

## 小麦黄花叶病毒的分离提纯及其血清学等特性

陈剑平 阮义理

(浙江省农业科学院病毒实验室, 杭州, 310021)

### 提 要

应用梯度离心和超速离心浓缩获得部分提纯的病毒制剂, 产量约为7.45g/kg病叶。提纯的病毒制剂的紫外吸收曲线呈典型的核蛋白吸收曲线, OD<sub>260</sub>/OD<sub>242</sub>和OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>的比值分别为1.24和1.38。病毒粒子呈线状, 宽13—14nm, 长度主要分布于250—300nm和550—700nm之间, 1000nm以上的粒子也有检出。病毒外壳蛋白仅由一个分子量约为30Kd的亚基组成。在免疫电镜试验中, 病毒粒子与日本WYMV抗血清发生强烈的血清学反应。新鲜病叶的超薄切片中可看到大量风轮体和膜状体。

**关键词:** 小麦黄花叶病毒(WYMV) 提纯 外壳蛋白 免疫电镜

自七十年代中期以来, 陕西省关中渭河流域的小麦植株上发生了一种叶片呈黄色花叶、由土壤中禾谷多粘菌 *Polymyxa graminis* 传播的病毒病<sup>[1]</sup>。张秦凤等研究了该病的一些生物学特性, 认为是小麦梭条斑花叶病(WSSMV)<sup>[1]</sup>。据我们对该病毒的血清学 and 外壳蛋白亚基组分的研究认为称小麦黄花叶病(WYMV)更为确切, 本文报道有关该病毒的提纯、粒子性质、血清学和内含体超微结构的一些研究结果。

## 材 料 与 方 法

### 一、病毒来源

1988—89年3月在陕西省长安县小麦发病田间, 采集典型症状的病株, 称重, 贮于-20℃下以供病毒提纯使用, 或直接固定, 作为内含体超微结构观察材料。

小麦梭条斑花叶病(WSSMV)病株于同期采自江苏省里下河地区农科所小麦病圃, 以同样处理备用。

### 二、病毒分离提纯

根据文献<sup>[2]</sup>, 稍作修改和简化。400g冰冻小麦病叶, 绞肉机绞碎, 加入1,200ml(0.5mol/L)磷酸钾缓冲液pH7.0匀浆, 双层纱布过滤, 得汁液约1,200ml, 加300ml CCl<sub>4</sub>, 剧烈摇动5min, 静置10min, 上层液经5,000r/m离心20min, 取上清, 加入6%PEG(分子量6000), 3% NaCl和1%

本文于1989年4月24日收到

\*浙江省自然科学基金会资助项目

张秦凤、邹晓和协助采集毒源, 洪健、董玛佳参加部分实验。

Triton x-100 充分溶解, 4℃过夜, 经8,000r/m 离心 20min, 取沉淀用同样缓冲液悬浮, 10,000 r/m离心20min, 取上清, 沉淀重复悬浮离心2次, 合并3次离心后所得的上清, 总体积约120ml, 然后经25,000r/m (HITACHI RP544转子) 离心2h (每管铺有5ml20%蔗糖垫, 内含0.3% Triton x-100), 沉淀以同样方法悬浮, 重复3次, 得悬浮液共约10ml, 接着经30,000r/m (HITACHI RP80T-3转子) 离心1.5h, 沉淀悬浮成1ml, 进行10—15%蔗糖密度梯度离心, 22,000r/m (HITACHI RPS65-T转子) 离心3小时, 取离心管上部1/3处的病毒层, 用同种缓冲液稀释后, 经40,000r/m (HITACHI RP80T-3转子) 离心1h, 最后将沉淀悬浮于1ml 0.1mol/L磷酸钾缓冲液 pH7.0, 获得病毒部分提纯制剂。

