

大麦黄花叶病毒(BaYMV)的提纯和生化性质的研究*

赵小立** 吴建华^V 黄纯农* 翁醒华* 龚祖坝

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海, 200031)

* (杭州大学生物系, 杭州, 310028)

S432.41

关键词: 大麦黄花叶病毒 外壳蛋白 核酸基因组

提纯

大麦黄花叶病是由禾谷多粘菌(*polymyxa graminis*)传布的一类麦类病毒病。是上海市郊区及长江中下游及沿海大麦产区的重要病害。大麦黄花叶病毒(BaYMV)在国内外虽已有不少研究,但对国内分离株的生化性质尚未有详细报道。本文报道以上海郊区的BaYMV为研究材料,成功地建立了一套分离提纯的方法,并在此基础上,研究了该病毒的结构蛋白和核酸性质,并和国外的一些研究结果进行了比较,从而为今后应用生物技术防治大麦黄花叶病毒打下了基础。

材料和方法

1 材料

大麦(*Hordeum vulgare* L.)品种早熟3号和沪麦4号种植在上海农科院设置的大麦黄花叶病毒自然感染区中。取典型感病5—6叶片大麦幼苗,去除麦根整理干净后,放在-20℃冰箱保存备用。

2 BaYMV 的分离纯化

取-20℃冰冻的病大麦叶子100克,加入三倍体积的0.1mol/L柠檬酸缓冲液,pH7.0于组织捣碎机打碎,按滤汁的体积加入25%的四氯化碳,剧烈振荡5分钟,静置分层,弃去底部四氯化碳及杂蛋白层,上层经6,000转/分,离心25分钟,上清在-20℃冰箱过夜。3,000r/m,离心10分钟,取上清,35,000r/m,离心2小时,用上述缓冲液悬浮沉淀,得到病毒粗制剂,经10%—40%的连续蔗糖密度梯度,25,000r/m,离心2小时,分层收集,经45,000r/m,90分钟离心,浓缩病毒。进一步用30%的氯化铯梯度离心纯化,3500r/m,10℃离心16小时,收集清晰的乳白色病毒带,再经一次超离心,将沉淀悬浮于上述缓冲液,即为纯化的病毒制剂。

3 BaYMV 的外壳蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳:按常规方法制备12%的聚丙烯酰胺凝胶,用考马斯亮兰染色。

4 BaYMV 的RNA 分离

在纯化的样品中,加入1%的SDS,37℃保温30分钟,然后按常规方法用饱和酚处理。

5 蛋白酶抑制剂的作用:将BaYMV部分提纯制剂平均分成三等分,其中一组作为对照,其余二组分别加入抑制剂Leupeptin和PMSF(苯甲基磺酰氟),成份如下:

5.1 Leupeptin组 10ul的10mmol/L Leupeptin,2ul的50mmol/L DTT,40ul的病毒制剂。

5.2 PMSF组 10ul的17mg/ml的PMSF,100ul的病毒制剂。

* 本文于1993年2月收到,3月13日修回

** 赵小立为中国科学院上海生物化学研究所进修教师。

感谢上海农科院作物研究所黄培忠同志协助。

5.3 对照组 100ul 的病毒制剂,然后各组进行10%—40%的蔗糖密度梯度及30%的 CsCl 梯度离心,分别收集病毒,浓缩后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。

结果与讨论

1 BaYMV 的分离提纯 按照我们所建立的提纯方法,可获得密集的一条病毒带。经电镜检查,病毒密度很高,杂质很少,而且病毒粒子均匀分散,很少聚集(图1)。长线状病毒粒子的长度高峰分布在500—600nm,短线状的病毒粒子长度高峰分布在200—300nm。

