

水稻草矮病毒在水稻原生质体中的表达

林丽明 吴祖建 金凤媚 谢荔岩 谢联辉*

(福建农林大学植物病毒研究所 福州 350002)

摘 要 通过建立水稻原生质体培养体系,经多聚鸟氨酸(PLO)介导将提纯的水稻草矮病毒(*Rice grassy stunt virus*, RGSV)接种到水稻原生质体内,利用酶联免疫吸附法(ELISA)及蛋白免疫印迹法(Western blot)研究 RGSV 在水稻原生质体内的生长周期及其编码蛋白的表达情况。结果表明:RGSV 在接种后 24h 左右开始在原生质体内复制,36h 左右达到最大值。NS6 在 15h 左右开始表达,在 30h 左右达到最大值。

关键词 水稻草矮病毒,原生质体,表达

中图分类号 S435 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2004)04-0530-03

水稻草矮病毒(*Rice grassy stunt virus*, RGSV)是纤病毒属(*Tenuivirus*)的一个成员,基因组包含 6 个 ssRNA 片段,6 个片段均采用双义编码策略^[1,2]。现有研究表明,RGSV vRNA5 编码的外壳蛋白(CP)和 vRNA6 编码的病害特异性蛋白(Specific-disease protein, SP 或 NS6 蛋白)是目前较为明确的致病相关蛋白,与褪绿花叶症状的严重程度密切相关,可在 RGSV 侵染的水稻中大量积累,并在寄主细胞内形成形态不一的内含体^[3],且在不同抗性水稻病株体内的表达、积累量存在明显的差异,说明 CP、SP 在病株体内的表达积累受到了寄主抗性基因及其产物的共同调控,随病毒寄主的变化而有所变化^[4-6],这暗示了两种蛋白在病毒与寄主的互动中可能起重要作用,这为病毒基因的表达调控研究提供了材料。有鉴于此,本文通过建立水稻原生质体培养体系,经聚鸟氨酸(PLO)介导将提纯的水稻草矮病毒接种到水稻原生质体内,利用蛋白酶免疫吸附法(ELISA)及蛋白免疫印迹法(Western blot)研究 RGSV 及其编码蛋白在水稻原生质体内的表达周期,为进一步明确 RGSV 及其基因产物在水稻细胞中的致病机制打下了基础,对揭示病毒与寄主水稻间互作及病毒演化具有重要的理论价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试毒源 经福建农林大学植物病毒研究所室内分离纯化,保存在水稻品种台中本地 1 号(TN1)上的水稻草矮病毒沙县分离物(*Rice grassy stunt virus*, RGSV-SX)。

1.1.2 试剂 纤维素酶、果胶酶、聚 L-鸟氨酸(PLO)购自北京欣经科有限公司, MES 购自上海生工生物技术有限公司,硝酸纤维素滤膜(NC)为 PALL 公司产品,碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG(IgG-AP)为 Promega 公司产品,其余试剂均为国产分析纯或化学纯。RGSV 抗血清由菲律宾国际水稻研究所的 Hibino 博士赠送, RGSV NS3 融合蛋白及 SP 抗血清为本室制备^[6,7]。

1.2 水稻愈伤组织诱导

取授粉后 10~12d(未成熟胚)或水稻成熟种子(台农 67)去皮(成熟胚),常规消毒处理后,无菌操作剥取未成熟胚或成熟胚,除去少量的胚乳,接种在 N6 或 MS 培养基上诱导愈伤

组织,愈伤组织每月继代一次。

1.3 悬浮细胞系的建立

参照文献 8 的方法,略有修改。

1.4 病毒提纯

参照文献 9,10 的方法,略作修改。

1.5 原生质体病毒侵染体系的建立

取继代 3~5d 的悬浮细胞在混合酶液中游离原生质体。在黑暗条件下保温 4~10 h,然后用 45 μ m 的滤网过滤,低速离心收集原生质体,并用含 13%甘露醇盐液洗涤 2~3 次后收集原生质体。进行原生质体活性测定,用 0.5%台盼蓝色,后在光学显微镜下观察。活的细胞不被染色,死亡的细胞则被染成蓝色^[11]。RGSV 接种原生质体参照文献 12 的方法。在接种前应先取出部分正常原生质体细胞设为阴性对照。

1.7 ELISA 和 Western blot 检测 RGSV 对水稻原生质体的侵染

ELISA 参照文献 13 的方法进行,SDS-PAGE 按常规方法进行。经 SDS-PAGE 分离后,电转移到硝酸纤维素膜上(200mA,1h),Western blot 参照文献 14 进行。

