

84-88

第8卷第1期  
1993年3月中国病毒学  
VIROLOGICA SINICAVol. 8 No. 1  
Mar. 1993

## 甘薯羽状斑驳病毒分离提纯及血清学特性

朱作为 薛启汉

(江苏省农科院遗传生理研究所, 南京210014)

S 435.313

## 提 要

从感染有甘薯羽状斑驳病毒的牵牛 (*I. Nil*) 叶片, 通过超速离心, Cs<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>密度梯度离心提纯SPFMV粒子, 每千克叶片可得病毒 13—15 毫克。电镜观察病毒粒子长度范围在 820—860 nm, 也可见到 900 nm 以上的特长粒子。病毒提纯物的紫外吸收曲线呈典型核蛋白吸收曲线, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> = 1.21, 免疫电镜检查, 该病毒与 SPFMV 抗血清起阳性反应。

关键词: 甘薯羽状斑驳病毒

提纯

免疫电镜

血清学特性

甘薯病毒种类较多, 而以甘薯羽状斑驳病毒 (Sweet Potato Feathery Mottle Virus, 简称 SPFMV) 最为流行<sup>[9,11,14]</sup>, 是甘薯的一种主要病毒, 已发现不同株系<sup>[9]</sup>。我国甘薯栽培面积占全世界的70%左右, 主要栽培地区均发现该病毒存在<sup>[11]</sup>。SPFMV是蚜传病毒, 属马铃薯丫病毒组, 可通过磨擦接种感染牵牛 (*Ipomoea Nil*) 园叶牵牛 (*I. purpurea*)、三色牵牛 (*I. tricolor*)、巴西牵牛 (*I. setosa*) 以及莧色藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 和本氏烟草 (*Nicotiana berthamiana*) 等。在甘薯上则引起明脉、退绿斑、紫色环斑、叶变形等病毒病症状<sup>[5,11]</sup>。

国内尚未见SPFMV提纯研究报道。国外的分离提纯方法、程序烦杂, 时间较长。本文报道一种程序较为简单、省时的提纯方法, 并用免疫电镜学方法对该病毒提纯物进行了血清学鉴定和研究。

## 材 料 和 方 法

## 一、病毒来源

用SPFMV感染的 *I. Nil* 叶片作病毒分离提纯的材料, 由徐州甘薯研究中心杨永嘉先生提供。首先经ELISA鉴定选出含SPFMV的甘薯植株, 以无毒棉蚜 (*Aphis gossypii*) 为媒介将病毒传到指示植物 *I. setosa* 上, 发病后再通过嫁接, 将病毒传到指示植物 *I. Nil* 上, 七、八月份, 收集病症明显的 *I. Nil* 叶片, 作为病毒分离提纯的材料。

本文于1991年9月18日收到, 1992年3月18日修回。

## 二、病毒的分离提纯

参考J. W. Moyer<sup>(7,10,12)</sup>等方法,修改制定下列分离提纯程序:

新鲜叶片样品,以0.5mol/L (pH8.0)的硼酸缓冲液(含0.01mol/L EDTA-Na, 1% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和0.01mol/L DIECA)和CCl<sub>4</sub>按1:3:0.5比例混合匀浆5—10分钟(4%下进行)。匀浆液经8000g离心10分钟,取上清液,加入1% Triton X-100搅拌15分钟,再加入NaCl(终浓度为0.1mol/L)和4%的PEG6000,继续搅拌1.5小时,静止半小时,10000g离心收集沉淀。沉淀用0.05mol/L硼酸缓冲液(含0.001mol/L EDTA-Na, 1% Triton X-100, pH8.0)悬浮1小时,再静止半小时,9000g离心10分钟,去沉淀。每30ml上清液,分别铺在5ml25%的蔗糖垫(以0.05mol/L硼酸缓冲液,含1% Triton X-100, pH8.0配制)上,90000g(日立80P-7, RP50T)离心2小时。将片状沉淀重新匀浆(Potter-Elvehjem匀浆器),再以磁力搅拌3小时以上,经一次低速离心(8000g)10分钟,上清液每1ml铺在CsCl密度梯度上(CsCl密度梯度为0—40%,用含20%蔗糖的0.05mol/L硼酸缓冲液配制),以38000r/m(日立80P-7, RPS 65T)8℃下离心3小时。用注射针头吸出病毒带。加入3—4倍量的0.05mol/L硼酸缓冲液(含0.001mol/L EDTA-Na, pH8.0)稀释,36000r/m(RP50T)离心2小时,弃上清,收集病毒沉淀,重悬浮于0.05mol/L的硼酸缓冲液中。

