

昆虫病毒包涵体电镜样品的制备 及其超微结构观察

石木标 戴冠群 钟士清

(华南农业大学食品科学系, 广州, 510642)

摘要 在提纯昆虫病毒包涵体及其病毒粒子的电镜样品制备进行了初步探讨. 结果表明: 在电镜下观察, 包涵体及其病毒粒子图像清晰, 显示了病毒粒子的形态特征, 可达到昆虫病毒电镜鉴定之目的. 与此同时, 还观察到某些包涵体表面呈蜂窝状或沟型凹陷等“前多角体”的特殊构造; 多角体块状蛋白质晶格、多角体外膜以及杆状病毒粒子蛋白亚基斜纹花样、病毒粒子囊膜等超微结构.

关键词 包涵体; 病毒粒子; 超微结构

中图分类号 Q93- 331

华南农业大学自 70年代后期, 陆续发现了不少昆虫病原病毒 (石木标等, 1984; 伍建芬等, 1983; 苏星等, 1983; 戴冠群等, 1983), 这些病毒是含有包涵体的. 其电镜样品制备技术, 当时尚未作系统的报道. 在工作中发现不同的昆虫病毒样品, 性质各异, 处理手段也应有所变动, 避免差错而影响包涵体或病毒粒子的观察. 现将 1978年以来所做的电镜样品处理方法作一整理. 其作为昆虫病毒的形态电镜鉴定效果, 较为理想.

1 材料与方法

1.1 试验材料及器材

感染病毒致死的昆虫幼虫若干种、研钵、蒸馏水、纱布、脱脂棉花、 $0.05\text{mol/L Na}_2\text{CO}_3$ 和 0.02mol/L NaCl 混合液, 混合液比例为 10 : 1 (pH 11)、5% HCl、钢网、2% 磷钨酸、普通小型离心机、小试管等.

1.2 试验方法

将每种病毒致死的虫尸放于研钵中, 加入适量蒸馏水加以研磨. 先用三层纱布过滤, 所得滤液再以脱脂棉花过滤, 取滤液以 4000r/min 以下差速离心, 提取包涵体. 将少量包涵体置于铜台上, 经干燥后碳-黄金喷涂, 扫描电镜观察.

另取一定量的包涵体置于小试管中, 加入适量的 $0.05\text{mol/L Na}_2\text{CO}_3$ 和 0.02mol/L NaCl 混合液处理 20~ 30min 后, 随即加入 5% HCl, 充分摇匀. 然后置于小型普通离心机中以 3000r/min 离心 15min, 得病毒上清液, 将病毒上清液上 Form 铜网, 2% 磷钨酸负染 1min, 在 EM-400 透视电镜观察.

2 结果与分析

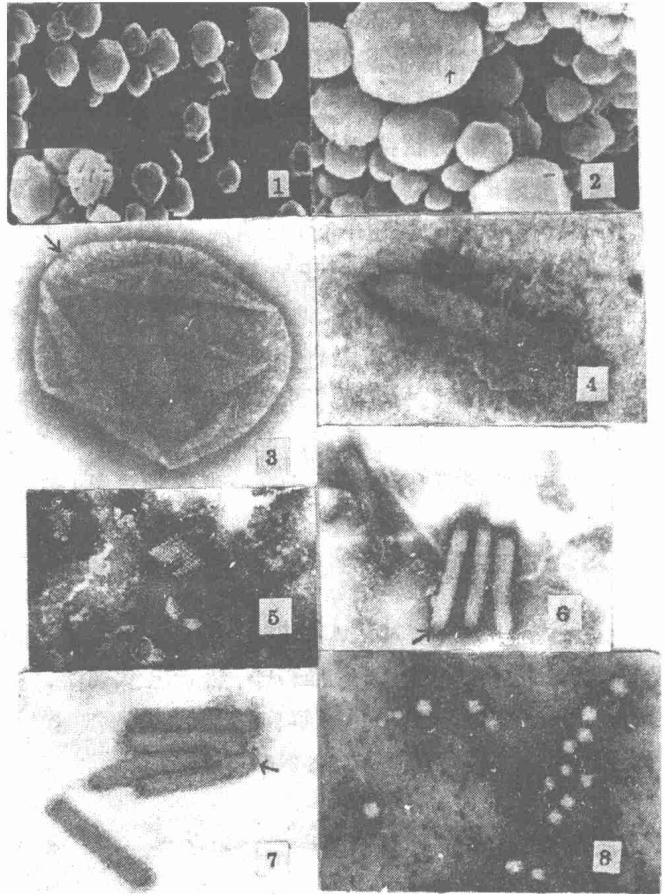
2.1 多角体表面蜂窝状或沟状凹陷结构

从我们的观察中, 大多数的多角体表面平滑 (图版 1) 或表面较粗糙 (图版 2), 反映了多角体的不规则的多面体。但松茸毒蛾质多角体表面则呈现蜂窝状结构 (戴冠群等, 1983), 这种蜂窝状多角体的获得, 是从感染病毒后幼虫组织中提纯获得, 其超薄切片图像中也表明这种窝状结构。

