

# 用互补 DNA 分子杂交技术研究番茄丛矮病毒组病毒 RNA 序列的同源性

安德荣 慕小倩

(西北农业大学植保系, 陕西杨凌)

**摘要** 分别以 TBSV-、AMCV-、PLCV-、PAMV- 和 CyRSV-RNA 为模板反转录合成的 cDNA 和每个同源或异源的 RNA 进行斑点杂交, 研究番茄丛矮病毒组病毒 RNA 序列的同源性。结果表明, TBSV 和 PLCV (24%) 及 AMCV (22%)、AMCV 和 PLCV (25%) 及 PAMV (24%) 之间的 RNA 有较大的序列同源性, CyRSV-RNA 和每个病毒 RNA 之间的同源性低。

**关键词** 分子杂交; 植物病毒; 番茄丛矮病毒组

有关番茄丛矮病毒组 (Tombusviruses) 分类问题的讨论由来已久<sup>[1]</sup>, 而且至今尚未结束。在植物病毒描述中<sup>[2]</sup>, 番茄丛矮病毒 Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV) 做为这一组典型成员, 而将菊芋斑皱病毒 Artichoke Mottle Crinkle Virus (AMCV)、荷兰石竹意大利环斑病毒 Carnation Italian Ringspot Virus (CIRV)、天竺属植物叶卷病毒 Pelargonium Leaf Curl Virus (PLCV) 和矮牵牛星状花叶病毒 Petunia Asteroid Mosaic Virus (PAMV) 做为 TBSV 的株系。但在第四届国际病毒分类委员会报告中, 根据病毒粒子为球状二十四面体及单链 RNA 特点, 认为番茄丛矮病毒组包括以下 7 个确定成员: TBSV、AMCV、CIRV、PLCV、PAMV、茄斑皱病毒 (Eggplant Mottle Crinkle Virus——EMCV) 和剑兰属植物环斑病毒 (Cymbidium Ringspot Virus——CyRSV)。虽然通过血清学方法可以将各个成员区别开来, 但它们之间的血清学关系却很复杂, 亲缘关系变化也很大, CyRSV 仅和 TBSV 有血清学关系, 其它各病毒间的亲缘关系尚不清楚。本文用 cDNA 分子杂交技术——斑点杂交法 (Dot Blot Hybridization) 研究 TBSV、AMCV、EMCV、PLCV、PAMV 和 CyRSV 相互之间 RNA 序列同源性, 并对它们进行亲缘性程度顺序的排列, 和血清学测定结果进行比较分析。

## 材料和方法

### (一) 病毒的提纯

TBSV、AMCV、PAMV、PLCV、EMCV 和 CyRSV 分别在 *Nicotiana benthamiana* 烟草上繁殖, 接种后 5—10 天收集发病叶片, 并立即在含有 1% 抗坏血酸的 50 mmol/L 醋酸盐缓冲液 (pH 5.0) 中匀浆, 用醋酸调节 pH 到 4.5, 使滤液澄清, 低速离心 (8000 r/min, 15 分钟), 用 NaOH 调上清液 pH 到 6.0, 用聚乙二醇 (PEG 6000) 和 0.2 mol/L 醋酸盐缓冲液 (pH 5.0)。病毒粒子进一步提纯采用 CsCl 密度梯度离心 (Beckman, 36000 r/min, 16 小时), 用注射针头收集病毒粒子带, 用 50 mmol/L NaCl (pH 5.5) 溶液透析除去 CsCl。

### (二) RNA 的制备

将所得病毒用两相酚-SDS 法抽提病毒核酸, RNA 的进一步纯化采用蔗糖密度梯度离心 36000 r/min 16 小时。收集 RNA 带, 加二倍乙醇沉淀 RNA, 沉淀悬浮在无菌蒸馏水中。

