

维普资讯
3117

BsNPV 感染油桐尺蠖及 Bs484 细胞的酯酶分析

徐旭士

(江西大学生物学系, 南昌 330047)

张超英

(江西大学中心实验室, 南昌 330047)

谢天恩

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

S763853

50476.13

A 提要 本文使用聚丙烯酰胺凝胶电泳及薄层扫描技术测定了油桐尺蠖 *Buzara suppressaria* 和 Bs484 细胞感染核型多角体病毒后的酯酶(EST)含量及类型的变化。结果表明,油桐尺蠖中肠 EST 的含量和类型在病毒感染 8 小时后就有明显的改变,随着感染时间延长,这二项指标都有较大的变化。而 Bs484 细胞的 EST 含量变化开始于病毒感染后 3 小时,细胞 EST 的类型则无改变。

关键词 BsNPV, 感染, 酯酶, 油桐尺蠖, 核多角体病毒;

中肠是核型多角体病毒感染昆虫后的靶器官之一,其蛋白酶类的变化是昆虫新陈代谢正常与否的一个指标^[1],通过对感病昆虫中肠酯酶同功酶(以下称酯酶)的研究可以了解病毒在寄主组织内复制时酯酶的变化。同样,当病毒感染昆虫体外细胞培养后,宿主细胞的酯酶也会受到影响,借助酯酶类型和含量的分析就可知道病毒感染细胞后的早期变化,这种间接的证明比病毒早期 mRNA 的检测来得更为简便,因而值得研究。本文就以上二个问题对油桐尺蠖核型多角体病毒(BsNPV)感染油桐尺蠖及油桐尺蠖成虫卵巢细胞系后的酯酶变化作了一些初步研究,现将结果报道如下。

材料和方法

1 病毒

1.1 感染昆虫的毒源:BsNPV 感染致死的虫尸加水研磨,然后用双层纱布过滤,滤液经差速离心(400/3000 r/m)得到初步纯化的多角体,用 0.01mol/L pH7.0 PBS 悬浮后进行 30—60%(W/W)蔗糖梯度离心(4000 r/m, 30 分钟),收集灰白色多角体,洗涤后用 0.01mol/L PBS 悬浮,4℃冰箱保存备用。

1.2 感染细胞培养的毒源:将多角体添食感染四龄的健康油桐尺蠖幼虫,4 天后收集病虫血淋巴,3000r/m 离心 20 分钟,上清用 0.45μm 的微孔滤膜过滤除菌,滤液即为感染毒源。

2 病毒感染的受试系统

2.1 受试昆虫:实验室人工培养的健康油桐尺蠖四龄幼虫。感染方式为添食感染,多角体的感染剂量为 2.5

* 本文于 1993 年 3 月 22 日收到,5 月 31 日修回

$\times 10^7$ PIBs/ml。

2.2 受试细胞：油桐尺蠖成虫卵巢细胞系(Bs484)^[2]，细胞培养基为 Grace^[3]。

3 酯酶电泳样品的制备

3.1 解剖油桐尺蠖取出中肠组织，经洗涤后称重，于冰浴中组织匀浆，匀浆液 4℃ 3000r/m 离心 30 分钟，上清于 -40℃ 保存备用。

3.2 离心收集 Bs484 细胞，0.1mol/L PBS 洗涤细胞后重悬，于冰浴中用 JC-3 超声波振荡器破碎细胞，4℃ 8000r/m 离心 20 分钟，上清贮存于 -40℃ 冰箱。

4 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)

4.1 电泳：采用垂直平板电泳，浓缩胶为 2.5%，分离胶为 7.5%，电极缓冲液为 Tris-甘氨酸系统，pH8.3，4℃ 电泳，电泳起始电流 1mA/cm，样品进入分离胶后改为 2mA/cm，样品的加样量均为 25 微升。

