维普资讯 http://www.cqvip.com

69-76 16958(12)

第11卷第1期 中国病毒学 Vol 11 No 1
1996年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 1996

核酸酶保护试验在黄瓜花叶病毒株系鉴定中的初步应用

谢响明 干嘉林 刘 仪
(北京农业大学农业生物技术国家重点实验室,北京 100094)
Karl Hellwald Lee Zhang Peter Palukaitis
(*Department of Plant Pathology, Cornell University, USA*)

S432.41

提要. 采用黄瓜花叶病毒(CMV)亚组Ⅰ株系 Fny-CMV RNA_2 的 1209～1626 核苷酸片段和亚组Ⅱ株系 Ls-CMV RNA_2 的 2002～2433 核苷酸片段的 cDNA 克隆,体外转录,同时掺入^{32}P 获得负链 RNA 探针,与纯化的番茄和甜椒上的 CMV 中国分离物的 RNA 杂交,结果表明:CMV 番茄和甜椒中国分离物与 Fny-CMV 的核苷酸有高度同源性,隶属于 Fny-CMV 为代表的亚组Ⅰ株系。并利用 K-CMV 株系(亚组Ⅰ,源于中国)的 RNA_2 全长 cDNA 克隆的两个 EcoRⅠ位点间的核苷酸序列(1657～2125nt)作探针,与上述两种 CMV 中国分离物的 RNA 杂交,进一步比较分析了这两个分离物和 K-CMV 株系的关系。讨论了核酸酶保护法在 CMV 株系鉴定中的作用。

关键词 黄瓜花叶病毒,株系,核酸酶保护试验 植物病毒

黄瓜花叶病毒(Cucumber Mosaic Virus, CMV),具有广泛的寄主范围,能侵染包括单子叶及双子叶植物在内的85科、365属、775种植物[1,2]。CMV 颗粒含有四种大小不同的 RNA,三个较大的 RNA 构成 CMV 的基因组[3],RNA_1 和 RNA_2 编码复制酶组分,RNA_3 编码运动蛋白和外壳蛋白。RNA_4 为编码外壳蛋白的亚基因组 RNA,位于 RNA_3 的 3′端。此外,有些 CMV 还有卫星 RNA。

CMV 有许多不同的株系,在寄主范围、致病性、病毒外壳蛋白多肽图谱及核苷酸序列同源性基础上,这些不同的株系被分为二个亚组[4,6]。其中亚组Ⅰ的代表株系为 Fny-CMV,中国的一种株系 K-CMV 也同属此亚组,亚组Ⅱ的代表株系为 Q-CMV。CMV 的不同株系在寄主范围、致病性、复制效率、卫星 RNA 的复制及蚜传效率方面均有差异[7]。同一亚组株系的核苷酸序列具有95%以上的同源性。随着对 CMV 病毒分子生物学的深入研究,国际上目前对 CMV 株系划分的主要依据倾向于核酸序列的同源性,而我国仍根据血清学及寄主范围对 CMV 分离物进行株系鉴定。为了避免引起混乱,与国际上株系划分统一,本文以 CMV 亚组Ⅰ和亚组Ⅱ株系的 RNA_2 上的特定核苷酸序列作探针,用核酸酶保护法检测来源于我国北方的两种 CMV 分离物——番茄分离物和甜椒分离物,初步鉴定其归属的亚组,为培育抗不同 CMV 株系的转基因植物提供依据。

核酸酶保护试验(The Ribonuclease Protection Assay, RPA)是一种特别灵敏的株系鉴定方法。其原理是首先体外转录合成一段与待分析的目标 RNA 互补的经同位素标记的 RNA 作

本文于1995年1月23日收到,7月26日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

探针，该探针与样品 RNA 杂交后，再用核酸酶（RNaseA 和 RNaseT）降解单链的未杂交的序列，样品中与探针互补的 RNA 结合配对，经核酸酶消化后可以被保护，该保护片段经聚丙烯酰胺凝胶分离后即可显示出其放射性自显影图。

