

固相分子杂交技术在植物病毒鉴定和分类研究中的应用

安德荣 魏宁生

R. Koenig

(西北农业大学植保系, 陕西杨陵)

(联邦德国生物研究中心)

提 要

在用斑点杂交试验对属于 10 个病毒组的 44 个不同病毒进行鉴定和分类研究中观察到, 杂交现象不仅出现在同源病毒之间, 也同样出现在相同病毒组或不同病毒组的异源病毒之间。定量的斑点杂交试验对仅有轻微血清学区别的病毒很敏感。在避免竞争和饱和现象对实验结果影响的情况下, 检测了番茄丛矮病毒组五个病毒的 RNA 之间的同源性程度, 结果表明, 这五种病毒之间的同源性程度与 Koenig 和 Gibbs 所做的血清学结果相近。

前 言

近几年, 核酸分子杂交技术日趋完善, 以不同材料为支持物的固相分子杂交技术取得了更为迅速的发展^[1]。斑点杂交 (Dot Blot Hybridization) 和吸印杂交 (Northern and Southern Blot Hybridization) 技术都属于将病毒的核酸固定在硝酸纤维素膜上, 用 ³²P 标记的互补 DNA (³²P-cDNA) 做探针的固相杂交技术。这一技术显示了对植物病毒进行鉴定和分类研究的潜在能力^[2]。在通过用反转录酶合成的 cDNA 对属于 10 个病毒组的 44 个不同病毒进行研究中, 观察到一些实验参数对结果有影响。本文也报道了用血清学技术尚不能鉴别的 APLV-caj、APLV-coll 及 TObV、ARTV 可以用斑点杂交技术进行鉴别。有关番茄丛矮病毒组分类问题的讨论由来已久, 而且至今尚未结束。虽然通过血清学方法可以将各个成员区别开来, 但它们之间的血清学关系却很复杂, 各个病毒之间的亲缘关系尚不清楚。本文也报道了用斑点杂交技术对番茄丛矮病毒组的五个病毒 RNA 之间的同源性程度的研究结果。

材 料 和 方 法

1. 病毒的种类和硝酸纤维素膜斑点的制备

下列病毒的提纯物均由联邦德国生物研究中心病毒所提供。

(1) 芜菁黄色花叶病毒组 (Tymoviruses): 安第期马铃薯潜病毒的 Coll 株系 (APLV-coll, H1*)、Hu 株系 (APLV-Hu, H5) 和 caj 株系 (APLV-caj), 颠茄斑驳病毒 (BelMV, A2), 山马蝗植物黄斑病毒 (DYMV, B1), 可可黄花叶病毒 (CoYMV, B3), 糖芥属植物潜病毒 (ELV, B5), 茄花叶病毒 (EMV, A1), 肯尼迪黄花叶病毒 (KYMV, B2), Okr 花叶病毒 (OkMV, A7), Poinsettia 花叶病毒 (PoimV, B6), 玄参属斑驳病毒的典型标本株系和 Anagyris 株系 (ScRMV-Type, A4, ScRMV-Anagyris, A3), 芜菁黄色花叶病毒 (TYMV, A6) 和野黄瓜花叶病毒 (WCuMV, A5)。

(2) 番茄丛矮病毒组 (Tombusviruses): 菊芋斑驳病毒 (AMCV, H4), 荷兰石竹意大利

* H1 表示该病毒在图 1、2 中的排列位置, 以下均类。

利环斑病毒 (CIRV, C5), 建兰属植物环斑病毒 (CyRSV, C7), 摩洛哥辣椒病毒 (MPV, C4), 矮牵牛星状花叶病毒 (PAMV, H2), 天竺属植物叶卷病毒 (PLCV, C3), 番茄丛矮病毒的典型株系和 BS3 株系 (TBSV-Type, Cl. TBSV-BS3, C2)。

