曲侯

(华中师范大学昆虫学研究所, 武昌 430070)

**摘要** 芹菜夜蛾 NPV 能够在小菜蛾细胞系中有效地复制增殖。受感染细胞呈典型细胞病理变化。病毒在细胞核中复制装配, 病毒感染率为 85%, 多角体产量为  $5.88 \times 10^6$  PIBs/ml。病毒增殖动力学显示, 病毒感染细胞 72h, 胞外病毒达最大滴度, TCID<sub>50</sub> 值为  $1.9 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml。

**关键词** 芹菜夜蛾 NPV, 离体复制, 小菜蛾细胞

芹菜夜蛾核型多角体病毒 (*Syngrapha falcifera* Nuclear Polyhedrosis Virus) 是一株具广谱杀虫性质的杆状病毒。它对棉铃虫、甜菜夜蛾、小菜蛾等多种农业害虫具有较强的致病性<sup>[1]</sup>。该病毒作为生物杀虫剂具有重要的应用潜力。建立和筛选适宜的芹菜夜蛾 NPV-昆虫细胞离体系统, 阐述病毒离体复制规律与特征是扩大其应用价值的重要基础性工作。本实验研究了芹菜夜蛾 NPV 在小菜蛾细胞中的复制, 现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒:** 芹菜夜蛾 NPV 系外国友人馈赠。

**1.1.2 细胞:** 小菜蛾细胞系 (BCIR-Px<sub>2</sub>-HNU<sub>3</sub>) 本所建立<sup>[2]</sup>。细胞生长培养基为 Tc-199-MK 辅以 10% 小牛血清。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 用 25ml 培养瓶培养细胞。培养基为 5ml, 细胞接种浓度为  $2.6 \times 10^5$  细胞/ml。细胞置 CO<sub>2</sub> 培养箱中于 28℃ 恒温静置培养, 待细胞进入对数生长期后用于接种病

毒。

**1.2.2 病毒的接种:** 接种病毒采用病毒组织培养物。方法见文献[3]。

**1.2.3 细胞的计数:** 用血球计数板按常规方法计数。

**1.2.4 病毒感染率的测定:** 以细胞中出现多角体作为阳性指标, 计算不同感染时期的感染率。

**1.2.5 多角体的收集与计数:** 感染病毒 6 d 后的细胞经超声波破碎后, 用血球计数板计数多角体。

**1.2.6 半数组织培养感染剂量 (TCID<sub>50</sub>) 测定:** 病毒组织培养物作  $10^{-1} \sim 10^{-9}$  的 10 倍系列稀释, 每个稀释度接种细胞密度为  $2 \times 10^5$  细胞/ml 的 96 孔板内, 攻毒吸附后更换新鲜培养基恒温培养, 5d 后观察病变情况。数据按文献[4]所述方法计算。

**1.2.7 病毒增殖曲线测定:** 取病毒感染不同时间的培养细胞上清液, 分别测其 TCID<sub>50</sub> 值, 绘制病毒增殖曲线。

**1.2.8 超薄切片及电镜观察:** 感染病毒的细胞

经离心沉淀后按常规方法制备切片。样品置日立 H-600 型电子显微镜观察拍片。

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞病理与超微结构

感染病毒后,细胞表面显得粗糙,细胞核肿胀,核质比例失衡。48h 后少数细胞核中出现折光率很强的多角体颗粒。随着感染时间的延续,产生多角体细胞逐渐增多,细胞生长特性亦产生明显变化。细胞由贴壁转变为悬浮,生长停滞。5d 后,细胞开始破裂并释放出多角体。受感染细胞呈典型 NPV 感染细胞病理变化。对照细胞生长正常,细胞形态均匀,表面光滑,胞质匀一透明。超微结构显示,受感染细胞核中出现电子致密的病毒发生基质,其间分布大量核衣壳;成熟的病毒粒子及多角体分布于病毒发生基质外侧(图 1)。病毒形态的变化主要发生在细胞核里,病毒复制装配是在宿主细胞核中进行的。可见,芹菜夜蛾 NPV 能在小菜蛾细胞中有效复制,病毒接种后产生的细胞病理变化,病毒形态建成,病毒装配部位等与其它 NPV-细胞系统是一致的<sup>[5,6]</sup>。此外,超薄切片显示,不少细胞中产生不包埋病毒粒子的空多角体(图 2)。空多角体在 NPV 离体复制系统是常见的现象<sup>[7,8]</sup>。由于病毒从非封闭型向封闭型转换机制和病毒包埋机制不明确,所以产

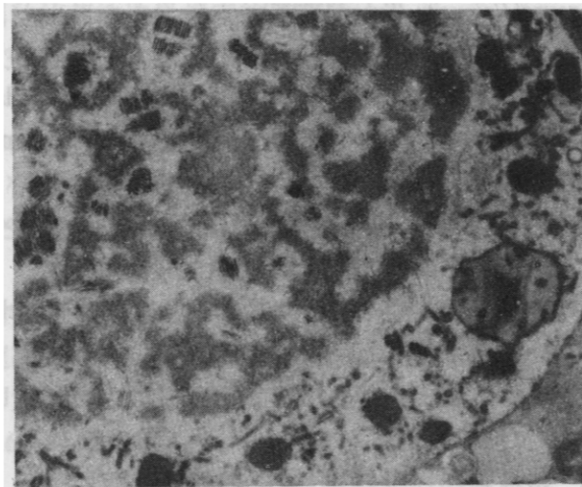


图 1 病毒感染的电镜图像(示病毒发生基质、病毒粒子及多角体)

