

香蕉束顶病毒的纯化及理化特性*

蔡文启 徐绍华 宋春华** 陈锦云 莽克强

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 从具有典型香蕉束顶病(BBTD)症状的香蕉病组织中提纯了香蕉束顶病毒(Banana bunchy top virus, BBTV)。电镜下可观察到直径为 18nm 的球形病毒颗粒。最高紫外吸收在 255nm, 最低紫外吸收在 240nm, A_{260}/A_{280} 为 1.30。用标准 BBTV 抗体通过 ECL-Western 转印法测定其外壳蛋白分子量为 21kDa。其核酸经 DNaseI、RNaseA 和 Mung Bean Nuclease 分析, 表明是约 1kb 的 ssDNA。结果与国外文献报道一致。

关键词 香蕉束顶病毒, 纯化, 理化特性

香蕉束顶病(BBTD)是香蕉病害中为害最严重的一种, 往往造成毁灭性灾害。香蕉是我国广东、广西、福建等省重要经济果木, 近年来在漳州、番禺、湛江、新会、东莞、保安、梧州和龙溪等地区发生了 BBTD, 尤其在以传统栽培方法为主的老香蕉种植园, 严重的则造成毁灭性灾害, 其病情仍在蔓延。抽检漳州地区组培种芽带毒率在 30% 左右。BBTD 的研究始于本世纪 20 年代, 根据症状、蚜虫持久性传毒以及主要分布在韧皮部等生物学特征, 当时推测可能是黄症病毒(Luteovirus)^[1]。1986 年 Dale^[2]从典型的感病香蕉组织中提取到 ds-RNA, 其大小类似于从感染 Luteovirus 的植物提取的 ds-RNA。Wu^[3]1990 年从感病材料中分离到 20~22nm 球形病毒颗粒含分子量为 2.0×10^6 的 ssRNA。但 Harding^[4]和 Thomas^[5]等人于 1991 年都获得了 18~20nm 等轴球形病毒颗粒并含 1kb 的 ssDNA。Thomas^[5]等人用蕉蚜(*Pentalonia nigronervosa*)成功地进行了回接试验, 从而重复肯定了 Dale 的工作, 并证明 BBTV 是引起 BBTD 的病原。近年来澳大利亚的 Dale^[6~10]、美国的 Hu JS^[11~12]以及台湾的 Su Hongji^[13]等实验室根据病毒颗粒大小、蚜虫持久性传毒、外壳蛋白 20.5kDa 分子量和多基因组结构(至少有 6 个分子量约为 1.0~1.1kb ssDNA), 认为与地三叶草矮化病毒(Subterranean clover stunt virus, SCSV)极相似, 或许可组成一个新的植物病毒组。我们实验室于 1993 年根据提纯病原物的形态和病组织超薄切片以及青霉素处理带有典型 BBTD 香蕉树可以恢复并结蕉的证据认为 Bacteria-like Organism (BLO)很可能也是 BBTD 的病原之一^[14], 为了进一步证明我国 BBTD 也可能是由含 ssDNA 的小病毒 BBTV 单独侵染, 或是由该病毒和 BLO 混合感染所致, 我们修饰了前人的提纯方法, 从具有典型 BBTD 症状的香蕉组织中提纯分离了含 ssDNA 的 BBTV。

*国家“八五”攻关资助项目。

**漳州市农科所。作者还有郭东川。

本文于 1996 年 5 月 19 日收到。

1 材料和方法

1.1 材料来源

采自漳州香蕉园,选叶片外缘有明显黄化,叶脉、叶柄和假茎具墨绿色条纹,束顶及明显矮化的病株,取其叶脉、叶柄或假茎,剪成1cm见方,液氮冷冻后粉碎成末,置 -70°C 备用。

1.2 病毒纯化

参考 Wu^[3]和 Thomas^[5]方法并做修改,提取液为0.2mol/L pH7.4 磷酸钾缓冲液(含0.2% 巯基乙醇和0.1% 二乙基二硫氨基甲酸盐),lg病组织与2倍体积提取液混合,研磨后用两层纱布过滤,滤液经7000r/min低速离心15min后,上清液经36000r/min超速离心2.5h(Beckman 45Ti转头),沉淀用适量0.07mol/L pH7.2 磷酸钠缓冲液悬浮,于 4°C 搅拌2d并放置2d,悬浮液低速离心后取上清液再超速离心,其沉淀用小量0.07mol/L pH7.2 磷酸钠缓冲液悬浮后进行硫酸铯密度梯度离心,分别测定各分部260nm的吸光度值及间接 DAS-ELISA的490nm吸光度值,合并与BBTV抗体有免疫反应的分部,再经超速和低速交差离心即可获得纯化的BBTV制品。

