

大麦条纹花叶病毒对大麦原生质体侵染的测定

邱并生 田波

(中国科学院微生物研究所, 北京)

在用大麦条纹花叶病毒(BSMV)接种大麦原生质体时,用免疫过氧化物酶测定其感染率,可排除自发性干扰。因 BSMV 新疆分离物没有定量寄主,用 ELISA 的双抗体夹心法和 BSMV-RNA 的 ^3H -cDNA 可以快速测定出感染原生质体中的病毒和核酸的增殖。

研究了感染大麦原生质体的最适条件。在此条件下,每个原生质体可以吸附 1400—1600 个 BSMV 颗粒。培养 6 小时后病毒量下降,然后逐渐上升,对数期维持到 48 小时。接种 24 小时后大约有 70% 左右的原生质体被感染,48 小时后每个感染原生质体中大约有 1.62×10^4 — 4.0×10^4 个病毒颗粒。病毒核酸的合成在接种后 12 小时达到高峰。

大麦条纹花叶病毒(BSMV)在我国许多地区对小麦和大麦造成普遍危害^[1],种子带毒率达 1—10%^[2]。BSMV 属于分段基因组病毒。我们用新疆分离的一株含四个基因片段的 BSMV^[3],研究了它对大麦原生质体侵染过程。由于大麦原生质体在紫外线激发下有自发荧光,故不能以常用的荧光抗体染色法测定原生质体的感染率^[4]。我们采用未标记免疫过氧化物酶技术测定原生质体感染率,用酶联免疫吸附实验(ELISA)和 BSMV-RNA 的互补 DNA (cDNA) 探针作病毒及其 RNA 的定量测定,研究了 BSMV 侵染大麦原生质体的条件及其一步生长曲线。

材 料 和 方 法

(一) 病毒

BSMV 新疆株(XJ)在大麦上繁殖,按以前^[2]方法进行提纯。

(二) 原生质体的分离

将皮大麦播种在 20℃ 防虫温室的消毒土中,待长出一片叶后采收叶片,撕去下表皮,浸在含 0.5% 纤维素酶(上海东风生化试剂厂)的 0.65 M 甘露醇溶液中(pH 5.4),25℃ 保温 2—3 小时。游离的原生质体经双层尼龙纱(80 目)过滤,除去大

的碎片,100×g 离心 3 分钟,把沉淀的原生质体用 0.65 M 甘露醇洗 3 次,最后悬浮在 0.65 M 甘露醇溶液中供接种用。

(三) 原生质体接种

经过预备实验确定,BSMV 的最适接种条件为:0.01 M 柠檬酸钾缓冲液, pH 4.7, 100 μg/ml BSMV, 10 μg/ml 聚鸟氨酸(英国 Sigma 公司,分子量 130,000), 0.65 M 甘露醇。在 25℃ 下预热 10 分钟,然后与等体积原生质体悬液(2×10^6 原生质体/ml)混合,于 25℃ 保温 10 分钟,100×g 离心 3 分钟,把沉降的原生质体再用 0.65 M 甘露醇(含 0.1 mM CaCl_2)洗三次,最后将其悬浮在原生质体培养液中^[5]。

(四) 抗血清

1. 兔抗 BSMV 抗血清:以提纯的 BSMV 免疫家兔,得效价 1:2000 的抗血清。

2. 羊抗兔 IgG:中国科学院生物物理所工厂产品。

3. 兔抗辣根过氧化物酶抗血清:1mg/ml 辣根过氧化物酶(HRP)(上海东风生化试剂厂 $R_0 = 2.9$)加等体积福氏完全佐剂混合,分别从家兔脚掌、皮内和皮下多点注射 2ml 乳化液。7—10 天后每周间隔在眼睑皮下、静脉和背部皮内等多部位注射 0.5mg/ml HRP 1 ml,不加佐剂。连续三次。十天后试血,效价为 1:64 (琼脂双扩散)。