(3) 石竹斑驳病毒组 (Carmoviruses): 石竹斑驳病毒 (CarMV, E2), 黄瓜土传病毒 (CSBV, E4), 天竺花碎病毒 (PFBV, E5) 和芜菁皱叶病毒 (TCV, E5)。

(4) 荷兰石竹环斑病毒组 (Dianthoviruses): 荷兰石竹环斑病毒 (CarRSV, E1 G2)。

(5) 豇豆花叶病毒组 (Comoviruses): 安第期马铃薯斑驳病毒 (APMV, G3)。

(6) 雀麦花叶病毒组 Bromoviruses: 雀麦花叶病毒 (BrMV, G1)。

(7) 烟草花叶病毒组 Tobamoviruses: 河流烟草花叶病毒 (ARTV, D3, R. Koenig 待发表), 黄瓜绿斑驳花叶病毒 (CGMMV, D5), Maracuja 花叶病毒 (MMV, D6), 齿兰环斑病毒 (ORV, D2), 辣椒轻花叶病毒 (PMMV, D7), Sieg 河流烟草花叶病毒 (SRTV, D1, R. Koenig 待发表), Ob 烟草花叶病毒 (TObV), 烟草退绿斑驳病毒 (TCMV, D4) 和烟草花叶病毒 (TMV, H3)。

(8) 甜菜坏死黄脉病毒组 (Furoviruses): 甜菜坏死黄脉病毒 (BNYVV, F6) 和 Wiv 分离物 (BNYVV-Wiv, F7, 未鉴定)。

(9) 马铃薯X病毒组 (Potexviruses): 马铃薯X病毒 (PVX, F1) 和仙人掌属X病毒 (CaVX, F2)。

(10) 荷兰石竹潜病毒 (Carlaviruses): 菊属植物B病毒 (CVB, F3)。

将上述各病毒的提纯物 (10 μ g) 点样到预先用 20 $\times$ SSC 溶液 (标准柠檬酸盐水) 处理过的硝酸纤维素膜上, 在 80 $^{\circ}$ C 下真空干燥两小时。

2. 核酸的制备、电泳分离和吸印转移

将提纯的 BrMV、APLV-caj、APLV-coll、BNYVV、ScrMV、TMV、SRTV、CoYMV、

CarMV、TObV、AMCV、PAMV、PLCV、EMCV 和 CybRSV 的各个病毒粒子制剂, 分别用两相酚-SDS 法抽提病毒核酸。病毒核酸的进一步纯化采用蔗糖密度梯度离心 (36,000r/min, 16hr), 收集 RNA 带, 加二倍冰冷乙醇沉淀 RNA, 沉淀悬浮在蒸馏水中备用。将各提纯的 APLV-coll、ScrMV、CoYMV、TMV、PAMV、BNYVV、PAMV 和 CarMV 的病毒 RNA (10 μ g) 在含 60% 甲酰胺的 1.25% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 电泳缓冲液为 0.04mol/L Tris-醋酸及 0.005mol/L 醋酸钠溶液, pH7.8, 电泳条件为 6V/cm。使各个病毒 RNA 的多组分核酸分离开来。电泳后, 凝胶上的各 RNA 带在 20 $\times$ SSC 溶液介质中通过滤纸吸附转移到预先用 20 $\times$ SSC 处理后的硝酸纤维素膜上^[3], 吸印过夜, 取出硝酸纤维素膜, 80 $^{\circ}$ C 真空干燥 2 小时。

