

油菜花叶病毒¹⁵侵染烟原生质体的研究*

中国科学院微生物研究所植物病毒组

(北 京)

与 TMV 有血清学关系的油菜花叶病毒¹⁵(YMV₁₅)侵染烟原生质体的条件与 TMV 不同。在低于其等电点(5.35)的 pH4.7 的接种液中,不需要聚鸟氨酸的协助,能达到 43—53% 感染率,但加入聚鸟氨酸可使感染率增加到 46—96% (荧光抗体染色)。YMV₁₅ 增殖的一步生长曲线,似乎显示了病毒脱去蛋白质外壳时的侵染性下降,对数生长期一直维持到接种后 24 小时。每个被感染原生质体内病毒颗粒数为 $1-3 \times 10^3$ 。

近年来在植物病毒学领域中发展起来的原生质体技术,是研究病毒与寄主细胞相互关系的优越体系。不仅对研究病毒侵染、复制、遗传、免疫等理论问题具有重要意义;而且为防治病毒病开创了良好的前景^[1-3]。

本文研究了引起我国油菜花叶病的病原之一——油菜花叶病毒¹⁵(YMV₁₅)^[4,5]侵染烟原生质体的条件和特点。YMV₁₅ 与烟草花叶病毒(TMV)有血清学关系^[5],但它与 TMV 不同,具有能侵染油菜和白菜等十字花科作物的特点^[4,5]。此外,它还具有等电点高和氨基酸组成中含有组氨酸和甲硫氨酸等许多独特的性状^[6-8]。YMV₁₅ 是 TMV 的一个远缘株系。

TMV 和大多数病毒侵染烟原生质体时都需要聚鸟氨酸的协助^[1-3]。在我们的实验中,发现 YMV₁₅ 侵染烟原生质体时并不必需聚鸟氨酸的协助。但加入它则有显著的促进作用,可使感染率高达 90% 左右。这为病毒增殖和病毒治疗等研究提供了同步感染的细胞体系,并为抗病原生质体的分离培养准备了条件。

材料和方法

(一) 植物和病毒

用于分离原生质体的植物为三生烟(*Nicotiana tabacum* cv. Surmsan)。冬天在防虫温室内培养,除自然光外,补充人工光照(5000勒克斯),日间温度为 20—25℃,夜间为 15—18℃;夏天在四面通风透光的防虫室内培养。YMV₁₅ 在小白口品种的白菜(*Brassica pekinensis*)上繁殖,并进行提纯。

(二) 游离原生质体的制备

采顶叶以下第 3—4 充分展开的叶片,经自来水淋洗,再用蒸馏水冲洗,吸干之后,在 70% 酒精中浸泡 1 分钟,萎蔫后用镊子撕去下表皮,按一步法^[9,10]把去皮的叶面往下浸在 0.5—0.7% 纤维素酶(上海东风生化试剂厂产,溶于 0.6M 甘露醇, pH5.4)液中,在 25℃ 温箱内保温 2—3 小时。如用 1.2% Anozuka R-10 纤维素酶(日本产),保温时间要延长至 15 小时左右。分离的原生质体经双层尼龙纱(80 筛目)过滤,除去大的碎片,然后 $35 \times g$ 离心 3 分钟,除去酶液和小碎片。把沉降的原生质体用 0.6M 甘露醇液洗 3 次。最后把沉降的原生质体悬浮在 0.6M 甘露醇液中供接种用。其形态见图版 I-1。

(三) 原生质体的接种和培养

1. 在 pH 低于病毒等电点的接种液中接种:接种液成分为 0.02M 柠檬酸钾缓冲液, pH4.7, 病毒 60 微克/毫升, 0.6M 甘露醇。把制备的原生

本文于 1977 年 6 月 30 日收到。

* 本所谢德贞和田颖川同志参加部分实验工作,齐祖洞同志协助显微照像;北京医学院刘俊达同志协助荧光显微照像。

质体悬液(浓度为 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ 原生质体/毫升)与接种液按等体积混匀,于 25°C 保温15分钟。

