

油桐尺蠖核型多角体病毒(BusuNPV)生物学与检测技术研究

陈川¹, 张永安^{1*}, 王玉珠¹, 曲良建¹, 林思诚², 柯沛强²

(1. 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;

2. 广东省茂名市林业科学研究所, 广东 茂名 525000)

关键词: BusuNPV; 油桐尺蠖; PCR; 生物活性

中图分类号: S718.8

文献标识码: A

Biological Activity of the BusuNPV and Its Detection Technology

CHEN Chuan¹, ZHANG Yong-an¹, WANG Yu-zhu¹, QU Liang-jian¹, LIN Si-cheng², KE Pei-qiang²

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Forestry Protection, State

Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. Maoming Research Institute of Forestry Science, Maoming 525000, Guangdong, China)

Abstract: Primers were designed according to sequence of polyhedron envelope protein gene (*pep*) of BusuNPV, then the polymerase chain reaction (PCR) technology was used to detect *Buzura suppressaria* nucleopolyhedrovirus DNA sequences from viral polyhedral inclusion bodies (PIB), and the DNA sequences was detected from the egg and offspring. The level of sensitivity by the technology was as low as $1 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ DNA. Morphology and biological activity studies of BusuNPV showed that, the BusuNPV saved by laboratory was single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus (SNPV). An infectivity test of BusuNPV against the second instar larvae of *Buzura suppressaria* was carried out in out laboratory, and LC_{50} of BusuNPV was determined as $6.65 \times 10^4 \text{ PIB} \cdot \text{mL}^{-1}$, and LT_{50} of BusuNPV was 5.69 d.

Key words: BusuNPV; *Buzura suppressaria*; PCR; biological activity

油桐尺蠖 (*Buzura suppressaria* Guenee) 又称油桐尺蛾、大尺蠖, 是一种暴食性害虫, 主要危害茶、油桐、柑桔、杨梅、桉树等多种植物, 常造成巨大的经济损失。国内主要分布在湖北、湖南、广东、广西等地区, 国外在孟加拉西部以及印度地区有分布。目前对其采取的治理方法主要为化学农药防治, 虽能起到一定的防效, 却带来了污染环境, 伤害天敌, 生态环境平衡失调, 降低茶叶、柑橘、杨梅等质量的严重后果。

1978年6月, 在湖北省羊楼洞茶场首次发现油桐尺蠖自然感病幼虫, 倒挂而死, 经采集分离及鉴定, 致死原因为一种核型多角体病毒^[1]。油桐尺蠖核型多角体病毒 (*Buzura suppressaria* nucleopolyhe-

drovirus, BuSuNPV) 感染油桐尺蠖后能引起很高的死亡率, 使用 $1 \times 10^6 \text{ PIB} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多角体悬液感染 2~5 龄幼虫, 死亡率可达 90% 以上^[2-3]。研究人员对 BusuNPV 的血清学、理化特性、安全性试验、剂型及大田应用等已进行了广泛的研究^[4]。有学者还对 BusuNPV 的全基因序列进行了限制性内切酶分析^[5-9], 并对 BusuNPV 的蛋白性质^[10-11] 以及细胞培养法增值 BusuNPV 进行了研究^[12-17], 但对 BusuNPV 的检测技术研究却少有报道。鉴于此, 本文对 BusuNPV 的分子检测技术进行研究和应用, 以期为深入研究 BusuNPV 在昆虫体内动态变化及林间流行规律奠定基础。此外, 本文还对研究室保存的 BusuNPV 毒株的形态及生物活性进行了研究。

收稿日期: 2010-03-01

基金项目: 林业公益行业专项基金(200704003)

作者简介: 陈川(1985—), 中国林业科学研究院在读硕士研究生, 主要从事害虫生物防治方面的研究。

* 通讯作者: 研究员. E-mail: zhangyab@caf.ac.cn

1 材料与方 法

1.1 供试毒株与试虫

BusuNPV 由本实验室保存,油桐尺蠖采自广东省茂名市,并在本实验室室内传代饲养。

1.2 试剂

蛋白酶 K (proteinase K) 购自 Merck 公司; Tris 酚、溴酚蓝等购自北京鼎国生物公司; 核酸染料 SYBR GREEN I、DNA marker 购自北京百泰克生物公司; $2 \times$ Taq PCR MasterMix 及其他 PCR 相关试剂购自天根生化; 其他试剂均为国内分析纯, 购自北京化学试剂公司。