3. 32 P 标记的 cDNA 制备

(1) 反转录酶法制备 32 P-cDNA: 按照 Taylor^[4] 的方法分别制备 BrMV、APLV-Hu、BNYVV、AMCV、PAMV、PLCV、FMCV 和 CybRSV 病毒 RNA 的 cDNA。取 0.5 μ g 做为模板的各 RNA 样品和试剂按以下顺序分别加入灭菌的 1.5ml 离心管内: 5 μ l 随机引物、1.25 μ l 随机引物缓冲液 (100mmol/l MgCl₂、50mmol/L KCl、100mmol/L DTT、40mmol/L Na₂P₂O₇)、0.2 μ l RNA 酶抑制剂 (7.5 个单位), 1 μ l 反应底物 (20mmol/L dATP、dGTP、dTTP 和 1.6 mmol/L dCTP)、1 μ l α - 32 P-dCTP (10 μ ci/ μ l), 最后加入 0.5 μ l 禽类白血病毒反转录酶, 在 37 $^{\circ}$ C 下保温 90 分钟, 加 6.5 μ l 1mol/L NaOH 终止反应并水解模板 RNA (60 $^{\circ}$ C, 保温 60 分钟), 然后加入相应的 HCl 使反应液呈中性, 用 Sephadex G50 柱收集标记的 cDNA。

(2) 缺口翻译 (Nick Translation) 制备克隆化的 cDNA: 取 0.5 μ g 含有克隆化 BNYVV-RNAs 的细菌质粒 (pBR322), 加入 200 μ mol/L 的 dATP、dGTP、dTTP, 50 μ Ci α - 32 P-dCTP 及 1 μ l DNA 聚合酶 I 和 DNA 酶混合物, 总体积为 10 μ l。在 15 $^{\circ}$ C 水浴中保温

90 分钟, 然后加 $1\mu\text{l}$ 反应终止缓冲液终止反应。用 Sephadex G50 柱收集标记的 cDNA。

4. 斑点杂交和吸印杂交

为了减少 cDNA 在膜上非杂交性吸附, 杂交前, 将上述各处理后的硝酸纤维素膜放入含有 50% 甲酰胺、 $5\times\text{SSC}$ 、0.02% BSA、0.02% Ficoll、0.02% 聚乙烯吡咯烷酮、50mmol/L Na_3PO_4 缓冲液 pH6.5 及 $250\mu\text{g}/\text{ml}$ 变性鲑鱼精子 DNA 的预杂交缓冲液中进行预杂交 (42°C 、保温 3 小时)。分别在预杂交缓冲液中加入 1/10 体积的各个变性的 ^{32}P -cDNA 组成杂交缓冲液, 和相应预杂交后的膜进行 cDNA 分子杂交 (42°C 、保温 18 小时)。

5. 杂交后的漂洗和检测

分别用含有 0.1% SDS 的 $2\times\text{SSC}$ 和 $0.1\times\text{SSC}$ 缓冲液在室温下将膜漂洗 20 分钟及在 50°C 下漂洗 30 分钟。将膜烘干 (40°C 、30 分钟), 用放射性自显影法和液闪计数器检测。

结 果

1. 定性检测

为了探明 cDNA 斑点杂交技术能否用来对病毒进行鉴定和分类研究, 和进一步研究一些新近发现的病毒特点, 我们将提纯的属于 10 个病毒组的 44 个不同病毒进行不同 cDNA 的杂交试验。结果如图 1、2 所示, 无论是用克隆

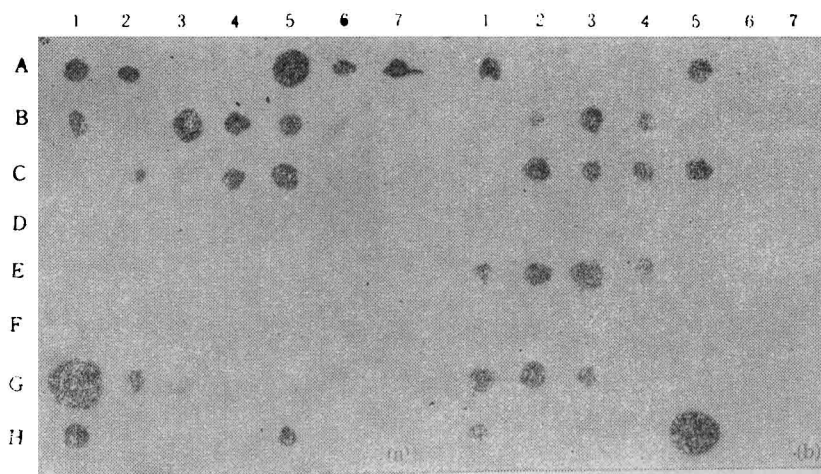


图 1 ERMV (图 1a) 和 APLV-Hu (图 1b) 的 cDNA 和 44 个不同病毒的斑点杂交结果
BrMV 和 APLV-Hu 在图 1a、1b 中的位置分别是 G1、H5

