

346-350

6781(12)

第10卷 第4期
1995年12月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 10 No. 4
Dec. 1995

简并引物 PCR 技术研究洋水仙 PVY 组病毒初报

陈枝楠

(深圳动植物检疫局, 深圳 518010)

S432.41
S436.83

A

提要 利用简并引物 RT-PCR 扩增技术, 结合 RT-PCR 扩增片段 RFLP 分析, 对洋水仙 14 个病毒病样品进行分组检测, 结果表明洋水仙植物上存在有四种以上 PVY 组病毒侵染, 它们可能是 TBV、NYSV、NSSV 和 OnYDV 等。

关键词 洋水仙, PVY 组病毒, 简并引物, 聚合酶链反应, 内切酶片段长度多态性

据 Brunt、Asjes 等报道^[1-3], 在洋水仙 (*Narcissus pseudonarcissus*) 寄主植物上可能存在有四种以上 PVY 组病毒单独或复合侵染。由于迄今为止仍没有从洋水仙上成功地分离、纯化到任何一种 PVY 组病毒 (Langeveld, 未发表), 故 ELISA 等血清学检测技术难以被广泛应用。

随着 PVY 组病毒分子结构及其功能的研究不断深入^[4,5,9], 利用外壳蛋白氨基酸序列和编码外壳蛋白氨基酸序列基因的同源差异性可以作为诊断和鉴定 PVY 组病毒的依据^[4,6-9]。近两年来又发现 PVY 组病毒的核酸复制酶 (RNA Replicatase) 功能基因也同样存在着类似的同源性, 即存在有相当部分的保守序列^[4,5]。Langeveld 利用这两个结构基因的特异性和保守性设计出了适合 PVY 病毒组的简并引物 (Degenerate Primer), 并成功地应用于该组成员郁金香和鸢尾等有关病毒的检测和分子生物学研究。

本研究参考设计了三对简并引物^[5,7,8], 利用逆转录和聚合酶链反应 (PCR) 以及 PCR 扩增片段的内切酶片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), 研究侵染洋水仙的 PVY 组病毒的分子生物学特性, 并进行了有关鉴定。

材料与方 法

1 研究材料来源

14 个洋水仙带毒样品是 1957 年起不同年代采集的, 由荷兰鳞球茎研究中心 (LBO) 提供, 编号分别为 N1, N2, N3……N14。

2 简并引物的设计与合成

PVY 组专化性简并引物体系的描述详见 Langeveld, Dekker 等文献^[4,5]。本研究试用的简并引物组

本文于 1994 年 10 月 5 日收到, 1995 年 5 月 15 日修回

* 本研究是在荷兰莱顿大学生化系 S. A. Langeveld 博士和 J. F. Bol 教授指导下完成

U 341/D341, U 880, U 1000/D1000在荷兰莱顿大学生化系 Applied Biosystem DNA Synthesizer 上合成。筒并位点的核苷酸分别由不同的 A、G、T、C 组成。序列中的脱氧次黄苷(Deoxyinosine)是为有利提高两倍的筒并性。

3 病毒及病毒核酸的制备

直接取 100—200 mg 病叶在液氮中研磨后转到 Eppendorf 管中,加入 500 μ l 抽提缓冲液(0.35 mol/L 甘氨酸, 0.048 mol/L NaOH, 0.34 mol/L NaCl, 0.04 mol/L EDTA, 4% SDS)和 500 μ l 冷酚,按氯 / 酚法^[9]得到的水相加入 1/3 体积 8 mol/L LiCl, +4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜后经离心,干燥得到总 RNA 含量为 1 μ g/ μ l 的水溶液。

4 逆转录合成(RT)

本逆转录合成反应为:1 \times PCR 缓冲液(Kit, Gibco BRL), 1.6 mmol/L MgCl₂, 16 mmol/L DTT, 0.25 mmol/L dNTP's, 50 pmol/L 下游引物 D341或 D1000, 0.24 mmol/L RNAsin, 2 μ g 模板 RNA, 1u MuMLV 或 1u AMV(Gibco, BRL)逆转录酶。总反应体积为 25 μ l。反应条件为 42 $^{\circ}$ C, 60 分钟。

