

植物病毒的提纯

技术与方法

史春霖 王小凤

(中国科学院微生物研究所, 北京)

植物被病毒感染后常表现种种外部病症, 这是研究植物病毒的一个重要方面。而对病毒的形态及各种物理化学特性的研究, 首先要将病毒提纯或部分提纯。本文拟对植物病毒的提纯方法作一系统简介。

原 理

病毒寄生在植物细胞内。提纯的过程就是将植物细胞中的各种组分除去, 使病毒颗粒的含量越来越大, 植物寄主各组分的含量越来越小, 当这个比例值接近无穷大时, 病毒就接近纯净了。而一般情况下, 提纯的病毒不会绝对纯净, 可能混杂有微量的寄主成份。在提纯的最后阶段, 要测定病毒提取物的纯度或均一性, 并且它的侵染力应与特异性颗粒的含量有相关性。

提纯的操作步骤

一、寄主和病毒株系的选择

为了提高工作效率, 提纯某种病毒时应选择高病毒含量的寄主和易于繁殖的病毒株系。

(一) 寄主的选择

1. 生产寄主的选择: 一般说来, 生产病毒的寄主最好是系统感染的植物, 接种后植物组织中病毒含量应较高。已经证明, 同一种病毒在不同植物寄主中的增殖情况可能有较大差异。例如马铃薯 X 病毒, 接种在番茄上比接种在马铃薯和烟草上的浓度要高。同时, 某些植物(如烟草)汁液中的正常组分较易除去, 而另一些则不易处理。在选择生产寄主时必须考虑这些情况。

一般来说, 呈现系统性病状的生长旺盛的幼嫩植株, 比染病时间长的老植株所含病毒浓度要高, 色素含量则较少。但也有例外, 如芜菁

黄花叶病毒在老的染病时间长的中国甘蓝或萝卜中的浓度, 反而比幼嫩的发病时间短的植株中要高。

不同组织中病毒含量可能有很大差异。一般叶面比中脉和叶柄中的病毒浓度高, 因此提取病毒时常除去中脉和叶柄。玉米粗缩病毒在根部浓度最高, 故以根作提取材料。

当然, 接种病毒后的植株, 应维持良好的水肥条件, 这对提高病毒浓度有利。例如施以丰富氮肥的烟草, 其病毒浓度比不施氮肥的植株要高 80 倍。

2. 测定寄主的选择: 为选择含病毒浓度较高的生产寄主和在提纯过程中测定提取物侵染力的变化, 都应有合适的测定寄主。这些测定寄主, 最好是会产生枯斑的。如烟草花叶病毒、黄瓜花叶病毒, 马铃薯 X 病毒的枯斑寄主分别是心叶烟、苋色藜、千日红等。在一定病毒浓度范围内, 侵染性病毒的浓度和枯斑数目成正比。但产生一个枯斑需要约 5 万个病毒颗粒, 因此枯斑数并不代表病毒颗粒的数目。

如果没有形成枯斑的寄主, 可用系统感染的寄主代替。

(二) 病毒株系的选择

同一种病毒的不同株系在寄主体内的产量有很大差异。例如烟草花叶病毒普通株的浓度是隐蔽系的两倍。

另外, 有些病毒在植物体内增殖慢, 并且往往达不到较高的浓度。这给提纯造成困难。一般认为一种病毒如稀释 10^{-2} 倍就无侵染力, 就很难提纯。每公斤新鲜植物材料至少要含 5—10 毫克干重的病毒才能进行提纯。

二、病毒的抽提

(一) 病毒粗提取物的制备

为避免病毒在高温下失活, 提纯病毒一般

在 4℃ 下操作。制备病毒粗提取物时,通常用机械方法(如绞肉机或组织捣碎机)将感病植物组织捣碎,使病毒释放到汁液中,用数层纱布或尼龙布过滤,除去细胞壁和纤维素等。如病毒较稳定,可将植物组织低温冷冻数十小时,这有利于破碎细胞和使杂蛋白沉淀。在破碎组织时,最好使用缓冲液。在组织捣碎器中破碎时,植物组织与缓冲液的重量比是 1:2。由于大多数植物破碎后的汁液带微酸性,而葫芦科植物的汁液带微碱性,从葡萄叶得到的汁液却有很强的酸性(pH3—4),因此,要注意选择缓冲液。经常采用的是磷酸盐缓冲液。但这种缓冲液对某些病毒有不利影响如抽提莴苣花叶病毒时,用磷酸盐缓冲液会使病毒丧失侵染性。