用同样步骤提纯WSSMV。

### 三、病毒样品检测

1. 病毒纯度检测 参照文献<sup>[2]</sup>

2. 病毒形态大小 参照文献<sup>[3]</sup>

3. 免疫电镜技术 应用免疫电镜技术<sup>[4]</sup>进行此病毒的血清学研究。WYMV抗血清由日本九州农业试验场宇杉富雄博士提供; 马铃薯Y病毒(PVY)抗血清由农业部植物检疫实验所张成良研究员赠送。

(1) “捕获”法: 取20μl经0.05mol/L碳酸钠缓冲液pH9.6稀释500倍的WYMV抗血清滴在石蜡板或Parafilm上, 将具有Formvar膜的铜网膜面朝下浮于抗血清液滴上, 室温下静置1h, 取出, 用0.06mol/L磷酸缓冲液pH7.0 30滴轻轻冲洗, 吸干, 膜面朝下覆盖在病叶浸出液(0.1g病叶: 1ml缓冲液)上4℃保湿过夜。再经20滴缓冲液冲洗, 6滴1%磷酸pH7.0负染, 置Optiqn EM109电镜观察, 并统计任意10<sup>3</sup>μm<sup>2</sup>面积上的病毒粒子数量。

(2) “修饰”法: 铜网按上述步骤进行抗血清包被, 病毒捕获和缓冲液冲洗, 然后再将膜面朝下浮于WYMV抗血清(稀释20倍), 保持30min, 最后再经缓冲液冲洗, 6滴磷酸负染, 电镜观察。

用PVY抗血清代替WYMV抗血清, 按同样步骤进行病毒的“捕获”和“修饰”试验。

4. 病株细胞内含体的超薄切片 取新鲜病叶, 切成2×3mm<sup>2</sup>的小块, 立即浸没于5%戊二醛固定液(0.1mol/L磷酸缓冲液pH7.2配制)。按常规戊二醛、锇酸双固定, 系列浓度乙醇脱水, Epon812浸透包埋, ULTRACUT E型超薄切片机切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双染色, JEOL JEM-1200电镜观察。

### 四、病毒外壳蛋白的亚基及其分子量

用此病毒和WSSMV制剂在同一块凝胶上进行电泳, 方法参照文献<sup>[5]</sup>。

## 结果与分析

### 一、病毒分离提纯

主病毒只感染小麦, 且在病株组织中含量很低, 在提纯过程中线状病毒容易断裂或凝聚以致丢失。许多提纯程序均未能获得理想的病毒制剂。我们的提纯方法有效地克服了上述问题, 所获得的病毒制剂在电镜下可看到大量线状病毒粒子, 很少有杂质(图1), 产量达7.45mg/kg病叶。高浓度(0.5mol/L)中性磷酸钾缓冲液对此病毒的抽提很有效, 这可能是此缓冲液可有效地克服线状病毒的高度凝聚, 使其在低速离心时不

