

## 苜蓿花叶病毒提纯方法的改进\*

陈集双 冯明光

(浙江大学生命科学院 杭州 310029)

**摘要:**用来自于白车根草(*Trifolium repens*)上的一个苜蓿花叶病毒分离物 AMV-SY 为材料,比较了 3 种以差速离心为主结合 PEG 沉淀和超速离心提纯病毒的方法,对提纯病毒进行紫外吸收测定、电镜检查和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测的结果显示:以交替使用含有 0.1mol/L EDTA 和 0.1mol/L MgSO<sub>4</sub> 的磷酸缓冲液作为病毒悬浮介质的提纯程序最为理想。该方法提取苜蓿花叶病毒的得率为 47.6mg/100g 昆诺藜鲜病叶,该病毒分离物的外壳蛋白分子量为 29kD。该方法的病毒得率较高、杂蛋白较少、病毒粒子完整,是比较理想的提纯方法。

**关键词:**苜蓿花叶病毒,白车根草,提纯方法,外壳蛋白

**中图分类号:**Q939.4 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)01-068-05

### MODIFIED TECHNIQUES FOR PURIFICATION OF ALFALFA MOSAIC VIRUS

CHEN Ji-Shuang FENG Ming-Guang

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

**Abstract:** Three purification methods, based on differential centrifugation, precipitation by polyethylene glycol (PEG) and ultra-speed centrifugation, were compared for purification of an alfalfa mosaic virus (AMV-SY) previously isolated from *Trifolium repens*. The Purified virus was observed under electron microscope, measured, by ultra-violet absorpton analysis and protein determination with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Our results showed that a method by alternative use of sodium phosphate buffers containing 0.1mol/L EDTA and 0.1mol/L MgSO<sub>4</sub> achieved the best purification with less miscellaneous protein contamination, integrate virus particles and relatively high yield, which was of 47.6mg virion per hundred grams of fresh leaves of *Chanopodium quinoa* inoculated with AMV-SY. The coat protein of AMY-SY was tested for about 29 kilo-Dalton.

**Key words:** Alfalfa mosaic virus, *Trifolium repens*, Purification method, Coat protein

苜蓿花叶病毒(Alfalfa mosaic virus, AMV)具有十分广泛的寄主分布,且容易经蚜虫以非持久性方式传播,是十分重要的植物病原病毒之一。在欧洲和美洲,这一病毒是三叶草类牧草和苜蓿类农田作物上引起严重病毒病的首要病原,并在马铃薯等豆科作物、烟草、蕃茄、辣椒等茄科作物和芹

\* 国家自然科学基金资助项目(No. 39880028)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 39880028)

浙江省教委重点课题

Key Project Granted by Zhejiang Provincial Education Committee

收稿日期:1999-10-27,修回日期:1999-12-20

菜、苜蓿甚至一些木本植物上引起典型病害<sup>[1]</sup>。在我国,苜蓿花叶病毒的研究报道相对较少,主要是在三叶草类植物(牧草、观赏植物)上发生危害<sup>[2~5]</sup>。文献报道,AMV为典型的多分体病毒,具有4种以上形态的病毒粒子,每种病毒粒子中包含一种单链RNA,其沉降系数分别为99S,89S,68S,以及60S和53S,RNA占病毒粒子分子量的18%, $A_{260}/A_{280}$ 约为1.70<sup>[1]</sup>。基于其形态和多分体基因组的特殊性,AMV在植物病毒分类中为单独一类,是进行植物病毒侵染过程和病毒基因组功能研究的理想材料<sup>[6]</sup>。

AMV同时也是最不稳定的植物病毒之一,高盐或低盐浓度以及缺少二价阳离子的缓冲液均易导致AMV粒子的解析<sup>[7]</sup>,但这些手段恰巧是病毒提纯过程中去除寄主细胞中最常见组份(如核糖体等)的有效手段。差速离心是最常用的是纯AMV的方法,但是AMV的4种主要粒子的沉降系数变化大而又与80S核糖体相似<sup>[9]</sup>。因此AMV现有的提纯方法均不够理想。AMV病毒粒子的不稳定性和AMV提纯方法不够理想限制了对该病毒的进一步研究,从而使许多分离物的描述处于初级阶段<sup>[8]</sup>。

我们从杭州药用植物白车根草(*Trifolium repens*)获得一株AMV分离物<sup>[2]</sup>。为了对该病毒进行深入研究,我们对该病毒的常规提纯方法进行了比较改进,现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒分离物

