

印度木薯花叶病毒 DNA 在寄主植物中可能存在的形式

洪益国 王小凤 田波

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

D. J. Robinson B. D. Harrison

(Scottish Crop Research Institute, Dundee DD2 5DA U. K.)

A 提要 从印度木薯花叶病毒(ICMV)侵染的植物中纯化特异的核酸,经RNAase, DNAase, Nuclease S1, Exonuclease III和EcoRI酶切, Southern和Dot blots杂交证实,在感病的植株中,存在两种形式的病毒核酸:环状双链DNA和环状单链DNA,后者可能是病毒DNA的(-)链,环状双链DNA经限制性内切酶作用可得2.7 kb的线性双链DNA纯化的病毒核酸含DNA1和DNA2两个分子量相近的组份。

关键词 印度木薯花叶病毒 基因组, 核酸杂交 DNA

双生病毒(Geminivirus)是单链DNA病毒,病毒颗粒呈双联体状,含一种外壳蛋白(M. W. 26 000-32 000)和约2.7 kb的环状单链DNA分子^[1],根据寄主范围,传毒介体,基因组的复杂性,外壳蛋白和复制酶氨基酸序列变异的比较^[2-3],双生病毒可被分为三个亚类: I)烟草粉虱(*Bemisia tabaci*)传播,双基因组,侵染双子叶植物; II)叶蝉传播,单一基因组,侵染双子叶植物; III)叶蝉传播,单一基因组,侵染单子叶植物。木薯花叶病毒属第一亚类,是侵染粮食作物木薯的主要病原之一,引起木薯严重减产,本文报道了印度木薯花叶病毒DNA在寄主植物中可能存在的形式。

材料与方 法

- 1 植物材料与病毒繁殖 印度木薯花叶病毒(Indian cassava mosaic virus)保存并繁殖在烟草(*Nicotiana glauca*)上,均用常规摩擦接种法,植株在30℃和日光灯的照射下培养2-3周出现症状,收集病叶,置-20℃备用。
- 2 病毒的纯化 参照文献^[4]。
- 3 病毒单链DNA的提取 参照文献^[5]。
- 4 从感染植物中提取病毒特异的DNA 适量的病叶于液氮中速冻并研成碎末,加2倍体积抽提缓冲液(1.25 mol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 0.1% BSA, 0.1% β-巯基乙醇, 50 mmol/L Tris-HCl pH8.0)。过滤后并6500×g离心10 min,于上清液中加入1% SDS, 65℃保温5 min后再加入等体积的酚-氯仿(V/V=8.2)抽提,乙醇沉淀水相得核酸粗样品,溶于小体积的TE(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA pH8.0)中, -20℃保存,取健叶作同样处理,粗核酸样品经两次1.0% LMT琼脂糖(含0.5 μg/ml 溴化乙锭)凝胶电泳和酚抽提,可得纯化的病毒特异核酸及其不同形式的分子。
- 5 病毒特异核酸的性质^[6] 纯化的核酸分别经2 μg/ml RNAase(10 mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 10 mmol/L Mg

• 本文于1991年12月26日收到,1993年8月11日修回

Cl₂), 70 u/ml DNAase (10 mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 10 mmol/L MgCl₂), 10 u/ml Nuclease SI (30 mmol/L NaAc, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L ZnSO₄), 1-2 u/ml Exonuclease III (66 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 77 mmol/L NaCl, 50 mmol/L MgCl₂), 1 u/ml EcoR I (50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 10 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L NaCl), 37°C 反应 2 hr, Southern blot 分析酶切结果。

8 分子杂交

6.1 探针的制备 Nick translation 制备探针^[7]。

6.2 Southern blot^[8]样品经 1.0% 琼脂糖电泳后, 变性 (1.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L NaOH) 1hr, 中和 (1.5 mol/L NaCl, 1.0 mol/L Tris-HCl, pH8.0) 1 hr, 转移到硝酸纤维素膜上, 80°C 真空干燥 2 hr, 预杂交 (6×SSC, 0.5% SDS, 5×Denhardt's 液, 100 μg/ml 变性鲑鱼精 DNA) 68°C, 4hr, 杂交 (6×SSC, 0.5% SDS, 5×Denhardt's 液, 100 μg/ml 变性鲑鱼精 DNA, 10 mmol/L EDTA, 10⁵-10⁸ cpm 探针) 68°C, 16 hr, 含 0.5% SDS-2×SSC 68°C 洗膜 1 hr, 空气干燥后放射自显影。

6.3 Dot blot 2μl DNA 样品, 0.5 μl 0.5 mol/L NaOH 2 μl 水中变性 10 min 后立即加入 0.5 μl 3 mol/L NaAc pH5.4, 点样于硝酸纤维素膜, 其余步骤同 Southern blot。

结果与讨论

1 探针的制备

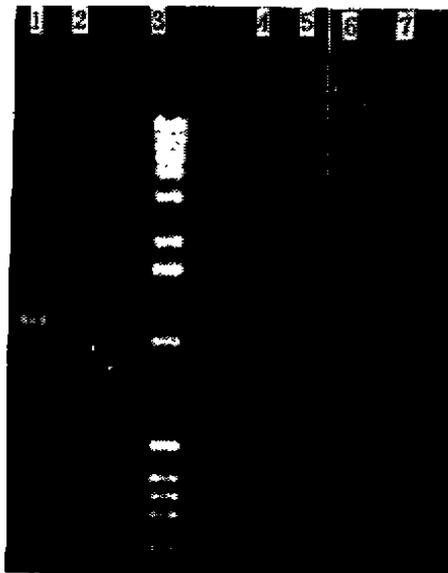


图1 病毒特异核酸的三个组份

1, 2; B; 4, 5; M; 6, 7; T

3: 1kb DNA 分子量标准

Fig. 1 Three components of virus-specific nucleic acids

1, 2; B; 4, 5; M; 6, 7; T

3: 1kb DNA ladder

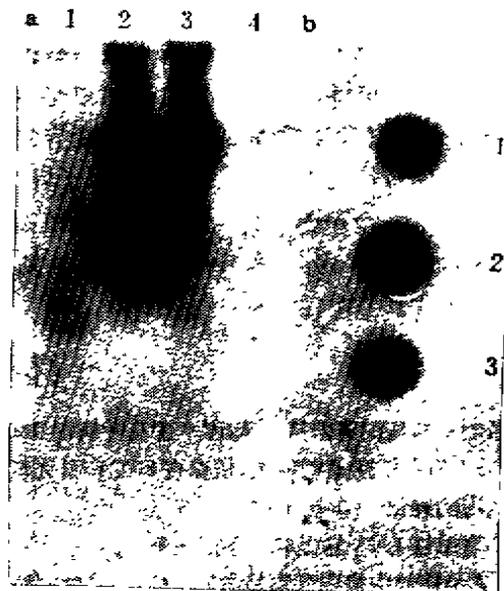


图2 病毒核酸的分子杂交

a: Southern blot; b: Dot blot

1; B; 2; M; 3; T; 4: 健叶对照

Fig. 2 Hybridization of virus nucleic acids

a: Southern blot; b: Dot blot

1; B; 2; M; 3; T; 4: Control

从纯化的病毒中提取的单链 DNA 是制备探针的良好模板,通过 Nick translation, ^{32}P 的标记效率高达 100%,高比活的探针是核酸分子杂交的前提;标记实验还表明病毒单链 DNA 分子中存在部分双链互补结构,因为 Nick translation 的模板需是双链 DNA,被 DNAase I 作用后,造成缺口(Nick)和部分降解,部分降解链可作为引物,以互补链为模板合成探针。

2 病毒侵染植物中的特异核酸

从病毒侵染植物中得到的特异核酸,进一步纯化可得 T, M 和 B 三个组份, B 组份含量高而 T 组份含量低,且 M 中含有两个分子量稍有差别的组份(图 1),全序列分析已经证明了 DNA1 和 DNA2 的存在^[9]。Southern 和 Dot blot 证实 T, M 和 B 三组份都是病毒特异的核酸(图 2)。

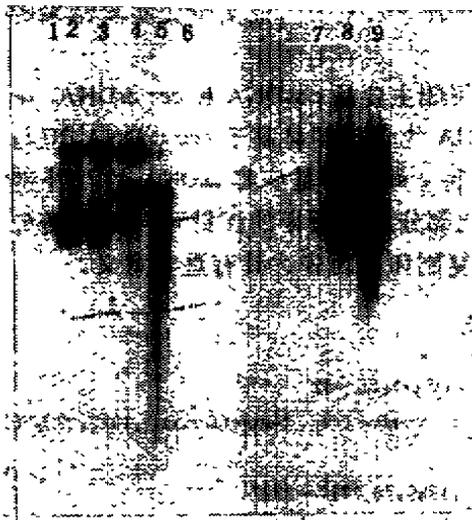


图3 病毒核酸的性质

1,7; 髓叶对照, 2,8; 无酶作用;
3; RNAase; 4; Nuclease S1;
5; 核酸 100℃ 变性后, Nuclease S1;
6; DNAase; 9; Exonuclease ■

Fig. 3 Properties of virus nucleic acid

1,7, Control; 2,8, No enzymes
3; RNAase; 4; Nuclease S1;
5; Nucleic acids denatured at
100℃, Nuclease S1; 6; DNAase;
9; Exonuclease ■

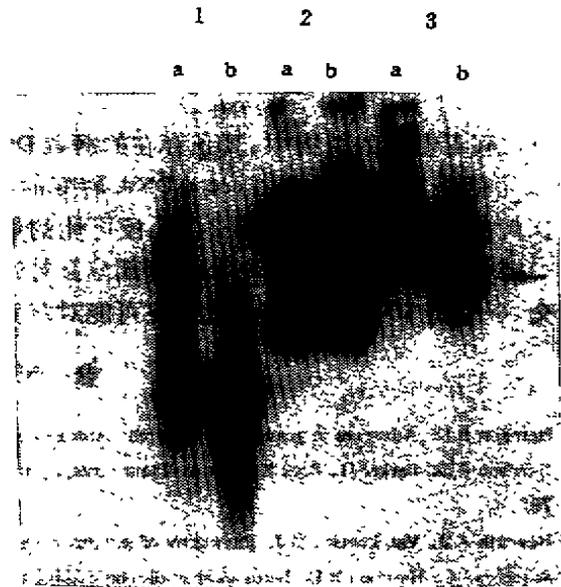


图4 EcoR I 酶切 T, M 和 B 组份

1; B; 2; M; 3; T;
a; 无 EcoR I; b; EcoR I
→ 2.7 kb dsDNA

Fig. 4 EcoR I analysis of T,

M and B components

1; B; 2; M; 3; T;
a; no EcoR I; b; EcoR I
→ 2.7 kb dsDNA

3 侵染植物中病毒核酸的性质

T、M 和 B 三组份都抗 RNAase 而敏感于 DNAase,说明这三个组份核酸都是 DNA 分子,进一步研究表明,从感病的植物中可得到三种构型的病毒特异 DNA 分子:环状单链(B, c ssDNA),共价闭合环状双链(M, ccc dsDNA)和开环双链(T, oc dsDNA)。经 Nuclease SI 处理,B (c ssDNA)被降解,M(ccc dsDNA)部分转变成 T(oc dsDNA),部分形成位于 M 和 T 之间一新的带型,可能是线性 dsDNA 分子,其原因是由于 Nuclease SI 造成 ccc dsDNA 分子内非特异性单链 Nick 或双链断裂所致;核酸样品经 100℃ 热变性后,可被 Nuclease SI 降解成大小不均一的片段;T、M 和 B 三组份都抗 Exonuclease III 的作用,尽管存在某些分子内的切割(图 3)。纯化的 M 组份中常含有大量的 T 组份,ccc dsDNA(M)很容易转变成 oc dsDNA 形式;EcoR I 对 B 不作用,而可以部分降解 M 和 T,形成 2.7kb 大小的线性分子(图 4),与报道的双生病毒基因组大小相似^[1]。电镜观察从 ICMV 侵染的烟草中提取的总核酸(经 RNAase 处理),发现存在病毒特异的 c ssDNA, ccc dsDNA 和 oc dsDNA 三种分子形式,而且 c ssDNA 分子比其他两种类型分子都多,但在健康植物中没有发现这些形式的 DNA 分子(数据未发表),证实杂交实验结果的分析。