1.3 间接 DAS-ELISA

参考 Thomas^[5]方法,反应体积为50 μl ,包被抗体用BBTV多抗Ig(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$);当抗原是密度梯度离心后各分部时,每个孔加25 μl PBST和25 μl 待检样品;加检测抗体前用PBST配制的5%脱脂奶粉在室温封闭1h;检测抗体用BBTV杂交瘤组织培养上清液,PBST配制的2%PVP作1:1稀释;辣根过氧化物酶标记兔抗小鼠Ig(BioRad)为结合物。

1.4 电镜观察

2% 醋酸氧铀负染,在日立H-600型电镜下观察。

1.5 外壳蛋白分子量的测定

用ECL-Western转印法(Enhanced Chemical Luminescence-Western blotting),电泳按Herman & Gebhard^[13]方法,电转移参照“Molecular Cloning”一书方法,转印膜的封闭及抗原与第一抗体反应按Thomas^[5]方法进行,用Saling缓冲液(10mmol/L pH7.4 Tris-HCl; 2.5 mmol/L MgCl_2 ; 0.9% NaCl和1% Tween-20)洗膜五次,每次5min,用辣根过氧化物酶标记第二抗体与第一抗体反应,洗膜后将膜平铺在保鲜膜上,滴一层ECL-Western blotting检测试剂(Amershan),再复盖一张保鲜膜,立即压上X光片,室温曝光数秒钟或数分钟即可显影和定影。有免疫特异反应的蛋白带在X光片中清晰可见。

1.6 核酸提取和分析

1.6.1 核酸提取:病毒制品加入等体积抽提缓冲液I(0.02mol/L pH9.0 Tris-HCl; 0.001 mol/L EDTA; 4% SDS), 60°C 保温15min,再加入等体积抽提缓冲液II(40 mmol/L pH8.0 Tris-HCl; 1% CTAB; 1mol/L NaCl; 5 mmol/L EDTA; 0.5% PVP; 0.1% 巯基乙醇)^[16] 65°C 保温10min,加入等体积氯仿抽提,10000r/min离心16min。水相加入等体积酚:氯仿(1:1)混合液再抽提一次,10000 r/min离心10min,水相加入等体积异丙醇,混匀后 4°C 放置1h,10000 r/min离心6min,用70%乙醇洗沉淀,空气干燥后其沉淀即为

核酸制品。

1.6.2 核酸分析：将核酸溶于水并分别与 DNase I(20U; Boehringer Mannheim), RNase A(5U; 国产) 和 Mung Bean Nuclease (1U; Boehringer Mannheim) 混匀, 37℃ 保温 45 min, 然后在 1% 琼脂糖、pH7.8TAE 缓冲液的条件下进行电泳。

2 结果和讨论

2.1 BBTV 的纯化

采用硫酸铯密度梯度离心达到了分离纯化的目的, 实验重复性也好, 每次都能得到如图 1 所示的图谱。分部 1~8 和 20~21 管均无免疫反应, 推测是香蕉寄主成分。分别合并、浓集分部 12~16 和 9~11 管的病毒, 从 12~16 管中得到无色的纯品, 而 9~11 管则得到略带浅紫色制品。香蕉组织液暴露空气后极易氧化呈紫色, 所以 9~11 管虽然 ELISA 检测呈阳性, 但与寄主成分峰靠得较近, 两个侧峰之间有交叉, 所以这部分病毒中会污染寄主成分。Thomas^[5]曾提到提取液含有亚硫酸钠较为理想, 但我们发现第一次低速离心后上清液仍然呈现紫色。改用二乙基二硫氨基甲酸盐后, 离心后的上清液略带浅紫色, 而且能保留相当高的免疫反应性, 这可能是由于二乙基二硫氨基甲酸盐作为铜离子螯合剂而削弱多酚氧化酶氧化多酚化合物一些中间体的能力, 从而减少这些中间体沉淀病毒使丢失在第一次低速离心的沉淀中。

2.2 紫外吸收特征

BBTV 具有核蛋白的特征, 其紫外吸收图谱在 255nm 有一最高吸光度值, 240nm 有一最低吸光度值, A_{260} / A_{280} 为 1.30, 与 Thomas^[5]报道的结果一致。

