

文章编号: 1001-1498(2008)04-0451-05

茶尺蠖核型多角体病毒 (EoNPV) 的 PCR 检测方法及其生物活性研究

张永安^{1, 2}, 仲国立¹, 侯玉霞^{1*}, 贡玉梅³, 曲良建², 王玉珠²

(1. 中国农业大学理学院, 北京 100094; 2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091;

3. 国家林业局科技发展中心, 北京 100714)

摘要:根据茶尺蠖核型多角体病毒 (EoNPV) 多角体蛋白基因建立了 PCR 检测方法, 在茶尺蠖子代卵和蛹内检测到 EoNPV 存在, 灵敏度达到 1 fg, 此方法可用于田间施用 EoNPV 后茶尺蠖种群带毒检测。PCR 方法由于操作简单、检测灵敏度高、特异性好、重复性好等优点, 值得应用。利用 EoNPV 感染茶尺蠖 2 龄幼虫, 幼虫对 EoNPV 的敏感性很高, 测得 LC_{50} 为 2.2×10^4 PB · mL⁻¹, EoNPV 感染浓度越高, 则幼虫死亡越快, 幼虫死亡时间与感染浓度呈正相关。

关键词: EoNPV; 茶尺蠖; PCR 检测; 生物活性

中图分类号: Q966

文献标识码: A

Application of PCR Method for Detecting of the EoNPV in *Ectropis obliqua* and Its Biological Activity

ZHANG Yong-an^{1, 2}, ZHONG Guo-li¹, HOU Yu-xia^{1*}, GONG Yu-mei³, QU Liang-jian², WANG Yu-zhu²

(1. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Research Institute of

Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, Beijing 100091, China; 3. Science and Technology

Development Centre, State Forestry Administration, Beijing 100714, China)

Abstract: The polymerase chain reaction (PCR) method for detecting *Ectropis obliqua* multiple nuclear polyhedrosis virus was established with self-designed primers according to the sequence of polyhedron gene of EoNPV, and EoNPV could be detected from the offspring, the data showed that the method would allow the detection of about 1 fg, this method could be used to identify EoNPV in field practices. The method was simple with good reproducibility and selectivity, and high sensitivity, so deserves to be popularized. An infectivity test of EoNPV against the second instar larvae of *Ectropis obliqua* was carried out in our laboratory, and LC_{50} of EoNPV was determined as 2.2×10^4 PB · mL⁻¹, the larva was very sensitive to EoNPV, and it had a higher death rate with higher EoNPV concentration, and the death time presented positive correlation with the concentration of EoNPV.

Key words: EoNPV; *Ectropis obliqua*; PCR detection; biological activity

茶尺蠖 (*Ectropis obliqua* Prout) 是苏、浙、皖等省茶树 (*Thea sinensis* L.) 上的主要害虫, 造成严重的经济损失, 多年来主要依赖化学农药防治, 增加了害虫抗药性, 加大了防治成本, 污染了环境, 危害了天敌

等。针对茶尺蠖的严重危害和无公害茶叶生产的需要, 运用茶尺蠖核型多角体病毒 (*Ectropis obliqua* Nuclear Polyhedrosis Virus, EoNPV) 专一致病作用原理, 在 $7.5 \times 10^9 \sim 15.0 \times 10^9$ PB · hm⁻² 的使用剂量

收稿日期: 2008-03-19

基金项目: 国家科技支撑计划资助 (2006BAD08A1202); 国家林业局重点项目 (2005 - 09)

作者简介: 张永安 (1959—), 男, 陕西西安人, 研究员, 博士生。E-mail: zhangyab@caf.ac.cn

* 通讯作者: 侯玉霞, 女, 博士。Tel: 010-62733824; E-mail: houyuxia@cau.edu.cn

下防治茶尺蠖 1~2 龄幼虫,当代防治达到 98% 以上,获得好的防治效果^[1-4]。

EoNPV 对茶尺蠖幼虫具有较高致病力^[5-10]。研究人员对 EoNPV 的生物学、毒性、环境因子对 EoNPV 的影响以及 EoNPV 与 *B. t.* 的混配进行了研究^[11-12]。研究了多角体病毒 DNA 的限制性内切酶分析,核型多角体病毒蛋白性质,核型多角体病毒的血清学等^[13-15],但对 EoNPV 病毒在虫体内的动态变化规律研究较少,PCR 技术是一种微量检测 EoNPV 变化的技术,为了比较准确了解 EoNPV 在茶尺蠖虫体中的动态,为茶尺蠖防治提供必要的信息,有必要进行 EoNPV 微量检测技术和生物活性的研究。

