柑桔裂皮类病毒和菊花矮化类病毒互补DNA探针的合成及检测

张奇亚 刘 勇 杨 平 林木兰
翁兆葵 糜克永 卓中琪 丁达明
(中国科学院武汉病毒研究所，武汉)

杨希才 陈 炜 田 波
(中国科学院微生物研究所，北京)

提 要

分别用人工合成的柑桔裂皮类病毒和菊花矮化类病毒的互补DNA探针，经固相分子杂交(dot blot)检测了柑桔、菊花等样品。结果表明：与生物学检测和聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析相比，这是早期诊断类病毒病和检测类病毒的一种较为灵敏、快速的方法。

人们把柑桔裂皮病，速衰病和黄龙病称为我国柑桔的三大病害。近年来，我国一些主要柑桔产区都发现了裂皮病。而脐橙类、卡特林娜甜橙和尤力克柠檬等许多优良品种发病尤为严重[1]。据调查，裂皮病已使局部地区柑桔明显减产，特别是潜伏感染现象极为普遍。因此该病对柑桔生产已造成严重威胁。

裂皮病病原是类病毒。它在寄主组织中含量极低，又有潜伏期长，多呈隐性感染等特点[2,3]。这些生物学性质给常规的生物学检测和聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析带来困难。1978年以来，Owens等人曾用液相分子杂交的方法对某些类病毒进行了检测[4]。1981年又把类病毒分子克隆和固相分子杂交技术成功地用于马铃薯纺锤形块茎类病毒(PSTV)的检测[5]，特别是在人们对12种类病毒中的9种作过序列比较之后，发现彼此间存在着不同程度的序列同源性[6]，为分子杂交技术在类病毒研究中广泛应用提供了重要依据。

国内也已开展了对类病毒的研究。在分离到PSTV，菊花矮化类病毒(CSV)，柑桔裂皮类病毒(CEV)，菊花褪绿斑驳类病毒(ChCMV)和牛蒡矮化类病毒(BSV)等类病毒[7,8,9,10]的同时，正努力研试灵敏可靠，重复性强，效率更高的类病毒检测技术。1983年以来，我们分别用CEV-RNA和CSV-RNA作模板，以Oligo$(dT)_{8\sim12}$为引

本工作承蒙澳大利亚学者J. Hzseloff和湖南省园艺所、农科院柑桔所等单位提供样品一并致谢
本稿1985年9月16日收到

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

物，逆转录合成相应的^{32}P标记的互补DNA(^{32}P-cDNA)探针，并在硝酸纤维素膜上与不同待检样品进行点杂交(dot blot)均取得良好结果。在我国首次建立了人工合成类病毒^{32}P-cDNA探针技术。这一技术的建立对类病毒检测，类病毒病的早期诊断，类病毒的结构与功能的研究会起到有力的推动作用。

材料与方法

一. 材料

碱性磷酸单酯酶，逆转录酶，Oligo $(dT)_{8-12}$ 均由澳大利亚学者J.Haseloff提供。α-^{32}P-dATP,α-^{32}p-dCTP, dNTP, Poly(A)酶为NEN公司产品，其它常规试剂均为国内标准产品。

提纯的CEV-RNA和CSV-RNA及各种待检样品均为自己提取制备。合成探针所用的模板CEV-RNA和CSV-RNA，事先均与澳大利亚学者J.Haseloff提供的CEV和CSV澳大利亚分离株^{32}P-cDNA探针进行过杂交鉴定。

二. 方法之一

1. 提纯的CEV-RNA和CSV-RNA及各种待检样品的核酸提取制备，参照Morris和Semancik等人的方法[11,12]。

2. CEV^{32}P-cDNA和CSV^{32}P-cDNA探针的合成：

(1). 脱磷酸：取1—4μg提纯的类病毒RNA，加入1μl 1M Tris-HCl(pH9.0)，5μl碱性磷酸单酯酶(1.5u/ml)，加消毒双蒸水到20μl，37℃保温20分钟。然后加入100μl的0.2M NaCl, 0.1mM EDTA,100μl氯仿苯酚(1:1)终止反应。离心取水相，乙醇沉淀，回收类病毒RNA，抽干。

(2). 加Poly(A)：将上述样品溶于50μl 0.1mM EDTA溶液中，80℃加热1分钟。取出迅速置冰浴中冷却。加10μl 2mM ATP，20μl新配制5倍浓度的Poly(A)反应液(250mM Tris-HCl pH7.9,12.5mM $MnCl_2$, 5mM DTT, 50mM $MgCl_2$)2u Poly(A)多聚酶，加消毒双蒸水到100μl。37℃保温40分钟。加200μl氯仿苯酚，离心取水相，乙醇沉淀，离心留沉淀抽干。