本文于 1981 年 2 月 13 日收到。

(五) 过氧化物酶-抗过氧化物酶可溶性复合物(PAP)的制备

PAP 的制备参照 Sternberger 等^[6]的方法。15ml 兔抗 HRP 抗血清经 15,000rpm 离心 20 分钟(4℃, 下同), 去沉淀, 逐滴加入 0.5mg/ml HRP 5.5ml, 置室温缓缓搅拌 1 小时, 15000rpm 离心 20 分钟, 沉淀用 0.01M pH7.2 磷酸缓冲的盐水(PBS)洗 3 次。在冰浴中, 加 6ml 2mg/ml 的 HRP 至上述沉淀中, 然后滴加 0.1N 和 0.01N HCl 调 pH 至 2.3, 此时沉淀物完全溶解。15,000rpm 离心 20 分钟, 取上清, 及时在冰浴中用 0.1N 和 0.01N NaOH 调 pH 到 7.5。15,000rpm 离心后有少量沉淀物, 可继续用 2mg/ml 的 HRP 提取。在可溶性 PAP 中, 按其总体积的 1/10 量加入 0.075N 醋酸钠和 0.15N 醋酸铵的等体积混合缓冲液, 然后加入等体积的饱和硫酸铵溶液沉淀 PAP 复合物。15,000rpm 离心 20 分钟, 沉淀用 50% 饱和度硫酸铵洗一次, 再溶于 5ml 重蒸馏水中, 对 2 升 pH6.75、0.075N 醋酸钠和 0.015N 醋酸铵缓冲液透析过夜(4℃), 其间换液二次, 然后离少量不溶性物质, 经 0.45 μ 微孔滤膜过滤灭菌, 分装安瓿瓶保存于 -10℃。

本实验所用可溶性 PAP 复合物、HRP 与抗 HRP 抗体结合的克分子比值为 1.4, 即为 3 克分子 HRP 和 2 克分子抗 HRP 抗体相结合。

(六) 酶标记抗体制备和测定

按以前用方法^[7]从 BSMV 抗血清中提纯 IgG 以过碘酸氧化法将 HRP 与 IgG 联接起来, 并按以前使用的双抗体夹心法^[7]测定原生质体样品中的 BSMV。

(七) 用未标记免疫酶法染色原生质体

1. 接种 BSMV 培养 24 小时后的大麦原生质体先固定在涂有 Mayer 氏蛋白贴片液(蛋清 50ml, 甘油 50ml, 水杨酸钠 1g)的载玻片上, 再用含 0.074% HCl 的甲醇溶液处理 30 分钟, 以抑制原生质体的内源过氧化物酶^[8]。

2. 加 1:20 兔抗 BSMV IgG (1mg/ml) 于涂片上, 37℃ 保温 1 小时, 在染色缸内用 0.01M、pH7.2 PBS 洗三次。

3. 按上法加 1:20 羊抗兔 IgG (1mg/ml)。

4. 按上法加 1:20 PAP (1mg/ml)。

5. 以 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)为酶底物

供氢体, 在黑暗下反应 10 分钟, 在染色缸内用 0.05M、pH7.6 Tris-HCl 缓冲液洗三次, 即可在光学显微镜下观察, 感染病毒的原生质体呈棕色。

(八) 以 ³H-CDN 为探针测定 BSMV-RNA 的浓度

按 Randles 等^[9]方法制备 ³H-cDNA。10⁶ 原生质体用 1ml 提取缓冲液(0.5M 硼酸盐缓冲液 pH9.0, 0.02M SDS, 80% 苯酚内含 0.1% 8-羟基喹啉)匀浆抽提核酸, 10,000 \times g 离心 15 分钟, 取水相, 加三倍体积的冷乙醇放置过夜(-20℃)。离心取沉淀, 以 100 μ l 杂交缓冲液(0.18M NaCl, 0.01M Tris, 0.001M EDTA-Na₂, 0.05% SDS, pH7.0)悬浮, 取 4 μ l 加 35 μ l 杂交缓冲液, 加 1 μ l 合成的 BSMV-RNA-³H-cDNA (2000cpm), 封装在硅化的玻璃毛细管中, 在 100℃ 水浴中煮沸 3 分钟, 使核酸变性, 然后迅速放入 60℃ 水浴中杂交 48 小时。杂交后, 将样品移入 450 μ l 含 4 μ g/ml DNA 的缓冲液(0.05M NaCl, 0.03M NaOAc, 0.001M ZnSO₄, 5% 甘油, pH4.6)中, 等分为两份, 1 份加 S₁ 核酸酶 6 单位, 另 1 份不加, 45℃ 保温 30 分钟, 加入 1ml 10% 的 TCA, 中止反应, 加入 10 μ l 1% 牛血清白蛋白, 冰浴 30 分钟。在 0.45 μ 微孔滤膜上过滤, 用 5% TCA 和 95% 乙醇各洗 3 次, 将微孔滤膜干燥, 放入装有甲苯闪烁液的测定瓶内, 在 NE8312 型液体闪烁仪上计数, 并计算杂交率。