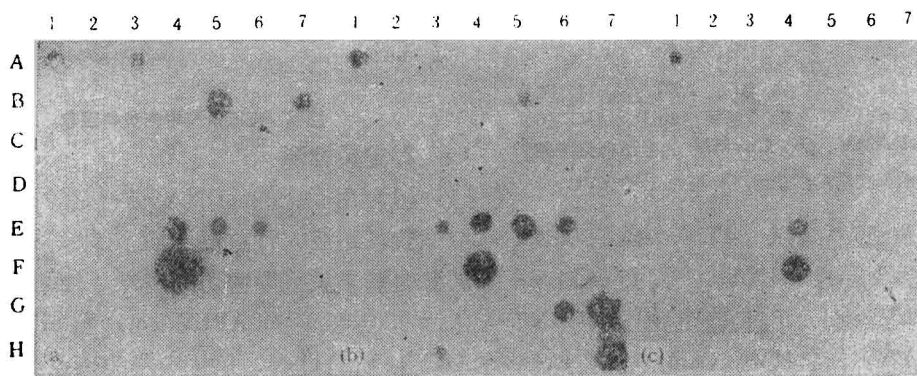


图 2 克隆化的 BNYVV 的 cDNA 和 44 个不同病毒的斑点杂交结果

图 2a、2b 分别表示杂交后的漂洗温度为 50°C 、 65°C ; 图 2c 表示在缺少 50% 甲酰胺的杂交缓冲液中的杂交结果

化的 BNYVV-RNAs 的 cDNA 还是用没有克隆化的 APLV-coll、BrMV 和 BNYVV-RNAs 的 cDNA 进行杂交,除可看到 cDNA 和同源性病毒之间有明显的杂交反应外,还可看到和其它病毒(包括相同病毒组内或不同病毒组内)也有杂交现象。当我们将杂交后的漂洗温度提高至 65℃ 时(图 2b)或在缺少 50% 甲酰胺的杂交缓冲液的情况下,将杂交温度提高到 68℃ 时,异源性的杂交反应变微弱,但不能完全消除。在用 S1 核酸酶处理膜或在杂交缓冲液中加入肝素的条件下,也可使异源性杂交反应变弱。

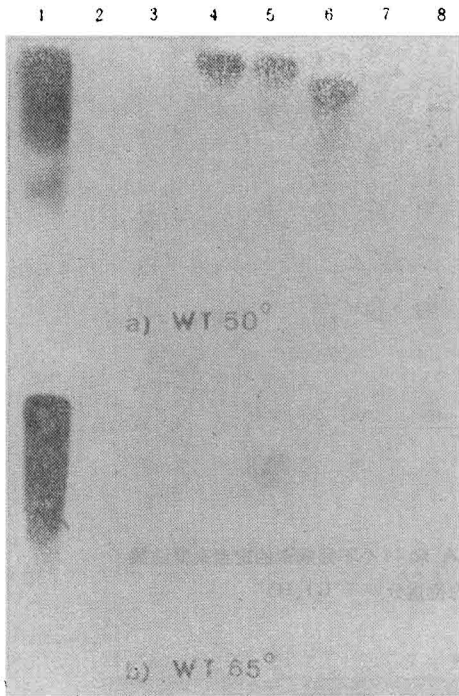


图 3 APLV-Hu 的 cDNA 和(1) APLV-coll、(2) SerMV、(3) CoYMV、(4) TMV、(5) PAMV、(6) BNYVV、(7) PAMV、(8) CarMV 的吸印杂交结果
图 3a、3b 表示杂交后的漂洗温度分别为 50℃、65℃。

