

舞毒蛾核型多角体病毒 PCR 检测技术的建立

陶 婧¹, 韩崇选^{1*}, 张永安^{2*}, 王玉珠², 曲良建², 王青华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)

摘要:根据舞毒蛾核型多角体病毒(LdMNPV)的蜕皮甾体尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶基因(*egt*)设计一对特异性引物,成功建立了LdMNPV的PCR检测技术体系,其对LdMNPV基因组的灵敏度可达到 $1\text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。应用该技术体系从舞毒蛾带毒幼虫、卵、蛹的基因组中扩增出目的片段,证明了这一技术的可行性。对不同浓度的多角体悬液的扩增结果显示:其检测最低量为 $5\text{ OBs}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。形态学研究表明:从内蒙舞毒蛾体内分离到的LdMNPV中,少数表面有凹陷的孔洞,病毒粒子从这些孔洞中游离出来,这也阐明了此技术能够从多角体悬液中扩增出目的片段的原因。在将来LdMNPV的检测中,可用虫体进行研磨过滤离心得到的组织液作为模板进行扩增。

关键词:舞毒蛾核型多角体病毒;PCR;微量检测;*egt*基因

中图分类号:Q966

文献标识码:A

Establishment of PCR Assay for Detecting of *Lymantria dispar* Multiple-embedded Nucleopolyhedrovirus (LdMNPV)

TAO Jing¹, HAN Chong-xuan¹, ZHANG Yong-an², WANG Yu-zhu², QU Liang-jian², WANG Qing-hua²

(1. College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 2. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Forest Protection, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: A technical architecture used for the microdetermination of *Lymantria dispar* multiple-embedded nucleopolyhedrovirus was set up. Based on *egt* gene of LdMNPV, a pair of primers was designed with the sensitivity of $1\text{ fg}\cdot\text{mL}^{-1}$ DNA. By using this pair of primers, the partial sequences of *egt* gene were amplified from the eggs, larvae and pupae of the infected *L. dispar*, which verified the feasibility of this method. The partial sequences of *egt* gene were also amplified from the polyhedron suspension and the minimum amount of detection could be as low as $5\text{ OBs}\cdot\text{mL}^{-1}$ of polyhedron. Morphology research indicated that the surface of a few of polyhedrons was rough pitted and released virions. It could be a reason why the target DNA fragment could be amplified from the virus suspension. So in the detection of LdMNPV, suspension after trituration, filtration and centrifugation can be used as template.

Key words: *Lymantria dispar* multiple-embedded nucleopolyhedrovirus (LdMNPV); PCR; microdetermination; *egt* gene

舞毒蛾在我国分布于东北、华北、西北、华东和中国台湾,其幼虫取食危害500余种植物^[1],对我国林业发展造成极大损失。微生物防治是当今农林害虫防治中最有价值的方法之一,其中,昆虫病毒防治以其专一性强、高效安全的优点在森林保护中发

挥了很大的作用^[2]。舞毒蛾核型多角体病毒(*Lymantria dispar* multiple-embedded nucleopolyhedrovirus, LdMNPV)于1915年首次报道^[3],但直至1948年其病原性才被证实^[4]。国外对LdMNPV的应用研究开始于20世纪60年代,我国于20世纪70年代

收稿日期:2012-01-12

基金项目:林业公益性行业科研专项(200704012,200904029)

作者简介:陶婧(1987—),女,河北石家庄人,硕士. Email: dorothytao88@126.com

* 通讯作者:韩崇选,男,教授. Email: sendakingcat@yahoo.com.cn; 张永安,男,研究员. Email: zhangyab@caf.ac.cn

末也开始了对 LdMNPV 的研究^[5]。

目前,对其防治效果仍采用肉眼观察、调查统计的方式。曾有学者应用免疫金颗粒标记鉴定 LdMNPV 的抗原,对 LdMNPV 进行鉴定和细胞定位。该标记系统具有容易制备、高的电子致密度和分辨力、与大分子结合的稳定性、不同的粒子大小以及很强的二次电子反射能力等优点,被广泛用于病毒与寄主间关系、病毒在寄主细胞内复制机制、病毒表面抗原和结构蛋白定位等研究^[6];但同一目寄主的核型多角体病毒同源性较近,抗体易和这些同源性相近的抗原产生亲和反应,使得免疫方法在鉴定病毒方面还存在一定的局限性;所以,建立一种以病毒基因组为基础的检测技术对我国林业舞毒蛾的防治具有很好的实际应用价值^[7]。本实验针对 LdMNPV 内蒙株设计了一对特异性引物,建立了以 PCR 技术为基础的昆虫病毒核酸快速检测技术体系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

