

番木瓜环斑病毒检测新技术的建立及其在 病毒——原生质体体系探索中的初步应用*

ESTABLISHMENT OF NEW TECHNIQUES FOR THE DETECTION OF
PAPAYA RINGSPOT VIRUS AND THEIR PRELIMINARY APPLICATION
TO THE EXPLORATION OF THE VIRUS—PROTOPLAST SYSTEM

陈枝楠 郑冠标 张春霞 田波

林孔勋 范怀忠

Chen Zhinan Zheng Guanbiao Zhang Chunxia Tian Bo

Lin KungHsun Faan Hweichung

(植物病毒研究室) (中国科学院微生物所)

(Plant Virus Disease Laboratory) (Institute of Microbiology. Academia Sinica)

关键词 番木瓜环斑病毒; 间接斑点 ELISA; cDNA 分子探针; 病毒—原生质体体系; 单细胞侵染模型

Key Words Papaya Ringspot Virus; Indirect Dot —ELISA; cDNA Molecular probe; Virus—Protoplast System; Model of Single—Cell Infection;

为了有助于全面了解和评价番木瓜完整植株对番木瓜环斑病毒 (PRV) 的抗、感病性机制, 建立单细胞侵染模型是一个重要途径。本研究首次建立了 PRV—番木瓜原生质体实验体系; 建立了检测 PRV 的间接 Dot—ELISA 和检测 PRV—RNA 的 cDNA 分子探针的方法和技术, 并利用这 2 个检测技术对 PRV 在番木瓜原生质体中的行为动态进行了初步探索。

1 番木瓜原生质体的分离和纯化

番木瓜两个栽培品种 (寄主植物: *Carica papaya* var. F1 和 *C. papaya* var. Tw—5) 和一个野生种 (非寄主植物: *C. stipulata*) 分别对 PRV 的侵染表现为高感、耐病和免疫。番木瓜原生质体的分离采用一步酶法。最佳分离条件为: 1. 0% Macerozyme R—10, 1. 5% Cellulase Onozuka R—10, 0. 45 M 甘露醇和 pH5. 4 的培养基酸碱度。初步分离的原生质体进一步经 20% Percoll 离心 (100xg, 5 min) 后, 得到了纯化的、浓度调节为 1×10^6 个原生质体/ml 的原生质体悬浮液, 供接种用。

2 PRV, PRV—RNA 的初提纯和精提纯

PRV—Ys、PRV—Vb、PRV—Sm 和 PRV—Lc 等分别为 PRV 的 4 个典型分离物。在接

* 国家教委科学基金资助项目。

1990—12—11 收稿

种到繁殖寄主西葫芦 (*Cucurbita pepo*) 后, 按照本研究修改制定的提纯程序提取病毒。粗提纯物经 20—40% 的非连续蔗糖密度梯度离心 (90000 xg, 2 hrs) 后, 用 ISCOUA-5 型密度梯度仪收集 PRV 病毒带, 即得到了精提纯的 PRV。PRV-RNA 的提取采用常规酚/氯仿法。所得到的 PRV-RNA 分子长度主要分布在 3.8—9.5Kbp 范围内, 其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.9—2.1。

3 原生质体的接种及其处理

PRV-Ys 和聚鸟氨酸 (PLO, MW200000) 各以 1 μg/ml 的最终浓度分别接种上述 3 个品种 (种) 的原生质体 (最终浓度为 5 × 10⁵ 个原生质体/ml)。接种后的原生质体分成 2 组进行处理, 其一是 3 品种 (种) 的原生质体在 28°C 下进行恒温培养, 并分别在培养 0, 8, 12, 24, 48, 72 和 96 h 后取样。另一组处理是 var. F1 的原生质体分别在 10, 22, 28, 35 和 40°C 下进行培养。取样方法同上。

4 间接 Dot-ELISA 的建立

本方法是在 5 cm × 3 cm 大小的硝酸纤维素膜 (NCM) 上直接点样。整个过程在 37°C 恒温箱中进行, 所需时间只要 2~3 h。PRV-Ys 免抗血清 IgG 的提取采用饱和硫酸铵沉淀 γ-球蛋白和 DEAE 纤维素柱层析分离纯化 IgG 的方法。在确定了 IgG 的工作浓度为 1:100 倍稀释度后, 用提纯的 PRV 4 个分离物作抗原、辣根过氧化物酶标记的 A 蛋白 (SPA-HPR) 作酶标结合物 (1:40 工作浓度), 以 3% 酪蛋白作为封闭剂和以 3', 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 作为显色底物, 所测得的最低可检测量分别约为 10 ng/斑 (检测灵敏度)。

