

互补 DNA 杂交分析和血清学方法 对香石竹环斑病毒分离物的研究

安德荣 魏宁生

(西北农业大学植保系, 杨凌)

R. Koenig

(联邦德国生物研究中心病毒所, 西德)

提 要

在联邦德国奥卡河中分离到一种病毒分离物(W), 通过鉴别寄主反应的测定, 病毒粒子的电子显微镜观察, cDNA斑点杂交和血清学的研究, 鉴定出这一病毒分离物为香石竹环斑病毒。其外壳蛋白亚基的分子量为 3.8×10^4 。cDNA吸印转移杂交分析表明, 香石竹环斑病毒的两个RNA组份(RNA₁、RNA₂)之间没有核苷酸序列同源性。RNA₁和RNA₂分别由3.7和1.5千碱基组成。

关键词: 香石竹环斑病毒 互补DNA 血清学 RNA序列同源性

近年来的研究表明, 在河流和湖泊中存在有许多植物病毒^[1]。在西德布伦瑞克附近的奥卡(Oker)河中, 分离到一种病毒分离物(W), 经鉴定为香石竹环斑病毒(Carnation Ringspot Virus-CarRSV), 从提纯的W分离物制剂中分离外壳蛋白和抽提病毒的RNA。采用凝胶电泳测定外壳蛋白和RNA组份的大小。以W分离物的RNA为模板合成³²P标记的互补DNA(³²P-cDNA), 利用³²P-cDNA进行吸印转移杂交(Northern Blot Hybridization)。研究两个RNA组份之间的核苷酸序列的同源性。

材 料 和 方 法

一、病毒的鉴别寄主反应和分离提纯: 取60毫升奥卡河水, 100,000g离心后, 将沉淀悬浮在0.02mol/L硼酸缓冲液中(pH7.4)。磨擦接种昆诺藜, 3天后产生大约200个坏死斑。将坏死斑进行单斑分离, 再接种于昆诺藜上, 产生和第一次相同的枯斑反应, 用纯化后的分离物做毒源, 测定不同寄主的症状反应。

将W分离物在克利夫兰烟上繁殖, 4天后取100g病叶和100毫升0.02mol/L硼酸缓冲液(pH7.4)及100毫升正丁醇氯仿混合液(1:1), 进行研磨粗提, 粗提液进行两次差速离心, 进一步纯化采用氯化铯等密度离心和再一次的差速离心^[2]。沉淀悬浮在0.05mol/L磷酸缓冲液中(pH7.2)。

本文于1988年3月17日收到。

二、 ^{32}P -cDNA 的制备、斑点杂交 (Dot Blot Hybridization) 和吸印转移杂交: 用 SDS-酚法抽提 W 分离物中的核酸, 利用低熔点琼脂糖凝胶电泳分离和收集病毒的两个 RNA 组份^[2]。依据 Taylor 等的方法制备随机引物^[3]。分别以 W 分离物的两个 RNA 组份 (0.5 μg) 为模板, 加入 2.55 μl 随机引物, 400 pmol 的 dCTP、5 nmol 的 dATP、dGTP 和 dTTP、1 μl 的 α - ^{32}P -dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) 和 0.5 μl 的反转录酶 (5 个单位), 在 37°C 下合成 cDNA, 然后将反应液通过 Sephadex G50 柱, 分离和收集 ^{32}P -cDNA^[9]。

将提纯的属于 10 个病毒组的 44 个不同病毒* (包括 W 分离物) 分别点样到硝酸纤维膜上, 每个病毒点样 10 μg , 然后将 RNA₁ 的 cDNA 或 RNA₂ 的 cDNA 或两个 cDNA 混合液和硝酸纤维膜上的 44 个不同病毒进行 cDNA 杂交试验^[9], 利用放射性自显影检测杂交结果。同时利用 1.25% 的琼脂糖凝胶 (内含 60% 的甲酰胺) 电泳分离 W 分离物的 RNA 组份。电泳后将凝胶带上的两个 RNA 组份通过 20 倍的标准柠檬酸盐缓冲液 (20 \times SSC) 吸印转移到硝酸纤维膜上^[5], 然后分别和 W 分离物 RNA₁ 的 cDNA 和 RNA₂ 的 cDNA 进行杂交, 用放射自显影检测杂交结果。