4.2 染色及固定：酯酶的染色方法按吴鹤龄所述^[4]进行，染毕后用 7% 醋酸固定。

5 凝胶扫描

经染色和固定的电泳凝胶置于 CS-9000 双波长薄层扫描仪上进行线性扫描，参考波长 450nm，样品波长为 540nm。

结 果

1 BsNPV 感染油桐尺蠖中肠组织的酯酶电泳的变化

取健康的四龄幼虫若干条，分成感染组和对照组，感染组昆虫在病毒感染 8、12、24、48、小时后分别取样，样品编号依次为 I₁、I₂、I₃、I₄，相应时间的对照样品编号分别是 C₁、C₂、C₃ 和 C₄，其凝胶电泳结果见图 1。电泳图谱表明，对照组样品共有 6 条酯酶带，基本分为三区：快带区(EST-4, EST-5, EST-6)，中间区(EST-3)，慢带区(EST-1, EST-2)。在感染组中，快带区的 EST-5 在感染早期(8hpi)消失，随后一直未出现。慢带区的 EST-1 和 EST-2 在感染 24 小时后开始消失，说明 EST-1, EST-2 和 EST-5 对 NPV 的感染比较敏感，因而可作为病毒感染中肠后的主要病理生化指标。

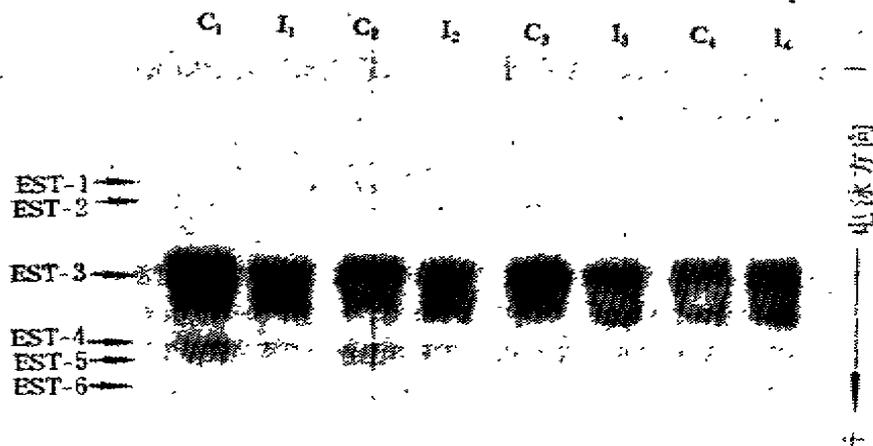


图 1 油桐尺蠖中肠酯酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 1 The results of PAGE for esterases in *Buzura suppressaria* mid-gut

2 中肠酯酶电泳凝胶的薄层扫描

酯酶电泳完毕后,经染色和固定,将凝胶置于 CS-9000 双波长薄层扫描仪上进行线性扫描,其结果以各条酶带吸收峰面积的形式输出,根据下式将酶带的扫描面积换算为酶的相对含量,各条酶带相对含量的结果列于表 1。

$$\text{酶相对含量} = \frac{\text{曲线面积}}{\text{上样量} - \text{上样量中所含载样液量}} \quad \text{单位: 酶相对含量(无量纲)/微升样品上清液}^{[5]}$$

表 1 中肠酯酶的相对含量

Tab. 1 The relative content of esterases in mid-gut

酶带 Zymogram	感染系列 Infective series				对照系列 Control series			
	I_1	I_2	I_3	I_4	C_1	C_2	C_3	C_4
	EST-1	45.6	46	0	0	45.5	47.55	54.25
EST-2	46.55	45.3	0	0	56.7	54.25	94.7	81.55
EST-3	4285.75	3179.4	2730.95	2458.85	4985.8	5006.25	4432.2	4451.05
EST-4	89.4	100.95	46.4	46.95	102.8	99.7	54.25	77.05
EST-5	0	0	0	0	92.8	82.5	50.65	49.8
EST-6	36.4	36.75	54.6	55.15	35.05	34.7	35.75	36.35

表 1 结果说明中肠酯酶在健康油桐尺蠖的生长过程中会有含量的动态变化,如果仅考虑感染系列酯酶含量的变化而不与对照系列的相应含量对比,则不能如实反映中肠酯酶在病毒感染后的变化趋势。本文将 I/C 作为判定中肠酯酶在病毒感染后变化的标准,借此了解 NPV 感染对中肠酯酶含量的影响。I/C 是指不同感染时间的感染系列的各个酶带含量与对照系列相应酶带含量的比值,表 2 给出了这组数据。

表 2 数据反映 BsNPV 感染中肠后,酯酶相对含量的变化有三种类型:1. 酶含量全部丧失:包括 EST-1, EST-2, EST-5, 其中 EST-5 在感染早期就全部丧失其含量,而 EST-1 和 EST-2 则要稍后一些。2. 酶含量部分丧失:包括 EST-3, EST-4, 随着感染时间的延长,这二类酶的含量逐渐递减。3. 酶含量上升:仅有 EST-6 至病毒感染 48 小时,其含量比对照组增加了 0.5 倍。

