

含有拟病毒 RNA 的绒毛烟草斑驳病毒 在克里夫兰烟原生质体内的增殖

吴建国 卢文筠

(武汉大学病毒学系, 武汉)

田波 邱并生

(中国科学院微生物研究所, 北京)

利用酶联免疫吸附分析 (ELISA) 的双抗体夹心法和未标记免疫过氧化物酶法 (PAP), 研究了含有拟病毒 RNA (Virusoid RNA) 的绒毛烟草斑驳病毒 (Velvet tobacco mottle virus, VTMoV) 侵染克里夫兰烟 (*Nicotiana clevelandii* A. Gray) 原生质体的最适条件以及病毒在原生质体内增殖的一步生长曲线, 建立了一种适宜 VTMoV 增殖的原生质体细胞体系。

VTMoV 侵染克里夫兰烟草原生质体的最适条件是: 接种液为 0.01M 柠檬酸钾缓冲液含有 0.7M 甘露醇、2 μ g/ml L-聚鸟氨酸和 8 μ g/ml VTMoV, pH5.0, 25 $^{\circ}$ C 接种 10 分钟。在此条件下, 每个原生质体约吸附 5840 个病毒粒子。在 28 $^{\circ}$ C 人工连续光照条件下培养 48 小时后, 用未标记免疫过氧化物酶法测定的原生质体的感染率为 46.7% 左右。

分别从接种后培养不同时间的原生质体中提取病毒, 用 ELISA 对病毒进行定量测定。接种后第 0—18 小时病毒量下降, 18 小时后病毒量有所增加, 从第 32 小时起到第 68 小时病毒量成指数形式增长, 病毒量一直增长到第 105 小时, 然后下降。在第 105 小时时每个被感染的原生质体体内的病毒粒子数约为 1.14×10^6 个。

关键词 拟病毒; 绒毛烟草斑驳病毒; 原生质体

VTMoV 是从生长在澳大利亚中部的绒毛烟草 (*Nicotiana velutina*) 上分离得到的一种植物病毒^[1]。Randles 等^[1]发现 VTMoV 病毒衣壳内含有两种 RNA 分子, RNA1 的分子量为 1.5×10^6 , 称谓类似病毒 RNA (Virus-like RNA), 是一种单链线性 RNA 分子; RNA2 的分子量为 0.12×10^6 , 称谓类似类病毒 RNA (Viroidlike RNA) 或者称谓拟病毒 RNA, RNA2 是一种单链环状分子, 它的某些理化性质和二级结构与类病毒相似^[2,3]。Gould 等人证实了在 VTMoV 中的两种 RNA 分子对病毒的侵染和复制都是必需的^[4], 说明 RNA1 和 RNA2 在功能上是相互依赖的, 同时也表明拟病毒 RNA 与类病毒在生物学功能上

存在差异。为了进一步研究拟病毒 RNA 的本质, 很有必要去建立一种适宜病毒增殖的细胞体系。我们选择了克里夫兰烟草的叶肉原生质体来作为 VTMoV 侵染和增殖的细胞体系, 为研究 VTMoV 的增殖特征以及拟病毒 RNA 的复制机制等提供了良好的细胞模型。

材料和方 法

(一) 病毒及其提纯

VTMoV 为澳大利亚 Francki 博士所赠送。病毒在生长于温室里的克里夫兰烟草上繁殖, 接种

本文于 1984 年 11 月 14 日收到。

后约一个月收获发病植株,按照 Randles 等人所介绍的方法提纯病毒^[1]。病毒制备物用 3% 醋酸铀负染后,在电子显微镜下观察病毒粒子(图 1)。

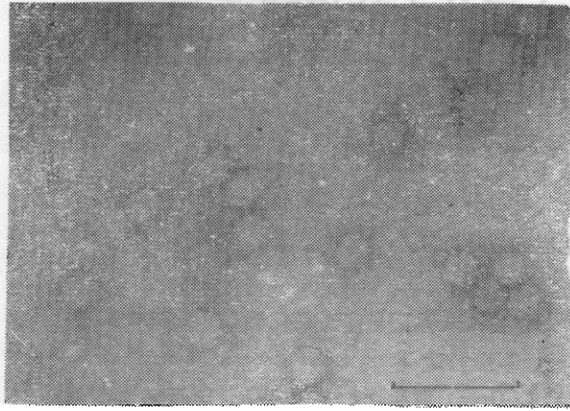


图 1 用 3% 醋酸铀负染的 VTMoV 电镜照片
(标尺代表 100nm)