在吸印杂交中,用以 APLV-Hu 的 RNA 为模板反转录合成的 cDNA,来测定 APLV-Hu 和 APLV-coll 及其它组病毒 TMV、PMMV、BNYVV、PAMV、CarMV 的 RNA 之间同源性关系。当杂交后的漂洗温度为 50℃ 时,也出现异源杂交现象(图 3a)。但将漂洗温度提高至 60℃ 时,cDNA 仅和血清学关系密

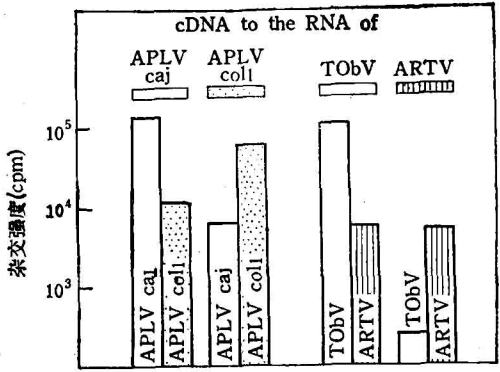


图 4 用斑点杂交试验对血清学技术尚不能鉴定的 APLV-caj、APLV-coll 和 TOBv、ARTV 的鉴别结果

切的 APLV-coll-RNA 有杂交现象,而和其它组病毒的 RNA 之间没有杂交现象。

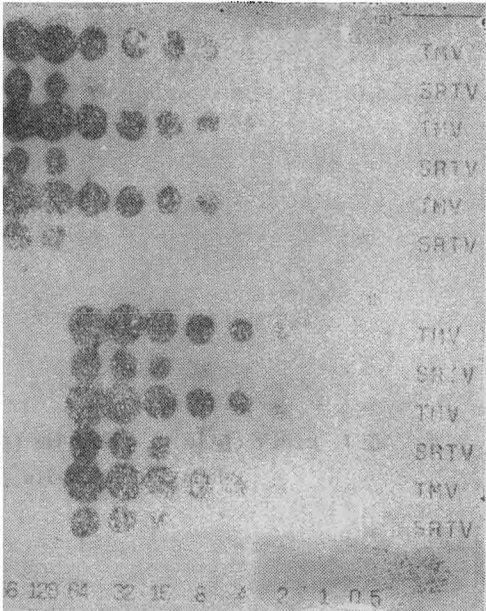


图 5 斑点杂交中的竞争现象

2. 定量检测

(1) 用标记的 cDNA 进行定量的斑点杂交试验,用液闪计数器测定结果,可以用来区分血清学关系很密切的病毒。用血清学技术尚不能鉴别的 APLV-coll 和 APLV-Hu、ARTV 和 TOBv,采用定量的斑点杂交技术都可进行明显的区分(图 4)。

(2) 用有明显的血清学区别的病毒 RNA 进行 cDNA 杂交比较试验,观察到测定的

RNA 同源性结果受以下几个参数的影响。(a) 竞争现象: 在有一定量 (9.8×10^5 cpm/每块膜)cDNA 的条件下,同源 RNA 和异源 RNA 在杂交反应中存在有竞争现象(图 5)。图 5a 表示每个斑点的 RNA 含量从 256ng 开始稀释至 0.5ng, 图 5b 表示每个斑点的 RNA 含量从 64ng 开始稀释至 0.5ng, 两块硝酸纤维素膜中均加入等量的 TMV-RNA 的 cDNA。图 5a 中, 同源 RNA, 特别是高浓度 RNA 斑点对 cDNA 有强烈的杂交吸附作用, 使溶液中 cDNA 量明显减少, 因此 cDNA 探针仅能检