不同金属离子和离子强度对病毒也有很大影响。例如苜蓿花叶病毒需要 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 等二价阳离子才能保持其侵染性。在提取液中还必须加入还原剂和螯合剂。因为一般植物汁液中都含有多聚酚氧化酶和酚类化合物被氧化后形成的病毒抑制剂,如丹宁就是这类物质,它可使草莓环斑病毒沉淀。辣椒液中也含有抑制病

毒侵染性的钝化物质。加入螯合剂或还原剂就可能避免这类物质对病毒的抑制作用。常用的还原剂有亚硫酸钠、二巯基乙醇、巯基乙醇酸、二乙基苏来醇等。常用的螯合剂有二乙胺硫代甲酸钠和乙二胺四乙酸二钠盐,前者可除去某些活化氧化酶时所需要的铜离子,因而可抑制多聚酚氧化酶;后者可螯合 Ca^{++} 和 Mg^{++} ,使核糖体处于不稳定状态,以便于除去。

(二) 抽提物的澄清

澄清病毒粗抽提物的步骤,是为了除去寄主的蛋白质和各种细胞器的碎片及小分子,使病毒进一步纯化。抽提物中含量最大的是植物蛋白,包括铁蛋白、叶绿体中主要的蛋白质二磷酸核糖羧化酶及细胞质中的蛋白质,它们的沉降常数分别是 60S、18S 和 4S。常用的方法是:

1. 低速离心: 3,000—10,000g 离心 10—30 分钟,可除去大多数比病毒质量大的组份,例如细胞壁碎片,叶绿体,核等。一些细胞器和病毒的沉降常数列于表 1。

2. 热处理或冷冻: 将粗抽提物在 50—60℃ 处理 5—10 分钟;或冻融处理。这可使植物蛋

表 1 一些细胞器和病毒的沉降常数

名 称	沉降常数 S_{20-W}	离 心 沉 降		大小 (毫微米)	分子量 $\times 10^6$
		转/分	时间(分)		
细胞核	1 千万	500	4	10^4	
叶绿体	1 百万	1,000	10	$5 \times 10^3 \times 2 \times 10^3$	
线粒体	十万	3,000	12	10^3	
核糖体	80	30,000	150	25	
石竹环斑病毒	140	30,000	90	29	6.7
黄瓜花叶病毒	98	30,000	120	30	6.7
芜菁黄化花叶病毒	<110, <53	<30,000	110—120	<28, <20	<5.5, <3
烟坏死病毒	122	30,000	100	28	6.3
卫星病毒	48	30,000	250	21	1.9
马铃薯黄矮病毒	900	30,000	15	110	
烟草花叶病毒	180	30,000	70	300×15	40
马铃薯 X 病毒	120	30,000	100	518×10	35
马铃薯 Y 病毒	154	30,000	80	685×12	

白变性,凝聚、然后通过低速离心或过滤将蛋白质除去。

3. 吸附: 加吸附剂吸附蛋白质和色素。如用活性炭、DEAE-纤维素、羟基磷酸钙、皂土等处理后,低速短时间离心除去。此外,利用硅藻土也可以滤掉一部分杂蛋白。在吸附处理时必须选择合适条件,以防病毒被同时吸附掉。

4. 有机溶剂处理: 某些有机溶剂可以有效地沉淀寄主植物的蛋白质而不沉淀病毒。常用的一些有机溶剂对水的亲合力如下:

乙醇 > 丙酮 > 乙醚 > 正丁醇 > 氯仿 > 四氯化碳

常用的氯仿几乎不溶于水(100 毫升仅溶 1 克)。当一定量氯仿与粗抽提液混在一起用力振摇时,即成乳浊液,低速离心后分为三层。上层为水,含亲水物质,包括病毒粒子;下层为氯仿,含脂肪、叶绿体等;中层是变性的蛋白质。另一常用的有机溶剂是正丁醇(100 毫升可溶 7.9

