

文章编号: 1001-1498(2009)05-0728-04

美国白蛾核型多角体病毒多角体蛋白的 SDS-PAGE分析

薛建杰^{1,2}, 曲良建², 王玉珠², 张永安^{2*}, 唐明^{1*}, 杨唯一^{1,2}

(1. 西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091)

关键词: HcNPV; 核型多角体病毒; 多角体蛋白; SDS-PAGE; 32KD 蛋白

中图分类号: S476+.13; S763.42

文献标识码: A

SDS-PAGE Analysis on Protein of *Hyphantria cunea* Nuclear Polyhedrosis Virus

XUE Jian-jie^{1,2}, QU Liang-jian², WANG Yu-zhu², ZHANG Yong-an², TANG Ming¹, YANG Wei-yi^{1,2}

(1. College of Forestry, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, Shaanxi, China;

2 Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, Key Laboratory of Forest Protection, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus (HcNPV) and several other nucleopolyhedrosis was extracted by differential centrifugation, and purified with sucrose gradient centrifugation method. Polyhedrin was gotten and analysed by SDS-PAGE. It indicated that most of those proteins had 32 KD protein band, and with 64 KD protein, and might be the main protein dimer with the structure and found *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus protein in 18 KD department had a specific band.

Key words: nuclear polyhedrosis; polyhedrin; SDS-PAGE; 32 KD protein

美国白蛾 *Hyphantria cunea* (Dury) 1979年传入我国辽宁丹东^[1]后,迅速扩散蔓延成灾。现多数分布在天津市、河北、辽宁、山东、陕西等省。在我国的寄主植物多达 49科 108属 175种^[2],给林业生产造成重大损失。1984、1996年两次列入全国森林植物检疫对象名单。

美国白蛾核型多角体病毒 (*Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus, HcNPV) 属杆状病毒科 (Baculoviridae), 核型多角体病毒属 (*Borrelinavirus*)。

HcNPV 对美国白蛾的作用非常明显,但目前国内外对 HcNPV 的研究多数在制剂的应用上^[3],对该病毒的检测还没有形成一套完善的体系。吴敏等^[4]对蓖麻蚕核型多角体 (*Philammla cynthia ricina* nu-

cleopolyhedrovirus, PcNPV) 包涵体蛋白进行了 SDS-PAGE 分析。孙国勋等^[5]证明棉铃虫枝型多角体病毒 (*Heliothis amigeri* nucleopolyhedrovirus, HaNPV) 的多角体蛋白以聚集体形式存在。D. C. Kelly 等^[6]对棉铃虫 *Heliothis amigeri* (Hubner) 的结构多肽及多肽的分子量进行了研究。但国内外对美国白蛾该方面的研究却鲜有报道。为了研究美国白蛾核型多角体病毒的结构及其所包含的蛋白条带,本文进行了美国白蛾核型多角体病毒在 15% 的分离胶浓度下有 16 条带,其中有主带 32 KD 蛋白和次带 64 KD 蛋白的形态学观察以及多角体蛋白的 SDS-PAGE 的探索,发现美国白蛾核型多角体病毒蛋白,与其他 4 种比较在 18 KD 处有一条特异性条带,为今后检

收稿日期: 2008-09-09

基金项目: 国家自然科学基金 (30671688) 资助; 国家“十一五”科技支撑计划 (2006BAD08A1202)

作者简介: 薛建杰 (1983—), 男, 山东青岛人, 硕士。E-mail: jianjiexue@163.com

*通讯作者: 张永安, 男, 研究员。E-mail: zhangyb@caf.ac.cn; 唐明, 女, 教授。E-mail: tangm@nwsuaf.edu.cn

测该病毒提供了重要依据。

1 材料与方法

1.1 病毒

本实验进行比较的昆虫核型多角体病毒有美国白蛾核型多角体病毒(HcNPV)、茶尺蠖核型多角体病毒(EoNPV)、棉铃虫核型多角体病毒(HaNPV)、苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)、舞毒蛾核型多角体病毒(LdNPV)5种。其中HcNPV是在连云港野外采集的自发病毒,其余4种是野外采集后由本实验室人工饲料饲养的传代虫体病毒。

1.2 核型多角体病毒的提纯^[3]和内外形态学观察

1.2.1 核型多角体病毒的提纯

(1)病毒提取:将5种感染NPV的虫尸于研钵中,加入适量磷酸缓冲液(即PBS,pH值7.4)充分研磨虫尸,使核型多角体释放出来,然后两层纱布中间加一层脱脂棉过滤,滤液与死虫的体积比约为5:1。将滤液先用 $500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清 $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min,弃去上清液,PBS悬浮沉淀 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min,重复3次;悬浮沉淀 $800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min弃沉淀,取上清液 $800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min弃沉淀, $8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心30 min,收集沉淀,把所得到的沉淀用少量的PBS(沉淀PBS约为1:2)悬浮静置,所得悬液即为粗提病毒,4℃保存备用。