## 三、病毒检测

电镜检查:病毒纯化过程中以及最后纯化物,均用2%磷钨酸(pH6.8)负染,于H-600电镜下检查。

免疫电镜:参考林均安<sup>(2)</sup>和M. A. Cadena-Hinojosa<sup>(4)</sup>的方法,稍加修改。SPFMV抗血清由美国北卡罗利那州立大学J. W. Moyer教授提供。

蜡板上先滴一滴SPFMV抗血清稀释液(pH7.0的0.1mol/L磷酸缓冲液按1:200稀释),将铜网膜面漂浮于抗血清上,室温下30分钟,取出铜网,用20滴0.1mol/L磷酸缓冲液连续滴洗,吸干余液。膜面朝下,铜网再漂浮在样品悬液上(0.5克病叶,1.5ml 0.1mol/L磷酸缓冲液粗提液),室温下30分钟,取出铜网,再以20滴0.1mol/L磷酸缓冲液和30滴重蒸水连续冲洗,吸干。用6滴2% PTA (pH6.8)滴染,自然干燥H-600电镜下,检查。

病毒粒子长度:按电镜照片,测量100个病毒颗粒长度(范围在800—900nm之间),少数800nm以下或900nm以上的不计数。

病毒浓度测定:病毒样品以Shimadzu UV-360扫描( $\lambda$ 200—300),病毒浓度按消光系数 $E_{0.1\%}/260=2.5^{(13)}$ 计算。

## 结果与讨论

### 一、病毒纯化:

以SPFMV症状明显的甘薯叶片为材料的预备试验中,提纯效果很差,无论是粗提液,还是最后的提取物,电镜观察只看到少数病毒颗粒,形态长短不一。以氯仿-四氯化碳或正丁醇澄清匀浆液,效果也不明显。以甘薯叶为材料,匀浆液或上清液呈粘稠状,杂质多。利用1—2次差速离心,虽能去掉大量杂质,但也损失了大量病毒,而且增加了操作时间。蔗糖密度梯度(50—10%)似乎也起不到分离提纯的效果,大量病毒颗粒沉入离心管底。

为防止病毒颗粒聚集,1%的TritonX-100比0.5mol/L的尿素效果更好。利用一次

蔗糖垫可有效地滤掉植物色素、寄主的游离蛋白和核酸。CsCl密度梯度离心对分散的病毒颗粒或聚集的病毒颗粒均有良好的分离效果。经CsCl密度梯度离心后，在自然光下均



图1 甘薯羽状斑驳病毒 (SPFMV) 提纯物电镜照片, 用2%磷钨酸 (pH6.8) 负染, 标尺300nm

Fig.1. Electron microscopy photo of CsCl step gradient purified sweet potato feathery mottle virus negatively stained with 2% PTA, pH6.8.

可见两条乳白色病毒带, 即使供试材料含毒量低, 在手电筒光照下, 两条病毒带仍清晰可见。CsCl离心管中两条带一般距管底1—1.3和1.5厘米处。电镜下可看到两条带均为大量丝状病毒颗粒 (图1), 颗粒长短整齐, 既有分散的也有聚集的颗粒。本试验供试样为徐州7—8月高温季节采集的材料, 病毒收率大约为10—15毫克病毒/每公斤病叶, 若在春秋凉爽季节采集样品, 病毒产量将更高。本试验分离的病毒, 机械接种指示作物 *I. setosa*, 8/10植株产生典型的SPFMV症状, 表明该程序分离的SPFMV具有侵染性。

## 二、病毒粒子的性质

1. 病毒形态: 经CsCl梯度离心纯化后的提取物, 经2%PTA负染后电镜观察, 可见大量丝状病毒颗粒, 粗细均匀, 呈弯曲状。测100个粒子, 其长度分布在820—860nm范围内, 也有超过900nm的少数颗粒, 短颗粒较少见。

2. 紫外吸收曲线: 提取的纯化物紫外吸收曲线呈典型核蛋白曲线, 最高吸收峰在254nm处。OD<sub>260/280</sub>为1.21。

3. 血清学反应: 粗提物在常规电镜下观察, 较难见到病毒颗粒, 利用SPFMV抗血清进行免疫电镜观察, 每个视野中可见到10个左右病毒颗粒。SPFMV抗血清与粗提物中病毒粒子能专一性结合, 证明该提纯物是SPFMV病毒 (图2) 免疫电镜观察也使



图2 甘薯羽状斑驳病毒的免疫吸附电镜标尺300nm  
Fig.2. Immunosorbent electronmicroscopy of SPFMV with antiserum from U.S.A. Bar=300nm  
(a) without immunosorption  
(b) immunosorption with FS PMV antiserum from U.S.A.