2 结果和分析

2.1 细胞悬浮培养系的建立及原生质体的分离和纯化

愈伤组织经多次继代后,挑选淡黄色,表面光滑,分裂旺盛、紧密颗粒状的胚性愈伤组织,用来分离原生质体或建立细胞悬浮培养物。愈伤组织加入 AAM 或 N6 液体培养基中进行悬浮培养,每 5~7d 继代一次。继代培养期间,可用无菌滴管吸 1 滴培养液于载玻片上,在 Leica 倒置荧光显微镜下观察细胞形态,避免操作中吸取坏死细胞。大约 2~3 个月后即可建立分散性好,生长旺盛的细胞悬浮系,取刚继代 3~5d 的悬浮细胞(图 1-A),此时细胞生长旺盛,可用于酶解制备原生质体(图 1-B),制备好的原生质体必须立即进行病毒接种实验,因细胞去壁后,如果酶液与细胞内的渗透压稍不平衡,极易引起原生质体破裂,因此,实验过程在分离原生质体酶液中加入 0.5%的牛血清白蛋白,有利于保护细胞膜免遭破坏。

基金项目 国家自然科学基金(A39970486),福建省自然科学基金(B0010011),福建省青年科技人才创新基金(2002J028)

* 通讯作者。Tel: 86-591-3769714; Fax: 86-591-3769704

作者简介 林丽明(1971-),女,福建三明人,助理研究员,博士,主要从事植物病毒及分子病毒学研究。E-mail: linliming@126.com

收稿日期 2003-09-28,修回日期 2002-12-16

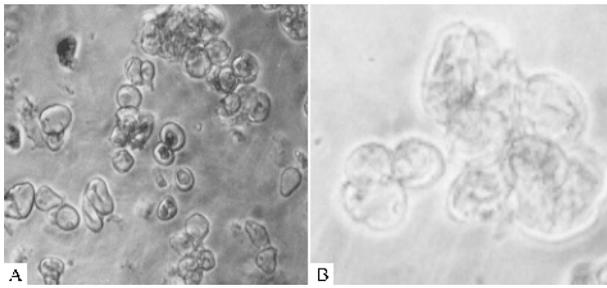


图 1 (A) 光镜下水稻胚性悬浮细胞(800×)(B)光镜下酶解后水稻原生质体(800×)。

Fig. 1 (A) Suspension culture of the embryo of rice under light microscope (800×) (B) Rice protoplasts by lysase under light microscope (800×).

2.2 RGSV 在水稻原生质体内的表达周期

经聚鸟氨酸介导,将 RGSV 导入水稻原生质体。以 RGSV 抗血清为探针,利用蛋白酶联免疫吸附法(ELISA),研究 RGSV 在水稻原生质体内的生长周期。结果表明:RGSV 在接种后 24h 左右开始在原生质体内复制,36h 左右达到最大值(图 2)。

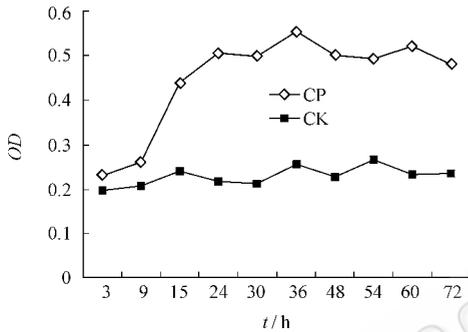


图 2 RGSV 在水稻原生质体内的一步增长曲线

Fig. 2 One-step growth curve of RGSV in rice protoplasts

2.3 RGSV 编码蛋白在水稻原生质体内的表达周期

RGSV 接种水稻原生质体后,进行 SDS-PAGE 电泳,分别在 0、3、9、15、24、30、36、48、54、60h 取样(以未接种 RGSV 的原生质体为对照),100g 离心 5min,去上清,加等体积 2× 凝胶上样缓冲液煮沸 3min,1000g 离心 3min,尽量去除细胞碎片等杂质,取 20μL 上清于 12% 聚丙烯酰胺分离胶,5% 聚丙烯酰胺浓缩胶中电泳,结果表明,在病毒接种后不同时间,在 21.6kD 的 NS6 蛋白条带及 34kD 的 CP 条带处表达量有所不同,这表明病毒接种后 CP、NS6 已在水稻原生质体细胞中得到表达。