克正丁醇),一般用 8% 体积的正丁醇处理。由于正丁醇作用较缓慢,须放置数小时后再离心除去变性蛋白质。也可将氯仿与正丁醇等量混合使用。

(三) 从澄清液中分离病毒

从澄清液中分离侵染性病毒颗粒,一般有以下几种方法

1. 沉淀法: 经常使用的沉淀剂是硫酸铵和聚乙二醇。多数病毒可用 1/4—1/2 饱和度的硫酸铵沉淀,某些非常易溶的病毒,则需用 3/4 饱和度的硫酸铵。聚乙二醇(分子量是 6,000 的称聚乙二醇-6,000)是近来使用很广泛的沉淀剂。用它沉淀病毒,技术简单、沉淀速度快,病毒颗粒结构及侵染性不易损伤。在使用时,要注意选择合适的浓度,例如 4% 的聚乙二醇和 4% NaCl 可使烟草花叶病毒沉淀。当提高聚乙二醇浓度时,非病毒颗粒的沉淀也会增加。用聚乙二醇法提纯烟草花叶病毒的一个实例列于图 1。

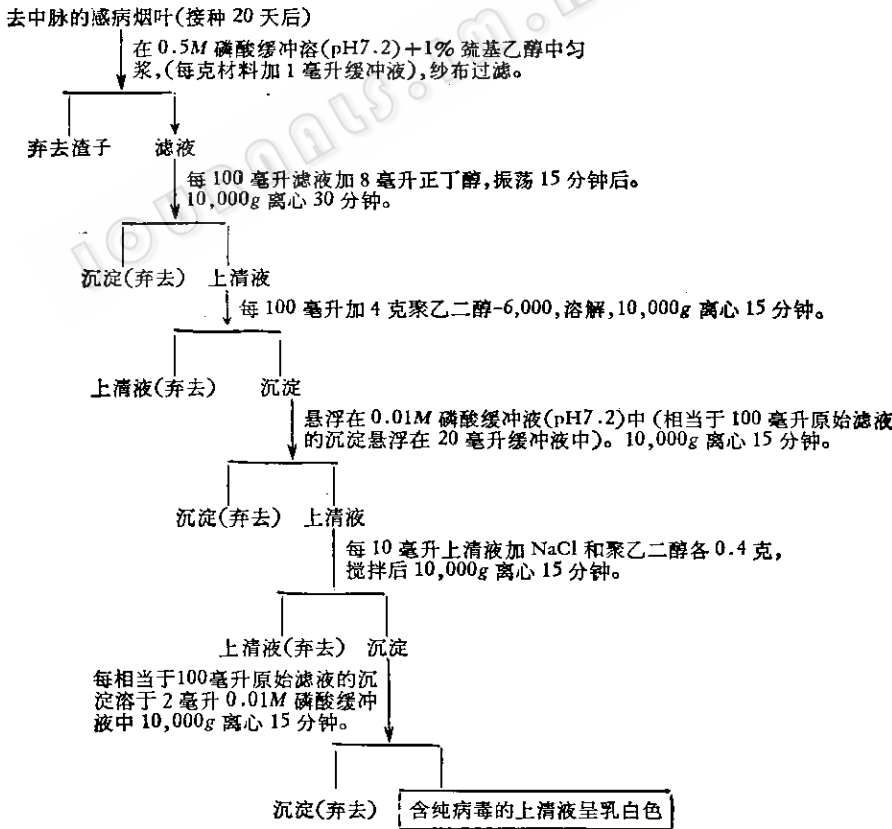


图 1 烟草花叶病毒的提纯过程

利用调节等电点的方法亦可使病毒沉淀，经常使用 0.1N 的盐酸或醋酸缓冲液调节 pH。但不同病毒，甚至不同株系，它们的等电点可能不同。例如烟草花叶病毒的等电点在 pH3.7—4.7 之间。一般等电点在 4.5 以下的病毒用此法沉淀较方便，因为当 pH 达到 4.8—5.0 时，寄主的许多成分也会沉淀下来。

某些对有机溶剂稳定的病毒可用甲醇或乙醇沉淀，但应选择合适的条件。例如芜菁黄花叶病毒，在冷却条件下用乙醇沉淀才不会变性。

2. 凝胶过滤法：用琼脂糖珠（如 Sepharose 2B）或葡聚糖凝胶（如 Sephadex G-200）过滤，可根据颗粒大小和扩散速度把病毒和其它杂质分开。凝胶装柱，平衡后，将浓缩的病毒样品置于色谱柱顶端，用缓冲液缓慢洗脱时，病毒从凝胶颗粒之间的空隙流出，而极小的颗粒（如植物的铁蛋白）则进入凝胶颗粒内部的微孔中。