3 BsNPV 感染 Bs484 细胞的酯酶电泳变化

将用病虫血淋巴液开始病毒液感染传代三天并已贴壁的第 51 代 Sf21 细胞,感染复数 MOI=20。

病毒于 26℃ 静置吸附细胞 1 小时,此时计为 hpi=0 (hpi: hours postinfection),然后将所有感染细胞混合后再分装成若干瓶。于 hpi=3, 6, 12, 24 分别取样,样品编号为 S₁, S₂, S₃, S₄, 相应时间的健康细胞样品编号是 N₁, N₂, N₃, N₄, 取样时,感染组每个样品的细胞总数与相应的健康对照组细胞总数基本相同。细胞酯酶的电泳结果见图 2。电泳图谱显示,除了 N₃ 与 S₃ 二个样品外,其它样品均具有 5 条酯酶带,基本上也可分为快中慢三个区。N₃ 和 S₃ 与其它样品相比缺少

表 2 感染系列中肠酯酶的 I/C 值

Tab. 2 The I/C rate of esterases in mid-gut from infective series

酶带 Zymogram	中肠酯酶含量的相对比值 Relative rate of content for esterases in mid-gut			
	I_1/C_1	I_2/C_2	I_3/C_3	I_4/C_4
	EST-1	1.0	0.97	0
EST-2	0.82	0.83	0	0
EST-3	0.86	0.63	0.61	0.55
EST-4	0.87	1.0	0.86	0.61
EST-5	0	0	0	0
EST-6	1.03	1.06	1.53	1.52

慢带区的 EST-1 和 EST-2。感染组的酶带种类及泳动速率与相应的对照组的电泳谱带相同。与中肠酯酶电泳不同的是, Bs484 细胞在受到 BsNPV 感染后, 与对照组相比没有酶带消失。同时电泳结果也说明, 病毒感染后的细胞酯酶没有出现新带, 这与中肠酯酶的结果相同。

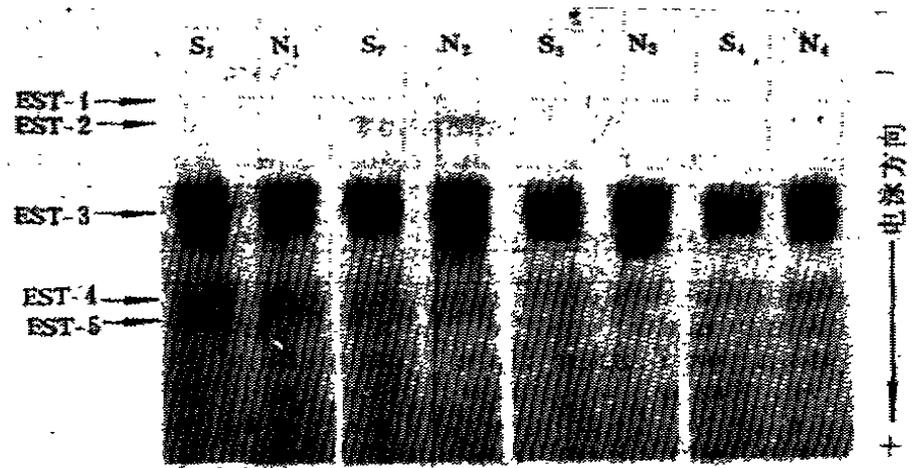


图2 Bs484 细胞酯酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 2 The results of PAGE for esterases in Bs484 cells

4 Bs484 细胞酯酶电泳凝胶的薄层扫描

电泳完毕后的凝胶按中肠酯酶相同的方法处理, 然后进行线性扫描, 扫描结果仍以酶带吸收峰面积的形式输出, 并按前述进行酶相对含量的换算, 其结果列于表 3。

表3 Bs484 细胞酯酶的相对含量

Tab. 3 The relative content of esterases from Bs484 cells

酶带 Zymogram	感染系列 Infective series				对照系列 Control series			
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄
	EST-1	15.75	47.8	0	16.8	16.05	58.8	0
EST-2	21.45	51.95	0	40.85	21.85	71.95	0	59.25
EST-3	2258.95	2024.05	2076.25	1599.3	2847.7	3135.55	3766.7	3017.6
EST-4	83.215	63.15	64.2	71.6	82.55	77.35	79.9	86.25
EST-5	78.7	60.45	49.7	41.95	77.95	74.8	59.25	51.1