材料和方法

1 材料

CMV 番茄和甜椒分离物毒原由农业部植物检疫所张成良先生提供。体外转录试剂盒购自 Promega 公司，核酸酶保护检测试剂盒（RPA-Kit）购自美国 Ambion 公司，a-^{32}P-UTP 为北京亚辉生物工程公司产品，质粒 pBluescriptSK(+)和大肠杆菌 DH5a 为本室提供。各种限制性内切酶为 Promega 及华美公司产品。亚组 I 株系 Fny-CMV 及亚组 II 株系 Ls-CMV 的探针由美国 Cornell 大学张力博士提供，探针的大小及方向如图 2。亚组 I 株系 K-CMV RNA_2 全长的 cDNA 克隆由 Karl Hellwald 博士构建[8]。

2 方法

2.1 病毒提纯及 RNA 纯化

将毒源接种于幼嫩的珊西烟（*Nicotiana tabacum* var. *xanthi nc*）上繁殖，14 天左右病症显著后，收获病叶。病毒的提纯及 RNA 纯化按 Peter Palukaitis (1984)的方法[9]进行。

2.2 亚克隆的构建和探针制备

2.2.1 亚克隆构建

把 K-CMV RNA_2 全长的 cDNA 克隆上的两个 EcoRI 位点间的核苷酸序列（1657～2125 nt）亚克隆到 pBluescript SK(+)载体的 EcoRI 位点上。

碱裂解法提取质粒和低熔点胶回收 DNA 片段按 Sambrook 等[10]的方法进行。

2.2.2 探针制备及纯化

质粒线性化后，根据亚克隆中目的片段的插入方向选用 T7 或 T3 RNA 聚合酶，体外转录标记负链 RNA 探针。探针制备的标准反应按 Promega 公司提供的体外转录试剂盒进行。

RNA 转录完毕后，加入无 RNase 的 DNase I，37℃ 消化 15 min，再加入等量的上样缓冲液（8% 甲醛/0.1% 二甲苯蓝/0.1% 溴酚蓝/2 mmol/L EDTA），并于 90℃ 下加热 3 min。在含 8 mol/L 尿素的 5% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离探针，电压 100～300 伏，电泳 20 min 至 1 h，电泳完毕后，经放射自显影，切下与 X 光片上位置相对应的含全长转录物的凝胶，再用探针洗脱缓冲液（0.5 mol/L 醋酸钠/1 mmol/L EDTA/0.2% SDS）于 37℃ 下洗脱过夜后，于 −20℃ 下保存备用。

2.3 核酸酶保护检测：详细操作过程见 RPA II-kit 说明书。

2.3.1 杂交

在 Eppendorf 管中混合探针和待检测的 RNA 样品。设置对照管，每个探针需用 2 个对照管，每个管中加入 2 μl 的酵母 tRNA。然后加入 1/10 体积的 5 mol/L NH_4Ac 和 2.5 体积的无水乙醇，−20℃ 下沉淀 RNA 至少 15 min，离心，真空干燥沉淀物。再向每个管中加入 20 μl 的杂交液，于 90±5℃ 条件下温育 3～4 min 后，再于 42～45℃ 下杂交 2～12 h。

2.3.2 RNA 杂交后的酶消解

每个样品管需要 200 μl 的 RNase 消解溶液，其中以 1:100 的比例加入 RNaseA/RNaseT1 混合物，并在其中一个酵母 tRNA 对照管中加入 200 μl RNase 溶液，另一个对照管则加不含 RNase 的 200 μl 的 RNase 消解溶液，37℃ 下温育 30 min，再于每个管中加入 300 μl 的 RNase 钝化/沉淀混合物，−20℃ 下沉淀 RNA 至少 15 min，离心，真空干燥沉淀物。

2.3.3 分离和保护片段检测

制备适合于分离保护片段的变性的聚丙烯酰胺凝胶（5% 聚丙烯酰胺/8 mol/L 尿素、同测序胶的制备），

维普资讯 http://www.cqvip.com

凝胶厚度为13cm×15cm×0.75mm。向每个管中加入8 μl的上样缓冲液后，90℃下温育3～4 min，上样，200～250V稳压电泳，电泳时间40 min～1 h。电泳完毕后把凝胶转移到X光片下，－70℃下放射自显影过夜