三、病毒粒子的电子显微镜观察和血清学试验: 用粗提液和提纯的 W 分离物粒子制剂分别滴在铺有 Formvar 的铜网上, 吸附 5 分钟后用纯蒸馏水冲洗, 吸干。再加 2% 醋酸双氧铀负染 1 分钟, 吸干后置电子显微镜下观察。

用琼脂双扩散法测定 W 分离物和 CarRSV 之间的血清学关系。

四、外壳蛋白亚基分子量和 RNA 组份大小的测定: W 分离物外壳蛋白亚基的分子量确定采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶方法^[6]。从提纯的 W 分离物中以两相酚法抽提病毒的 RNA, 用 1.25% 的琼脂糖凝胶 (内含 60% 甲酰胺) 电泳测定 RNA 组份及大小。

结 果

一、鉴别寄主的症状反应: 接种 2 天后, 观察各个寄主上的症状反应和症状发展, 如表 1 所示。从表 1 可看到 W 分离物在昆诺藜、千日红、克利夫兰烟、菜豆上的反应和 CarRSV 在这些寄主上的反应是一致的。

二、病毒粒子的电镜观察: ^{32}P -cDNA 斑点杂交和血清学试验结果: 病毒的粗提液和提纯制剂负染后, 电镜下均可看到大量的球形粒子 (图 1), 粒子直径为 33nm, 而且, 病毒粒子外壳蛋白的症状表面结构也清晰可见。

分别利用 W 分离物的 RNA₁ 的 cDNA 和 RNA₂ 的 cDNA 或两种 cDNA 混合液和属于 10 个病毒组的 44 个不同病毒进行杂交的结果 (图 2) 表明, 任何一种 cDNA 或混合 cDNA 均和 W 分离物自己及 CarRSV 发生强烈的杂交反应, 这证明了 CarRSV 和 W 分离物在核苷酸水平上存在着最大的序列同源性, CarRSV 也同时存在着两个 RNA 组份。

琼脂免疫双扩散结果 (图 3) 表明, W 分离物和 CarRSV 在血清学上具有不可分性, 它们属于 CarRSV 一种病毒。

三、外壳蛋白亚基的分子量和 RNA 组份的大小: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定病毒粒子外壳蛋白亚基的分子量为 3.8×10^4 。病毒的核酸分为 RNA₁ 和 RNA₂ 两个组

* 注: 44 个不同病毒的排列位置见附图 2

份, RNA₁ 和 RNA₂ 分别由 3.7 和 1.5 仟碱基组成。

四、RNA₁ 和 RNA₂ 之间核苷酸序列同源性: 分别以 RNA₁ 和 RNA₂ 为模板合成的两种 cDNA 和吸印转移后含有两种 RNA 组份 (RNA₁ 和 RNA₂) 的硝酸纤维膜进行杂交的结果 (图 4) 表明, RNA₁ 的 cDNA 仅和 RNA₁ 发生杂交反应, RNA₂ 的 cDNA 仅和 RNA₂ 发生杂交反应, 而 RNA₁ 的 cDNA 与 RNA₂ 的 cDNA 不能分别和 RNA₂ 与 RNA₁ 发生杂交反应。这表明 RNA₁ 和 RNA₂ 在核苷酸序列上没有同源性, 也表明 RNA₂ 不属于 RNA₁ 亚基因组份。

讨 论

近几年来, 核酸的分子杂交技术日趋完善, 以不同材料为支持物的固相杂交技术取得了更为迅速的发展^[5], 以硝酸纤维膜为支持物的固相杂交具有快速、简便的特点, 而且样品比较集中, 灵敏度高。从病毒 RNA 为模板合成的 cDNA 能代表整个病毒基因所携带的遗传信息, 因此, 以 cDNA 为探针, 进行植物病毒核酸水平上的鉴定和研究是一种理想的试验方法。