舞毒蛾核型多角体病毒(LdMNPV)、思茅松毛虫核型多角体病毒(*Dendrolimus kikuchii* nucleopolyhedrovirus, DkNPV)、美国白蛾核型多角体病毒(*Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus, HcNPV)、春尺蠖核型多角体病毒(*Apocheima cinerarius* nucleopolyhedrovirus, AciNPV)、茶尺蠖核型多角体病毒(*Ectropis obliqua* nucleopolyhedrovirus, EoNPV)、甜菜夜蛾核型多角体病毒(*Spodoptera exigua* multiple-embedded nucleopolyhedrovirus, SeMNPV)、斜纹贪夜蛾核型多角体病毒(*S. litura* nucleopolyhedrovirus, SpliNPV)和油桐尺蠖核型多角体病毒(*Buzura suppressaria* nucleopolyhedrovirus, BsNPV)均为中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所提供。

舞毒蛾采自内蒙古自治区乌兰察布市苏木山林场,在实验室人工饲养并连续传代。

1.2 实验方法

1.2.1 病毒的增殖与多角体的纯化 取冰箱保存的 LdMNPV 感染健康舞毒蛾 4 龄幼虫,收集具有典型病毒症状的死虫尸,加入少量的磷酸缓冲液(pH 值 7.4)研磨虫尸,3 层纱布过滤。滤液经多次离心^[7]得到纯净的 LdMNPV 多角体悬液,将此悬液浓度调整为 5.0×10^9 PIB · mL⁻¹,采用十倍梯度稀释法,逐级稀释为 5.0×10^8 、 5.0×10^7 、 5.0×10^6 、 5.0×10^5 、 5.0×10^4 、 5.0×10^3 、 5.0×10^2 、 5.0×10^1 PIB

· mL⁻¹, 4 °C 保存备用。

1.2.2 电镜观察 扫描电镜样品的制备:将干净的载玻片弄碎,选取大小约 0.16 cm² 见方的碎片,将纯化的 LdMNPV 多角体悬液均匀涂于上述载玻片碎片上,自然干燥,喷金 180 s;扫描电镜观察多角体形态特征。

透射电镜样品的制备采用仲国立等^[8]的方法。

1.2.3 带毒幼虫卵和蛹的获取 以 2×10^4 PIB · mL⁻¹ 的浓度感染健康舞毒蛾 2 龄幼虫,幼虫化蛹后单独收集,待其羽化、产卵。卵不经消毒处理,随机取 5 个卵块置于 -20 °C 冰箱中保存备用,剩余卵块在 4 °C 放置 40 d,待其滞育解除后置于 25 °C 环境下孵化,幼虫孵化后单头饲养至化蛹,随机取 20 头蛹置于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.2.4 病毒 DNA 的提取和病虫总 DNA 的提取 用碱裂解法^[8-9]提取病毒 DNA。

病虫总 DNA 的提取:取待检测的舞毒蛾幼虫、卵、蛹加入适量液氮研磨,采用平衡酚法^[10-11]提取舞毒蛾总 DNA。

1.2.5 引物设计 LdMNPV 的全基因组序列已被测定^[12],根据 genbank 公布的序列,进行比对发现其蜕皮甾体尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶基因(*egt*)特异性很高,根据 LdMNPV 的 *egt* 基因设计了一对引物,命名为 LEB, LEB-F: 5'-ATGAGATCACGCTTCGATCGCG-3', LEB-R: 5'-CGTCGATCGTCAGATGCAGAC-3',其扩增的目的片段长 984 bp。