结　果

1　提纯病毒的获得及病毒RNA的提取

纯化的病毒经紫外扫描分析，均显示出病毒的特征吸收曲线，其中甜椒分离物A260/A280的比值为1.64，与CMV标准的A260/A280比值极为相近，番茄分离物的A260/A280比值为1.28，与CMV标准的A260/A280比值有一定偏差。

纯化的病毒经3%磷钨酸负染，在电镜下呈现为典型的球形病毒粒子，且粒子形态完整，极少破碎，粒子中间有一定典型的核酸芯。

提纯的RNA经0.8%琼脂糖电泳后，呈现出CMV RNA特征带型，但有一定程度的降解（图1）。甜椒分离物的RNA有四条带型（RNA_1=3.2kb，RNA_2=3.0kb，RNA_3=2.2kb，RNA_4=1.2kb）。番茄分离物的RNA有五条带型，两种分离物的RNA_1和RNA_2由于大小相近，彼此很难分开。

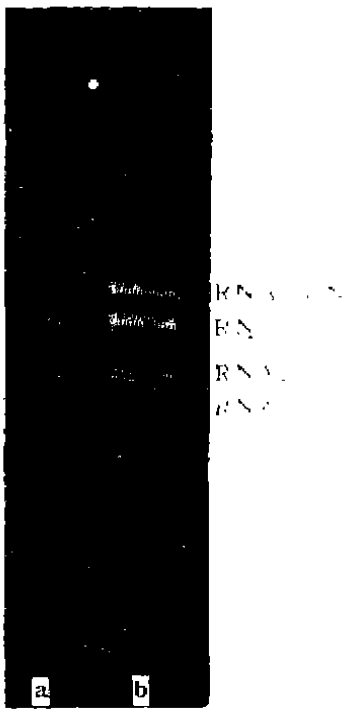

图1　纯化的两种CMV分离物RNA的电泳带型
a：番茄分离物　b：甜椒分离物

Fig 1　Electrophoresis pattern of purified RNAs of two CMV isolates
a: Tomato isolate　b: Pepper isolate

2　亚克隆的构建及探针制备

把K-CMV RNA_2全长cDNA克隆之间的两个EcoRI位点间的核苷酸片段插入到pBluescript SK(+)载体的EcoRI位点上，得到亚克隆pCMV，经酶切鉴定重组质粒，其结构和插入方向如图2。

根据亚克隆的方向，分别选用XbaI、BamHI、EcoRV单酶切F2、L2、K2/PSK插入片段的

维普资讯 http://www.cqvip.com

5′端，再分别选用3′端的RNA聚合酶（T7或T3），体外转录即分别得到^{32}P标记的负链RNA探针：F2、L2和K2探针。

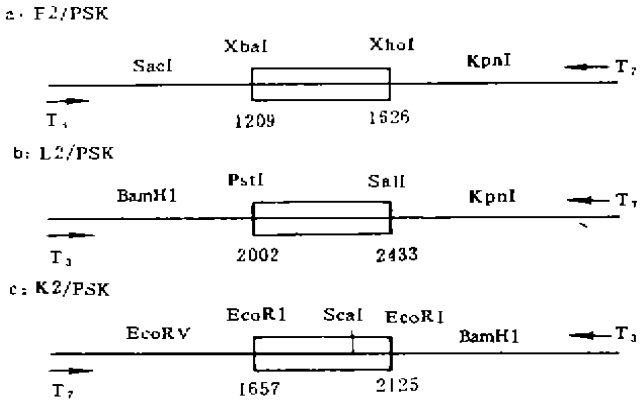

图2 探针大小及方向示意图

a Fny-CMV RNA_2探针（F2探针） b：Ls-CMV RNA_2探针（L2探针） c：K-CMV RNA_2探针（K2探针）

Fig 2 The size and orientation of the probes

a：Fny-CMV RNA_2 probe（F2 probe） b：Ls-CMV RNA_2 probe（L2 probe） c：K-CMV RNA_2 Probe（K2 probe）

图3为体外转录的K2探针在5%聚丙烯酰胺凝胶上的放射自显影图。探针形成较强的单一带型，稍有降解，切下与该带型相对应位置上的凝胶经洗脱浸泡过夜后即得到线化的探针。

图3 体外转录的K2探针在聚丙烯酰胺凝胶上的放射自显影图

Fig 3 Autoradiogram of a denaturing polyacrylamide gel containing the K2 probe transcribed *in vitro*