结 果

(一) BSMV 侵染大麦原生质体的条件

测定了接种液 pH, 聚鸟氨酸(PLO)和病毒浓度对原生质体吸附病毒量和感染率的影响。

表 1 列出了不同 pH 值的 0.01M 柠檬酸钾缓冲液接种时, 原生质体的感染率和病毒浓度的结果。

试验表明, 接种液 pH 为 4.7 时, BSMV 的侵染率和原生质体中病毒增殖量最高。

当接种病毒浓度为 50 μ g/ml 时, 不同 PLO 用量对原生质体吸附病毒量有明显影

表 1 接种液 pH 值对 BSMV 侵染大麦原生质体的影响

Table 1 Effect of pH of the inoculation medium on adsorption of virus and infection percentages of barley protoplasts by BSMV

pH	原生质体吸附的病毒量 virus adsorbed on protoplasts		原生质体感染率(%) infection percentages (%)	48 小时后原生质体内病毒量 yield of virus after 48h	
	μg 病毒/ 10^6 原生质体 μg virus/ 10^6 protoplasts	病毒颗粒/原生质体 number of virus particles/protoplast ($\times 10^3$)		μg 病毒/ 10^6 原生质体 μg virus/ 10^6 protoplasts	病毒颗粒/原生质体 virus particles/protoplast ($\times 10^3$)
4.7	0.071	1.65	71.5	50.0	1.62
5.0	0.068	1.58	60.4	24.0	0.92
5.3	0.060	1.39	51.5	20.0	0.90
5.6	0.051	1.19	31.0	3.5	0.26
6.0	0.028	0.66	12.0	1.5	0.29

响。结果指出(表 2), 在试验范围内 PLO 浓度愈高所吸附的病毒量愈多, 但高浓度的 PLO 对原生质体产生毒害作用。 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 是最适 PLO 浓度。

从表 3 可见不同病毒量对原生质体吸附病毒量的影响。 $50-100\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 BSMV 使原生质体达到很高的吸附量。

表 2 PLO 量对大麦原生质体吸附 BSMV 数量的影响

Table 2 Effect of concentration of PLO on adsorption of BSMV particles by barley protoplasts

PLO ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	原生质体吸附病毒量 virus adsorbed on protoplasts	
	μg 病毒/ 10^6 原生质体 μg virus/ 10^6 protoplasts	病毒颗粒/原生质体 virus particles/protoplast
0	0.042	973
1	0.052	1200
5	0.072	1668
10	0.096	2224

使用上述最佳条件接种的大麦原生质体, 采用材料和方法中所述的 PAP 染色法对接种 24 小时后的原生质体进行感染率的测定。图 1 为未经染色的健大麦原生质体。图 2、3 分别为经染色的未接种和接种 BSMV 培养 24 小时后的原生质体。在光学显微镜下观察, 接种 BSMV 的(图 3)

表 3 接种液中 BSMV 浓度对大麦原生质体吸附病毒量的影响

Table 3 Effect of concentration of BSMV on adsorption of virus particles by barley protoplasts

BSMV ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	原生质体吸附病毒量 virus adsorbed on protoplasts	
	μg 病毒/ 10^6 原生质体 μg virus/ 10^6 protoplasts	病毒颗粒/原生质体 virus particles/protoplast
1	0.032	741
5	0.036	834
10	0.052	1205
50	0.064	1483
100	0.066	1592

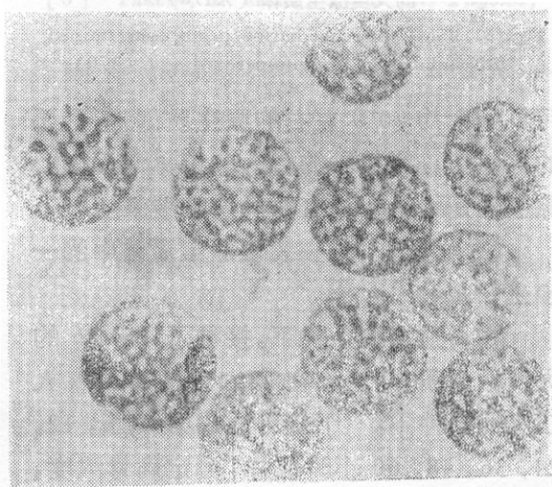
图 1 大麦叶肉原生质体 ($\times 400$)Fig. 1 Barley protoplasts ($\times 400$)



