

长臂光敏生物素标记葡萄扇叶病毒外壳蛋白基因 cDNA 探针的制备及其在检测上的应用*

曹肖真^② 张玉满^③ 蔡文启^① 管汉成 莽克强

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

关键词 长臂光敏生物素 GFLV 外壳蛋白基因 cDNA 探针, 分子杂交, GFLV 检测
分类号 Q753 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0109-12

由葡萄扇叶病毒(Grapevine fan leaf virus, GFLV)导致的葡萄扇叶病在世界各地葡萄园内均有发生,是最为普遍和严重的病毒病害之一,感病葡萄可减产 20%~80%。近年来,许多国家开展了葡萄脱毒苗木的培育和推广工作,同时进行了葡萄扇叶病毒检测技术的研究。国内外曾报道用 ELISA^[1,2]、协同凝集试验^[3]及³²P、³⁵S 或¹²⁵I 标记的探针^[4]等方法检测 GFLV,这些方法在制备及应用上均存在一些问题,ELISA 和协同凝集试验灵敏度稍低;用放射性同位素标记,因同位素半衰期短,其来源、操作及废物处理比较麻烦,也存在局限性。近年来,生物素标记核酸探针检测植物病毒及类病毒的研究引起了国内外普遍重视^[5~7]。一般用缺口平移法、随机引物法将 Bio-11-dUTP 代替 TTP,通过聚合酶链反应标记探针。但标记方法及纯化操作都比较麻烦,而且仅适用于双链或单链 DNA,不适用于 RNA。标记的探针是各种随机长度片段的混合物,难以重复及规格化。采用光敏生物素标记探针则可避免以上不足。而用长臂光敏生物素标记探针由于克服空间位阻,其检测灵敏度能接近放射性同位素水平^[8]。

本研究利用长臂光敏生物素制备了 GFLV 外壳蛋白基因 cDNA 探针,使检测 GFLV 时样品用量仅为 ELISA 检测样品用量的 1%。

1 材料和方法

1.1 试剂

长臂光敏生物素核酸探针标记和检测试剂盒购自华美生物制品公司(军事医学科学院放射医学研究所生产)。硝酸纤维素膜(NC膜)为 Bio-rad 公司产品或华美生物制品公司。试剂的配制参考试剂盒使用手册。

1.2 GFLV 外壳蛋白基因 cDNA 的制备

以重组质粒 pGAB5 中的 GFLV 外壳蛋白基因 cDNA(1.7 kb)为模板,5'端引物为:5'GCGATAT-CACCATGGGATTAGCTGGTAGAG 3'端引物为:5' CAGTCGACACACTGTGCCACT^[9],PCR 反应条件,94℃ 1 min,52℃ 1 min,72℃ 1.5 min,30 个循环后 72℃ 保温 5 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查扩增的产物。按常规方法纯化 PCR 产物,用紫外吸收法测定含量及纯度。

* 国家“八五”科技攻关计划项目(No. 85-722-10-02)。

① 联系人。

② 中国农业大学植物病理学系,北京 100094。

③ 北京林业大学林果、花卉良种繁育研究中心,北京 100083。

收稿日期:1997-09-24,修回日期:1998-07-20。

1.3 长臂光敏生物素 GFLV 外壳蛋白基因 cDNA 探针的制备、探针显色灵敏度和斑点杂交灵敏度检测参考该试剂盒使用手册。

1.4 斑点杂交检测葡萄组织中的 GFLV

葡萄组织 RNA 的制备参考谷洪仓等人^[6]的方法并作如下改进:(1)取葡萄叶片约 200 mg, 在 1.5 mL 小离心管中用液氮研磨成粉末状, 加入 300 μ L 的 RNA 提取液后振荡混匀, 冰浴中孵育 10 min 后继续研磨, 再加入 250 μ L 的 RNA 提取液;(2)将最后提取的 RNA 溶于 400 μ L 无菌水中。

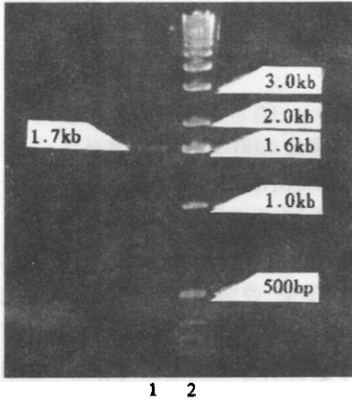


图1 重组质粒 pGABS

PCR 扩增产物的电泳

1. Amplified products; 2. 1 kb ladder

1.7 kb 的 GFLV 外壳蛋白基因 cDNA(图 1)。PCR 产物经纯化后, 用紫外吸收法测定其含量在 0.5~1.0 μ g/ μ L, $A_{260}/A_{280} > 1.7$ 。



