

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2010)03-0179-04

综 述

马铃薯病毒分离提纯的方法

范国权¹, 朱洪涛², 高艳玲¹, 耿宏伟¹, 张 威¹, 申 宇¹, 刘玮婷¹, 孙邦生³, 白艳菊^{1*}

(1. 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江北大荒马铃薯产业有限公司, 黑龙江 克山 161621; 3. 黑龙江省农业科学院克山分院, 黑龙江 克山 161606)

摘 要: 马铃薯已被我国定为第四大粮食作物, 国内马铃薯需求量也越来越大, 种植面积逐年上升, 同时国际种薯市场也在逐渐扩大, 需要大量高质量的合格种薯, 所以迫切需要用于检测马铃薯病毒的病毒检测试剂盒。本文主要介绍马铃薯病毒提纯的环节及注意事项, 以便提纯出高质量的病毒, 用于制备病毒检测试剂盒检测病毒。

关键词: 马铃薯; 病毒; 提纯

Separation and Purification Methods of Potato Virus

FAN Guoquan¹, ZHU Hongtao², GAO Yanling¹, GENG Hongwei¹, ZHANG Wei¹, SHEN Yu¹,
LIU Weiting¹, SUN Bangsheng³, BAI Yanju¹(1. Virus-free Seedling Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China;
2. Potato Industry Co., Ltd. Heilongjiang Great Northern Wilderness, Keshan, Heilongjiang 161621, China;
3. Keshan Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan, Heilongjiang 161606, China)

Abstract: Potato is considered as the fourth main food crop in China, which is demanded more and more every year. Thus, the cultivation area is also expanding accordingly with the growing international market and great demand for qualified seed potatoes. Therefore, the testing kit for potato virus diseases is also badly needed. The procedures and notices that guarantee high quality virus in potato virus purification were introduced in this research, so as to prepare the high quality virus detection kit.

Key Words: potato; virus; purification

目前, 已报道存在于马铃薯作物的病毒达 20 种以上^[1], 其中, 部分病毒对作物危害严重。种薯感病一般可致马铃薯减产 10%~30%, 重者达 80% 以上, 从而影响马铃薯的质量和产量^[2]。采用分离提纯病毒, 制备抗血清的方法, 检测马铃薯病毒病, 有利于提高脱毒马铃薯的质量, 扩大脱毒马铃薯种植面积, 对于提高我国马铃薯的产量和质量具有重要意义^[3]。本文就马铃薯病毒分离提纯的方法加以介绍。

1 马铃薯病毒特点和类型

马铃薯病毒粒子是指完整的、成熟的、具有侵

染力的病毒, 也称病毒颗粒, 主要是由两类生物大分子即核酸与蛋白构成, 呈等轴型或称球形、弹状和杆状, 线状的一般长 580~730 nm, 宽 11~13 nm; 球状的一般直径 23~30 nm; 弹状的长 380 nm, 宽 75 nm; 杆状的长 150~180 nm, 宽 20~30 nm^[4]。病毒的基本结构是核蛋白, 内部是作为遗传物质的核酸, 外部是起保护作用的蛋白质衣壳。侵染马铃薯常见的病毒主要包括: 马铃薯 A 病毒、马铃薯 Y 病毒、马铃薯 S 病毒、马铃薯 X 病毒、马铃薯 M 病毒、马铃薯卷叶病毒和烟草花叶病毒, 除马铃薯卷叶病毒为球状外, 其余大多数呈杆状和线状^[5]。

收稿日期: 2010-03-10

基金项目: 农业科技成果转化资金项目(2008GB2B200084); 马铃薯产业体系(NYCYTX-15); 948 项目(2008-Z23)。

作者简介: 范国权(1982-), 男, 硕士, 主要从事马铃薯病害研究。

* 通信作者: 白艳菊, 副研究员, 主要从事马铃薯病害研究, E-mail: yanjubai@163.com。

2 马铃薯病毒分离方法

马铃薯病毒的分离主要指生物分离, 其原理是依据病毒的分离寄主、传毒介体或病毒物理特性等差异, 将一种病毒或株系同其他病毒或株系分离开来, 以达到生物纯化目的。

2.1 搜集毒源

毒源主要根据马铃薯生物学性状和血清学检测结果搜集。田间马铃薯典型病毒病症状表现为花叶、卷叶、紫顶、叶脉坏死、叶片畸形、皱缩、节间缩短、矮化、褪色、扭曲、新叶色淡等。毒源应尽量满足病毒含量较高, 病毒单一, 非单一病毒、杂病毒应容易与目标病毒分离。再经 DAS-ELISA 方法鉴定筛选所需毒源材料, 检测结果呈阳性, 且吸光值较高^[6]。以马铃薯 Y 病毒为例, 在田间发现

