

# 马铃薯 Y 病毒组病毒高产量提取方法的建立

周雪平 陈集双 李德葆

(浙江农业大学生物技术研究所, 杭州 310029)

李尉民

(农业部植检实验所双桥隔离圃, 北京 100024)

**摘要** 本文报道了高产量提取芜菁花叶病毒(TuMV)、莴苣花叶病毒(LMV)、芋花叶病毒(DMV)和大豆花叶病毒(SMV)的提取方法。本方法通过使用高盐浓度的磷酸盐缓冲液以及在缓冲液中加入氯化镁和脲,并用 Triton X-100 作为澄清剂,替代常规使用的氯仿和正丁醇,成功的提取到了大量病毒粒子,上述四种病毒提取的得率分别是 TuMV 为 173.3mg/kg 病叶,LMV 为 96mg/kg 病叶,SMV 为 199.2mg/kg 病叶,DMV 为 176.6mg/kg 病叶。

**关键词** 提纯,马铃薯 Y 病毒组,芜菁花叶病毒,莴苣花叶病毒,芋花叶病毒,大豆花叶病毒

马铃薯 Y 病毒组病毒(Potyviruses)是国际病毒分类委员会承认的 35 个植物病毒组和科中最大的一个组,含有 157 个肯定成员及可能成员<sup>[1]</sup>。该组病毒在自然界主要以蚜虫非持久性方式传毒,有的还能通过种子传毒,并能在多种植物上引起严重危害,造成经济上的巨大损失,因而该组病毒越来越受到人们关注。

Potyviruses 病毒粒体线形,大小为  $11 \times 680-900\text{nm}$ ,在开展 Potyviruses 研究时需要提纯病毒,而该组病毒在提纯过程中易发生凝集,不仅造成病毒产量的损失,也降低了提纯病毒的生物活性和免疫原性<sup>[2,3]</sup>,因而迫切需要解决提纯过程中病毒的凝集问题。本文报道了高产量提取四种 Potyviruses 的提纯方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒源和繁殖寄主

芜菁花叶病毒(TuMV)<sup>[4]</sup>、莴苣花叶病毒(LMV)<sup>[5]</sup>、大豆花叶病毒(SMV)<sup>[6]</sup>和芋花叶病毒(DMV)<sup>[7]</sup>均由作者分离鉴定,分别繁殖于青菜(苏州青)、昆诺藜、大豆(1138-2)和 *Philodendron selloum* 上,在显症初期摘取病叶,按下面方法提纯。

### 1.2 提纯方法

每 100g 病叶中加入 200ml pH7.5 0.5 mol/L 磷酸盐缓冲液(PB)(含 0.01mol/L Na-EDTA 和 0.1% 巯基乙醇),匀浆 2 分钟后用双层尼龙纱布过滤,滤液离心(6000r/min, 20 min)去植物组织残渣,得上清液边搅拌边滴加 2.5% Triton X-100、4% PEG(分子量为 6000)和 0.1mol/L NaCl,4℃ 搅拌 4 小时以上,离心(11000r/min, 15 min)得沉淀。沉淀用 pH7.5 的 0.5mol/L PB(含 0.01mol/L MgCl<sub>2</sub> 和 0.5mol/L 脲)充分洗涤,离心(6000r/min, 15 min)后吸出上清液置于离心管,沉淀再洗涤离心,反复 3 次。合并上清液,超速离心(33000r/min, 100 min),所得沉淀悬浮后离心(8000r/min, 15min),上清液再超离心(33000r/min, 100min),离心管底加有 20—30% 蔗糖垫,所得沉淀用 pH7.5 的 0.5mol/L PB(含 0.01mol/L MgCl<sub>2</sub>)悬浮,悬浮液即为病毒提纯液。

### 1.3 提纯病毒的电镜观察和生物活性测定

提纯病毒液用常规方法制样后用 2%

pH6.7 磷钨酸或 2% pH5.0 醋酸铀负染, 电镜下观察病毒粒体形态。

提纯病毒稀释后 TuMV 和 LMV 回接昆诺藜, SMV 回接大豆, DMV 回接 *Philodendron selloum*, 10 天后观察记载发病情况。