图2 探针显色灵敏度的检测

探针量自左至右为 50pg, 10pg, 5pg, 0pg

2.2 探针显色灵敏度的检测

用紫外法测定标记探针的量, 将探针作 50 pg/ μ L, 10pg/ μ L, 5pg/ μ L 和 0pg/ μ L 系列稀释, 在硝酸纤维素膜上各点 1 μ L。如图 2 所示显色深浅与探针浓度成正相关, 稀释至 5pg 仍能显色, 即探针显色灵敏度为 5pg。

2.3 探针斑点杂交灵敏度的检测

将未标记的葡萄病毒外壳蛋白基因 cDNA 系列稀释为 100pg/ μ L, 50pg/ μ L, 20pg/ μ L, 10pg/ μ L 和 5pg/ μ L, 分别取 1 μ L 点于硝酸纤维素膜上, 用 100ng/mL 探针与之杂交。从图 3 可见当未标记 cDNA 为 20pg/斑点时仍能显色, 表明该探针的斑点杂交灵敏度为 10pg, 接近放射性同位素探针检测灵敏度。

2.4 探针和 ELISA 检测葡萄组织中 GFLV 的比较

用半叶法对北京林业大学提供的 8 株葡萄叶片分别用斑点杂交和 ELISA 进行 GFLV 检测, 从表 1 和图 4 可以看出探针检测与 ELISA 检测结果呈正相关, 1、2、5、6、7、8、号样品 ELISA 检测结果均为阳性, 读数越高的样品用探针检测反应越明显; ELISA 检测结果 P/N 略高于 2 的 1、2 号样品, 探针检测仍为阳性; ELISA 检测结果 P/N < 2 为阴性的样品, 在斑点杂交中也为阴性。从一些未在此发表的数据中曾显示, ELISA 检测结果为阴性的样品中有部分样品在斑点杂交中为阳性, 说明探针可以检测出 ELISA 检测下限以下的病毒含量。

将经热变性处理过的核酸样品点样于 NC 膜上, 80 $^{\circ}$ C 烘干 1 h, 42 $^{\circ}$ C 预杂交 2~4 h。42 $^{\circ}$ C 杂交 20~24h。将膜取出经杂交洗涤液 A 和杂交洗涤液 B 分别于室温和 65 $^{\circ}$ C 振荡洗涤 3 次, 每次 5 min。轻轻吸干滤膜, 按试剂盒使用手册选择亲和素-碱性磷酸酯酶系统, 用 BCIP + NBT 底物进行显色。

1.5 ELISA 检测葡萄组织中的 GFLV

本文所列样品检测试验均采用半叶法分别进行 ELISA 和探针检测, ELISA 检测方法按参考文献[2]中的 PAS-ELISA 法进行, 所列结果均为 3 次重复测定的平均值。P/N > 2.0 示为阳性, 带 GFLV; P/N \leq 2 示为阴性。

2 结 果

2.1 GFLV 外壳蛋白基因 cDNA 的制备

以重组质粒 pGABS^[9]中 GFLV 外壳蛋白基因 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 产物经 1% 琼脂糖电泳分析, 表明合成了长度为



图3 探针斑点杂交灵敏度检测

每斑点未标记 cDNA 量从左至右为 100pg, 50pg, 20pg, 10pg, 5pg

2.5 大田葡萄植株不同部位叶片的探针和 ELISA 检测

对 2 株大田葡萄叶片用半叶法分别进行探针斑点杂交和 ELISA 检测,并对其中一株的上、中、下部叶片又分别进行斑点杂交检测,从表 2 和图 5 可见,斑点杂交结果与 ELISA 检测结果呈正相关,且感病植株中、下部叶片斑点杂交也为阳性。正如文献[2]曾报道过 ELISA 检测以早春上部未展开叶为宜,不适用于对田间葡萄植株中、下部叶片 GELV 检测,而探针对下部叶片也能进行有效检测,所以不受取样部位和季节的限制。

