

765-370

第6卷第4期
1991年12月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 6 No. 4
Dec. 1991

草莓伪温和黄边病毒提纯技术的研究

吴元华 韦石泉

(沈阳农业大学, 沈阳 110161)

S436.68
S432.41

提 要

纯化的草莓伪温和黄边病毒(SPMYEV), 小叶嫁接繁殖于指示植物草莓 UC-4上, 然后采样榨汁, 结合聚乙二醇(PEG)沉淀, 蔗糖垫底差速离心及连续性蔗糖密度梯度离心, 能成功地将草莓伪温和黄边病毒提纯出来。经电镜观察为丝杆状病毒颗粒, 长×宽为650nm×12-13nm。提纯的病毒制剂, 经紫外分光光度计测定, 呈典型的核蛋白吸收曲线, 其最大值位于263nm, 最小值位于243nm。A260/A280=1.24, 用冰醋酸分解病毒, 提取衣壳蛋白, 经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定其分子量约37000道尔顿。

关键词: 草莓伪温和黄边病毒 提纯程序 衣壳蛋白

草莓伪温和黄边病毒(Strawberry pseudo-mild yellow edge virus, SPMYEV) 国内外研究较少, 据知它可能属于荷兰香石竹潜隐病毒组(Carlavirus group)的一新成员^[1]。目前尚未找到其它适宜的繁殖寄主, 故病毒仍须繁殖于草莓株上。由于提纯病毒所用的感染病毒的草莓叶, 在其榨汁中含很多的多元酚及单宁等物质, 这些物质在榨汁过程中, 易引起该病毒在生体外的集聚或钝化^[1,2]。此外, 本病毒在草莓组织中含量很低, 因此, 从草莓中直接提纯SPMYEV显然相当困难。我们经过多次试验, 摸索到一种较好方案, 能够较满意地从染病草莓中提纯这种SPMYEV。

材 料 和 方 法

一、供试病毒 将从春香品种上分离纯化的SPMYEV(本校植保系植物病毒研究室保存), 以小叶嫁接接种法繁殖于指示植物草莓UC-4上, 采收病叶及叶柄, 用作提纯试验的材料。

二、病毒提纯 设计了几种提纯程序, 包括不同抽提缓冲液, 不同有机溶剂及聚乙二醇沉淀、蔗糖垫底差速离心及连续性蔗糖密度梯度离心等试验。

三、电镜观察 提纯的SPMYEV样品置于载网, 经2%磷钨酸pH 7.0负染5分钟, 自然干燥后进行电镜观察(JEM-100cx)。

四、SPMYEV衣壳蛋白质的分离及分子量测定 衣壳蛋白质分离参照 Fraenkel-conral^[3]的冰醋酸法操作。

采用SDS-聚丙烯酰胺电泳法测其分子量(凝胶浓度为10%, 内含0.1% SDS)。电泳板以考

本文于1991年3月11日收到, 4月4日修回。

马斯亮兰染色, 甲醇-冰醋酸脱色, 标准蛋白质样品, 选用了核糖核酸酶 (ribonuclease, MW 37000), 胰凝乳蛋白酶A (chymotrypsin, MW 25000), 卵清蛋白 (albumin, MW 43000) 及牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, MW 67000)。

结 果

一、抽提缓冲液的选择及其效果

各取冷冻UC-4病叶10g, 分别加入5倍体积的有关缓冲液匀浆, 双层纱布过滤后得粗提液经6000rpm离心20分钟。上清液电镜观察, 调查病毒粒子检出频率, 结果表明, 0.1mol/L硼酸缓冲液pH8.2抽提病毒最好。在电镜下放大4万倍, 50个视野中有病毒粒子42个; 0.5mol/L PB, pH7.5次之, 病毒粒子27个; 0.1mol/L柠檬酸盐缓冲液pH7.0较次, 病毒粒子为12个; 0.05mol/L碳酸盐缓冲液pH9.6, 及0.02mol/L Tris-HCl缓冲液pH7.5, 均未见到病毒粒子。

草莓叶中富含单宁及多种酚类物质, 因此, 为防止病毒纯化, 抽提缓冲液中加入尼古丁, 巯基乙醇及聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等。试验证实, 0.1mol/L硼酸缓冲液pH8.2或0.5mol/L PB pH7.5中, 加入2%尼古丁、0.2%巯基乙醇、2%PVP及0.01mol/L EDTA效果最好。

二、不同有机溶剂澄清病毒效果的观察

取上述粗提液分别加入氯仿等有机溶剂, 振动15分钟后, 5000r/m离心15分钟。取上清, 比较澄清效果。结果表明25%氯仿+8%正丁醇有较好的澄清作用, 溶液呈棕色, 但从最终提纯病毒含量看, 此步澄清仍能引起病毒大量损失, 故不宜采用。

