164—169 605(10) 维普资讯 http://www.cqvip.com

第8卷第2期 中国病毒学 Vol.8 No.2
1993年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1993

番木瓜环斑病毒检测技术的研究*

陈枝楠** 郑冠标 林孔勋 范怀忠

（华南农业大学植保系，广州 510642）

张春霞 田 波

（中国科学院微生物所，北京 100080）

Q93-332

提 要

本研究在37℃条件下，以硝酸纤维素滤膜（NCM）为载体；3%酪蛋白为封闭剂、辣根过氧化物酶标记的A蛋白为酶标结合物（SPA-HRP）和以稀释100倍兔抗PRV-Ys的IgG为其工作浓度，成功地建立了检测PRV的间接Dot-ELISA。其检测灵敏度达到了较满意的ng水平。同时，本研究以PRV-Ys株系RNA作模板、oligo $(dT)^{12-18}$ 作引物、pUC19作cDNA克隆载体和以*E. coli* JM107作受体，采用缺口翻译（Nick Translstion）方法成功地制备了pYs6 cDNA分子探针（插入片段约300bp）。其检测PRV-RNA的灵敏度达到了较理想的pg水平。

关键词：番木瓜环斑病毒 间接斑点ELISA cDNA分子探针

番木瓜环斑病毒（Papaya Ringspot Virus,PRV）是世界各番木瓜产区的一个严重的毁灭性病害。在我国自60年代范怀忠等[2]报道以来，番木瓜抗PRV品种筛选中的微量PRV及PRV-RNA的检测技术问题一直是一个有待解决的难题[1,3]。建立一套高度灵敏、准确和快速、简便的检测PRV和PRV-RNA的方法和技术，将有助于番木瓜愈伤组织抗PRV筛选和番木瓜单细胞抗性遗传的研究[1,3,14,15]。

材 料 与 方 法

一、材料

PRV-Ys，Vb，Sm，Lc株系和PRV-Ys兔抗血清（1988年12月制备）均由华南农业大学植物病毒研究室提供。

本文于1990年10月4日收到，1992年9月26日修回

1 N=1mol/L×离子价

* （1）国家教委科学基金资助项目

（2）本研究部分内容得到了广东微生物所简浩然研究员的大力支持和指导，特此致谢。

** 现在地址：深圳动植物检疫局，深圳 518010

维普资讯 http://www.cqvip.com

PRV 繁殖寄主为西葫芦（*Cucumis pepo*）。

PRV-cDNA 合成试剂购自西德 Boehringer Mannheim 公司和华美生物工程公司；缺口翻译合成探针试剂盒购自英国 Amersham 公司；硝酸纤维素滤膜（NCM）购自美国 Sigma 公司。

二、方法

（一）间接 Dot-ELISA 的建立

PRV-Ys兔抗血清IgG提取：用饱和硫酸铵沉淀法[18,27]提取的γ-球蛋白在0.01mol/L磷酸钾缓冲溶液（pH7.5）中充分透析后，采用DEAE-纤维素离子交换柱层析法[18,27]提取 IgG。

IgG 工作浓度的确定：以 10μg/ml 的 PRV-Ys 抗原点样 NCM，IgG 溶液以 1∶10、1∶20、1∶30、1∶40……1∶10^n方式稀释，按照本研究建立的间接 Dot-ELISA 操作程序比较显色反应结果。阴性对照为健康繁殖寄主西葫芦（*C. pepo*）提取液，从而确定 IgG 有效工作浓度[13,8,12,13,14,21]。

间接 Dot-ELISA 操作程序：

（1）NCM 准备：剪裁 5cm×3cm 大小的 NCM，光滑面朝上，用铅笔标记好点样点。

（2）点样：抗原PRV用0.05mol/L Na_2CO_3-$NaHCO_3$缓冲溶液（pH9.6）以不同方式进行稀释，取出1—5μl稀释液点样于NCM上，在37℃下干燥20—30分钟。

（3）洗涤：将 NCM 浸入 TBST 溶液（0.1mol/L Tris.Cl pH7.6，0.5mol/L NaCl，0.5% Tween-20）中，振动洗涤三分钟后倒出 TBST 溶液，重复三次。NCM 在37℃下干燥10分钟。

（4）封闭：NCM浸入封闭液（TBST 中加入 3%酪蛋白，0.1mol/L NaN_3 和 0.04% H_2O_2）中，在37℃下孵育30分钟后，取出甩干，洗涤方法同上。

（5）加抗体：把NCM浸入IgG工作溶液中，在37℃下孵育30分钟，取出甩干。

（6）酶标：NCM 浸在加入了辣根过氧化物酶标记的 A 蛋白结合物（SPA-HRP）（由中国军事医学科学院提供，工作浓度 1∶40）的工作溶液中，在 37℃下孵育 30 分钟，洗涤方法同上。