2. 在加有聚鸟氨酸的接种液中接种: 接种液成分: 0.02M 柠檬酸钾缓冲液, $\text{pH}4.7$, 聚鸟氨酸(美国 Sigma 化学公司出品, 分子量为 $130,000$) 2 微克/毫升, 病毒 2 微克/毫升, 0.6M 甘露醇。接种液在 25°C 下预热10分钟, 然后与等体积的原生质体悬液混匀, 于 25°C 保温10分钟。之后, 离心3分钟, 除去接种液和未吸附的病毒, 把沉降的原生质体用 0.6M 甘露醇(含 0.1mM 氯化钙)洗3次。最后把沉降的原生质体悬浮在原生质体培养液中, 其成份为: 0.6M 甘露醇, 0.2mM 磷酸二氢钾, 1mM 硝酸钾, 0.1mM 硫酸镁, 10mM 氯化钙, $1\mu\text{M}$ 碘化钾, $0.01\mu\text{M}$ 硫酸铜, $\text{pH}5.6$ 。在连续光照(3000 勒克斯)下, 于 $25-28^\circ\text{C}$ 保温培养。培养24小时左右加入制霉菌素(上海第三制药厂提供)和庆大霉素(本所抗菌素组提供)各25单位/毫升。

原生质体数目用血球计数板计数, 其活性用 0.1% 酚番红检查。

(四) 荧光抗体的制备和染色

用荧光抗体染色法检查原生质体的感染率。

1. 免疫球蛋白的抽提: 取 YMV₁₅ 抗血清(效价为 2024) 20 毫升, 4000 转/分离心30分钟, 取上清液加入 20 毫升 0.85% 氯化钠, 缓慢加入 28 毫升饱和硫酸铵, 搅匀后于 4°C 静止30分钟, 离心。取沉淀悬浮在 20 毫升 0.85% 氯化钠液中, 再加入 20 毫升饱和硫酸铵, 静止后离心, 取沉淀悬浮在 3 毫升 PBS 缓冲液(0.01M 磷酸缓冲液, $\text{pH}7.0$, 含 0.85% 氯化钠)中, 于 4°C 对同样的缓冲液透析2天(用氯化钡检查, 至透析液无沉淀出现为止)。可获得浓度为 2% 的免疫球蛋白液 7 毫升。

2. 免疫球蛋白的荧光素标记: 将提取的 7 毫升球蛋白液加入 7 毫升 0.02M 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液($\text{pH}9.8$), 于 4°C 下对 140 毫升含有 0.011% (15.4 毫克)荧光素异硫氰酸酯(FITC, 西德 E. Merck 出品)的同样的缓冲液, 在磁力搅拌下透析24小时。透析后通过 Sephadex G-25 柱(柱高 30 厘米, 直径 1.8 厘米, 洗脱液为 0.01M PBS, $\text{pH}7.0$, 流速为 1 毫升/分)分离提纯, 获得 14 毫升荧光标记免疫球蛋白液, 浓度为 10.6 毫克/毫升荧光素(F),

与球蛋白(P)比值, 即 $F/P=1.3$ 。

3. 荧光标记球蛋白的烟丙酮干粉处理: 为了消除非特异性荧光, 荧光抗体需要用烟丙酮干粉处理^[11]。

烟丙酮干粉制备: 将烟叶切成小块, 用生理盐水洗3—5次, 在组织捣碎器内匀浆, 用4倍量丙酮冲洗, 离心, 取沉淀, 用生理盐水洗涤, 37°C 烘干, 研成粉末, 低温保存备用。

烟丙酮干粉处理: 将 0.3 克烟干粉用 60 毫升 80% 乙醇于 80°C 抽提10分钟, 然后用 0.01M PBS $\text{pH}7.0$ 洗3次, 取 1 毫升标记球蛋白液加 3 毫升 PBS, 加入 200 毫克烟干粉, 于室温搅拌60分钟, 然后于 4°C 离心20分钟($14000 \times g$), 取上清液再加半量烟干粉重复处理一次, 所得上清液即为处理过的荧光抗体, 其滴度为 $1/8-1/16$ 。

