

昆虫病毒学

谭业平 陶涛 编著

INSECT
VIROLOGY

武漢出版社

前 言

一九七八年前，我们还只是从图片上见过昆虫病毒。说来见笑，我们第一次采用离心术分离昆虫病毒时，还不知病毒是在上层还是在下层。幸好我们身边有许多老师，我们是在刘年翠教授的指导下，逐渐步入昆虫病毒学之门。

当时有关昆虫病毒的技术资料很少，我们主要是借鉴其他病毒的研究技术。后来，我们找到了一本K. Smith著的Insect Virology (1967)，该书对一些主要的昆虫病毒作了描述，使我们受益匪浅。我们边工作边收集国内外前辈的研究论文，使我们的视野又有了扩展。随着昆虫病毒的研究在国内外日趋活跃，有关昆虫病毒的资料逐渐多了起来，尤其是研究论文，无论是在广度还是在深度方面都有了很大的发展。有关专著也先后问世。1982年，吕鸿声教授出版了《昆虫病毒与昆虫病毒病》一书，该书对昆虫病毒及其病毒病作了系统的介绍。1986年，梁东瑞等老师出版了《中国昆虫病毒图谱》，该图谱汇集了我国历来昆虫病毒的研究成果，概述了昆虫病毒全貌。1987年，刘岱岳、谭业平翻译出版了Karl Maramorosch教授编著的“The Atlas of Insect and plant Viruses”的第一部分《昆虫病毒图谱》，该图谱对昆虫病毒作了较全面的描述。以上三本书的出版对我国昆虫病毒的研究起到了积极地推动作用。

然而，目前国内外尚无一本系统介绍昆虫病毒研究技术方面的书籍。回顾我们所走过的路程，深知昆虫病毒技术在昆虫病毒研究中的重要性，缺乏此类参考书使有关科研人员的工作极其不便。因此，我们编著了这本《昆虫病毒学》，目的是想给从事昆虫病毒研究的工作人员，尤其是对刚刚涉足此研究领域以及在基层工作的技术人员提供一些可供参考的技术方法。

该书分两大部份，共17章。第一部分叙述了昆虫病毒的基本概念，并收集了一些鲜为人知的新知识。第二部分较全面的介绍了昆虫病毒研究技术，是本书的重点。同时，我们考虑了广度和深度，既包括了应用方面的技术，同时也综合了基础研究方面的技术。从最基本的病毒标本采集到病毒的分离鉴定技术，以及从病毒的提纯到昆虫病毒的分子生物学技术均作了描述。为了使读者使用方便，我们采用了大量的图表和照片，并尽量做到由浅入深，通俗易懂。但愿书中所介绍的昆虫病毒基础知识和技术方法能对您的工作有所帮助。

我们是初出茅庐，涉足面必有局限性，缺点和错误在所难免，敬请专家、读者指正。

我们在写此书的过程中，得到了高尚荫先生生前的教诲。由于种种原因，此书在高尚荫教授逝世一年多后才与读者见面，为此我们深感遗憾。

陆志宇先生自始至终指导了本书的编写，并提供了一些最新资料，却执意不在书上署名，这种甘当人梯的精神使晚辈深为感动。在编写此书的过程中还得到了贺新芝、梅德平、闵一帆、熊定荣同志的帮助，责任编辑李兵为出版此书做了大

量的工作，在此一并感谢。

刘年翠先生是我们的启蒙老师，不仅在工作中培养了我们，并为出版此书给予了极大地关怀，本书即是献给刘年翠老师的。

作 者

1990年8月于珞珈山

目 录

前 言

第 一 部 分

第一章 病毒的基本性质

第一节 病毒的形态结构	2
一、病毒的大小与形态	2
二、病毒的化学组成	6
三、病毒的结构	9
第二节 病毒的繁殖	15
第三节 病毒的分类	22

第二章 昆虫病毒学的发展及其分类地位

第一节 昆虫病毒学的发展	28
第二节 昆虫病毒的分类	30
一、昆虫病毒分类的发展梗概	30
二、各类昆虫病毒的主要特征	36

第三章 杆状病毒

第一节 核型多角体病毒	43
一、核型多角体病毒病的病理学	43
二、核型多角体病毒的理化性质	46
三、核型多角体病毒的形态	49

四、NPV的化学组成	54
五、核型多角体病毒的形态发生	55
六、核型多角体病毒对害虫的防治	58
七、核型多角体病毒的敏感细胞系	59
第二节 颗粒体病毒	59
一、病症特征	60
二、形态大小	61
三、理化性质	63
四、宿主范围和体外培养	67
五、颗粒体病毒的增殖及形态发生	67
六、GV的应用	71
第三节 杆状病毒的分子生物学	72
一、AcNPV DNA的物理图谱测定	72
二、杆状病毒基因的定位、复制、转录和表达	73
三、遗传工程在昆虫杆状病毒领域中的成就	75
四、杆状病毒的分子生物学研究进展	82