我们认为这种蜂窝状多角体属于“前多角体” (Hunter, et al, 1973); 而感病致死的幼虫中获得多角体 (图版 2) 则未见此现象, 即为成熟的多角体 (Hunter et al, 1973)。此外, 在十斑大瓢虫核多角体、灰白蚕蛾核多角体、木麻黄核多角体、红缘灯蛾核多角体和棉古毒蛾核多角体中, 则发现有沟型或孔洞型凹陷结构 (图版 1), 这些凹陷结构多出现于较细小的多角体中。我们认为这些凹陷结构似与杆状病毒粒子或病毒束嵌入多角体蛋白中所遗留的痕迹, 但在其它的多角体中未见此现象。多角体的特殊结构对于研究多角体的形成和发育有一定的意义。

2.2 多角体对弱碱溶液的特异性

我们用弱碱处理近 20 种昆虫病毒包涵体的过程中, 发现颗粒体一般需要降解 20 min, 绝大多数的多角体需要 20~30 min 降解; 而棉古毒蛾核多角体、双线盗毒蛾核多角体经弱碱处理 1 min, 病毒粒子就释放出来 (图版 7)。但红缘灯蛾核多角体用弱碱处理 120 h, 多角体仍完整无缺, 我们试用 1% NaOH 和 0.02 mol/L NaCl 混合液处理, 1 min 便释放出病毒粒子 (石木标等, 1984)。包涵体对弱



图版说明

1. 十斑大瓢虫核多角体扫描电镜图 (注意沟型凹陷结构), $\times 3150$; 2. 松茸毒蛾质多角体扫描电镜图, $\times 4900$; 3. 红缘灯蛾核多角体经 1% NaOH 处理 1 min 后的多角体膜透射电镜图, $\times 14180$; 4. 丽绿刺蛾颗粒体病毒粒子透射电镜图, 2% PTA 负染 (注意病毒粒子两端钝圆构型和斜纹花样构型), $\times 151200$; 5. 松茸毒蛾质多角体块状蛋白质晶格透射电镜图, 2% PTA 负染, $\times 136500$; 6. 油桐尺蠖核多角体病毒粒子透射电镜图, 2% PTA 负染 (注意两端绒毛状突起结构和病毒囊膜左上角), $\times 52730$ (引自戴冠群等, 1983); 7. 双线盗毒蛾核多角体病毒粒子透射电镜图, 2% PTA 负染 (注意病毒两端环状结构), $\times 63500$ (引自石木标等, 1984); 8. 松茸毒蛾质多角体病毒粒子透射电镜图, 2% PTA 负染 (注意六边形结构和囊膜), $\times 52500$

碱的特异性,可能与不同种类包涵体的蛋白质成分和结构的差异有关.

2.3 多角体蛋白质晶格 多角体膜

斜纹夜蛾核多角体经弱碱溶解后在超速离心的沉淀物中发现块状蛋白质晶格,并描绘了晶格排列形式(张立人等,1979),我们在观察松毒茸蛾质多角体病毒过程中,也发现了松茸毒蛾质多角体块状蛋白质晶格的立体构型(图版 5),其晶格以点线式样排列,测得晶格大小约为 $57\text{\AA}$,晶格间距 $45\text{\AA}$ 左右.我们所获得块状蛋白质晶格,仅以弱碱处理 10min 后,以 5% HCl 中止降解,然后上样,电镜中观察到大小不一的蛋白质块状晶格 (Gregory, 1969).我们用 1% NaOH 处理红缘灯蛾核多角体过程中,在电镜下也观察到多角体膜(图版 3),其膜上有一个被碱液溶解的孔,在电镜上还观察到有些病毒颗粒包在多角体膜中.对于红缘灯蛾核多角体对弱碱的特异性,是否与多角体膜有关?