1 材料与方法

1.1 EoNPV 的分离与纯化

从收集大量人工感染典型发病的茶尺蠖幼虫尸体中,分离提取 EoNPV 的粗提液,然后经蔗糖梯度离心获得纯净的 EoNPV。

1.2 EoNPV 电镜观察

1.2.1 EoNPV 形态观察 将离心后收集到的 EoNPV 用适量的无菌水悬浮成溶液,涂于干净的载玻片上,自然干燥,喷金, DMS-6360 LZ 型扫描电镜观察。

1.2.2 EoNPV 超薄切片制备及电镜观察

取 EoNPV 样品置于 1.0 mL 的离心管底部,用 2% 戊二醛固定 6 h,然后用磷酸缓冲液 (pH 值 6.8) 清洗 2~3 次,置于 4℃ 冰箱过夜。

用 2% 的锇酸固定 1.5 h,用磷酸缓冲液 (pH 值 6.8) 清洗 2~3 次,置于 4℃ 冰箱过夜。

在 4℃ 冰箱中用体积分数 70%、80%、95% 的酒精逐次脱水各 15 min 后,再用体积分数 100% 的酒精脱水 2 次,各 10 min,丙酮脱水 1 次,10 min。

用环氧树脂 Epon812 浸透包埋,于 35、45、60℃ 中分别聚合 12、24、48 h。

用 ULTRACUT 型超薄切片机切片,切片厚度为 50~60 nm,经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色,在 JEM1230 型透射电镜下观察。

1.3 EoNPV DNA 和茶尺蠖总 DNA 的制备

纯净的 EoNPV 悬液,加等体积碱解液,37℃ 水浴裂解 30~60 min,然后加入 100 mg·mL⁻¹ 的 SDS 至终浓度 10 mg·mL⁻¹,加蛋白酶 K 至终浓度 200 μg·mL⁻¹,37℃ 水浴裂解 1 h,加入 1.0 mol·L⁻¹ HCl 调 pH 值接近蛋白等电点 (pH 值 6~7)。用酚氯仿 异戊醇 (25:24:1) 抽提 3 次,氯仿 异戊醇

(24:1) 抽提 1 次,取上清液,加 3.0 mol·mL⁻¹ 醋酸钠和预冷乙醇混匀,置于 -20℃ 冰箱 20 min,离心,留沉淀,用 70% 乙醇洗涤,晾干后溶于适量 TE 缓冲液 (pH 值 8.0) 中,-20℃ 保存备用。分别取 50 粒茶尺蠖卵、1.5 g 蛹采用液氮研磨,提取茶尺蠖总 DNA,具体方法见 Hughes 等方法^[16-17]。

1.4 EoNPV 的 PCR 检测方法

1.4.1 引物设计及 PCR 扩增 根据 EoNPV 的多角体蛋白基因设计特异性引物:

上游 EF: 5'-ATGTA TACTCGTACAGTTACAA CCC-3',

下游 ER: 5'-TTAA TACGCA GGTCTGAATAC-3',

以 EoNPV DNA 为模板,进行 PCR 扩增,预扩增 DNA 片断为 741 bp。

PCR 反应体系 (25 μL):

10 × PCR buffer	3 μL
10 mmol·L ⁻¹ dNTP	2 μL
10 μmol·L ⁻¹ 上游引物 EF	0.5 μL
10 μmol·L ⁻¹ 下游引物 ER	0.5 μL
1 μg·mL ⁻¹ 模板	0.5 μL
2 U·mL ⁻¹ Taq 酶	0.5 μL
H ₂ O	18 μL
总体积	25 μL

将反应液混匀后,按以下条件进行 PCR 扩增。PCR 条件如下:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 1 min,58℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,循环 35 次,72℃ 最后延伸 10 min。PCR 反应结束后,取 5 μL PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,回收纯化。

