

一种有效的分离制备 柑桔裂皮病类病毒的方法

马修理 熊学德 熊克勇

谭惠青 周咏芝

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉)

提 要

类病毒分子量小, 在寄主体内含量低, 不易提纯。一般提纯方法需经过酚抽提, 去糖、透析、氯化锂处理、DNase 消化和纤维素层析, 由于步骤复杂, 所以回收率较低, 同时所得样品纯度不高, 难以满足各种需要。

本文报道一种柑桔裂皮病类病毒(CEV)的分离制备方法, 采用苯酚-氯仿抽提核酸, 核酸经 LiCl 处理后, 进行纤维素(CF-11)层析, 然后经 PAGE 纯化 CEV。该方法具有操作简便, 所使用的设备简单, 纯化 CEV 效果好等优点, 是柑桔裂皮病类病毒早期诊断, 序列分析, 分子克隆和防治等研究必不可少的基础工作。

类病毒的分离制备是类病毒研究的基础, 由于它的分子量小, 在寄主体内的含量很低, 而且有些寄主植物中常有类似于类病毒的小分子 RNA 存在^[1,2,3], 因此, 与其它病毒相比, 类病毒的制备工作要困难得多。目前, 用于制备类病毒的方法多数较复杂, 或需要大型设备^[4,5]。近年来, 国内有关类病毒的研究已日趋活跃, 但至今还没有建立分离制备柑桔裂皮病类病毒(Citrus Exocortis Viroid, 简称 CEV)的有效方法。

本文介绍一种分离制备 CEV 的方法, 与已报道的多数方法相比, 该法具有操作简便, 设备简单和纯化效果好等优点。

材 料 与 方 法

一、材料 用中性磷酸缓冲液提取有明显裂皮症状的鲁脐鲜叶(采于湖南淑浦)的叶汁, 针刺接种于长有 3—5 片叶的健康爪哇三七(*Gynura aurantiaca* D.C.) 幼苗, 一周后重复接种一次, 健康对照不接种。

二、方法 1、粗核酸抽提和初步纯化: 取感染 CEV 的爪哇三七的新鲜叶或冰冻叶 100 克, 加抽提液(0.3mol/L Tris, 0.6mol/L NaCl, 0.2mol/L Glycine)100ml, 10% SDS10ml, 水饱和酚(含 0.1% 8-羧基喹啉)50ml, 氯仿 50ml, 充分捣碎后, 3000 转/分离心 30 分钟, 上清液加 2.5 倍体积 95% 乙醇, -20°C 放置 2 小时, 3,000 转/分离心 30 分钟, 收集沉淀, 真空干燥。所得干粉用 100ml TSE 缓冲液(0.05mol/L Tris, 0.001mol/L

本文于 1987 年 11 月 3 日收到

EDTA, 0.10mol/L NaCl, pH7.2)充分溶解, 加入 LiCl (晶体)使终浓度为2.0mol/L, 4℃放置过夜, 8,000 转/分离心 20 分钟, 收集上清液。

2、纤维素 (CF-11) 层析: 取纤维素 (CF-11) 干粉 (Whatman 公司) 8 克, 按照 Allen 等的方法^[6]进行预处理。2mol/L LiCl 处理后的上清液加入 10×TSE 和乙醇使其终浓度分别为 1×TSE 和 35% 乙醇, 搅拌加入预处理的纤维素中, 4℃搅拌过夜。布氏漏斗抽滤, 用含 35% 乙醇的 TSE 缓冲液洗涤至滤液为无色 (约 600ml), 用不含乙醇的 TSE 缓冲液洗脱两次 (40ml/次), 收集滤液。洗涤和洗脱也可在装柱 (按 Allen 等的方法^[6]) 或离心 (按 Niblitt 等的方法^[7]) 条件下进行。洗脱液加 2.5 倍体积乙醇, -20℃ 放置 2 小时, 15,000 转/分离心 20 分钟, 收集沉淀, 真空干燥。

3、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE): 上述干粉溶于无菌双蒸水 (约 0.7mg/ml), 按周咏芝等的方法^[8]进行聚丙烯酰胺凝胶双相电泳 (丙烯酰胺浓度为 5%, N, N'-亚甲基丙烯酰胺为 0.166%), 银染后切出含有 CEV 区带的胶片。按 Boulikas 等的方法^[9]脱色, 用浸泡法将胶片放在适量的浸泡液 (0.5mol/L NH₄Ac, 1mmol/L EDTA, 0.1% SDS) 中, 28℃ 振摇过夜。取出含有 CEV 的浸泡液加 2.5 倍体积乙醇, -20℃ 放置 2 小时, 15,000 转/分离心 20 分钟, 收集沉淀, 真空干燥, -20℃ 保存。