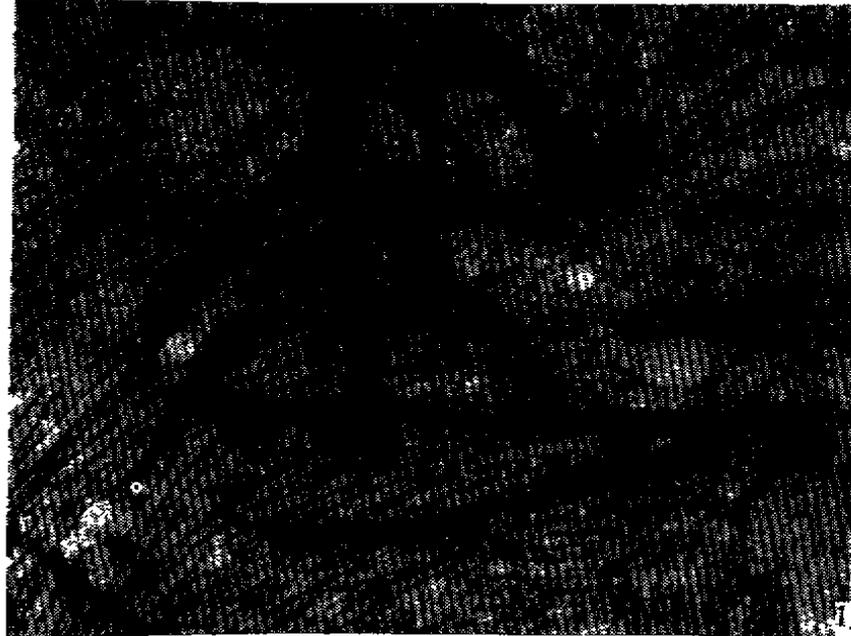


图1 纯化的BaYMV的电镜照片,放大倍数20000×5

Fig. 1 Electron micrography of purified BaYMV negatively stained with uranyl acetate. 100000x

2 BaYMV 的结构蛋白 分离提纯的 BaYMV 制剂,直接用 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳样品缓冲液处理后,电泳显示一条主要蛋白带,其分子量约 29—30kd。若提高病毒样品浓度,则还可显示另一条分子量为 33kd 的蛋白带(图 2)

在病毒分离提纯过程中,分别在部份提纯制剂中加入一定量的两种蛋白酶制剂—PMSF 和 leupeptin,然后进一步提纯,并进行电泳分析,此时 33kd 的蛋白带明显增加,特别是用 PMSF 处理过的样品,33kd 的蛋白条带明显浓于 29kd 条带。这证明 BaYMV 上海分离株含有和国外报道的分子量相同的衣壳蛋白 33kd,而且这一分离株的 33kd 外壳蛋白极不稳定,在分离提纯过程中,受到寄主细胞内释放的蛋白水解酶的作用,水解成 29kd 蛋白,因此这一水解产物是在病毒包装以后发生的,和一些植物病毒外壳蛋白在酶加工以后再包装不同(图 3)

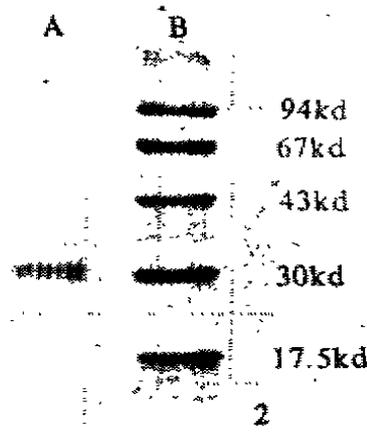


图2 纯化的BaYMV的12%SDS-PAGE电泳图

A. BaYMV 外壳蛋白 B. 低分子量标准蛋白

Fig. 2 12% SDS-PAGE of purified BaYMV.

A. Viral coat protein B. Standard protein markers.

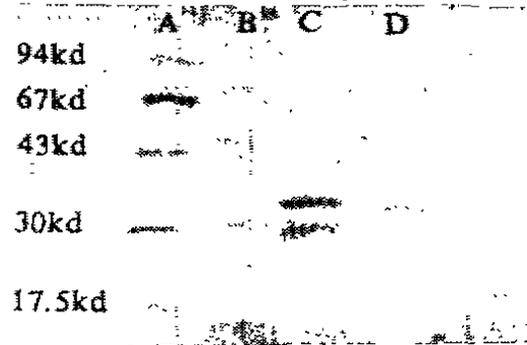


图3 蛋白酶制剂作用后的BaYMV的蛋白电泳图

A, 标准蛋白分子量; B, 对照; C, leupeptin 处理; D, PMSF 处理

Fig. 3 12% SDS-PAGE of purified BaYMV treated with PMSF or Leupeptin during purifications of the Virus

A, Standard protein markers; B, BaYMV untreated with protease inhibitor;

C, BaYMV treated with leupeptin; D, BaYMV treated with PMSF.