本试验利用 cDNA 做探针, 进行核酸杂交试验, 首次证明 CarRSV 的两个 RNA 组份之间的核苷酸序列没有同源性。RNA₁ 和 RNA₂ 分别由 3.7 和 1.5 仟碱基组成。

CarRSV 是河流中迄今已被鉴定出的第三个香石竹病毒, 其它两种病毒为香石竹斑駁病毒 (Carnation mottel virus) 和香石竹意大利环斑病毒 (Carnation Italian ring-spot virus)。它在香石竹上引起严重危害。最初认为它的寄主范围仅限制在几种石竹科植物上, 如香石竹 (*Dianthus caryophyllus*) 和须苞石竹 (*D. barbatus*)。后来发现它还可以侵染其它科植物和杂草, 但在杂草上没有症状, 如繁缕 (*Stellaria media*)、早熟禾 (*Poa annua*) 荨麻 (*Urtica urens*) 等。在李、酸樱桃、苹果和桃树上, 都有低浓度的 CarRSV 存在。Kleinhempel 等证明受侵果树实际上是侵染繁缕的病毒来源。CarRSV 不仅存在于植物叶、叶柄、果实和根部, 还存在于土壤中。本试验证明 CarRSV 还可被释放到水流和湖泊中。因此, 利用污染有 CarRSV 和其它病毒的水进行农作物、园艺等农田灌溉, 则存在着潜伏的危险。

附: 44 个不同病毒在硝酸纤维膜上的位置, 按每行从 1—7 的顺序排列。

第 A 行: 茄花叶病毒 (EMV), 颠茄斑駁病毒 (BelMV), 玄参斑駁病毒的典型株系 (ScrMV) 及 *Anagyris* 株系 (ScrMV-*Anagyris*), 野黄瓜花叶病毒 (WGuMV), 茺菁黄色花叶病毒 (TYMV), OKr 花叶病毒 (OkMV)。

第 B 行: 山马蝗植物黄斑病毒 (DYMV), 肯尼亚黄花叶病毒 (KYMV), 可可黄花叶病毒 (CoYMV), 安第斯马铃薯潜病毒的 Caj 株系 (APLV-Caj), 糖芥属植物潜病毒 (ELV), *Poinsettia* 花叶病毒 (PoiMV)。

第 C 行: 番茄丛矮病毒的典型株系及 BS₃ 株系 (TBSV-BS₃), 天竺属植物叶卷病毒 (PLCV), 摩洛哥辣椒病毒 (MPV), 香石竹意大利环斑病毒 (CIRV), 连兰属植物环斑病毒 (CyRSV), 最后一个斑点未点样。

第 D 行: Sieg 河流烟草花叶病毒 (SRTV, R. Koenig 待发表), 齿兰环斑病毒 (ORV), 河流烟草花叶病毒 (ARTV, R. Koenig 待发表), 烟草褪绿斑駁病毒 (TCMV), 黄瓜绿斑駁花叶病毒 (CGMMV), *Maraouja* 花叶病毒 (MMV), 辣椒轻花叶病毒 (PMMV)。

第 E 行: 分离物 W, 香石竹斑駁病毒 (CarMV), 芜菁皱叶病毒 (TCV), 黄瓜土传病毒 (CSBV), 天竺花碎病毒 (PFBV)。

第 F 行: 马铃薯 X 病毒 (PVX), 仙人掌属 X 病毒 (CaVX), 菊属植物 B 病毒 (CVB), 甜菜坏死黄脉病毒 (BNYVV)

及 Wic 分离物 (BNYVV-Wic, 未鉴定)。

第C行: 雀麦花叶病毒 (BrMV), 香石竹环斑病毒 (CarRSV), 安第斯马铃薯斑驳病毒 (APMV) (后四个斑点未点样)。

第H行: APLV的Col1株系 (APLV-Col1), 矮牵牛星状花叶病毒 (PAMV), 烟草花叶病毒 (TMV), 菊芋斑纹病毒 (AMCV), APLV的Hu株系 (APLV-Hu)。

表 1 W-分离物的鉴别寄主症状和潜育期
Table 1 Symptoms of diagnostic species and incubation periods of isolate-W