4、产率和纯化效果的测定: 将回收得到的纯核酸样品溶于双蒸水中, 测其在 260, nm 下的光吸收值 (O.D₂₆₀), 并通过下列公式计算出一系列提取步骤的产率。

$$\text{核酸总含量} (\mu\text{g/ml}) = \frac{O.D_{260}}{0.024 \times \text{比色杯厚}} \times \text{稀释倍数}。$$

用聚丙烯酰胺凝胶双相电泳-银染色法检测纯化效果。

结 果

一、CEV 的扩增

经 CEV 接种的爪哇三七两周以后, 部分植株逐步表现矮化和卷叶等症状。健康爪哇三七生长良好, 无异常表现 (图 1)。

经聚丙烯酰胺凝胶双相电泳-银染色法分析, 用作接种源的柑桔叶 (图 2 d) 和接种过 CEV 的爪哇三七叶 (图 2 b) 的核酸抽提物显示较明显的 CEV 带, 而健康柑桔叶 (图 2 c) 和健康爪哇三七叶 (图 2 a) 不出现此带。

二、样品的分离与纯化效果

经聚丙烯酰胺凝胶双相电泳检测, 制备过程中丢弃部分未检测出 CEV, 回收部分显示较明显的 CEV 带 (图 3), 说明制备过程基本无 CEV 丢失, 该方法具有较好的回收率。

分别取粗提、2mol/L LiCl 处理、纤维素 (CF-11) 层析三步纯化的核酸样品 20μg, 20μg, 5μg 进行聚丙烯酰胺凝胶双相电泳分析。图 4 表明在核酸抽提物中几乎检测不到 CEV, 经 2mol/L LiCl 处理后可较清楚地检测到 CEV, 而加样量只有前者 1/4 的纤维素 (CF-11) 层析后的核酸样品出现很强的 CEV 带, 说明在核酸抽提, 2mol/L LiCl 处理纤维素 (CF-11) 层析过程中, CEV 含量得到较高的浓缩, 各步处理效果良好。



图1、接种和未接种 CEV 的爪哇三七生长情况对照。 a、健康的爪哇三七； b、接种CEV 的爪哇三七。
Fig.1. a. *Gynura aurantiaca* plant uninfected with CEV.
b. *Gynura aurantiaca* plant infected with CEV.

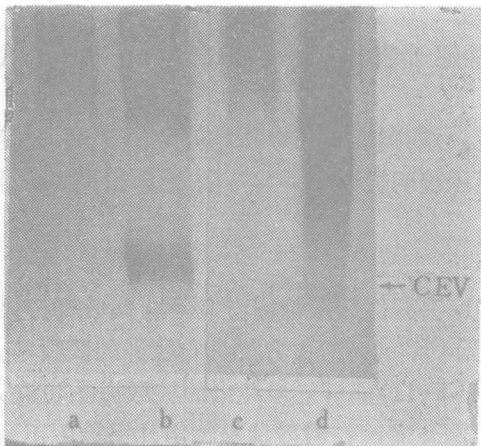


图2、爪哇三七与柑桔病株及其健康对照株叶片抽提物的聚丙烯酰胺凝胶双相电泳。

- a、健康的爪哇三七叶核酸抽提物；
- b、接种 CEV 的爪哇三七叶核酸抽提物；
- c、健康柑桔叶核酸抽提物；
- d、有明显裂皮症状的柑桔叶核酸抽提物。

Fig.2. a. Extract from *Gynura aurantiaca* plant uninfected with CEV.

b. Extract from *Gynura aurantiaca* plant infected with CEV.

c. Extract from the leaves of healthy citrus tree.

d. Extract from the leaves of citrus tree.

which manifest a serious of exocortis symptoms,



图 3、CEV 制备中丢弃部分与回收部分的聚丙烯酰胺凝胶双相电泳。

- a. 感病爪哇三七叶核酸提取物;
- b. 2 mol/L LiCl 处理后的上清液;
- c. 2 mol/L LiCl 处理后的沉淀;
- d. 纤维素 (CF-11) 非特异性吸附部分;
- e, f. 纤维素 (CF-11) 特异性吸附部分。

Fig. 3. a. Crude CEV.

- b. Supernatant of the solution treated with LiCl.
- c. Pellet of the solution treated with LiCl.
- d. The part of non-specific adsorption with CF-11.
- e, and f. Purificatory product with CF-11 chromatography.

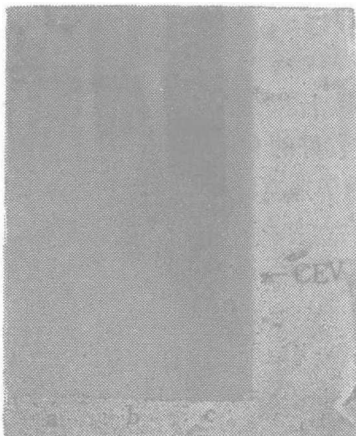


图 4、制备中各步回收部分 CEV 含量聚丙烯酰胺凝胶双相电泳分析。

- a. 核酸提取物 (20 μg);
- b. 2 mol/L LiCl 处理后上清液的核酸提取物 (20 μg);
- c. 纤维素 (CF-11) 层析后的核酸样品 (5 μg)。

Fig. 4. a. Crude CEV. (20 μg)

- b. The sample dalt with LiCl (20 μg).
- c. The sample of CF-11 chrematography (5 μg).

