

中蜂囊状幼虫病病毒核酸和多肽的研究

杨荣鉴 董秉义* 范瑞莲**
郭振泉* 李小杰*** 洪涛**

(江西省医学科学研究所, 南昌)

提 要

中蜂囊状幼虫病病毒(CSBV)核酸经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和琼脂糖凝胶电泳(AGE)分析,表明为单链RNA,易于降解;CSBV结构多肽经SDS-PAGE分析,有3个多肽,其分子量分别为27,000、29,000、39,000道尔顿。此病毒RNA和多肽与意蜂囊状幼虫病病毒(SBV)有差异。

1975年杨冠煌等首先从江西省患中蜂囊状幼虫病(简称中囊病)的中蜂(*Apis cerana*)幼虫病变组织中,发现有一种直径为28—30nm的病毒粒子^[1]。尔后,董秉义等对该病毒进一步研究表明,该病毒形态、大小及在宿主组织的复制部位与意蜂(*Apis mellifera*)所患意蜂囊状幼虫病病毒(*Sacbrood virus*, SBV)的特性基本相似,其病毒引起幼虫发病的症状也很相象,但二种病毒又有不同之处:1.中囊病的病毒只感染中蜂幼虫而不感染意蜂幼虫,2.血清学反应,二种病毒具有不同的抗原性^[2]。董秉义等称该病毒为中蜂囊状幼虫病病毒(*Chinese Sacbrood Virus*, CSBV)^[2]。1982年Bailey等从泰国患囊状病的东方蜜蜂幼虫病变组织中分离到一种病毒,其形态与SBV基本相同,但经生物学和血清学实验,二者有差别,故被定名为*Thai Sacbrood Virus* (TSBV)^[3]。我国中蜂与泰国东方蜜蜂是同属一种。为了深入研究CSBV的性质,我们对该病毒进行了核酸和多肽的研究。

材 料 与 方 法

一、病毒来源

1. CSBV 1985年4月采自江西省南昌县向扩种蜂场的中蜂发病群。
2. SBV 1985年6月采自中国农业科学院养蜂研究所蜂场的人工感染意蜂病蜂群。

本稿于1986年7月14日收到。

* 中国农业科学院养蜂研究所

** 中国预防医学科学院病毒学研究所

*** 中国科学院生物物理研究所

注: 陈涛、郝刚同志参加部份工作。

二、蔗糖密度梯度超速离心提纯病毒

参照 Bailey L. 等^[4] 方法分别提纯CSBV和SBV病毒颗粒。

三、电镜观察

经上述方法提纯的 CSBV 与 SBV 颗粒分别滴在铜网上, 用 2% 磷钨酸(pH6.5) 负染。在JEM-100B电镜下观察。

四、病毒核酸的提取

参照Maniatis T等^[6] 方法, 分别提取CSBV和SBV核酸。按文献^[6] 测定核酸。

五、病毒核酸酶解

上述提取的CSBV核酸(0.5微克/微升) 4 微升, 加入牛胰核糖核酸酶(10毫克/毫升) 8 微升, 37℃水浴 1 小时。

六、病毒核酸PAGE

参照杨荣鉴等^[8] 方法。采用 7% 分离胶。

七、病毒核酸AGE

参照Maniatis等^[9] 的方法。采用0.7%琼脂糖凝胶。

八、病毒多肽SDS-PAGE及其分子量测定

参照Pharmacia Fine Chemicals^[10, 11] 方法。采用10%分离胶。

结 果

一、电镜观察

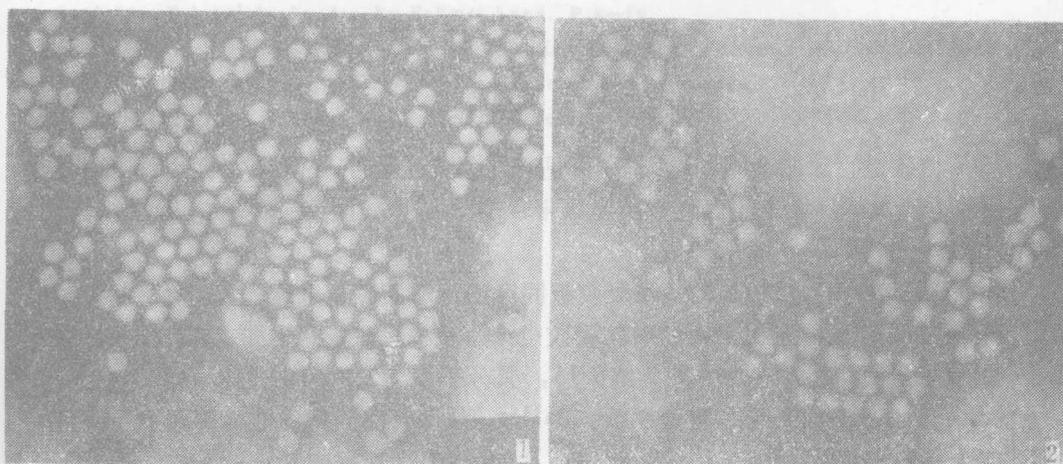


图1 CSBV颗粒电镜照片(负染, 100,000×)

Fig.1 Electron micrograph of CSBV particles (Negative Staining, 100,000×)

图2 SBV颗粒电镜照片(负染, 93,000×)

Fig.2 Electron micrograph of SBV particles (Negative Staining, 93,000×)

纯化后的CSBV, 电镜下呈现许多直径为30nm大小的球形病毒颗粒; 未见任何细胞碎片等杂质。见图1。纯化的SBV, 亦是30nm大小的球形病毒颗粒, 亦未见任何杂质。见图2。