三、PEG沉淀和不同悬浮缓冲液在提纯中的作用

取未经有机溶剂澄清的粗提液, 分别加入6%聚乙二醇(PEG, MW6000)和0.1mol/L NaCl或6%PEG, 0.1mol/L及1% Triton X-100, 冰浴下搅拌至完全溶解, 置4℃过夜, 10000r/m离心30分钟, 此沉淀分别用不同缓冲液悬浮, 再于10000r/m离心20分钟, 上清经电镜观察, 结果表明, 加Triton X-100的, 沉淀呈乳白色, 病毒悬液杂质较少, 而不加Triton X-100的。沉淀呈乳白色, 病毒悬液不净。电镜观察发现, 加Triton X-100者, 病毒粒子分散性好, 且收量较多, 杂质较少; 不加Triton X-100者, 病毒粒子常凝聚成团。

试验证实, 低浓度的缓冲液悬浮效果好。如0.01mol/L PB pH7.2比0.5mol/L PB pH7.2病毒得率高; 另外, 悬浮缓冲液中所含成份也直接影响悬浮效果, 含0.1%PVP和0.001mol/L EDTA的0.01mol/L PB比不含此两种物质的同种缓冲液要好, 比含0.1%巯基乙醇或0.5mol/L尿素的同种缓冲液悬浮效果也要好得多。因此, 在提纯程序中, 采用6%PEG+0.1mol/L NaCl+1% Triton X-100沉淀病毒, 以0.01mol/L PB pH7.2(含0.1%PVP和0.001mol/L EDTA)为悬浮缓冲液有较理想的效果。

四、垫层差速离心

将上述病毒悬液加在20%蔗糖垫(以悬浮缓冲液配制, 15ml/管, 38000r/m离心90分钟, 所得沉淀悬浮于缓冲液中, 再以10000r/m离心15分钟澄清, 同时设无蔗糖垫层差速离心做对照。试验结果表明, 未经蔗糖垫底的样品虽在电镜下也可见到许多病毒粒子, 但凝集现象较重, 且夹杂寄主成份较多; 而通过蔗糖垫底差速离心过程的, 显然病

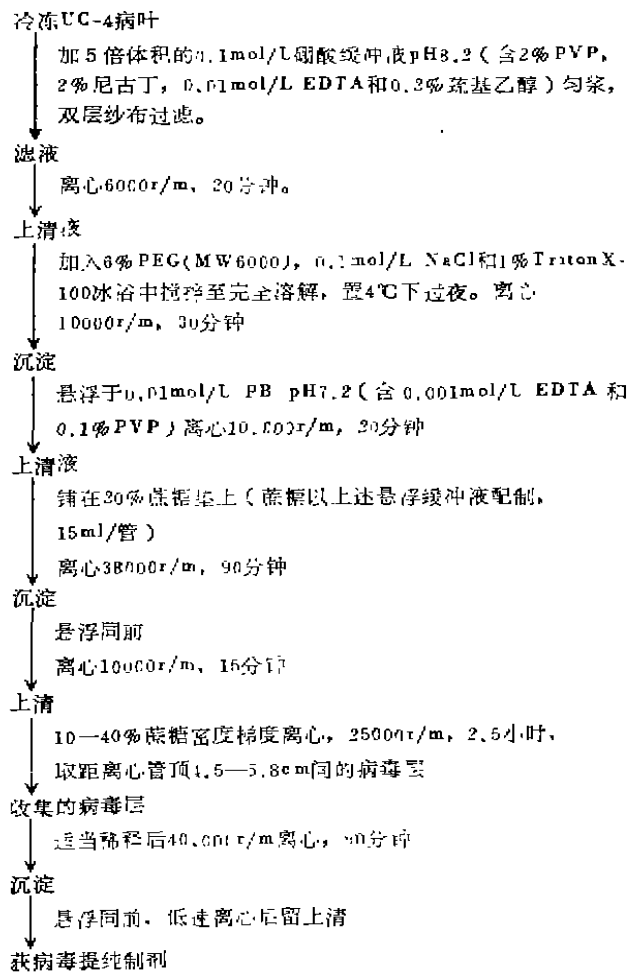
毒纯度大为提高, 病毒粒子数量较多且分散性很好。

五、蔗糖密度梯度离心

将垫层差速离心后得到病毒悬液, 进行蔗糖密度梯度离心。用连续蔗糖梯度(10—40%蔗糖)以上述悬浮缓冲液配制, 经25000r/m吊兰转头(日立SCP85H型)离心2.5小时, 明显看到在距管顶5.2cm处有一条白色絮状带, 电镜下每个视野都充满了SPMYE-V粒子, 很少有杂质。收集此梯度带, 经40000r/m离心90分钟, 取沉淀再悬浮, 即得病毒制剂, 所得病毒量甚少为0.7—1mg/百克鲜叶。