5 PRV-Ys RNA cDNA 分子探针的建立

以 Oligo(dT) 12—18 作为 ssDNA 合成引物, 以 AMV-逆转录酶系统合成 ssDNA。再以 *Escherichia coli* R-hase H., DNA 聚合酶 I 和 T4-DNA 连接酶参与合成的方法合成 dsDNA, 经两端补平后再与经 Sma I 消化处理后的 PUC19 载体进行平头连接 (重组)。重组质粒转化受体细菌 *E. coli* JM 107 后, 参照 Maniatis 和 Berger 等的原位分子杂交等方法进行阳性克隆筛选, 筛选出 1 个编号为 pYs6 的重组质粒, 作为 cDNA 分子探针。经过 EcoRI/pst I 双酶切后, 测得其插入片段约为 300 bp。

采用缺口翻译方法制备 pYs6 cDNA 分子探针 (Amersham Kit), 以提纯的 PRV 4 个分离物的 RNA 点样 NCM, 杂交后放射自显影结果显示其检测灵敏度都约为 20 pg/斑。

6 两个检测技术的初步应用

检测结果表明, pYs6 cDNA 分子探针远比间接 Dot-ELISA 法灵敏、准确。用间接 Dot-ELISA 检测的结果表明, 3 个品种 (种) 的原生质体都是在接种后培养 (28°C) 48 h 才能检测到 PRV 的存在。而用 pYs6 cDNA 分子探针检测的, 则都在接种后 (培养一开始时) 就可检测到 PRV-RNA 的存在, 并且其病毒的增殖量随着时间的延长而增加。同时, 这一结果还说明, PRV-Ys 不仅能在所选用的寄主番木瓜品种的原生质体中进行

增殖，而且也能在非寄主 *C. stipulata* 的原生质体中进行增殖。

检测结果还发现，培养温度对 PRV 病毒在原生质体内的增殖有明显的影响。用间接 Dot-ELISA 检测 var. F1 品种原生质体的结果表明，在 10℃ 培养下的原生质体中，在 96 h 内都检测不到有任何 PRV 颗粒；在 22℃ 下的，在 48 h 后可检测到；而在 28℃ 下的，则在 24 h 后就可检测到；在另外两个温度（35℃、40℃）下的，则分别在 72 和 96 h 后才检测到。由此说明了 28℃ 是 PRV 在原生质体中增殖的最适温度。这表明，低温培养对细胞中 PRV 增殖的影响要比高温的影响明显。用高度灵敏的 pYs6 cDNA 分子探针检测在 10℃ 培养下的原生质体；只在 0, 24 和 48 h 时才检测到 PRV-RNA 的存在；而检测在其它 4 个温度（22, 28, 35 和 40℃）培养下的原生质体，则都在接种开始后就可检测到 PRV RNA 的存在。这一结果又补充说明了上述低温影响的结果。这也就是为什么在自然界的罹病番木瓜植株、其症状随环境温度变化而变化等现象在细胞学和分子生物学水平上的原因。低温（约 20℃ 下）不仅严重抑制了 PRV 在细胞内的增殖，而且更严重地影响了番木瓜的抗病能力，因而番木瓜叶片显示严重“鸡爪形”症状；适宜的温度（约 28℃）虽有利于植株的生长，但更有利于 PRV 在细胞内大量的快速增殖，因而植株表现典型的花叶和环斑症状。高温（约 35℃ 以上）虽不太影响番木瓜植株旺盛生长，却严重影响 PRV 细胞内的增殖，因而病株的症状减轻或隐症。

小结：本研究所建立的间接 Dot-ELISA 和 cDNA 分子探针不仅其灵敏度分别达到了理想的 ng 和 pg 水平，而且还初步成功地应用于 PRV—番木瓜原生质体体系中的 PRV 行为动态的探索性研究。