维普资讯 http://www.cqvip.com

第6卷第2期
1991年6月

病毒学杂志
VIROLOGICA SINICA

Vol.6 No.2
Jun.1991

一株辣椒花叶病毒的生化特性研究

薛翠峰　周履谦　熊克娟　孙富林

（中国科学院武汉病毒研究所，武汉，430071）

提　要

本文对辣椒花叶病毒的生化特性进行了研究。病毒蛋白的紫外吸收，最高280毫微米，最低为260毫微米；以SDS-PAGE测定其分子量为17500；病毒蛋白亚基由148个氨基酸组成。从病毒提纯的核酸为线状RNA；紫外吸收最高为260毫微米，最低230毫微米；经聚丙烯酰胺凝胶电泳测定，其分子量为2.0×10^6。根据形态结构、血清学试验、外壳蛋白亚基组成、核酸和蛋白的分子量等综合分析，我们认为这株辣椒花叶病毒是烟草花叶病毒组（TMV）中的一个毒株。

关键词：辣椒花叶病毒　外壳蛋白　氨基酸

辣椒是我国人民普遍喜爱的蔬菜。近年来，病毒病已成为我国辣椒高产、稳产的主要限制因素。盛发期（8月）田间感染率在80%左右，一般减产20—40%。目前尚无高抗品种和其它有效的防治措施。1981年，吉林省蔬菜研究所杨永林先生曾在长春辣椒病株中发现一株杆状病毒，并对其形态结构、病状表现、寄主范围、传毒媒介和体外抗性等方面进行了报道[1]。本文在此研究的基础上，对该株花叶病毒（简称CaMV）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组中的一个毒株。由于对辣椒花叶病毒的一些基本特性的了解，从而可能对辣椒病毒病害的综合防治和有目地开展抗病毒病育种提供一定的科学依据及必要措施。

材料和方法

一、病毒的提纯

1、毒源由吉林省蔬菜研究所杨永林先生提供。在防虫温室内的健康普通烟上增殖。感染后收集典型病叶，放低温冰箱保存，以备提纯之用。

将冰冻材料按1：2的体积加0.05mol/L PBS pH7.4，用组织捣碎机捣碎后，经4层纱布过滤，按所得滤液量的20%加入氯仿，3000r/m 30分钟离心取上清，用PEG（6000）7%进行沉淀，再加沉淀物1：1.5的0.05mol/L PH7.4 PBS缓冲液匀浆洗脱病毒，4000r/m 30分钟离心，留上清，沉淀再重复3次。最后将3次上清总和用105,000g 2小时超速离心，获提纯的病毒材料。

2、用提纯的病毒样品制铜网，以2%的磷钨酸负染，在JEM-100C电镜上观察并进行紫外吸收光谱测定。

本文于1990年9月4日收到；1990年11月20日修回。

维普资讯 http://www.cqvip.com

二、血清学测定 参照田波等人的方法[2]。用普通烟草花叶病毒的抗血清，经免疫双扩散法测定辣椒花叶病毒、油菜花叶病毒（YMV—15）和烟草花叶病毒普通株（TMV）之间的血清学亲缘关系。

三、病毒外壳蛋白的分析

1、外壳蛋白的提取[3]：按醋酸提取法于17℃的病毒液中滴加2倍体积的冰醋酸，离心除去沉淀。将上清转入透析袋中，用蒸馏水进行透析，至透析液接近pH4.7时，滴加3 mol/L pH4.7的醋酸缓冲液40ul，10000r/m 10分钟离心收集蛋白沉淀，再用双蒸水悬浮蛋白35000r/m 1小时除去杂蛋白，紫外扫描呈典型蛋白吸收曲线。

2、外壳蛋白分子量的测定：采用Laemmli方法[4-5]。浓缩胶和分离胶分别为4%和10%，电压200V，室温下电泳4小时。电泳后用考马斯亮兰R-250染色。标准蛋白用上海生化所东风试剂厂产品。

