

## 油菜花叶病毒 15 号的分离提純\*

刘年娟 張其玖

(中国科学院微生物研究所)

油菜花叶病毒 15 号,是周家熾从王祈楷在四川采集的材料中检定出来的<sup>[1]</sup>。当时所采二百多样品中,病毒 15 号这一类型所占百分数较高,某些生物学特性与一般分布的油菜花叶病毒(6 号)不同,而与烟草花叶病毒(TMV)相近似。我們在 1959 年进行了分离提純,现将初步結果簡报于后。

在防虫温室用消毒土壤种植土油菜幼苗,汁液接种后 30—50 天采取病叶,弃去叶脉,将叶片在  $-15^{\circ}\text{C}$  下冰冻过夜,榨出汁液。参考一般植物病毒提純常用方法<sup>[2]</sup>,将汁液离心去渣,每 100 毫升上清液加 4 毫升正丁醇(重蒸餾),一滴一滴加入,伴随攪动。充分混合后在室温下靜置 2 小时,即有少許沉淀出現,多为变性的寄主蛋白及其他寄主所含杂质。再以流水透析除去丁醇,然后离心去渣,再緩緩加入固体硫酸銨,使充分溶解,最終达 1/3 饱和度。混合均匀,置冰箱內 2—4 小时,則病毒于此条件下可充分沉淀。离心收集沉淀,又用少量 pH 7.2 磷酸盐緩冲液使沉淀悬浮,离心去渣,重复进行硫酸銨沉淀,直至上清液无色,最后用醋酸盐緩冲液在 pH 4.5—4.8 沉淀 1—2 次,收集沉淀,再悬浮于 pH 7.2 磷酸緩冲液中,以流水透析、蒸餾水透析及 pH 7.2 磷酸盐緩冲液透析,再經高速 10000 rpm. 离心 20 分除去少許残渣,即可得到洁白純淨制剂。

将提純 15 号病毒制剂作适当稀释后,接种油菜,能产生系統花叶病症。接种在心叶烟(*Nicotina glutinosa*)上,2—3 天后产生典型局部坏死病斑,病斑数与接种病毒制剂的浓度成正比,其最高感染稀釋度接近  $10^{-8}$  克/毫升,也就是在这样的浓度范围内能引起感染。

提純病毒制剂,稀釋至一般測定光譜吸收浓度范围内,于 pH 7.2 1/15 M 磷酸盐緩冲液中,在紫外分光光度計(Hilger)检查其吸收光譜。于  $258\text{m}\mu$  出現吸收高峯(图 1);显示了一般植物病

毒核蛋白的吸收特性。

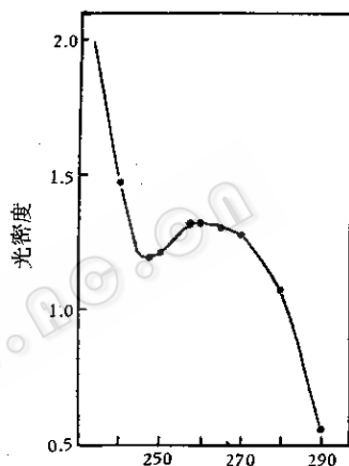


图 1 油菜花叶病毒 15 号吸收光譜

在玻片上滴上适量的 pH 5.4, 0.01 M 醋酸盐緩冲液,用玻璃棒蘸取少量純淨病毒制剂,攪匀后在顯微鏡下观察,可見針狀結晶(图 2)。結晶在心叶烟上能产生典型局部坏死病斑,与原制剂比較具有同样的生物活性。

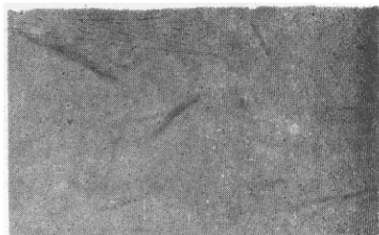


图 2 油菜花叶病毒 15 号結晶  $\times 2025$

在这样的条件下, TMV 是不产生結晶的。

用上述方法提純的油菜花叶病毒 15 号,用 Antweiler 微量电泳仪进行电泳試驗<sup>1)</sup>, pH 7.2,

本文 1962 年 10 月 20 日收到。

\* 技术人員初昭嶠。

1) 电泳測定是借用北京农业大学植物生理生化教研組的电泳仪进行的,特此致謝。

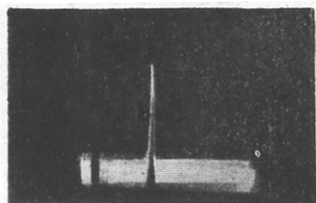


图3 油菜花叶病毒15号电泳图谱。  
pH 7.2, 1/15 M 磷酸盐缓冲, 电泳12  
分, 40V 1.95 mA。

1/15 M 磷酸盐缓冲液。电泳检查为均一物质, 图谱上只出现一峰(图3)。如改用 pH 8.6, 巴比妥缓冲液进行电泳, 亦得到同样结果。如与 TMV (电泳出现一峰, 图4), 混合后再进行电泳, 则在



图4 TMV 电泳图谱。pH 7.2, 1/15 M  
磷酸盐缓冲, 电泳14分, 40 V 1.85 mA。

图谱上很明显地出现了两个峰(图5), 因 TMV 等电点较 15 号病毒为低, 移动快, 所以在图5中前者(右)为 TMV, 后者(左)为 15 号病毒。可见在电泳行为方面, 15 号病毒与 TMV 有很显著的差别。

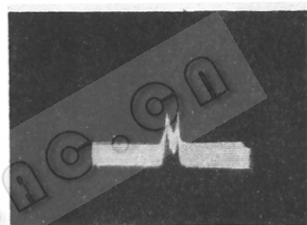


图5 油菜花叶病毒15号与 TMV 混合电泳图谱。pH 7.2, 1/15 M 磷酸盐缓冲, 电泳11分, 45 V 1.95 mA。

## 参考文献

- [1] 周家骥: 关于油菜花叶病毒的类型。微生物学报 8 (4): 414—417, 1962。
- [2] Steer, R. L.: The purification of plant virus. *Advances in Virus Research*: 6, 1—73, 1959。