

# 番木瓜环斑病毒(PRV)提纯的研究

高文通

(黄埔动植物检疫局, 广州 510700)

高乔婉 范怀忠

(华南农业大学植保系, 广州 510642)

5432.41

关键词 ~~番木瓜环斑病毒, 病毒提纯~~

提纯, 番木瓜环斑病, 病毒;

四十年代末, 美国首次报道的番木瓜环斑病(Papaya Ringspot Virus, PRV)病原病毒粒子细长, 提纯时易断裂聚集, 与寄主杂质粘结而丢失<sup>[1-4]</sup>, 至今未有影响其粗提纯效果因素的详细报道。国外精提纯研究所用的铯盐等密度梯度超速离心 20-50 小时<sup>[2-4]</sup>, 国内难以进行。因此有必要在现有条件下弄清 PRV 粗提纯效果的影响因素, 寻找 PRV 精提纯方法, 以制备高纯度的 PRV 制剂。

## 材料与方法

- 1 毒原 PRV-YS 由华南农业大学植物病毒研究室提供。
- 2 繁殖寄主 西葫芦(*Cucurbita pepo.*)和角葫芦(*Cucumis melo/ferus*)种子分别由新疆种子公司和美国康乃尔大学 Dr. Gonsalves 提供。
- 3 PRV-YS 的繁殖 在防虫温室中按常规方法接种繁殖寄主幼苗, 半月后采呈典型症状叶片作提纯材料。
- 4 电镜样品的制作与观察(简称 TEM) 在铜网上加病毒制剂, 再加 2% 磷钨酸负染, 干燥后在透射电镜下观察并记录观察结果。
- 5 紫外吸收测定(简称 UV 测定) 将病毒制剂稀释, 用自动分光光度计测定 220-320nm 波长范围内吸收光谱, 并由此计算制剂的浓度、纯度和产量。
- 6 PRV 粗提纯程序 参考国内外有关文献<sup>[1,2,4,5]</sup>, 并经多次试验拟定 PRV 粗提纯程序, 采病叶称重加 2 倍 (V/W) PB<sub>1</sub><sup>[1]</sup>, 1 倍 (V/W) CCl<sub>4</sub>-CHCl<sub>3</sub> 等量混和物, 捣碎后 2500g 离心 15 分钟, 取上清液 5000g 离心 15 分钟 (PEG 沉淀前去渣) 得抽提液 (体积 V<sub>0</sub>), 再加 3% NaCl、6% PEG 搅溶, 静置 3 小时 (10℃), 2500g 离心 20 分钟, 将沉淀用 V<sub>0</sub>/5 PB<sub>1</sub><sup>[1]</sup> 悬浮, 悬浮液再 10000g 离心 15 分钟, 取上清液再 100000g 超离心 90 分钟, 将沉淀用 V<sub>0</sub>/50 PB<sub>1</sub><sup>[1]</sup> 悬浮即得病毒粗制剂。所用缓冲液为: PB<sub>1</sub>, 0.5mol/L pH7.0 磷酸缓冲液 (含 0.05mol/L EDTA-Na<sub>2</sub>, 0.25mol/L 脲, 0.3% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); PB<sub>2</sub>, 0.1mol/L pH7.0 磷酸缓冲液 (含 0.01mol/L EDTA-Na<sub>2</sub>, 0.5mol/L 脲); PB<sub>3</sub>, 0.1mol/L pH7.0 磷酸缓冲液 (含 1.0mol/L 脲)。

本文于 1993 年 4 月 2 日收到, 9 月 7 日修回

• 国家自然科学基金资助项目部分内容

## 结果与讨论

### 1 PRV 粗提纯的主要影响因素探讨

1.1 繁殖寄主种类 重复三次的试验结果表明用角葫芦作繁殖寄主的效果远比西葫芦好:前者提纯产量(27.45mg/100g 角葫芦病叶)比后者(14.25mg/100g 西葫芦病叶)高近一倍,杂质去除较易,粗制剂纯度也较高。研究结果支持了 Yeh 等的最新报道<sup>[4]</sup>。但因种子数量所限,下述研究均以西葫芦作繁殖寄主。

1.2 有机澄清剂加入量 试验结果表明有机澄清剂加入量以体积与病叶重的 80% (ml/g)  $\text{CCl}_4$ - $\text{CHCl}_3$  提纯效果好、产量高。结果与 Yeh<sup>[4]</sup>和 Mercedes<sup>[5]</sup>的观点相似,即加入适量温和的有机澄清剂既能较彻底澄清绿色杂质又不至于使 PRV 粒子断裂变性。

1.3 PEG 沉淀前的去渣离心力 采用 PRV 粗提纯程序,离心力(g)设四个处理:5000、10000、15000、20000,离心时间 15 分钟,试验结果表明去渣离心力以 10000g 最合适,不仅寄主颗粒去除彻底,而且病毒粒体损失较少。

1.4 浓缩 PRV 的超速离心力 采用上述 PRV 粗提纯程序,去渣离心力为 10000g,超速离心力(g)设五个处理:60000、80000、95000、110000、130000。重复三次的试验结果表明超速离心力以 110000g 较为合适,支持吴方城的报道<sup>[1]</sup>,即中等超速离心力既可使 PRV 沉降较完全,而寄主细胞的小颗粒沉降又较少,同时还避免了离心力过大所致沉淀过于粘结而难以重新悬浮的缺点。