明显花叶或脉坏死症状的植株, 采集到实验室, 通过 DAS-ELISA 方法检测或鉴别寄主来确定样品中是否含有马铃薯 Y 病毒, 如果有则收集该样品。也可以通过在试管苗检测时, 收集含有马铃薯 Y 病毒的苗子来收集毒源。

2.2 确定鉴别寄主

马铃薯病毒寄主范围较广, 如番茄、茄子、辣椒、烟草、酸浆、曼陀罗、黄瓜、甜菜、豇豆、菜豆、西瓜、龙葵、大丽花、矮牵牛、枸杞、菊花、千日红、苜蓿、灰菜等植物^[7]。不同病毒需要不同类型的鉴别指示植物, 通过病毒在鉴别寄主上产生的症状, 确定毒源中的病毒种类, 同时判断是否单一。几种病毒在鉴别寄主上的症状如表 1^[8]。

2.3 病毒的分离

鉴别寄主分离病毒是某些病毒分离鉴定的最基

表 1 马铃薯病毒的鉴别寄主及症状

Table 1 Identification hosts and symptoms of potato virus

马铃薯病毒 Potato virus	接种方法 Mode of inoculation	指示植物 Indicator plant	症 状 Symptoms
马铃薯 X 病毒 PVX	摩擦 Rub	毛曼陀罗	汁液摩擦接种, 在 20℃ 条件下, 接种 10 d 后接种叶片出现局部病斑心叶花叶。
		千日红	汁液摩擦接种 5~7 d, 在接种叶片出现紫红环枯斑。
		白花刺果曼陀罗	接种后 10 d 心叶出现花叶症状。
		指尖椒	接种 10~12 d 接种叶片出现坏死斑点, 以后系统发病。
马铃薯 Y 病毒 PVY	摩擦或(桃蚜) Rub or peach aphid	普通烟草	汁液接种 7~10 d 感病初期叶片明脉, 后期是沿脉绿状。
		洋酸浆	汁液摩擦接种后, 在室温 16~18℃ 条件下, 经 10~15 d, 在接种叶片上出现黄褐色不规则的枯斑, 以后落叶。
		枸杞	接种 10 d 左右, 接种叶片产生模糊不清的褐色局部病斑。
		A6	接种 5~10 d 接种叶片出现褐色球状坏死枯斑。初浸染时呈绿色圆环斑, 逐渐坏死。24℃、1 000 lx 光照下。
马铃薯 S 病毒 PVS	摩擦 Rub	千日红	汁液摩擦接种 14~25 d, 接种叶片出现红色小斑点, 略微凸出的园环小斑点。
		莧色藜	接种 20~25 d 接种叶片出现局部黄色斑点。
		德伯尼烟	初期明脉以后是暗绿块斑花叶。
马铃薯卷叶病毒 PLRV	桃蚜 Peach aphid	洋酸浆	蚜虫接种, 在温度 24℃ 条件下, 接种 6~8 d 开始出现系统卷叶失绿、生长抑郁。
		白花刺果曼陀罗	蚜虫接种后, 系统卷叶。
马铃薯 M 病毒 PVM	摩擦 Rub	千日红	接种 15~20 d, 接种叶片沿叶脉周围出现紫红色斑点。
		毛曼陀罗	接种 10 d 后, 接种叶片出现失绿小圆斑至褐色枯斑, 以后系统发病。
		德伯尼烟	接种 10 d 后接种叶片出现局部病斑。

本方法, 通常选用对一种病毒感染后有特定病症反应, 或对某种病毒免疫或有枯斑反应的指示植物作为对某种病毒的过滤植物。将含有复合病毒毒源接种到鉴别寄主上, 会产生不同的症状。

单斑分离: 病毒侵染寄主植物后, 会诱导寄主产生过敏反应, 出现局部枯斑而不扩展成系统侵染, 这样的寄主也称枯斑寄主。即取下单斑, 用于接种繁殖寄主^[9]。例如, 千日红是马铃薯 X 病毒特性鉴别寄主, 接种叶产生枯斑, 不系统发病, 可单斑剥离分离此病毒排除其他病毒。

免疫: 有的鉴别寄主对一些马铃薯病毒免疫也可以达到分离的目的。例如, 番茄对马铃薯 S 病毒免疫, 接种后可以排除马铃薯 S 病毒。

2.4 影响病毒分离的因素

2.4.1 马铃薯病毒寄主的生长条件

温度和阳光是影响寄主生长的主要因素, 适宜的温度取决于病毒和寄主组合, 一般为 20~25℃。降低光照强度有利于病毒增殖。夏季温室应该遮阳, 根据光照强度可降低到自然光的 1/3 到 1/5。营养条件的影响较小, 一般充足的营养可获得较高的病毒产量^[10]。