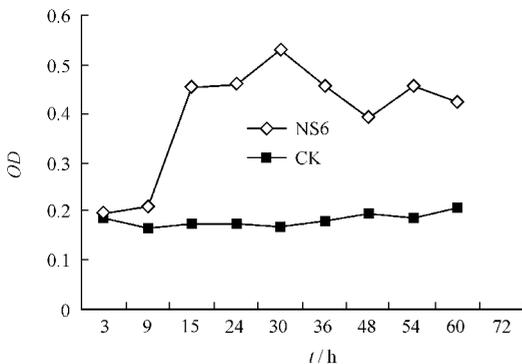


图 3 NS6 在水稻原生质体内的表达情况

Fig. 3 The expression of NS6 in rice protoplasts

利用酶联免疫吸附法(ELISA),进一步研究 RGSV 在水稻原生质体内的生长周期及其编码蛋白的表达情况。对 RGSV 接种水稻原生质体不同时间内,分别以制备的 NS3、NS6 蛋白抗血清为探针,检测 RGSV 在侵染过程中 NS3、NS6 的表达情况。以接种后时间为横坐标,检测 OD 值为纵坐标进行作图分析,结果表明,NS6 在 15h 左右开始表达,在 30h 左右达到最大值(图 3),而在 RGSV 侵染 30h 后才检测到 NS3 蛋白的表达,在 36h 时还能检测到,但到 48h 后则检测不到 NS3 蛋白的存在。这表明 NS3 蛋白在体内表达量很低,或只在病毒复制的特定时期表达而未能检测到。

Western blot 检测结果与 ELISA 检测结果基本吻合,NS3 蛋白也只在病毒接种后 30h 有检测到目的条带,病毒接种后 15h NS6 蛋白在水稻原生质体中已开始得到表达,而未接种对照则无目的条带出现(图 4)。

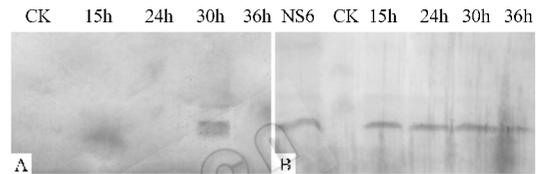


图 4 NS3 及 NS6 蛋白的 Western blot 检测结果

Fig. 4 The result of NS3/NS6 Western blot

A: NS3; B: NS6.

3 结论

原生质体培养技术为研究病毒与寄主间的互作及其致病机制提供了一个理想模型。以水稻原生质体代替水稻植株来研究 RGSV 和寄主间的互作,从细胞水平研究病毒在寄主体内表达,这不仅简化了实验,而且缩短了研究周期。本研究以建立的水稻原生质体侵染体系为基础,经多聚鸟氨酸介导,对 RGSV 和寄主间的互作做了初步的探索。将 RGSV 导入水稻原生质体,研究 RGSV 在水稻原生质体内的生长周期及 NS3、NS6 蛋白的表达情况。研究结果表明,RGSV 在接种后 24h 左右开始在原生质体内复制,36h 左右达到最大值,NS6 在 15h 左右开始表达,在 30h 左右达到最大值,本所金凤媚等利用 Northern 点杂交,对 RGSV 接种原生质体后的不同时间取样检测的结果表明,病毒接种后需 8h 才能进行转录,而且从此以后持续上升,直到 24~32h 达到最高峰,以后又降到一个平台期(未发表数据),这进一步证实了 RGSV 已在原生质体中得到有效复制。该结果与病毒基因组采取的独特双义编码策略^[1,2]是相对应的,即直接翻译自 vRNA 的 NS6 是病毒复制周期的早期阶段的产物,而由 vcRNA 编码的 CP 是病毒复制周期晚期阶段的产物。对 NS3 蛋白的检测则发现,在 RGSV 侵染 30h 后才检测到 NS3 蛋白的表达,在 36h 时还能检测到,但到 48h 后则检测不到 NS3 蛋白的存在,这表明 NS3 蛋白在体内表达量很低,或可能只在病毒复制的特定时期表达而未能检测到。这表明 RGSV 所编码的各蛋白在病毒复制、繁殖中的表达似乎存在一个相互调控的过程。国内杨文定等^[5]以 RSV 为抗血清研究 RSV 侵染水稻原生质体过程中 RSV 的增

殖周期;另外,我所也已对 RSV 在原生质体内的复制与表达等方面进行了研究^[16],也得到类似的结果。

聚鸟氨酸是一种碱性氨基酸,为多价阳离子,具有高度促进病毒感染的作用。与其它病毒接种方法相比,其感染率高、方法简单易行等优点。该方法已被广泛成功地应用于黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)、马铃薯 X 病毒(*Potato X virus*, PVX)、豇豆花叶病毒(*Coupea mosaic virus*, CpMV)、苜蓿花叶病毒(*Alfalfa mosaic virus*, AMV)等对烟叶原生质体的接种实验中^[17,18]。因此,在实验过程中我们采用多聚鸟氨酸病毒接种法,经实验证明此方法在水稻原生质体侵染体系中确实可行,且接种效率高(未发表资料)。

在本研究基础上,我们可进一步制备 NS3-DNA、NS6-DNA 探针,完成水稻原生质体中各基因的表达、积累及作用位点分析。为今后深入研究病毒在水稻原生质体细胞内的复制、细胞间的移动及细胞中的定位,明确 RGSV 基因产物在水稻细胞中的致病机制打下了基础。