维普资讯 http://www.cqvip.com

3　核酸酶保护检测法鉴定 CMV 株系差异

图 4 为含^{32}P 标记的 Fny-CMV RNA_2 及 Ls-CMV RNA_2 两种负链探针分别与两种 CMV 分离物杂交、经 RNase 消解后,被保护片段的聚丙烯酰胺变性胶的放射自显影图。如图所示,两种 CMV 分离物与 F2 探针(Fny-CMV RNA_2)杂交、经 RNase 消解后,大部分片段被保护(lane 1 和 lane 6),说明这两种分离物的核酸序列与 Fny-CMV RNA_2 互补的负链探针有很高的同源性。从核酸序列同源性的程度看,我国的这两种 CMV 分离物应隶属于以 Fny-CMV 为代表的亚组 I 株系。

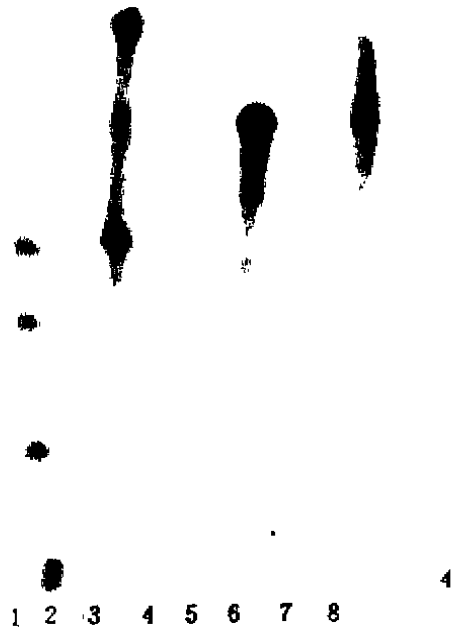

图 4　^{32}P 标记的与 Fny-CMV RNA_2 1209～1629nt 及 Ls-CMV RNA_2 2002～2433nt 互补的负链探针与两种 CMV 中国分离物 RNA_s杂交,经 RNase 消解后被保护片段的聚丙烯酰胺变性胶的放射自显影图。

第一列　甜椒分离物 + F2 探针　　第二列　甜椒分离物 + L2 探针

第三列　酵母 RNA + F2 探针(无 RNase 酶)　　第三列　酵母 RNA + F2 探针

第五列　番茄分离物 + L2 探针　　第六列　番茄分离物 + F2 探针

第七列　酵母 RNA + L2 探针　　第八列　酵母 RNA + L2 探针 (无 RNase 酶)

Fig 4　Autoradiogram of a denaturing polyacrylamide gel containing a ^{32}P-labeled negetive-sense probe complementary to Fny-CMV RNA_2 1209 nt to 1629 nt and Ls-CMV RNA_2 2002 nt to 2433 nt, and protected from RNase digestion after annealing to RNA_s of two Chinses CMV isolates.

lane 1: Pepper isolate + F2　　lane 2: Pepper isolate + L2　　lane 3: Yeast RNA + F2 + no RNase

lane 4: Yeast RNA + F2　　lane 5: Tomato isolate + L2　　lane 6: Tomato isolate + F2

lane 7: Yeast RNA + L2　　lane 8: Yeast RNA + L2 + no RNase

从图中还可看出,CMV 甜椒分离物与番茄分离物的 RNA 与 F2 探针杂交,被 RNase 酶解后的电泳带型有较大差别,番茄分离物 RNA 被保护的程度更高,说明该分离物核苷酸与 Fny-

维普资讯 http://www.cqvip.com

CMV 有更高的同源性。

图 5 为含^{32}P 标记的 K-CMV RNA_2 的负链探针与两种 CMV 分离物杂交，经 RNase 酶解后聚丙烯酰胺变性凝胶的放射自显影电泳图谱。这两个分离物 RNA 的核苷酸与 K-CMV 探针杂交后，均有被保护的片段，说明这两种分离物与 K-CMV 的核苷酸序列有很高的同源性，但两者又有不同的特征带型，番茄分离物被保护的片段似乎更大，说明它与 K-CMV 的核苷酸序列同源性更高。

