

## 用<sup>32</sup>P 标记 cDNA 探针进行核酸斑点杂交 检测马铃薯卷叶病毒(PLRV)\*

扈惠平 哈斯阿古拉 张鹤龄

(内蒙古大学生物系,呼和浩特市 010021)

5432.4f

A

**提要** 利用克隆的马铃薯卷叶病毒(PLRV)外壳蛋白(CP)基因 cDNA,用切口平移法制成<sup>32</sup>P 标记探针,通过核酸斑点杂交,对马铃薯卷叶病毒 RNA,提纯的马铃薯卷叶病毒和感染 PLRV 的马铃薯茎、叶、块茎及带毒桃蚜进行了检测。结果表明:PLRV-CP 基因的 cDNA 探针特异性强,灵敏度高。可测出提纯的 PLRV-RNA 的最低量为 40pg,感病马铃薯植株茎叶提取液的最高浓度为 1:75。探针只与 PLRV 及其 RNA 反应,而不与 PVY、PVS 等病毒及其 RNA 反应。从而为马铃薯卷叶病毒的有效诊断,建立了一项比血清学更为可靠、灵敏、特异性强,同时又适于大量样品检测的分子生物学方法。

**关键词** 马铃薯卷叶病毒, <sup>32</sup>P 标记 cDNA 探针, 核酸斑点杂交, 诊断

cDNA 探针

马铃薯卷叶病毒(Potato Leafroll Virus)属黄化病毒组(Luteovirus)<sup>[1]</sup>,是以多种蚜虫为介体,以持续性方式严格虫传的一种病毒。可造成马铃薯植株黄化、矮缩、卷叶、僵化及块茎网状坏死等症状,严重影响马铃薯产量和品质。PLRV 分布广泛,难于控制,是危害全球马铃薯生产最严重的病毒之一<sup>[2]</sup>。因此建立可靠、灵敏而特异的检测方法具有重要的经济意义。

用核酸分子杂交技术检测病毒基因组的方法已越来越广泛应用于各种植物病毒的鉴定。国外,Baulcome 等用此法对马铃薯 X 病毒(PVX)、马铃薯 Y 病毒(PVY)及马铃薯卷叶病毒(PLRV)进行了检测,结果发现核酸斑点杂交法检测马铃薯病毒在灵敏度、特异性、重复性方面均优于 ELISA 法<sup>[3]</sup>。

本文报告用<sup>32</sup>P 标记由本室合成的 PLRV 外壳蛋白基因 cDNA 探针<sup>[4]</sup>和以随机引物合成的 cDNA 探针<sup>[5]</sup>,用核酸斑点杂交技术,检测纯化的 PLRV、PLRV-RNA 以及感病植株汁液中 PLRV 的实验结果。

### 材料与amp;方法

#### 1 材料

- 1.1 PLRV-CP 基因 cDNA 重组质粒 pLCP2<sup>[4]</sup>和随机引物合成的 cDNA 重组质粒 pLR6<sup>[5]</sup>,由本实验室制备和提供。
- 1.2 PLRV 系分离自内蒙古自治区呼和浩特市地区马铃薯主栽品种“紫花白”的分离物,由本室分离、鉴定及保存。
- 1.3 感染 PLRV 的马铃薯植株为内蒙古大学网室中经蚜虫接种 PLRV 的马铃薯植株和实验田小区中马铃薯

本文于 1993 年 12 月 13 日收到,1994 年 4 月 28 日修回

\* 本项目由国际马铃薯中心(CIP)资助

植株。

1.4 带毒桃蚜是经过在感染 PLRV 的马铃薯植株上饲毒后的无翅桃蚜。

## 2 实验方法

2.1 病毒的提纯及其 RNA 的提取 将 PLRV 增殖在网室中种植的脱毒马铃薯“紫花白”上,待出现典型症状时收集茎叶, -20℃冰柜中保存。病毒的提纯参考本室以前报道的方法<sup>[6]</sup>。病毒 RNA 采用 SDS-酚法提取<sup>[7]</sup>。