（7）显色反应：NCM 浸入3′,3′-二氨联苯胺（DAB）溶液中，在 37℃黑暗条件下显色反应10分钟后迅速加入足量 2N H_2SO_4 溶液以终止显色反应。用蒸馏水充分漂洗 NCM后可长期保存于4℃冰箱，或者取出自然风干，干燥保存。

显色反应结果判断标准为，以出现棕黄色斑点为阳性。根据颜色强度定为"+、++、+++、++++"。显色斑模糊者为"±"。没有颜色斑出现者定为"－"阴性。

（二）PRV-cDNA 分子探针的合成

1. PRV 的纯化

PRV-Ys 株系的粗提纯液采用20—40%（W/W）的不连续蔗糖密度梯度离心法[17]（2.7kr/m，4℃；BECKMAM，SW60Ti）。

2. PRV-RNA 的抽提

采用混合酚/氯仿（1∶1）方法[4,18,20,28]分别对PRV 的四个株系进行多次抽提。干燥后的 RNA 悬浮于 TE 缓冲溶液（pH7.6）中。

3. PRV-cDNA 分子探针的合成与制备

sscDNA的合成：参考文献[4,16]等方法，以 PRV-Ys RNA 作为模板[26]，oligo(dT) 12—18 作引物，α-^{32}p-dCTP作标记物，在AMV-逆转录酶缓冲系统中（反应总体积50μl）反应60分钟（42℃）。然后，EDTA终止反应。经酚/氯仿抽提、干燥后反应物悬浮于20μl TE缓冲液(pH7.6)中。sscDNA合成效果的检测采用1.4%碱性琼脂糖微型凝胶电泳法[15]。

dscDNA的合成：参照文献[4,18,17,20]等方法在 dscDNA 的合成反应成份中加入2U *E.coli* RNase H，α-^{32}p-dCTP，20U DNA聚合酶I和5U T_4-DNA连接酶（总体积为50μl），反应60分钟

维普资讯 http://www.cqvip.com

（22℃）。终止反应后，经酚/氯仿抽提，洗涤干燥，干燥物悬浮于20μl无菌双蒸水中。dscDNA合成效果检测方法同上。

dscDNA两端补平和pUC19质粒Sma I内切酶消化处理：参照文献[4,6,16]的方法完成。

质粒重组：把500ng pUC19-Sma I，3U T4-DNA连接酶和dscDNA合成产物加入在连接酶缓冲溶液中，平头连接24小时（22℃）后，钝化处理10分钟（65℃）[4,16,24,26]。

感受态细胞制备：按照Maniatis[16]方法，受体细菌选用*E. coli* JM107，$CaCl_2$浓度选用100mmol/L。

转化：参照文献[4,16,26]方法，热冲击2.5分钟（43℃）。转化物涂布于Macconkey培养基上培养（37℃），24小时后观察菌落颜色变化。

原位分子杂交用分子探针的制备：应用快速末端标记法[7,16,23]标记同源PRV-Ys RNA。

RNA的5'末端先脱磷酸化[16]，再用100UCi γ-^{32}p-ATP（总体积100μl）标记5'末端。经Sephadex G-50柱层析后，收集有效峰洗脱液作为原位分子杂交用分子探针。

原位分子杂交：在Macconkey平板上挑取白色细菌克隆，按照Maniatis等[7,16]方法进行。

插入片段大小检查：经原位分子杂交初选出的细菌克隆，抽提质粒经1.5% Agarose凝胶电泳，选用迁移率较慢的编号为pYs6的重组质粒进行EcoR I/Pst I双酶切[8,7,11]，酶切产物进行2% Agarose凝胶电泳，以λDNA/Hind Ⅲ酶切产物作为DNA分子片段大小参照物。

cDNA分子探针的制备：采用Nick Translation方法[6,20,26]，从试剂盒中取出一份溶液和1μg pYs6重组质粒，50μCi α-^{32}p-dCTP进行反应（2hr，14℃）经Sephadex G50柱层析后收集合并有效峰洗脱液即为PRV-RNA cDNA分子探针溶液。

（三）间接Dot-ELTSA和cDNA分子探针灵敏度检测

1. 间接Dot-ELISA灵敏度检测

PRV-Ys，Vb，Sm和Lc四个株系的粗提纯制剂分别用0.05mol/L Na_2CO_3-$NaHCO_3$（pH9.6）缓冲液以$1/2^n$的方式进行稀释，从各稀释液中取出1μl点样NCM，选用所确定的IgG工作浓度，按照本研究操作程序进行显色反应[3,13]。健康西葫芦提取物作阴性对照。