1.3 病毒的增殖和多角体纯化

取 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存的 BusuNPV, 以 1.0×10^7 PIB $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度感染 3 龄末油桐尺蠖幼虫。4 d 后开始收集具有典型病毒症状的虫尸, 研磨匀浆, 加水稀释后 3 层纱布过滤。经差速离心和蔗糖密度梯度离心得纯净的 BusuNPV 悬液。

1.4 电镜观察

1.4.1 扫描电镜样品的置备 将纯化的病毒多角体悬液用 2.5% 戊二醛预固定, 过夜; 酒精梯度脱水, 放入叔丁醇, 喷金 180 s, S-3400N 扫描电镜观察多角体外部形态特征。

1.4.2 透射电镜样品的制备 将纯化的 BusuNPV 悬液沉淀, 用 2.5% 戊二醛预固定 2 h, 0.1 mol 磷酸缓冲液漂洗 4 次, $10\text{ min} \cdot \text{次}^{-1}$; 1% 的锇酸固定 2 h, 0.1 mol 磷酸缓冲液漂洗 3 次, $10\text{ min} \cdot \text{次}^{-1}$; 经梯度丙酮脱水, 各 20 min; 环氧树脂 SPURR 包埋, 聚合 70 ~ 80 h, 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。

1.5 BusuNPV 的生物活性测定

将病毒稀释为 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 PIB $\cdot \text{mL}^{-1}$ 4 个浓度, 每个处理设 3 个重复, 每重复实验虫 20 头, 设置空白为对照。在无菌环境下, 每个养虫杯饲料上接入 300 μL 的病毒液, 阴干后放入 2 龄幼虫 20 头, 72 h 后更换无病毒新鲜人工饲料。逐日记录幼虫死亡数, 用 SPSS 统计软件计算出半数致死浓度 (LC_{50}) 及半数致死时间 (LT_{50}) 等相关数据。

1.6 带毒幼虫的卵和蛹的获取

以 LC_{50} 的浓度感染油桐尺蠖 2 龄幼虫, 具体方 法同 BusuNPV 的生物活性测定。单独收集蛹使其

羽化、产卵, 卵不进行消毒处理, 随机取 50 粒置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 其它卵置于 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下孵化, 孵化后幼虫单头饲养直至化蛹, 随机取 20 头蛹用于 PCR 检测。

1.7 病毒 DNA 的提取和纯化

应用碱裂解法提取病毒 DNA。具体方法为: 取纯化的多角体病毒悬液, 沉淀后溶于适量 TE (pH 值 8.0) 中, 加入等体积碱解液 (pH 值 10.8), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 碱解 4 h; 10% 冰醋酸 HAc 调 pH 值至 7 ~ 8; 加十二烷基硫酸钠 SDS 和蛋白酶 K 至终浓度分别为 0.5% 和 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 ~ 4 h; 等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 和等体积氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提溶液; 加 1/10 体积的 $3\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钠溶液, 加 2.5 倍体积的冰乙醇沉淀 DNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀 2 h (或过夜); 预冷的 75% 乙醇漂洗 2 次, 风干后的基因组 DNA 溶于 TE, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

1.8 总 DNA 的制备

取待检测的油桐尺蠖幼虫、卵、蛹加入适量液氮研碎, 然后加入匀浆缓冲液 ($0.1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, $0.03\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $0.01\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $0.01\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇, 0.5% 曲拉通) 后离心, 将离心沉淀物在细胞裂解液中裂解, 最后用平衡酚抽提^[18-19]。

