维普资讯 http://www.cqvip.com

87-90 20182(15)

第12卷第1期 中国病毒学 Vol.12 No.1
1997年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 1997

侵染香蕉的黄瓜花叶病毒分离物衣壳蛋白的肽链分析*

李华平[1**] 胡晋生[2] 范怀忠[1]
[1](华南农业大学植保系,广州 510642)
[2](University of Ha ai, Honolulu, HI 96822, USA)

S432.41 S436.421.2

植物病毒,

关键词 香蕉,CMV株系,肽链 黄瓜花叶病毒,衣壳蛋白,

香蕉花叶病为华南香蕉生产的重要限制因素之一[1]。特别是随着组培苗应用面积的扩大,发生越来越严重,一般地块发病率为20~40%,个别重病地块高达90%,损失严重。

此病病原虽在1930年[2]就被鉴定为黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV),但至今对其研究不多。从有限的文献看,大多数作者[1,3]都认为其病原为CMV的一个株系,即香蕉株系。但也有认为为二个株系[4]、或三个株系的[5]。因此有关病原的调查鉴定就成为当前迫切需要解决的一个重要问题。

1991~1993年我们在广东省广州市天河和黄埔区,以及顺德、番禺、高州、东莞、新会等市县的香蕉产区进行病害调查,发现了三种不同类型的花叶症状,即断续条纹类(BS)、连续条纹类(CS)和斑纹类(MM)。通过病毒形态学、生物学、血清学、衣壳蛋白(CP)基因核苷酸序列测定,已将三类症状代表分离物(BS、CS和MM)划分为了三个不同的株系(另文发表)。

本文采用蛋白质肽链图谱技术和肽链的Western blot法,对香蕉三类代表分离物进行了分析,其结果显示这两种方法能够较好地区分和鉴定CMV株系。

材料和方法

香蕉CMV不同分离物(BS、CS和MM)分别分离于广东省香蕉产区,CMV-T37和CMV-L18(分离于番茄)由华南农业大学高乔婉教授提供。所有分离物经苋色藜(*Chenopodium amaranticolor*)单斑纯化,通过普通烟(*Nicotiana tabacum* CV. HV38)作繁殖寄主,参照Lot *et al*.[6](两次差速离心和一次蔗糖梯度离心)提纯病毒。

糜蛋白酶、胃蛋白酶、A蛋白酶标记的辣根过氧化物酶等分别购于Sigma公司和上海生物制品所,CMV-T37的抗血清由华南农业大学高乔婉教授惠赠。

CP肽链图谱的测定采用Edwards和Gonsalves[7]法修饰后进行。各分离物的CP分别经常规SDS-PAGE法电泳后,用0.25%考马斯亮蓝R-250(内含50%甲醇和10%冰乙酸)染色20 min,5%甲醇和7.5%冰乙酸振荡脱色40 min。蛋白带经冰冻干燥后,采用Hager和Burgess法[8]回收蛋白质。糜蛋白酶和胃蛋白酶分别以1:10和1:5的比例(W/W)与各分离物的CP混合,在37℃下孵育过夜,经PAGE法电泳后,用硝酸

收稿日期:1995-07-11,修回日期:1996-06-21
* 广东省科学基金和高等学校博士点科研基金资助项目
** 现在华中农业大学植保系(武汉,430070)工作

维普资讯 http://www.cqvip.com

银法染色。

各分离物的CP肽链经PAGE法电泳后，用电转移法将肽链转移至硝酸纤维素膜上。其后步骤(封闭、加抗体、加酶结合物、加底物等)都按DOT－ELISA法[9]进行，所用抗血清为CMV－T37的抗血清。

结果与讨论

用糜蛋白酶消化五个CMV分离物CP的结果，产生了三种不同的带型方式(图1A)。香蕉三类分离物(BS、CS和MM)属第一种方式，可产生三条带，三条带的位置完全一致；T37分离物属第二种方式，可产生五条带，五条带中第四条带是其特有的。L18分离物属第三种方式，也可产生五条带，但第五条带(即分子量最小的一条带)在其它四个分离物都不具有。因此依据糜蛋白消化图谱，仅能将香蕉三类分离物与T37和L18区分开，而香蕉三类分离物间则不能区分。

胃蛋白酶消化五个CMV分离物的CP，产生了与糜蛋白酶消化的不同方式的肽链图谱(图1B)。MM仅产生三条带，CS和T37产生五条带，BS和L18产生六条带。这五种分离物除第一、第二条带的位置相同外，其它条带至少有一条带位置不同，据此可将这些分离物予以区分。

图1 CMV不同分离物CP的肽链图谱

A:糜蛋白酶消化；B.胃蛋白酶消化

Fig.4 Peptide mapping of coat proteins of CMV isolates

A. Digested with Chymotrypsin B:Digested with Pepsin

糜蛋白酶分别消化CMV四个分离物后，其产物分别利用CMV－T37的抗血清进行的Western blot的试验结果表明：香蕉分离物BS和CS间无差异，即都只有两条带，且位置相同；而MM除产生与BS和CS相同的两条带外，还多产生一条带；L18产生四条带，其中第一、第二、第四条带与MM第一至第三条带相同，但其第三条带是L18自己所特有的(图2A)。

胃蛋白酶分别消化CMV五个分离物后的Western blot(用CMV－T37的抗血清)的结果揭示：所有五个分离物的第一条带都相同，但CS、BS只有这一条带，而MM、L18和T37还产生相同的第二条带，L18和T37则还产生相同的第三条带(图2B)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