参 考 文 献

- [1] Toriyama S, Kimishima T, Takahashi M. The proteins encoded by rice grassy stunt virus RNA5 and RNA6 are only distantly related to the corresponding proteins of other members of the genus *Tenuivirus*. *J Gen Virol*, 1997, **78**: 2355 - 2363.
- [2] Toriyama S, Kimishima T, Takahashi M, et al. The complete nucleotide sequence of the rice grassy stunt virus genome and genomic comparisons with viruses of the genus *Tenuivirus*. *J Gen Virol*, 1998, **79**: 2051 - 2058.
- [3] 林奇英, 谢联辉, 谢莉妍, 等. 中菲两种水稻病毒病的比较研究 II. 水稻草状矮化病的病原学. *农业科学集刊*, 1993, **1**(1): 203 - 206.
- [4] Toriyama S. An RNA-dependent RNA polymerase associated with the filamentous nucleoproteins of rice stripe virus. *J Gen Virol*, 1986, **67**: 1247 - 1255.
- [5] 林丽明, 吴祖建, 谢荔岩, 等. 水稻草矮病毒与品种抗性的互作. *福建农业大学学报*, 1998, **27**(4): 444 - 448.
- [6] 林丽明, 吴祖建, 谢荔岩, 等. 水稻草矮病毒特异蛋白抗血清的制备及应用. *植物病理学报*, 1999, **29**(2): 123 - 129.
- [7] 林丽明, 吴祖建, 谢联辉, 等. 水稻草矮病毒基因组 vRNA3 NS3 基因的克隆及序列分析. *农业生物技术学报*, 2003, **11**(2): 187 - 191.
- [8] 叶和春. 水稻细胞悬浮培养及再生植株的研究. *植物学报*, 1984, **26**(1): 52 - 59.
- [9] Hibino H, Usugi T, Omura T, et al. Rice grassy stunt virus: a planthopper-borne circular filament. *Phytopathol*, 1985, **75**: 894 - 899.
- [10] Toriyama S. Ribonucleic acid polymerase activity in filamentous nucleoproteins of rice grassy stunt virus. *J Gen Virol*, 1987, **68**: 925 - 929.
- [11] 陈浩明, 颜长辉, 姜晓芳, 等. 热激诱导烟草悬浮细胞的凋亡. *科学通报*, 1999, **44**(2): 196 - 200.
- [12] Samac D A, Nelson S E, Loesch-Fries L S. Virus protein an encapsidation of individual brome mosaic virus infected alfalfa protoplasts. *Virology*, 1983, **131**: 455 - 462.
- [13] 陆家珏, 张成良, 张作芳. A-蛋白酶联法检测植物病毒的研究. *植物检疫*, 1990, **4**(3): 161 - 163.
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1989: 888 - 897.
- [15] Yang W, Wang X, Wang S, et al. Infection and replication of a planthopper transmitted virus-rice stripe virus in rice protoplasts. *J Virol Met*, 1996, **59**: 57 - 60.
- [16] 明艳林, 吴祖建, 谢联辉. 水稻条纹病毒 CP、SP 进入叶绿体与褪绿症状的关系. *福建农林大学学报*, 2001, **30**(增刊): 147.
- [17] Okano T. Infection of barley protoplasts with brome mosaic virus. *Phytopathol*, 1977, **67**: 610.
- [18] 田波, 裴美云. 植物病毒研究方法(上). 北京: 科学出版社, 1987: 222 - 256, 307 - 318.

Expression of Rice Grassy Stunt Virus in Rice Protoplasts

LIN Li-Ming WU Zu-Jian JIN Feng-Mei XIE Li-Yan XIE Lian-Hui*

(Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: With the rice protoplast infection system, the purified virus particles of *Rice grassy stunt virus* were delivered into rice protoplasts derived from suspension cells of rice cultivars Tainong 67 via PLO-mediated method. Using antisera prepared against the purified virus particles of RGSV, NS3 fusion protein and purified NS6 protein, expression profiles of RGSV and its encoded proteins in rice protoplasts were investigated by indirect ELISA and Western blot. The results showed as follows: RGSV was detectable in rice protoplasts 24 h after inoculation, and reached its highest level 36 h after inoculation. NS6 was detected 15 h after inoculation, and reached its highest level 30 h after inoculation.

Key words: *Rice grassy stunt virus*, Protoplast, Expression

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (A39970486); National Science Foundation of Fujian Province (B0010011); The Youth Exploration Foundation of Fujian Province (2002J028)

* Corresponding author. Tel: 86-591-3769714; Fax: 86-591-3769704

Received date: 09-28-2003