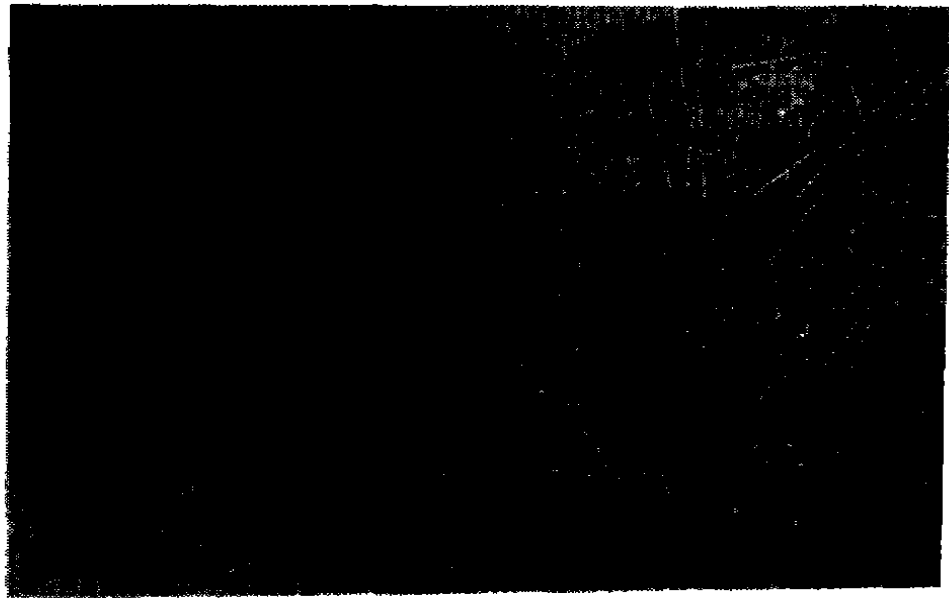


图1 小麦黄花叶病毒 (WYMV) 提纯制剂电镜照片  
(A) 1% 醋酸铀 pH5.5 负染; (B) 1% 磷钨酸 pH7.0 负染, 标尺 300nm  
Fig. 1. Electron microscope photos of purified wheat yellow mosaic virus (WYMV) stained in  
(A) 1% UAC, pH5.5; (B) 1% PTA, pH7.0. Bar represents 300nm

致被大量丢失。Triton x-100的存在, 不仅有利于病毒粒子从寄主组织中充分释放出来, 而且也能在一定程度上克服病毒粒子的凝聚现象。蔗糖垫除了给病毒粒子在强大的离心力作用下沉提供缓冲作用以致不大量断裂外, 更重要的是还可以有效地滤去游离的寄主核酸和蛋白, 以促使病毒进一步纯化。

## 二、病毒粒子的一些性质

### 1. 紫外吸收曲线

提纯制剂紫外吸收呈典型的核蛋白吸收曲线, 吸收峰和吸收谷分别为 260 和 242nm 处,  $OD_{260}/OD_{242}$  和  $OD_{260}/OD_{280}$  分别约为 1.38 和 1.24。约在 290nm 处有一个“肩”(图 2)。

### 2. 电镜观察

纯化的病毒经电镜观察, 可看到大量线状病毒, 很少有杂质。如用 1% 醋酸铀 pH5.5 染色, 病毒粒子粗细不匀, 呈弯曲(图 1-A); 但用 1% 磷钨酸 pH7.0 染色, 则病毒粒子粗细均匀, 呈刚直(图 1-B)。由此表明, 病毒粒子在中性条件下较为稳定, 在酸性条件下其结构分裂或受到影响。

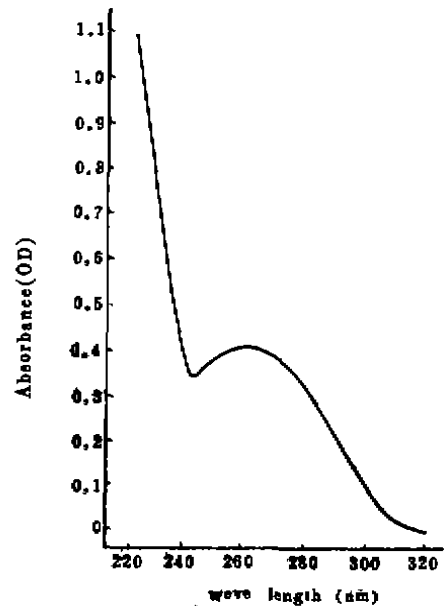


图2 陕西WYMV提纯制剂的紫外吸收曲线  
Fig. 2. UV absorption spectrum of WYMV preparation from Shanxi

### 3. 病毒粒子长度

病毒粒子宽13—14nm, 长度分布在250—300nm和550—700nm形成二个主峰(图3) 分别用醋酸铀或磷钨酸染色, 测定4批病毒制剂共1200个病毒粒子, 测得前者200nm和625nm的粒子各占25%和42%(图3a), 后者250nm和625nm的粒子各占26%和41%