2.3 形态

图 2 所示提纯病毒负染后在电镜下可观察到 BBTV 的球形颗粒, 直径在 18nm 左右, 26 万倍放大后似能看到外壳蛋白亚基的轮廓。

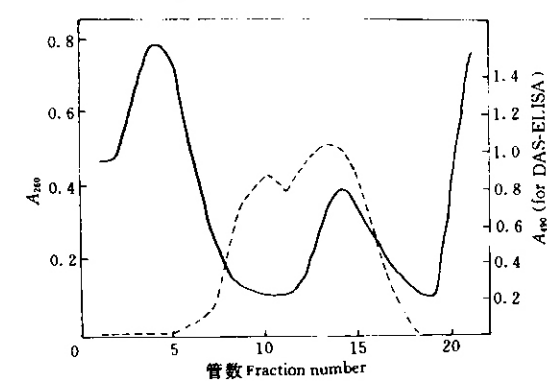


图 1 BBTV 硫酸铯密度梯度沉降图谱
Fig.1 Sedimentation profile of the Cs₂SO₄ density gradient centrifugation of the BBTV
—A₂₆₀; ----A₄₉₀(for DAS-ELISA).

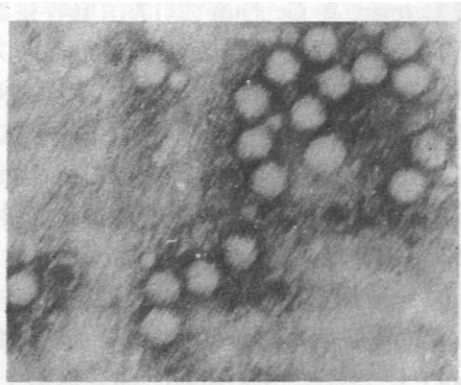


图 2 硫酸铯密度梯度离心后的 BBTV 颗粒(265 000×)
Fig.2 Purified BBTV particles (265 000×)

2.4 外壳蛋白分子量的测定

图3是在同一块SDS-PAGE上所得的结果。来自9~16管的BBTV制品在20kDa~30kDa之间给出三条蛋白带, 而且显然不与CMV-CP的位置一致, 这说明该

BBTV制品不混有CMV。为了确证三条中的哪一条是BBTV的外壳蛋白, 将第四泳道的BBTV未经染色的蛋白带做电转移, 然后与BBTV抗体进行免疫特异反应。采用近年来较新的ECL-Western转印法, 结果在X光片上只显示一条带并与三条带中分子量最小的一条带位置完全吻合。从图4可知其分子量为21kDa, 与文献报道的相符。

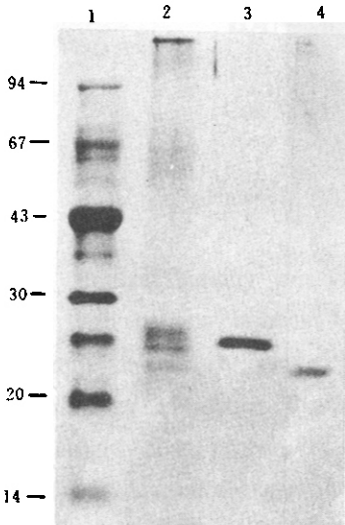


图3 香蕉束顶病毒外壳蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

1. 标准蛋白质($\times 10^3$ 为其分子量); 2. BBTV 制品; 3. CMV-CP; 4. ECL-Wester转印;
1、2、3用考马斯亮兰 G250 染色。

Fig.3 Analysis of protein associated with BBTV in 11% SDS-PAGE

Lane1. Protein markers; Lane2. BBTV sample(mixture of fraction 8~16);

Lane3. CMV-CP; Lane4. ECL-Western blotting.

Lane1. 2. 3 were stained with coomassie brilliant blue G250; The number at the left refer to the Mr values ($\times 10^3$) of marker proteins.

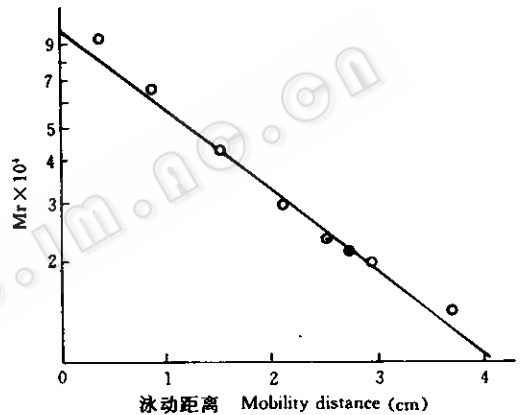


图4 香蕉束顶病毒外壳蛋白亚单位分子量测定

Fig.4 Plot of the log of the relative molecular masses (Mr) of BBTV-CP subunit proteins.

O: Markers (such as Fig.3); ◐: CMV-CP subunit;
●: BBTV-CP subunit.