苜蓿花叶病毒分离物AMV-SY来自于药用植物白车根草<sup>[7]</sup>,毒原繁殖保存繁殖于昆诺藜(*Chenopodium quinoa*)上。

### 1.2 病毒提纯

毒原繁殖寄主为昆诺藜,AM-SY磨擦接种昆诺藜4~6d后采集病叶,于-70℃保存备用,对AMV-SY的提纯依次采用以下3种方法。

方法(1):参照蔡发兴等(1982),具体步骤如下:新鲜病叶100g,-70℃冰冻过夜;加入150mL,0.2mol/L(pH7.0,含0.1%巯基乙醇)的磷酸缓冲液(PB)匀浆2min;继续加入100mL氯仿;正丁醇(1:1)继续匀浆1~2min,5000g离心10min,取上清;然后分别加入总体积10%的PEG6000和1%的NaCl充分溶解,4℃下静置2h后10000g离心30min,取沉淀悬浮于30mL 0.01mol/L PB(pH 7.0)中,5000g离心10min,取上清;沉淀用上述缓冲液重新悬浮2次,5000g离心10min,合并上清;4℃下78000g离心90min,取沉淀用0.01mol/L PB(pH7.0)充分悬浮,低速离心取上清;4℃下,78000g离心90min;沉淀用0.01mol/L PB(pH 7.0)充分悬浮,低速离心后保存上清,至4.5mL。

方法(2):参照Hisashi(1985)并修改,具体步骤如下:新鲜病叶100g,-70℃冰冻过夜,加入150mL 0.2mol/L PB(pH 7.4,含0.1%巯基乙醇,1% Triton X-100,0.01mol/L EDTA),匀浆2min,继续加入20mL氯仿;正丁醇(1:1),继续匀浆1~2min;8000g离心20min,取上清;分别加入终浓度为6%的PEG 6000和终浓度为0.1mol/L的NaCl,充分溶解;4℃下静置4h;8000g离心20min,取沉淀悬浮于30mL 0.05mol/L PB(pH7.4,含1% Triton X-100,0.01mol/L EDTA)中;8000g离心20min,取上清,沉淀用上述缓冲液重新悬浮2次,8000g离心20min,取上清,4℃下,78000g离心150min;沉淀用0.01mol/L PB(pH7.4)充分悬浮,低速离心取上清;4℃下,78000g离心150min;沉淀用0.01mol/L PB(pH7.0)充分悬浮,低速离心后保存上清,至4.5mL。

方法(3):(综合方法(1)和方法(2)并参照Van Volten-Doting & Jaspars 1972),具体步骤如下:新鲜病叶100g,-70℃冰冻过夜,加入150mL,0.2mol/L pH7.4 PB(含0.1%巯基乙醇,1%Tri-

ton X-100), 匀浆 2min; 继续加入 20mL 氯仿; 正丁醇(1:1) 继续匀浆 1~2min, 12000g 离心 20min, 取上清, 加入终浓度为 0.01mol/L 的 EDTA, 4℃ 下充分搅拌 20min; 分别加入终浓度为 6% 的 PEG 6000 和 0.6% 的 NaCl, 充分溶解; 4℃ 下静置 4h, 12000g 离心 20min, 取沉淀悬浮于 40mL 0.05mol/L PB(pH7.4, 含 1% Triton X-100, 0.01mol/L EDTA), 12000g 离心 20min, 取上清; 沉淀用上述缓冲液重新悬浮 2 次, 12000g 离心 20min, 合并上清, 4℃ 下, 78000g 离心 120min; 沉淀用 0.02mol/L PB(pH7.4, 含 0.01mol/L  $MgSO_4$ ) 充分悬浮, 低速离心取上清; 4℃ 下, 78000g 离心 120min, 沉淀用超纯水或 0.02mol/L PB(pH7.0) 充分悬浮, 低速离心后保存上清, 至 4.5mL。

### 1.3 提纯病毒的紫外吸收测定

提纯病毒用 PB 稀释后经紫外扫描测定其 200~300nm 波长范围的紫外吸收特征并确定其 260nm 和 280nm 的吸收值, 参照田波等(1987)的介绍之方法计算病毒浓度和每 100g 病叶的病毒的产量<sup>[9]</sup>。

### 1.4 病毒粒子检查

提纯病毒用超纯水悬浮并稀释 5~10 倍, 经 1% 醋酸铀负染 2~3min<sup>[9]</sup>, 观察病毒粒子的完整性及纯度。

### 1.5 外壳蛋白分子量确定

提纯病毒按常规 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法测定其外壳蛋白分子量并检测蛋白质的纯度<sup>[10]</sup>。凝胶浓度为 10%, 标准分子量为美国 BRL 公司产品, 分子量范围为 14.3~2000kD。