第四章 昆虫痘病毒

第一节 病理学	99
第二节 形态结构与理化性质	101
第三节 血清学	106
第四节 形态发生和增殖	106
第五节 应用	112

第五章 质型多角体病毒

第一节 宿主范围和侵染组织	114
第二节 病症特征	114
第三节 多角体和病毒粒子	117

第四节	感染和增殖	128
第五节	血清学	129
第六节	应用	129
第六章	非包涵体病毒	
第一节	昆虫浓核症病毒	131
一、	宿主范围	131
二、	病症特征及侵染组织	131
三、	形态及大小	132
四、	理化性质	133
五、	代表种和亚型	135
六、	增殖	135
七、	应用	137
第二节	昆虫虹彩病毒	137
一、	宿主范围	137
二、	病症特征及侵袭部位	138
三、	形态及大小	138
四、	理化性质	143
第三节	多分散性基因组病毒	143
一、	分类地位	144
二、	分布	144
三、	生活周期	145
四、	理化性质	145
五、	病毒形态	145
六、	增殖	146
第四节	昆虫的微小RNA病毒	146
一、	家蚕软化病病毒	147

二、蜜蜂急性麻痹病病毒·····	150
三、蜜蜂慢性麻痹病病毒·····	151
四、蜜蜂囊雏病病毒·····	152
五、野田村病毒·····	155

第 二 部 分

第七章 昆虫病毒的分离和纯化

第一节 病毒的分离·····	157
一、感病昆虫的特征·····	157
二、标本的采集·····	159
三、标本的处理·····	159
四、标本的接种·····	160
第二节 昆虫病毒的提纯技术·····	161
一、提纯病毒时应注意的因素·····	162
二、昆虫病毒的提纯方法·····	163

第八章 昆虫病毒的鉴定及保存

第一节 昆虫病毒的鉴定·····	185
一、根据病毒的宿主范围进行鉴定·····	185
二、根据幼虫的病症进行鉴定·····	185
三、根据组织病变和病毒在细胞中形成部位进行 鉴定·····	195
四、根据病毒的感染性进行鉴定·····	199
五、根据病毒包涵体和病毒的形态进行鉴定·····	200
六、根据病毒的血清学进行鉴定·····	201
七、根据病毒的理化性质加以鉴定·····	203
第二节 昆虫病毒的保存方法·····	205

一、真空冰冻干燥保存法·····	205
二、低温冻结保存法·····	207
三、普通冰箱保存法·····	208

第九章 超速离心技术在昆虫病毒学研究中的应用

第一节 超速离心机的结构·····	210
一、制备性超速离心机·····	210
二、分析性超速离心机·····	212
第二节 超速离心的一般原理·····	214
第三节 沉降速度法·····	217
一、原理·····	217
二、沉降速度法测定沉降系数及分子量·····	219
三、沉降速度法提纯病毒·····	223
四、沉降速度法鉴定病毒制剂的均一性·····	225
第四节 等密度区带离心法·····	225
一、原理·····	225
二、梯度溶液的制备·····	226
三、等密度区带离心法的应用·····	229
第五节 DNA构象的分析·····	230

第十章 电子显微镜技术

第一节 电子显微镜的结构与成象原理·····	235
一、电子显微镜的结构·····	235
二、电子显微镜的成象原理·····	237
第二节 电子显微镜的使用与保养·····	240
一、真空操作·····	240

二、合轴.....	241
三、放大倍数的标准.....	241
四、样品观察及图象摄影.....	242
五、电镜的保养.....	242
第三节 电镜技术在昆虫病毒学研究中的应用.....	243
一、昆虫病毒学研究中常用的电镜技术及其作用...	243
二、生物样品的制备技术.....	243
三、其它的研究技术.....	254

第十一章 昆虫病毒的血清学技术

第一节 血清学技术中的动物实验方法.....	261
一、皮下注射法.....	262
二、皮内注射法.....	262
三、腹腔注射法.....	262
四、肌肉注射法.....	262
五、静脉注射法.....	263
六、心内注射法.....	263
第二节 抗血清的制备.....	263
第三节 血凝及血凝抑制实验.....	266
第四节 沉淀反应.....	269

第十二章 昆虫病毒的定性及定量测定

第一节 病毒的定性测定.....	282
一、一般感染实验.....	283
二、LD ₅₀ 测定法.....	283
三、昆虫病毒毒力的测定.....	286
四、其它的定性测定方法.....	290
第二节 病毒的定量测定.....	291

一、空斑测定法.....	291
二、昆虫病毒的其它测定方法.....	293
第十三章 电泳技术	
第一节 基本原理.....	295
第二节 影响泳动率的因素.....	297
一、颗粒性质.....	297
二、电场强度.....	297
三、溶液性质.....	298
四、电渗.....	298
五、焦耳热.....	299
六、筛孔.....	299
第三节 琼脂糖凝胶电泳.....	300
一、分析性琼脂糖凝胶电泳.....	302
二、制备性琼脂糖电泳.....	306
三、小型胶和碱性琼脂糖凝胶电泳.....	306
四、从琼脂糖凝胶中回收 DNA.....	307
第四节 聚丙烯酰胺凝胶电泳.....	310
一、盘状电泳.....	315
二、SDS—PAG 电泳.....	319
第十四章 气相色谱技术	
第一节 气相色谱仪.....	323
一、基本部件.....	323
二、辅助部件.....	327
第二节 气相色谱技术在昆虫病毒研究中的应用.....	330
第十五章 昆虫组织培养技术	
第一节 昆虫组织培养的研究历史.....	336

第二节 昆虫细胞培养操作技术·····	340
一、实验室及其设备·····	341
二、培养方法·····	344
三、培养基及培养基的改进·····	348
第三节 细胞系或株·····	356
第四节 昆虫病原病毒在组织培养里的感染·····	359
一、昆虫病毒对细胞培养的接种方法·····	359
二、蚀斑技术·····	362
第五节 昆虫组织培养在昆虫病毒研究中的应用·····	366
一、形态发生·····	366
二、分离毒株·····	368
三、转染实验·····	370
四、利用昆虫细胞生产 β 干扰素·····	372
五、大量培养昆虫细胞生产病毒·····	373

第十六章 昆虫病毒的分子生物学技术

第一节 昆虫病毒核酸的提取与测定·····	379
一、提取病毒核酸的注意事项·····	380
二、提取昆虫病毒核酸的一般程序·····	380
三、不同类型的核酸的分离提取·····	385
四、同类型核酸的分级分离·····	386
五、病毒核酸含量的测定·····	387
六、蓖麻蚕NPV DNA的分离提纯·····	388
第二节 病毒蛋白质的提取与分析·····	389
一、提取病毒蛋白质的注意事项·····	390
二、昆虫病毒蛋白质的提取方法·····	390
三、病毒蛋白质含量的测定·····	393

第三节 杂交技术和分子克隆在昆虫病毒研究中的应用	394
一、分子杂交	396
二、分子克隆	402
第十七章 昆虫病毒与生物防治	
第一节 昆虫病毒用于生物防治的历史	405
一、历史	406
二、利用昆虫病毒进行生防的实例	407
第二节 昆虫病毒制剂的生产	415
一、人工饲料	415
二、工业生产	418
三、产品质量检测	429
第三节 昆虫病毒制剂的大田应用	437
一、应用方式	437
二、决定大田病毒防治效果的诸因素	438
三、害虫病毒防治的试验程序	438
附 录	
一、中国昆虫病毒名录	441
二、病毒学实验常用器材的准备	465
三、常用试剂的配制	470
四、与沉降系数有关的资料	476

第一部分

第一章 病毒的基本性质

病毒是因其致病性被发现的，1892年俄国学者伊万诺夫斯基首次发现烟草花叶病的感染因子能通过细菌滤器，病叶汁液通过滤器后得到的滤液，可感染健康的烟草而使之发生花叶病。此后的近100年时间里，病毒学的研究有了巨大的发展，无论在了解病毒的本质，还是在抵御病毒性疾病以及利用病毒为人类造福等诸方面，都取得了令人瞩目的成绩。

病毒是目前已知的最小微生物，其中最大者为痘病毒，大小为 300×200 纳米，最小者为细小核糖核酸病毒，只有 $10 \sim 28$ 纳米。但由于有关病毒的知识日益增多，新的病毒种类不断发现，现在对病毒下一个完整的、确切的、能为大家都接受的定义还很难。综合病毒学家们的观点，可以认为：病毒是一种生物，是没有细胞结构的 $10 \sim 300$ 纳米大小的传染因子。它的基因组是由一种核酸（DNA或RNA）组成，利用活细胞的合成机构复制有感染性的病毒粒子，并将基因组从一个细胞传给另一个细胞。现将病毒区别于其他生物的主要特征归纳如下：

