

# 番木瓜环斑病毒的提纯研究\*

高文通\*\* 高乔婉 范怀忠

(华南农业大学植保系, 广州, 510642)

**摘要** 详细报道了影响番木瓜环斑病毒 (PRV) 粗提纯效果的几个主要因素 (繁殖寄主种类、有机澄清剂、分散剂、病毒浓缩前的去渣离心力、浓缩病毒的超离心力等) 的最佳选择。繁殖寄主以角葫芦 (*Cucumis melo*) 最好。该研究综合上述最佳选择而拟定的一次差速离心和一次 30% 蔗糖硫酸铯连续密度梯度离心 3 h 的简单程序较好地提纯了 PRV, 提纯的病毒有典型核蛋白紫外吸收曲线,  $A_{260}/A_{280}=1.68$ , 提纯产量为 2.56 mg/100 g 西葫芦病叶。所得病毒制剂可满足血清学、分子生物学等方面的深入研究。

**关键词** 番木瓜环斑病毒; 线状病毒提纯

**中图分类号** S436.67

40 年代末美国首次报道 (Holmes et al, 1948) 的番木瓜环斑病 (Papaya Ringspot Virus PRV) 现已成为严重限制番木瓜生产的世界性病害。对该病毒国内外都做过不少研究。由于其粒子细长容易在提纯过程中断裂和聚集, 并与寄主杂质粘结而丢失 (Gonsalves et al, 1980; Merceredes et al, 1983) 因而提纯较为困难。在国外其提纯方法大多是按西瓜花叶病毒 (WMV)、菜豆普通花叶病毒 (BCMV) 和马铃薯病毒 Y (PVY) 的提纯程序经适当改进后进行 (Francine et al, 1987, Gonsalves et al, 1980; Merceredes et al, 1983) 精提纯一般采用铯盐等密度梯度离心约 20~25 h 来进行 (Gonsalves et al, 1980; Merceredes et al, 1983; Yeh et al, 1985) 效果较好。但费用太高, 因此很有必要在现有条件下研究提高提纯效果的最佳途径。

在影响 PRV 提纯效果的众多因素中, 繁殖寄主种类、分散剂和澄清剂的作用已有报道, 但研究结果有不同程度的差异 (吴方诚等, 1983, Gonsalves et al, 1980; Merceredes et al, 1983; Yeh et al, 1985)。本文就影响 PRV 提纯效果的主要因素进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 毒源 (PRV-YS) 由华南农业大学植物病毒研究室提供。

1.1.2 繁殖寄主 角葫芦由美国康乃尔大学 Dr. D. Gonsalves 惠赠。

### 1.2 方法

1.2.1 PRV-YS 的繁殖 在防虫温室中按常规汁液摩擦法接种, 18~25 d 后采病叶作提纯材料。

1.2.2 电镜样品的制作和观察 (简称 TEM) 按常规方法制样, 以目测每视野中的病毒粒体

1995-04-18 收稿

\* 国家自然科学基金资助项目部分内容; \*\* 现在广州黄埔动植物检疫局工作

数、粒体的分散性、完整性和寄主杂质含量来评定提纯效果。

1.2.3 紫外吸收光谱测定(简称 UV 测定) 按常规方法测定,计算病毒制剂的浓度、纯度和提纯产量。

2 试验结果

2.1 PRV 粗提纯的主要影响因素的探讨

2.1.1 繁殖寄主种类 参照国内外有关 PVY 病毒组(包括 PRV)的提纯方法,采用一次 PEG 沉淀和一次超速离心的粗提纯程序。试验繁殖寄主为西葫芦和角葫芦,试验重复 3 次。试验结果:用角葫芦和西葫芦的提纯产量分别为 27.45 a 和 14.25 b(a, b 表示邓肯复极差检验结果),病毒制剂纯度分别为 1.37 a 和 1.48 b,抽提液分别为浅绿色和绿褐色,粗制剂颜色分别为橙黄色和浅黄绿色。这表明用角葫芦作繁殖寄主的效果远比西葫芦好:前者的提纯产量比后者高近 1 倍,绿色杂质去除较彻底,粗制剂纯度也较高。

2.1.2 PEG 沉淀前的去渣离心力 本试验采用一次 PEG 和一次超速离心的粗提纯程序。离心力试验设 4 个处理(表 1),离心时间均为 15 min,对得到的病毒粗制剂进行 UV 测定和 TEM 观察。综合表 1 各检测结果,认为 PEG 沉淀前的去渣离心力以 10 000 ~ 15 000 g 较为合适。