1.9 病毒的 PCR 检测

1.9.1 引物设计和 PCR 扩增 根据 BusuNPV 的多角体囊膜蛋白基因 (*pep*) 设计了一对引物, 上游引物 BPF-F 为 5'-ACCTTACTTCCAGCGTGACC-3', 下游引物 BPF-R 为 5'-CGGTTTGATGTGATTGATGC-3', 预扩增片段长为 450 bp。PCR 反应体系总体积为 20 μL , 反应条件为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($48\text{ }^{\circ}\text{C}$) 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 min。PCR 反应结束后, 取 5 μL 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物送天根生物化学有限公司测序。

1.9.2 PCR 检测的应用 分别以带毒的油桐尺蠖幼虫、卵、蛹的总 DNA 为模板, 各取 2 μL 进行 PCR 扩增, 同时以健康虫的总 DNA 和双蒸水 (ddH_2O) 为对照, 扩增条件同上。

2 结果与分析

2.1 BusuNPV 的形态特征研究

从扫描电镜图像观察到 BusuNPV 形态呈不规则形状, 边角钝圆, 表面有的光滑, 有的呈现层状, 个

别有杆状凹窝,其大小为 $0.85 \sim 1.50 \mu\text{m}$ (图1)。

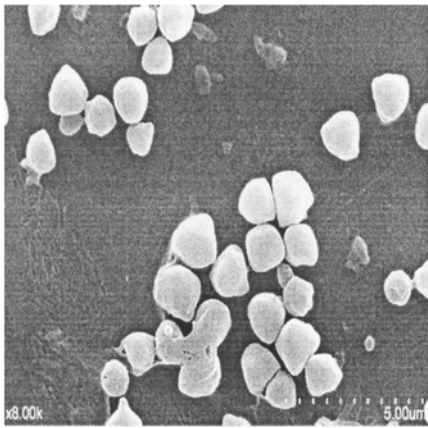


图1 油桐尺蠖多角体病毒扫描电镜图

透射电镜图像表明:BusuNPV 的病毒粒子呈杆状,在多角体中零散分布,排列方式无规律,为单核衣壳多角体类型(SNPV),未发现病毒束,大小约 $60 \text{ nm} \times 220 \text{ nm}$ (图2)。

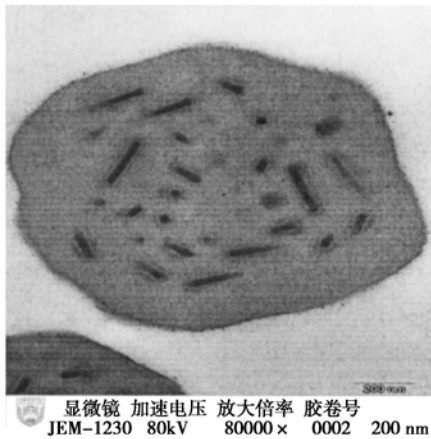


图2 油桐尺蠖多角体病毒透射电镜图

2.2 BusuNPV 生物活性研究

研究结果(表1)表明:油桐尺蠖2龄幼虫对BusuNPV的敏感性很高,其半数致死浓度(LC₅₀)为 $6.65 \times 10^4 \text{ PIB} \cdot \text{mL}^{-1}$;当BusuNPV浓度为 $1.0 \times 10^7 \text{ PIB} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,油桐尺蠖2龄幼虫的半数致死时间(LT₅₀)为5.69 d,而浓度为 $1.0 \times 10^4 \text{ PIB} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,LT₅₀为15.45 d。由此可见:油桐尺蠖2龄幼虫的死亡时间与感染浓度呈正相关,感染浓度越大,幼虫死亡速度越快(表2)。

表1 BusuNPV 感染油桐尺蠖2龄幼虫的LC₅₀测定结果

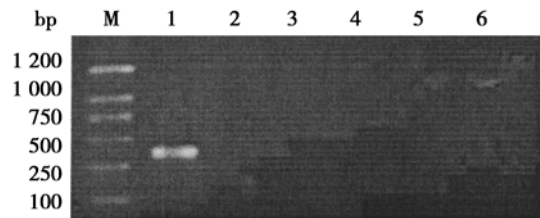
虫龄	LC ₅₀ / (PIB · mL ⁻¹)	95% 置信限/ (PIB · mL ⁻¹)	回归方程
2龄	6.65×10^4	$3.84 \times 10^4 \sim 1.08 \times 10^5$	$Y = -3.776 + 0.785x$

