

小(微米级)。这就使得人们有可能利用 SALS 方法来研究这些体系中的形态结构,包括各种因素(如温度、溶剂种类, pH 值、辐射等)对结构形态影响,进而研究生物高分子结构与功能的关系。这个方面,有人做了有益的尝试,还有许多课题有待人们去开发。

参 考 文 献

- [1] Stein, R. S. Rhodes, M. B.: *J. Appl. Phys.*, **31**, 1873, 1960.
- [2] Higgins, J. S., Stein, R. S.: *J. Appl. Cryst.*, **11**, 346, 1978.
- [3] Chang, E. P. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **343**, 615, 1974.
- [4] 胡世如, 张建国:《塑料》, 1978 年, 第 1 期, 第 1 页。
- [5] Mattson, J. S. et al.: *Computers in Polymer. Sciences* (Computers in Chemistry and Instrumentation, Vol. 16), Marcel Dekker Inc., Chapter 10, (Ed. by A. Misra, R. S. Stein) 1977.
- [6] Chu, W. H. Horne, D. E.: *J. Polymer Sci., Phys.*

- ed., **15**, 303, 1977.
- [7] Rhodes, M. B. Stein, R. S.: *J. Polymer Sci.*, **A-2**, **7**, 1539, 1969.
- [8] Moritani, Masahiko et al.: *Polymer J.*, **2**, 74, 1971.
- [9] Prud'homme, R. E. Stein, R. S.: *Eur. Polymer, J.*, **13**, 365, 1977.
- [10] Picot, C. Stein, R. S.: *J. Polymer Sci.*, **A-2**, **8**, 1491, 1970.
- [11] Robinson C.: *Tetrahedron*, **13**, 219, 1961.
- [12] Wilkes, G. L. et al.: *Structure and Properties of Polymer Films* (Ed. R. W. Lenz, R. S. Stein). p. 36—68, Plenum press, New York, London, 1973.
- [13] Junji Watanebe, et al.: *Polymer Bulletin*, **1**, 67, 1978.
- [14] Iizuka, E.: *Advances in Polymer Science*, Vol. **20**, Springer-Verlag Berlin, pp. 79—107, 1976.
- [15] Bettalheim, F. A. Kaplan, D.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **313**, 268, 1973.
- [16] Kaplan, D., Bettalheim, F. A.: *Exp. Eye Res.*, **13**, 219, 1972.
- [17] Iizuka E.: *Polymer J.*, **9**, 173, 1977.
- [18] 纪极英, 辛淑敏, 胡世如, 徐懋: 待发表工作。

[本文于 1980 年 7 月 26 日收到]

植 物 病 毒 的 纯 化

陈作义 朱本明

(中国科学院上海生物化学研究所)

现在已经知道有六、七百种植物病毒病,在农业生产上造成严重损失。肯定病原,才能采取及时的综合防治措施。因此,植物病毒的纯化在植物病毒研究和病毒病害防治上都有重要意义。现结合我们在植物病毒研究中一些病毒纯化的实例,介绍有关方法和技术。至于一般方法,可参考其他综述,专论^[1-6]。

一、植物病毒纯化的一般原理

植物病毒寄生于植物细胞内。利用病毒与寄主细胞内组分的差异,在不使病毒损伤和失活情况下选择各种不同的技术手段,可把病毒从植物细胞中分离出来,并进一步制备成高纯度、具活性的病毒制剂。

由于大多数病毒的外表面主要由蛋白质组

成,因此,一些提纯蛋白质的技术可用于病毒纯化。同时,病毒具有一定的大小、形状和密度,利用它们的沉降性质可使其与盐类、其它蛋白质和许多细胞组分分开。

二、选择适宜的寄主植物

一种植物病毒往往有多种寄主,它在不同寄主中的繁殖情况不相同,甚至可有很大差异。最好选择一种病毒含量高寄主成分又容易除去的寄主植物。

一般来讲,系统感染的植物中病毒含量高。新近发病表现出症状的幼嫩植物,较老的久经感染的植物,具有更高的病毒含量,同时色素较少。施肥适当,在 20—25°C 阴湿条件下生长的寄主植物,往往含病毒量高,寄主细胞组分易除