图2 用未标记过氧化物酶染色的
健大麦原生质体 ($\times 170$)

Fig. 2 Healthy barley protoplasts stained with
unlabelled immunoperoxidase ($\times 170$)

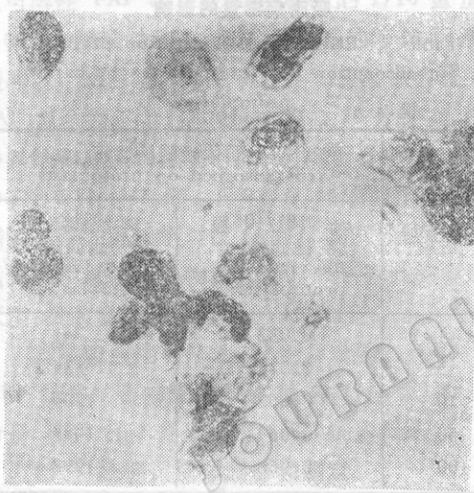


图3 用未标记过氧化物酶染色的感染 BSMV
的大麦原生质体 ($\times 170$)

Fig. 3 BSMV infected barley protoplasts stained
with unlabelled immunoperoxidase ($\times 170$)

可见到大约 70% 左右的原生质体有明显的棕色区, 未接种的(图 2)未见此反应。棕色区是 HRP 和底物反应的结果。

(二) BSMV 在大麦原生质体中的一步生长曲线

在最适接种条件下, 接种了 BSMV 的大麦原生质体, 培养在 25°C 和 1000Lux 人工光照条件下。于接种后的第 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 小时取样, 测定病毒浓度, 绘出如图 4 的一步生长曲线。零时的吸收值是被原生质体吸附的病毒, 平均每个原

生质体有 1500 病毒颗粒, 6 小时病毒量下降, 此后出现子代病毒, 并迅速增长, 对数期一直维持到 48 小时, 以后病毒增殖速度变慢。接种 24 小时后大约 71% 的原生质体被感染, 48 小时后每个感染的原生质体中大约为 2.07×10^6 病毒颗粒。

(三) 接种 BSMV 的原生质体内病毒 RNA 的增长

在一步生长曲线实验中, 于接种 0, 12, 24, 48 小时取 10^6 原生质体抽提核酸, 测定与 BSMV-RNA- ^3H -cDNA 的杂交率, 从同一时间中的杂交率反应 BSMV-RNA 的增长。

由表 4 结果可见, 病毒 RNA 的增长较病毒抗原的增长快, 接种后 12 小时杂交率已达 85.5%。

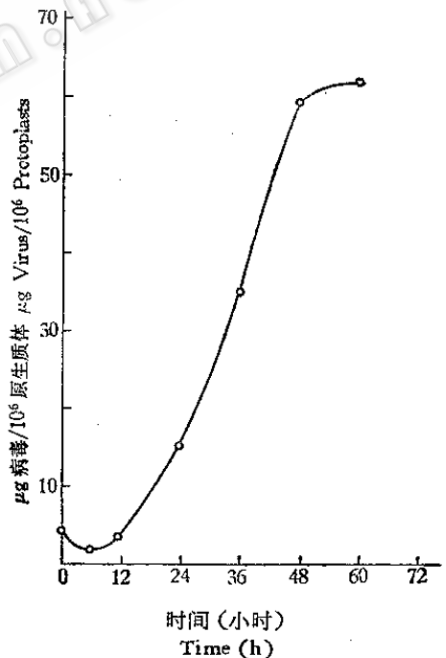


图4 大麦条纹花叶病毒在大麦原生质体内的一步生长曲线

Fig. 4 Time course of BSMV replication
in barley protoplasts

讨 论

原生质体是研究植物病毒侵染过程的

表 4 从接种病毒的原生质体中提取的 RNA 与 BSMV-RNA-³H-cDNA 杂交
Table 4 The molecular hybridization percentage of RNA extracted from inoculated protoplasts with BSMV-RNA-³H-cDNA