Fig. 1 Electron micrograph of VTMoV negatively stained with 3% uranyl acetate (Bar represents 100nm)

(二) 原生质体的制备、接种和培养

采取生长在防虫温室室内 1—2 个月的克里夫兰烟草叶片,蒸馏水冲洗,75% 酒精消毒,稍萎蔫后,用镊子撕去叶片下表皮。然后按一步法^[5,6]将去皮叶片浸泡在 0.4% 果胶酶 (R-10, 日本产) 和 1.2—1.4% 纤维素酶 (R-10, 日本产) 的混合酶液中 (含 0.7M 甘露醇, pH5.6), 25℃ 保温 12—14 小时后,经双层尼龙纱 (80 目) 过滤,滤液 30×g 离心 3 分钟,沉降下来的原生质体再用 0.7M 甘露醇洗三次,原生质体最后悬浮在 0.7M 甘露醇液中,供接种用。原生质体的活性可用 0.1% 酚番红染色检查^[7]。

经过预备实验,确定了原生质体最适接种条件是: 接种液为 0.02M 柠檬酸钾缓冲液,含有 4μg/ml L-聚鸟氨酸 (PLO)、16μg/ml VTMoV 和 0.7M 甘露醇, pH5.0。混合液在 25℃ 水浴预热 10 分钟后与等体积的原生质体制备物 (约 4×10⁵ 原生质体/ml) 混匀,然后在 25℃ 水浴保温 10 分钟。30×g 离心 3 分钟去接种液,沉降的原生质体用含 0.1mM 氯化钙的 0.7M 甘露醇液洗三次。最后将原生质体悬浮在液体培养基中,培养液为: 0.7M 甘露醇, 0.2mM 磷酸二氢钾, 1mM 硝酸钾, 0.1mM 硫酸镁, 10mM 氯化钙, 1mM 碘化钾,

0.01mM 硫酸铜, pH 5.6^[8]。加入制霉菌素和卡那霉素各 2.5 单位/ml 后,在 28℃ 及人工光照条件下培养。

(三) 用 ELISA 测定病毒量以及未标记免疫酶法检测原生质体感染率

1. 用 33% 饱和度的硫酸铵从抗 VTMoV 抗血清中提取抗体,按照马德芳等报道的方法提纯 IgG^[9]。

2. 采用过碘酸氧化法将辣根过氧化物酶 (HRP, RZ = 2.5—3, 中科院上海生化所) 与 IgG 联结,制备酶标抗体。

3. 用 ELISA 的双抗体夹心法^[9]定量测定从感染 VTMoV 后培养不同时间的原生质体体内提取的病毒,算出原生质体体内的病毒量,从而绘制出 VTMoV 在原生质体内增殖的一步生长曲线。

4. 先制备过氧化物酶—抗过氧化物酶可溶性复合物 (PAP)^[10], 用未标记免疫酶法染色原生质体,在光学显微镜下观察并计数,算出原生质体的感染率。

实验结果

(一) VTMoV 侵染克里夫兰烟叶肉原生质体的条件

1. 在 5μg/ml VTMoV 和 5μg/ml PLO 的固定条件下,分别用不同 pH 值的 0.01M 柠檬酸钾缓冲液接种原生质体,然后用 ELISA 测定原生质体吸附的病毒量,得到的结果见图 2。

从中可知接种液 pH 值愈低,原生质体吸附的病毒量愈多,考虑到低 pH 值的接种液对原生质体有损害作用以及该病毒的等电点为 pH4.7,我们认为 pH5.0 是接种液的最适 pH。