1.2.6 扩增条件 PCR 反应体系:2 × Taq PCR MasterMix 10 μL,上下游引物各 1 μL(10 μmol · L⁻¹),模板加入量因实验材料而异,其中病毒和病虫总 DNA 为 1 μL,LdMNPV 多角体悬液为 0.5 μL,最后加无 RNA 水至 20 μL。

反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s, DNA 模板 58 °C (其中以 LdMNPV 多角体为模板的退火温度 55 °C)复性 45 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环;72 °C 再延伸 10 min。

反应结束后,取 5 μL 反应液经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 反应液送北京三博远志生物技术有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 LdMNPV 的形态特征

由图 1 的 LdMNPV 扫描电镜照片观察到,LdMNPV 多角体形态呈不规则球形,有的表面光滑,有的

有突起,有的有棒状凹陷,其直径为 $0.8 \sim 2.8 \mu\text{m}$ 。

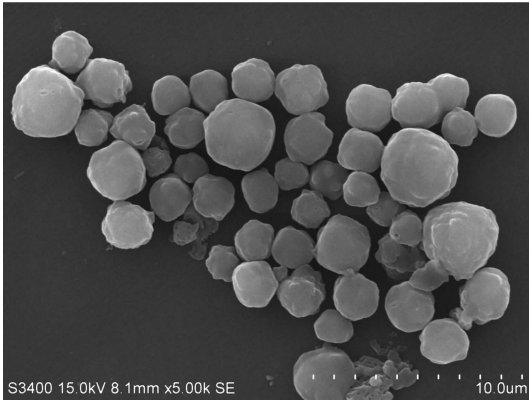
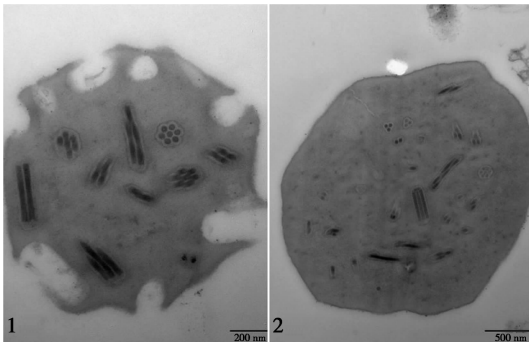


图1 LdMNPV 扫描电镜照片($5\ 000 \times$)

从图2 LdMNPV 透射电镜照片可以看出:LdMNPV 为多粒包埋型核型多角体病毒,其病毒束在多角体中无规则排列,并有囊膜包被;病毒粒子呈杆状,大小约为 $25 \text{ nm} \times 280 \text{ nm}$, $3 \sim 7$ 个杆状病毒粒子平行排列成束;左图中多角体边缘的病毒束已经游离出来,留下一些环状孔洞。



1. 边缘有凹陷的多角体($100\ 000 \times$);
2. 边缘平滑的多角体($50\ 000 \times$)

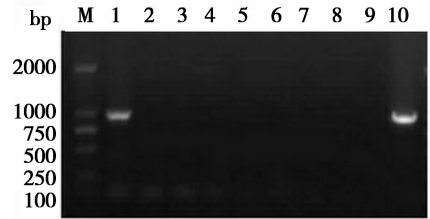
图2 LdMNPV 透射电镜照片

2.2 引物特异性分析

分别以 LdMNPV、DkNPV、HcNPV、AciNPV、EoNPV、SeMNPV、SpliNPV、BsNPV 的基因组 DNA 为模板,以 LEB 为引物进行 PCR 扩增,扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。结果(图3)表明:只有以 LdMNPV 的基因组 DNA 为模板对引物 LEB 的扩增得到了一条清晰、特异的条带,此条带与目的片段大小一致。测序结果显示扩增出的产物即 LdMNPV 的 *egt* 基因片段,其大小为 984 bp。

2.3 LdMNPV 基因组 DNA 灵敏度的检测

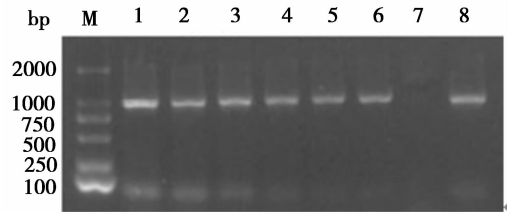
以浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LdMNPV 基因组 DNA 为模板,以 LEB 为引物进行扩增。扩增结果(图4)表明:这种模板的检测灵敏度