1.4.2 PCR 扩增产物克隆及测序 将纯化的 PCR 扩增产物按 pGEM-Teasy vector 试剂盒 (购自 Promega 公司) 的方案进行连接反应。将连接反应物转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞内,取 20 μL X-gal 和 7 μL IPTG (20%) 滴在 LB 平板 (含 50 μg·mL⁻¹ Amp) 上,将其均匀涂布,然后将转化物涂布在 LB 平板,37℃ 培养过夜,经蓝白斑筛选,获得大量克隆。经 PCR 鉴定挑选白色克隆划单菌落,放入 50 μg·mL⁻¹ 氨苄青霉素 (Amp) LB 液体培养基震荡培养,阳性克隆送到上海生物工程技术有限公司 (生工) 测序。

1.4.3 PCR 技术检测 EoNPV 以带毒虫卵、蛹的茶尺蠖总 DNA 为模板,取 0.5 μL DNA 进行 PCR 扩增,PCR 扩增条件同上。

1.4.4 带毒幼虫的卵和蛹的获得 以 LC_{50} 浓度感染茶尺蠖 3 龄幼虫, 单独收集蛹, 使其羽化产卵, 卵不进行消毒。随机取 50 粒卵在 4℃ 下保存, 其他卵于 25℃ 养虫室孵化, 孵化后单头单瓶饲养至化蛹, 随机取 20 头蛹用于 PCR 检测。

1.5 EoNPV 感染茶尺蠖幼虫的生物活性

将病毒稀释 1.2×10^7 、 1.2×10^6 、 1.2×10^5 、 1.2×10^4 $PB \cdot mL^{-1}$ 4 个浓度, 每组实验虫数为 30 头, 每个处理重复 3 次, 设置空白对照。在无菌操作下对饲料接毒, 每个养虫杯人工饲料表面滴入 300 μL 的药液, 阴干后挑取茶尺蠖 2 龄幼虫 30 头放入。饲料食进 72 h 后更换无病毒新鲜的人工饲料。待幼虫开始死亡后, 每日定时检查记录死虫数, 并取出虫尸。试验完毕后, 计算逐日死亡率。用 SPSS 统计软件计算出致死浓度 LC_{50} 和半致死天数 LT_{50} , 比较 EoNPV 对茶尺蠖幼虫的敏感性及其死亡速度^[18-19]。

2 结果与分析

2.1 EoNPV 的形态特征研究

扫描电镜观察到: 茶尺蠖核型多角体病毒多角体为不规则的多面体, 表面呈皱纹, 高低不平, 有的还出现较深的沟痕和凹窝的结构。多角体大小不一致, 其直径约为 0.8 ~ 1.5 μm , 平均直径约为 1.2 μm , 如图 1 所示。

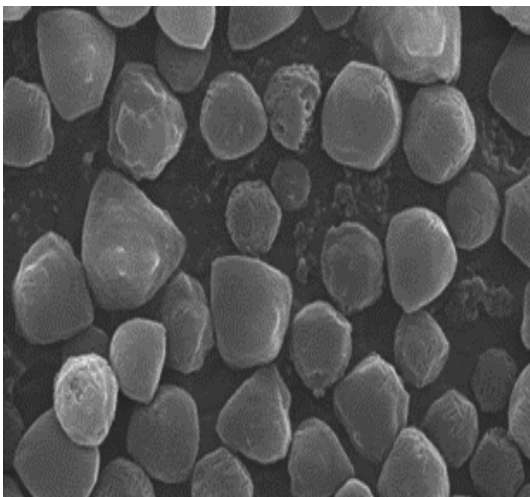


图 1 茶尺蠖核型多角体病毒多角体扫描电镜图 (20 000 \times)

透射电镜观察表明: 该 EoNPV 病毒多角体切片在透射电镜下呈不规则形状, 多角包涵体中有多个病毒粒子, 在多角体中零散分布, 排列方式无规律, 粒子呈杆状, 大小约 60 \times 200 nm, 为单核衣壳类型 (SNPV), 如图 2 所示。



图 2 多角体超薄切片的透射电镜图 (单核衣壳类型) (60 000 \times)