2.4.2 单斑分离的次数

由于一个枯斑往往只是代表一种有效病毒粒体所造成的一个侵染点, 经 3~4 次单斑分离, 再把单个枯斑转接到能产生系统侵染的寄主上去繁殖, 这样就可获得较纯的病毒或株系, 达到了病毒生物分离的目的^[11]。

3 马铃薯病毒纯化方法

马铃薯病毒的提纯主要指理化提纯, 即应用各种理化方法, 除去寄主组织和细胞中的其他非病毒组分, 提取出具有侵染力的高纯度病毒。

3.1 毒源扩繁

病毒分离后, 选择系统侵染的繁殖寄主, 大量扩繁病毒, 为病毒提纯做好准备。作为病毒的繁殖寄主一般应具备: ①能产生较高浓度的病毒; ②不含有大量的抑制病毒或不可逆的沉淀病毒物质, 如酚类化合物、有机酸、黏液和胶质等; ③各种寄主成分的大小和物理性质与病毒粒体显著不同, 不影响病毒的分离和提纯, 也不吸附在病毒粒体表面; ④易培养, 生长迅速; ⑤在温室条件下不感染其他病害, 对杀虫剂等不敏感; ⑥系统发病; ⑦病毒易

接种与感染^[12]。

根据病毒传播的特点, 在适合的繁殖寄主上, 采用汁液摩擦、桃蚜和嫁接方法接种病毒^[13]。几种病毒的繁殖寄主如表 2^[14]。

表 2 马铃薯主要病毒的繁殖寄主
Table 2 Host plants of potato virus

病 毒 Virus	繁殖植物 Host plant	学 名 School name
马铃薯卷叶病毒 PLRV	洋酸浆	<i>Physalis floridana</i>
	白花刺果曼陀罗	<i>Datura Stramonium</i>
	Huagalind (马铃薯品种)	<i>Solanum tuberosum</i>
马铃薯 Y 病毒 PVY	洋酸浆	<i>P. floridana</i>
	黄苗榆烟	<i>Nicotiana tabaco</i>
马铃薯 X 病毒 PVX	黄苗榆烟	<i>N. tabaco</i>
	心叶烟	<i>N. glutinosa</i>
马铃薯 S 病毒 PVS	黄苗榆烟	<i>N. tabaco</i>
	德伯尼烟	<i>N. debneyii</i>
马铃薯 M 病毒 PVM	番茄	<i>Lycopersicon esculentum</i>

3.2 毒源的提纯

根据病毒粒子自身特点, 利用差速离心和密度梯度离心, 分离目标病毒。具体操作如下:

(1) 病毒粒子释放: 在毒源材料发病高峰期采收, 加入 2~3 倍提取缓冲液, 放入组织打碎机中打碎植物叶片, 两层纱布过滤。

(2) 去除植物组织: 样品中加入澄清剂, 充分搅拌, 低速离心, 去除植物组织。

(3) 病毒粒子的浓缩: 样品经过超速离心或 PEG 和 NaCl 沉淀病毒, 浓缩病毒。

(4) 粗提纯: 样品经过 20% 蔗糖垫, 去除杂质, 得到初提纯的病毒。

(5) 精提纯: 样品经过密度梯度离心, 收集病毒带, 样品脱盐, 得到纯病毒。

3.3 影响病毒纯化的因素

3.3.1 用于提纯的繁殖寄主的预处理

马铃薯病毒接种植物后, 随着复制, 其浓度逐渐增高, 几天或几周后达到最高峰, 达到高峰后多数病毒其浓度迅速下降, 必须及时采收病叶, 以便

获得较高起始浓度的提纯材料。研究表明, 提高接种物浓度可缩短达到浓度高峰的时间^[15]。

马铃薯病毒在植物体内的分布是不均一的, 发病叶片病毒含量多高于其他部位。有的在接种叶中, 有的在系统感染叶中达到最高浓度。叶脉中的病毒含量显著低于叶肉, 提纯材料最好将叶脉去除, 以免吸附病毒^[16]。

一些较稳定的病毒采收后可在低温下迅速冻结, 延长保存时间, 但有些病毒冻结则产生有害影响, 因此在提纯过程中最好使用新鲜的叶片。

3.3.2 病毒提取缓冲液

病毒提取常用磷酸盐缓冲液, 大多数病毒等电点低于7, 在中性或稍偏碱性条件下(病毒颗粒带负电荷)是溶解的^[17]。一定范围内, 随pH升高, 病毒的溶解度增加, 但若pH值过高, 病毒蛋白和核酸间的结合力变得微弱, 使两部分分开。缓冲液离子强度一般为0.1~0.5 M, 提纯后期往往用较低浓度。

