

## 小球藻病毒的分离\*

张远征 王苏燕 盛 刚 叶 寅 田 波

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

真核藻类作为一类重要的淡水和海洋水生生物与人类和环境有密切关系。在生态学上,藻类作为普通食物链中的原初生产者,在水环境中显得尤为重要,可作为许多水生生物的食物,也可使水域在一定范围内自净。藻类还极有希望成为人类新的食物来源和能源。但藻类的过量繁殖可引起严重的水污染。因此,搞清真核藻类与其寄生物—真核藻类病毒的关系,对维持藻类的生态平衡,控制利用藻类资源意义重大。对真核藻类病毒的深入研究已揭示出这类病毒在自然界的广泛存在。到目前为止,已报道发现的真核藻类病毒或病毒状颗粒(Virus-like particle)至少有 44 种<sup>[1]</sup>,但多数仅限于电镜观察。直到病毒裂解性小球藻的发现<sup>[2,3]</sup>,才使得对真核藻类病毒的研究提高到一个新水平,也使该领域的研究越来越受到人们的关注。国际上已开展真核藻类病毒研究的国家有美国、日本、德国等,我国在该领域的研究尚属空白。在国内开展真核藻类病毒的研究,首先要深入地调查我国的真核藻类病毒资源,同时可阐明一类新的病毒——寄主关系的分子生物学基础,了解诸如病毒基因组在寄主细胞中的表达调控,为研究高等植物基因的表达调控提供一个适宜的模型。另外,由于已知的真核藻类病毒具有相当大的基因组,可预见其基因产物的数目和功能具有多样性,例如病毒编码的甲基转移酶、限制性内切酶以及降解寄主细胞壁的几丁质酶等<sup>[1]</sup>。

我们实验室目前正在进行真核藻类病毒的研究,已建立了小球藻 NC64A 细胞培养体系,并分离得到了一株小球藻病毒,属于 Plycodnavirus 属<sup>[6]</sup>,称为 BJ-1 株。

## 1 材料和方法

## 1.1 小球藻 NC64A 细胞的培养

1.1.1 小球藻 NC64A 细胞: Van Etten 教授和夏远南博士(University of Nebraska, Lincoln)惠赠。

1.1.2 MBBM 培养液:在 Bold's basal medium 中加入 0.5%蔗糖和 0.1% Bacto-peptone(Difco.)。

MBBM 软琼脂:在 MBBM 培养液中加入 0.7%琼脂(汕头市水产品综合加工厂)。

MBBM 琼脂:在 MBBM 培养液中加入 1.4%琼脂。

1.1.3 培养条件:接种 NC64A 细胞于 MBBM 培养液中,于 25℃,连续光照、摇动(120r/min)培养。

## 1.2 空斑检测

1.2.1 水样处理:采集的水样,通过  $\Phi=0.45\mu\text{m}$  的微孔滤膜(上海医药工业研究院高东药用净化器材厂)过滤,取 100 $\mu\text{l}$  用于病毒空斑检测。

1.2.2 空斑检测:小球藻病毒通过 Van Etten 等的方法<sup>[7]</sup>进行检测。小球藻 NC64A 为寄主。100 $\mu\text{l}$  过滤水样与 200 $\mu\text{l}$  寄主细胞(细胞浓度为  $1\sim 2\times 10^8$  个/ml)混合后,加入到已熔化并冷却到 50℃ 的 MBBM 软琼脂中,混匀后倾倒入 MBBM 琼脂平板上。25℃ 光照培养,24h 后即可观察到空斑。

## 1.3 病毒的纯化

取单个空斑,接种于 2.5ml NC64A 细胞中(细胞浓度  $1\sim 2\times 10^7$  个/ml),培养 48h 后,扩大到 150ml NC64A 三角瓶中(细胞浓度为  $1\sim 2\times 10^7$  个/ml)。培养 72h 后,在 5000r/min,4℃,5min 离心,沉淀粗提病毒颗粒。再经 10%~40%(W/V)的蔗糖密度梯度离心(20000r/min,4℃,20min),取出病毒带(位于离心管 1/2~2/3 处的一条带淡蓝色荧光的白色条带),最后以 27000r/min,4℃,3h