去。

纯化病毒还要选择合适的寄主植物组织。如患桑树萎缩病的病桑叶组织粘度很大,难以抽提出病毒。我们选用粘度小的发病新梢茎皮、叶柄、叶脉作为抽提材料^[7,8]。还要注意同一病毒的不同株系在同一寄主中的增殖量也不同,如马铃薯 X 病毒的一些株系之间增殖量可相差二倍。

Markham 认为,每公斤寄主植物的鲜叶材料至少要含 5—10 毫克干病毒才能进行纯化^[9]。但实际上,为了得到好的纯化效果,往往需要含有更多的病毒量。

为了测出纯化过程不同阶段的病毒含量,要用灵敏的、反应快速的植物种属用作指示植物或测定寄主,其中在接种叶片上可以产生枯斑反应的植物最为适用。

三、病毒汁液的粗抽提

将寄主植物样品置于 -20°C 以下低温冰冻 24 小时,有助于破碎植物细胞壁和使非病毒蛋白凝固,便于去除。

有些病毒在高温时不稳定,会失活,所以一般在 4°C 以下进行抽提。根据病株样品数量可选用电动绞碎机、组织捣碎器、石臼等破碎组织,然后再用双层纱布或尼龙纱布过滤,除去细胞残渣。由寄主细胞内逸出的病毒即留在汁液中。

通常捣碎组织和榨出汁液时,只有约 1/2 病毒质粒逸出。如用合适的缓冲液可得到更多的病毒,并能使病毒质粒稳定。如用 pH7.0、0.1 M 磷酸缓冲液抽提被感染烟叶中的苜蓿花叶病毒,比用水 (pH5.3) 抽提得到病毒量多三倍。大多数病毒在中性缓冲液中比较稳定。

寄主植物细胞中的核糖体大小、性质与病毒质粒相似,较难去除,但它们在无 Ca^{++} 和 Mg^{++} 情况下不稳定。在缓冲液中加入乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA),可使 Ca^{++} 和 Mg^{++} 与之螯合,从而使核糖体降解便于除去。但要注意到有的病毒(如苜蓿花叶病毒),要 Ca^{++} 或 Mg^{++} 等二价阳离子才稳定。植物汁液中常含

有多酚氧化酶和酚类化合物被氧化所形成的鞣酸等物质,这些物质既抑制病毒,又很难除去。若加入一些还原剂(如巯基乙醇,亚硫酸钠等),可避免它们的形成。

对一些长线状病毒质粒,以使用柠檬酸缓冲液为宜。要防止病毒质粒聚集引起的变性,在抽提马铃薯 Y 病毒时,加入 0.5 M 尿素是有用的,但较高浓度的尿素会破坏病毒质粒。

四、粗汁液的澄清

粗汁液中同时含有许多寄主细胞的各种细胞器,蛋白质等,均可用以下一些物理和化学的手段除去:

1. 低速离心 最为常用。在 3,000—10,000 g 离心 15 分左右,可除去较病毒大的颗粒,如寄主细胞的细胞核、线粒体、叶绿体和一些植物蛋白等。

2. 过滤和吸附 用滤纸、多孔玻璃滤器,木炭、皂土、硅藻土等过滤方法可除去细胞残渣等大组分,非病毒的许多小组分。但对滤纸或硅藻土有很强吸附的马铃薯 Y 病毒就不宜用此法。

加吸附剂(如活性炭)对于除去粗汁液中色素是有效的。但是,吸附法一般不具有精确的选择性,所以要掌握好合适条件。用鲜叶重量 5—10% 的硅藻土抽滤,可澄清水稻黄矮病毒粗汁液^[10]。

3. 加热或冷冻 可使一些植物蛋白质变性或凝聚,然后通过低速离心把它们除去。对于具有高的热钝化点的一些病毒榨出液,在 50—60 $^{\circ}\text{C}$ 加热几分钟即可除去许多杂蛋白。从茄科植物寄主纯化病毒时常用此法。

4. 加入有机溶剂 不仅可除掉寄主细胞的脂质成分,而且使大量寄主细胞蛋白变性,因此能有效地澄清粗汁液。但对含脂质外膜和因有机溶剂处理会失活的病毒不适用。我们用氯仿处理水稻普通矮缩病毒粗汁液,可得澄清的含病毒汁液^[11]。氯仿的体积一般用 20—25%,并事先冰冻,处理 2—5 分钟,以免病毒失活。如