2. 当接种液 pH 值固定为 5.0,病毒浓度为 5μg/ml 时,用不同浓度的 PLO 接种原生质体后,测定原生质体吸附病毒量的结果如图 3 所示。

实验结果表明,在实验范围内 PLO 的浓度愈高,原生质体吸附病毒量亦愈多,由

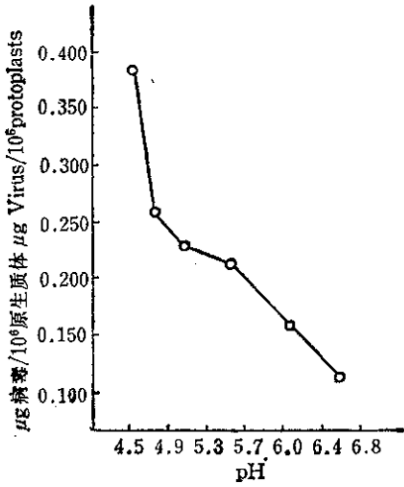


图2 接种液 pH 对克里夫兰烟原生质体吸附 VTMoV 量的影响

Fig. 2 Effect of pH of the inoculation medium on adsorption of VTMoV by *N. clevelandii* protoplasts

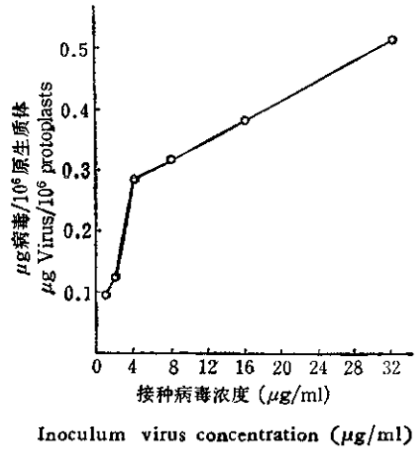


图4 接种液病毒浓度对克里夫兰烟原生质体吸附 VTMoV 量的影响

Fig. 4 Effect of inoculum virus concentration on the amounts of VTMoV absorbed by *N. clevelandii* protoplasts

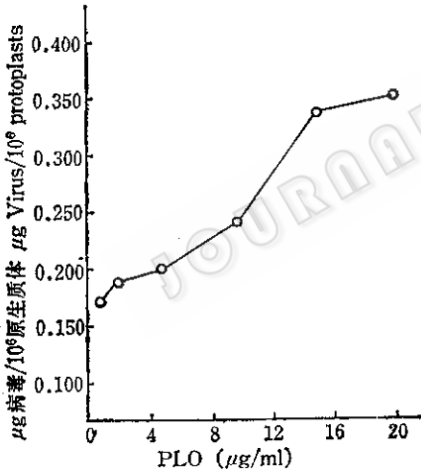


图3 接种液 PLO 浓度对克里夫兰烟原生质体吸附 VTMoV 量的影响

Fig. 3 Effect of PLO concentration on the numbers of VTMoV absorbed by *N. clevelandii* protoplasts

于高浓度的 PLO 对原生质体会产生毒害作用，我们选择 2 μg/ml PLO 为最适接种浓度。

3. 图 4 显示了在接种液 pH 值为 5.0, PLO 浓度为 2 μg/ml 的情况下，用不同浓度的病毒接种原生质体时，原生质体吸附

病毒量的情况。可以看出，当接种物浓度在 1—4 μg/ml 之间时，病毒吸附量随病毒接种量的增加而急剧增加；在 8 μg/ml 以上时，病毒吸附量增加较缓慢，我们选择的最适接种物浓度为 8 μg/ml。

4. 用 PAP 法染色并检测了在上述最适条件下接种后培养 48 小时的原生质体

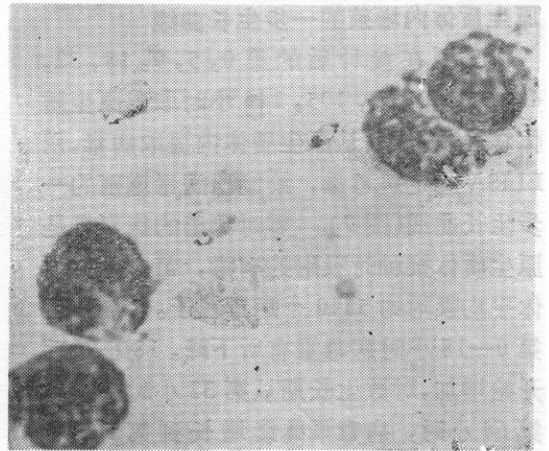


图5 用未标记免疫过氧化物酶法染色的感染 VTMoV 的克里夫兰烟原生质体 (×250)