M: Marker; 1: LdMNPV; 2: DkNPV; 3: HcNPV; 4: AciNPV;
5: EoNPV; 6: SeMNPV; 7: SpliNPV; 8: BsNPV;
9: 阴性对照; 10: 阳性对照

图3 以 LEB 为引物扩增不同病毒的 *egt* 基因

均已达到 $1 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

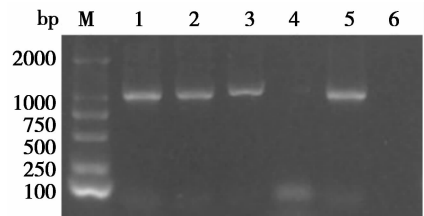


M: Marker; 1: $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 2: $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 3: $1 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$;
4: $100 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 5: $10 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 6: $1 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$;
7: 阴性对照; 8: 阳性对照

图4 以 LEB 为引物扩增 LdMNPV 基因组 DNA *egt* 基因

2.4 LdMNPV 的 PCR 检测技术的可行性验证

分别以均感染 LdMNPV 的舞毒蛾带毒卵、幼虫、蛹的 DNA *egt* 基因组为模板,以 LEB 为引物进行 PCR 扩增,扩增产物的电泳结果(图5)显示:其均扩增出特异条带,而健康虫和双蒸水的对照没有扩增出任何条带。这验证了用此方法进行 LdMNPV 的微量、快速检测是切实可行的,可以应用到 LdMNPV 的实际检测中。



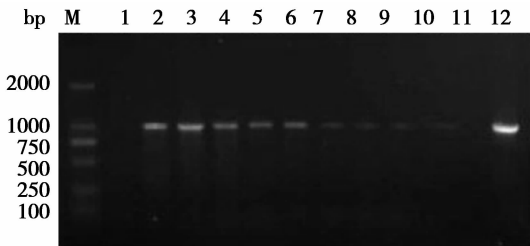
M: Marker; 1: 卵 DNA; 2: 幼虫 DNA; 3: 蛹 DNA;
4: 阴性对照; 5: 阳性对照; 6: 双蒸水

图5 以 LEB 为引物扩增舞毒蛾卵、幼虫、蛹的 DNA *egt* 基因

2.5 LdMNPV 模板的多样性

分别以不同浓度的多角体悬液作为模板,以 LEB 为引物进行 PCR 扩增,阴性对照为健康虫经研磨过滤、离心^[7]得到的悬液,阳性对照为提纯的 LdMNPV DNA。结果(图6)显示:检测灵敏度可达

到5个多角体的模板检测量。



M:Marker;1~10 分别为: 5.0×10^9 、 5.0×10^8 、 5.0×10^7 、 5.0×10^6 、 5.0×10^5 、 5.0×10^4 、 5.0×10^3 、 5.0×10^2 、 5.0×10^1 、 5.0×10^0 PIB · mL⁻¹;11:阴性对照;12:阳性对照

图6 以LEB为引物扩增多角体悬液

3 结论与讨论

由图2可以看出:LdMNPV多角体中包被的病毒束数量、病毒束中包被的病毒粒子数量并不固定,所以,多角体包含时选择病毒粒子可能是随机的,包含病毒粒子束多的多角体其直径也大^[13]。有学者认为,多角体的大小和形态取决于蛋白质的一级结构,多角体蛋白的构象调节其包埋过程。此外,LdMNPV的多角体易溶于NaOH、KOH、H₂SO₄和HAC的水溶液中,碱解也相对容易。图1中多角体表面的棒状凹陷以及图2(1)中多角体边缘的环状孔洞可能是在电镜样品处理过程中多角体溶解。也有学者认为,多角体表面孔洞形成的原因是多角体囊膜蛋白基因(*pep*基因)失活导致多角体囊膜蛋白缺失,同时病毒粒子束释放了出来^[14]。这为以多角体悬液作为模板可以扩增出目的条带提供了理论依据。