2. cDNA分子探针灵敏度检测

PRV-Ys，Vb，Sm和Lc四个株系的RNA溶液分别以$1/10^n$的方式进行稀释，从各稀释液中分别各取5μl点样NCM，按照试剂盒要求，预杂交7小时（68℃）后，加入标有α-^{32}p-的pYs6的cDNA分子探针溶液（10^9CPM/μg），继续杂交24小时，放射自显影。

结 果

1. IgG的提取及其工作浓度

PRV-Ys兔抗血清IgG：提取的γ球蛋白浓度为2.5mg/ml，IgG的浓度为0.22mg/ml。IgG提取液的紫外吸收光谱λmax为280nm，λmin为250nm，是典型的蛋白吸收光谱。

IgG的工作浓度：根据本研究制定的操作程序，以1μl PRV-Ys株系的粗提纯物点样NCM，IgG溶液以$1/10^n$稀释后得到的结果（图版Ⅵ1）表明，当IgG溶液稀释到1∶100时，NCM上的棕黄色阳性斑仍比较清晰，故以1∶100的稀释度作为本研究IgG的工作浓度。此时IgG溶液浓度为2.2μg/ml。

2. cDNA分子探针的合成

维普资讯 http://www.cqvip.com

PRV的纯化：PRV四个株系粗制剂浓度分别为22.2，14.2，9.4和19.4μg/ml。其中PRV-Ys的精提纯制剂（图版Ⅵ 2）病毒浓度为0.2219mg/ml。其OD260/OD280值为1.25。

PRV-RNA的提取：PRV四个株系RNA溶液浓度分别为81.04，72.10，69.20和21.52μg/ml。其中PRV-Ys RNA溶液紫外光谱曲线λmax是260nm，λmin是236 nm，OD260/OD280值约为2。

cDNA分子探针的合成：ssDNA和dscDNA合成效果分别为17.0%和14.0%。dscDNA放射自显影见图版Ⅵ 3。

45个细菌克隆原位分子杂交结果见图版Ⅵ 4。阴性对照点样斑没有任何影像，而其它点样点则有不同强度的放射自显影影像。

pYs6重组质粒经EcoR Ⅰ/Pst Ⅰ双酶切后，其电泳图谱（图版Ⅵ 5）显示插入的cDNA片段约为300bp。

3. 灵敏度测定

间接Dot-ELISA检测灵敏度：PRV四个株系点样NCM的显色反应见图版Ⅶ 6。其最低可检测量分别为每点样斑22.2，14.2，9.4和19.4ng。

表 1　cDNA分子探针灵敏度检测

Table 1　Test of cDNA molecular probe sensitivity

PRV不同株系	Ys	Vb	Sm	Lc
检测灵敏度（pg）	36.46	32.00	21.52	32.28

cDNA分子探针的检测灵敏度：PRV四个株系点杂交结果见表1，其最低可检测PRV-RNA量分别为每点样斑36.46，32.00，21.52和32.28pg。

讨　论

根据Smith和Banttari（1984）等[12,13,14,18]检测马铃薯卷叶病毒（PLRV）的Dot-ELISA（用微板作支持物）的原理，本研究选择以3%酪蛋白作封闭剂，SPA-HRP作酶标结合物，成功地建立了检测PRV的间接Dot-ELISA。检测PRV四个株系的灵敏度都达到了ng水平，说明是较理想的PRV病毒粒子的检测方法。这个方法比Gonsalves（1984）等[11,13]用的常规ELISA不仅在检测灵敏度上提高近十倍，而且还由于是在NCM上直接点样，因而操作过程更为快速、简便，观察结果直观。另外整个过程只需2—3小时内在37℃恒温下即可完成，比Smith和Banttari等检测其它病毒时在室温下进行既稳定又缩短了3—4小时[3,14,18,21]。然而，由于本研究使用的兔抗血清滴度不高，致使IgG工作浓度偏高。

由于PRV-RNA 3′-末端具有poly(A)结构，而且病毒的外壳蛋白编码基因又靠近3′-末端[3,11,25,21]，因而在合成ssDNA时选用了oligo(dT)$^{12-18}$作引物，这样就有可能获得具有专化性较强的3′末端基因片段。本研究最终筛选的一个编号为pYs6的克隆，其PRV-RNA cDNA基因片段约为300bp，符合作为分子探针最好是在250-1250bp大小范围的要求[20,25]。当用α-^{32}p标记pYs6 cDNA时，检测PRV 4个株系RNA的灵敏度都在pg水平，说明是较满意的检测PRV-RNA的分子探针。这不仅比本研究中所建立