2.2 待测样品的制备 方法 1:取 1g 茎叶组织,置于塑料袋中,加入 2ml 提取缓冲液(含 50mmol/L Tris-HCl pH7.5, 5mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl),加入 0.1g SDS, 0.1ml 巯基乙醇及 1ml TE 饱和酚,迅速研磨。再加入 1ml 饱和酚和 2ml 氯仿,彻底研碎,离心收集上清,即可做点样之用。方法 2:取 1g 茎叶,加入 1ml 提取液(20×SSC 和甲醛 1:1 混合液),研碎,加入水饱和酚:氯仿(1:1)混合液 2ml,混合乳化 1 分钟,放入 4℃冰箱中过夜,第二天取上清,用于点样。方法 3:取 1g 茎叶,加入 2ml 提取缓冲液(50mmol/L PB<sup>+</sup> pH7.5),研碎后离心取上清,做点样用。方法 4:取 1g 茎叶,加入 2ml 提取缓冲液(50mmol/L Tris-HCl pH7.5, 5mmol/L 铜试剂, 5mmol/L EDTA, 1% TritonX-100),研碎后,离心取上清点样。方法 5:取 1g 茎叶,加入 1ml 提取缓冲液(20×SSC:甲醛 1:1 混合液)研碎后,离心取上清点样。

桃蚜的处理:取饲毒过的桃蚜 100 头,加入 0.2ml 提取液(50mmol/L Tris-HCl pH7.5, 5mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl), 0.01g SDS, 0.01ml 巯基乙醇和 0.1ml TE 饱和酚,研碎后,再加入 0.1ml TE 饱和酚及 0.2ml 氯仿,乳化 1 分钟,离心取上清,经甲醛处理后点样。

2.3 pLCP2 和 pLR6 质粒扩增和提取 将含 pLCP2 和 pLR6 质粒的大肠杆菌 JM103,分别接种于 20ml LB 培养液(含 Amp 50μg/ml)中 37℃振荡培养过夜。第二天离心收集菌体,采用一般的碱法提取质粒<sup>[8]</sup>。

2.4 NC 膜的处理及点样 将国产 NC 膜,放入无菌水中浸泡 10 分钟,取出放入 20×SSC(3mol/L NaCl, 0.3 mol/L Na<sub>2</sub>Citrate·2H<sub>2</sub>O, pH7.0)中浸泡 10 分钟,再换 20×SSC 浸泡 10 分钟,取出 NC 膜于滤纸上,室温晾干 2 小时,放入 60℃温箱中过夜。第二天取出夹于干净滤纸中备用。

将待测样品加入甲醛(终浓度 7%)混合,55℃保温 15 分钟,即可点样。取处理好的 NC 膜,在膜上每斑点点样 5μl 晾干,然后于 80℃烤箱烘烤 2 小时,取出待杂交。为测定探针灵敏度,我们将纯化的 PLRV-RNA 液做一系列稀释(5×),每斑点点样 5μl,含 25ng-10pg RNA。病株提取液也做一系列稀释(5×)。质粒 DNA 煮沸 10 分钟后点样。

2.5 [<sup>32</sup>P]dATP 标记 cDNA 探针 我们采用切口平移法标记探针<sup>[9]</sup>。取 0.2μl 点在 DE-81 滤纸上,检测探针标记放射性活度。探针用量为 10<sup>4</sup>CPM/ml。

2.6 杂交、洗涤和放射自显影<sup>[9]</sup> 首先将待杂交的 NC 膜,于 6×SSC 中浸湿,取出放入杂交袋中,加入预杂交液(50%去离子甲酰胺, 6×SSC pH7.0, 5×Denhardt's, 0.5mg/ml 变性鱼精 DNA, 25mmol/L Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH6.5),于 42℃水浴中预杂交 4 小时。然后弃去预杂交液,加入杂交液(45%去离子甲酰胺, 6×SSC pH7.0, 1×Denhardt's, 20mmol/L Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH6.5, 0.2mg/ml 变性鱼精 DNA, 5%硫酸葡聚糖, 10<sup>5</sup>CPM/ml 新变性的<sup>32</sup>P-cDNA 探针)。于 42℃水浴中,反应 24 小时。先用 6×SSC/0.1%SDS 溶液,室温下洗膜 3 次,每次 10 分钟。然后用 2×SSC/0.1%SDS,室温下洗膜 3 次,每次 10 分钟。再用 1×SSC/0.1%SDS,于 50℃下洗 3 次,每次 10 分钟。用保鲜膜包好洗涤后的 NC 膜,放在 X 光片暗盒中,把 X 光片覆盖其上,加上增感屏,-80℃冰柜中放射自显影 2-4 天。