四、外壳蛋白的氨基酸组份分析 病毒外壳蛋白1mg/ml与5.7N HCl 1ml装入硬质玻璃管内，排除空气封口，于105—110℃水解24小时，再用10℃水浴蒸发去HCl。样品在日立835-50型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的二甲基苯甲醛法[7]测定。

五、核酸的分析

1、用苯酚法抽提核酸[8-9]。取纯化的病毒液5ml，加入同体积的水饱和酚（内含0.3%SDS 8—羟基喹啉1mg/ml）与0.01mol/LPBS pH7.4的混合液，强烈震荡10分钟，5000r/m 10分钟离心取水相。再加1/2体积酚—PBS混合液抽提。重复3次。取水相加等体积乙醚(去过氧化物)抽提水相中的酚，反复3次。水相加入1/10体积3 mol/L NaAc和2.5倍体积的4℃冷乙醇，置—20℃冰箱过夜。17000r/m 15分钟离心收集核酸沉淀。再用70% 4℃冷乙醇洗3次，真空泵抽气除去乙醇及部分水份。RNA溶于0.1mmol/L EDTA pH7.0中，置—15℃冰箱保存备用。

2、核酸的电泳方法参考[10-11-12]。采用TBE电泳缓冲液，用2.5%聚丙烯酰胺（内含0.5%琼脂糖）复合凝胶垂直板电泳。同时用TMV-RNA、E.Coli-RNA23S和16S作为参照RNA。电压60V、电流10mA、时间7小时。

3、核酸的电镜观察：根据生物粒子带有一定负电荷的性质，核酸的展层采用静电泳动展开的方法[13]。先将核酸样品放置静电电场中，核酸在电场作用下向正极泳动，逐渐展开。再用铜网沾取样品，染色脱水后，于高真空下用铂—钯合金旋转喷镀，置电镜下观察。

结果和讨论

一、辣椒花叶病毒纯度测定

通过聚乙二醇沉淀及差速离心提纯的病毒，其核蛋白紫外吸收曲线如图1。吸收高峰在260nm，低峰在250nm，260/280的比值为1.20，260/250的比值为1.10。

将一定浓度的病毒悬液，滴在Formvar-碳膜的铜网上，用2%磷钨酸负染，在JEM-100C型电子显微镜下观察，为均一的杆状病毒粒子，长度多数为280—320nm，宽度为18—20nm。见图2。

二、血清学反应。烟草花叶病毒普通株的抗血清与烟草花叶病毒普通株、油菜花叶病毒（YMV-15）、辣椒花叶病毒有明显的沉淀线形成，而油菜花叶病毒（YMV-15）和辣椒花叶病毒的沉淀线完全愈合，说明它们之间有近缘的血清学关系。见图3所示。

维普资讯 http://www.cqvip.com

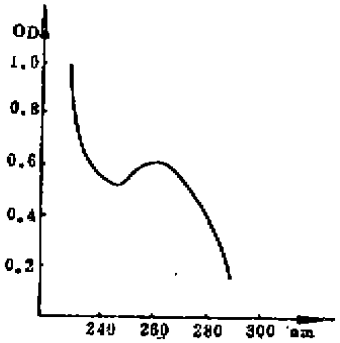

图1　CaMV核蛋白曲线

Fig.1　Ultraviolet absorption spectra of CaMV nucleoprotein

图2　电镜下的CaMV病毒粒子×50000

Fig.2　Electron micrograph of CaMV particles ×50000

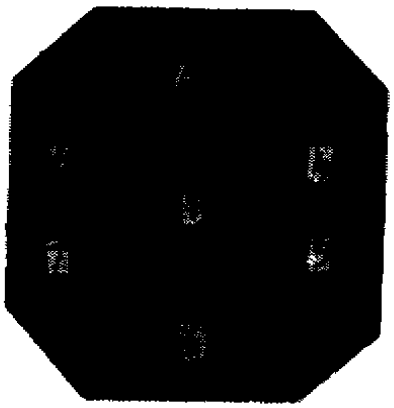

图3　CaMV的琼脂双扩散试验

1. TMV抗血清　2. 5. 健康对照

3. 8. 辣椒病叶抗原　4. YMV-15抗原

7. TMV抗原

Fig.3　The agar double diffusion of CaMV

1. TMV antiserum

2. 5. Health plant as a check

3. 6. CaMV antigen

4. YMV-15　7. TMV antigen

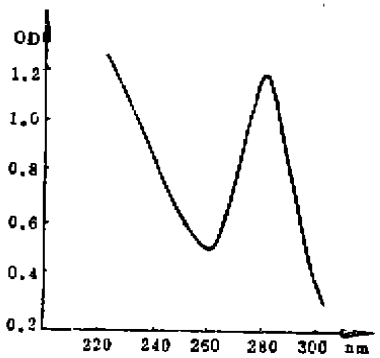

图4　CaMV外壳蛋白的吸收曲线

Fig.4　Absorption curve of CaMV coat proteins

三、病毒外壳蛋白分子量的测定

由冰醋酸法提取的CaMV外壳蛋白，测定其紫外吸收曲线，见图4。最高吸收峰在280nm，最低吸收峰在260nm。280/260的比值为2.4，与烟草花叶病毒组外壳蛋白的紫吸收曲线相似。

维普资讯 http://www.cqvip.com

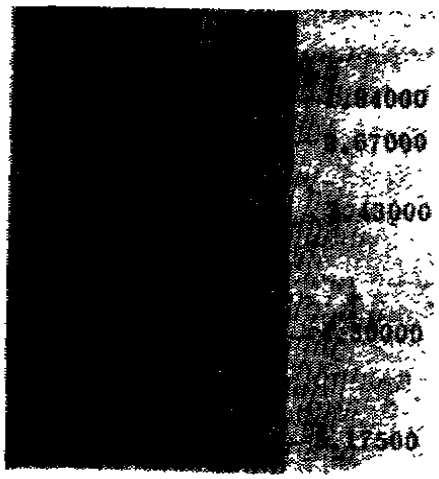

图6 CaMV外壳蛋白的SDS—PAGEA图
A.1.磷酸化酶 2. 牛血清白蛋白 3. 肌动蛋白
4.碳酸肝酶 5. TMV外壳蛋白
B.5.CaMV外壳蛋白
Fig. 5 SDS-PAGE of coat proteins
A. Standard proteins B. CaMV coat proteins

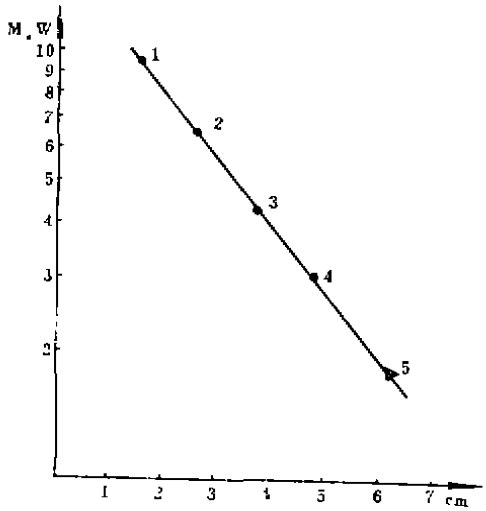

图6 CaMV外壳蛋白分子量的测定
1.磷酸化酶(9400) 2.牛血清白蛋白(67000)
3.肌动蛋白(43000) 4.碳酸肝酶(30000)
5.TMV外壳蛋白(17500) △CaMV外壳蛋白
Fig.6 Estimation of molecular weight of CaMV coat protein Standard proteins
1.Phosphorylase b(94000) 2.Albumin(67000)
3.Actin(43000) 4.Carbonic Anhydrase(30000)
5.TMV coat proteins(17500) △ CaMV

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法测定外壳蛋白的分子量。将已知分子量的磷酸化酶B、牛血清白蛋白、肌动蛋白、碳酸酐酶和烟草花叶病毒外壳蛋白作为测定分子量的标