对小麦丛矮病毒粗汁液就只处理 2 分^[12]。一般用 8.5% 浓度正丁醇逐滴加入粗汁液中,加完后置于冰箱中数小时,使其作用充分,然后离心除去杂蛋白。乙醚常用在线状病毒汁液的澄清,也可用四氯化碳、乙醇、丙酮等有机溶剂处理。

5. 酶处理 用蛋白水解酶和核酸酶处理粗抽提液,可除去非病毒的蛋白质和核酸,而保留病毒质粒。对粘度特别大的粗抽提液,用纤维素酶或蜗牛酶处理,可使粘度下降和杂蛋白降解,变性。

6. 抗血清处理 利用寄主蛋白的抗血清加到病毒抽提液中沉淀寄主蛋白,再通过离心除去。但要制备出既有足够效价,又含有适当比例的抗血清相当困难,因此很少应用。

五、从澄清液中分离纯化病毒

对多数病毒来说,要结合使用以下一些方法,才能得到合适的病毒纯化制剂。

1. 沉淀方法 可简便快速使病毒浓缩。硫酸铵是一种常用沉淀剂,特别适用于由大体积溶液制备病毒;通常用 1/3 饱和度。聚乙二醇是近来应用很广的沉淀剂,有 6,000, 12,000 等不同分子量。我们经常使用 6% 聚乙二醇和 3% 氯化钠沉淀病毒。

病毒在等电点时溶解度最小,容易沉淀。在纯化病毒时有时先调节溶液 pH 至等电点后,再加入沉淀剂,使沉淀效果更好。

2. 差速离心和超离心 通过几次重复循环的低速(5,000—10,000 转/分)和高速(50,000—60,000 转/分)差速离心,可得到高度纯化的 TMV 病毒制剂。

若病毒不太稳定,或者在植物里浓度太低,用化学方法难以纯化,则可采用超离心。病毒在 75,000—150,000g 离心 0.5—4 小时可沉淀。可以根据不同病毒质粒性质,选择合适的超离心速度。

Brakke 改进和发展了超离心技术,称为密度梯度离心^[13]。常用蔗糖或甘油在离心管中构成它们的密度梯度,将病毒悬浮液放在梯度顶

部。沉降速度取决于颗粒的大小、形状、密度以及离心力和介质的密度、粘度等。离心过程使具有不同密度的颗粒分离到各分层中,然后将含病毒层抽出。进一步的改进是用氯化铯代替蔗糖,在离心管内将病毒悬浮液与氯化铯混和进行密度梯度离心。密度梯度离心是很有效的病毒纯化手段,但要求离心机条件高,目前国内尚未能较普遍使用。

3. 凝胶层析 常用琼脂糖珠 (Sepharese, 其胶浓度为 2% 的 2B 型适用于病毒分离) 和葡聚糖凝胶 (Sephadex, 常用于病毒者为 G 200 型) 进行层析。让病毒悬浮液慢慢渗透通过这些凝胶柱。这些微孔只允许低于一定大小的分子(如色素和其他小颗粒)进入胶珠内部,病毒大颗粒被排除在外,于是迅速通过胶柱而先收集到。Steere 对此技术有过专门的详细介绍^[14]。我们用琼脂糖柱,将混杂在地黄黄斑病毒制剂中的色素除去,取得较好效果^[15]。

以上介绍的一些常用的纯化方法,从目前实际情况来看,用得最多的主要是沉淀方法结合差速离心。我们曾应用这样的方法分离纯化过线状病毒(如柑桔黄龙病毒)^[16]、球状病毒(如黄瓜花叶病毒、水稻普通矮缩病毒^[11])、杆状病毒(如大白菜病毒^[17])和弹状病毒(如小麦丛矮病毒^[12]、水稻黄矮病毒^[10])等。表 1 以大白菜病毒的分离纯化为例说明。

六、病毒制剂纯度的鉴定^[18]