表1 提纯SPMYEV的程序

Table 1 The procedure for purifying SPMYEV



提纯病毒经电镜观察为丝状粒子(见图)。测其230个病毒粒子, 长度集中分布在650nm(图1)。粒子宽12—13nm, 视野中病毒粒子疏松均匀, 并无集聚现象。经紫外分光光度计(岛津UV-120型)测定, 呈典型的核蛋白紫外吸收光谱(图2), 最大吸收值在263nm处, 最小吸收值在243nm, $A_{260}/A_{280} = 1.24$ 。并试以提纯的SPMYEV, 摩擦接种草莓UC-4, EMC, 昆诺藜及苋色藜等植物, 但均未能接种成功。

六、SPMYEV衣壳蛋白质的分离及分子量测定

用冰醋酸法分离出SPMYEV衣壳蛋白, 经紫外分光光度测定, 看到典型的蛋白紫外吸收光谱(图3), 其最大吸收值位于280nm, 最小吸收值位于250nm, $A_{280}/A_{260} = 1.43$ 。

分离的病毒衣壳蛋白经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测试, 测得为一条蛋白质带, 说明蛋白质是均一的。经四次电泳试验测定, SPMYEV衣壳蛋白相对迁移率为0.44(图4), 平均分子量为37000道尔顿。

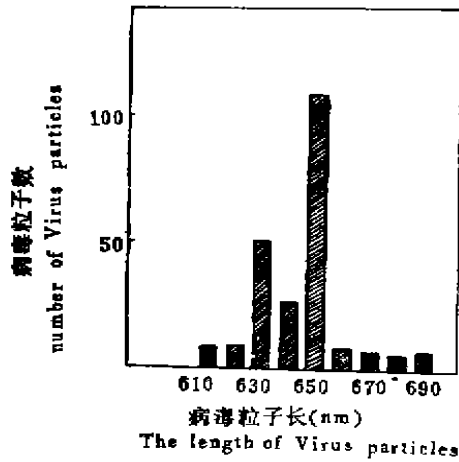


图 1. 提纯SPMYEV粒子长度分布图
Fig.1. The length distribution of purified SPMYEV particles

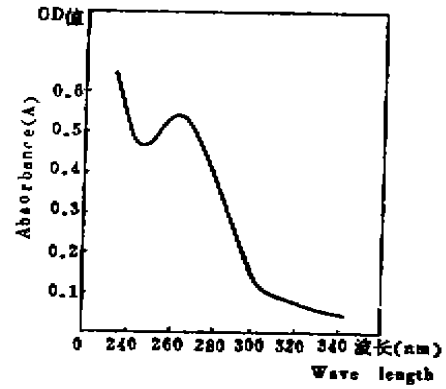


图 2 提纯SPMYEV紫外吸收图谱
Fig.2. UV absorption spectrum of the purified SPMYEV

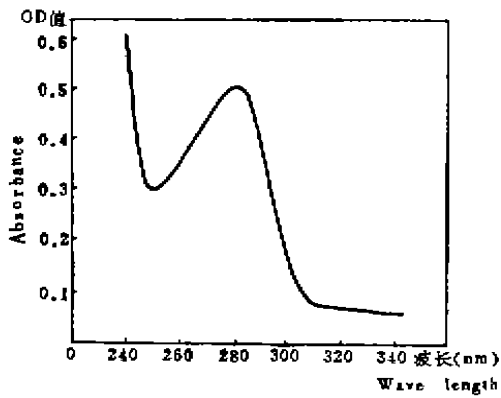


图 3. SPMYEV衣壳蛋白质的紫外吸收图谱
Fig.3. UV absorption spectrum of the coat protein from SPMYEV

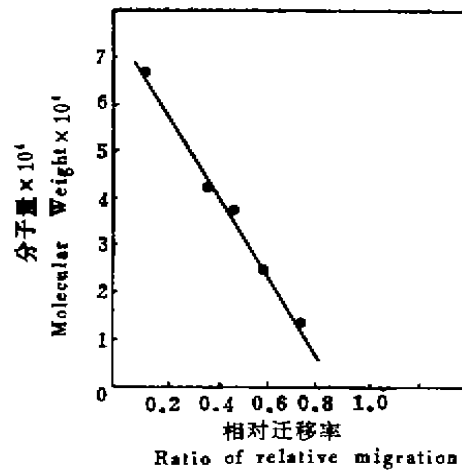


图 4. SPMYEV衣壳蛋白相对迁移率
Fig.4. The ratio of relative migration of the coat protein of SPMYEV