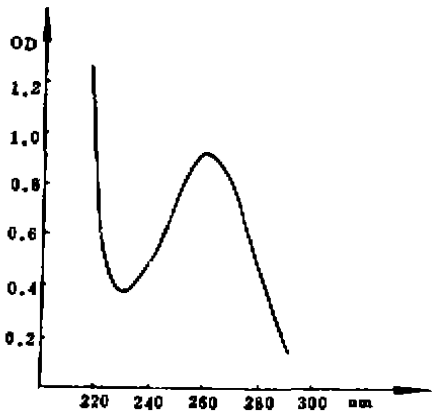

图7 CaMV核酸的吸收曲线
Fig.7 Absorption curve of CaMV nucleic acid

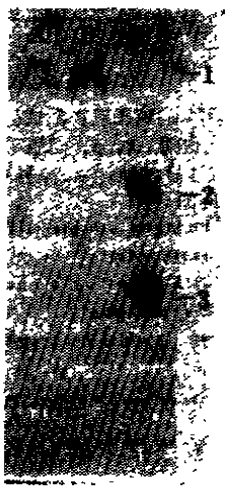

图8 CaMV核酸的PAGE图
A_1 TMV-RNA B.1 CaMV-RNA
C 2. 3. E. coli r-RNA 23S 16S
Fig.8 PAGE of CaMV nucleic acid
A.1 TMV-RNA B.1 CaMV-RNA
C.2.3.E coli r-RNA 23s, 16s

维普资讯 http://www.cqvip.com

准。电泳结果见图5。

在用标准蛋白电泳时的迁移距离作横坐标，以标准蛋白分子量的对数作纵坐标的坐标准曲线中，辣椒花叶病毒外壳蛋白的分子量大约为17,500，见图6所示。

四、病毒外壳蛋白亚基的氨基酸分析

用日立835-50型氨基酸分析仪以及用化学法测定半胱氨酸和色氨酸。结果表明辣椒花叶病毒的蛋白亚基由148个氨基酸组成。其蛋白亚基各氨基酸的个数分别为：Asp(16)、Thr(11)、Ser(13)、Glu(17)、Pro(6)、Gly(7)、Ala(13)、Cys(1)、Val(13)、Met(2)、Ile(8)、Leu(12)、Tyr(6)、Phe(8)、Lys(2)、His(1)、Arg(9)、Trp(3)，见图10。

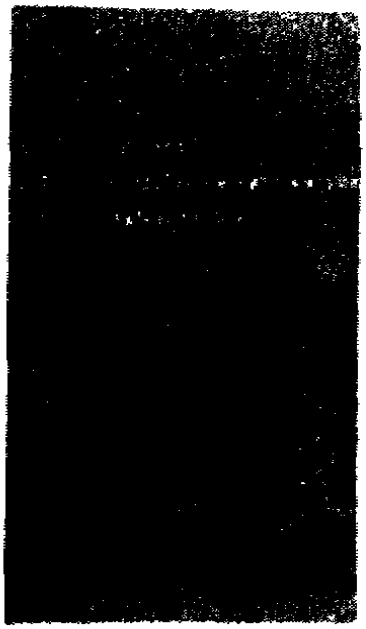

图9　CaMV核酸的电镜图（×30000）
Fig.9　Electron micrograph of CaMV nucleic acid(×30000)

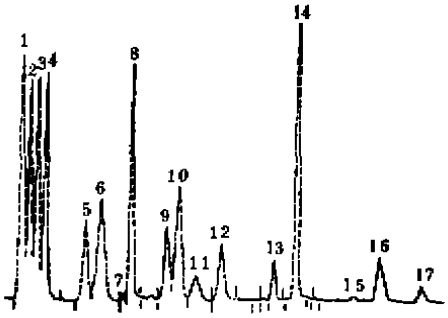

图10　氨基酸组分
Fig.10　Amino acid composition
1.Asp(16) 2.Thr(13) 3.Ser(13) 4.Glu(17) 5.Gly(7) 6.Ala(13) 7.Met(2) 8.Val(13) 9.Ile(8) 10.Leu(12) 11.Cys(1) 12.Lys(2) 13.Tyr(6) 14.Phr((8) 15.His(1) 16.Arg(9) 17.Pro(9)