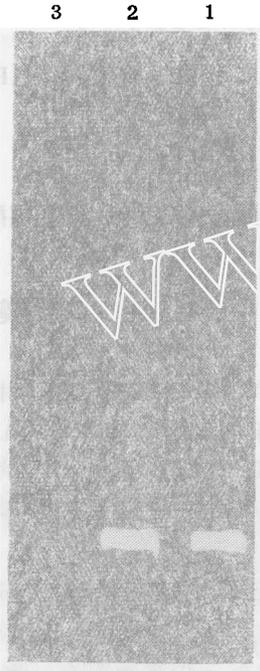


图3 琼脂糖凝胶电泳
Fig3 Agarose electrophoresis
1. SBV-RNA; 2. CSBV-RNA; 3. CSBV-RNA + RNase

二、核酸AGE

CSBV核酸、经RNA酶酶解的CSBV核酸和SBV核酸在同一块凝胶板同时进行电泳, 结果在2537 Å 波长紫外光照射下, CSBV和SBV各呈现一条红色荧光区带, 二者迁移率一致, 而经RNA酶酶解的CSBV核酸, 则未见红色荧光区带, 见图3。当电泳进行至2小时, CSBV核酸区带基本消失, 而SBV未见变化。

三、核酸PAGE

CSBV核酸和SBV核酸在同一凝胶板同时进行电泳, 结果二者各呈现一条区带, 二者迁移率一致。

四、多肽SDS-PAGE

CSBV、SBV分别经裂解后, 在同一块凝胶板同时进行电泳, 结果二者各呈现三条多肽区带。经分子量测定: CSBV三个多肽分别为27,000、29,000、39,000道尔顿; SBV三个多肽分别为24,000、28,000、36,000道尔顿。

讨 论

CSBV核酸进行琼脂糖凝胶电泳, 可见一红色荧光区带; 而经牛胰RNA酶作用的CSBV核酸进行电泳, 则未见有红色荧光区带, 这表明该核酸为一种单链RNA, 因为只有单链RNA才能被RNA酶所降解。

CSBV核酸和SBV核酸在同一块凝胶板同时进行琼脂糖凝胶电泳均各呈现一条区带, 二者迁移率一致; 同时进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 也各呈现一条区带, 二者迁移率一致。Bailey等研究证实SBV为一种单链RNA, 其分子量为 2.8×10^6 道尔顿^[12], 故CSBV RNA的分子量亦可能为 2.8×10^6 道尔顿。Bailey等研究证实TSBV亦为单链RNA, 分子量亦为 2.8×10^6 道尔顿^[12]。

CSBV RNA琼脂糖凝胶电泳当电泳到一定时间后, RNA区带消失, 而此时SBV RNA仍现一条区带, 这说明此二种病毒的RNA性质不同, CSBV性质甚不稳定。是何机理? 有待进一步研究。

Bailey等对SBV多肽研究结果, SBV有3个多肽, 其分子量分别为26,000、28,000、31,000道尔顿^[12]。本实验结果SBV亦为三个多肽, 其分子量亦接近, 分别为24,000、28,000、36,000道尔顿。

TSBV 3个多肽分子量分别为30,000、34,000、39,000道尔顿^[12], 比SBV 3个多肽分别略大些。本实验结果, CSBV 3个多肽分子量分别为27,000、29,000、39,000道尔顿亦分别比SBV多肽略大些, 这提示CSBV亲缘关系与TSBV更为接近。

董秉义等对CSBV的研究, 发现CSBV与SBV不发生交叉感染, 而且具有不同的抗原性^[2]。本实验结果亦表明, 二者在RNA和多肽方面也不相同。

参 考 文 献

- [1] 杨冠焯等, 1979, 中国养蜂, (5): 17.
- [2] 董秉义等, 1984, 中国养蜂, (3): 8.
- [3] Bailey L. et al., 1982, *J. Invertebrate Pathology*, 39: 264.
- [4] Bailey L. et al., 1977, *J. Gen Virol.* 37: 175.
- [5] Maniatis T. et al., 1982, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Printed in the USA, P. 456.
- [6] Maniatis T. et al., *Ibid.*, P. 468.
- [7] Maniatis T. et al., *Ibid.*, P. 141.
- [8] 杨荣盛等, 1986, 微生物学通报, 13(2): 92.
- [9] Maniatis T. et al., 1982, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Printed in the USA, P. 199.
- [10] Pharmacia Fine Chemicals., 1980, *Polyacrylamide Gel Electrophoresis-Laboratory Techniques*, Printed in Sweden by Rahmsi Lund, P. 8-19.
- [11] Pharmacia Fine Chemicals., 1978, *Calibration Kits for Molecular Weight Determination Using Electrophoresis*, Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden.
- [12] Bailey L., 1981, *Honey Bee Pathology*, Academic Press, P. 10.

Investigation of Nucleic Acids and Polypeptides of Chinese Sacbrood Virus

Yang Rong-jian Dong Bing-yi' Fan Rui-lian"
Gou Zhen-guan' Li Xiao-jie''' Hung Tao"

(Jianxi Institute of Medical Sciences, Nanchang)

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and agarose gel electrophoresis (AGE) were used to analyze the Chinese Sacbrood Virus (CSBV). The experiment revealed the RNA of CSBV is a single-stranded species which is easily degraded, and the virus protein consists of three polypeptides with molecular weight of 27,000, 29,000 and 39,000 daltons respectively. The RNA and three polypeptides of the CSBV were different from those of the sacbrood virus from *Apis mellifera* (SBV).

' Institute of Apiculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences.

" Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine.

'''Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences.