

太子参花叶病毒的生化特性研究

陈棣华 陈绳亮 孙继山 张立人

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

刘清琪

(山东大学生物系, 济南)

提 要

我们对中药材太子参 (*Pseudostellaria heterophylla*) 花叶病毒外壳蛋白的分子重量、氨基酸组份及核酸方面进行了研究, 并根据其形态结构, 病症表现, 宿主范围及血清学实验综合分析, 认为太子参花叶病毒是烟草花叶病毒 (TMV) 群中一个毒株。

1982年我们曾在中药太子参的病株中发现一株杆状病毒, 并对其形态结构、病症表现, 宿主范围、血清学试验以及对此病害的综合防治等方面进行了报道^[1]。本文对太子参花叶病毒(简称TaMV)的某些生化特性进行了研究, 实验结果表明该病毒是烟草花叶病毒群中的一个毒株。由于对太子参花叶病毒的一些基本特性的了解, 从而可能对太子参病害的综合防治提供一定的科学依据及必要措施。

材料和方法

1、病毒的提取: 将太子参病株叶片, 用氯仿抽提, 聚乙二醇 (M.W.6000) 沉淀, 差离心纯化可得到纯净和密集的杆状病毒粒子悬液, 提纯方法见前文报道^[1]。已提纯的病毒放在 4°C 保存备用。

2、病毒外壳蛋白的提取: 基本按照 H. Fraenkel-Conrat 的醋酸方法制备^[4], 将纯化的病毒悬液 (TaMV 的含量为 4—5 mg/ml), 加二倍体积在冰点之上的冰醋酸, 在冰浴中搅拌 15 分钟, 然后离心除去已分离出的 RNA 沉淀, 上清液加入等体积的蒸馏水, 在 4°C 对蒸馏水透析 3 天, 每天替换蒸馏水数次, 当 TaMV 的外壳蛋白在接近其等电点范围内, 开始聚集, 加入微量 3 M NaAC 使蛋白沉淀完全, 然后经 33000g 离心 1.5 小时, 收集沉淀, 用 PH 8—8.5 的蒸馏水溶解沉淀, 4000 rpm 离心 30 分钟, 上清液即为病毒外壳蛋白溶液, 可冻干于冰箱贮放备用。

3、太子参花叶病毒外壳蛋白分子量测定: 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法测定^[5], 凝胶浓度为 10%, 垂直板电泳, 电泳缓冲液为 0.1M 磷酸缓冲液, pH 7.2, 50 mA/板, 电泳

* 本文1985年9月17日收到

* 本试验复旦大学生物系郁操国同志参加部份工作, 特此致谢。

6—8小时，电泳结束后用三氯醋酸固定，0.25%考马斯亮兰染色，7%醋酸脱色。

4、病毒蛋白亚基的氨基酸分析*：病毒外壳蛋白与5.7N盐酸（G.R）装入硬质特制玻璃管内，排除空气封口，于105°—110°C水解24小时，然后去除盐酸，样品在B₃₆型日立氨基酸分析仪上测定其氨基酸组份，同时对半胱氨酸用Ellman-CTNB法^[6]，色氨酸用Spied的二甲氨基苯甲醛法^[7]，分别进行测定。

5、病毒核酸的提取：用苯酚法提取，将病毒悬液与等体积苯酚在冰浴中抽提二次，水相再用乙醚洗数次，去残余乙醚，然后加入冷的95%酒精，置-15°C过夜，离心得沉淀。将沉淀溶于蒸馏水中，于4°C透析后贮放备用。

6、病毒核酸一步释放法：太子参病毒核酸电镜观察采用一步释放法制备样品，即展开液为10%甲酰胺、Tris-EDTA缓冲液2ml，该溶液中含有尿素0.24克，BAB（溴代十二烷基二甲基苄胺）10μl，Tris 25μl（22mg/ml），下相液为0.01M醋酸铵溶液，用复盖碳膜的Formvar膜蘸取释放的核酸，并经钨合金旋转投影后，在电镜下观察。

结果和讨论

1、太子参花叶病毒纯度测定：通过聚乙二醇及交差离心提纯的病毒，其核蛋白曲线如图1。吸收高峰在260nm，低峰在250nm，260/280的比值为1.20；260/250的比值1.10。

将一定浓度的太子参悬液，滴在Formvar—碳膜的铜网上，用3%磷钨酸染色，在JEM-100C型电子显微镜下观察，为均一密集的杆状病毒粒子，长度多数在240—280nm左右。宽度约为20nm左右。见图2。

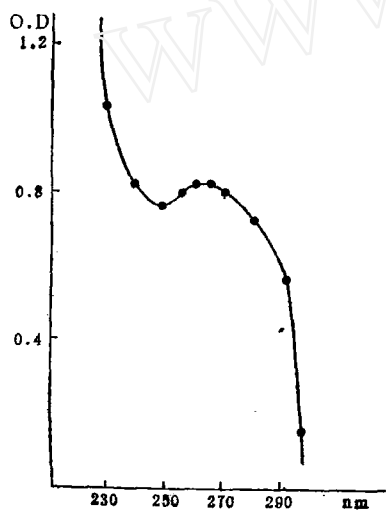


图1、TaMV核蛋白曲线

Fig. 1. Ultraviolet absorption spectra of TaMV nucleoprotein

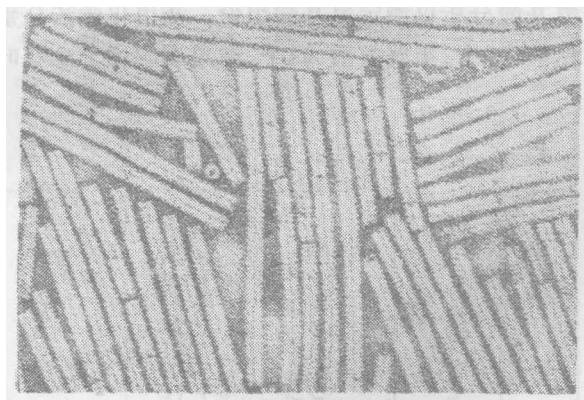


图2、电镜下的TaMV病毒粒子×231000

Fig. 2. Electron micrograph of TaMV particles ×231000

提纯的病毒用1%SDS和1%巯基乙醇在100°C解聚2分钟，分别在5%与7%浓度的SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳5小时，均显示出单一的带，从这可以证明太子参花叶病毒的外壳蛋白是由一种亚基组成，说明实验样品已达到电泳纯。见图3。

2、太子参花叶病毒外壳蛋白亚基分子量的测定：用67%醋酸法提取的病毒外壳蛋白，测定其紫外吸收曲线，见图4。280/250的比值为2.6，呈现与烟草花叶病毒群中相似的蛋白吸收曲线。

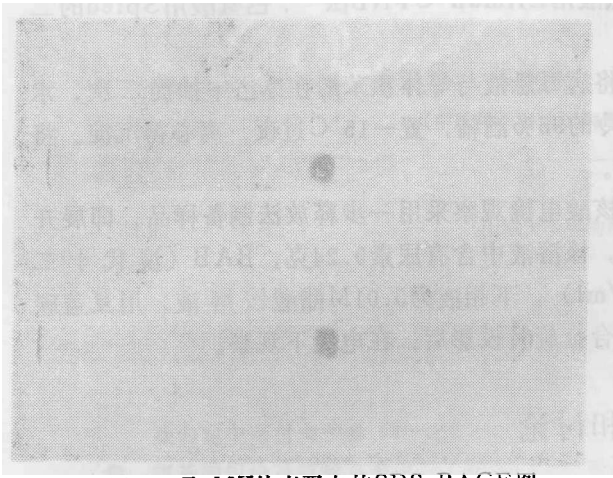


图3、TaMV外壳蛋白的SDS-PAGE图
Fig. 3. SDS-PAGE of coat proteins

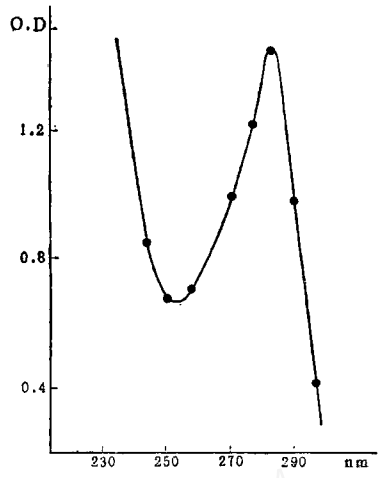


图4、TaMV外壳蛋白的吸收曲线
Fig. 4. Absorption spectra of TaMV coat proteins

用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法测定蛋白亚基的分子量，将已知分子量的牛血清蛋白、卵清蛋白、胃蛋白酶、核糖核酸酶和细胞色素C作为测定分子量的标准，结果表明太子参花叶病毒蛋白亚基的分子量为16600，见图5所示。

3、太子参花叶病毒蛋白亚基的氨基酸分析：通过氨基酸分析仪测定氨基酸组份，及用化学法分别测定色氨酸为2个，半胱氨酸为1个。结果表明太子参花叶病毒的

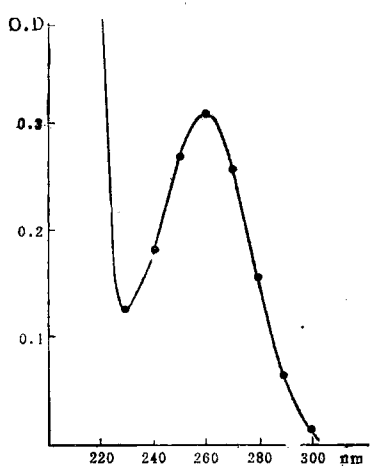


图6、TaMV核酸的吸收曲线
Fig. 6. Absorption curve of TaMV nucleic acid

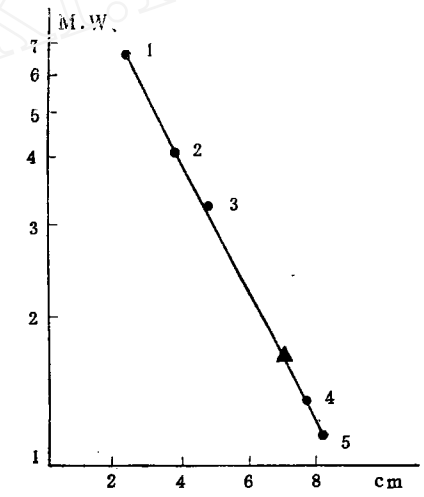


图5、TaMV外壳蛋白的分子测定
1、牛血清蛋白(68000) 2、卵清蛋白(43000) 3、胃蛋白酶(35000) 4、核糖核酸酶(13700) 5、细胞色素C(11700) ▲TaMV

Fig. 5. Estimation of molecular weight of TaMV coat proteins (1) Bovine serum albumin (68000) (2) Ovalbumin(43000) (3) Pepsine (35000) (4) Ribonuclease (13700) (5) Cytochrome C (11700) ▲TaMV

TaMV与其它植物病毒的氨基酸组份的比较(2.8)
Table Amino acid composition of the TaMV and plant virus(2.8)

	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Try	总数
A 烟草花叶病毒 (TMV) 普通株 Wild type	18	16	16	16	8	6	14	1	14	0	9	12	4	8	2	0	11	3	158
B Dahlemense	17	17	16	19	8	6	11	1	15	1	7	13	5	8	2	0	9	3	158
C 烟草花叶病毒 U ₂ U ₂	22	19	10	16	10	5	17	1	12	2	8	11	6	8	1	0	8	2	158
D 长叶车前花叶病毒 HR	17	13	13	22	3	4	18	1	10	3	8	11	7	6	2	1	10	2	156
E 次兰环斑病毒 ORSV	20	21	12	15	9	7	11	1	10	3	8	14	7	7	1	0	9	3	158
F 黄瓜花叶病毒 3 Cucumber 3	17	12	22	10	8	5	18	0	14	0	5	13	4	10	3	0	9	1	151
G 黄瓜花叶病毒 4 Cucumber 4	18	12	23	10	9	5	20	0	14	0	7	12	4	11	4	0	10	1	160
H 黄瓜绿斑嵌病毒-C CGMMV-C	20	10	24	10	6	9	21	0	7	0	7	18	4	9	4	2	8	2	161
I 黄瓜绿斑嵌病毒-W CGMMV-W	18	12	21	10	10	5	18	0	13	0	8	12	4	12	4	0	10	1	158
长叶车前花叶病毒(1) Ribgrass Mosaic Virus(1)	17	13	13	22	8	4	18	1	10	3	8	11	7	6	2	1	10	2	156
长叶车前花叶病毒(2) Ribgrass Mosaic Virus(2)	17	14	13	22	8	4	18	1	10	3	8	11	7	6	2	1	11	2	158
剪秋罗花叶病毒 Lychnis Mosaic Virus	16	13	16	21	9	3	17	1	10	4	7	12	7	5	2	1	11	3	158
烟草花叶病毒 u ₁ TMV-u ₁	18	16	16	16	8	6	14	1	14	0	9	12	4	8	2	0	11	3	158
油菜花叶病毒 15 YMV-15	14	10	12	20	8	3	19	1	10	3	6	14	7	6	2	1	10	3	149
长叶车前花叶病毒 sh HRV sh	16	11	13	27	8	4	20	1	10	4	5	16	3	5	2	1	10	2	158
太子参花叶病毒 TaMV	15	13	16	30	5	3	19	1	10	2	6	15	6	5	2	1	10	2	161