## 结 果

### 1 探针灵敏度的测定

用<sup>32</sup>P 标记的 pLCP2 探针和 pLR6 探针分别与 PLRV-RNA、PLRV 颗粒及用方法 1 制备的感染 PLRV 的茎叶提取液进行斑点杂交。实验结果表明:两种探针比较结果,探针 pLCP2 杂交效果优于 pLR6。用 pLCP2 探针可测出 PLRV-RNA 最低含量为 40pg。而未经甲醛处理的 PLRV-RNA,每斑点含量 800pg 方可被检出。然而纯化的 PLRV 颗粒经甲醛处理与不经处理对杂交结

果无明显影响。当 PLRV 颗粒含量为 5ng 时可被检出。PLRV 感染茎叶提取液可检出的最高稀释度可达 1:75(见图 1)。探针 pLR6 与 PLRV-RNA、PLRV 粒体杂交信号弱, 但与感染 PLRV 茎、叶提取液的杂交信号却比较强。

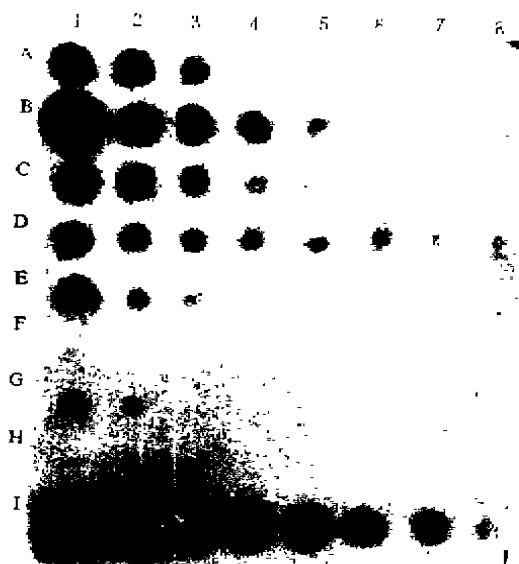


图 1 探针灵敏度测定

- I: pLCP2 为探针 II: pLR6 为探针
- A. 未经甲醛处理的 PLRV-RNA(原液含 100ngRNA)
- B. PLRV-RNA(原液含 25ng RNA)
- C. 未经甲醛处理 PLRV 颗粒(原液含 700ng 病毒)
- D. PLRV 颗粒(原液含 600ng 病毒)
- E. 感染 PLRV 茎叶汁液(原液为稀释 3× 的汁液)
- F. 正常马铃薯汁液(原液为稀释 3× 的汁液)
- G. 未经甲醛处理的 PLRV 感染茎叶汁液(原液为稀释 3× 的汁液)
- H. 正常马铃薯对照(原液为稀释 3× 的汁液)
- I. pLCP2 质粒(原液含 250ng DNA)
- (从左至右稀释倍数为: 1×, .5×, .25×, .125×, .625×, .3125×, .15625×, .78125×)