*egt*基因编码一种叫作蜕皮甾体尿苷二磷酸葡萄糖转移酶(EGT)的多肽,受病毒感染的幼虫,其*egt*基因表达产生的EGT蛋白分泌到血淋巴中,使受感染幼虫在死亡前一直保持活跃的取食和生长状态,有利于病毒进行最大限度地增殖^[15]。作者通过序列分析,设计后筛选出一对特异性引物LEB,该对引物只有以LdMNPV DNA为模板才能扩增出与预期大小相符的目的片段,而其它病毒DNA未扩增出条带。此外,以LdMNPV多角体悬液作为模板同样扩增出了目的片段,而从健康虫体内提取的悬液并未扩增出目的条带,说明多角体悬液即可用于PCR检测。在林间应用中,取虫体进行研磨过滤、离心等步骤得到的悬液作为模板,无需提取DNA,使得昆虫病毒的检测方法呈现多样化并且简单易行。因此技术具有快速、特异、准确性高的优点,已广泛应用

于病毒的检测^[16-17]。此外,此技术还可用于实验室种群病毒感染检测和林间舞毒蛾病毒流行病检测、研究等,同时也可以用于林间舞毒蛾核型多角体病毒在环境中存留跟踪研究。

参考文献:

- [1] 萧刚柔. 中国森林昆虫(第二版)[M]. 北京:中国林业出版社, 1983: 834
- [2] Arif B M. A brief journey with insect viruses with emphasis on baculoviruses[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2005, 89: 39-45
- [3] Glaser R W, Chapman J W. A preliminary list of insects which have wilt[J]. Journal of Economic Entomology, 1915, 6: 479-488
- [4] Bergold G H. Über die Kapsel Virus-Krankheit[J]. Zeitschrift für Naturforschung, 1948, 3b: 338-342
- [5] Rollinson W D, Lewis F B, Waters W E. The successful use of a nucleopolyhedrosis virus against gypsy moth[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1965, 7: 515-517
- [6] 丁 翠,马 可. 用免疫金颗粒标记鉴定舞毒蛾核型多角体病毒的抗原[J]. 昆虫学报, 1991, 34(1): 7-12
- [7] Charpentier G, Desmarteaux D, Bourassa J P, et al. Utilization of the polymerase chain reaction in the diagnosis of nuclear polyhedrosis virus infections of gypsy moth (*Lymantria dispar*, Lep., Lymantriidae) populations[J]. Journal of Applied Entomology, 2003, 127: 405-412
- [8] 张永安,仲国立,侯玉霞,等. 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[J]. 林业科学研究, 2008, 21(4): 451-455
- [9] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (third edition)[M]. New York: Cold spring harboratory Press, 2001: 32-36
- [10] Hughes D S, Possee R D, King L A. Activation and detection of a latent baculovirus resembling *Mamestra brassicae* Nuclear polyhedrosis virus in *M. brassicae* insect[J]. Virology, 1993, 194: 608-615
- [11] 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经卵和蛹的垂直传播[J]. 中国生物防治, 2005, 21(1): 45-48
- [12] Kuzio J, Pearson M N, Harwood S H, et al. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*[J]. Virology, 1999, 253: 17-34
- [13] Boucias D G, Nordin G L. Interinstar susceptibility of the fall webworm, *hyphantria cunea* to its nucleopolyhedrosis and granulosis virus[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1977, 30: 68-75
- [14] David S B, James M S. Impact of deletion of the *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus *pep* gene on viral potency: expression of the green fluorescent protein prevents larval liquefaction[J]. Biological Control, 1999, 14: 51-59
- [15] 沈兴家,张志芳,李奕仁. 昆虫杆状病毒*egt*基因研究进展[J]. 中国蚕业, 2004, 25(2): 4-7
- [16] 王文欢,张永安,王玉珠,等. 基于PCR方法的美国白蛾核型多角体病毒早期检测[J]. 昆虫学报, 2009, 52(6): 707-712
- [17] 陈 川,张永安,王玉珠,等. 油桐尺蠖核型多角体病毒(BsNPV)生物学与检测技术研究[J]. 林业科学研究, 2011, 24(3): 410-414