维普资讯 http://www.cqvip.com

的间接 Dot-ELISA 更为灵敏、准确，而且还比 Gonsalves 等[11,19,23]用的常规 ELISA提高灵敏度近千倍，并且还能检测 PRV-RNA 形态。这是任何血清学技术无法比拟的。

用间接 Dot-ELISA 和 cDNA 分子探针检测 PRV 在 PRV 研究中系首次报道，它们可分别用来检测 PRV 病毒粒子和 PRV-RNA。这将给番木瓜环斑病毒病的诊断和单细胞、愈伤组织抗病性研究提供一套理想的检测手段。

参 考 文 献

〔1〕 朱西儒，1989，华南农业大学博士论文，p248。

〔2〕 任佩瑜，范怀忠，1964，植物保护学报，(3)：423。

〔3〕 郑光宇，Kostrutana，W．1988，病毒学报，44(2)：150。

〔4〕 张春霞，田波，1989，科学通报，34(7)：540—3。

〔5〕 蒋秉坤，1988，病毒学杂志，2：157—66。

〔6〕 Barbara, D. J. et al., 1987, *J. Gen. Virol.* 68：2419.

〔7〕 Birgit, P. et al., 1988, *J. Gen. Virol.* 69：2397—402.

〔8〕 Clark, M. F. and Adam, A. N., 1977, *J. Gen. Virol.* 34：475.

〔9〕 Conover, R. A. and Litz, R.F., 1978, *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 91：182.

〔10〕 Dougherty, W. G. et al., 1985, *Virol.* 142：437.

〔11〕 Gonsalves, D. *and* Ishi, M., 1980, *Phytopathol.* 70：1028.

〔12〕 Gumpf, D. J. et al., 1984, *Phytopathol.* 74：847.

〔13〕 Hawkes, R. et al., 1982, *Anal. Biochem.* 119：142.

〔14〕 Hibi, T. and Saito, Y., 1985, *J. Gen. Virol.* 66：1191.

〔15〕 Kuchler, R. T., 1977, Biochemical Methods in Cell Culture and Virology. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc.

〔16〕 Maniatis, T. et al. 1982, Molecular Cloning, A laberatory manual, RSH.

〔17〕 Nagel, J. and Hichert, E., 1985, *Virol.* 143：435.

〔18〕 O'Connor, C. G. and Ashima, L. K., 1982, *J. Immunol. Method* 54：267.

〔19〕 Owens, R.A. et al., 1978, *Virol.*89：388.

〔20〕 Perbal, B., 1988, A Practical Guide to Molecular Cloning. A Wiley Interscience Publication.

〔21〕 Powell, C. A., 1984, *Phytopathol.* 74：847.

〔22〕 Prill, B. et al., 1988, *J. Gen. Virol.* 69：2397.

〔23〕 Rigby, P. W. J. et al., 1977, *J. Mol. Biol.* 113：237.

〔24〕 Roy, B. P. et al., 1988, *Phytopathol.* 78：425—29.

〔25〕 Shukla, D. D. and Ward, C. W. 1989, Arch. Virol. 106：171.

〔26〕 Th, Hohn. 1987, Plant DNA Infectious Agents. Springer-Verlay Wien, N. Y.

〔27〕 Van Regenmortel, M. H.V. 1982, In *Serology and Immunoche-mistry of Plant Viruses.* Academic Press, N. Y. p39.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Studies on Techniques of Detecting Papaya Ringspot Virus

Chen Zhinan Zheng Guanbiao Lin Kongxun Fan Huaizhong

(*Plant Protection Department, South China Agriculture University, Guangzhou, 510642*)

Zhang Chunxia Tian Bo

(*Institute of Microbiol., Academia Sinica, Beijing*)

A sensitive indirect dot-ELISA was developed by using nitrocellulose membrance (NCM) instead of microplate, 3% casin as a blocking agent, horse-radish peroxidase conjugated protein A as an enzyme-labelled complex and a dilution by 100 folds of IgG from antiserum of rabbit to PRV-Ys strain as the working concentration, and was found to b workable for assessing an amount of PRV particles at ng level (ave. 10ng/spot, at 37℃). A PRV-RNA cDNA molecular probe (the insert ca. 300bp) was successfully constructed with PRV-Ys RNA as the synthesis template, oligo$^{(dT)}$ 12—18 as the primer for sscDNA synthesis, pUC^{18} plasmid as the cloning vector and *Escherichia coli* JM107 as the transformation receptor of recombinant plasmid. The molecular probe could be used to detect an amount of PRV-RNA at pg level (ave. 20pg/spot).

Key words: Papaya ringspot virus Indirect dot ELISA cDNA molecular probe