Fig. 5 Micrograph of *N. clevelandii* infected protoplasts by VTMoV stained with unlabelled immunoperoxidase (×250)

的感染率。图 5 显示了染色后在光学显微镜下观察呈棕色的感病的原生质体。图 6 显示了未感病的原生质体。在我们的实验中有 46.7% 左右的原生质体有较明显的棕色区,说明原生质体的感染率约为 46.7%。

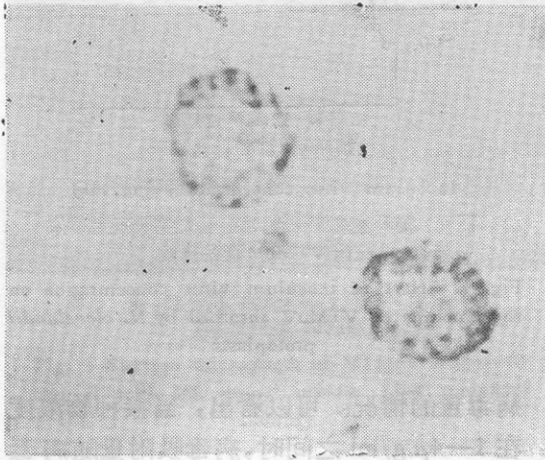


图 6 用未标记免疫过氧化物酶法染色的未感病的克里夫兰烟原生质体 ($\times 250$)

Fig. 6 Micrograph of *N. clevelandii* uninfected protoplasts stained with unlabelled immunoperoxidase ($\times 250$)

(二) VTMoV 在克里夫兰烟草叶肉原生质体内增殖的一步生长曲线

分别在接种后的第 0, 5, 9, 18, 32, 43, 55, 68, 79, 105, 144 小时取出原生质体培养物,然后从原生质体内提取病毒,用 ELISA 测定病毒量,绘制出病毒增殖的一步生长曲线(图 7)。零时测出的病毒量是原生质体接种时吸附的病毒,每个原生质体平均吸附约 5840 个病毒粒子。接种后第 0—18 小时病毒量有所下降,18 小时后开始增加,对数生长期从第 32 小时持续到第 68 小时,病毒量继续增长到第 105 小时,然后出现下降的趋势。根据原生质体感染率,病毒增长量以及病毒的分子量,计算出培养 105 小时后,每个感病的原生质体内的病毒粒子数约为 1.14×10^6 个。

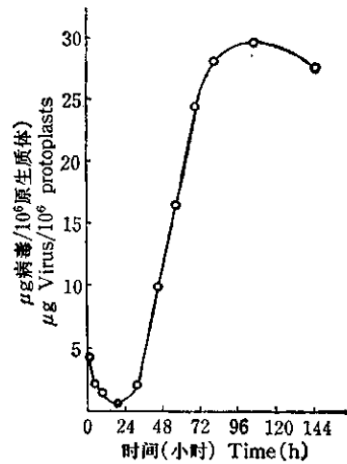


图 7 VTMoV 在克里夫兰烟原生质体内的一步生长曲线

Fig. 7 One-step growth course of VTMoV in *N. clevelandii* protoplasts

讨 论

病毒侵染原生质体时,原生质体的感染率与接种液中的病毒浓度在一定范围内成比例^[11],另外还与接种病毒的基因组份有一定的关系。多分段基因组的病毒如 BSMV、CCMV 和 BMV 在侵染原生质体时所需浓度 ($50-100 \mu\text{g/ml}$)^[10] 比单基因组份的病毒如 TMV 和 YMV₁₅ 的 ($1 \mu\text{g/ml}$)^[12] 要高得多。VTMoV 的基因组份是由病毒 RNA 和拟病毒 RNA 二者构成,侵染原生质体时也需要较高的浓度 ($8 \mu\text{g/ml}$)。这反映了多分段基因组病毒必须在各段基因组都存在的情况下才能侵染原生质体。