5 PCR 扩增反应

直接从 RT 反应液中取出 10 μ l 加入到 40 μ l PCR 扩增反应液中:1 \times PCR 缓冲液, 1.5 mmol/L MgCl₂, 20 pmol/L U 341或 U 880或 U 1000, 2.5u Taq 聚合酶(Gibco, BRL), 加 50 μ l 矿物油后进行 35 次扩增循环。循环条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 54 $^{\circ}$ C 退火 120 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 80 秒, 其中最后一次循环在 72 $^{\circ}$ C 时延伸时间为 5 分钟。

6 RT-PCR 扩增片段大小分析

取 20 μ l RT-PCR 扩增反应液进行 1.5% 琼脂糖(Seakem)电泳(0.5 μ g/ml 溴乙锭)或者经冻融法^[10]纯化后再电泳比较不同扩增片段长度。

7 RT-PCR 扩增片段的内切酶片段多态性(RFLP)分析

取等份 20 μ l RT-PCR 扩增反应液分别用 10 u 的 Taq I, EcoR I, BamH I, Rsa I 等内切酶进行酶切^[4,7], 琼脂糖电泳后计算酶切片段数量及分子量大小, 从中选择具典型代表性结果的内切酶 Rsa I。

结 果

1 寄主症状

从不同年代采集样品的记录和病样症状表现, 洋水仙病株症状基本表现为:植株生长势弱, 鳞球茎产量逐年减少。叶片症状为褪绿黄色条斑或长椭圆形病斑。严重者叶片上病斑沿叶脉连接成片, 部分形成穿孔或裂缝。在花上有时表现轻微碎色。由此看出病株症状表现各异, 类型较多。

2 筒并引物核苷酸序列

根据洋水仙可能带有的 PVY 组病毒种类, 参考已知 32 个 PVY 病毒进化树(Phylogenetic Tree), 本研究设计选择的三种筒并引物核苷酸序列见表 1。

表 1 筒并引物核苷酸碱基序列

Table 1 The Degenerate Primer Sequence of Oligonucleotide

引物 Primer	碱基序列 Sequence
下游引物 Downstream	341 5' CGCGGATCCGCIGYYTTCATYTGIRIWKIGC 3'
上游引物 Upstream	880 5' GGCAAGCTTCWGAGKTNTGADGCTAYHGTCG 3'
下游引物 Downstream	1000 5' GTCRCRTTITCIATRCACCAIAYCAT 3'

R=A+G, W=A+T, Y=G+T, K=G+T, N=A+C+T
D=A+G+T, N=A+T+G+C, I=脱氧次黄苷(Deoxyinosine)

3 RT-PCR 检测结果

14个洋水仙样品经过两对引物 U 880/D1000和 U 880/D341进行 PCR 扩增,电泳检测结果见表2。当引物为 U 880/D1000时,样品 N1、N2、N7、N8和 N11、N12都有明显的电泳带,其片段大小为620 bp(见图1)。N9、N10为阴性(结果图中未列)。当引物为 U 880/D341时,则只有 N1、N2、N11、N12有900 bp 的电泳带出现。N4、N7、N8则没有扩增片段出现(见图2)。表2中 N3、N4、N5、N6、N13、N14等6个样品已由 Langeveld 和陈枝楠等以 U 341/D341 一对引物进行研究,并已确认为郁金香碎色病毒(Tulip breaking virus, TBV)(尚未发表)。

表2 不同样品 RT-PCR 检测结果

Table 2 The Detection Result of Various Samples by RT-PCR

样品编号 Sample No.	引物 U880/D1000 Primer U880/D1000 (620 bp)	引物 U880/D341 Primer U880/D341 (900 bp)	引物 U341/D341 Primer U341/D341 (341 bp)
N1	+	+	+
N2	+	+	+
N3	0	0	+
N4	+	-	+
N5	0	0	+
N6	0	0	+
N7	+	-	+
N8	+	-	+
N9	-	-	+
N10	-	-	+
N11	-	+	+
N12	+	+	+
N13	0	0	+
N14	0	0	+