	寄 主 Hosts	症 状 Symptoms	潜 育 期 Incubation periods(Day)
1.	金 鱼 草 <i>Antirrhinum majus</i>	坏死斑, 后发展为系统性斑驳	4—5
2.	千 日 红 <i>Gomphrena globosa</i>	坏死斑, 后发展为畸形	3
3.	<i>Nicotiana benthamiana</i>	坏死斑, 退绿斑, 后发展为畸形	4—5
4.	<i>N. megalosiphon</i>	同 上	4—5
5.	碧 西 烟 <i>N. tabacum-xanthi</i>	同 上	4—5
6.	克利夫兰烟 <i>N. clevelandii</i>	同 上	4—5
7.	碧 冬 茄 <i>Petunia hybrida</i>	坏 死 斑	5—7
8.	昆 诺 藜 <i>Chenopodium quinoa</i>	坏 死 斑	3
9.	菜 豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>	坏死斑, 后发展为系统性斑点	4—5

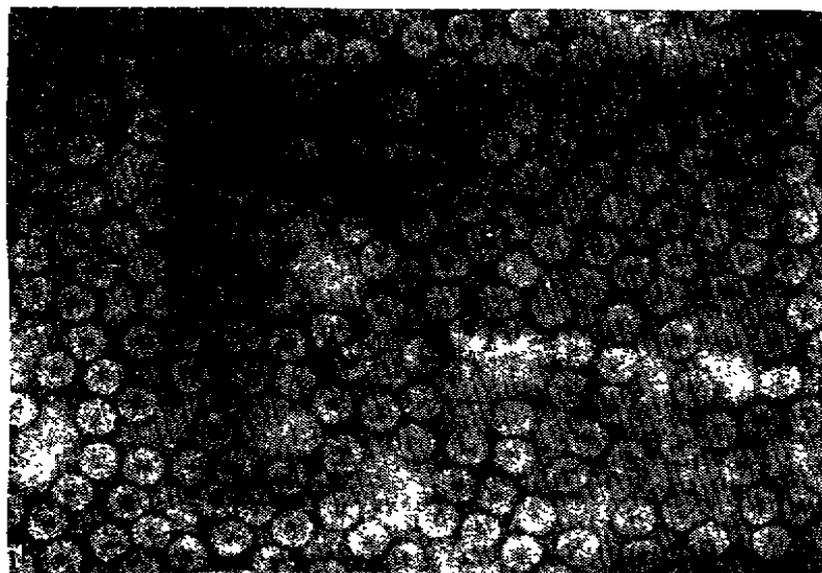


图 1 分离物W的病毒粒子 (150,000×)
Fig 1 Virion of isolate-W (150,000×)

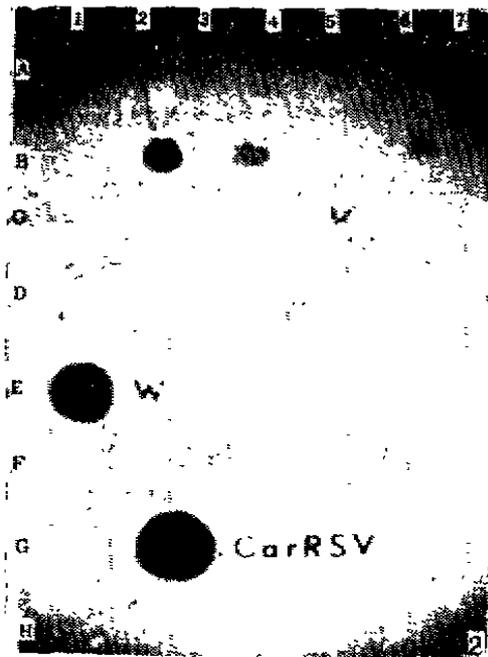


图 2 分离物 (W) RNA 的 cDNA 和 44 种不同病毒的斑点杂交结果。同源分离物 W 和 CarRSV 都有强烈的杂交反应。另外两个弱的杂交斑分别为肯尼亚黄花叶病毒和芜菁黄色花叶病毒, 其属于异源性杂交反应。

Fig 2 Dot blot hybridization test with cDNA to RNA of virus isolate (W) and 44 different plant virus. A very strong hybridization signal was observed with the homologous virus (W) and CarRSV. Another two weaker heterologous hybridization dots 1 and 2 was KYMV and TYMV respectively.