### (三) <sup>32</sup>P-cDNA 的制备

按照 Taylor<sup>[4]</sup> 的方法, 分别制备 TBSV、AMCV、EMCV、PLCV、PAMV 和 CyRSV 各基因 RNA 的互补 DNA。将 0.5 μg 的各 RNA 样品和试剂, 按以下顺序分别加入灭菌的 Eppendorf 管内: 5 ml 随机引物 (10 mg 牛胸腺 DNA 加 0.3 mg 的 DNase, 在 37℃ 下裂解 8

小时)、1.25 $\mu$ l 随机引物缓冲液(100m mol/L MgCl<sub>2</sub>、50m mol/L KCl、100m mol/L DTT、40m mol/L Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)、0.2 $\mu$ l RNA 酶抑制剂(7.5个单位)、1 $\mu$ l 反应底物(20m mol/L dATP、dGTP、dTTP 和 1.6m mol/L dCTP)、1 $\mu$ l  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP(10u Ci/ $\mu$ l), 最后加入 0.5 $\mu$ l (5个单位)禽类白血病毒(AMV)反转录酶,混合均匀后,在 37℃ 水浴中保温 90 分钟,然后加入 6.5 $\mu$ l 1N NaOH, 在 60℃ 保温 60 分钟,终止反应并水解模板 RNA, 加 6.5 $\mu$ l 1N HCl 中和前面加入的 NaOH, 使反应液呈中性。用预先平衡过的 Sephadex G50 柱收集 cDNA (平衡液为 10m mol/L NaCl, 1m mol/L EDTA, 10m mol/L Tris HCl, pH8.0), 用上述平衡液洗脱 15 次(每次 100 $\mu$ l), 收集每次洗脱液, 并用液体闪烁计数器测放射性强度(cpm), 收集含有标记 cDNA 样品的第一个放射峰。

#### (四) RNA 斑点制备和斑点预杂交

将各个 RNA 样品(1ng/ $\mu$ l)用微量点样器点到预先用 20 × SSC 平衡过的硝酸纤维膜上, 每次点样为 3.2 $\mu$ l, 斑点大小为 0.5cm<sup>2</sup> 左右, 点样后将膜在 80℃ 真空干燥 2 小时, 然后将膜放入含有 50% HCONH<sub>2</sub>、5 × SSC、0.02% BSA、0.02% Ficoll、0.02% PVP、50m·mol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、250 $\mu$ g/ml 变性鲑鱼精子 DNA 的预杂交缓冲液(pH6.5)中进行预杂交(42℃, 3 小时), 以减少探针 DNA 在滤膜上非杂交性的吸附。

#### (五) 斑点杂交

在上述预杂交液中分别加入 1/10 体积的各个变性 <sup>32</sup>P-cDNA (100℃ 水浴中加热 7 分钟后, 立即在冰水浴中冷却)组成杂交缓冲液, 和预杂交后的膜进行 cDNA 分子杂交(42℃, 18 小时)。

#### (六) 杂交后的洗脱和检测

分别用 2 × SSC、0.01% SDS 和 0.1 × SSC、0.1% SDS 溶液在室温下洗脱 20 分钟并在 50—90℃ 范围内(温度梯度为 2℃)洗脱 30 分钟, 将膜烘干(40℃, 30 分钟)后将每个 RNA 膜

斑点剪下, 用闪烁计数器测定每个斑点的放射性强度(cpm)。

## 结 果

### (一) 斑点杂交

因为 TBSV 和 CyRSV 病毒的 RNA 链端不含有多聚腺核苷酸(Poly A)<sup>[5]</sup>, 因此, 本实验所有 cDNA 的合成均采用由 DNase I 裂解牛胸腺 DNA 后的短 DNA 片段做随机引物, 根据我们的实验经验, 用 DNase I 在 37℃ 下裂解牛胸腺 DNA 8 个小时, 所得到核苷酸片段只有 4—6 个碱基残基(3% 的碱性琼脂糖凝胶电泳测定大小)。用此引物来合成 cDNA 的效率较高, 而且  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 在 cDNA 中的结合率也高(Incorporation)。将 RNA 点样到硝酸纤维膜上以前, 没有必要将 RNA 进行变性处理, 不变性的 RNA 可以牢固地结合在膜上。