图 5 ^{32}P 标记的与 K-CMV RNA_2 1657～2125nt 互补的负链探针与两种 CMV 中国分离物的 RNA_S 杂交，经 RNase 酶解后被保护片段的聚丙烯酰胺变性胶的放射自显影图。

第一列 酵母 RNA + K2 探针

第二列 甜椒分离物 + K2 探针

第三列 番茄分离物 + K2 探针

第四列 酵母 RNA + K2 探针（无 RNase 酶）

Fig 5 Autoradogram of a denaturing polyacrylamide gel containing a ^{32}P-labeled negative-sense probe complementary to K-CMV RNA_2 nucleotide 1657 to nucleotide 2125, and protected from RNase digestion after annealing to RNAs of two Chinese CMV isolates

lane 1: Yeast RNA + K2

lane 2: Pepper isolate + K2

lane 3: Tomato isolate + K2

lane 4: Yeast RNA + K_2(no RNase)

讨 论

1 CMV 番茄分离物的 RNA 有五条带型。第五条带究竟是卫星 RNA，还是缺失型（DI）RNA，本实验室尚在研究之中。

2 本文介绍了一种新的鉴别 CMV 株系的方法——核酸酶保护检测法（RPA，The ribonuclease protection assay）。该方法可以鉴定特定的 RNA 存在[11,12]及 RNA 序列的差异[13,14]，这种方法也同样适用于鉴定其它存在许多不同株系的病毒。由于 RPA 技术比核酸的克隆和测序要快速、简便得多，故用该技术可以更加迅速地测定 RNA 序列的差异性，灵敏度也较高。该方法不需要对病毒 RNA 直接测序即可与已知序列的特定病毒的株系 RNA 来比较其同源性。当然，它又不如核酸序列测定提供的信息更加具体、准确、全面。

利用核酸酶保护方法鉴定病毒株系时，首先应选择变异程度相对较大的区域作探针，对 CMV RNA2 复制酶基因来说，由于不同株系的 RNA2 的 5′端及 3′端非编码区都具有很高的同源性，故应选择变异程度相对较大的中间编码区序列。其次，探针的长度尤为关键，一般为 200～500 nt 左右。虽然减少探针的长度有助于提高合成全长转录物的效率，但是将降低试验的灵敏度；而增加杂交探针的长度有利于提高灵敏度，但探针的活性及合成全长转录物的效率也相对较低。第三，纯化探针的洗脱液的反应体积宜尽可能小，以增加放射性标记的探针的摩尔浓度，有利于探针的纯化。

用核酸酶保护法鉴定标系时，保护片段的带型将是随机的，这取决于探针序列和病毒

维普资讯 http://www.cqvip.com

RNA的同源性。如果在某探针保护的片段中,n个点突变按理会有n+1个片段,假如病毒RNA序列与一个400 nt长的探针有99%的高度同源性,1%的序列差异即会有4个碱基的不同,理论上会产生4+1=5个RNA带型。这五条RNA依其长度大小在PAGE凝胶上将呈现不同的带型。反之,如果只有一条探针的带型或者全没有带型,说明所检测的株系和所用探针的株系为同一株系或者是一个完全无关的株系。因此,利用这一方法可十分准确地鉴定CMV株系。

最近,我们对K-CMV及本文所采用的番茄、甜椒两种CMV分离物的RNA2的1806~1866之间的核苷酸进行了序列分析,结果表明在61个核苷酸区域内,K株系与CMV番茄分离物的核酸序列同源性为88.5%,与甜椒分离物的核酸序列同源性为86.9%(另文发表)。序列分析结果与本文利用RPA鉴定结果是一致的。

3　CMV株系划分的方法很多。有的从寄主范围、致病性等方面划分株系,有的直接根据核酸序列同源性划分株系。我国仍根据寄主范围、致病性、血清学、生化特性等来划分株系,工作量大,准确程度亦不高,不同研究结果间的可比性较低。因此,利用这一方法可以直接从核酸水平上来划分株系。只要有合适的探针,利用这种方法可大量、快速地初步鉴定各种CMV分离物的株系。