蛋白亚基由161个氨基酸组成;其外壳蛋白亚基各氨基酸克分子数为: ASP(15),THR(13),SER (16), GLU(30),GLY(3), ALA(19), CYS(1), VAL(10), MET(2), ILE(6), LEU(15), TYR(6), PHE(5), LYS(2), PRO(5), HIS(1), ARG(10), TRY(2)。如表所示。

4、提取的太子参花叶病毒经地衣酚显色法确定为RNA,其紫外吸收曲线如图6。260/230的比值为2.5,260/280的比值为1.9。

经过单分子展层一步释放法,在电子显微镜下显示RNA的线状分子,计算出分子量的近似值为 1.85×10^6 。

我们在前文中已报道过太子参花叶病毒的提取方法,形态结构,血清学实验,在指示植物上的感染症状等试验,结果表明与烟草花叶病毒群存在着亲缘关系。本文从太子参花叶病毒外壳蛋白的吸收曲线、分子量及核酸的吸收曲线特性几个方面看来^[2,8,9],亦均在TMV群的一定特性之内,从氨基酸组份分析结果看来,太子参花叶病毒含有组氨酸和甲硫氨酸,故与油菜花叶病毒(YMV-15)、长叶车前病毒(HR)相类同,这一特点和血清学试验及在指示植物感染症状的结果均为一致的,而蛋白亚基氨基酸组份与以上株系却又各有其不同(见表)。这也许是烟草花叶病毒适应不同宿主而产生的相应变异。根据以上结果,我们认为太子参花叶病毒是烟草花叶病毒群的一个毒株。

参 考 文 献

- [1] 陈绳亮、陈棣华等,病毒学集刊5(印刷中)
- [2] 郁操国、王鸣峻等,1981病毒学集刊1:129。
- [3] 张秀华、李国宏等,1980植物病理学报10:149—54。
- [4] H. Fraenkel-Conrat, 1959 Virology 4:1—4。
- [5] J. H. HILL, R. T. Shepherd, 1972, Virology 47:817—822。
- [6] Ellman. G. L. 1959, Arch, Biochem. Biophys. 82:70。
- [7] Spied, J. R., D. C. Chamber, 1946, Anal. Chem. 21:1249—1266。
- [8] H. Fraenkel-Conrat, R. Wanger. 1974, Comprehensive Virology. 1:113。
- [9] Zhang Liren et al, 1982, Electron Microscope 3:142。

A STUDY ON BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF TAIZISHEN MOSAIC VIRUS

Chen Di-hua Chen Sheng-liang Sun Ji-shen Zhang Li-ren

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Liu Chin-chi

(Department of Biology, Shandong University, Jinan)

The roots tubers of Taizishen are usually used as the traditional Chinese medicine. A rod-shaped virus has been found from the diseased plant of Taizishen.

The virus purified by polyethylene precipitation and differential centrifugation showed rod-shaped, close and numerous particales under the electron microscope, and in one band of existence of these virus particles was further verified by polyacrylamid gel electrophoresis.

The molecular weight of coat protein were 16,600 consisting of 161 amino acid residues.

The virus nucleic acid was confirmed as RNA.

on the basis of the symptoms in different host plants, morphological structure of the virions, serological test and amino acid composition of coat protein subunits, we preliminarily conclude that the TaMV is a strain of the Tobacco Mosaic Virus.