“+”为阳性反应 Positive Reaction

“-”为阴性反应 Negative Reaction

“0”为其它片段 Other Fragment

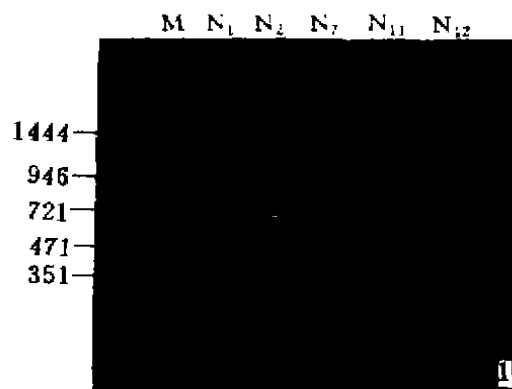


图1 简并引物 U880/D1000 PCR 扩增片段

Fig. 1 The amplification Fragments with Degenerate Primer U880/D1000

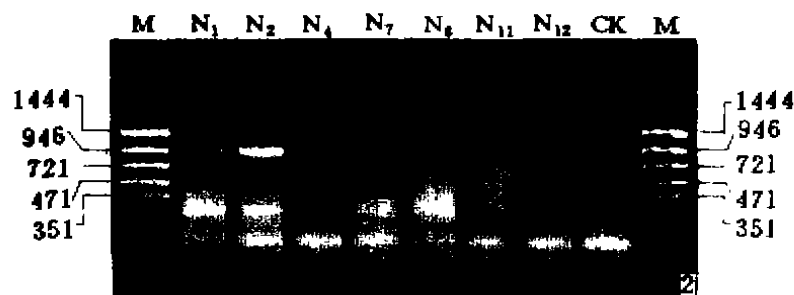


图2 简并引物 U880/D341 PCR 扩增片段
Fig. 2 The amplification Fragments with Degenerate Primer U880/D341

1 RT-PCR 扩增片段内切酶片段长度多态性分析(RFLP)

分析表2、图1和图2结果后,选择有代表性的三组样品 RT-PCR 扩增片段620bp 进行内切酶 *Rsa* I 酶切,结果见图3。从图中看出 N1和 N2的 RT-PCR 扩增片段 RFLP 图谱是一致的,酶切后的两条带分别为375bp 和170bp。虽然 N7也是两条带,但其分子量分别为425bp 和160bp。N12为四条带,其分子量分别为425bp 和160bp—180bp 之间的三条带。三组样品表现出三种不同的 RFLP 图谱。

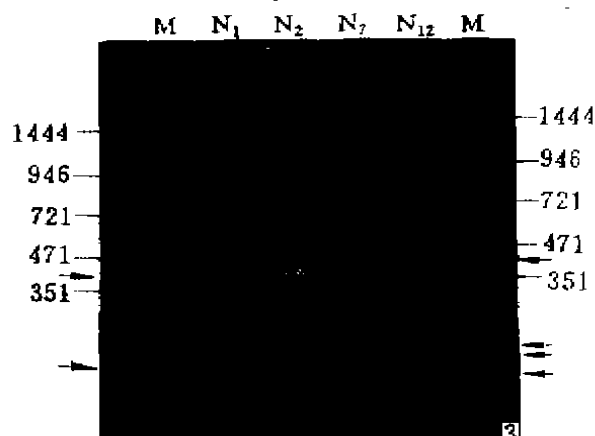


图3 PCR 扩增片段 *Rsa* I 酶切图谱
Fig. 3 Restriction Mapping of PCR Amplification Fragment with *Rsa* I

讨 论

Langeveld(未发表)、Brunt^[3]和 Asjes^[1]等认为洋水仙植物上存在有严重的 PVY 组病毒侵染。也正因为从洋水仙上难于分离纯化 PVY 组病毒,故产生了应用简并引物 PCR 技术结合 RFLP 分析快速检测 PVY 组病毒的方法^[5,6]。如利用分子克隆、DNA 序列分析^[4,8],则可对 PVY 组病毒的特性作进一步鉴定和研究。