3 BaYMV 核酸基因组 从 BaYMV 的提纯制剂分离获得的 RNA, 经电泳鉴定可得到大小分别为 R1 8.2kd (2.78×10^6), R2 3.3kd (1.12×10^6) 和 R3 2.0kd (0.68×10^6) 三条带。RNA1 的分子量和国外报道的分离物一致。RNA2 比国外报道的略小。最近从英国的 Wiltshire 分离物中也报道存在有除二条主要的分子量相近 RNA 条带外, 尚存在另一条 RNA 带。因此小分子的 R3 是否为病毒所携带, 类似于其它植物病毒的卫星 RNA, 亦或低分子的降解产物, 还是寄主 RNA 杂质, 尚需进一步研究(图 4)。

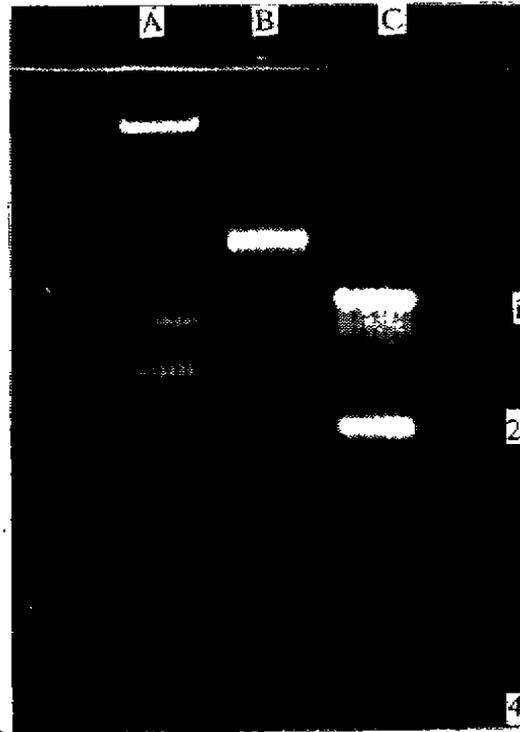


图 4 BaYMV 的 RNA 的电泳图

A. BaYMV-RNAs; B. TMV-RNA; C. 1. 1.23×10^6 , 2. 0.55×10^6

B, C 均作为 RNA 标准分子量用

Fig. 4. Agarose electrophoresis of BaYMV RNAs.

A. BaYMV-RNAs; B. TMV-RNA, as ss-RNA markers 2. 17×10^6 ; C. ssRNA markers; 1. 1.23×10^6 , 2. 0.55×10^6

参 考 文 献

- 1 Usugi T, et al. Some properties of nucleic acids and coat proteins of soil-borne filamentous viruses. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1989, 55: 26-31
- 2 Kashiwazaki S, et al. characterization of several of barley yellow mosaic virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1989, 55: 16-25
- 3 Batista M F, et al. RNA/cDNA hybridization studies of UK isolates of barley yellow mosaic virus. *Plant Pathology*, 1989, 38 (2), 226-229
- 4 Huth W, et al. Barley yellow mosaic virus (BaYMV) and BaYMV-M; two different viruses. *Intervirology*, 1990, 31: 38-42
- 5 Adams M J, et al. The distribution of barley yellow mosaic virus (BaYMV) and barley mild mosaic virus (BaYMV) in UK winter barley samples, 1987-1990. *Plant Pathology*, 1991, 40: 53-58
- 6 Kashiwazaki S, et al. Nucleotide sequence of the capsid protein gene of barley yellow mosaic virus. *J. Gen. Virol.*, 1989, 70:

3015—3023

- 7 陈剑平,等.大麦黄花叶病毒粒子性质以及抗体制备.浙江农业科学,1988,(5),239—241
- 8 陈剑平,等.大麦黄花叶病毒的提纯.植物病理学报,1989,19(1),35—39
- 9 陈剑平.大麦黄花叶病毒及其真菌介体多粘菌的研究进展.中国病毒学,1992,7(1):1—10

Studies on the Purification and Biochemical Properties of BaYMV

Zhao Xiaoli* Wu Jianhua Huang Chunrong* Wen Xinghua* Gong Zhuxun

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai, 200031

* Department of Biology, Hangzhou University, Zhejiang, Hangzhou, 310028)

The Barley Yellow Mosaic disease is an important crop disease spread in the suburbs of Shanghai and coastal areas in East China. A purification procedure of Shanghai isolate of BaYMV was developed using the combination method of organic solvent treatment, ultracentrifugation, sucrose and CsCl density gradient centrifugation. The isolate showed the existence of two peaks in particle-length distribution (300 nm and 600 nm). SDS-PAGE of purified virus preparation demonstrated one major band of 29kd. A minor band of 33kd appeared occasionally. The density of 33kd band could be increased significantly, when two protease inhibitor PMSF or laupeptin were added during extraction and purification. Besides two major species of RNAs of the isolate with size about 2.78×10^6 and 1.12×10^6 , one small RNA about 0.68×10^6 were observed in non-denaturing agarose electrophoresis. The relationship between the Shanghai isolate and other isolates of BaYMV reported previously was discussed.

Key words: Barley Yellow Mosaic Virus Coat protein Viral RNA genome