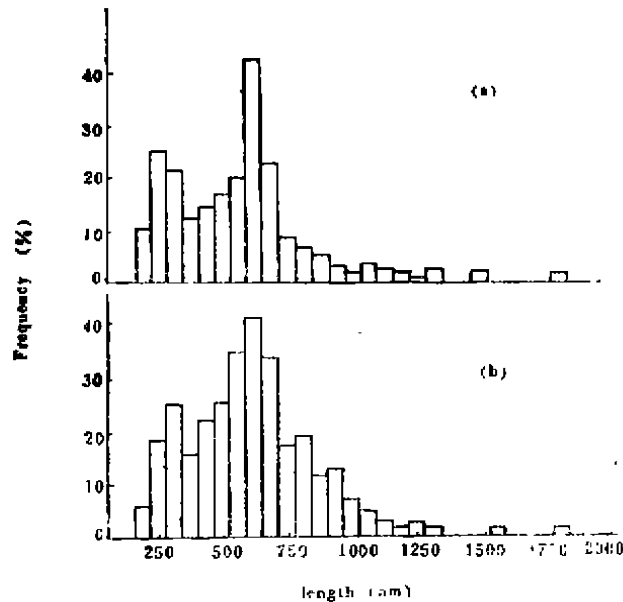


图3 陕西WYMV提纯制剂粒子长度分布

(a) 1%醋酸铀pH5.5负染;

(b) 1%磷钨酸pH7.0负染;

Fig.3. Histograms showing particles length distributions of purified WYMV preparation from Shanxi measured by an image analysis computer

a) stained with 1% UCA pH5.5;

b) stained with 1% PTA pH7.0.

(图3b)。其中550—700nm长的粒子数量, 磷钨酸染色的比醋酸铀染色的多。

### 4. 病毒外壳蛋白亚基及其分子量

本病毒提纯制剂经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 出现一条很浓的病毒外壳蛋白带, 其分子量约为30kd(6次重复平均值)(图4)。相比之下, WSSMV制剂在分子量约为30kd和27kd(6次重复)处出现二条蛋白质带(图4)。

### 三、血清学

应用常规电镜技术, 检测病汁液中的病毒粒子, 每 $10^3\mu\text{m}^2$ 只能查到几个病毒粒子, 相比之下, 用WYMV抗血清包被铜网, 进行“捕获”法免疫电镜试验, 则从同样病汁液中所测得的病毒粒子数每 $10^3\mu\text{m}^2$ 超过400个, 比常规电镜观察的灵敏度提高100倍, 而用PVY抗血清代替WYMV抗血清, 所检测到的粒子数量则没有明显增加, 可见WYMV抗血清可特异地“捕获”本病毒粒子。同样, 在“修饰”试验中, 病毒粒子周围均匀地包上了一层厚厚的WYMV抗血清外套(图5), 即所谓免疫桥之意。而用PVY抗血清处

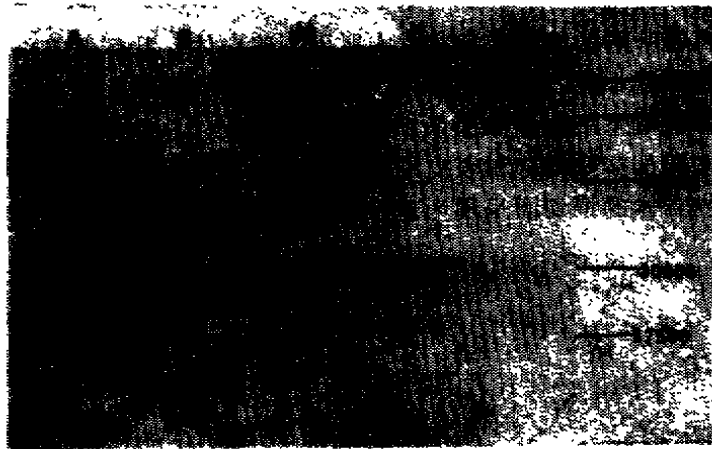


图4 病毒制剂SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

A, B: 不同浓度的小麦梭条斑花叶病毒

C, D: 不同浓度的陕西小麦黄花叶病毒

M: 标准蛋白

Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified virus preparations

A, B: different concentrations of WSSMV

C, D: different concentrations of Shanxi WYMV

M: protein standards



图5 日本WYMV抗血清对陕西小麦病毒分离物的修饰, 标尺300nm

Fig. 5. Decoration of Shanxi wheat virus with antiserum to WYMV Japanese isolate, Bar represents 300nm