2.4 病毒粒子绒毛状突刺及病毒囊膜

我们观察的杆状病毒中,细皮夜蛾 GV、竹斑蛾 GV、红缘灯 GV、丽缘刺蛾 GV 和斜纹夜蛾 GV 等病毒粒子两边平行,两端钝圆(图版 4),仅母生天社蛾 GV 则两边平行,而两端平截的;但松茸毒蛾等 12 种 NPV 都是两边平行,两端平截的 NPV,未发现有两端钝圆的 NPV;在杆状病毒中,我们发现有些病毒粒子两端可清楚见到似绒毛状突刺构型(图版 6),此绒毛状结构是否与其侵染寄主细胞时起吸附作用有关.未见有文献报道.有些病毒粒子呈现蛋白亚基斜纹花样结构(图版 4)和病毒粒子囊膜(图版 6,左上角);有些杆状病毒粒子两端则呈现环状结构(图版 7).马尾松毛虫 CPV 和马尾松茸毒蛾 CPV,其病毒粒子呈典型六边形结构,其囊膜 (Harrap, 1972) 也清晰可见(图版 8).

3 讨论

不少文献报道(刘年翠等,1981;张立人等,1979),昆虫病毒包涵体经弱碱处理后,均用超速,冰冻,蔗糖梯度提取病毒粒子,然后电镜观察.我们探讨之方法,病毒包涵体经弱碱处理后,立即以 5% HCl 中止降解作用,避免碱液对病毒粒子的伤害作用,并采用普通离心机低速离心,制备病毒电镜样品,保持了病毒粒子完整性,可达到病毒形态电镜鉴定,方法简单,效果较理想.

在试验中,我们发现不同昆虫病毒的包涵体对弱碱敏感性有很大的差异,多数包涵体在弱碱溶液中,一般处理 $20\sim 30\text{min}$ 释放出病毒粒子,但有一些包涵体处理 1min 就释放出病毒粒子,而有个别的包涵体则在弱碱溶液中处理 120h ,其包涵体仍然完好,揭示包涵体蛋白在成分和结构上存在着极大的差异性.我们所观察到多角体表面的特殊构造、多角体块状蛋白质晶格和多角体膜,对于研究多角体的形成、发育提供一些依据.

参 考 文 献

- 石木标, 冼炳才, 戴冠群, 等. 1984. 三种园林害虫核多角体病的初步观察. 林业科技通讯, (6): 27~ 28
- 刘年翠, 梁东端, 张起磷. 1981. 菜粉蝶颗粒体病毒的分离、提纯、鉴定、超微结构和应用. 武汉大学学报 (自然科学版), (2): 49~ 60
- 伍健芬, 戴冠群, 石木标, 等. 1983. 丽缘刺蛾颗粒体病毒初步研究. 林业科学 (昆虫专辑): 75~ 80
- 苏 星, 戴冠群, 仪向东, 等. 1983. 松茸毒蛾核多角体病毒的初步研究. 病毒学集刊, (3): 153~ 158
- 张立人, 王学兰, 邓海凡, 等. 1979. 斜纹夜蛾核型多角体病毒形态与结构. 中国科学, (4): 398~ 401
- 戴冠群, 石木标, 冼炳才, 等. 1983. 在华南地区发现的一些昆虫包涵体病毒. 华南农学院学报, (4): 49~ 55
- 戴冠群, 石木标, 伍健芬, 等. 1982. 两种叶蜂的肠型核多角体病. 林业科技通讯, (7): 32~ 38
- Gregory B G, Ignoffo C M, Shapir M. 1969. Nucleopolyhedrosis of *Heliothis* Morphological description of inclusion bodies and Virion. J Invert Pathol, (14): 186~ 193
- Harrap K A. 1972. The Structure of nuclear polyhedrosis Viruses, I. The inclusion body Virology. (50): 114~ 123
- Hunter D K, Hoffmann D F, Collier S J, et al. 1973. The histology and ultrastructure of a NPV of the Webbing clothes moth. J Invert Pathol, (21): 91~ 100

THE PREPARATION FOR INCLUSION BODY VIRUS OF INSECT AND THE OBSERVATION OF ITS ULTRASTRUCTURE WITH ELECTRON MICROSCOPE

Shi Mubiao Dai Guanqun Zhong Shiqing

(Dept. of Food Science, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

The purification of inclusion body virus of insect and the preparation for the virus sample for electron microscope were tentatively studied in this paper. The pictures of inclusion body and its virion under electron microscope were shown clearly, and displayed their morphological character of virion and made it possible to identify insect virus with electron microscope. The special structure such as cellular and ditch-like concave propolyhedra, ultrastructure such as polyhedron massive proteinic Crystal, Polyhedron membrane, and heringbone Pattern of Protein subunit of baculiform virion and envelope of virion were also observed clearly.

Key words inclusion body; virion; ultrastructure