2.2 EoNPV 基因组 DNA PCR 扩增和测序

根据 EoNPV 的多角体蛋白基因设计特异性引物 EF 和 ER, 以 EoNPV 基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。将 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 发现 EoNPV DNA 序列的扩增产物有一条清晰、特异的 DNA 条带 (图 3)。扩增条带在 700 bp 和 800 bp 之间, 与预期 741 bp 结果相符。扩增产物经过回收并连接到 pGEM-T easy 载体, 然后转化到大肠杆菌 DH5 中。通过菌落 PCR 法筛选重组的阳性克隆后, 提取阳性克隆的质粒 DNA, 鉴定目的片段插入的结果, 然后送到上海生工进行测序。所得 PCR 扩增 DNA 片断序列测序结果证实为 741 bp, 与理论 EoNPV 的多角体蛋白基因相同, 所以此方法可以用于 EoNPV 的微量检测。

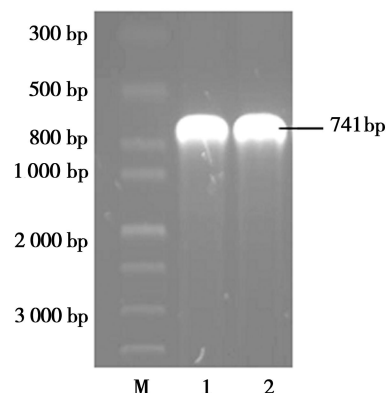


图 3 EoNPV 基因组 DNA PCR 扩增图谱
(M: Marker ; 1, 2: EoNPV 基因组 DNA PCR 结果)

2.3 PCR检测 EoNPV基因组 DNA敏感性的研究

将纯化的 EoNPV 基因组 DNA 浓度调整为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 等比稀释为 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 各取 $0.5 \mu\text{L}$ EoNPV DNA 做模板进行 PCR 扩增, 结果如图 4。从图 4 看到, 当模板浓度为 $1 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 仍可见清晰扩增条带, 其检测水平可以达到 $1 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

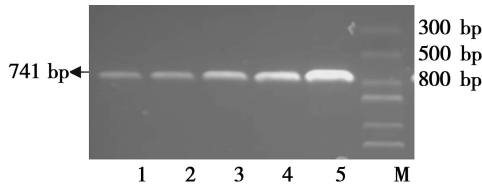


图 4 PCR 检测 EoNPV 基因组 DNA 敏感性

(M: Marker ; 1: $1 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 2: $10 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$;
3: $100 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 4: $1 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 5: $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)

2.4 PCR技术检测带毒茶尺蠖虫卵、蛹研究

分别以带毒茶尺蠖卵、蛹总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物电泳结果如图 5 所示。在 700 bp 和 800 bp 之间有一清晰的、特异条带, 健康虫的总 DNA 则没有扩增出任何条带, 这说明检测设计是合理的、可行的。

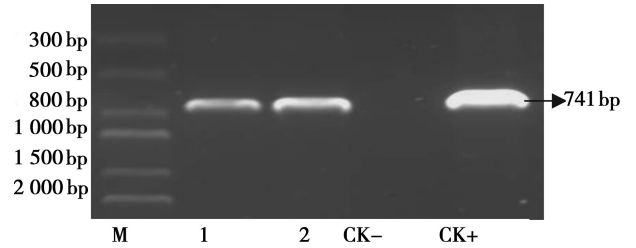


图 5 带毒卵、蛹总 DNA 的 PCR 扩增图谱

M: Marker ; 1: 卵; 2: 蛹; CK-: 阴性对照; CK+: 阳性对照)

2.5 EoNPV生物活性研究

经 EoNPV 感染茶尺蠖二龄幼虫后, 死虫表现为核型多角体病毒致死症状, 死虫组织液涂片可见大量病毒多角体。

研究结果表明, 茶尺蠖二龄幼虫对 EoNPV 的敏感性很高, 其 LC_{50} 为 $2.2 \times 10^4 \text{ PB} \cdot \text{mL}^{-1}$, 见表 1; 当 EoNPV 浓度为 $1.2 \times 10^7 \text{ PB} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, LT_{50} 为 5.93 d , 由此得出 EoNPV 感染茶尺蠖二龄幼虫浓度越高, 幼虫死亡越快, 幼虫死亡时间与感染浓度呈正相关, 见表 2 所示。