表2 BusuNPV 感染油桐尺蠖2龄幼虫的LT₅₀测定结果

BusuNPV 浓度 /(PIB · mL ⁻¹)	LT ₅₀ /d	95% 置信限/d	回归方程
1.0×10^7	5.69	5.43 ~ 5.94	$y = -5.86 + 7.76x$
1.0×10^6	7.25	6.94 ~ 7.56	$y = -6.21 + 7.21x$
1.0×10^5	9.85	9.25 ~ 10.69	$y = -5.29 + 5.32x$
1.0×10^4	15.45	12.95 ~ 21.28	$Y = -4.29 + 3.61x$

2.3 BusuNPV 基因组的PCR扩增和引物特异性

以BusuNPV基因组DNA为模板,并以美国白蛾病毒(HycuNPV)、茶尺蠖病毒(EoSNPV)、春尺蠖病毒(AciNPV)、舞毒蛾病毒(LdMNPV)的基因组DNA为模板进行PCR扩增为对照,检测引物BPF的扩增专一性。由图3可见:只有以BusuNPV基因组DNA为模板对引物BPF的扩增得到了与目的片段大小相符的扩增产物,测序结果与预期结果相似度为98.27%,几乎一致。

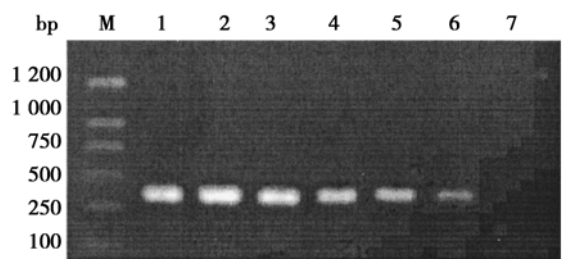


M:Marker;1:BusuNPV;2:HycuNPV;3:EoSNPV;4:AciNPV;5:LdMNPV;6:ddH₂O

图3 不同病毒基因组DNA的PCR扩增结果

2.4 PCR检测BusuNPV基因组DNA的敏感性

将纯化的BusuNPV基因组的DNA浓度调整为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,进一步稀释为 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$,扩增结果(图4)表明:当模板DNA浓度为 $1 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,仍可见到清晰条带,表明检测水平可达到DNA浓度 $1 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$,灵敏度较高。

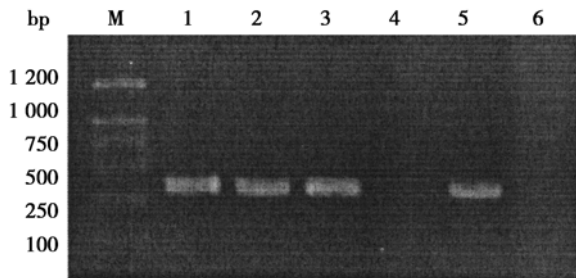


M:Marker;1~6:基因组DNA浓度分别为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$;7:H₂O

图4 PCR检测BusuNPV基因组DNA敏感性

2.5 油桐尺蠖核型多角体病毒 PCR 检测技术的应用

分别以带毒的油桐尺蠖幼虫、卵、蛹的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后结果(图 5)表明:在 250 ~ 500 bp 之间有一清晰、特异条带,健康虫和双蒸水对照的总 DNA 均没有扩增出任何条带,这说明该方法是合理可行的,可以应用到 BusuNPV 的实际检测中。