1.5 分散剂 采用 PRV 粗提纯程序,试验选常用的脲、 $\text{EDTA-Na}_2$ 、Triton X-100,结果表明三种分散剂均有减轻粒体聚集防止丢失的效果,其中  $\text{EDTA-Na}_2$  和脲最好,Triton X-100 次之。同时发现使用分散剂种类越多,提纯效果越好,其机理有待进一步探索。

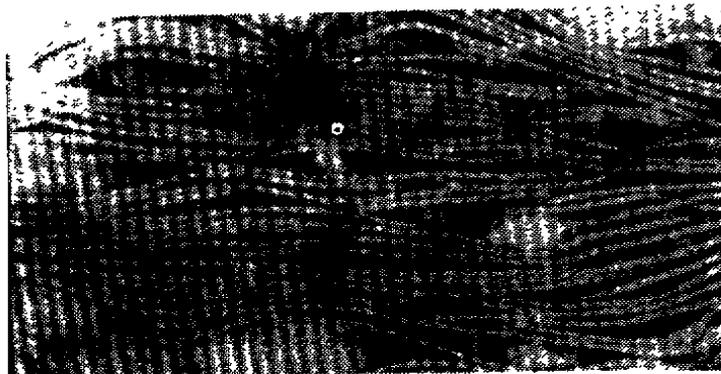


图 电镜下 PRV 精提纯制剂的病毒粒体( $\times 130000$ )

Fig. Virion of PRV advance purification preparation on electron microscope( $\times 130000$ )

### 2 PRV 精提纯研究

PRV 精提纯研究是国内学者非常重视的一个问题<sup>[1-4]</sup>,本研究参照前人提纯方法<sup>[5-7]</sup>,

采用 30%蔗糖硫酸铯连续密度梯度离心进行试验。试验设三个处理,各处理的  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  梯度浓度(mol/L)分别为:(1)0.7,0.5,0.3;(2)0.8,0.6,0.4;(3)0.9,0.6,0.3。先依次加上上述梯度介质液,经一昼夜扩散形成连续密度梯度介质,再加 PRV 粗提纯制剂,160000g 离心 3 小时。离心管中下部各有一条乳白色带和褐色带,即分别为病毒带和杂质带,其中以低梯度浓度的处理(1)较好,病毒带与杂质带分离得较开且病毒带窄而明显。病毒带取出后稀释,TEM 观察见图,病毒粒体分散性较好且几乎没有寄主杂质,UV 测定有典型核蛋白紫外吸收曲线,  $A_{260}/A_{280} = 1.68$ ,提纯产量为 2.56mg/100g 西葫芦病叶,接近于 Yeh 的报道<sup>[4]</sup>。本研究最适  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  梯度浓度和蔗糖浓度有待继续探索。

### 参 考 文 献

- 1 吴方城,徐绍华,彭学贤. 华南番木瓜环斑病毒的鉴定、提纯与性质的初步研究. 植物病理学报, 1983, 13(3), 21—28
- 2 Gornalves D, M Ishii. Purification and serology of papaya ringspot virus. Phytopathology, 1980, 70, 1028—1032
- 3 Mercedes De L R, Lastra R. Purification and partial characterization of papaya ringspot virus. Phytopathology, 1983, 106(4), 329—336
- 4 Yeh S D, Gornalves D. Translation of papaya ringspot virus DNA in vitro, Detection of a possible polyprotein that is processed for capsid for protein, cylindrical-inclusion protein, and amorphous-inclusion protein. Virology, 1985, 143, 260—271
- 5 周广利,陈剑波,陈善铭. 河南小麦条斑花叶病毒病原鉴定、病毒提纯及其特性. 病毒学报, 1989, 5(1), 46—51
- 6 Francine W Vander Mear, Helen M Garrett. Purification and Identification of a South Africa Isolate of Watermelon Mosaic Virus-Morocco. Journal of Phytopathology, 1987, 120, 255—270
- 7 Bar Joseph M, Gumph D J, Dodds J A, et al. A Simple purification method for citrus tristeza virus and estimation of its genome size. Phytopathology, 1985, 75, 195—198

## Research on Purification of Papaya Ringspot Virus (PRV)

Gao Wentong

(Huangpu Animal and Plant Quarantine Bureau of P. R. C., Guangzhou 510700)

Gao Qiaowan Faan Hweichung

(Depart. of plant protection, South China Agri. Uni., Guangzhou 510642)

Every best choice of several main affecting factors on the crude purification of PRV was reported detailedly in this paper. The advance purification method of PRV with the  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  continuous density gradient supercentrifugation for about 3 hours with 30% sugar cushion was tested for the first time. A simple procedure of one cycle of different speed centrifugation and one cycle of  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  continuous density gradient supercentrifugation was designed at last. The virus preparation showed a typical ultraviolet absorption curve for nucleoproteins, The yield of virus was 2.56mg/100g of infected squash leaves.

**Key words** Papaya Ringspot Virus, Purification of virus