表 1 不同去渣离心力的 PRV 提纯效果<sup>(1)</sup>

检 测 项 目	去 渣 离 心 力 /g			
	500	10 000	15 000	20 000
提纯产量/mg · (100g) <sup>-1</sup>	20.86 ab <sup>(2)</sup>	25.83 a	23.24 a	16.21 bc
病毒纯度(A260/A280)	1.39 c	1.48 b	1.52 a	1.54 a
提纯液颜色	绿褐色	浅绿褐色	黄褐色	黄褐色
病毒粒体数量	较 少	最 多	很 多	多
杂质粗颗粒数	很 多	较 多	较 少	极 少

(1)表中数据为 3 次重复实验平均值;(2)采用邓肯氏复极差检验,表 2,3,4 同

2.1.3 浓缩 PRV 的超速离心力 在采用一次 PEG 和一次超速离心粗提纯程序的基础上,本试验设 5 个不同超速离心力处理(表 2),离心时间均为 90 min。得到的病毒粗制剂再用 3 000 g 离心 15 min,取上清液作 UV 测定和 TEM 观察。试验结果表明超速离心力以 110 000 g 较为合适。

2.1.4 分散剂 在采用上述 PRV 粗提纯程序基础上,试验的分散剂选常用的 EDTA-NA<sub>2</sub>、脲和 TritonX-100 3 种并设 4 个处理:(1)PB<sub>1</sub>, PB<sub>2</sub>, PB<sub>3</sub> 中不加分散剂;(2)PB<sub>1</sub>, PB<sub>2</sub> 中加 EDTA-NA<sub>2</sub>, PB<sub>3</sub> 中不加;(3)PB<sub>1</sub>, PB<sub>2</sub> 中加 EDTA-NA<sub>2</sub> 和脲, PB<sub>3</sub> 中加脲;(4)PEG 沉淀加 1% TritonX-100,其它同(3)。各分散剂的加入量按文献(Gonsalves et al, 1980; Merceredes et al, 1983; Nagel et al, 1985; Yeh et al, 1985)报道进行(图 1),去渣离心力为 13 000g,超速离心力为 110 000 g。试验结果(表 3)表明:3 种分散剂均有较好效果,但以 EDTA-NA<sub>2</sub> 和脲最好。

2.1.5 有机澄清剂加入量 按文献报道(吴方诚等, 1983; Gonsalves et al, 1980; Merceredes et al, 1983)选常用的 CCl<sub>4</sub> 和 CHCl<sub>3</sub> 的等量混和物,其它提纯过程同上,试验结果(表 4)表明:有机澄清剂以 80%CCl<sub>4</sub>-CHCl<sub>3</sub> 等量混和物提纯效果较好。

表 2 不同超速离心力的 PRV 提纯效果<sup>(1)</sup>

检 测 项 目	超 速 离 心 力 /g				
	60 000	80 000	95 000	110 000	130 000
提纯产量/mg · (100 g) <sup>-1</sup>	11.35 a	11.54 a	17.92 b	23.95 c	22.43 c
病毒纯度 (A260/A280)	1.35 a	1.39 a	1.48 b	1.53 bc	1.51c
病毒粒体数量	很 少	较 少	多	最 多	很 多
病毒粒体分散性	很 好	很 好	好	好	很 差
病毒粒体完整性	最 好	很 好	好	好	较 差

(1)表中数据为 3 次重复实验平均值

表 3 分散剂种类对 PRV 提纯效果的影响<sup>(1)</sup>

检 测 项 目	分 散 剂 种 类 <sup>(2)</sup>			
	O	A	A+B	A+B+C
提纯产量/mg · (100 g) <sup>-1</sup>	9.52 a	16.83 b	23.81 c	26.54 c
病毒纯度 (A260/A280)	1.35 a	1.44 b	1.50 c	1.48 bc
病毒粒体分散性	很 差	较 差	较 好	好