理, 则未见此现象。由此表明, 此病毒分离物与日本WYMV抗血清具有强烈的血清学反应。

#### 四、内含体的超微结构

发病初期呈现花叶病的细胞质丰富，内质网、线粒体、叶绿体等细胞器膨大，核糖体数量巨增，出现大量小囊，有些小囊中含有类似纤维状物质。发病后期呈黄化的老叶，细胞器多解体，剩下细胞壁和大量细胞质内含体。

病叶叶肉、木质部薄壁细胞和表皮细胞中最明显的变化是出现大量柱状（风轮状）内含体。风轮状内含体的横切面呈现为若干个“曲臂”绕轴伸展（图3），而其纵切面

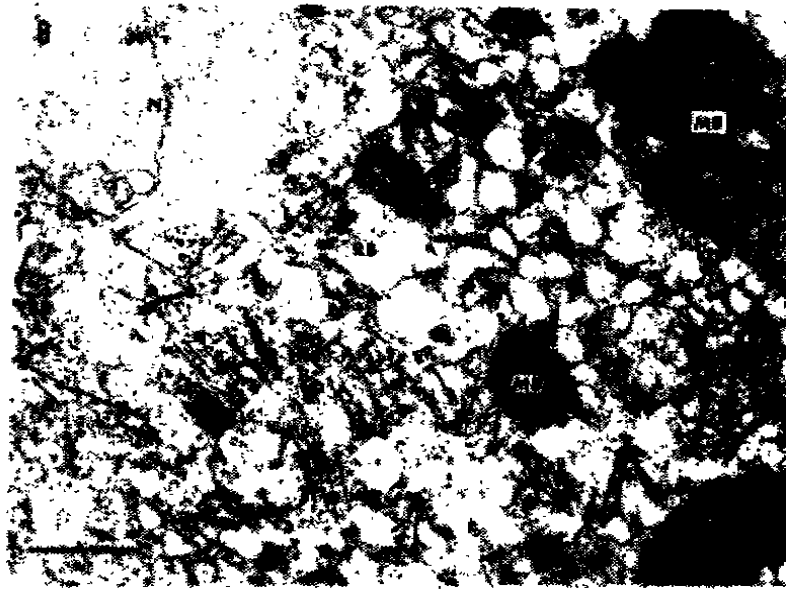


图6 感染WYMV的小麦细胞超薄切片

病叶细胞质中分布着大量与内质网相联的膜状体，柱状或风轮状内含体及板状集结体（箭头）。标尺1 $\mu$ m

Fig. 6. Thin section of wheat leaf cell infected with WYMV. Numerous membranous bodies connecting with endoplasmic reticulum, cylindrical or pinwheel inclusions and laminated aggregates (arrows) scattered through the cytoplasm. Bar represents 1  $\mu$ m.

则表现为若干个平行的束状结构，且一端与内质网相连（图6），有时也可见到几片“曲臂”重叠而成的板状体集结体（图6），但未见环状体。这些特征性内含体都是马铃薯Y病毒组成员所具有的，根据Edwards<sup>on</sup> (1974)<sup>(9)</sup>内含体分类体系属第II亚组。

病叶细胞中所出现的另一个显著特征是膜状体（图6）。膜状体呈三维空间分布，小的似线粒体，大的如细胞核，甚至几乎充满整个细胞。内质网呈辐射状与膜状体相连（图6）。

### 结 论 和 讨 论

陕西小麦黄花叶病毒（WYMV）由禾谷多粘菌传播，仅感染小麦。其病毒粒子长度为200—300nm（多为250nm）和550—700nm（多为625nm），也有少数粒子长度超过