## 2 试验结果

### 2.1 TuMV 提纯

600g 青菜病叶提纯后得到 10ml 病毒悬浮液, 悬浮液稀释 50 倍后, 用紫外分光光度计进行紫外吸收测定, 表现出典型的病毒核蛋白吸收曲线, 最高吸收峰为 260nm, 最低吸收峰为 240nm,  $A_{260}/A_{280} = 1.363$ , 平均每公斤新鲜病叶可提取出 173.3mg 病毒。

提纯病毒在电镜下可观察到大量线状病毒粒体, 且不发生凝集, 其长度分布在 690—770nm 之间, 平均长度为 736nm(图 1)。提纯病毒接种昆诺藜后具有很强的侵染性。



图 1 TuMV 提纯病毒粒体形态(48000×)

### 2.2 LMV 提纯

50g 豌豆病叶提纯后得到 3ml 病毒提纯液, 稀释 30 倍后进行紫外吸收测定, 呈现出典型的病毒吸收曲线,  $A_{260} = 0.449$ ,  $A_{280} = 0.326$ ,  $A_{260}/A_{280} = 1.38$ , 平均每公斤病叶可提取获得 96mg 病毒。

提纯病毒在电镜下可观察到大量线形病毒粒体, 平均长度为 750nm, 且病毒不发生凝集(图 2), 提纯病毒接种昆诺藜后表现出很强的侵染性。

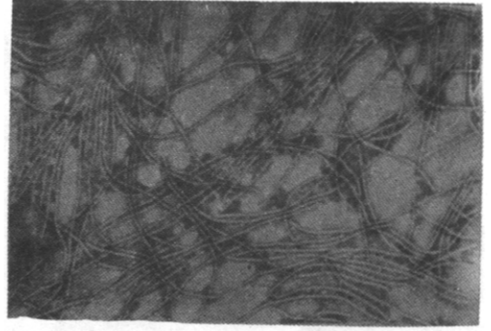


图 2 LMV 提纯病毒粒体形态(36000×)

### 2.3 SMV 提纯

100g 大豆病叶提纯后获得 2ml 病毒提纯液, 稀释 50 倍后进行紫外吸收测定, 呈现出典型的病毒吸收曲线,  $A_{260} = 0.478$ ,  $A_{280} = 0.314$ ,  $A_{260}/A_{280} = 1.52$ 。平均每公斤病叶可提取获得 199.2mg 病毒。提纯病毒粒体线形, 长约 750nm(图 3)。提纯病毒接种大豆后表现很强的侵染性。

### 2.4 DMV 提纯

100g *Philodendron selloum* 病叶提纯后获得 4.5ml 病毒提纯液, 稀释 11 倍后进行紫外吸收测定, 呈现出典型的病毒吸收曲线,  $A_{260} = 1.106$ ,  $A_{280} = 0.678$ ,  $A_{260}/A_{280} = 1.63$ 。平均每公斤病叶可提取得到 176.6mg 病毒, 提纯病毒粒体线形, 平均长度为 745nm(图 4)。提纯病毒接种 *Philodendron selloum* 后表现出很强的侵染性。

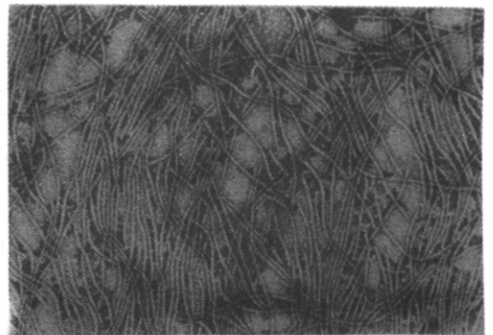


图 3 SMV 提纯病毒粒体形态(36000×)