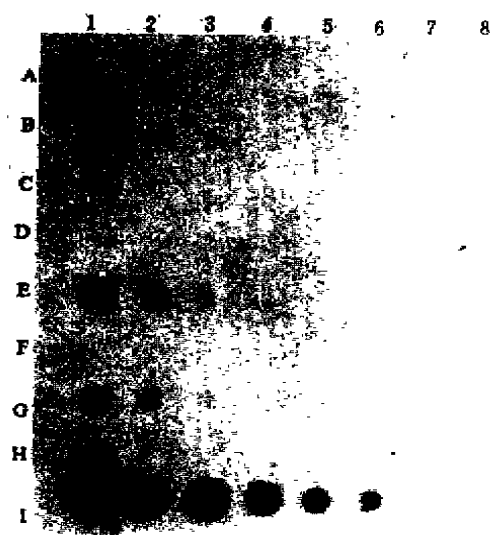


Fig 1 Sensitivity of the probes

- I: pLCP2 as probe II: pLR6 as probe
- A. PLRV-RNA(not treated with formaldehyde)
- B. PLRV-RNA
- C. PLRV(not treated with formaldehyde)
- D. PLRV particles
- E. Extract of PLRV-infected potato stems and leaves
- F. Extract of healthy potato
- G. Extract of PLRV-infected potato (not treated with formaldehyde)
- H. Extract of healthy potato
- I. pLCP2 plasmid
- (Dilution from left to right: 1×, .5×, .25×, .125×, .625×, .3125×, .15625×, .78125×)

## 2 pLCP2 探针的特异性

为了测定 pLCP2 探针检测 PLRV 的特异性, 我们将其与其它马铃薯病毒 RNA 进行杂交, 其结果见图 2。实验结果表明, pLCP2 探针完全不与 PVY、PVS 及其 RNA 杂交。说明 pLCP2 探针有高度特异性。

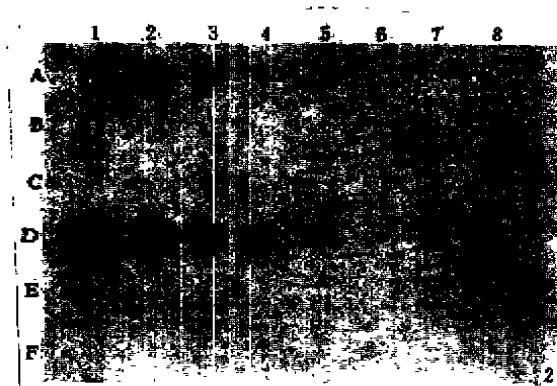


图2 pLCP2 cDNA 探针特异性测定(原液含 700ng 病毒或 25ng RNA)

A. PLRV 颗粒 B. PVY 颗粒 C. PVS 颗粒  
D. PLRV-RNA E. PVY-RNA F. PVS-RNA  
(从左向右依次稀释 5 倍)

Fig. 2 Specificity of pLCP2 cDNA probe

A. PLRV particles B. PVY particles C. PVS particles  
D. PLRV-RNA E. PVY-RNA F. PVS-RNA  
(5 times dilution from left to right)

### 3 马铃薯茎叶汁液不同提取方法的比较

我们采集网室中感染 PLRV“紫白花”幼嫩茎叶,分别用五种不同的方法(见材料方法)提取汁液、点样,与 pLCP2 探针杂交。实验结果表明,用方法 1 提取的汁液杂交效果最好,尤其经甲醛处理后点样时,杂交信号强,稀释倍数可达 1:75。而其它几种提取方法结果基本相同,灵敏度较差。

### 4 用 pLCP2 探针检测桃蚜中的 PLRV

我们将饲毒桃蚜处理后,点样,第一个斑点点样量相当于 2 头桃蚜,以下按 2× 稀释。结果见图 3。试验结果表明,当含量相当于 0.5 头蚜虫时,用 pLCP2 探针即可检测出其中的 PLRV。

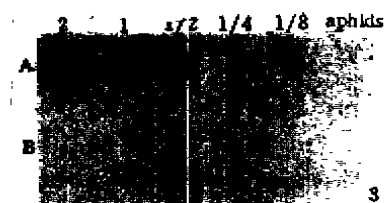


图3 用 pLCP2 cDNA 探针检测桃蚜中的 PLRV

A. 经饲毒 PLRV 的桃蚜 B. 无毒桃蚜

Fig. 3 Detection of PLRV in *Myzus persicae* by pLCP2 cDNA probe

A. Viruliferous *Myzus persicae* B. Normal *Myzus persicae*

### 5 不同取材部位的检测

我们取感染 PLRV 的马铃薯植株的不同部位,茎、叶和块茎,用 pLCP2 探针核酸斑点杂交进行检测,结果表明,感染 PLRV 的茎提取液的杂交信号最强,依次为叶片、块茎芽眼、块茎脐部。说明茎中 PLRV 含量较高。此外,在休眠的马铃薯块茎中也含有相当数量的 PLRV(见图 4)。