3. 超速离心：提纯过程中采用超速离心的目的，一是浓缩病毒，二是把病毒和杂质分开。主要的方法是反复高速—低速离心。

长时间超速离心（75,000—150,000g, 0.5—4 小时）可使病毒从澄清液中沉降。把病毒沉淀悬浮在小体积缓冲液中，在 4℃ 放置过夜，再低速离心即得到病毒提纯液。如此重复数次，

即可提纯病毒。

4. 密度梯度离心：交替进行高速—低速离心的方法对分离沉降速度差异较大的颗粒比较适用。如果沉降速度相接近的颗粒，须用密度梯度离心法才能很好地分开。

制备梯度的物质，必须化学性质稳定，常用的有蔗糖和甘油。这些物质可溶解在适当的缓冲液中。提纯病毒常用的梯度范围是 10—40%。梯度常在透明的硝酸纤维离心管中制备，密度由上到下增加，分连续和不连续两类（见图 2A、B）。离心时，把少量病毒提取液加在梯度的顶部，各种颗粒将在不同的梯度层中沉降。颗粒的沉降速度取决于它的大小、形状、密度，也取决于离心力及悬液介质的密度和粘度。选择适当的离心时间、温度、速度，可使病毒区带落在离心管中部。病毒区带在平行光自上而下照射时，呈乳白色。取出病毒区带部分，最方便的方法是用弯曲的皮下注射针（图 2C）小心插入该区带下端吸取。更准确的方法，是刺破离心管的底部，使流出液体进入专门的检测仪器，收集在 260 毫微米波长光下相当于出现吸收峰的部分（图 2D）。为了获得良好结果，病毒抽提液样品的浓度不应超过 1 毫克/毫升。

应当指出，如果能用沉淀法提纯，那是最便利的。上述四种方法在具体工作中可以有选择

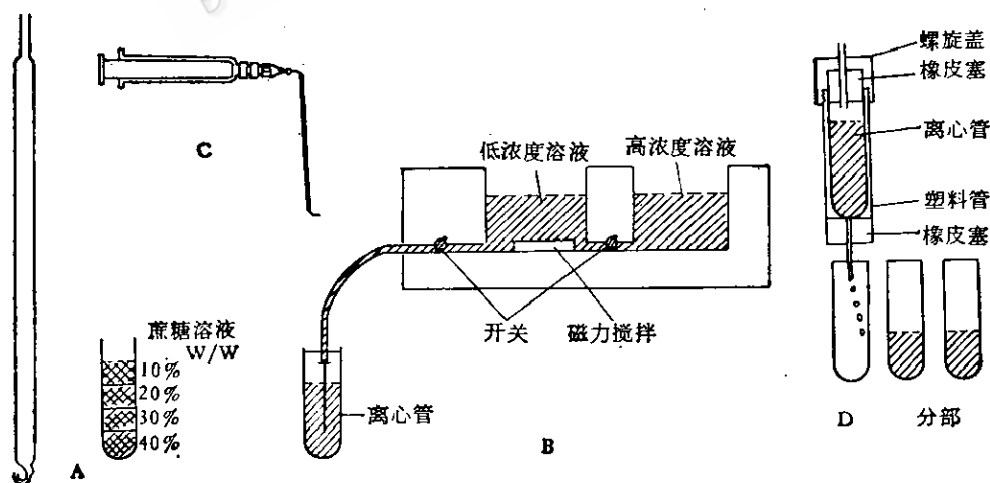


图 2 蔗糖密度梯度的制备和离心后样品的取得

A. 加蔗糖液用吸管及不连续的蔗糖梯度； B. 连续梯度液混合制备器具； C. 带弯曲针头的注射器； D. 离心后样品的收集。从螺旋盖开口处不断注入空气或轻溶液，离心管底部流出样品。

（注：制备好的不连续梯度放置过夜，可形成近似连续梯度。）

地交替使用。

病毒提纯物纯度的鉴定和贮存

通常用下述方法鉴定纯度。

一、吸收光谱法

病毒是一种核蛋白，它可以通过紫外吸收光谱的测定，快速而简便地检测病毒提取物的纯度和浓度。图3是两种病毒的紫外光吸收曲线。病毒的最低和最高吸收值在240和260毫微米波长附近。因为每种病毒的蛋白质和核