五、核酸的分析。从纯化病毒提取的核酸经地衣酚显色法确定为RNA，经紫外吸收光谱测定呈典型核酸吸收峰，如图7所示。最高吸收在260nm，最低吸收在230nm。260/230的比值为3.1，260/280的比值为2.0。

核酸的聚丙烯酰胺凝胶电泳如图8所示。在电泳图中显示出一条带，其迁移距离与参照的TMV-RNA相同，证明其分子量大约为2.0×10^6。

用静电泳动核酸电镜技术制作的核酸展层照片如图9所示。证明辣椒花叶病毒的核酸是线状RNA。

杨永林[1]在1981年从辣椒上分离的这株杆状病毒，对其形态结构、症状表现、寄主范围、传毒媒介和体外抗性等方面曾进行了研究，证明该毒株与烟草花叶病毒有一定的亲缘关系。本文从辣椒花叶病毒的血清学反应、外壳蛋白性质、分子量及核酸的某些性质等几个方面来看，亦均在TMV组的一定特性之内。但从外壳蛋白亚基的氨基酸组份来看，该毒株只有148个氨基酸，含有2个甲硫氨酸和1个组氨酸，与油菜花叶病毒（YMV-

维普资讯 http://www.cqvip.com

15）亲缘关系很近，这一点与血清学试验吻合。油菜花叶病毒（YMV-15）的外壳蛋白亚基有149个氨基酸，含有3个甲硫氨酸和1个组氨酸[14]。所以我们认为，毒株的区别除寄主差异和血清反应等外，蛋白亚基的氨基酸组份和顺序，以及核酸的组份和顺序的差异从分子生物学水平为鉴别不同毒株或分离株提供依据。

参 考 文 献

〔1〕杨永林等，1981，吉林农业科学，第3期67—75。
〔2〕田波等，1987，植物病毒研究方法，PP.263—265，科学出版社。
〔3〕H.Fraenkel-Conrat, 1957, *Virology* 4: 1—4。
〔4〕Laemmli U.K. 1970, *Nature* 227: 680—685。
〔5〕张尤翔等，1982，生化实验方法和技术，PP.112—116，人民教育出版社。
〔6〕Ellman.G.L, 1959 *Arch, Biochem.Biophy.*82: 70。
〔7〕Spied, J.R, and D.C.Chember, 1946 *Anal.Bhem.* 21: 1248—1266。
〔8〕A.Glerer, G.Schramm, 1956 *Nature* 177: 702。
〔9〕H.Fraenkel-Conrat 1961, *Virology* 14: 54—59。
〔10〕蔡良琬等，1987，核酸研究技术，PP.129—138，科学出版社。
〔11〕王小凤等，1983，植物病理学报，3：29—35。
〔12〕黄传贤等，1984，植物病理学报，3：153—158。
〔13〕梁世平等，1990，静电泳动核酸电镜技术，待发表。
〔14〕陈楳华等，1986，病毒学杂志，1：47。

Study on Biochemical Characteristics of a Capsicum Mosaic Virus

Xue Cui-feng Zhou Lu-qian Xiong Ke-juan Sun Fu-lin

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

A Capsicum Mosaic Virus (CaMV) was studied on some biochemical characteristics. UV-absorbance curve of viral protein at 280nm is maximum, at 260nm is minimum. The molecular weight of coat protein is 17500, consisting of 148 amino acid residues. The purified nucleic acid is confirmed as linear RNA, UV absorbance of virus RNA at 260nm is maximum, at 230nm is minimum. Polyacryamide gel electrophoresis of viral RNA showed that molecular weight is about 2×10^6. On the basis of the morphological structure of the virion, serological test, amino acid composition of coat protein subunits and molecular weight of virus RNA and protein, we preliminarily conclude that the CaMV is a strain of Tobocco Mosaic Virus.

Key words: Capsicum Mosaic Virus Coat protein Amino acid