本研究选用的14个样品是经过不同引物对组合多次 PCR 检测后分组形成的(样品中排除

了其它 PVY 复合侵染的样品)。从表2的检测结果看出14个样品按 PCR 反应的阴阳性可分为四个组,即 N1、N2、N11、N12为第一组;N3、N4、N5、N6、N13、N14为第二组;N7、N8为第三组以及 N9、N10为第四组。除第二组样品另文待发表外,其它三组样品的研究结果从图1、图2和图3分析 N1、N2和 N11、N12可能分别为不同的 PVY 组病毒成员。图3的 RFLP 图谱分析同时选用 N1和 N2两样品目的在于验证 N1和 N2的一致性。而 N7和 N8、N11和 N12只选用了其中的一个样品作代表,这样在研究材料中可以认为存在有四种 PVY 组病毒成员侵染。加上第二组样品已被认定为 TBV,则实际上14个样品材料中可能存在有五种 PVY 组病毒成员的侵染。这一结论与 Brunt、Langeveld 和 Asjes 等的观点一致。

据资料报道,在洋水仙上可能存在有洋水仙黄条病毒(NYSV)^[3],郁金香碎色病毒(TBV)(未发表),洋水仙银条斑病毒(NSSV)^[1],洋葱黄矮病毒(OnYDV)^[2]等四种以上 PVY 组病毒成员。本研究从现代分子生物学角度证实了这一推测。如何进一步对几种病毒定名,正着手从如下两个方面进行深入工作:一是利用可能有的标准 TBV、OnYDV 和 PVY 组组专化性血清进行检测;二是将特异性差异的 RFLP 多态性片段克隆后进行序列分析,从而完成洋水仙上感染 PVY 组病毒成员的鉴定和分子生物学的研究。

参 考 文 献

- 1 Asjes C J. Virus diseases in Narcissus in the Netherlands. *Daffodil*, 1972; 8: 3-11
- 2 Bos L. Onion yellow dwarf virus. CM1/A A B, Description of Plant Virus. 1976; No. 158
- 3 Brunt A A. Narcissus yellow stripe potyvirus. CM1/A A B, Description of Plant Viruses. 1971; No. 76
- 4 Dekker E L, Derks A F L M, Asjes C J, et al. Characterization of potyviruses from tulip and lily which cause flower breaking. *J Gen Virol*. 1993; 74: 881-887
- 5 Langeveld S A, Dore J M, Memelink J, et al. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J Gen Virol*, 1991; 72: 1531-1541
- 6 Shukla D D, Ward C W. Structure of potyvirus coat protein and its application in the taxonomy of the potyvirus group. *Advances in Virus Res*. 1989; 36: 273-341
- 7 Robertson N L, French R, Gray S M. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteovirus. *J gen Virol*, 1991; 72: 1473-1477
- 8 Rollich G and Jaffri M. Computer program for the selection of PCR primers. In: *Basic Methodology and Research Application*, 1991; 46-47
- 9 Rosner A, Stein A, Levy S. Transcription amplification of polymerase chain reaction products of bean yellow mosaic virus RNA extracted from gladioli corm. *Anu Appl Biol*, 1992; 121: 267-276
- 10 Tautz D, Renz M. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gel. *Analytical Biochemistry*. 1983; 132: 14-19

The Priliminary Study on Narcissus Infected with PVY Group Viruses by Degenerate Primer-PCR Techniques

Chen Zhinan

(Shenzhen Animal and Plant Quarantine Service, Shenzhen 518010)

More than four PVY group viruses were found to infect Narcissus by the techniques of degenerate primer reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction(PCR)and restriction fragment length polymorphism (RFLP), they may be TBV, NYSV, NSSV and OnYDV etc.

Key words Narcissus, PVY Group, Degenerate primer, RT-PCR, RFLP