生空多角体的原因也不明确,有待进一步研究。

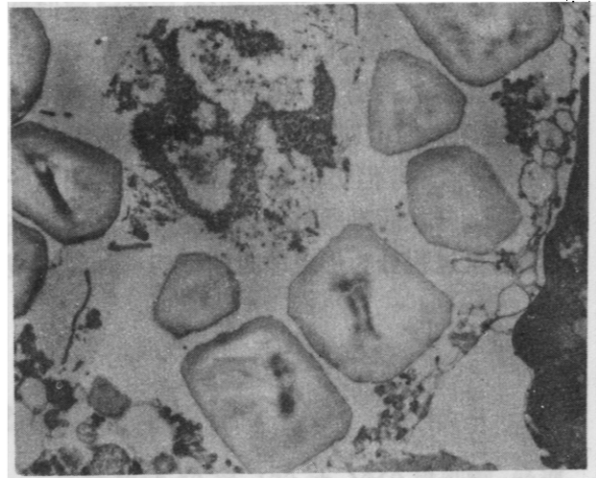


图 2 病毒增殖的超微结构(示空多角体)

### 2.2 病毒感染率与多角体产量

病毒感染后病变细胞变化如图 3 所示。细胞接种病毒 96h, 产生多角体的细胞达 85%。15% 的细胞在病毒感染 48h 就可在光学镜下观察到多角体。多角体的产量可以达到  $5.88 \times 10^6$  PIBs/ml。病毒感染率的统计计数是建立在细胞中出现多角体为阳性指标基础上,而病毒感染 5d 后导致细胞破裂,故 5d 后难于估算感染率,实际感染率要高于 85% 值。事实上在电镜研究受感染细胞的超微结构过程中,所观察的细胞全部都产生了细胞病变,表现病毒复制进程中不同阶段。高敏感病毒细胞体系对于利用细胞离体系统生产芹菜夜蛾 NPV 是十分有益的。

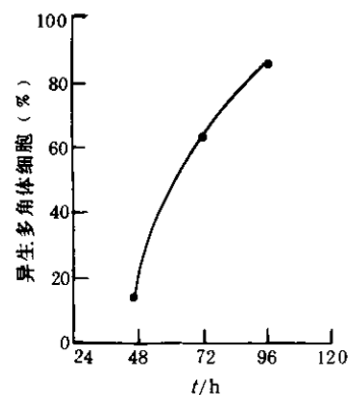


图 3 病毒感染后不同时间产生多角体细胞的百分率

### 2.3 病毒增殖特征

根据病毒感染不同时期分别取样测定病毒滴度,绘制病毒增殖曲线(图4)。在一定时间内病毒滴度随感染时间延续逐渐增高,72h后达到峰值。此时有最大胞外病毒含量,TCID<sub>50</sub>值高达 $1.9 \times 10^8$ TCID<sub>50</sub>/ml。随后病毒滴度开始逐步下降,但仍可在较高水平保持相当一段时间。杆状病毒具有双向复制周期。病毒在复制的全过程分为形成非封闭型病毒和封闭型

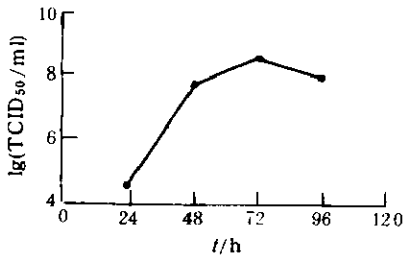


图4 病毒增殖曲线

病毒两个时相,即复制早期产生非封闭型病毒,复制晚期产生封闭型病毒。两种病毒在结构和功能上存在差异。芹菜夜蛾 NPV 在小菜蛾细

胞中复制同样具双向复制性质,而且非封闭型病毒滴度异常之高。高水平胞外病毒是病毒高效复制的结果,亦是病毒和宿主细胞之间相互协调的表现。欲获取胞外病毒或制备高感染性病毒液宜在病毒接种72h收取最为适宜。

### 参 考 文 献

- [1] 王家坤,陈曲侯. 湖北植保增刊(2)湖北省昆虫学94年会论文集1994,29.
- [2] 陈曲侯,麦克塔希,伊格诺佛. 华中师范学院学报(自然科学版),1983,3:99~103.
- [3] 彭建新,余泽华,黎路林等. 华中师范大学学报(自然科学版),1989,4:541~545.
- [4] Reed L J, Muench H A. Amer J Hyg, 1938, 27(4): 493~497.
- [5] Chung K, Brown M, Faulkner P. J Gen Virol, 1980, 46: 335~347.
- [6] Adams J R, Goodwin R H, Wilcox T A. Biol Cell, 1977, 28: 261~268.
- [7] 余泽华,陈秀英,陈曲侯. 华中师范大学学报(自然科学版),1986,20(4):499~505.
- [8] Sohi S S, Percy J, Cunningham J C, et al. Can J Microbiology, 1981, 27(11):1133~1139.

## REPLICATION OF *SYNGRAPHA FALCIFERA* NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS IN CONTINUOUS CELL LINE

Peng Jianxin Hui Fengli Yang Kai Chen Quhou

(Institute Entomology, central China normal University, Wuhan 430070)

**Abstract** The *Syngrapha falcifera* nuclear polyhedrosis virus could effeciently replicate in plutella xylostella cell line. Infected cells gave a typical cytopathological change. Viruses replicated and assembled in nuclei infected cells. Cells about 85% were infected. The production of polyhedra was  $5.88 \times 10^6$ PIBs/ml. At 72 h postinfection buded virions reached peak titer and TCID<sub>50</sub>Value was  $1.9 \times 10^8$ /ml.

**Key words** *Syngrapha falcifera* nuclear polyhedrosis virus, Replication in vitro, plutella xylostella cell line