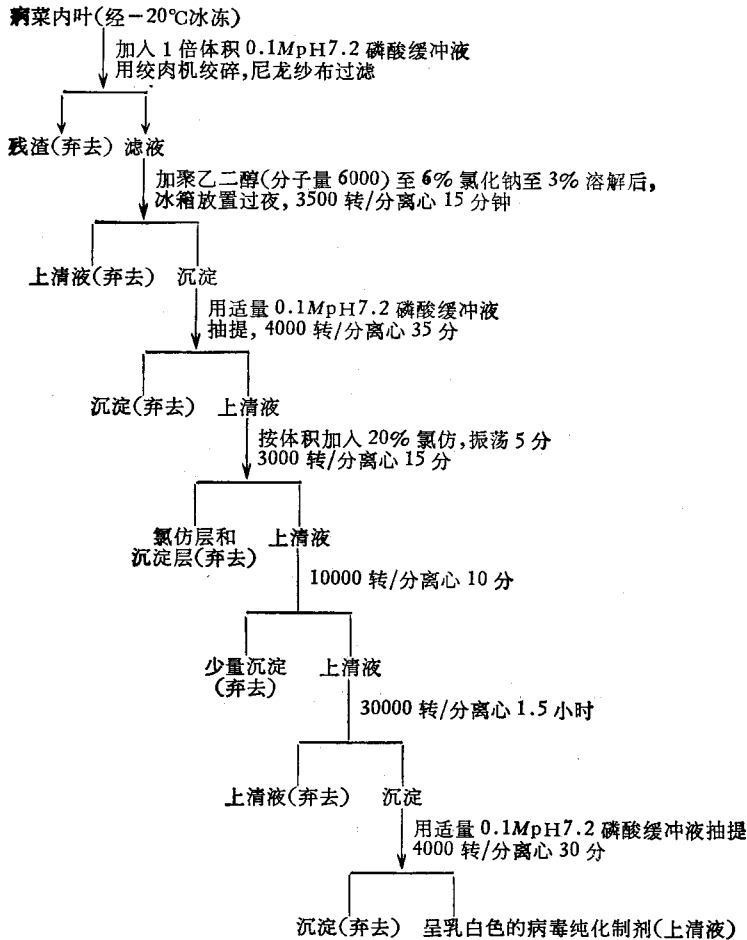
1. 电镜观察 常先用电镜观察病毒纯化制剂,纯化后的病毒质粒应均一,结构清晰,杂质很少。

2. 超离心沉降 可以根据各种病毒质粒特有的沉降系数来判断病毒纯化制剂是否均一。如检测出两个或多个组分,往往就可能有其他杂质。但多组分病毒因组分不同,也会有不同沉降系数。

3. 电泳 如果病毒纯化制剂均一,则在电泳中会出现一个均一的成分区带。

4. 紫外吸收光谱测定 从 220—310 毫微米测定病毒制剂的紫外吸收值。因病毒是一种

表 1 大白菜病毒纯化过程



核蛋白, 它的蛋白质和核酸量是固定的。可以测定它们的吸收值 A_{260} 、 A_{280} 、 A_{240} 。病毒的最低和最高吸收值在 240 和 260 毫微米附近, A_{260}/A_{240} 、 A_{280}/A_{260} 的比值, 可反映蛋白质和核酸的特有比例关系。纯化好的病毒能精确反映出这些比值。

5. 血清学试验 可用寄主植物细胞正常组分制备的抗血清, 检测病毒纯化制剂中是否混有寄主细胞残存的杂质。

6. 测定反映病毒特性的核酸碱基比和核酸含量 每一病毒有其特有的核酸含量和碱基, 如病毒已纯化, 则可精确地测定这些数据。

7. 侵染性试验 观察所得病毒纯化制剂是否引起发病, 并在其指示寄主上出现特有的症状。

七、病毒纯化制剂的浓缩和保存

1. 病毒纯化制剂的浓缩 一般在纯化过程中, 病毒质粒浓度可自然地浓集。如需进一步浓缩, 可采用下列二种方法:

(1) 渗透和吹干 将病毒溶液装入透析袋内, 两头扎紧。在袋的周围包埋上大分子量的亲水化合物 (如聚乙二醇、卵白蛋白), 使其失水。也可将装有病毒溶液的透析袋悬空吹干, 使水份蒸发, 浓缩病毒。

