

斜纹夜蛾 (*Prodenia litura*) 幼虫 核多角体病毒核酸 (DNA) 的分离和电镜观察

杨承熾
(昆虫学研究所)

Bergold(1963)⁽¹⁾综合地报导了昆虫核型多角体病毒的性质;对家蚕核型多角体病毒核酸也陆续进行了研究^(2,3);我国沈思祥等对家蚕核多角体病毒核酸(DNA)进行了研究,并报导其分子量为 1.6×10^7 ⁽⁴⁾。

我们对农作物的主要害虫斜纹夜蛾的核型多角体病毒核酸进行分离和电子显微镜观察。

材 料 和 方 法

病毒多角体的收集 将斜纹夜蛾多角体病毒,涂布于蓖麻叶,饲喂由实验室饲养的四龄斜纹夜蛾幼虫,七天后收集五龄病死虫尸,存于4°C冰箱中备用。

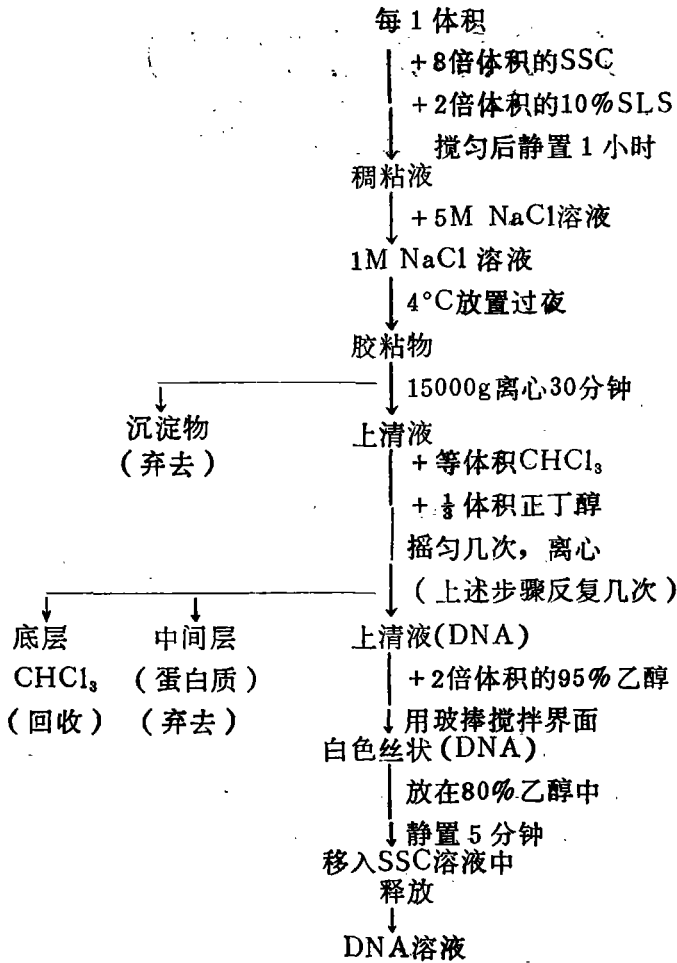
病毒多角体的分离 将上述收集的死虫加少量蒸馏水,用玻棒捣碎,尼龙纱布隔渣过滤,滤液在6000Rpm离心30分钟,收集沉淀。沉淀物悬浮于密度为1.3的蔗糖溶液中,1800g离心45分钟,收集悬浮物,再悬浮于密度1.2的蔗糖溶液中,同样离心,收集沉淀,然后用蒸馏水多次洗涤提纯,收集白色多角体。

病毒粒子的分离 用 Onodera(1965)⁽³⁾方法从多角体分离病毒粒子,即1克纯化的多角体悬浮在200ml的0.006M Na_2CO_3 -0.05M NaCl 溶液中,混合物在室温下轻轻摇动1小时,以4500g速度,在0°C下离心15分钟,除去少量不溶物。上清液以40000g速度离心30分钟,收集沉淀,再用0.0006M Na_2CO_3 -0.05M NaCl 溶液洗涤二次,最后用蒸馏水洗涤一次,得纯化的病毒粒子。

病毒 DNA 的分离 按照 Randall等⁽⁵⁾的方法分离病毒 DNA,其程序简列如下表。

电镜观察的核酸试样制备 按照 Egel-Mitani Michiko⁽⁶⁾的微量扩散法,稍做改进,即在一块干净的照像底片(12cm×8cm)上,滴注含有 2×10^{-4} 微克 DNA的0.15M醋酸铵溶液35微升,然后迅速加入4微升 $2 \times 10^3\%$ 的细胞色素C和1微升8%的甲醛溶液(混合液共40微升),盖上培养皿,10分钟后,用带有碳载膜的电子显