3.3.3 澄清剂

常用的澄清剂有氯仿、正丁醇、四氯化碳、乙醇等。氯仿主要用于线状病毒的澄清, 正丁醇和四氯化碳则广泛用于球状病毒。处理时一般将上述有机溶剂按一定比例(如10%~20%)加入抽提液中, 在匀浆机中高速搅拌形成乳剂, 静止分层或低速离心, 除去油相部分, 就可获得良好的澄清效果。这些澄清剂可使一些蛋白变性, 除去叶绿素和脂类物质等。

3.3.4 稳定剂

在细胞破碎时和提纯过程中, 多酚氧化酶不仅会纯化病毒, 还会使提取液变棕色, 干扰病毒的精提纯, 因此需要加入还原剂, 如亚硫酸钠、巯基乙醇、抗坏血酸等, 以抑制酚类氧化酶的活性。一些合成聚合物如PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、PEG(聚乙二醇)也可与多元酚形成复合物, 减少多元酚氧化酶的底物。

核糖体与许多圆形病毒的大小相似, 干扰病毒的提纯^[18]。用0.01 mol·L⁻¹ 乙二胺四乙酸(EDTA)的钠盐在pH 7.4的缓冲液中, 可引起大多数核糖体的破坏, 阻止它们与病毒共同沉淀下来。它也能抑制某些需要金属的酶。但它只能用于不需要两价金属离子的病毒。也可用斑脱土(Bentonite clay)吸附核糖体, 它还可吸附寄主蛋白、叶绿体、核糖核酸

酶, 色素及其它寄主物质可用活性炭吸附。

提纯过程中往往加入曲拉通(TritonX-100)、吐温-20等去垢剂, 以分散病毒粒体, 有时加入0.5~1 mol·L⁻¹的尿素, 也可以达到很好的效果^[19]。球状马铃薯病毒在提纯过程中除加入去垢剂外, 还应加入0.01 mol·L⁻¹的乙二胺四乙酸(EDTA), 以破坏核糖体, 阻止它们与病毒共同沉降下来。

[参 考 文 献]

- [1] E. 库尔斯塔克. 植物病毒比较诊断指南[M]. 北京: 农业出版社, 1991: 518.
- [2] Salazar L F, Harrison B D.. Host range, purification and properties of potato virus[J]. Ann Appl Biol, 1978, 89: 223-224.
- [3] 白艳菊, 李学湛, 于德才, 等. 黑龙江省马铃薯产业发展现状[J]. 中国马铃薯, 2006, 20(2): 124-127.
- [4] 李之芳. 中国马铃薯主要病毒图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 4-5.
- [5] 田波, 裴美云. 植物病毒研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 1.
- [6] 白艳菊, 李学湛, 吕典秋, 等. 应用 DAS-ELISA 法同时检测多种马铃薯病毒[J]. 中国马铃薯, 2000, 13(3): 143-144.
- [7] 田波, 裴美云. 植物病毒研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 153-154.
- [8] Pierpont W S. The enzymic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinine produced[J]. Biochem, 1966, 98: 567-580.
- [9] 谢联辉, 林奇英. 植物病毒学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 59.
- [10] Luis F Salazar. 马铃薯病毒及其防治[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000: 6.
- [11] Makoto K, Eishiro S, Masayoshi S, et al. Purification and electron microscopy of potato leafroll virus[J]. Virology, 1969, 2: 162-174.
- [12] 郭兴启, 吕士恩, 朱汉城, 等. 烟草上马铃薯 Y 病毒的提纯与检测[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1999: 5-7.
- [13] Rowhani A, Stace-Smith R. Purification and characterization of potato leafroll virus[J]. Virology, 1979(1): 45-54.
- [14] R. 赫尔. 马修斯植物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 90.
- [15] 高秀妍, 高艳玲, 耿宏伟, 等. 马铃薯 Y 病毒黑龙江分离物株系鉴定[J]. 中国马铃薯, 2009, 23(1): 11-14.
- [16] Peters D. The purification of potato leafroll virus from its vector *Myzus persicae* [M]. Virology 1967, 1: 46-54.
- [17] 吴凌娟, 张雅奎, 董传民, 等. 马铃薯普通花叶病毒(PVX) 抗血清的制备和不同酶联免疫吸附检测法的对比试验[J]. 中国马铃薯, 2001, 15(3): 220-221.
- [18] 谢联辉, 林奇英. 植物病毒学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 61.
- [19] 吴云锋. 植物病毒学原理与方法[M]. 西安: 西安地图出版社, 1999, 54.