4. 原生质体的荧光抗体染色: 取一滴原生质体悬液置于涂有 Mayer's 清蛋白(卵蛋白 5 克溶于 50 毫升蒸馏水中, 加 50 毫升甘油和 1 克水杨酸钠)的载片上, 迅速干燥, 在丙酮中室温固定30分钟, 以 0.01M PBS 液浸洗 $1.5-2$ 小时。然后滴一滴荧光抗体于原生质体涂片上, 在保湿的 37°C 条件下保温2小时。用 0.01M PBS 浸洗 $1-2$ 小时。最后以含有 10% 甘油的 PBS 缓冲液封片固定, 供荧光显微镜检查。

5. 原生质体内病毒量和粒子数计算: 以心叶烟(*Nicotiana glauca*)测定病毒的侵染性。离心收集备测样品的原生质体, 加入 $1/15\text{M}$ 磷酸缓冲液($\text{pH}7.0$), 低温冰冻, 融化后, 用玻璃组织匀浆器匀浆, 取 0.5 毫升原生质体匀浆液经稀释后, 以半叶法接种心叶烟。另半叶接种浓度为 $0.5-1$ 微克/毫升提纯病毒作对照。以枯斑数比例计算样品的病毒量, 并依据 YMV₁₅ 分子量 3.8×10^7 ^[6]推算出每个感病原生质体内病毒粒子数。

结 果

(一) 接种液 pH 对 YMV₁₅ 侵染烟原生质体的影响

多数病毒侵染原生质体时都需要聚鸟氨酸, 其最适 pH 值在 5.2 左右。YMV₁₅ 具有较高的等电点(5.35)。因此测定接种液 pH 对感染率的影响是非常重要的。用 pH

表 接种液 pH 和聚鸟氨酸对 YMVi₁ 侵染烟原生质体内病毒量的影响*

实验号	接种液 pH	聚鸟氨酸 (微克)	原生质体($\times 10^4$)		荧光原生质体 百分率(%)	粒子数/每个 感病原生质体 ($\times 10^4$)
			枯斑数	病毒量(微克)		
1	4.4	0	430	1.5	15	1.5
		1	964	3.3	27	1.8
	4.7	0	612	2.1	53	0.6**
		1	2664	9.1	81	1.7
	5.0	0	304	1.0	38	0.4**
		1	2117	7.2	57	1.9
	5.3	0	162	0.6	21	0.4**
		1	1023	3.4	46	1.1
	5.6	0	392	1.4	15	1.4
		1	960	2.2	15	2.2
2	4.4	0	391	4.1	22	2.8
		1	447	4.7	21	3.3
	4.7	0	441	4.8	43	1.6
		1	1269	13.9	90	2.3
	5.0	0	110	1.1	39	0.4**
		1	159	1.7	50	0.5**
	5.3	0	198	2.2	28	1.1
		1	307	3.3	22	1.3
	5.6	0	—	—	—	—
		1	—	—	—	—