参 考 文 献

1 Kaper J M, Waterworth H E　Cucumovirus. In: Handbook of plant virus Infections and Comparative Diagnosis, Kurstak, E ed　Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981;257~332

2 Doume L. Recensement d'especes vegetales sensibles au virus de la mosaique du concomber(CMV). Etude bibliographique. Annabes de Phytopathologie, 1979;11:439~475

3 Peden K W C, Symons R H. Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome. Virology, 1973;53:487~492

4 Edwards M C, Gonsalves D, Provvidenti R. Genetic analysis of cucumber mosaic virus in relation to host resistance: Location of determinants for pathologenicity to certain legumes and *lactuca saligna*. Phyto Pathology, 1993; 73:269~273

5 Gonda T J, Symons R H. The use of hybridization analysis with complementary DNA to determine the RNA sequence homology between strains of plant viruses: Its application to several strains of cucumovirus　Virology, 1978;88:367~370

6 Piazzolla P, Diaz-Ruiz J R, Kaper J M. Nucleic acid homologies of eighteen cucumber mosaic virus isolates determined by competition hybridization. J Gen Virol, 1979;45: 361~369.

7 Palukaitis P, Roosinok M J, Shintaku M. *et al*　Mapping function domains in cucumber mosaic virus and its satellite RNA. Canadian Journal of Plant Pathology, 1991;13:155~162

8 Zaitlin M, Anderson J M, Perry K L. *et al*. Specificity of replicasemediated resistance to cucumber mosaic virus. Virology, 1994;201:200~205

9 Palukaitis P, Zaitlin M　Satellite RNAs of cucumber mosaic virus: Characterization of two new satellites. Virology, 1984; 132:426~435

10 Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T, *et al*　Molecular Cloning. 2nd ed　USA:Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

11 Winter E, Yamamoto F, Almoguera C, *et al*　A method to detect and charaterize point mutations in transcribed gence: Amplification and overexpression of the mutant c-ki-ras allele in human rumor cells　Proc. Natl Acad Sci USA, 1985;82:7575~7579

12 Kurath G, Palukaitis P　Satellite RNAs of cucumber mosaic virus: Recombinants constructed *in vitro* reveal independent functional domains for chlorosis and necrosis in tomato　Mol Plant-Microbe Interact, 1989;2:91~96

13 Lopez-Galindez C, Lopez J A, Melero J A. *et al*. Analysis of genetic variability and mapping of point mutations in influenza

维普资讯 http://www.cqvip.com

virus by the RNase A mismatch cleavage method. Proc Natl Acad Sci USA, 1988;85:3522~3526

14 Kurath G, Palukaitis P RNA sequence heterogeneity in natural populations of three satellite RNAs of cucumber mosaic virus Virology, 1989;173:231~240

The Application of Ribonuclease Protection Assay in the Identification of Strains of Cucumber Mosaic Virus

Xie Xiangming Yu Jialin Liu Yi

(*National Laboratory for Agrobiotechnology, Beijing Agricultural University, Beijing* 100094)

Karl Hellwald Lee Zhang Peter Palukaitis

(*Department of Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, NY* 14853, *USA*)

The cDNA sequences spanning nt 1209 to nt 1626 of Fny-CMV RNA_2 (a subgroup Ⅰ strain) and nt 2002 to nt 2433 of Ls-CMV RNA_2 (a subgroup Ⅱ strain) were used for probe preparation. The ^{32}P-labeled negative strand RNAs prepared by transcription *in vitro* were hybridized with purified RNAs of two Chinese CMV isolates from pepper and tomato, respectively. The result shows that the two Chineses isolates share high identities of sequence to the Fny-CMV, therefore the isolates belong to the CMV subgroup I strain. A transcription probe complementary to the fragment flanking nt 1657 to nt 2125 of K-CMV RNA_2 (a subgroup Ⅰ strain originated from China) was hybridized with the purified RNAs of the two Chinese CMV isolates as well. The relationship between the K-CMV strain and the two Chinese isolates was compared. The application of ribonuclease protection assay was discussed in the identification of CMV strains.

Key words Cucumber mosaic virus (CMV), Strain, Ribonuclease protection assay