结果表明, 幼虫死亡时间与感染浓度呈正相关, 感染浓度越高, 则幼虫死亡越快。

表 1 EoNPV 感染茶尺蠖二龄幼虫的 LC_{50} 测定结果

虫龄	回归方程	相关系数	$LC_{50} / (\text{PB} \cdot \text{mL}^{-1})$	95% 置信限 / $(\text{PB} \cdot \text{mL}^{-1})$
二龄	$Y = -4.66752 + 1.07405x$	0.966	2.2×10^4	$1.02 \times 10^4 \sim 4.06 \times 10^4$

表 2 EoNPV 感染茶尺蠖二龄幼虫的 LT_{50} 测定结果

浓度 / $(\text{PB} \cdot \text{mL}^{-1})$	回归方程	相关系数	LT_{50} / d	95% 置信限 / d
1.2×10^7	$y = -4.14981 + 5.36558x$	0.958	5.93	5.34 ~ 6.53
1.2×10^6	$y = -4.87542 + 5.80374x$	0.978	6.91	6.29 ~ 7.52
1.2×10^5	$y = -4.31441 + 5.12303x$	0.965	6.95	6.30 ~ 7.67
1.2×10^4	$y = -2.89795 + 2.72205x$	0.953	11.60	9.60 ~ 16.97

3 结论与讨论

(1) 通过光学显微镜观察手段检测 NPV, 其最低检测水平为 $10^6 \text{ PB} \cdot \text{mL}^{-1}$ [7]; DNA 杂交法最低检测水平可以达到 0.1 ng ($20 \sim 5000 \text{ PB} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

(2) 本文根据 EoNPV 多角体蛋白基因建立 PCR 检测体系, 检测到 EoNPV 存在子代卵和蛹内, 灵敏度达到 1 fg , 此方法可用于田间施用 EoNPV 后茶尺蠖种群带毒检测。PCR 法由于操作简单、检测灵敏度高、特异性好、重复性好等优点, 此方法值得应用。

(3) 应用 PCR 技术可以比较灵敏地检测到病毒在昆虫体内的存在, 但还无法检测到昆虫所携带的病毒量, 也无法通过该项技术准确掌握病毒在昆虫种群中的动态规律, 发展更加灵敏的病毒检测技术对充分发挥病毒的作用非常重要。

(4) EoNPV 对茶尺蠖非常敏感, 特别对 3 龄前幼虫, 所以在应用病毒防治茶尺蠖时宜在 3 龄前喷洒, 且喷洒浓度不低于 $1 \times 10^6 \text{ PB} \cdot \text{mL}^{-1}$; 另外建议病毒与 *B. t* 等其他生物农药混配使用, 以减少茶尺蠖造成的经济损失。

参考文献:

- [1] 殷坤山,陈华才,唐美君,等. 茶尺蠖病毒杀虫剂田间使用技术的研究 [J]. 中国病毒学, 2003, 18(5): 492 - 495
- [2] 殷坤山,陈华才. 喷施茶尺蠖病毒杀虫剂对茶叶品质的影响 [J]. 中国茶叶, 2002, 24(4): 5
- [3] 曾明森,王庆森,吴光远. 高效氯氟氰菊酯、苦参总碱和高效 Bt 防治茶尺蠖田间药效试验结果 [J]. 茶叶科学技术, 2005(2): 13 - 14
- [4] 吴晓晶,胡 萃. 茶尺蠖核型多角体病毒的大量增殖研究 [J]. 浙江农业大学学报, 1987, 13(2): 150 - 157
- [5] 叶恭银,朱俊庆. 高温条件下茶尺蠖核型多角体病毒对茶尺蠖繁殖的影响 [J]. 中国病毒学, 1992, 7(3): 283 - 288
- [6] 叶恭银,朱俊庆,胡 萃. 茶尺蠖核型多角体病毒对宿主幼虫食物摄取与利用的影响 [J]. 浙江农业大学学报, 1995, 21(1): 77 - 80
- [7] 叶恭银,朱俊庆,胡 萃. 茶尺蠖核型多角体病毒对宿主种群的控制作用 [J]. 植物保护学报, 1994, 21(3): 231 - 237
- [8] 胡 萃,朱俊庆,叶恭银. 茶尺蠖 NPV 对茶尺蠖幼虫取食及生长发育的影响 [J]. 浙江农业大学学报, 1990, 16(2): 113 - 118
- [9] 孔庆瑚,何 玲,陈云英. 茶尺蠖核型多角体病毒毒性试验 [J]. 科技通报, 1990, 6(1): 32 - 35
- [10] 陈棣华,洪北边,赵焯焯. 茶尺蠖核型多角体病毒研究 [J]. 生物防治通报, 1989, 5(4): 168 - 172
- [11] 陈棣华,孙继山. 茶尺蠖多角体病毒的精细结构及发生 [J]. 电子显微学报, 1992, 5: 373 - 374
- [12] 谭业平,陶 涛. 昆虫病毒学 [M]. 武汉: 武汉出版社, 1991
- [13] 陈棣华,赵怀宇,张立人. 三种昆虫核型多角体病毒 DNA 的限制性内切酶酶解分析 [J]. 病毒学报, 1987, 3(1): 69 - 75
- [14] 张益民. 三种茶树害虫核型多角体病毒蛋白质性质的初步研究 [J]. 微生物学通报, 1986, 13(5): 198 - 200
- [15] 赵怀宇,陈棣华,张立人. 茶尺蠖核型多角体病毒的血清学研究 [J]. 病毒学杂志, 1986, 1(3): 52 - 59
- [16] Ma X C, Xu H J, Mei J T, *et al*. Genome sequence and organization of a nucleopolyhedrovirus that infects the tea looper caterpillar, *Ectropis oblique* [J]. Microbiol, 2006, 44(1): 77 - 82
- [17] Hughes D S, Possee R D, Ling I A. Activation and detection of a latent baculovirus resembling *Mamestra brassicae* nucleopolyhedrovirus in *M. brassicae* insect [J]. Virology, 1993, 194: 608 - 615
- [18] 曲良建,张永安,王玉珠,等. PCR 法证实棉铃虫核型多角体病毒对棉铃虫卵和蛹的垂直传播 [J]. 中国生物防治, 2005, 21(1): 45 - 48
- [19] 贾春生. 利用 spss 软件计算杀虫剂的 LC50 [J]. 昆虫知识, 2006, 43(3): 414 - 417
- [20] 郭 郭,忻介六. 昆虫学实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1988, 359 - 360
- [21] 叶恭银,胡 萃. 温度对茶尺蠖核型多角体病毒增殖动态的影响 [J]. 病毒学杂志, 1990, 4(4): 397 - 403
- [22] 陈亦根,黄明度. 茶尺蠖生物防治进展 [J]. 昆虫天敌, 2001, 23(4): 181 - 184
- [23] 肖能文,谭济才. 无公害杀虫剂防治茶尺蠖试验 [J]. 茶叶通讯, 2001(4): 17 - 19
- [24] 雷元胜,夏良胜,石 涛. 4 000 N/mg Bt 颗粒剂防治茶尺蠖药效对比试验 [J]. 茶业通报, 2002, 24(2): 26
- [25] 张益民,王学兰,张世敏. 茶尺蠖核型多角体病毒超微结构的初步研究 [J]. 科学通报, 1985, (24): 1918 - 1920
- [26] 刘 军,兰萍章. 用细胞遗传学方法检测茶尺蠖核型多角体病毒的安全性 [J]. 生物防治通报, 1988, 4(1): 38 - 44
- [27] 叶恭银,胡 萃. 茶尺蠖感染核型多角体病毒后病死时间分布的数学模拟 [J]. 生态学报, 1994, 14(2): 196 - 200
- [28] 陈棣华,钟卫洲,栗陶生. 灰茶尺蛾核型多角体病毒的精细结构及生物学特性研究 [J]. 微生物学通报, 1991, 18(6): 321 - 323
- [29] 叶恭银,胡 萃. 适用于高温季节的茶尺蠖核型多角体病毒制剂的筛选 [J]. 植物保护学报, 1991, 18(3): 215 - 220
- [30] 叶恭银,胡 萃,洪 健. 温度对茶尺蠖核型多角体病毒形态发生的影响 [J]. 浙江农业大学学报, 1991, 17(2): 185 - 191
- [31] 周晓峰,李 劲,陈海雷. 油茶尺蠖核型多角体病毒毒力的生物测定 [J]. 植物保护, 1990, 16(4): 25 - 26
- [32] 甘运凯,刘年翠,黎国强. 应用混合病毒防治茶园害虫 [J]. 湖南微生物学通讯, 1990(1): 16 - 17