(3). ^{32}P-cDNA探针的合成：取上述样品，加2μl Oligo$(dT)_{8-12}$ (1mg/ml)，10μl 5倍浓度的逆转录酶反应液(500mM KCl, 50mM $MgCl_2$,5mM DTT, 250mM Tris-HCl pH8.3)100μci α-^{32}P-dCTP(或α-^{32}P-dATP)分别加入2μl 10mM dATP(或dCTP), dGTP, dTTP, 加消毒双蒸水到50μl，再加2μl逆转录酶(10u/μl)，37℃保温2小时。然后加入2μl 10mM dCTP, 1μl逆转录酶，37℃保温1小时。

(4). 去除模板类病毒RNA：取50μl上述合成的类病毒RNA-^{32}P-cDNA样品，保温2分钟，取出后迅速在冰浴中冷却。然后加2μl RNaseA(10μg/μl)，37℃保温1小时。加150μl 0.2MNaCl, 0.1mMEDTA, 150μl氯仿苯酚，振荡后离心，取上清液过Sephadex-G_{50}柱。用0.1M NH_4HCO_3平衡柱床并洗脱样品，分管收集，用G-M计数管测放射计数，取第一个峰(计数为2-3×10^3cpm)的样品，乙醇沉淀，将收集到的^{32}P-cDNA

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

抽干备用。

3. 杂交(dot blot):

(1). 点样:将提纯的CEV-RNA, CSV-RNA, 健康对照和各种待检样品点到硝酸纤维素膜上,并放入杂交袋中。

(2). 预杂交:在杂交袋中放入预杂交液(750mM NaCl,75mM柠檬酸钠, 1%甘氨酸, 250μg/ml变性后再经超声波破碎的鱼精DNA, 50mM 磷酸缓冲液 pH6.5, 5%去离子甲酰胺, 5mM EDTA, 0.2%SDS), 55℃保温15小时。

(3). 杂交:预杂交后换上含有CEV^{32}P-cDNA, 探针(或CSV^{32}P-cDNA探针)的杂交液,探针的放射性计数为2-3×10^{3}cpm。(杂交液:11%硫酸葡聚糖, 200μg/ml变性后再经超声波破碎的鱼精DNA, 660mM NaCl, 66mM柠檬酸钠, 44mM磷酸钠缓冲液pH6.5, 1%甘氨酸, 44%去离子甲酰胺, 5mM EDTA, 0.2%SDS)55℃保温24小时。

(4). 放射自显影:取出硝酸纤维素膜,用2×SSC, 0.1%SDS溶液,在室温下漂洗3次,每次5分钟。然后在55℃下用0.1×SSC, 0.1%SDS溶液漂洗2次,进行放射自显影。

三、方法之二

PAGE, 5%的胶(丙烯酰胺:NN'-甲叉双丙烯酰胺=19.4:0.6)。TBE,管胶大小为1.0×10cm,电流为6—8mA/管,电泳2—3小时,电泳后用0.05%甲苯胺兰染色,用蒸馏水脱色,观察记录结果。

四、方法之三

生物感染:取待检植物的叶片,加磷酸缓冲液碾磨,纱布过滤后所得汁液,经磨擦接种到爪哇三七,菊花等指示植物上,三周后观察其症状表现,并记录结果。

结果与讨论

上述合成的两种探针分别与被检样品进行杂交(见表1,表2),对其结果进行比较(见图1,图2)表明:它们与健株样品均不产生杂交点,而与提纯的CEV和CSV均能产生明显的杂交点。这说明在健株核酸提取物中不存在用上述探针可检测出的类病毒成分。CEV^{32}P-cDNA与CSV能产生杂交点,CSV^{32}P-cDNA与CEV也能产生杂交点,这表明CEV和CSV之间有碱基序列的同源性,此结果与已报道的结果相符[13,14]。从图片中还可以看出:CEV^{32}P-cDNA探针与提纯的CEV和CSV产生杂交点的强弱相当(图片1);而CSV^{32}P-cDNA探针与CSV和CEV产生杂交点的强弱不同,这是由于所用样品中类病毒浓度不同。由此说明,对同一探针来说,只有当每个被检样品类病毒浓度相同或每个样点类病毒含量接近时,杂交点的强度才能反应出探针与被检样品之间碱基序列同源性的程度。适当提高被检样品的浓度或加大点样量,对排除假阴性结果是必要的。