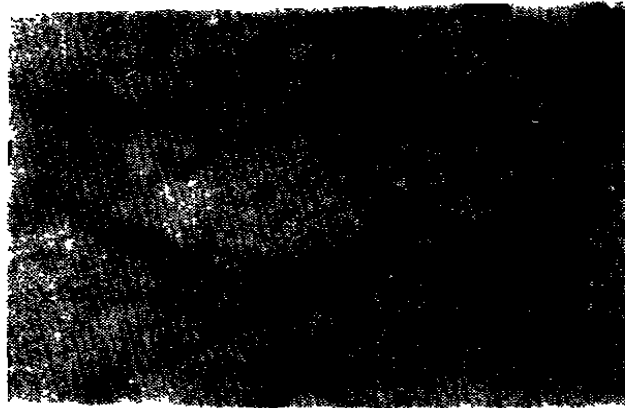


图 5. SPMYEV 粒子形态、标尺100nm

Fig.5. Morphology of SPMYEV particles, Bar represents 100nm

讨 论

草莓伪温和性黄边病毒 (SPMYEV) 过去虽仅在弗吉尼亚草莓 (*Fragaria Virginiana*) 及日本栽培品种宝交早生 (*F. ananassa* CV. *Hoko-Wase*) 有过发生的报道^(4,6), 至今国内尚未见肯定的文献评述。近年作者等对一些草莓栽培地, 进行了调查和鉴定, 从辽宁省的沈阳市郊和丹东市郊部分草莓品种上, 已分离到这种病毒, 经过较系统的诊断、鉴定之后, 证实它是 SPMYEV, 初步认为这是国内首次较系统的报道。

对于 SPMYEV 的提纯, 所繁殖的病毒源, 是采用 Frazier (1974) 所改进的小叶嫁接法进行的⁽⁵⁾。这一技术对本试验的研究帮助很大。对病毒衣壳蛋白的分离, 采用 Fraenkel-Conrat (1957) 冰醋酸法⁽³⁾, 显然亦很有效。本实验所获得的一些数据, 对进一步深入 SPMYEV 研究, 肯定会有参考价值。

目前还没有汁液接种草本植物繁殖该病毒的可能性, 尚需要深入探索。但从 UC-4 草莓经小叶嫁接复制的病毒, 用差速离心技术及 PEG 沉淀和蔗糖垫底离心, 再经连续性蔗糖密度梯度离心, 可以有效地获得 SPMYEV 的病毒制剂, 这对深入研究其生物学特性及其本质等方面, 提供了比较成功的依据。虽然手续麻烦一些, 且目前还不能简化, 否则不易获得提纯病毒。但本文报道的方法, 至少已提纯 SPMYEV 成功。至于用提纯病毒制剂摩擦回接未能成功, 估计与感染方法不妥有关, 拟再用蚜虫传染方法做回接试验。

参 考 文 献

- [1] 韦石泉、吴元华, 1989, 沈阳农业大学学报 20(3): 307—312。
 [2] 韦石泉、吴元华, 1989, 世界农业 12: 31—33。
 [3] Fraenkel-conrat., H. 1957, *Virology* 4: 1—6。
 [4] Frazier, N.W., 1966, *Phytopathology* 56: 571—572。
 [5] Frazier, N.W. 1974, *Pl. Dis. Repr.* 53: 203—207。
 [6] Yashikawa, N, Inouye., 1986, (日)植病学会报 52: 643—652。

Study on the Purification Techniques for Strawberry Pseudo-Mild Yellow Edge Virus

Wu Yuan-hua Wei Shi-quan

(Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

The isolated strawberry pseudo-mild yellow edge virus (SPMYEV) was maintained in the strawberry-*Fragaria vesca* L. var. UC-4, and was successfully extracted and purified through homogenization by polyethyleneglycol (PEG) precipitation, differential centrifugation in the sucrose cushion and continuous sucrose density gradient centrifugation.

The purified preparations contained flexuous rod-shaped virus particles mainly 650nm in length and 12—13nm in width. The virus showed a typical UV spectrum of nucleoprotein with max. and min. absorption at 263nm and 243nm respectively. The $A_{260}/A_{280} = 1.24$.

The coat protein of SPMYEV was obtained by using cold acetic acid, and had one band with the mol. wt. 37000 daltons (average of four determinations), it was through the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis plate.

Key words: Strawberry Pseudo-Mild Yellow Edge Virus SPMYEV
 Procedure of plant virus purification Coat protein