VTMoV 增殖的潜伏期 (18 小时) 比一般病毒如 TMV、YMV₁₅ 的 (6 小时)^[12] 要长得多。VTMoV 的对数生长期 (第 32—68 小时) 比一般病毒的 (第 6—12 小时) 要慢些,比类病毒如 CPFV 的 (第 48—72 小时) 要快^[13], 介于两者之间。但 VTMoV 的对数生长期维持时间 (36 小时) 比一般病毒和类病毒的都长。这可能是由于 VTMoV 的生长是由病毒 RNA 和拟病毒 RNA 的

复制共同构成的缘故。

烟类叶肉原生质体吸附 VTMoV 病毒粒子数 (5×10^3) 与吸附 TMV 的 (1×10^3)^[12] 相近。病毒产量也与一般病毒的产量大致相同, 在每个感病的原生质体中增殖的 VTMoV 病毒粒子数可达 1×10^6 个, TMV 病毒粒子数为 $0.5-9.3 \times 10^6$ 个, BSMV 达 2×10^6 , YMV₁₅ 的为 0.3×10^6 个。

参 考 文 献

[1] Randles, J. W. et al.: *Virology*, 108: 111—122, 1981.
 [2] Gould, A. R.: *Virology*, 108: 123—133, 1981.
 [3] Haseloff, J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 10:

(12) 3681—3691, 1982.
 [4] Gould, A. R. et al.: *Virology*, 110: 420—426, 1981.
 [5] Kassanis, B. et al.: *J. Gen. Virol.*, 24: 447—452, 1974.
 [6] Power, J. B. et al.: *J. Exp. Bot.*, 21: 64—70, 1970.
 [7] 中国科学院微生物研究所植物病毒组: 微生物学报, 17(4): 306—310, 1977.
 [8] 马德芳等: 微生物学报, 21, (1): 63—67, 1981.
 [9] Clark, M. F. et al.: *J. Gen. Virol.*, 34: 475—483, 1976.
 [10] 邱井生等: 微生物学报, 22 (4): 321—326, 1982.
 [11] Otsuki, Y.: *Virology*, 52: 433—438, 1973.
 [12] 田波等: 微生物学报, 16(3): 258—264, 1976.
 [13] Mühlbach, H. P. et al.: *J. Gen. Virol.*, 35: 377—386, 1977.

MULTIPLICATION OF VELVET TOBACCO MOTTLE VIRUS ENCAPSIDATED VIRUSOID RNA IN *N.* *CLEVELANDII* PROTOPLASTS

Wu Jianguo Lu Wenjun

(Department of Virology, Wuhan University, Wuhan)

Tian Bo Qiu Bingsheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Some optimum conditions for infection of *N. clevelandii* leaf protoplasts by velvet tobacco mottle virus (VTMoV) encapsidated virusoid RNA were described. The infected virus concentrations were estimated by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A protoplast cell system appropriated for the multiplication of VTMoV was established. The one-step growth course of virus multiplication in protoplasts was measured.

In our experiments, optimum conditions for infection of *N. clevelandii* protoplasts by VTMoV were 0.01 M potassium citrate buffer at pH 5.0 containing 0.7 M mannitol, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly-L-ornithine. Virus inoculum was performed with concentration of 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, at 25°C for 10 min. Under these conditions, every protoplast absorbed 5840 virus particles. Protoplasts were cultured at 25°C, under continuous light for 48 h, then stained with unlabelled im-

munoperoxidase. About 46.7% of protoplasts were infected.

The one-step growth course of VTMoV multiplication was measured by estimating the concentration of virus isolated from protoplasts in different cultivated times. The amounts of virus were dropped 0—18 hours after inoculation. Virus concentration increased at 18 hours. The logarithm growth phase after inoculation ranged from 32 hours to 68 hours. Virus increase might continue up to 105 hours, then virus concentration decreased. The average number of virus particles per infected protoplast was about 1.16×10^6 .

Key words

Virusoid: Velvet tobacco mottle virus; Protoplast