根据表 3 就可算出感染系列酯酶含量的相对比值(S/N)。见表 4。

结果表明, EST-3 在病毒感染 3 小时后损失含量的 21%, 而 EST-1, EST-2, EST-4 和 EST-5 的含量在这个感染时间内基本上没有变化。随着感染时间的延长, 以上各类酶的含量都有所下降, 但彼此幅度不一样, 到感染后 24 小时, EST-3 含量损失约 1/2, 其次是 EST-1 和 EST-2, 损失约 1/3, 而 EST-4 和 EST-5 从 6hpi 到 24hpi 其相对含量没有变化。看来 BsNPV 的感染对细胞 EST-3 的抑制作用要明显一些, 这种受到抑制后的含量变化趋势与中肠 EST-3 相似。

讨 论

酯酶是一种相当复杂的酶类,有单体、二聚体和三聚体。目前对其基因编码还未研究清楚。在动植物和微生物细胞内有其广泛的分布,并具有组织器官及发育阶段的特异性^[6]。在本实验中,发现中肠酯酶比 Bs484 细胞的酯酶在快带区多出了一条酶带 (EST-6),说明昆虫酯酶也同样存在组织特异性。从代谢的角度来说,酯酶与细胞的酯类代谢有关,其存在与否和活力高低可以反映出细胞的生活状态。

正是基于这一点,我们将酯酶作为病毒感染组织和细胞的病理生化测定指标。

杆状病毒感染细胞的早期生化变化多集中于病毒 RNA 多聚酶、病毒早期 mRNA 以及病毒基因组的合成等方面的研究^[7,8],而病毒感染对细胞代谢影响的报道则不多见。实际上,当杆状病毒进入宿主细胞后很快就能进行早期转录,其表达产物可达 12 个主要转录物和 30 多个次要转录物,这些转录物一方面为病毒核酸的复制提供必要的准备,另一方面又可抑制宿主细胞的部分功能,其中包括细胞的各种代谢及其活力^[9]。这样,借助细胞某种蛋白酶类的检测就可了解感染早期病毒-宿主细胞相互作用的特点。本文结果表明,BsNPV 不论是感染中肠还是感染体外培养细胞,其酯酶均有比较明显的变化,可见,感染组织和细胞的酯酶研究可以反映病毒感染的早期情况。

NPV 感染昆虫的病理生化分析,过去往往是测定感病昆虫血淋巴各种蛋白质的变化^[10,11],要在病毒感染 24 小时后才能被检测到^[12]。事实上,当 NPV 进入昆虫体内后,多角体在中肠被蛋白酶降解,从而使释放出来的病毒粒子侵入中肠细胞,经过增殖进入血腔,然后入侵其它的感受性组织,因此选择中肠进行病理生化检测比病虫血淋巴更具有理论意义,因为这可以提供比血淋巴更早的病毒感染引起的变化情况。本研究的中肠酯酶在病毒感染后都发生了变化:EST-1 变化是处于全或无状态,在 8hpi 和 12hpi,其含量基本没有损失,在 24hpi 之后,酶含量全部丧失。EST-2 变化与此类似。值得一提的是 EST-6 的变化,与其它酶带不同,在病毒感染 48 小时后,EST-6 含量增加了 0.5 倍。有文献报道,NPV 可以成倍提高昆虫中肠肠壁磷酸酶的活性,这种现象可能与幼虫体内因 NPV 增殖而引起的细胞解体过程有关^[13]。本结果所提示的 NPV 提高某类酯酶的含量,是否也与细胞解体过程有关,尚需实验的进一步证实。

BsNPV 感染 Bs484 细胞的生化研究表明,BsNPV 基因组的合成开始于病毒感染细胞后约 6 小时^[14],因此,病毒的早期转录必定是在这之前,对 Bs484 细胞酯酶的研究说明了酯酶含量在病毒感染 3 小时就有了变化,这正是病毒早期生化活动所导致的结果。与中肠酯酶的电泳结果相比,我们发现 Bs484 细胞的酯酶在病毒感染后没有酶带消失,这可能是由于酯酶存在组织特异性,使中肠和 Bs484 细胞中的酯酶不完全相同,这在二组对照样品的电泳结果上已得到反映。因而各自细胞内的酯酶对同一种病毒的敏感性就有可能产生差异。