(2)病毒纯化:采用蔗糖密度梯度离心法将病毒粗提液进行纯化。首先制备30%(m/v)、45%(m/v)、60%(m/v)的蔗糖溶液,在离心前预先将配制的蔗糖溶液按照管底浓而管顶稀的密度梯度盛于离心管内,将待分离样品铺在梯度液顶上。离心后,不同密度的样品颗粒到达与自身密度相等的梯度层,即达到等密度的位置而获得分离。收集分离的多角病毒多角体溶于适量的双蒸水中,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.2.2 HcNPV扫描电镜样品的制备 取纯化的美国白蛾核型多角体少许,用适量无菌水制成悬液,涂于干净的盖玻片上,自然干燥或者用红外灯烘干,红外灯与玻片的距离约为15~20 cm,烘20~30 min后,喷金,DMS-6360型扫描电镜观察其外部形态,放大倍数 $8\,000\times$ 。

1.2.3 HcNPV透射电镜样品的制备

(1)将HcNPV样品置于1.0 mL的离心管底部,

用2.5%戊二醛预固定2 h,然后用pH值6.8磷酸缓冲液漂洗4次,每次10 min,置于4℃冰箱过夜。

(2)用2%的锇酸固定2 h,pH值6.8的磷酸缓冲液漂洗,重复3次,每次10 min,置4℃冰箱过夜。

(3)在4℃冰箱中用体积分数分别为70%、80%、95%的酒精逐次脱水各15 min后,再用无水乙醇脱水2次,每次10 min,最后用丙酮脱水10 min。

(4)用环氧树脂Epon812浸透包埋,于35、45、60℃条件下分别聚合12、24、48 h。

(5)LEICAUC6I切片机切片,醋酸双氧铀30 min,柠檬酸铅双染色10 min。JEM-1230透射电镜下观察多角体面内包埋病毒粒子特征。

1.3 多角体病毒蛋白的提取^[7]

(1)将纯化的核型多角体冻干后配成 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 悬液,70℃保温2 h以上,以灭活碱性蛋白酶。

(2)用终浓度 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Na}_2\text{CO}_3$ 、 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}$ 、 $0.004\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ EDTA}$ (pH值10.6)碱解液(约5 g多角体病毒溶于1 mL碱解液中)室温振荡碱解10 min, $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ HCl}$ 调pH值至8.5终止碱解。

(3) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $20\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心60 min,去上清液,用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ HCl}$ 调pH值至5.0~6.0,至有絮状沉淀生成,放4℃冰箱静置2 h。

(4) $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min,沉淀的蛋白溶于适量 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Tris-HCl}$ 缓冲液(含 $0.002\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ EDTA}$,pH值8.8)中。

1.4 SDS-PAGE电泳

(1)将上述蛋白悬液用2×上样缓冲液溶解,漩涡混匀器混匀后,沸水浴10 min,以充分溶解。

(2)SDS-PAGE电泳是采用Leammli非连续系统^[8],浓缩胶5%,pH值6.8,分离胶15%,pH值8.8的电泳系统中分离,浓缩胶恒压12 A,分离胶恒压24 A,大约4 h可以完成。蛋白Marker购于Fementas公司。

(3)电泳完毕后将胶剥离,用0.1%考马斯亮蓝R250(水 mL 甲醇 mL 乙酸 mL = 4 5 1)进行染色1 h,然后用乙酸-甲醇(水 mL 甲醇 mL 乙酸 mL = 810 120 70)脱色法进行脱色2~3次,每次1 h,置清水中过夜。

(4)用UMAX 2100XL-USB型扫描仪进行胶片扫描。

2 结果与分析

2.1 核型多角体病毒的形态学

HcNPV经蔗糖密度梯度离心后,大部分核型多

角体病毒都集中在 45% 一层, 该层溶液为灰白色, 颜色均一, 无其他杂质。吸取该层溶液, 多次洗涤离心后获得沉淀物, 再经冷冻干燥机冻干后所制得的固体粉末, 该粉末呈灰白色。

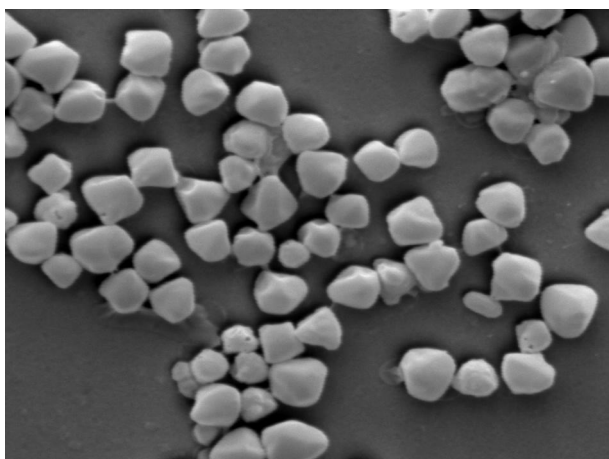


图 1 纯化的 HcNPV 的电镜扫描照片 (8 000 ×)



图 2 纯化的 HcNPV 的电镜透射照片 (80 000 ×)

图 1 为 HcNPV 电镜扫描图片, 从图可以看出 HcNPV 为不规则的多面体, 其颗粒大小不一, 直径约 0.5 ~ 2 μm, 有三角体、四角体、五角体、六角体等, 并且其表面多有突起和凹陷。

图 2 为 HcNPV 电镜透射照片。HcNPV 大多为多粒包埋型, 极少数为单粒包埋^[9]。

2.2 5种多角体病毒蛋白物理性质的比较

经等电点沉淀法获得 5 种核型多角体病毒蛋白, 这几种核型多角体蛋白的等电点都在 pH 值 5.6 左右。美国白蛾核型多角体病毒蛋白为淡蓝色, 其余 4 种核型多角体病毒的蛋白均为白色。说明美国白蛾核型多角体蛋白的折光性与其他 4 种蛋白存在差异, 这也可以作为初步鉴定美国白蛾核型多角体的依据, 但说明美国白蛾核型多角体病毒蛋白是否具有某种特性有待于进一步研究。

2.3 5种昆虫核型多角体病毒蛋白的 SDS-PAGE 电泳比较

将 5 种昆虫病毒的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 结果如图 3 所示。



从左至右依次为 Marker, HcNPV, EoNPV, HaNPV, LdNPV, AcNPV, Marker 的分子量为 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 120, 150, 200

图 3 5 种昆虫核型多角体病毒蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

所有 NPV 外面都有一层厚厚的包涵体蛋白, 其含量约占病毒组成的 80% 以上^[11]。以上经 SDS-PAGE 可以看出, 这 5 种昆虫核型多角体病毒蛋白的条带都是多条的, 其中 HcNPV 有 16 条蛋白带, EoNPV 有 6 条蛋白带、HaNPV 有 8 条蛋白带、LdNPV 有 2 条蛋白带、AcNPV 有 5 条蛋白带, 并且 5 种蛋白带在 32KD 左右的蛋白含量明显高于别处。

经 SDS-PAGE 电泳分析, HcNPV 有 16 条带, 在 32 KD 处有 1 条主带^[12], 蛋白在主带处的含量较高, 在其上方 64 KD 左右有 3 条次带, 次带蛋白的含量略低于主带蛋白, 在主带蛋白下方还有多条次带, 其中 18 KD 和 24 KD 处的蛋白比较明显。其他 4 种 NPV 在 32 KD 左右都有一条主带, 其中 EoNPV、HaNPV、AcNPV 在对应的 64KD 处左右存在次带。

这 5 种 NPV 均在 32 KD 到 64 KD 没有任何蛋白条带, 这在几种 NPV 之间是一致的, 另外这几种 NPV 只有在 32 KD 处以下才出现了不同分子量的蛋白条带, 并且这些小于 32 KD 的蛋白条带在几种 NPV 之间没有明显的分布规律, 与自身的其他蛋白条带也没有明显的数量关系。

3 讨论

由图 2 可以看出,病毒粒子束所包含的病毒粒子数目并不固定,推测其包含时选择病毒粒子可能是随机的,因此其大小可能与多角体中包含的病毒粒子的数量^[10]有关。吕鸿声^[9]认为多角体的大小和形态,取决于多角体蛋白的一级结构,多角体蛋白构像调节病毒粒子的包埋过程。

关于核型多角体蛋白的组成一直存在着争论^[3],D. C. Kelly 与同事们分析美国棉铃虫与中国棉铃虫的结构多肽,均为多条电泳带,分子量在 9 000 ~ 106 000 D 之间^[13]。本实验所做的 5 种昆虫病毒蛋白是由多种蛋白构成的,这也进一步证实了核型多角体蛋白是由多种蛋白构成的,与刘子夜等在粘虫核型多角体病毒 (*Leucania separata* nucleopolyhedrovirus, LsNPV) 包涵体蛋白的性质研究得出的结论^[11]一致。也有研究称核型多角体普遍存在碱性蛋白酶,可以将核型多角体蛋白降解成不同的片段。本实验对其做了 70℃ 灭活处理,但仍有许多小分子量的片段。产生多条小分子量的原因可能是该碱性蛋白酶经高温灭活后仍然具备将多角体蛋白碱解成小片段的活性。从另一个方面来说,这种活性机制对病毒粒子有很大的意义,可以使其在高温的逆境中保存下来并且仍然具备活性,在适当的条件下释放病毒粒子,进行病毒的复制、传代。

通过 5 种核型多角体蛋白的对比,有 4 种 NPV 在 32 KD 处有蛋白条带,这说明在 32 KD 处的蛋白是比较保守的,在相应的 64 KD 处也有蛋白条带,可能是该主带蛋白存在二聚体结构^[3],另外在 32 KD 到 64 KD 处也没有其他蛋白,这就更加证实了二聚体结构的存在。有可能存在某种装配机制,在包涵病毒粒子的过程中主带蛋白形成二聚体,然后进一步装配将病毒粒子包含其中,对于装配机制还有待于进一步研究。这两处的条带可能是多角体蛋白的主要构成部分,而其他的小分子量条带则是由于碱性蛋白酶作用的结果。美国白蛾核型多角体蛋白在主带蛋白下方还存在 1 条次带,吴敏^[3]等人在蓖麻蚕核型多角体病毒蛋白中也发现有 1 条类似的条带,并猜想其为多角体膜蛋白。

通过对比,发现 HcNPV 蛋白在 18 KD 左右相对

其他 4 种多角体蛋白有一条特异性条带,虽然不能排除是否由于碱性蛋白酶作用产生的,但是多次电泳结果表明,这些小分子量的蛋白性质比较稳定,所得的电泳结果基本一致。该 18 KD 条带所在的位置比较特殊,其他 4 种昆虫病毒蛋白在该处均无条带,并且该条带的蛋白含量相对较多,这在以后的纯化分析中有较高的利用价值,可以以此作为抗原来制得相应的抗体,这仅在分子量上就有很大的差异,这在该病毒的检测中具有非常重要的意义。

参考文献:

- [1] 李玉璠,王景文,艾德洪,等. 美国白蛾研究初报 [J]. 辽宁农业科学, 1980(1): 46 - 47
- [2] 宋玉双. 十九种林业检疫性有害生物简介 () [J]. 中国森林病虫害, 2005, 24(1): 30 - 31
- [3] 李辉,汤历,陈其津. 昆虫病毒的研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2007, 13(13): 150 - 152
- [4] 吴敏,徐旭士,王晓芳. 蓖麻蚕核型多角体病毒包涵体蛋白的提纯及 SDS-PAGE 分析 [J]. 南昌大学学报:理科版, 2001, 25(4): 344 - 347
- [5] 孙国勋,秦启联,蔡秀玉,等. 棉铃虫核型多角体病毒多角体蛋白聚集体特性及与其它包涵体蛋白的血清学关系 [J]. 昆虫学报, 2002, 45(1): 24 - 29
- [6] Kelly D C, Brown D A. Biochemical and biophysical properties of a *manestra brassicae* multiple enveloped nuclear polyhedrosis virus [J]. Archives of Virology, 1980(60): 133 - 141
- [7] 吴伯春. 中国棉铃虫核多角体病毒 (*Heliothis amigera* NPV) VHA273 毒株 DNA 的酶切分析与比较研究 [J]. 华中师范大学学报:自然科学版, 2000, 31(1): 74 - 77
- [8] Lcannlli U K. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacterio [J]. Nature (London), 1970, 227: 680 - 685
- [9] 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学 [M]. 北京:中国农业科技出版社, 1998
- [10] Boucias D G, Nordin G L. Interstar susceptibility of the fall webworm, *hyphantria cunea* to its nucleopolyhedrosis and granulosis virus [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1977, 30: 68 - 75
- [11] 刘子夜,齐义鹏. 粘虫核型多角体病毒包涵体蛋白的性质及其对几种肿瘤细胞生长的抑制作用 [J]. 中国病毒学, 1993, 8(4): 357 - 365
- [12] Allaway G P, Payne C C. A biochemical and biological comparison of three european isolates of nuclear polyhedrosis viruses from *agrotis segetum* [J]. Archives of Sirology, 1983, 75: 43 - 54
- [13] Kelly D C. Biochemical, biological and serological properties of two single enveloped nuclear polyhedrosis viruses from *Heliothis amigera* and *Heliothis jea* [J]. Microbiologica, 1980(3): 319 - 331