- 1、无细胞结构，仅含一种类型的核酸——DNA或RNA，至今尚未发现二者兼有的病毒。

- 2、严格的活细胞内寄生，没有自身的核糖体，不能生

长也不进行二均分裂，必须依赖宿主细胞进行自身的核酸复制，形成子代。

3、大部分病毒没有酶或酶系统极不完全，不含催化能量代谢的酶，不能进行独立的代谢作用。

4、个体极小，能通过细菌滤器，在电子显微镜下才可看见。

第一节 病毒的形态结构

一、病毒的大小与形态

病毒的大小通常用电子显微镜观察法、分级过滤法、超速离心沉降法、电泳法、电离辐射和x射线衍射法测定。大多数病毒比细菌小得多，但比多数蛋白质分子大，而且病毒的大小相差甚远，直径在10—300纳米之间，通常在100纳米左右（表1—1）。如昆虫浓核症病毒直径仅有20纳米左右，昆虫痘病毒其长度则为15—470纳米，其宽度在165—300纳米范围内。

表1—1 病毒的大小

类别	病 毒	长×宽或直径 (nm)
动物病毒	痘病毒 (<i>Poxvirus</i>)	200—350 × 200—250
	家蚕细胞核型多角体病毒 (<i>Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus</i>)	250—400 × 40—70
	疱疹病毒 (<i>Herpesvirus</i>)	100—150
	大蚊虹色病毒 (<i>Tiplula iridescent</i>)	

(续上表)

类别	病 毒	长×宽或直径 (nm)
	<i>virus</i>)	130
	新城疫病毒 (<i>Newcastle disease virus</i>)	115
	腺病毒 (<i>Adenovirus</i>)	70—90
	流感病毒 (<i>influenza virus</i>)	80—85
	鸡瘟病毒 (<i>Fowl plague virus</i>)	70—80
	家蚕细胞质型多角体病毒 (<i>Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus</i>)	60
	多瘤病毒 (<i>Polyomavirus</i>)	43
	脊髓灰质炎病毒 (<i>Poliovirus</i>)	27—30
	口蹄疫病毒 (<i>Foot-and-mouth disease virus</i>)	22
植物病毒	马铃薯Y病毒 (<i>Potato virus Y</i>)	750×12
	马铃薯X病毒 (<i>Potato virus X</i>)	520×10
	烟草花叶病毒 (<i>Tobacco mosaic virus</i>)	300×15
	黄瓜绿斑花叶病毒 (<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>)	230×16
	萝卜花叶病毒 (<i>Rachel mosaic virus</i>)	120×25
	苜蓿花叶病毒 (<i>Allatta mosaic virus</i>)	58×18
	马铃薯黄矮病毒 (<i>Potato yellow dwarf virus</i>)	110

(续上表)

类别	病 毒	长×宽或直径 (nm)
	番茄丛矮病毒 (<i>Tomato bushy stunt virus</i>)	30
	芜菁黄花叶病毒 (<i>Turnip yellow mosaic virus</i>)	26
	烟草环斑病毒 (<i>Tobacco ringspot virus</i>)	26
	南瓜花叶病毒 (<i>Squash mosaic virus</i>)	22
噬 菌 体	大肠杆菌噬菌体 T_2, T_4, T_6 (<i>Coliphage T₂, T₄, T₆</i>)	头部90×60 尾部100×20
	大肠杆菌噬菌体 T_1 (<i>Coliphage T₁</i>)	40 160×10
	大肠杆菌噬菌体 T_3 (<i>Coliphage T₃</i>)	45 10×10
	大肠杆菌噬菌体 T_5 (<i>Coliphage T₅</i>)	65 170×10
	大肠杆菌噬菌体 T_7 (<i>Coliphage T₇</i>)	45 10×10
	大肠杆菌噬菌体 f_d (<i>Coliphage f_d</i>)	700×5
	大肠杆菌噬菌体 f_2 (<i>Coliphage f₂</i>)	25
	痢疾杆菌噬菌体	头部60—70 尾部150×—
	灰色放线菌噬菌体	50 150×15
	分枝杆菌噬菌体	80-90×35 160-190×20
	大肠杆菌噬菌体 $\phi X174$ (<i>Coliphage $\phi X174$</i>)	直径 20—30
	大肠杆菌噬菌体 M_{13} (<i>Coliphage M₁₃</i>)	长 600—800

病毒的形态有球形、卵圆形、砖形、弹状、杆状、丝状