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

另外由柑桔，菊花等25个样品检测结果表明：凡是有典型类病毒病症状或生物学检测和聚丙烯酰胺凝胶电泳测定有明确结果的样品，杂交分析均有明确结果（见表3）。而象尤力克柠檬（溆浦），乳柑，菊花（温室）和爪哇三七（冬季感染）既无可见症状，生物学检测和PAGE测定又无明显结果的样品，通过分子杂交也能得到准确判断。并对矮化温州密柑，短节枳壳（宜昌采）等样品测定后，排除了CEV存在的可能性。同时为鸡冠花矮化类病毒（CoSV）和菊花褪绿斑驳类病毒（ChCMV）的鉴定提供了佐证。

总之，本文所述的类病毒检测方法主要优点是：1. 用样量小，灵敏。一般仅用数微克电泳纯的类病毒RNA作模板，即够合成探针之用，当合成探针的放射计数不低于10^3cpm时，被检样品无论是提纯类病毒还是植物的核酸粗提物，只要每个样点中含有微量类病毒，就能与相应探针产生可辨的的杂交点。比PAGE法灵敏百倍以上。而且重复性好。2. 检测样品多，快速。用这种方法，通常在一张十余cm^2的硝酸纤维素膜上可点几十个样品，而且一次合成的探针可重复使用。3. 合成一种探针，可检测多种样品。用某种类病毒作模板合成的探针，既可检测同种类病毒又可检测与模板类病毒有同源序列的其他类病毒。这显示出应用类病毒分子杂交技术的广泛意义。

表1：图1中被检样品的排布（每个点为一个样品）

Table 1 The distribution of the samples in the Fig 1. (One sample per spot)

提纯的CEV（感染柑桔）	提纯的CEV（感染爪哇三七）	感病柑桔核酸提取物	感病菊花核酸提取物
健健柑桔核酸提取物	提纯的CEV	健康爪哇三七核酸提取物	提纯的CSV（感染菊花）

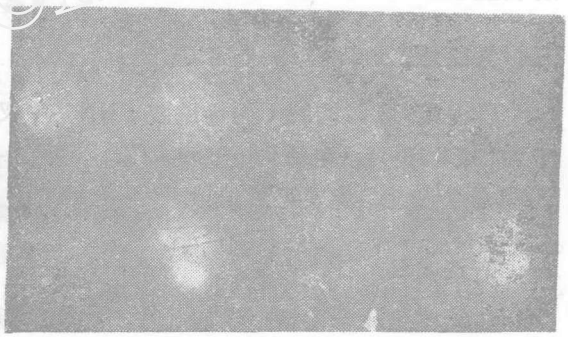


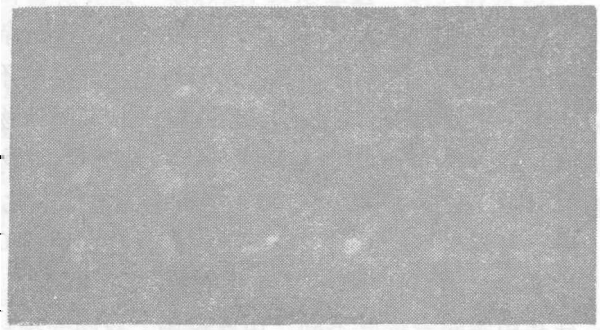
图 1：CEV^{32}P-cDNA探针与表1中被检样品杂交的结果

Fig. 1: The result of hybridization CEV^{32}P-cDNA probe with the samples in the table 1.

表2：图2中被检样品的排布（每个样品点2个点）

Table 2: The distribution of the samples in the Fig. 2. (One sample for two spots).

健康柑桔核酸提取物	健康爪哇三七核酸提取物	健康菊花核酸提取物
提纯的CEV（感染爪哇三七）	感病爪哇三七核酸提取物	健康菊花核酸提取物
提纯的CEV（感病柑桔）	健康柑桔核酸提取物	健康柑桔核酸提取物
感病柑桔核酸提取物	提纯的CSV（感病菊花）	感病柑桔核酸提取物



图片2：CSV^{32}P-CDNA探针与表2中被检样品杂交结果

Fig. 2: The result of hybridization CSV^{32}P-cDNA probe with the samples in the table 2.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3 柑桔、菊花等25个样品的分子杂交及其它方法检测结果*

Table 3 The results of 25 samples of citrus and chrysanthemum etc. detected by hybridization and other methods.