* 接种病毒后,原生质体保温 48 小时,分别测定感染率和侵染性。

** 污染有霉菌,原生质体死亡较多。

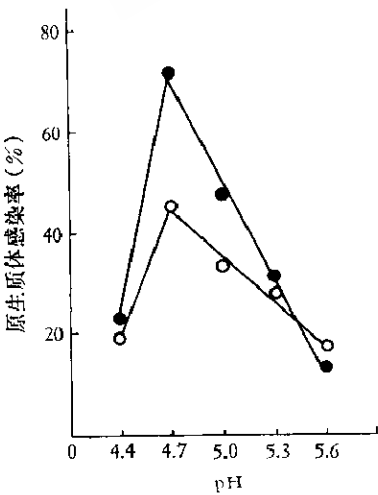


图 1 接种液 pH 和聚鸟氨酸对 YMVi₁ 侵染烟原生质体的影响(为 5 次实验的平均值。原生质体接种病毒后 48 小时,作荧光抗体染色检查)。

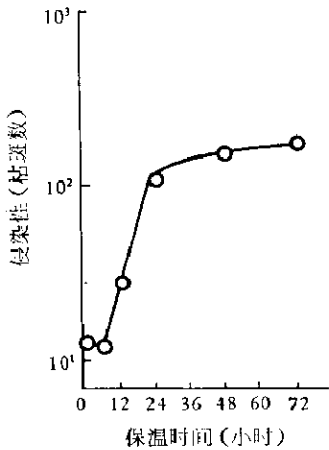


图 2 YMVi₁ 在烟原生质体内的一步生长曲线(接种液 pH 为 4.7,不加聚鸟氨酸)。

值不同的不含聚鸟氨酸的柠檬酸钾接种液接种原生质体, 经过 48 小时保温培养, 以荧光抗体染色检查感染率, 结果如图 1 所示。在低于 YMV_{15} 的等电点的接种液中, 原生质体的感染率随接种液 pH 值的降低而增高, 在 pH4.7 时达到最高。pH 再降低时, 感染率迅速下降。在高于 YMV_{15} 等电点的接种液中, 原生质体的感染率最低。

(二) 聚鸟氨酸对 YMV_{15} 侵染烟原生质体的影响

YMV_{15} 在低于其等电点的 pH4.7 时, 不加入聚鸟氨酸, 可达到 43—53.4% 的感染率。从图 1 和表所示结果证明: 接种液中加入聚鸟氨酸(每毫升 1 微克)可显著增加感染率。尤以 pH4.7 时为最显著, 达到 46.8—90%。在其它 pH 值时感染率也有增加, 但不如 pH4.7 时显著。

上表列出了两次试验中被感染原生质体内病毒的侵染性和病毒颗粒数目。每个被感染原生质体中病毒粒子数为 $1-3 \times 10^5$, 但与接种条件无明显相关性。

图版 I-2 示明, 在 pH4.7 条件下, 被 YMV_{15} 感染的烟原生质体的荧光显微镜照片。特异性荧光分布于细胞浆中。

(三) YMV_{15} 在烟原生质体内的一步生长曲线

一步生长曲线是病毒增殖的基本特征。在 pH4.7 的接种液中接种, 然后把接种了 YMV_{15} 的原生质体培养在 24℃ 条件下, 分别于接种后 0、5、12、24、48 和 72 小时取样测定病毒的侵染性。根据侵染性绘出 YMV_{15} 的一步生长曲线(图 2)。零时的侵染性是被原生质体吸附的病毒所引起的, 5 小时的侵染性下降, 这可能反映了病毒脱去蛋白质外壳的阶段。此后出现子代病毒, 并迅速增长, 对数生长期一直维持到 24 小时。以后病毒增殖速度变慢达到相对平衡。

讨 论

近年来, 已成功地把十几种病毒接种于植物原生质体。多数病毒的感染都需要聚鸟氨酸的诱导^[1-3]。本文报道的 YMV_{15} 对烟原生质体的侵染, 在低于其等电点(5.3)的 pH4.7 的条件下, 无需聚鸟氨酸的协助, 感染率可达 50% 左右。这与已报道的 TMV 的情况完全不同^[4], 这种差异可能是由于 YMV_{15} 的等电点高于 TMV 的等电点(3.5)^[6]的缘故。最近, 国际上也报道了豌豆耳突花叶病毒^[12]和雀麦草花叶病毒 V₁ 突变株^[13]侵染烟原生质体时不需要聚鸟氨酸的协助, 它们的共同特点也是病毒等电点都在 5 以上。当接种液 pH 值低于病毒等电点时, 病毒颗粒带正电, 因此能够与表面带负电荷的原生质体结合。植物病毒无主动侵染细胞的能力, 在自然界借助人或介体造成的伤口进入细胞。对于去壁细胞——原生质体的感染, 看来, 正负电荷的结合起着重要作用。一般认为 pH 低于 4.2 时会严重影响原生质体的生理活性。对于等电点较高的病毒, 使其带正电荷的低 pH 值不会伤害原生质体的生理活性。而使低等电点的病毒带正电荷的 pH 值对原生质体有严重损伤。必须用其他的方法使病毒带正电荷, 一般用一种多价阳离子的化合物与病毒结合, 效果最佳的是聚鸟氨酸, 而且对高等电点的病毒也有显著促进侵染的作用。关于聚鸟氨酸促进侵染的机理, 除与病毒结合增加正电荷外, 还可能使原生质体产生胞饮现象^[13,15]和伤口^[16,17]。