杆状病毒感染的早期变化是一个研究较多的课题,如果在研究病毒特异性核酸和蛋白的基础上结合检测感染细胞的病理生化变化将能够更全面地了解病毒-宿主细胞在感染早期相互作用的特点。本文所建立的酯酶分析法无疑给 BsNPV 早期感染的进一步研究提供了有效途

表 4 感染系列细胞酯酶的 S/N 值

Tab. 4 The S/N rate of esterases in Bs484 cells from infective series

酶 带 Zymogram	细胞酯酶含量的相对比值 relative rate of content for esterases in Bs484 cells			
	S ₁ /N ₁	S ₂ /N ₂	S ₃ /N ₃	S ₄ /N ₄
	EST-1	0.98	0.81	—
EST-2	0.98	0.72	—	0.68
EST-3	0.79	0.64	0.55	0.53
EST-4	1.0	0.82	0.80	0.83
EST-5	1.0	0.81	0.83	0.82

径。

参 考 文 献

- 1 Van Der Groot L P S, Wassink H J M. Hemolymph proteins of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, after infection with a nuclear polyhedrosis virus. *J Invertebr Pathol*, 1969, 14(3), 419~420
- 2 刘松华, 谢天恩. 油桐尺蠖成虫卵巢细胞系的建立及其病毒感染特性研究. 见: 中国科学院武汉病毒研究所等编, 油桐尺蠖核型多角体病毒杀虫剂的研制及应用成果鉴定资料. 1985, 53~71
- 3 Grace T D C. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature*, 1962, 195, 788~789
- 4 吴鹤龄, 林锦湖主编. 遗传学实验方法和技术. 第1版, 北京: 高等教育出版社, 1983, 273~274
- 5 王爱民. 莫桑鼻给非鲫生长期同功酶变化的分析. *武汉大学学报(自然科学版)*, 1992, 1, 98~104
- 6 王春元, 王长城. 金鱼酯酶同功酶的研究 I. 鲫鱼和红头金鱼各组织器官酯酶同功酶的比较. *遗传学报*, 1988, 15(6), 442~449
- 7 Kelly D C. Baculovirus replication. *J Gen Virol*, 1982, 63, 1~13
- 8 Tjia S T, Carstens E B, Doerfler W. Infection of *Spodoptera frugiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 1979, 99(2), 399~409
- 9 Erlandson M A, Gordon J, Carstens E B. Size and map locations of early transcription products on the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology*, 1985, 142(1), 12~23
- 10 Yong S Y, Scott A H. Immunoelectrophoresis of hemolymph of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, during the course of a nuclear polyhedrosis virus infection. *J Invertebr Pathol*, 1970, 16(1), 57~62
- 11 Martignoni M B, Milstead J E. Hypoproteinemia in a noctuid larvae during the course of nuclear polyhedrosis. *J Insect Pathol*, 1964, 6(3), 517~531
- 12 丁翠, 蔡秀玉. 棉铃虫感染核型多角体病毒后血淋巴蛋白的变化. *昆虫学报*, 1981, 24(2), 160~165
- 13 Sujak P, Ziennicki K, Ziennicka J, et al. Acid and alkaline phosphatase activity in the fat body and midgut of the Beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera, Noctuidae), infected with nuclear polyhedrosis virus. *J Invertebr Pathol*, 1978, 30(1), 4~9
- 14 徐旭士, 谢天恩. 油桐尺蠖核型多角体病毒在 Bs484 细胞中的感染特性研究. *中国病毒学*, 1992, 7(3), 289~295

The Analysis on Esterases from BsNPV-Infected *Buzura suppressaria* and Bs484 Cells

Xu Xushi

(Biology Department of Jiangxi University, Nanchang 330047)

Zhang Chaoying

(Centre Laboratory of Jiangxi University, Nanchang 330047)

Xie Tianen

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

By the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and thin-layer scanning, the esterases of the fourth instar larvae of the *Buzura suppressaria* and Bs484 cells were investigated after infection with nuclear polyhedrosis viruses. The amount of the zymograms for mid-gut esterases in diseased larvae was found to be less than that in the healthy ones during the course of the disease. The results showed that the changes in type and content of mid-gut esterases were investigated at 8 hours postinfection, and the changes became obvious as infective time went on. The changes in content of esterases for Bs484 cells were determined at 3 hours postinfection with BsNPV, but the type of esterases had no changes.

Key words BsNPV, Infection, Esterase