

生物素标记 GFV-cDNA 探针的制备及 在检测葡萄扇叶病毒上的应用

谷洪仓* 严敦余 刘焕庭

(山东农业大学, 泰安 271006)

邱并生√ 王晋芳 田波

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

A
提要 以整合到质粒中的 GFV-cDNA 为模板经 PCR 合成了生物素标记的 GFV 单、双链探针。用合成的探针对提纯的 GFV-RNA₂、感染 GFV 的昆诺藜叶及 18 株葡萄进行 DNA-RNA 杂交检测表明: 检测提纯病毒 RNA₂ 的灵敏度为 1.5 pg/斑点, 感染 GFV 的昆诺藜提取液最高稀释度可达 40960 倍, 11 株显示典型扇叶症状的样品杂交结果均为阳性, 且汁液稀释 400~800 倍仍能测出, 7 株不显示典型扇叶症状的葡萄中 3 株受到 GFV 的侵染。单、双链探针最适使用浓度分别为 1/200 及 1/100。

关键词 葡萄扇叶病毒, cDNA 探针, PCR 技术, 核酸斑点杂交

5432.41
生物毒

葡萄扇叶病在世界各地均有发生, 是葡萄上最为普遍和严重的一种病毒病害, 罹病葡萄可减产 20~80%^[1]。近年来, 许多国家都开展了葡萄脱毒苗的培育和推广, 同时进行了葡萄扇叶病毒(Grapevine Fanleaf Virus, GFV)检测技术的研究。国内、外曾报道用 ELISA^[2-3]及 ³²P 标记的探针检测 GFV^[4]。这些方法在应用上均存在一些问题, 前者灵敏度稍低, 后者对环境有一定污染等。最近几年, 生物素标记核酸探针检测植物病毒及类病毒的研究^[5,6]引起了国内外广泛重视。生物素标记核酸探针最常用方法为缺口翻译法, 仅就缺口翻译本身而言, 就需二种不同的操作。聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术只需一步操作即可合成核酸探针, 且生物素掺入量较高^[8]。我们根据 GFV 已知的核酸序列利用 PCR 技术合成了生物素标记的 GFV-cDNA 单、双链探针, 并采用核酸斑点杂交法, 分别检测了提纯的 GFV-RNA₂, 感染 GFV 的昆诺藜及葡萄样品, 并同时单、双链探针检测结果作了比较。现将结果报道如下:

材料和方法

1 GFV-RNA₂ 的提取及引物的合成

1.1 病毒的提纯 GFV 毒源由中国农科院果树研究所刘福昌先生提供。繁殖于昆诺藜(*Chenopodium quinoa*)上, 接种 15 天后采收, 病毒的粗提纯基本参照 Pink 等^[9]的方法。粗提纯病毒的进一步提纯参照 Quacquarelli

本文于 1992 年 8 月 14 日收到, 1993 年 9 月 10 日修回

• 现在工作单位: 山东省果树研究所, 地址: 泰安市龙潭路 64 号, 邮编 271000

等^[10]的方法。精提纯的 M 带病毒用于 GFV-RNA₂ 的提取。

1.2 GFV-RNA₂ 的提取 方法参考文献^[11], 提取的 GFV-RNA₂ 用作 cDNA 合成的母本链。

1.3 引物的合成 参照 Serghini 报道^[12]的 GFV-RNA₂ 序列设计 5' 及 3' 端引物。5' 端引物(引物 1)的序列为: 5'CTGAGCTCAACCATGAGAGGA3', 3' 端引物(引物 2)序列为: 5'TTAAAGTCAGATACCTGGAC3'。引物经中国科学院微生物所技术室 DNA 合成仪合成。

2 GFV-cDNA 的合成及克隆

2.1 GFV-cDNA 合成 GFV-RNA₂ 经热变性后, 按试剂盒说明, 用上述合成的引物合成 cDNA。

2.2 克隆 采用 Sambrook 等方法, 以 pBluescript ks 为载体经 Sma I 酶切成平末端, 转化 *E. coli* XLI-Blue, 转化物涂于含 50 μg/ml Amp 及 X-gal 和 IPTG 培养基上, 37℃ 培养过夜, 挑选白色克隆。将选出的克隆扩大培养, 抽提质粒, 用限制性内切酶酶解后电泳分析。

3 核酸探针的制备

3.1 探针的制备 参照 Emanuel 的方法^[13], 取上述抽提质粒, 加 TE(pH8.0) 适量溶解。取 5 μl 用作 PCR 扩增的母本链, 加入 10× 扩增缓冲液 10 μl, 2 mmol/L dNTP 5 μl, Bio-11-dUTP 5 μl, DNA 高温聚合酶 1.25 μl, 50 pmol/L 引物 1 及引物 2 各 1 μl (合成双链探针用量) 或加入 1 μl 引物 1 及 0.01 μl 的引物 2 (合成单链探针用量), 加 H₂O 使总体积达 100 μl 后置 PCR 扩增仪扩增, 合成探针经电泳分析后, 检测生物素掺入量。

3.2 合成探针的检测 参照 BRL 公司非放射性核酸系统检测手册。

4 核酸斑点杂交

4.1 样品制备 将昆诺藜或葡萄叶片约 0.2g 液氮研磨成粉末状, 加 0.55 ml RNA 提取液(0.2 mol/L Tris·HCl pH 9.0, 0.4 mol/L LiCl, 25 mmol/L EDTA, 1% SDS) 混匀, 加等体积酚混匀, 12000r/m 离心 2 分钟, 取上清液再次用酚抽提, 上清液加等体积氯仿混匀后 12000r/m 离心 2 分钟, 上清液再用酚抽提, 所得上清加等体积氯仿混匀后 12000r/m 离心 5 分钟, 取上清液 50 μl/L 加 3 mol/L 乙酸钠(pH5.0) 及 2.5 倍体积的无水乙醇, 4℃ 下放置半小时, 12000r/m 离心 5 分钟, 沉淀加 0.3 ml 2 mol/L LiCl 悬浮, 再加 30 μl 3 mol/L 乙酸钠及 2.5 倍体积无水乙醇, 4℃ 下放置 30 分钟, 离心弃上清, 沉淀用二乙基焦碳酸酯(DEPC)处理的蒸馏水 50 μl 悬浮。-70℃ 保存备用。GFV-RNA₂ 的提取方法为: 100 μl 精提纯 M 带病毒加等体积酚混匀后 10000r/m 离心 1 分钟, 上清加等体积酚-氯仿(1:1) 混匀, 然后再次离心, 上清加 2.5 倍体积的乙醇及 50 μl 3 mol/L 乙酸钠, 40℃ 放置 30 分钟后离心, 沉淀用 DEPC 处理蒸馏水 50 μl 悬浮。GFV-RNA₂ 含量测定参照文献^[14]。

样品在斑点杂交前先经变性处理, 处理方法采用甲醛变性法。

4.2 斑点杂交 将硝酸纤维素膜(NC 膜, 北京化工学校附属工厂生产, 孔径 0.45 μm) 在无菌水中浸透, 再经 10×SSC 浸泡 15 分钟, 取出晾干, 每个样品点样 1 μl, 然后将 NC 膜置 80℃ 干燥 2 小时。

斑点杂交的方法参照文献^[15]报道, 检测葡萄样品时, 阳性对照用提纯的 GFV-RNA₂ 1:100 稀释液, 阴性对照用实生葡萄叶片提取液。

结果与分析

1 cDNA 的合成与克隆

以 GFV-RNA₂ 为模板经逆转录合成了 GFV 外壳蛋白基因的 cDNA, 然后再以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增样品经凝胶电泳分析表明, 合成了长度为 1.5 kb 的 GFV 外壳蛋白基因。合成的基因经与酶切后的质粒进行钝端连接后, 被成功地转入到 *E. coli* 细胞中, 见图 1。

2 探针中生物素掺入量的测定结果

以重组质粒中病毒外壳蛋白基因 cDNA 为模板合成了长度为 1.5 kb 生物素标记的单、双链探针。合成的探针经不同梯度稀释后检测表明, 双链探针经 20000 倍稀释、单链探针经

10000 倍稀释后仍有信号出现,这证明生物素-11-dUTP 经 PCR 大量掺入到单、双链探针,见图 2。

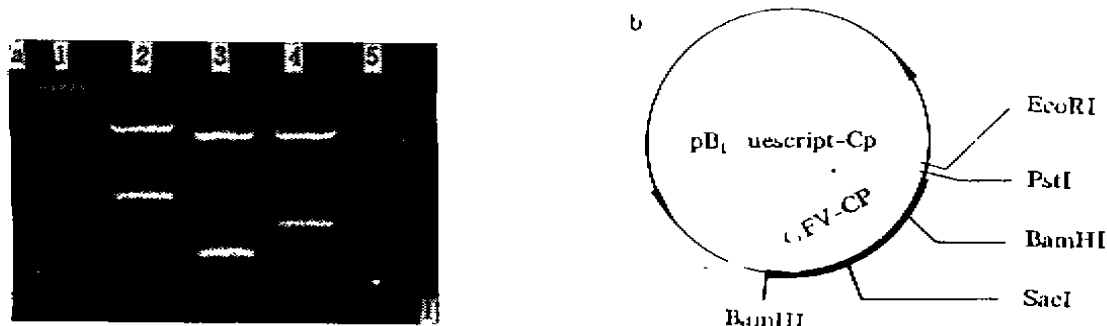


图1 GFV-CP 基因的酶切图谱分析。a. 重组质粒的琼脂糖凝胶电泳, b. GFV-CP 基因酶切图谱。

1. 标准分子量(Sppl+EcoR I), 2. BamH I 单酶切, 3. BamH I +SacI 双酶切,
4. EcoR I +SacI 双酶切, 5. pBluescript-CP.

Fig. 1 Analysis of the coat protein gene map of Grapevine Fanleaf Virus.

a. Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid. b. The coat protein gene map.

1. Marker of MW(Sppl+EcoRI), 2. digested with BamHI, 3. digested with BamHI & SacI,
4. digested with EcoRI & SacI, 5. pBluescript-CP.

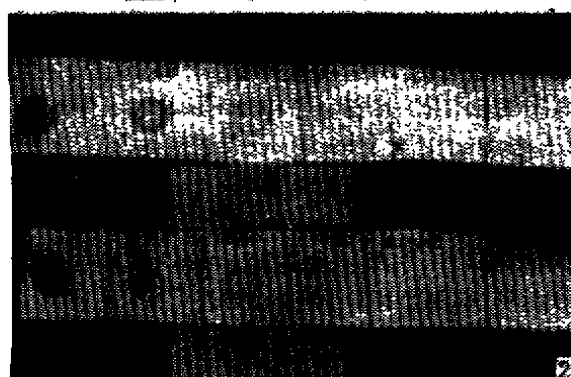


图2 单链(A)双链(B)探针中生物素-11-dUTP 掺入量测定结果

从左到右稀释度为 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:20000 阴性对照

Fig. 2 Detection of biotin-11-dUTP in biotin-labelled SS (A) ds(B)-probe

Dilution(from left to right) 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:20000, CK(negative control)

3 斑点杂交结果

3.1 探针浓度对杂交灵敏的影响

单链探针 800 倍稀释时杂交信号较弱,随探针浓度的增加信号逐渐增强,但稀释小于 200 倍时杂交信号变化不明显。双链探针 800 倍稀释时,信号极弱,随探针浓度增加,杂交信号逐渐增强,但与 50 倍与 100 倍稀释的探针杂交结果接近。结果还表明 100 倍稀释的双链探针与 200 倍稀释的单链探针杂交结果相近,可作为探针检测用的工作浓度,见图 3。

3.2 灵敏度与特异性测定结果

提纯的 GFV-RNA₂, 健康及感染 GFV 的昆诺藜提取液经不同梯度稀释后检测表明,斑点杂交可检测 GFV-RNA₂ 的最低量为 1.5pg/斑点。可检测昆诺藜病叶提取液最大稀释倍数为

40960 倍,健康对照无杂交信号出现,见图 3。

3.3 葡萄样品的检测

18 株不同品种的葡萄样品经 1/10,1/50,1/100,1/200,1/400,1/800 6 个不同梯度稀释后,分别用单链探针(1/200)及双链探针(1/100)进行测定表明,11 株显示典型扇叶症状的葡萄样品经 400~800 倍稀释后仍为阳性,而不表现扇叶症状的样品中,有 3 个样品为阳性,证明这 3 株葡萄已受到 GFV 的侵染,见图 4。

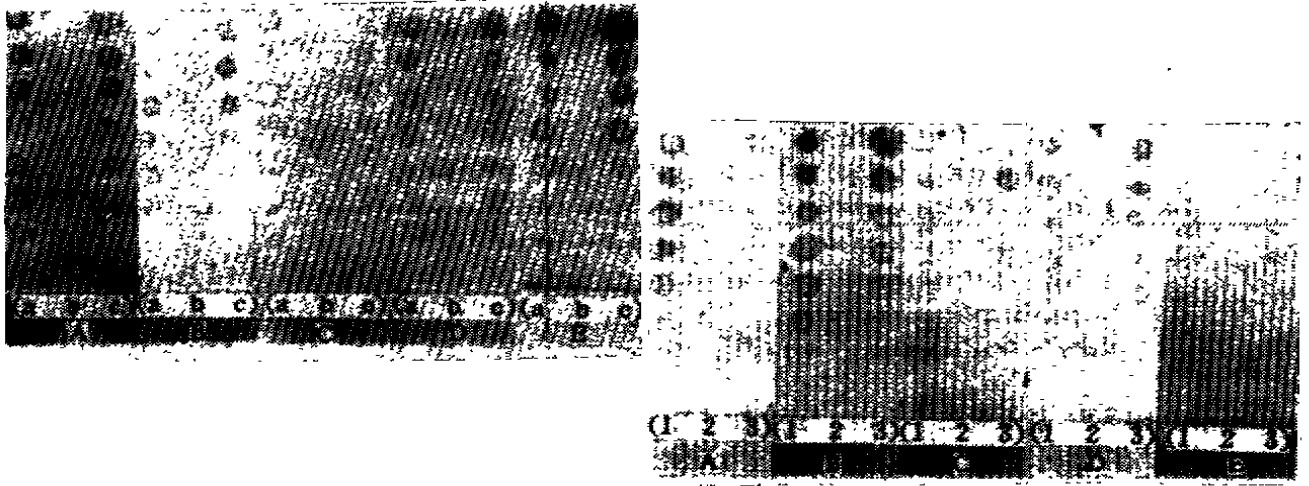


图 3 单链(图 3A)和双链(图 3B)探针检测 GFV-RNA,昆诺藜病叶提取液的结果
 a(或 1)昆诺藜病叶汁液,稀释度自上而下为 1,1:10,1:40,1:160,1:640,1:2560,1:10240,1:40960。
 b(或 2)昆诺藜健康叶汁液,稀释度自上而下为 1:10,1:40,1:160,1:640,1:2560,1:10240,1:40960。
 c(或 3)提纯的 GFV-RNA,GFV-RNA₂ 的量自上而下为:1.5×10⁶pg,1.5×10⁴pg,1.5×10³pg,
 1.5×10²pg,15pg,1.5pg,1.5×10⁻¹pg,1.5×10⁻²pg。
 探针浓度:A 1:50,B 1:100,C 1:100,D 1:400,E 1:800

Fig. 3 Detection of GFV-RNA and extract of the leaves of *C. quinoa* infected with GFV by dot blot hybridization using ss(Fig3A) and ds(Fig3B) probe

- a. (or 1) extract of the leaves of *C. quinoa* infected with GFV. dilution (from top to bottom) 1, 1:10, 1:40, 1:160, 1:640, 1:2560, 1:10240, 1:40960
 b. (or 2) extract of the healthy leaves of *C. quinoa*. dilution (from top to bottom) 1, 1:10, 1:40, 1:160, 1:640, 1:2560, 1:10240, 1:40960
 c. (or 3) purified GFV-RNA, (from top to bottom) 1.5×10⁶pg, 1.5×10⁴pg, 1.5×10³pg, 1.5×10²pg, 1.5pg, 1.5pg, 1.5×10⁻¹pg, 1.5×10⁻²pg.
 probe dilution A 1:50, B 1:100 C 1:200 D 1:400 E 1:800

讨 论

生物素标记的核酸探针已被成功地应用于某些植物病毒及类病毒的检测。目前国内外尚未见到生物素标记的 GFV-cDNA 探针合成及应用的报道。国外最近有人^[4]报道用³²P 标记的 GFV-cDNA 探针检测 GFV-RNA 最低检出量为 pg 水平。我们用生物素标记的 GFV-cDNA 探针

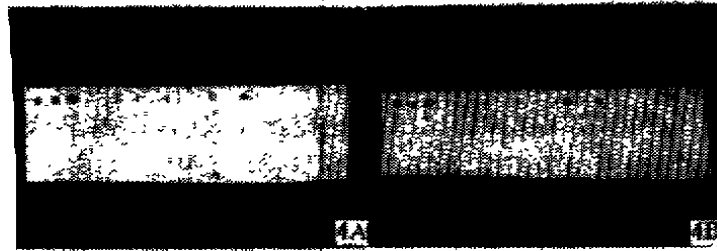


图4 单链(A)和双链(B)探针检测葡萄样品 GFV-RNA

1~3, 6~9, 13~16 为表现典型扇叶症状的样品。

4~5, 10~12, 17~18, 为不表现扇叶症状的样品。

19, 阳性对照, 20, 阴性对照。

样品稀释度(自上而下)1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800。

Fig. 4 Detection of GFV-RNA in grapevine leaves extract by dot-blot hybridization with ss(A), ds(B)biotin-labelled probes.

1~3, 6~9, 13~16 grapevine samples with typical fanleaf symptoms.

4~5, 10~12, 17~18 grapevine samples without fanleaf symptoms.

19, positive, 20, negative control

dilution (from top to bottom) 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800

检出的 RNA 最低量达 1.5 pg。与³²P 标记的 cDNA 探针相比,生物素标记的 cDNA 探针具有稳定、贮存时间长的优点,在-20℃下至少可贮存一年,而且对人体无危害,应用较方便。

PCR 技术是 80 年代后期发展起来的一种基因体外扩增技术,我们首先采用这一技术合成了生物素标记的 GFV-cDNA 单、双链探针。从结果看来,合成的双链探针中生物素-11-dUTP 掺入量高于单链探针的掺入量,但两种探针用于检测最低检出量均可达到 pg 水平。在检测时使用单链探针的浓度为 1/200,双链探针的浓度为 1/100,达到基本相似的结果。这是因为在杂交过程中,双链探针的两条链部分相互结合,因而使用双链探针应用较高的浓度。用生物素标记的探针检测植物病毒是一种灵敏度高、特异性强的先进技术,但在检测过程中对检测样品的制备要求较高,今后如能使样品制备过程简化,并使生物素标记的 GFV-cDNA 探针在葡萄扇叶病毒检测中得到广泛的推广应用,将在生产中带来巨大的经济效益。

参 考 文 献

- 1 Frazier N W. Virus Diseases of Small Fruits and Grapevines. Berkeley: University of California, 1970, 195~271
- 2 Huss B, Walter B, Etienne L, *et al.* Grapevine fanleaf virus detection in various grapevine organs using polyclonal and monoclonal antibodies. *Vitis*, 1986, 25: 178~188
- 3 蔡文启, 郭德银, 徐绍华, 等. 葡萄扇叶病毒的分离、鉴定、提纯及血清学研究. *植物病理学报*, 1990, 20(2): 99~105
- 4 Fuchs M, Pink M, Etienne L, *et al.* Characterization and detection of grapevine fanleaf virus by using cDNA probes. *Phytopathology*, 1991, 81(5): 559~566
- 5 Eweida M, Xu H, Singh R P, *et al.* Comparison between ELISA and biotin-labelled probes from cloned cDNA of potato virus X for the detection of virus in crude tuber extracts. *Plant Pathology*, 1990, 39: 623~628
- 6 张鹤龄, 曹先维, Balbo I, 等. 用生物素标记的 cDNA 探针检测马铃薯纺锤块茎类病毒. *病毒学报*, 1989, 5(1): 72~75
- 7 Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T, *et al.* *Molecular Cloning* 2nd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

- 8 Bodnarczuk T A, Wiggins R C, Konat G W. Generation of high efficiency, single-stranded DNA hybridization probes by PCR. *Biofeedback*, 1991, 10(4): 478
- 9 Pink L, Fuchs M, Pink M, *et al.* A satellite RNA in grapevine fanleaf virus strain F13. *J. Gen. Virol.*, 1988, 69: 233~239
- 10 Quacquarelli A, Gallitelli D, Savino V, *et al.* Properties of grapevine fanleaf virus. *J. Gen. Virol.*, 1976, 32: 349~360
- 11 Yamada O, Matsumoto T, Nakashima M, *et al.* A new method for extracting DNA or RNA for polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 1990, 27: 203~210
- 12 Serghini M A, Fuchs M, Pink M, *et al.* RNA₂ of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *J. Gen. Virol.*, 1990, 71: 1433~1441
- 13 Emanuel J R. Simple and efficient system for synthesis of nonradioactive nucleic acid hybridization probes using PCR. *Nucleic acids research*. 1991, 19(20): 2790
- 14 华美生物工程公司编著. 现代分子生物学研究技术. 1989, 31(内部资料)

Detection of Grapevine Fanleaf Virus by Dot-blot Hybridization with Biotin-labelled GFV-cDNA Probe

Gu Hongcang Yan Dunyu Liu Hunting

(Shandong Agricultural University, Taian City, Shandong Province 271018)

Qiu Bingsheng Wang Jinfang Tian Bo

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

The 5' and 3'-primers of 21 bp of GFV coat protein gene were synthesized according to the GFV-RNA sequence. The cDNA of GFV coat protein gene was synthesized with reverse transcriptase using 3'-primer and GFV-RNA extracted from the purified virus as template. Then the ds-cDNA was amplified by PCR technique employing GFV-RNA₂:ss-cDNA as templates and 5', 3'-primers and ligated with pBluescript ks. The ds-cDNA were transformed into Ecoli XLI-Blue cells. The biotin-labelled ss, ds-cDNA probes were generated by PCR technique using the cDNA extracted from the recombinant clones of *E. coli* cells.

The biotin-labelled ss, ds-probes have been used for the detection of purified GFV-RNA, GFV-infected *C. quinoa* and 18 grapevine leaves by nucleic acid dot-blot hybridization. The minimal amount of purified GFV-RNA₂ which gave the visible signal was 1.5pg/test dot and the maximum dilution of GFV-infected *C. quinoa* extract which gave visible signal was 1:40960. 11 samples with typical symptoms were positive and some of them could give the signal when they were diluted 1:400~1:800. 3 samples out of 7 symptomless leaves were positive. The optimum dilution of ss and ds-cDNA probes were 1:100 and 1:200.

Key words Grapevine Fanleaf Virus, PCR technique, cDNA Probe, Nucleic acid dot-blot Hybridization