2.5 病毒核酸分析

图5的第5泳道在1kb位置有一条核酸带, 用RNaseA处理后在第3泳道1kb位置的核酸带依然存在, 而用DNaseI处理后该核酸带就消失, 可见此核酸是DNA。Mung Bean Nuclease具有消化ssDNA特性, 用它处理BBTV核酸在第4泳道的核酸带消失了, 以上数据足以表明BBTV核酸是约1kb的ssDNA。

目前的研究结果只能表明我国的BBTD很可能是由BBTV和BLO两种病原体引起的, 还需要进一步搞清楚是BBTV或BLO单独侵染还是混合侵染, 那一种病原体为主, 单独侵染或混合侵染引起的病症又如何, 以便提出合理的防治措施。从分子生物学研究入手有可能利用基因工程手段培育抗病香蕉植株。

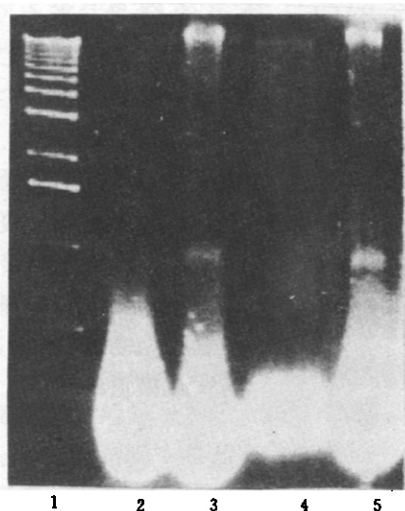


图5 BBTV 核酸的分析

Fig.5 Analysis of nucleic acids associated with BBTV

Lane1: 1kb ladder; Lane 2: BBTV after DNaseI digestion; Lane 3: BBTV after RNaseA digestion;
Lane 4: BBTV after Mung Bean Nuclease digestion; Lane 5: untreated BBTV.

致谢 澳大利亚 Dr.Thomas (Queensland Department of Primary Industries) 惠赠 BBTV 多抗和单抗, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Dale J L. *Adv Virus Res*, 1987, 33: 301~325.
- [2] Dale J L, Phillips D A, Parry J N *et al. J Gen Virol*, 1986, 67: 371~375.
- [3] Wu R Y, Su H J. *J Phytopathology*, 1990, 128: 153~160.
- [4] Harding R M, Thomas M B, Dale J L. *Journal of General Virology*, 1991, 72: 225~230.
- [5] Thomas J E, Dietzgen R G. *Journal of General Virology*, 1991, 72: 217~214.
- [6] Harding R M, Thomas M B, Hafner G J *et al. Journal of General Virology*, 1993, 74: 323~328.
- [7] Burns T M, Harding R M, Dale J L. *Arch Virol*, 1994, 137: 371~380.
- [8] Karan M, Harding R M, Dale J L. *Journal of General Virology*, 1994, 75: 3541~3546.
- [9] Thomas M B, Harding R M, Dale J L. *Journal of General Virology*, 1995, 76: 1471~1482.
- [10] Hafner G J, Harding R M, Dale J L. *Journal of General Virology*, 1995, 76: 2279~2285.
- [11] Wu R Y, You L R, Soong T S. *Phytopathology*, 1994, 84(9): 952~958.
- [12] Xie W S, Hu J S. *Phytopathology*, 1995, 85(3): 339~347.
- [13] Yeh H H, Su H J, Chao Y C. *Virology*, 1994, 198: 645~652.
- [14] 徐绍华, 蔡文启, 莽克强. *微生物学报*, 1993, 33(1): 58~61.
- [15] Hermann S, Gebhard V J. *Analytical Biochemistry*, 1987, 166: 368~379.
- [16] Doyle J J, Doyle J L. *Focus*, 1990, 12: 13~15.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF BANANA BUNCHY TOP VIRUS

Cai Wenqi Xu Shaohua Song Chunhua

Chen Jinyun Mang Keqiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract Banana bunchy top virus(BBTV) was purified from banana plants (Fu Jian Province) with banana bunchy top disease by cycles of differential centrifugation and caesium sulphate density gradient centrifugation. These BBTV particles were isometric with a diameter of about 18nm, The A_{260} / A_{280} of purified preparations was about 1.30. A single coat protein of Mr 21kDa was identified with antibodies to BBTV particles from Australia by ECL-Western blotting. Nucleic acid extracted from BBTV preparations migrated as a discrete band of about 1.0kb. This band was sensitive to digestion by DNaseI and Mung bean nuclease but not to RNaseA. The single-stranded virus-associated DNA of BBTV was characterized.

Key words Banana bunchy top virus, Purification, Characterization