样品名称 \ 项目内容	采样地点	症状	生物检测	电泳分析	分子杂交	备注
CEVA	澳大利亚分离株			+	+	
CSVA	澳大利亚分离株			+	+	
卡特林娜	农科院柑桔所(川)	+	+	+	+	
尤力克柠檬	农科院柑桔所(川)	+	+	+	+	
克拉斯特	溆浦园艺场(湘)	+	+	+	+	
脐血橙	湖南园艺所	+	+	+	+	
汤姆逊脐橙	湖南园艺所	+	+	+	+	
鲁宾逊脐橙	湖南省园艺所	+	+	+	+	
菊花(矮化)	中科院北微所(京)	+	+	+	+	
菊花(矮化)	中科院病毒所(汉)	+	+	+	+	
爪哇三七(感染)	中科院病毒所(汉)	+	+	+	+	
鸡冠花(缩叶)	中科院武汉分院	+	+	+	+	
菊花(褪绿斑驳)	中科院病毒所(汉)	+	+	+	+	
桃叶橙	农科院柑桔所(川)	−	−	−	−	
尾张	中科院力学所(汉)	−	−	−	−	
菊花	中科院病毒所(汉)	−	−	−	−	
爪哇三七	中科院病毒所(汉)	−	−	−	−	
尤力克柠檬	溆浦园艺场(湘)	−	±	±	+	
菊花(网室)	中科院病毒所(汉)	−	±	±	−	
爪哇三七(感染)	中科院病毒所(汉)	−	±	±	+	冬季感染
鸡冠花	中科院武汉分院	−	±	±	+	
乳柑	浙江省柑桔所	−	−	+	+	弱株在爪哇三
本地早	浙江省柑桔所	−	−	+	+	七上不表现症状
矮化温州蜜柑	宜昌柑桔所	±		−	−	
短节枳壳	宜昌柑桔所	±		−	−	

* 1. "+"有症状或反应; "−"无症状或无反应; "±"可疑症状或反应

2. 生物测定用爪哇三七作指示植物。

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参 考 文 献

〔1〕 赵学源，蒋元辉，邱桂石，苏维芳，1983，植物病理学报 13(4)：43-46。
〔2〕 谢鲁奇柯，Ю.М.В.г列夫曼著 王小凤译，1982，类病毒--类新病原，科学出版社出版 北京 pp28—40。
〔3〕 Diener, T.O 著 刘勇等译，1985，类病毒和类病毒病 科学出版社出版 北京 pp9—53。
〔4〕 Owens, R. A., Smith, D.R., and T.O.Diener, 1978, *Virology* 89: 388.—394.
〔5〕 Owens, R.A and T.O.Diener, 1981, *Science* 213: 670
〔6〕 Teruo Sano et al., 1984. *Nucl. Acid. Res.* 12(8): 3427—3434.
〔7〕 田波，张秀华，夏远南，1982，病毒学集刊 1: 119—122。
〔8〕 陈炜，田颖川，刘勇，彭勃，夏远南，田波，1981，科学通报14: 880—889。
〔9〕 糜克永，杨一平，杨平、徐元珍，林木兰，刘勇，李学柱，赵学源，1985，病毒学集刊 4: 35-42。
〔10〕 陈炜，田波，朱玉香，刘勇，1982，微生物学报 22(3): 241--247。
〔11〕 Morris, T.J and N.S. Wright, 1975, *Am. Potato. J.* 52: 57—63.
〔12〕 Semancik, J.S.et al., 1975.*Virology* 63: 160—167.
〔13〕 Zaitlin, M.et al., 1980.*Virology* 104: 1—9.
〔14〕 Palukaitis, P., et al., 1979. *Virology* 99: 145—151.

SYNTHESIS OF CITRUS EXOCORTIS VIROID AND CHRYSANTHEMUM STUNT VIROID DNA ^{32}P-cDNA PROBES AND DETECTION BY THE PROBES

Zhang Qi-ya Liu Yong yang ping Lin Mu-lan
Weng Zhao-Kui Mi Ke-yong Zhuo Zhong-qi Ding Da-ming
(*Wuhan Institute of Virology Academia Sinica, Wuhan*)

Yang Xi-cai Chen Wei Tian Bo
(*Institute of Microbiology Academia Sinica, Beijing*)

The ^{32}P-cDNA Probes of Citrus Exocortis Viroid (CEV) and Chrysanthemum Stunt Viroid (CSV) RNA has been synthesied respectively and used for detecting some samples that may contain relative viroids. This is a sensitive and rapid method for diagnosing early viroid disease as compared with biology assays and polyacrylamide gel electrophoresis.

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net