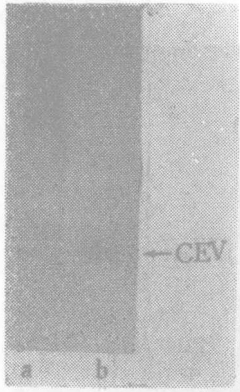


图 5、CEV 纯制品的聚丙烯酰胺凝胶双相电泳检查。

a. 经苯酚氯仿处理的 CEV 粗样品 (50 μ g)；

b. 纯化的 CEV (0.3 μ g)。

Fig.5. a. Crude CEV-treated by phenol-chloroform (50 μ g)

b. Purified CEV (about 0.3 μ g)

三、聚丙烯酰胺凝胶双相电泳

经上述方法制得的核酸样品，进一步用聚丙烯酰胺凝胶双相电泳分离回收，获得高纯度的 CEV 样品。该样品经检查为单一的 CEV 电泳带（图 5）

四、CEV 的产量和得率

100g 感病爪哇三七鲜叶，经抽提粗核酸，LiCl 处理，CF-11 层析、聚丙烯酰胺凝胶双相电泳，各纯化步骤所得之产量和产率如表 1。

表 1 CEV-RNA 的产量与收得率

Table 1 Yield and recovery ratio of CEV-RNA

处理步骤	苯酚氯仿处理	2mol/L LiCl处理	CF-11层析	PAGE
回收的核酸量(克)	1.46	1.03×10^{-1}	5.47×10^{-4}	4.39×10^{-6}
产率(%)	1.46	1.03×10^{-1}	5.47×10^{-4}	4.39×10^{-6}

讨 论

类病毒的分离制备，一般需要经过酚抽提、去糖、透析、LiCl 处理，DNase 消化和低温下纤维素 CF-11 层析等复杂步骤^[6,7,8]，而且所获得样品纯度不高，同时，由于步骤烦琐，样品容易损失，低温下层析也给操作带来不便。

我们的方法省去了常用方法中所使用的去糖、透析、DNase 消化等步骤，改变纤维素 (CF-11) 吸附的温度 (-15 $^{\circ}$ C)^[6] 为 4 $^{\circ}$ C，使整个分离制备过程简便，易行，在一般实验室即可进行。此外，实验结果显示，使用该方法有较好的 CEV 回收率，可获得高纯度的 CFV 样品。我们将该方法回收得到的 CEV 用于分子杂交和末端标记，均获得理想的实验结果（有关研究结果将另外报道）。该方法的建立有利于柑桔裂皮病类病毒的研究深入开展。

参 考 文 献

- [1] Duran-vila et al., 1986, *Virology*, 150 : 75.
- [2] 邓俗俊等, 1987, *病毒学报*, 3(1) : 53.
- [3] Sano, T. et al., 1985, *The Journal of General Virology*, 66(2) : 333.

- [4] Singh, R. P. et al., 1986, *Canadian Journal of plant pathology*, 8 : 54.
- [5] Colpan, M. et al., 1983, *Analytical Biochemistry*, 131 : 257.
- [6] Allen, R. N. et al., 1981, *Annals of Applied Biology*, 98(3) : 451
- [7] Niblett, C. L. et al., 1980, *Etiology*, 70(7) : 610
- [8] 周咏芝等, 1986, 中国柑桔, (1) : 15.
- [9] Boulikas, T. et al., 1981, *The Journal of Biochemistry*, 5(4) : 219

An Effective procedure for the Separation and Preparation of Citrus Exocortis Viroid

Ma Xiu-li Xiong Xue-de Xiong Ke-yong

Tan Hai-qing Zhou Yong-zhi

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan)

Viroid is small and exists less in host, which is difficult to purify. General method of purification is phenol extract, remove carbohydrate, dialysis, LiCl partition, DNase degradation and cellulose chromatography. The procedure is complicated, recovery ratio is less and the pure sample which is adapted to all kinds of use can't be gotten.

A procedure for the separation and preparation of citrus exocortis viroid (CEV) is reported. Nucleic acids were extracted from citrus leaves by phenol-chloroform treatment. The extracts were dealt with CF-11 chromatography after treated with LiCl, and finally were carried out on 5% polyacrylamide gel electrophoresis to obtain purified CEV. It is a simple and convenient method. And only simple equipment is sufficient. Ideal samples were obtained for studying CEV, for example, early diagnosis, molecular clone, sequence analysis, research on prevention and cure of CEV, and so on.