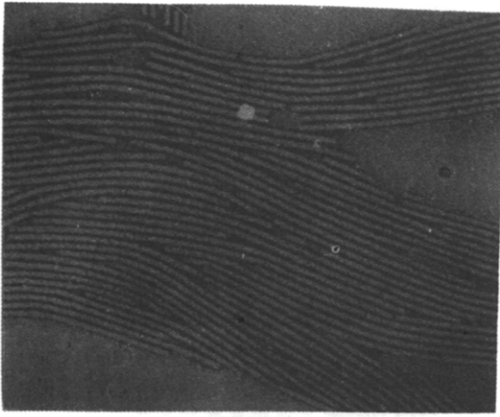


图4 DMV 提纯病毒粒体形态(60000×)

### 3 讨论

在提纯马铃薯 Y 病毒组病毒时,遇到的主要问题是病毒的不可逆聚集,因而易在低速离心时丢失。作者在提纯时,通过使用高盐浓度的磷酸盐缓冲液(0.5mol/L)以及在缓冲液中加入脲及 MgCl<sub>2</sub> 后,解决了病毒凝集问题,电镜下观察四种提纯病毒时,未发现凝集现象。此外作者使用 Triton X-100 作为澄清剂,代替广泛使用的氯仿和正丁醇,获得了理想结果。文献报道氯仿和正丁醇能使多种马铃薯 Y 组病毒遭受破坏<sup>[8]</sup>, 作者认为 Triton X-100 是很好的病毒提纯澄清剂,除澄清作用外,它还能防止病毒的凝集。用本文报道提纯方法提取 TuMV、LMV、SMV 和 DMV 时均能提取到大量病毒粒体,病毒得率都很高,病毒稳定性好。且寄主

杂质较少,作者认为本方法可推广用于 Potyviruses 的提纯。而其它植物病毒组病毒,只要适当替换缓冲液种类,也可使用本方法获得大量病毒粒体。

夏俊强等报道提纯 LMV 时,提纯制品的病毒纯度不高,且提纯过程中病毒稳定性较差<sup>[3]</sup>,除提纯方法外,可能与使用莴苣作为繁殖寄主有关,作者认为豌豆是较好的 LMV 繁殖寄主。因此提取 Potyviruses 时尚需选择合适的繁殖寄主。

### 参 考 文 献

[1] Francki R I B, Fauquet C M, Knudson D L, et al. Classification and Nomenclature of Viruses Verlag Wien New York, 1991, 351-357.

[2] Choi J K, Maeda T, Wakimoto S. Ann Phytopath Soc Japan, 1987, 43: 440-448.

[3] 夏俊强, 严敦余, 王清和, 等. 植物病理学报, 1984, 14: 241-246.

[4] 周雪平, 濮祖芹. 南京农业大学学报, 1990, 13(4 增): 51-55.

[5] 周雪平, 濮祖芹. 江苏农业学报, 1991, 7(2): 44-47.

[6] 李尉民, 濮祖芹. 南京农业大学学报, 1990, 13(4 增): 56-59.

[7] 陈集双, 高其康, 李德葆. 中国病毒学, 1993, 8: 271-276.

[8] Hollings M L, Brunt A A. In "Handbook of Plant Virus Infections, Comparative Diagnosis" (Kurstak E Ed.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981, 731-807.

## A METHOD FOR HIGH YIELD PURIFICATION OF POTYVIRUSES

Zhou Xueping Chen Jishuang Li Debao

(Institute of Biotechnology, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Li Weimin

(Plant Quarantine Institute, Ministry of Agriculture, Beijing 100024)

**Abstract** This paper reported a method for high yield purification of turnip mosaic virus (TuMV), lettuce mosaic virus (LMV), dasheen mosaic virus (DMV) and soybean mosaic virus

(下转第 179 页)

(上接第 186 页)

(SMV). The viruses were purified by using Triton X-100 and high molarity potassium phosphate buffer added with magnesium chloride and urea. The yields of purified viruses were 173.3, 96, 199.2 and 176.6 mg per kg of the infected leaves, respectively. The purified virus particles were not aggregated. Few contaminants from host materials was observed in the purified preparation under electron microscopy.

**Key words** Purification, Potyviruses, TuMV, LMV, DMV, SMV