病毒颗粒的形态更加清晰完整。

SPFMV是马铃薯Y病毒组中颗粒较长的一种,一般在830—850nm<sup>[3,4,6,13]</sup>。本试验提纯的病毒颗粒长度范围在830—860nm之间,形态等与前人的描述一致;纯化物与J.H.Moyer提供的SPFMV抗血清呈典型阳性反应,均证明该纯化物是甘薯羽状斑驳病毒。

采用本程序分离纯化SPFMV的产量一般在13—15mg/公斤材料,每批材料所获病毒产量不等,主要影响因素是供试材料的质量。在高温(30℃以上)季节取材。提纯病毒产量较低,而且病毒颗粒容易聚集成团,聚集成团的病毒颗粒在低速离心时也沉入管底,采用高速离心,反而加剧病毒凝聚程度,因此,超离心次数越多,丢失的病毒越多。除用TritonX-100以减少病毒颗粒聚集外,还应尽可能减少差速离心次数,延长沉淀病毒时的悬浮时间和加大悬浮时振荡的剧烈程度。这样虽会增加悬浮液中的杂质量,但通过CsCl密度梯度离心时,杂质可分离掉,不影响

病毒带的形成,因此并不影响病毒纯度,而蔗糖密度梯度离心,则病毒颗粒会大量聚集。

SPFMV是丝状病毒,粒子长度较大,容易聚集,造成抽提和纯化的困难。TritonX-100能破坏寄主细胞膜和叶绿体膜,使更多的病毒粒子得以释放,并能减少由于病毒和寄主物质的结合而造成的损失<sup>[10]</sup>。本试验用1%的TritonX-100,不用或少用有机溶剂,即能得到较满意的结果。氯仿等有机溶剂,能破坏病毒粒子,不仅能使病毒失去其侵染活性<sup>[8]</sup>,同时也会降低病毒的产量<sup>[7]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] 李汝刚等, 1990, 植物病理学报, 20(3): 189—194。
- [2] 林均安等, 1989, 实用生物电子显微术, 辽宁科技出版社。
- [3] B.B.Cali and J.W.Moyer., 1981, *Phytopathology*, 71(3): 302—305.
- [4] M.A.Cadena-Hinojosa and R.N.Campbell., 1981, *Phytopathology*, 71(10): 1086—1089.
- [5] R.N.Campbell, D.H.Hall and N.M.Mielinis., 1974, *Phytopathology*, 64: 210—218.
- [6] J.Cohen, R.Salomon, and G.Loebenstein., 1988, *Phytopathology* 78(6): 809—811.
- [7] J.Hammond and R.H.Lawson., 1988., *Journal of Virological Methods*, 20: 203—216.
- [8] H.Huttings., 1973, *Neth.J.Pl.Pathol.*, 79: 125—129.
- [9] W.G.Kemp and G.H.Collin., 1967, *Can.Plant Dis.Surv.* 56: 33—34.
- [10] L.C.Lane, Propagation and purification of RNA plant viruses, in *methods in enzymology*, Vol.118: 627—723.
- [11] J.W.Moyer et al., 1980, *Plant Dis.* 64: 762—764.
- [12] J.W.Moyer and B.B.Cali., 1985, *J.Gen.Virol.* 66: 1185—1189.
- [13] J.W.Moyer and G.G.Kennedy., 1978, *Phytopathology*, 68: 998—1004.
- [14] H.W.Rosael and G.Thottappilly., 1985, Sweet potato virus disease, page 10—13 in *Virus*

*Disease of Important Food Crops in Tropical Africa*. H. W. Rossel and G. Thottappilly, eds. Int'l. Inst. Trop. Agric. Ibadan, Nigeria.

(15) Van Costen., 1972, *Neth. J. Pl. Pathol.* 78 : 33—47.

## Purification and Serology of Sweet Potato Feathery Mottle Virus

Zhu Zuowei    Xue Qihan

(Institute of Genetics, Jiangsu Academy of Agricultural  
Sciences, Nanjing 210014)

Sweet potato feathery mottle virus (SPEMV) was purified from infected *I. Nil* leaves using ultracentrifugation and CsCl step gradient centrifugations. Virus yields of 13—15 mg per kilogram of infected leaf tissue were obtained. The normal particle lengths of the SPEMV was 820—860nm. The virus obtained was highly infectious and a good immunogen. Purified virus had a OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ratio of 1.21.

**Key words:** Sweet potato feathery mottle virus    Purification  
Immunosorbent electromicroscopy