1000nm。病毒外壳蛋白仅由一种分子量约为30kd的亚基组成。这些性质都与日本报道的标准WYMV相同<sup>[6,7]</sup>。用日本WYMV的抗血清与本病毒进行免疫电镜试验,结果也表明两者具有强烈的血清学反应。

不过,尽管Usugi和Saito(1979)<sup>[7]</sup>认为WYMV和另一种土传病毒—小麦梭条斑花叶病毒(WSSMV)相同,或者说,WSSMV是WYMV的一个株系,因为两者不管在症状,寄主范围,病毒形态、浮力密度、汁液稳定性还是血清学、内含体等方面都具有共同的特性。但是,我们认为两者的外壳蛋白亚基数不同,WSSMV含有二种外壳蛋白亚基,分子量为33Kd和26.5Kd<sup>[8]</sup>,或30kd和27Kd<sup>[3]</sup>,而WYMV只含有一种外壳蛋白亚基,其分子量为33Kd<sup>[8]</sup>或30Kd。所以,要确定WYMV和WSSMV是否同一种病毒,尚需进一步研究。

### 参 考 文 献

- (1) 张秦凤等, 1988, 病毒学杂志 1: 94—97
- (2) 陈剑平等, 1989, 植物病理学报 19(1): 35—39
- (3) 陈剑平等, 1989, 病毒学杂志 2: 176—181
- (4) Hill, S.A., 1984, *Methods in plant virology*, p150—153, Blackwell Scientific Publications, London
- (5) Edwardson, J.R., 1974, *Fla. Agric. Exp. Sta. Monogr. Ser. 4*, 398
- (6) Usugi, T. and Y., Saito, 1976, *Ann. of the Phytopathol. Soc. of Jap.* 42, 12—20
- (7) Usugi, T. and Y., Saito, 1979, *Ann. of the Phytopathol. Soc. of Jap.* 45, 397—400
- (8) Usugi, T. and Y., Saito, 1987, *Abstracts of papers given at a meeting on viruses with fungal vectors held at Scotland*, p29, the Association of Applied Biologists

## Purification, Serology and Other Properties of Wheat Yellow Mosaic Virus (WYMV)

Chen Jian-ping Ruan Yi-li

(Virology Laboratory, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences,  
Hangzhou, 310021)

Wheat yellow mosaic virus (WYMV) has been occurred on wheat in Shanxi province since 1970s. The virus preparation was purified from naturally infected wheat plants by extracting in 0.5mol/L potassium phosphate buffer pH7.0, clarifying in 1/4 v carbon tetrachloride, precipitating with 6% PEG, 3% NaCl and 1% Triton X-100 followed by two cycles of differential centrifugations with 20% sucrose cushions containing 0.3% Triton X-100 and finally centrifuged in 10—50% sucrose density gradients. The yields of virus preparation were about 7.45 mg/kg leaves. Purified virus preparation showed a typical UV spe-

ctrum of a nucleoprotein with max. and min. absorption at 260nm and 242nm, respectively, the ratios of  $OD_{260}/OD_{242}$  and  $OD_{260}/OD_{280}$  were 1.24 and 1.38. Purified virus preparations contained filamentous particles measuring 13-14 nm in width, 250-300 nm, 550-700 nm in length, and contained a single polypeptide species of mol. wt of c. 30 kd. The virus particles were serologically trapped and decorated by Japanese antiserum against WYMV in immunosorbent electronmicroscopy (ISEM) tests. Numerous cylindrical inclusions (pinwheel) and complex membranous bodies in the cytoplasm of fresh infected wheat leaves were observed with an electron microscope.

**Key words:** Wheat yellow mosaic virus (WYMV) Purification  
Viron coat protein Immunosorbent electronmicroscopy  
(ISEM)