样 品 Samples		每分钟的计数 (cpm)		杂交率 Hybridization percentage (%)
		+S ₁ 核酸酶 +S ₁ nuclease	-S ₁ 核酸酶 -S ₁ nuclease	
从原生质体中 抽提的 RNA RNA extracted from proto- plasts after inoculation (h)	0	343	729	47.0
	12	899	1052	85.5
	24	785	893	87.9
	48	842	900	97.4
	未接种对照 uninoculated control	54	518	10.0
提纯的 BSMV-RNA Purified BSMV-RNA (μg)	0.01	512	524	97.0
	0.001	507	572	88.6
	0.0001	287	645	44.4
	0	47	754	6.0

一个良好体系^[4], 属于多分段基因组的 BSMV 在侵染大麦原生质体时需要相当高的病毒浓度 (50 μg/ml)。其他多分段基因组病毒, 如红豆褪绿斑驳病毒和雀麦花叶病毒在侵染原生质体时比其他病毒所需病毒浓度也高。Okuno 等^[5a]用雀麦花叶病毒侵染大麦原生质体时需 50—100 μg/ml 的接种物浓度, 与本实验结果非常相近。因为多分段基因组病毒必须有各段基因同时存在时才能引起成功的侵染。

用未标记免疫酶测定有自发荧光的原生质体的感染率比荧光抗体染色法灵敏, 特异性也高。应用此法无需制备每个病毒的荧光抗体或酶标记抗体, 简化了步骤。对于尚无枯斑定量寄主的病毒, ELISA 测定病毒浓度也是可取的, 其缺点是不能反映核酸的数量。用 cDNA 探针进行分子杂交的方法检测核酸含量, 灵敏度和特异性

都较高, 但尚需制定直接反映核酸浓度的方法。

参 考 文 献

- [1] 谢浩等: 微生物学报 20: 328—330, 1980。
- [2] 邱并生等: 植物病理学报, 付印中。
- [3] 裴美云等: 生物物理与生物化学学报, 14(3): 273—278, 1982。
- [4] Takebe, I.: in "Comprehensive Virology" II: 271, (ed by H. Frankel-Conrat and R. R. Wagner), Plenum press, New York and London, 1977
- [5] Takebe, I. et al.: *Plant cell Physiol.*, 9: 115—124, 1968.
- [6] Sternberger, L. A. et al.: *J. Histochem. Cytochem.*, 18: 315—333, 1970.
- [7] 马德芳等: 微生物学报, 21:(1) 63—67, 1981。
- [8] 邱并生等: 病毒学集刊, 付印中。
- [9] Randles, J. W. et al., *J. Gen. Virology*, 43: 649—662, 1979.
- [10] Okuno, T. et al.: *Phytopath.* 67: 610—615, 1977.

INFECTION OF BARLEY PROTOPLASTS WITH BARLEY STRIPE MOSAIC VIRUS DETECTED BY IMMUNOPEROXIDASE AND COMPLEMENTARY DNA PROBE

Qiu Bingsheng Tian Bo (Tien Po)

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

The unlabelled immunoperoxidase technique was applied to determine the level of infection of barley protoplasts with barley stripe mosaic virus (BSMV), since the nonspecific fluorescence of barley protoplast during culture interfered with the use of fluorescence antibody method. Protoplasts were stained with the following steps: (1) Treatment by ethanol contained 0.074% HCl to inhibit the endogenous peroxidase; (2) Localization the virus antigen with rabbit IgG to BSMV; (3) Reaction with sheep IgG to rabbit IgG in excess; (4) Reaction with peroxidase-anti-peroxidase (PAP); (5) Staining with 3, 3'-diamino-benzidine and H_2O_2 ; (6) Examined the brown masses of virus antigen under a light microscope. The amounts of virus and its RNA were determined by double antibody sandwich type

of ELISA and the hybridization percentage with BSMV-RNA- 3H -cDNA.

The best conditions for infection of barley protoplasts by BSMV were 0.01 M potassium citrate buffer at pH 4.7 containing 50 μ g/ml purified BSMV, 5 μ g/ml poly-L-ornithine and 0.65 M mannitol for 10 min at 25 °C. Estimation showed that from 1400 to 1600 BSMV particles were adsorbed per protoplast and about 70% of protoplasts were infected 24 hr after inoculation. Virus yield were ranging from 1.62×10^6 to 4.0×10^6 per protoplast.

The one-step growth curve of BSMV determined by ELISA showed that, virus antigen present at zero time represents inoculum virus absorbed to protoplasts. Virus increased rapidly during the period between 12 hr and 48 hr. The synthesis of viral RNA have started earlier.