### (二) RNA 序列同源性

斑点杂交后, 将每个 RNA 膜斑点在严格条件下洗脱(0.1 × SSC、0.1% SDS 溶液, 在 65℃ 下洗脱 30 分钟), 以除去非特异性杂交体。然后将每个 cDNA 和同源或异源 RNA 杂交后的斑点剪下, 用闪烁计数器测定每个斑点的放射性强度, 计算出每个 cDNA 与异源 RNA 序列同源性的百分比<sup>[5]</sup>(表 1)。

从表 1 结果得出: (1) 在番茄丛矮病毒组内, 一些病毒 RNA 相互之间有较高的同源性, 如 TBSV 和 PLCV、AMCV 和 PLCV、PAMV 等; (2) 测定出各病毒 RNA 相互之间同源性程度。TBSV 和其它病毒 RNA 之间的同源性顺序依次为: PLCV (24%)、AMCV (22%)、PAMV (15%)、EMCV (8%)、CyRSV (6%)。AMCV 和其它病毒 RNA 之间同源性顺序依次为: PLCV (25%)、PAMV (24%)、TBSV (20%)、EMCV (11%)、CyRSV (7%)。同样, 我们也可看出 PLCV、EMCV、CyRSV 和其它病毒亲缘关系的程度。很明显, CyRSV 与其它病毒的亲缘关系都较远。

表 1 番茄丛矮病毒组各成员之间 RNA 序列同源性百分比

以各种 RNA 为模板的 cDNA 病毒的 RNA	TBSV	AMCV	PAMV	PLCV	EMCV	CyRSV
TBSV	100	20	18	19	10	7
AMCV	22	100	24	29	12	4
PAMV	15	24	100	19	16	5
PLCV	24	25	14	100	10	3
EMCV	8	11	7	11	100	10
CyRSV	6	7	5	5	4	100

注: 表中同源性百分比值均为两次重复的平均值

### (三) cDNA-RNA 杂交物的熔解曲线

当  $^{32}\text{P}$ -cDNA 与同源或异源的 RNA 杂交时, 固定在膜上的 RNA 和 cDNA 形成杂交体, 为了除去非特异性 cDNA-RNA 杂交体和测定同源的 cDNA-RNA 杂交体的热稳定性, 在 50—90°C 范围内进行严格漂洗, 漂洗后, 测定每个膜斑点的放射性 (图 1)。AMCV-cDNA 与 PLCV-PAMV-RNA 之间的杂交物  $T_m$  值较高, 说明 AMCV-cDNA 与 PLCV-和 PAMV-

RNA 之间有较多的碱基配对, 因此它们之间具有较高的同源性。AMCV-cDNA 和 CyRSV-RNA 之间的杂交物  $T_m$  值低 ( $T_m = 55^\circ\text{C}$ ), 这说明它们之间核苷酸序列的同源性低, 这些结果与表 1 测定 RNA 序列同源性百分比的结果一致。

### 讨 论

近几年来, 核酸的分子杂交技术日趋完善, 以不同材料为支持物的固相杂交技术取得了更为迅速的发展<sup>[7]</sup>。在植物病毒方面, 最初将 RNA 固定在硝酸纤维膜上的固相杂交技术是用来检测植物汁液中的病毒和类病毒, 经试验证明这一方法同样可以用来检测病毒 RNA 序列同源性。斑点杂交法具有简便、快速的特点, 而且样品比较集中, 灵敏度高。因为以病毒 RNA 为模板合成的互补 DNA 能代表整个病毒基因所携带的遗传信息, 而血清学技术和外壳蛋白亚基的氨基酸组成及顺序都只能代表整个病毒 RNA 所携带遗传信息的一小部分, 因此, 用 cDNA 分子杂交技术测定不同病毒核苷酸序列的同源性, 并进行病毒的分类是理想的, 也是可行的。