\* 该项研究由国家自然科学基金资助。

本文于 1995 年 2 月 27 日收到。

离心, 沉淀纯化病毒颗粒。

#### 1.4 病毒颗粒的电镜观察

纯化病毒颗粒用 1% 醋酸双氧铀负染色, 用日立 H-500 型电子显微镜观察。

## 2 结果和讨论

NC64A 细胞接种于 MBBM 培养液中的初始细胞浓度为  $1 \sim 2 \times 10^6$  个/ml, 培养 72h 后, 浓度可达  $1 \sim 2 \times 10^7$  个/ml。用其它种类的 Peptone 替代 Bacto-peptone 对 NC64A 细胞生长无影响。

从北京采集的水样中, 分离得到 1 株小球藻病毒, 经过四次纯化得到纯病毒颗粒, 称为 BJ-1 株。培养 72h 后, 空斑的直径为 3mm (图版 I-1)。随着培养时间延长, 空斑逐渐变大。电镜观察表明, 该病毒为球形多面体结构, 直径为 150nm (图版 I-2), 属于 Phycodnaviridae 科, Phycodnavirus 属。

目前, 从世界各国分离到小球藻病毒均为球形多面体结构, 直径 125~200nm<sup>[8]</sup>。病毒形成的空斑可分为大空斑 ( $\Phi=6 \sim 10$ mm) 和小空斑 ( $\Phi=1 \sim 3$ ) (培养 72h)<sup>[1,8]</sup>。我们分离纯化到的小球藻病毒 BJ-1 株, 形态和其它小球藻病毒相似, 形成小型空斑。

随着研究的展开, 我们拟在我国的不同地区采集水样, 分离小球藻病毒, 对我国小球藻病毒资源进行广泛的调查, 在此基础上对病毒基因组的性质进行深入研究。

致谢 此项研究得到夏远南博士的大力帮助, 特此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] Van Etten J L, Lane L C, Meints R H. *Microbiol Rev*, 1991, **55**: 586~620.
- [2] Meints R H, Van Etten J L, Kuczmarski D *et al.* *Virology*, 1981, **113**: 698~703.
- [3] Van Etten J L, Meints R H, Kuczmarski D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79**: 3867~3871.
- [4] Wang I N, Li Y, Que Q D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 3840~3844.
- [5] Que Q D, Li Y, Wang I N *et al.* *Virology*, 1994, **203**: 320~327.
- [6] Van Etten J E, Ghabrial S A. *Arch Virol Suppl*, 1991, **2**: 137~139.
- [7] Van Etten J L, Burbank D E, Kuczmarski D *et al.* *Science*, 1982, **219**: 994~996.
- [8] Yamada T, Higashiyama T, Fukuda T. *Appl and Environ Microbiol*, 1991, **157**: 3433~3437.

## CHLORELLA VIRUS IS FIRST ISOLATED IN CHINA

Zhang Yuanzheng Wang Suyan Sheng Gang Yie Yin Tian Bo \*

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** By using a plaque assay with the unicellular green alga chlorella sp. strain NC64A as a host, one strain of chlorella virus (BJ-1) has been isolated. The diameter of this virus plaque is about 3mm (incubated at 3 days). Electron microscopy revealed that the purified and negatively stained virus was very large ( $\Phi=150$ nm) icosahedral particle. BJ-1 belongs Phycodnaviridae Phycodnavirus.

**Key word** Chlorella virus

## 图版说明

1. BJ-1 株分离物与 NC64A 共培养 72h 后形成的空斑 ( $\Phi=3$ mm); 2. 分离纯化的 BJ-1 病毒颗粒 (负染色 30000 $\times$ ).

\* Tien Po