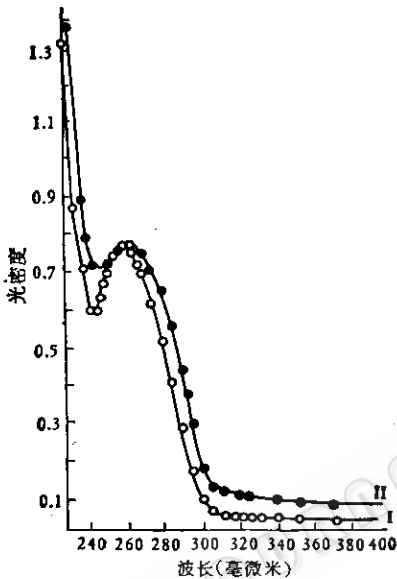


图3 烟草坏死病毒(I)和烟草花叶病毒(II)提纯液的紫外光吸收曲线

酸含量是固定的，因此它们的吸收值 A_{260}/A_{240} 和 A_{280}/A_{260} 的比值是有种特异性的。如烟草花叶病毒和马铃薯 X 病毒的前一比值分别为 1.09 和 1.15；后一数值分别为 0.84 和 0.834。因此测定光密度并求出这些比值，就可知病毒提取液的纯度。

根据紫外光吸收值可以计算病毒提纯液中病毒的浓度。计算按下列公式：

$$\frac{A_{260}}{E_{1\%}^{0.1\text{cm}}(260)} \times 1 \text{ 毫克} \\ = \text{病毒浓度(毫克/毫升)}$$

其中 A_{260} 为病毒提纯液在 260 毫微米波长下的光密度； $E_{1\%}^{0.1\text{cm}}(260)$ 是比消光系数，即浓度为 1 毫克/毫升的病毒溶液在 260 毫微米波

长下，光程 1 厘米测定的光密度值。测定病毒提纯液的光密度和干重，可以求得一种病毒的比消光系数。

二、分析超离心法

这是根据各种组份沉降系数不同来检测病毒提纯物的纯度的方法。如果检测出两个或多个组份，说明病毒只是部分纯化了，但也可能说明有一个以上的病毒组份参加侵染过程，或者有一部分病毒发生了聚集。

三、电镜法

电镜是检查病毒提纯物最可靠的工具。要注意的是，病毒提纯物中常含有不挥发的盐类（如磷酸盐等），在电镜照片上易被误认为病毒不纯。为此，对于那些对蒸馏水或挥发性盐（如醋酸铵）稳定的病毒，可用蒸馏水或挥发性盐缓冲液悬浮病毒，再将悬液点在清洁的喷碳加固的火棉胶膜铜网上，再用 2% 磷钨酸（pH7.0）负染，进行电镜观察。

检测病毒纯度的方法还有各类电泳法、血清学方法等。

四、病毒提纯物的贮存

纯化的病毒提纯物在合理的条件下贮存，可以较长时间保持其完整性和侵染性。大多数病毒制备物，可在悬液中加少量抗菌剂于 0—4℃ 保存；常用的抗菌剂有叠氮钠、氯仿、甲苯和百里酚。亦可在低温下加等体积甘油保存。

因为病毒提纯液一般含盐均很少，经过冰冻很容易失去侵染性。如在冰冻前加入蛋白胍和葡萄糖（各 5—10%）可以保护侵染性。

病毒提纯物也可用冷冻干燥的方法保存。

结 束 语

目前已发展了许多植物病毒的有效提纯方法。上面只是作了一般的介绍。在着手提纯某一种病毒时，除了应对国内外有关文献进行调研外，还应应对每一提纯步骤进行试验性探索，以求方法的完满。

参 考 文 献

- [1] 裴维藩：植物病毒学，农业出版社，北京，1964 年。

- [2] Gibbs, A. and B. Harrison: *Plant Virology, The Principles*, London Arnold, 1976.
- [3] Kado, C. I. and H. Agrawal (ed.): *Principles and Techniques in Plant Virology*, VNR, New York, 1972.
- [4] Mattews, R. E. F.: *Plant Virology*, Academic Press, New York, 1970.
- [5] Maramorosch, K. and H. Koprowski (ed.): *Methods in Virology*, vol. 2, Academic Press, New York, 1967.
- [6] Noordam, D.: *Identification of Plant Viruses, Methods and Experiments*, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, 1973.
- [7] Smith, K. M.: *Plant Viruses*, 6th ed. Chapman and Hall, London, 1977.
- [8] Smith, K. M.: *A Textbook of Plant Virus Diseases*, 3rd ed., Longman Group Ltd., 1972.