将本实验结果和血清学测定结果<sup>[1]</sup>进行比较 (表 2), 可以看出: (1) 大多数 RNA 序列同源性百分比和 SDI 值相近; (2) 我们能从杂交结果直接看出各 RNA 之间的亲缘程度, 而 SDI 值仅能表示各病毒之间血清学关系的紧密程度; (3) CyRSV 和 PLCV 之间有 10% RNA 序列同源性, 而 SDI 值 ( $>9$ ) 则表示它们之间

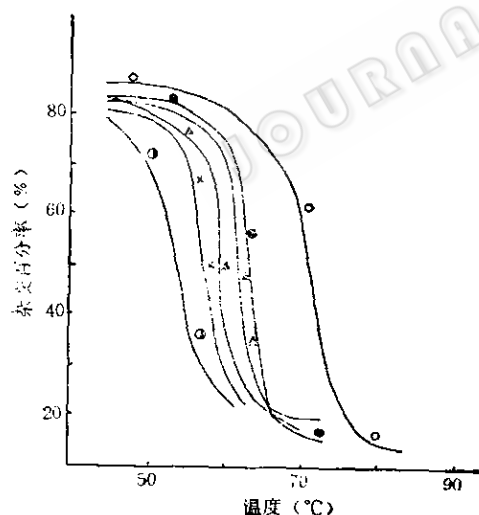


图 1 AMCV 的 cDNA 和组内不同病毒 RNA 之间杂交物的热溶解曲线

○—○ AMCV-RNA ●—● PLCV-RNA  
●—● CyRSV-RNA ▲—▲ TBSV-RNA  
×—× EMCV-RNA △—△ PAMV-RNA

各病毒的  $T_m$  值:  $T_m(\text{AMCV}) = 73.5^\circ\text{C}$ ,  
 $T_m(\text{PLCV}) = 65^\circ\text{C}$ ,  $T_m(\text{PAMV}) = 62.3^\circ\text{C}$ ,  
 $T_m(\text{TBSV}) = 60^\circ\text{C}$ ,  $T_m(\text{EMCV}) = 58^\circ\text{C}$ ,  
 $T_m(\text{CyRSV}) = 55^\circ\text{C}$

表 2 cDNA 分子杂交法测定的同源性百分比和血清学鉴别指数的比较

病毒 RNA	AMCV/ PAMV	AMCV/ PLCV	PLCV/ PAMV	EMCV/ PAMV	AMCV/ EMCV	PLCV/ EMCV	CyRSV/ AMCV	CyRSV/ PAMV	CyRSV/ EMCV	CyRSV/ PLCV
同源性百分比	24	25	19	16	11	11	4	5	3	10
血清学鉴别指数	1	2	2	3	5	5	>9	>9	>9	>9

注：血清学鉴别指数愈小，病毒亲缘性关系愈高，反之亦然

没有血清学关系。另外，AMCV 和 PLCV 的 RNA 序列同源性百分比和 SDI 值也有差异，这些差异可能是由于血清学方法的局限性所致。为了进一步揭示番茄丛矮病毒组 RNA 序列的同源性，可通过对每个病毒的 RNA 碱基序列进行分析。我们希望这一技术也象 cDNA 杂交技术一样，经不断改进成为确定病毒基因之间同源性的有力工具。

### 参 考 文 献

1. Koenig R et al.: *J. Gen. Virol.*, **69**: 75—82, 1986.
2. Martelli G P et al.: C.M.I./A.A.B. Description of Plant Virus, No 69, 1971.
3. Martelli G P et al.: In the Atlas of Insect and Plant Virus, 1977.
4. Taylor J M et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **442**: 324—330, 1976.
5. Thomas P S: *Methods in Enzymology* **100**: 255—266, 1983.