在病毒侵染的植物中,真正存在的病毒 DNA 形式可能主要是 c ssDNA 和 ccc dsDNA。oc dsDNA 可能是实验过程中由 ccc dsDNA 转变而成,c ssDNA 的含量明显高于 ccc dsDNA,但与病毒探针的杂交程度却低(图 2,3),极可能的解释是这种 c ssDNA 是病毒 ssDNA 的互补链即(-)链 DNA,由于病毒 ssDNA 含有部分互补结构,由此部分序列所得的探针可与(-)链分子杂交,(-)链 DNA 分子的大量存在可能对双生病毒的复制和基因表达具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Harrison B D. Advances in geminivirus research. *Ann Rev Phytopathol*, 1985,23,55~82
- 2 Harrison B D, Barker H, Bock K R, *et al*. Plant viruses with circular single-stranded DNA. *Nature(London)*, 1977,270,760~762
- 3 Howarth A J, Vandermark G J. Phylogeny of geminiviruses. *J Gen Virol*, 1989,70,2717~2727
- 4 Sequeira J C, Harrison B D. Serological studies on cassava latent virus. *Ann Appl Biol*, 1982,101,33~42
- 5 Robinson D J, Harrison B D, Sequeira J C, *et al*. Detection of strains of African cassava mosaic virus by nucleic acid hybridization and some effects of temperature on their multiplication. *Ann Appl Biol*, 1984,105,483~493
- 6 Hamilton W D O, Bisaro D M, Buck K W. Identification of novel DNA forms in tomato golden mosaic virus infected tissue. evidence for a two component genome. *Nucl Acids Res*, 1982,10,4901~4912
- 7 Rigby P W J, Dieckmann M, Rhodes C, *et al*. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase. *J Mol Biol*, 1977,113,237~251
- 8 Southern E M. Detetion of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975,98,503~517
- 9 洪益国. 水稻条纹叶枯病毒和木薯花叶病毒的分子生物学. [博士学位论文],北京:中国科学院微生物研究所,1990

Specific Nucleic Acids in Host Plant Infected by Indian Cassava Mosaic Geminivirus

Hong Yiguo Wang Xiaofeng Tian Po

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

D. J. Robinson B. D. Harrison

(*Scottish Crop Research Institute, Dundee, DD2 5DA, U. K.*)

Nucleic acids extracted from Indian cassava mosaic geminivirus infected plant leaves (*Nicotiana benthamiana*) and further purified through 1.0% LMT agarose gel electrophoresis were treated with RNAase, DNAase, Nuclease S1, Exonuclease III and restriction endonuclease EcoR I. Two kinds of virus-specific DNA existed in infected plants as shown by Southern and Dot blotting using virus ssDNA probes synthesized by nick translation. These two DNAs were circular double stranded and single stranded DNA (dsDNA and ssDNA) respectively. The dsDNA was in the form of open circular and covalently closed circular molecules (oc and ccc dsDNA). Both oc and ccc dsDNA were digested by EcoR I to produce linear molecules of about 2.7 kb. The virus genome contained two components (DNA1 and DNA2). Furthermore, the circular viral ssDNA in plants was largely the minus stranded not the plus stranded ssDNA reported from virus particles. This may be an important clue to the understanding of processes of geminivirus replication and its gene expression and regulation.

Key words Cassava mosaic virus, Genome, Hybridization