(2) 冷冻干燥 将病毒溶液低温冷冻 (-20°C), 然后放在盛有五氧化二磷的真空干燥器中, 真空冻干, 可制成病毒冷冻干粉保存。

2. 病毒纯化制剂的保存 病毒悬浮液, 可放在 $0-4^{\circ}\text{C}$ 保存, 并加入抗菌药物 (如叠氮钠、

甲苯等)以免染菌。

病毒纯化制剂冻结或冰冻干燥,对其侵染力影响很小。但是,如果病毒很纯,处在无盐或等电点时,经冰冻很易失去侵染性。为了保持侵染性,可在冰冻前加入 5—10% 的蛋白胨和葡萄糖。

参 考 文 献

- [1] 裘维藩: 植物病毒学, 农业出版社, 1964。
- [2] Smith, K. M.: *Plant Viruses*, 6th ed. Chapman and Hall, 1977.
- [3] Gibbs, A. et al.: *Plant Virology The Principles*. Arrol, 1976.
- [4] Noordam, D.: *Identification of Plant Viruses Methods and Experiments*, Center for Agricultural Publishing and Documentation, 1973.
- [5] Knight, C. A.: *Molecular Virology*, McGraw-Hill Book Company, 1974.
- [6] Martin, A. J.: *The Biochemistry of Viruses*, Cambridge University Press, 1978.
- [7] 中国科学院上海生物化学研究所病毒组等: 《中国科学》, **3**, 283, 1974。
- [8] 同上: 《中国科学》, **3**, 292, 1974。
- [9] Markham, R.: *Plant and Bacterial Viruses. The Viruses*, Vol. 2, Academic Press, 1959.
- [10] 中国科学院上海生物化学研究所病毒组等: 《生物化学与生物物理学报》, 1978 年, 10 期, 363 页。
- [11] 同上: 《生物化学与生物物理学报》, **10**, 355, 1978。
- [12] 同上: 《生物化学与生物物理学报》, **11**, 89, 1979。
- [13] Brakke, M. K.: *Adv. Virus. Res.*, **7**, 193, 1960.
- [14] Steere, R. L.: *Plant Virology*, pp. 211—34 (Eds. M. K. Corbett et al.) Univ. of Florida Press, 1964.
- [15] 朱本明, 陈作义: 《自然杂志》, **4**, 3, 1981。
- [16] 中国科学院上海生物化学研究所病毒组: 《中国科学》, **3**, 313, 1973。
- [17] 朱本明, 郑巧兮, 陈作义: 《生物化学与生物物理学报》, **13**, 2, 1981。
- [18] Pirie, N. W.: *Biol. Rev.*, **15**, 377, 1940。

[本文于 1981 年 2 月 12 日收到]

铜作催化剂测定谷物、豆类种子粗蛋白质

崔淑文 陈必芳 张 矩

(中国农业科学院综合分析室)

在凯氏消化中,一般认为汞是较理想的催化剂,它对于难消化物质氮的回收率较高,但汞有毒,因而寻找一个低毒的、能代替汞的催化剂是当前大家感兴趣的研究课题。近两年来,我们在前人工作的基础上用硫酸铜作催化剂测定谷物、豆类种子粗蛋白质含量建立了一个半微量凯氏法,其精密度和准确度与 ICC 标准法^[1]一致,且试剂无毒,价格便宜、操作简易,现已经专业会议审定为农业部标准方法。现介绍如下。

材 料 与 方 法

1. 供试材料 水稻、麦子、玉米、谷子、高粱、大豆、杂豆等作物种子。

2. 仪器、试剂(均为 AR 级)。

(1) 凯氏定氮仪。

(2) 0.02 N、0.05 N 盐酸标准溶液。

(3) 混合指示剂 溴甲酚绿 0.5 克、甲基红 0.1 克,分别溶于 95% 乙醇中;混合后稀释至 100 毫升。

(4) 硼酸-指示剂混合液 将混合指示剂与 2% 硼酸溶液按 1:100 混合,调节 pH 值到 4.5,呈灰紫色。

(5) 加速剂 硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 10 克,硫酸钾 100 克,研磨、混匀。

3. 测定步骤

(1) 制备试样 选取有代表性种子(带壳种子需脱壳),挑拣干净,按四分法取样,量不得少于 20 克,然后 60—65℃ 干燥;磨碎,过 40 目筛,装磨口瓶备用。

(2) 称样 称 0.1 克试样,准确到 0.1 毫克,置于 25 毫升凯氏瓶中测蛋白用。另取 1—2 克试样,测定水份。

(3) 消煮 向装有试样的凯氏瓶中加 2 克