### 6 未知样品的测定

我们随机收集实验田小区中的一些“紫花白”马铃薯植株,其中有的呈现感染 PLRV 的症状,有的则没有症状。经处理点样,用 pLCP2 探针杂交。结果表明,检测的 32 株马铃薯中,9 个样品为阳性(见图 5)。

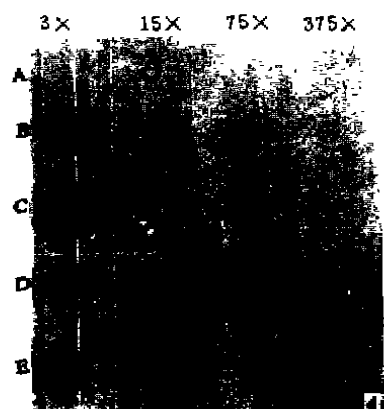


图 4 用 pLCP2 探针检测马铃薯植株不同部位的 PLRV

A. 无毒苗对照 B. 感染 PLRV 叶片提取液 C. 感染 PLRV 茎提取液 D. 感染 PLRV 块茎芽眼部位提取液 E. 感染 PLRV 块茎脐部提取液 (从左至右稀释倍数为: 3×, 15×, 75×, 375×)

Fig. 4 Detection of PLRV in different part of potato plant with pLCP2 probe by NASH

A. Virus free plantlets B. Extract of PLRV-infected leaves C. Extract of PLRV-infected stems D. Extract of eyes region of PLRV-infected tuber E. Extract of heel end of PLRV-infected tuber (Dilution from left to right: 3×, 15×, 75×, 375×)

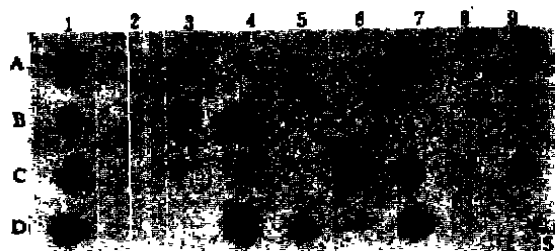


图 5 <sup>32</sup>P 标记 pLCP2 cDNA 探针检测“紫花白”品种中 PLRV。C<sub>1</sub> 和 D<sub>7</sub> 为阳性对照, C<sub>2</sub> 和 D<sub>8</sub> 为阴性对照, 其它样品均为待测样品。

Fig. 5 Detection of PLRV in potato cultivar "Purple flower white" with pLCP2 cDNA probe. C<sub>1</sub> and D<sub>7</sub> are positive control, and C<sub>2</sub> and D<sub>8</sub> are negative control. The others are samples tested.

## 讨 论

近年来,分子杂交技术已广泛用于植物病毒的检测,在某些植物病毒检测方面,它比 ELISA 更具有优越性。用于杂交的 cDNA 探针可以很容易地在重组质粒中扩增,不需要大量提纯病毒,也不需要制备高效价抗血清。其次,用 cDNA 探针进行核酸分子杂交的结果可靠,且适于检测大量样品。此外,试验证明应用<sup>32</sup>P 标记的 pLCP2 的 cDNA 探针检测有很高的灵敏度和很强的特异性。茎叶提取液杂交结果与 ELISA 检测的结果比较表明,用 cDNA 探针可检出感染 PLRV 汁液稀释倍数高达 75 倍,而 ELISA 检测感染 PLRV 汁液的最高稀释度只能达到 12 倍<sup>[10]</sup>。用核酸斑点杂交检测 PLRV 的灵敏度远高于 ELISA。这一技术可应用于马铃薯脱毒种薯检验,抗病毒育种,育种亲本选择以及种质资源评价<sup>[3]</sup>。

马铃薯卷叶病毒不能通过汁液传播,而是严格虫传。本文用 pLCP2 探针,对蚜虫进行了检测,结果发现,相当于 0.5 头经饲毒的桃蚜中的 PLRV 即可被检出,这一试验结果对于带毒蚜虫测报有实际意义。

本文还比较了 pLCP2 探针和 pLR6 探针的杂交结果。pLCP2 cDNA 是 PLRV 的 CP 基因全长 cDNA,而 pLR6 是随机引物合成的,大小为 1kb 的 cDNA。两个探针杂交结果表明,pLCP2 cDNA 探针与 PLRV-RNA、PLRV 颗粒及感病 PLRV 植株提取液杂交效果较好。而 pLR6 cDNA 探针与 PLRV-RNA、PLRV 颗粒杂交信号弱,但与感染 PLRV 的茎、叶提取液杂交结果却表现比较强。

鉴于 RNA 和 NC 膜结合力较弱,参考有关文献<sup>[6]</sup>,本文用甲醛处理 RNA 得到较好的结果。试验证明,经甲醛处理的 PLRV-RNA 杂交结果比未经处理的 PLRV-RNA 的灵敏度提高了 25

倍,从而可使国产普通硝酸纤维素膜作为植物病毒 PLRV 杂交检测的载体而无需购买昂贵的进口硝酸纤维素膜,使这一检测技术即经济又便于推广应用。

### 参 考 文 献

- 1 Matthews R E F. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 1982;17:1—199
- 2 Kojima N, Lapiere H. Potato leafroll virus. In: *European Handbook of Plant Diseases*, Smith I M, *et al.* Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988, 23—24
- 3 Baulcombe D C, Flavell R B, Boulton R E, *et al.* The use of cloned hybridization probes to detect viral infection in a potato breeding programme. *The Genetic Manipulation of Plants and its Application to Agriculture*, 1984, 183—195
- 4 哈斯阿古拉, 施一荣, 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒外壳蛋白基因的合成、分子克隆和全序列分析. *中国病毒学*, 1992, 7(4): 432—435
- 5 Shi Yixiang, Kong Wei, Zhang Heling, *et al.* Molecular cloning of potato leafroll virus and potato virus Y genome and preparation of cDNA probe. In: *Beijing International Conference on Biotechnology*, 1989, 175
- 6 孟清, 张鹤龄. 马铃薯卷叶病毒的提纯. *病毒学报*, 1987, 3(2): 151—155
- 7 Gould A R. Studies on encapsidated viroid-like RNA. II. Purification and characterization of a viroid-like RNA associated with velvet tobacco mottle virus (VTMoV). *Virology*, 1989, 108: 123—133
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* *Molecular Cloning*. 2nd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 9 蔡良琬主编. 核酸研究技术. 北京: 科学出版社, 1987
- 10 张鹤龄, 孟清, 马志亮. 应用酶联免疫吸附试验鉴定马铃薯卷叶病毒. *病毒学报*, 1987, 3(3): 289—293

## Detection of Potato Leafroll Virus by Nucleic Acid Spot Hybridization with $^{32}\text{P}$ Labelled cDNA Probe

Hu Huiping    Hasi Agula    Zhang Heling

(Biology Department, Inner Mongolia University, Hohhot 010021)

The cDNA of potato leafroll virus coat protein gene and cDNA by random primer were used as probe labelled with  $^{32}\text{P}$  by nick translation. The isolated PLRV-RNA, purified PLRV particles, the extract of PLRV-infected potato stems, leaves, tubers and viruliferous *Myzus persicae* were detected with these probes by the nucleic acid spot hybridization. The tests show that the cDNA probe is highly specific, sensitive and reliable, which can only react with PLRV-RNA and cannot react with other potato viruses, such as PVY and PVS. The minimum amount of purified PLRV-RNA which can be detected was 40pg. The maximum dilution of PLRV-infected potato stem and leaf extract which gives positive reaction is 1 : 75, and the PLRV in 0.5 *Myzus persicae* can be detected. The results show that the nucleic acid spot hybridization (NASH) with  $^{32}\text{P}$ -labelled cDNA probe of PLRV-CP gene can be used for virus-free seed potato certification, virus resistant breeding, germplasm evaluation and control of virus diseases.

**Key words** Potato Leafroll Virus,  $^{32}\text{P}$  labelled cDNA probe, Nucleic acid spot hybridization, Diagnosis