图 3 琼脂双扩散试验。中央孔为 CarRSV 抗血清, C 孔为 CarRSV, W 孔为分离物

Fig 3 Agar gel double diffusion test. Antiserum to C in center well, CarRSV in C well and isolate (w) in W well.

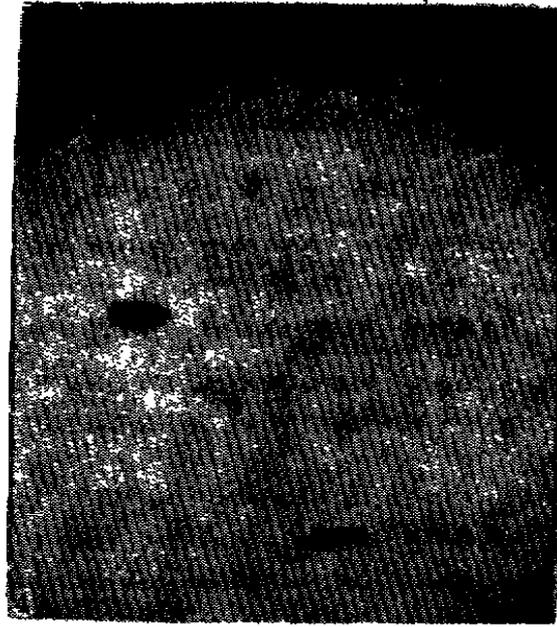


图 4 含有 RNA₁ 和 RNA₂ 带的两条硝酸纤维膜分别和 RNA₁ 及 RNA₂ 的 cDNA 进行的吸印转移杂交。

Fig 4 Two nitrocellulose strips containing RNA₁ and RNA₂ bands hybridized with cDNA to RNA₁ and RNA₂ respectively.

参 考 文 献

- [1] Fritzsche, R and K.Schmelzer, 1967. *Naturwissenschaften*. 59, 498—499.
- [2] Gallitelli, D and R.Hull, 1985. *J. Virol. Methods*. 11, 141—144.
- [3] Kleinbempel, H., G.Gruber and H.Kegler, 1980. *Acta. Phytopathol, Acad. Sci, Hung.* 15, 107—111.
- [4] Koenig, R., 1986. *Adv.Virus.Res.* 31, 321—333.
- [5] Koenig, R., D.An and W.Burgermeister, 1988. *J.Virol.Methods*. 19, 57—68.
- [6] Koenig, R and D.E.Lesemann, 1985. *Phytopathol.Z.* 112, 105—116.
- [7] Laemmli, U.K and F. Favre, 1973. *J.Mol.Biol.* 80, 575—579.
- [8] Taylor, J, M., R.Illmensee and J.Summers, 1978. *Biochem. Biophys. Acta.* 442, 324-330.
- [9] Thoms, P.S., 1980. *Proc.Natl.Acad.Sci., USA*, 77, 5201-5205.
- [10] Tomlinson, J.A., E.Faithfull, T.H.Flewett and G.Bearde, 1982. *Nature*. 300, 637-638.
- [11] Weintraub, M., H.W.J.Ragetli and E.Leung, 1975. *Phytomorphology*. 25, 288-304.

Studies on the Isolation of Carnation Ringspot Virus by cDNA Hybridization Analysis and Serology

An De-rong Wei Ning-sheng

(Dept. of Plant Protection, Northwestern Agricultural
University, YangLing, Shaanxi)

R. Koenig

(Institute of Plant Virology, Biological Research
Center, W. Germany)

A virus isolate (w) has been obtained from the Oker river in W. Germany. The isolate was identified as Carnation ringspot virus (CarRSV) by means of inoculation on the test plant, electron microscopy, dot blot hybridization and serology. The molecular weight of the coat protein is 3.8×10^4 . Northern blot analysis revealed that the two RNA species of the virus which consisted of c. 3.7 and 1.5 kb, respectively, but without base sequence homology.

Key words: CarRSV cDNA hybridization RNA sequence homology