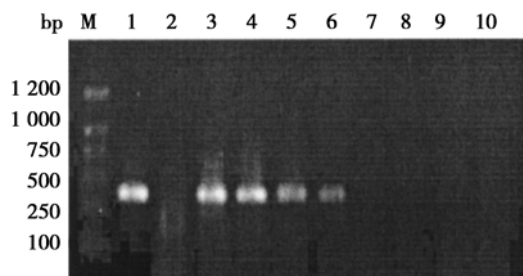


M: Marker; 1: 幼虫; 2: 卵; 3: 蛹; 4: 阴性对照; 5: 阳性对照; 6: ddH₂O

图5 带毒油桐尺蠖幼虫、卵、蛹的 PCR 扩增结果

2.6 PCR 检测技术模板的多样性

将提取后纯化的 BusuNPV 多角体悬液进行计数,得到原液,将浓度调整为 1.0×10^9 PIB · mL⁻¹, 等比稀释为 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 PIB · mL⁻¹, 分别作为模板进行 PCR 扩增,模板加入量为 1 μL,退火温度 48 ℃。扩增结果(图 6)表明:当多角体悬液浓度为 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 PIB · mL⁻¹时,可检测到 BusuNPV。这说明多角体悬液中含有裸露的 DNA,当多角体悬液达到一定浓度时,可以直接用做模板检测 BusuNPV;但当多角体悬液达到 1.0×10^8 PIB · mL⁻¹时,却检测不到 BusuNPV 的存在。一方面可能是受 PCR 实验条件



M: DNAmarker; 1: 阳性对照; 2 ~ 9: 病毒多角体的浓度分别为 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 PIB · mL⁻¹; 10: ddH₂O

图6 以不同浓度的多角体悬液为模板进行的 PCR 检测

的限制,引物和模板必须按照一定比例加入;另一方面大量的多角体存在也可能会影响 NDA 的配对及扩增,还有待于进一步研究。

3 讨论

油桐尺蠖在南方各省危害严重,采用生物防治的方法不仅可以保护环境,而且可以减少防治害虫的成本。BusuNPV 对油桐尺蠖各龄幼虫均有防治效果,特别对 2 龄幼虫防治效果最佳。单独使用病毒防治害虫,见效较慢,但持续作用好。可尝试使用微生物制剂,如 Bt、植物源农药等与 BusuNPV 混配,以降低油桐尺蠖危害造成的经济损失。

多角体囊膜蛋白是病毒的结构蛋白,在连续传代中极少发生缺失。有研究表明,在弱碱环境中,多角体囊膜蛋白缺失的多角体昆虫病毒感染性比野生型多角体高^[20-21],原因可能是缺少了囊膜的多角体在碱性环境中更容易释放病毒粒子。这说明多角体囊膜的作用是保护多角体抵御外界环境^[22]。因此,本文选择多角体囊膜蛋白基因为目的片段,进行 PCR 研究,结果与预期一致,多种 NPV 病毒做对照时,只有 BusuNPV 的基因组能扩增出目的条带。PCR 产物测序结果与已知的 BusuNPV 的囊膜蛋白基因有很小的差异,这可能是由于病毒在野外不良环境下,碱基对发生少量替换或缺失等,但 98.27% 的相似度足以说明扩增出的条带是囊膜蛋白基因。

应用多角体悬液直接作为模板进行 PCR 检测,可以检测到 BusuNPV 的存在。这不仅简化了实验步骤,而且可以证明在病毒多角体悬液里存在裸露的 DNA。电泳图片的拖带现象是由于多角体悬液含有大量非 DNA 物质,但不影响检测结果。

大多数检测 NPV 的手段是通过光学显微镜观察,该方法准确性较差。也有学者用间接酶联免疫吸附分析法(ELISA)在蛋白水平对病毒进行检测,该方法花费的时间相对较长^[23]。本文建立的 BusuNPV 的 PCR 检测技术,不仅能短时间内成功的从卵和蛹内检测到 BusuNPV,而且其灵敏度可达到 $1 \text{ fg} \cdot \text{mL}^{-1}$ DNA。由于该方法操作简单、用时短、灵敏度高、特异性好、重复性好,可用来研究病毒在虫体内的增殖规律及检测林间油桐尺蠖的带毒情况,进而为病毒流行病学的深入研究提供技术支持。

参考文献:

- [1] 梁布锋,刘明富,梁军. 油桐尺蠖核型多角体病毒(羊楼洞株)基因组特性[J]. 微生物学杂志,1997,17(1):6-9

- [2] 齐义鹏,叶林柏,尹宜农,等.油桐尺蠖核型多角体病毒毒力的生物测定[J].武汉大学学报:自然科学版,1993,15(2):121-125
- [3] 韩明波.10000000PIB/毫升油桐尺蠖核多角体病毒.4 000IU/微升苏水悬浮剂防治茶叶油桐尺蠖药效试验[J].现代农业科技,2005(1):23
- [4] 油桐尺蠖核型多角体病毒杀虫剂的研制及应用[C].武汉:中国科学院武汉病毒研究所,1985
- [5] 刘明富,胡志红,金峰,等.油桐尺蠖核多角体病毒多蛋白基因定位与克隆[J].中国病毒学,1992,7(1):80-84
- [6] 陈海雷,刘年翠.油桐尺蠖核型多角体病毒及其基因组某些理化性质研究[J].武汉大学学报:自然科学版,1989,11(3):91-96
- [7] Hu Z H, Arif B M, Sun J S. Genetic organization of the HindIII-I region of the single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Buzura suppressaria* [J]. Virus Research, 1998, 55:71-82
- [8] Hu Z H, Broer R, Westerlaken J. Characterization of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene of a single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus of *Buzura suppressaria* [J]. Virus Research, 1997, 47:91-97
- [9] 龚岷,刘赣东,梁布锋.油桐尺蠖核型多角体病毒 DNA 聚合酶基因的克隆和序列分析[J].中国病毒学,2000,15(1):59-65
- [10] 刘明富,谢天恩.油桐尺蠖核型多角体病毒多角体蛋白双向电泳分析[J].生物化学杂志,1991,7(5):635-637
- [11] 陈华,陈东,龚为民.油桐尺蠖核型多角体病毒多角体蛋白的理化性质及二级结构预测[J].生物化学杂志,1997,13(3):308-311
- [12] 谢天恩,王录明.油桐尺蠖血球细胞系的建立及其病毒感染试验[C]//油桐尺蠖核型多角体病毒杀虫剂的研制及应用成果鉴定.武汉:中国科学院武汉病毒研究所,1985:45-50
- [13] 胡志红,谢天恩.油桐尺蠖核型多角体病毒的空斑测定[J].中国病毒学,1991,6(4):340-343
- [14] 徐旭士.油桐尺蠖核型多角体病毒感染 Bs484 细胞的病变研究[J].江西大学学报,1992,6(3):243-246
- [15] 徐旭士,谢天恩.油桐尺蠖核型多角体病毒感染 Bs484 细胞的感染特性研究[J].中国病毒学,1992,7(3):289-295
- [16] 徐旭士,张超英,谢天恩.油桐尺蠖核型多角体病毒感染 Bs484 细胞的研究[J].中国病毒学,1995,10(1):61-66
- [17] 陈义光,谢天恩.细胞培养法增殖油桐尺蠖 NPV 工艺条件[J].吉首大学学报,1999,20(2):49-52
- [18] 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
- [19] 祁学忠,孟小林,朱应,等. PCR 法证实 AeNPV 对小菜蛾的经卵传播[C]//中国有害生物综合论文集.北京:中国农业出版社,1996:1098-1101
- [20] Zuidema D, Klinge-Roode E C, van Lent J W M. Construction and analysis of an *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutant lacking the polyhedral envelope [J]. Virology, 1989, 70:187-202
- [21] Ignoffo C M, Carcia C, Zuidema D. Relative *in vivo* activity and simulated sunlight-UV stability of inclusion bodies of a wild-type and an engineered polyhedral envelope negative isolate of the nucleopolyhedrosis virus of *Autographa californica* [J]. J Invertebr Pathol, 1995, 66:212-213
- [22] 董春升,邓菲,袁丽.缺失 p10 基因的重组棉铃虫病毒导致多角体囊膜包装不完整[J].中国病毒学,2006,21(6):594-598
- [23] 乔鲁芹.美国白蛾核型多角体病毒及其感病寄主检测方法的研究[D].北京:中国林业科学研究院,2007