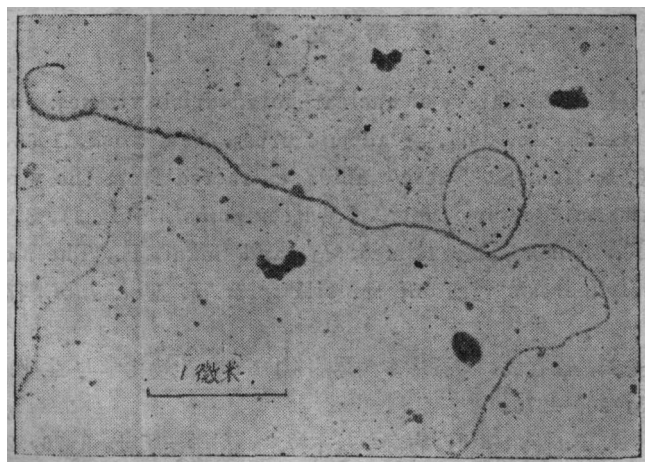
纯化的病毒粒子



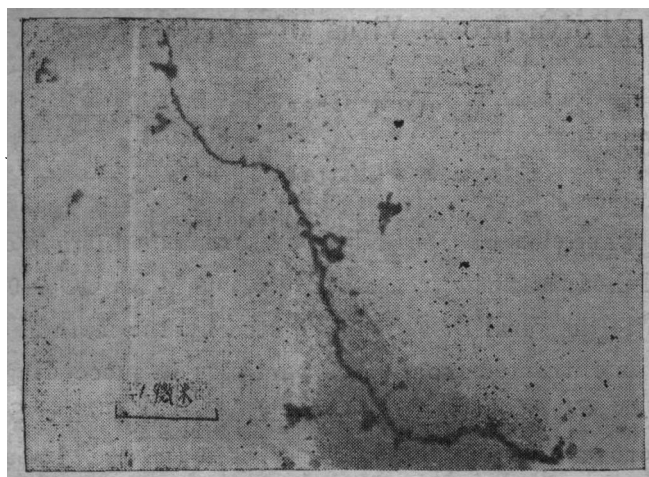
微镜栅网与液面接触5秒钟,用无水酒精洗去水分,再将栅网置于用无水酒精配制的 $1 \times 10^{-5}M$ 醋酸氧铀溶液中染色30秒钟,取出后,先后用95%和100%乙醇脱水。如此制得的栅网直接置于电子显微镜下观察,或经过真空铂(Pt)投影后观察并拍照。

实验结果

病毒核酸DNA的形状和分子量。核酸分子用醋酸氧铀染色后,直接在电子显微镜下观察,其结果示于图一。染色后,经过真空铂(Pt)投影,电镜下观察,结果示于图二。



图一 斜纹夜蛾核型多角体核酸(DNA)分子的电镜照片。
微量扩散法, 醋酸氧铀酰染色。



图二 核酸DNA分子的电镜照片。醋酸氧铀酰染色后, 铂(Pt)投影。

用这个方法从电镜下观察得到的斜纹夜蛾核多角体(NPV)病毒核酸(DNA)分子, 长度为 8.3μ , 并推算出其分子量是 16.6×10^6 道尔顿。

[注]: SSC: 0.15M NaCl, 0.02M柠檬酸三钠, 0.0005M EDTA, pH7.0;
10% SLS: 45%乙醇中含10%的十二烷基硫酸钠。

參 考 文 獻

- [1] Bergold, G. H., The nature of nuclear-polyhedrosis viruses. *Insect pathology* 1, (E. A. steinhaus, de.), Academic press, New York, 1963, 413—456.
- [2] Aizawa, K. & Iida, S., Nucleic acids extracted from the virus polyhedra of the silkworm, *Bombyx mori.*, *J. Insect pathol.*, 5(1963), 3, 341—348.
- [3] Onoswea, K., Komno, T., Himeo, M. and Sakai, F., The nucleic acid of nuclear-polyhedrosis virus of the silkworm. *J. Mol. Biol.*, 13, (1965), 532—539.
- [4] 沈思祥、李士云、徐有成, 家蚕核多角体病毒DNA, 生物化学与生物物理学报, 9 (1977), 3, 269—276.
- [5] K. 哈伯尔、N. P. 萨尔兹曼, 病毒学基本技术, 科学出版社, 1976, 255—256.
- [6] エーゲル・ミタニ充子, 電子顕微鏡観察のための核酸微量試様のとり扱い方, 蛋白質・核酸・酵素, 19(1974), 5, 388—350,

A Preliminary Study of the DNA of the Nuclear
Polyhedrosis Virus of *Prodenia litura*

Yang Chengchi

Abstract

The virus particles of the NPV of *Prodenia litura* were isolated from the polyhedra by the treatment of 0.006 M Na_2CO_3 —0.05 M NaCl solution, while the viral DNA was isolated by the method of Randall. The DNA was extracted from virus particles in succeeding steps with SSC+SLS, NaCl, $\text{CHCl}_3+n-\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ and SSC. Under electron microscope the DNA appears as a twisted linear molecule with the length about 8.3 microns and its MW is 16.6×10^6 .