## 2 结果与讨论

### 2.1 3 种方法所获得提纯病毒的得率和紫外吸收特征

2.1.1 方法 1 所获得提纯病毒的结果: 从 100g 昆诺藜病叶获得提纯病毒悬浮到 4.5mL PB (pH7.0) 中, 稀释 44 倍后测定 200~330nm 范围内的紫外吸收曲线如图 1A 所示,  $OD_{260} = 0.92$ ,  $OD_{280} = 0.55$ ,  $OD_{260}/OD_{280} = 1.67$ , 吸收曲线符合核蛋白吸收特征, 计算 AMV 得率为 35.0mg 病毒/100g 鲜病叶。

2.1.2 方法(2)所获得提纯病毒的结果: 从 100g 昆诺藜病叶获得病毒提纯物悬浮到 4.5mL PB (pH 7.0) 中, 与方法(1)同等倍数稀释后提纯病毒的紫外吸收曲线如图 1B 所示,  $OD_{260} = 0.76$ ,  $OD_{280} = 0.58$ ,  $OD_{260}/OD_{280} = 1.31$ , 其  $OD_{260}$  值明显偏低, 不符合典型的核蛋白吸收特征, 计算病毒得率为 28.9mg 病毒/100g 鲜病叶。

2.1.3 方法(3)所获得提纯病毒的结果: 从 100g 昆诺藜病叶获得提纯病毒悬浮到 4.5mL pH 7.0 的 PB 中, 与方法(1)同等倍数稀释后提纯病毒的紫外吸收曲线如图 1C 所示,  $OD_{260} = 1.25$ ,  $OD_{280} = 0.74$ ,  $OD_{260}/OD_{280} = 1.70$ , 为典型的核蛋白吸收特征, 计算 AMY 得率为 47.6mg 病毒/100g 鲜病叶。

根据紫外吸收测定结果, 方法(3)所获得的数据与常见植物 RNA 病毒的紫外吸收结果比较接近; 方法(2)所获得提纯物的紫外吸收明显偏向于蛋白质部分, 所计算的病毒浓度亦偏高, 可能是由于部分病毒粒子解体, RNA 降解所致; 方法 1 获得的病毒得率最低。经 2 次重复, 所获结果基本一致。

### 2.2 3 种方法所获得提纯病毒的电镜观察结果

提纯病毒用超纯水悬浮后经 1% 醋酸铀负染后电镜下观察到的粒子形态如图 2 所示。方法(1):

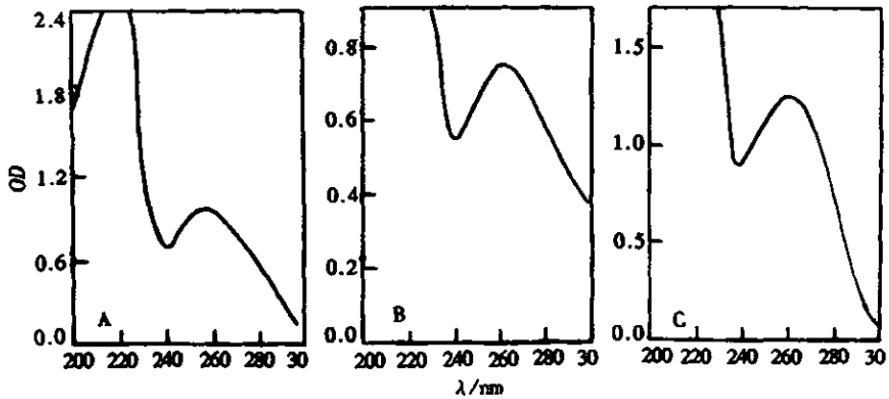


图1 3种提纯方法所获得提纯病毒的紫外吸收结果

A 方法(1)、B 方法(2)、C 方法(3)

病毒粒子较完整,但容易聚集,并存在一定量的杂蛋白(图2A);方法(2):病毒粒子结构不够完整,可见到松散的亚基结构(图2B);方法(3):病毒粒子分散性好、结构完整、均一,基本上没有亚基离散的情况(图2C)。

电镜观察结果显示:方法(3)所获得的病毒粒子提纯效果最好。

### 2.3 3种方法所获得提纯病毒的蛋白质分析结果

经10%胶浓度的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,提纯病毒的蛋白组分各有差异。方法(1):呈现多条混杂的蛋白带,在29kD左右有一条主带,相当于病毒外壳蛋白亚基(图3.3);方法(2):在29kD左右有一条蛋白带,相当于AMV外壳蛋白亚基;另外只在14kD以下有微弱的杂蛋白带(图3.1);方法(3):在29kD左右有一条蛋白带,相当于AMV外壳蛋白亚基,在68~50kD左右有两条较弱的杂蛋白带、在14kD以下有及其微弱的杂蛋白带(图3.2)。