测出高浓度 (256、128、64ng) 的同源和异源 RNA。在图 5b 中, 竞争现象明显减少, 在低浓度下 (64、32、16、8ng) 同源 RNA 和异源 RNA 都可被检测出来。(b) 饱和效应: 为了避免竞争现象, 将每个 RNA 浓度点样到分离的硝酸纤维素膜小块上 (1cm²), 每个小块加入等量的 cDNA, 在分离的小容器中进行杂交反应, 结果如图 6 所示。在这一条件下, 硝酸纤维素膜小块上的同源或异源 RNA 不会因为对 cDNA 有明显的杂交吸附作用而影响相邻斑点的低浓度 RNA 杂交反应。但如果硝酸纤维素膜小块上有过高的 RNA 浓度, 则会出现饱和现象, 即在 RNA 高浓度下, 同源和异源 RNA 都有较强的杂交反应。如图 6 所示, 为了避免 RNA 的饱和现象, 对不同浓度的 RNA 进行一系列杂交试验, 证明在 12ng 的 RNA 浓度下, 可以进行定量斑点杂交试验。

(3) 在避免上述参数的影响下, 用定量斑点杂交试验检测了番茄丛矮病毒组五个病毒 RNA 之间的同源性程度。取 10ng 的 RNA 样品点样到处理后的硝酸纤维素膜小块上, 杂交后的漂洗温度由 50℃ 升高到 65℃。结果表明(表 1), 这五种病毒之间的同源性程度(百分比)和血清学测定的结果(血清学鉴别指数)基本一致^[3]。

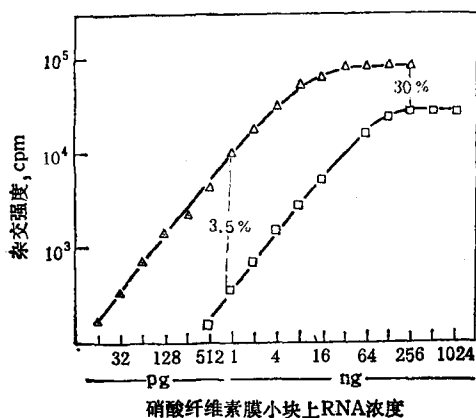


图 6 斑点杂交中的饱和效应

△TMV RNA, □SRTV RNA, 3.5% 和 30% 表示不同 RNA 浓度下 SRTV 和 TMV 之间的同源性百分比

表 1 cDNA 分子杂交法测定的同源性百分比和血清学鉴别指数的比较

病毒 RNA	AMCV/ PAMV	AMCV/ PLCV	PAMV/ PLCV	AMCV/ EMCV	PAMV/ EMCV	PLCV/ AMCV	CyRSV/ PAMV	CyRSV/ EMCV	CyRSV/ AMCV	CyRSV/ PLCV
同源性百分比(%)	24	25	17	12	12	10	5	5	5	4
血清学鉴别指数	1	2	2	5	3	5	>9	>9	>9	>9

* 血清学鉴别指数愈大, 表示病毒之间的亲缘性关系愈低, 大于 9 时, 表示没有血清学关系。

讨 论

据本文的实验结果, 固相分子杂交技术可直接用来鉴别植物病毒, 特别是亲缘关系很近的病毒, 而且可以用来分析病毒之间核酸的同源性及各组分基因病毒的各基因组之间的关系。用 cDNA 做探针的固相杂交技术来测定不同病毒之间核苷酸序列的同源性并进而对病毒进行分类, 是理想的, 也是可行的。

参 考 文 献

- [1] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning; a Laboratory Manual*, Gold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [2] Maule, A. J. et al.: *J. Virol. Methods*, 1983, 6, 215.
- [3] Thomas, P. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, 5201.
- [4] Taylor, J. H. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1976, 442, 324.
- [5] Gallitelli, D. et al.: *J. Gen. Virol.*, 1985, 66, 1523.

[本文于 1987 年 11 月 30 日收到]