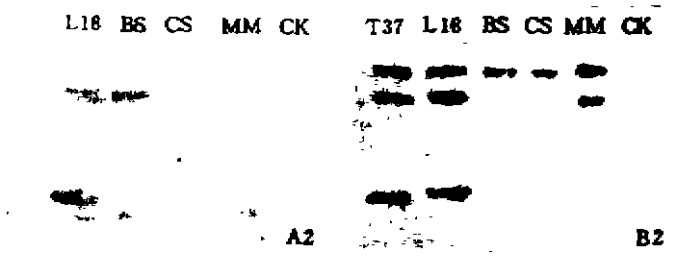

图2　CMV不同分离物CP的肽链的Western blot法测定(CMV－37的抗血清)
A:糜蛋白酶消化;　B:胃蛋白酶消化
Fig.2　Western blot analysis of coat protein peptide mapping of CMV isolates
A: Digested with Chymotrypsin; B: Digested with Pepsin

可见,在与CMV－T37的抗血清发生反应中,其肽链抗原决定簇的数量以分离物T37与L18较多、MM次之、CS和BS最少。

蛋白质肽链图谱技术是Cleveland *et al*[10]建立的,后来用于植物不同病毒或株系进行分析,并与血清学、核酸杂交等方法比较,认为这一方法结果稳定、可靠,而且简便易行[7,11]。本研究应用这一技术对广东香蕉三个分离物和CMV－T37和CMV－L18两个分离物的分析结果表明,这一方法可明显地将所测定的CMV分离物划分为不同的肽链类型,每一肽链类型可能代表CMV的一个株系CP的部分特征。在此基础上,本研究首次采用肽链图谱的Western blot法来对CMV分离物进行分析。这一方法将生物化学技术与血清学技术结合起来,从而能确定CP的肽链抗原决定簇。结果显示这是划分CMV分离物的一个有效、方便、稳定性高的方法。因此我们认为,CP肽链图谱和肽链的Western blot技术,可能是CMV株系鉴定中一个非常有价值的鉴定标准。它不仅从蛋白质肽链水平上,还从血清学抗原决定簇上对CMV株系进行分析,能确切地将不同株系予以区分。

在肽链图谱的测定中,选择合适的消化酶可能最为关键。在本研究中,我们仅选用了糜蛋白酶和胃蛋白酶。在糜蛋白酶消化的图谱中,五个分离物表现了三种图谱方式,其中BS、CS和MM之间没有差别;但在胃蛋白酶消化的图谱中,五个分离物却表现了五种方式,即五个分离物据此能被区分开来。因此在本研究中,胃蛋白酶明显比糜蛋白酶效果好。这表明在应用肽链图谱技术划分植物病毒株系时,要尝试不同的蛋白消化酶进行试验,以确定最佳的消化酶。

在CP肽链的Western blot法测定中,仅应用了CMV－T37的抗血清进行试验。糜蛋白酶和胃蛋白酶消化的CP肽链,都只有三种反应方式,其中BS和CS不能区分,这表明BS和CS在与CMV－T37抗血清的反应中具有相同的抗原决定簇。但在胃蛋白酶消化的CP肽链中,BS和CS有至少一条肽链是不同的,这不同的肽链不能与CMV－T37的抗血清发生反应。如果应用其它抗血清,如CMV－BS抗血清,也许有可能将BS和CS区分开来。因此,在CP肽链的Western blot法测定中,选择合适的抗血清进行试验也是重要的。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1 高乔婉,范怀忠.引致香蕉花叶病的黄瓜花叶病毒株系,华南农业大学学报 1993,4:43～48

2 Wardlww C. W. Mosaic, infectious chlorosis and other virus diseases. In: Banana Disease. 2nd, Lingmun, 1972.116～140

3 Porta C, Devergna J C, Cardin L *et al*. Serotype specificity of monoclonal antibodies to cucumber mosaic virus. Arch Virol, 1989,104:271～285

4 Hwang S C. Status of banana diseases in taiwan. In: Valmaryor R V *et al*. Banana Diseases in Asia and Pacific INIBAP Network for Asia and Pacific, 1991.73～83

5 Patel K V, Mali V R. Comparative studies on three isolates of cucumber mosaic virus from banana. Indian Phytopathol, 1983, 36:443～447

6 Lot H, Marrou J. A contribution to the study of cucumber mosaic virus. Ⅱ. Quick method of purification. Ann Phytopathol, 1972,4:325～338

7 Edwards M C, Gonsalves D. Grouping of seven biologically defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide mapping. Phytopathol, 1983,73:1117～1120

8 Hager D A, Burgess R R Elusion of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrlamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate and renaturation of enzymatic activity. Anal Biochem, 1980,109:76～86

9 肖火根.番木瓜环斑病毒株系间的交互保护作用及其机理研究.[博士论文].华南农业大学,广州,1992

10 Cleveland D W, Fischer S G, Krischner M W *et al*. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J Biol Chem, 1977,252:1102～1106

11 李华平,胡晋生,范怀忠.黄瓜花叶病毒的株系鉴定研究进展,中国病毒学,1994,9:187～194

Peptide Mapping of Coat Proteins of Cucumber Mosaic Virus Isolates Infecting Banana

Li Huaping[1] John S. Hu[2] Faan Hweichung[1]

[1] (*South China Agricultural University, Guangzhou* 510642)

[2] (*University of Hawaii, USA* 96822)

Peptides of coat proteins of cucumber mosaic virus isolates infecting banana from Guangdong province were first analysed. The coat proteins of different isolates were digested with Chymotrypsin and Pepsin to produce different peptide patterns. They were evaluated by Western blot using the antiserum to CMV－T37. It was found that MM contained more quantitative peptides of antigen determinants to antiserum CMV－T37 than BS or CS did.

Key words Banana, CMV isolates, Peptide