在感病烟原生质体内 YMV_{15} 的一步生长曲线, 出现了可能反映病毒脱去蛋白质外壳阶段的侵染性下降, 这与 TMV^[9] 的情况是一致的。但 YMV_{15} 在烟原生质体内增殖速率较缓慢。从病毒量看, 接种后 48 小时, 每个感病原生质体内病毒粒子数为

$1-3 \times 10^5$, 与粒子数高达 $0.5-9.3 \times 10^6$ 的 TMV 比, 则低得多。

参 考 资 料

- [1] 田波等: 微生物学报, 16(3), 258—264, 1976.
- [2] Takebe, I.: *Ann. Rev. Phytopathol.*, 13: 105—125, 1975.
- [3] Zaitlin, M., Beachy, R. N.: *Adv. Virus Res.*, 19:1—35, 1974.
- [4] 周家炽: 微生物学报, 8(4), 414—417, 1962.
- [5] 裴美云: 微生物学报, 8(4), 420—428, 1962.
- [6] Chang Yu-shang, Pei Mei-yün et al.: *Scientia Sinica*, 8(5), 753—759, 1964.
- [7] 张友尚、裴美云等: 生物化学与生物物理学报, 4(2): 196—208, 1964.
- [8] 张友尚、裴美云等: 生物化学与生物物理学报, 3(1): 47—54, 1963.
- [9] Power, J. B. and Cocking, E. C.: *J. Exp. Bot.*, 21:64—70, 1970.
- [10] Kassanis, B. et al.: *J. Gen. Virol.*, 24: 447—452, 1974.
- [11] Otsuki, Y. et al.: *Virology*, 38:497—499, 1969.
- [12] Takebe, I. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 64:843—848, 1969.
- [13] Motoyoshi, F. et al.: *J. Gen. Virol.*, 24: 89—99, 1974.
- [14] Motoyoshi, F. et al.: *J. Gen. Virol.*, 25: 31—36, 1974.
- [15] Cocking, E. C.: *Planta*, 68:206, 1966.
- [16] Burgess, J. et al.: *Planta*, 119:247—256, 1974.
- [17] Kassanis, B.: *Phytopathol. Z.*, 88:215—228, 1977.

THE INFECTION OF TOBACCO LEAF PROTOPLASTS BY CHINESE RAPE MOSAIC VIRUS (YMV₁₅)

Research Group of Plant Virus, Institute of Microbiology, Academia Sinica
(Beijing)

The requirement of infection of tobacco leaf protoplasts by chinese rape (*Brassica Campestris* L.) mosaic virus (YMV₁₅), serologically related to TMV, is different from that of TMV. At pH 4.7, lower than YMV₁₅ isoelectric point (5.35), infection may reach 43—53% (staining with fluorescent antibody) without poly-L-ornithine but increase up

to 47—90% in the presence of poly-L-ornithine. The one-step growth curve of YMV₁₅ multiplication suggests that a drop of infectivity may occur during the uncoating of virus protein. The logarithm growth phase may continue up to 24 hours after inoculation. The average number of progeny virus particles per infected protoplast is around $1-3 \times 10^5$.