提纯病毒外壳蛋白电泳检测结果显示:方法(2)所获得的提纯病毒基本上不含有杂蛋白成分,方法(3)所获得的提纯病毒则只含有极少量的杂蛋白;方法(1)所获得的提纯病毒含有较多的杂蛋白。

本文采用了3种提纯AMV的方法,根据病毒得率、提纯病毒形态观察和蛋白质分析,显示以上3种方法提纯效果的差异。方法(1)的提纯步骤中均不含有去除植物80S核糖的成分,虽能获得一定的病毒产量,但病毒粒子容易聚集,并混有大量的杂蛋白;方法(2)中根据 $A_{280}$ 和 $A_{260}$ 估算的提纯病毒得率偏高,且基本上没有杂蛋白,但这一程序的缓冲液中均含有使AMV不稳定的成分(0.1mol/L EDTA),因而所得到的病毒粒子结构不够完整。提纯病毒中蛋白比重偏大,但基本不含

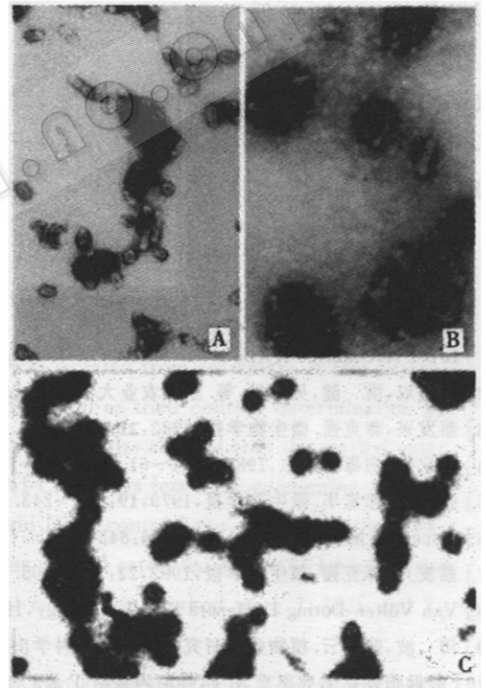


图2 提纯病毒的电镜观察结果(醋酸铀负染)  
A 方法(1)所获病毒粒子(10500×), B 方法(2)所获病毒粒子(19500×), C 方法(3)所获病毒粒子(13000×)

有杂蛋白;方法(3)在提纯过程中病毒粒子只是在短时间内(步骤8~12)暴露于含有EDTA的溶液中,并在接下来的步骤中通过添加二价金属离子使病毒稳定性得到恢复;因此,既有效地消除了核糖体等杂质,又保持了AMV的稳定性。方法3的病毒得率较高、杂蛋白比较少、病毒粒子完整,是比较理想的AMV提纯方法。提纯病毒在-70℃保存12个月以上,与保存在昆诺藜上经过接种活化的AMV毒源比较在昆诺藜接种叶上形成的早期坏死斑数量和出现系统症状的时间,方法(3)与植物上的毒源相当,而方法(2)和方法(1)的侵染力则明显偏低,方法(2)低于方法(1)。

**致谢** 部分工作在原浙江农业大学生物技术研究所完成,感谢李德葆、洪健先生给予的支持和帮助。

### 参 考 文 献

- [1] Brunt A, Crabtree K, Gibbs A. *Viruses of Tropical Plants*. Wiltshire: Redwood Press Ltd. 1990, 71~75.
- [2] 陈象双, 洪 健, 吴琳福, 等. 浙江农业大学学报, 1994, 20: 24~28.
- [3] 蔡发兴, 莽克强. 微生物学报, 1982, 22: 233~249.
- [4] 魏宁生. 病毒学杂志, 1987, 4: 54~61.
- [5] 张鹤龄, 郭素华. 微生物学报, 1979, 19: 238~243.
- [6] Jaspars E M. *Arch Virol*. 1999, 144: 843~863.
- [7] 蔡发兴, 莽克强. 微生物学报, 1982, 22: 300~305.
- [8] Van Volten-Doting L, Jaspars E M J. *Virology*, 1972, 48: 699~708.
- [9] 田 波, 裴美云. 植物病毒研究方法. 北京: 科学出版社, 1987, 153~207.
- [10] 萨母布鲁克J, 弗里奇MF, 曼尼阿蒂斯T著. 金冬雁等译. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1996, 880~887.



图3 提纯病毒 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

M 蛋白质 markers, 1 方法(2)提纯病毒,  
2 方法(3)提纯病毒, 3 方法(1)提纯病毒