(1) 表中数据为 3 次重复实验平均值；(2)O:无分散剂 A: EDTA-NA<sub>2</sub> B: 脲 C: TritonX-100

表 4 有机澄清剂加入量对 PRV 提纯效果的影响<sup>(1)</sup>

检 测 项 目	有机澄清剂加入量 <sup>(2)</sup> /%			
	0	40	80	120
提纯产量/mg · (100 g) <sup>-1</sup>	12.61 a	16.16 b	20.41 c	17.21 b
病毒纯度 (A260/A280)	1.44 a	1.48 b	1.48 bc	1.46 c
抽提液颜色	深绿色	绿褐色	浅绿褐色	黄褐色
粗制剂颜色	黄绿色	浅黄绿色	浅黄绿色	淡黄色

(1)表中数据为 3 次重复实验平均值；(2)“%”有机澄清剂 CCl<sub>4</sub>-CHCl<sub>3</sub> 等量混合物 (mL) 与叶重 (g) 的百分比

通过上述对影响 PRV 粗提纯效果的几个主要因素的研究，并根据现有条件拟定 PRV 粗提纯程序 (图 1)。按此程序重复 5 次试验均获得较好的效果：UV 测定具有典型的核蛋白吸收曲线，最高和最低吸收峰分别约在 258 nm 和 238 nm 处，A260/A280=1.57、A258/A238=1.38，TEM 检查结果，病毒粒体数较多，分散性较好，寄主粗颗粒很少。

2.2 PRV 精提纯研究

Francine 等 (1987) 报道用 10% ~ 40% 蔗糖密度梯度离心法较好地提纯了长线状的西瓜花叶病毒，用 30% 蔗糖硫酸铯不连续密度梯度离心法提纯了柑桔衰退病毒 (Brakke et al,1974) 以及小麦梭条斑花叶病毒 (周广和等, 1989)，本研究参照上述两方法精提纯 PRV，效果不理想，于是在 PRV 粗提纯程序 II 的基础上用 30% 蔗糖硫酸铯连续密度梯度离心法进行试验 (mol/L) 分别为 (I) 0.7,0.5,0.3,( II) 0.8,0.6,0.4,( III) 0.9,0.6,0.3 (均用 30% 蔗糖液配制)。在 4.2 mL 离心管中依次加入上述溶液，上层再加 0.9 mL 的 30% 蔗糖，经一昼夜扩散形成一连续密度梯度介质，在此梯度介质上加入 1.0 mL 病毒粗制剂，立即进行 40 000 r/min (160 000 g) 离心 3 h (MSE 型 SW6 × 4.2)，在距离离心管底约 1/4 处有 1 条明显的乳白色病毒带，其下有 1 条浅黄褐色杂质带 (图 2)，此两带用细玻璃管取出后再用 PB<sub>3</sub> 稀释，进行 100 000 g 离心 90 min，其沉淀用 2 ~ 3 mL PB<sub>3</sub> 悬浮，再进行 UV 测定和 TEM 观察，结果见



图3, 4。

从图2可以看出,在硫酸铯不同梯度浓度的离心管中,病毒带和杂质带均被区分开,其中以低梯度浓度的处理(I)病毒带和杂质带被分开得较好,且病毒带窄而明显,分离较为容易。图3和图4表明:从病毒得到的精提纯制剂具有很典型的核蛋白紫外线吸收曲线,由此计算得出 $A_{260}/A_{280}=1.68$ ,提纯产量为2.56 mg/100g病叶,电镜视野中的病毒粒体分散性好且几乎没有颗粒状寄主杂质。

### 3 讨论与结论

我们通过查阅和比较国内外有关PRV提纯的文献和多次预备试验,明确了影响PRV粗提纯效果的几个主要因素,并对这些因素进行了多次重复试验,得到了满意结果。

提纯PRV的繁殖寄主多数学者用西葫芦,只是Yeh等(1985)报道用角葫芦较好,本研究结果支持Yeh的观点。

防止PRV粒体聚集是许多学者提到的一个重要问题(吴方诚等,1983;Gonsalves et al, 1980; Merceredes et al, 1983; Yeh et al, 1985)在各种提纯缓冲液中和在浓缩PRV时加适量分散剂,可减轻粒体聚集以防止丢失。本试验发现同时采用提纯长线状病毒的常用分散剂的种类越多,提纯效果越好。可能是由于不同分散效果相同,因而混和它们应用效果较好,其机理有待进一步探索。

澄清和离心去除寄主残渣是PRV提纯过程中的又一个关键步骤。本研究用多数学者所用的温和澄清剂 $CCl_4$ 和 $CHCl_3$ 来进行加入量的试验,结果支持了Merceredes等(1983)和Yeh(1985)的观点,即60%~80%的 $CCl_4-CHCl_3$ 的等量混和物,既能较彻底地澄清绿色杂质又不至于使PRV粒体断裂变性。至于PRV提纯的去渣离心力,文献报道差异较大(吴方诚等,1983; Gonsalves et al, 1980; Merceredes et al, 1983)本试验结果表明10 000~15 000 g较合适,寄主粗颗粒去除较彻底,且去渣后病毒粒体损失较少。

关于沉降PRV的超速离心力问题,本研究结果支持吴方诚的报道(吴方诚等,1983)即中等超离心力110 000 g离心90 min可使PRV沉降较完全而寄主细胞的小颗粒沉降较少,同时还避免了离心力过大所造成的沉淀过分粘结而难以重新悬浮的缺点。

PRV的精提纯研究是国内外学者非常重视的一个问题(Gonsalves et al, 1980; Merceredes et al, 1983, Yeh et al, 1985)本研究参照前人精提纯长线状病毒的方法,经多次摸索试验用30%蔗糖硫酸铯连续密度梯度离心并适当降低硫酸铯梯度浓度和增大超速离心力来纯化PRV,取得了较好效果,病毒制剂纯度达到1.68,提纯产量接近于Yeh报道的用两次硫酸铯等密度梯度离心约20 h来纯化PRV的产量(如试验用角葫芦作繁殖寄主,提纯产量还会更高)。但其最适硫酸铯梯度浓度和蔗糖浓度还有必要再进一步探索。

本研究用一次PEG沉淀,一次差速离心(附蔗糖垫)、一次蔗糖硫酸铯连续密度梯度离心的简单提纯程序较好地提纯了PRV。同时还首次报道了用30%蔗糖硫酸铯连续密度梯度离心3 h能精提纯长线状的植物病毒。

#### 参 考 文 献

- 吴方城,徐绍华,彭学贤. 1983. 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, 13(3): 21~28
- 周广和,陈剑波,陈善铭. 1989. 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, 5(1):

46~51

- Brakke M K, Rochow W F. 1974. Ribonucleic acid of barley yellow dwarf virus. *Virol*, 61: 240~248
- Francine W V M, Garrett H M. 1987. Purification and identification of a South Africa isolate of Watermelon Mosaic Virus—Moroco. *J Phytopath*, 120: 255~270
- Gonsalves D, Ishii M. 1980. Purification and serology of papaya ringspot virus. *Phytopath*, 70: 1028~1032
- Holmes F O, Hendrix W. 1948. Ringspot of papaya in Hawaiian Islands. *Phytopath*, 38: 310~312
- Mercercedes De L R, Lastra R. 1983. Purification and partial characterization of papaya ringspot virus. *Phytopath*, 106(4): 329~336
- Nagel J, Hiebert E. 1985. Complementary DNA cloning and expression of the papaya ringspot potyvirus sequence encoding capsid protein and a nuclear inclusion—like protein in *Escherichia coli*. *Virol*, 143: 435~441
- Yeh S D, Gonsalves D. 1985. 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. *Virol*, 143: 260~271

## STUDY ON PURIFICATION OF PAPAYA RINGSPOT VIRUS

Gao Wentong\*   Gao Qiaowan   Fan Huaizhong \*\*

(Dept. of Plant Protection, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

### Abstract

Every best choice of several main factors affecting the crude purification of papaya ringspot virus (PRV) (including kinds of propagation host, organic clarification agent, dispersion agent, centrifugal force for removing sediment before concentrating the virus, supercentrifugal force for concentrating the virus) was reported detailedly in this paper. Jelly melon (*Cucumis metuliferus*) was found to be a better propagation host than the Zucchini Squash (*Cucurbita pepo*). A simple procedure of one cycle of different speed centrifugation and one cycle of  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  continuous density gradient supercentrifugation with sugar cushion was designed. The virus preparation showed a typical ultraviolet absorption curve for nucleoproteins,  $A_{260}/A_{280} = 1.68$ , the yield of virus was 2.56 mg/100 g of infected squash leaves and the virus preparation could be suitable for the further research on the serology and molecular biology of PRV.

**Key words** Papaya Ringspot Virus; purification

\* Now in Huangpu Animal and Plant Quarantine Bureau of Guangzhou; \*\* Fann Hweichung