2.6 感病葡萄组织系列稀释检测结果

作探针检测时,每斑样品用量为 0.5 mg,而 ELISA 检测每孔组织用量为 50 mg,样品用量仅为 ELISA 检测样品用量的 1%。

当来自葡萄园感染 GFLV 的 1 号样品上部叶片组织 RNA,作系列稀释,由图 6 可见当将样品稀释至 20 倍时仍为阳性。

表 1 斑点杂交与 ELISA 平行检测葡萄叶片中的 GFLV 的比较

样品号	PAS-ELISA 值 (P/N)*	斑点杂交
1	2.70	+
2	2.25	+
3	1.80	-
4	1.42	-
5	3.06	++
6	9.65	+++
7	8.40	+++
8	9.34	++++

* P 为样品 A₄₉₀ 读数;N 为缓冲液 A₄₉₀ 读数的 2 倍。

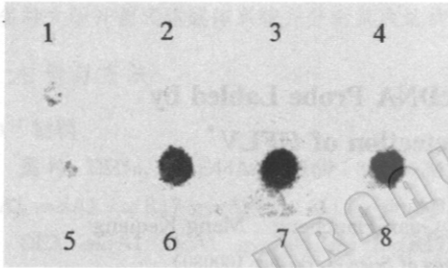


图 4 斑点杂交检测葡萄叶片中的 GFLV

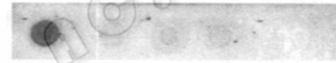


图 5 葡萄叶片的斑点杂交检测 GFLV 自左至右为样品号 1,2,3,4,5



图 6 1 号样品系列稀释检测结果 稀释倍数从左至右为:1:1;1:10;1:20;1:50;1:100

表 2 探针与 ELISA 检测葡萄植株不同部位叶片中 GFLV 的比较

样品号	样品来源	斑点杂交	PAS-ELISA (P/N)*
1	S-1 上部叶片(top)	+++	12.52
2	S-2 中部叶片(mid)	+	NT
3	S-3 下部叶片(lower)	+	NT
4	S-2	+	4.50
5	CK	-	0.83

* P 为样品 A₄₉₀ 读数;N 为缓冲液 A₄₉₀ 读数的 2 倍。
CK:经 ELISA 检测为阴性的植株。
NT:未检测。

3 讨论

由于葡萄组织中多酚化合物、单宁和多糖含量高,制备样品 RNA 时易产生假阳性反应。在参考文

献[6,10]提取 RNA 方法的基础上,进行改进后,不仅提高了提取效率,而且去除了假阳性反应的干扰,取得了重复性好的检测结果。

自 1994 年以来,多次进行探针制备,从对不同年份、季节、部位葡萄样品进行检测取得的数据(包括未发表数据)表明,用本方法标记的探针其重复性好,检测灵敏度高,稳定性强(制备 1 年后仍可正常使用),且不受季节和检测部位的限制,检测样品用量极少,具有广泛的应用前景。

参 考 文 献

- [1] B. Huss, B. Walter, L. Etienne *et al.* *Vitis*, 1986, 25:178~188.
- [2] 蔡文启,郭德银,徐绍华等.植物病理学报,1990,20(2):99~105.
- [3] 蔡文启,刘宏迪,黄德来等.微生物学报,1992,32(4):262~265.
- [4] M. Fuchs, M. Pinl, L. Etienne *et al.* *Phytopathology*, 1991, 81(5):559~566.
- [5] M. Eweida, H. Xu, R. P. Sing *et al.* *Plant Pathology*, 1990, 39:623~628.
- [6] 谷洪仓,严敦余等.中国病毒学,1994,9(1):49~53.
- [7] 张鹤龄,曹先维, I. Rabbo 等.病毒学报,1989,5(1):72~75.
- [8] 张晓燕,谷鸿喜等.生物技术,1993,3(4):44~46.
- [9] 管汉成,蔡文启等.生物工程学报,1996,12(2):124~128.
- [10] A. Rowhani, C. Chay, D. A. Golino. *Phytopathology*, 1993, 83(7):749~753.

Preparation of GFLV CP-gene cDNA Probe Labeled by Photosensitive Biotin and Detection of GFLV*

Cao Xiaozhen Zhang Yuman Cai Wenqi Guan Hancheng Mang Keqiang
(*Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

Abstract The cDNA of the GFLV CP gene amplified from clone pGAB5 by PCR were labeled by photo-sensitive biotin. The probe sensitivity is 5pg, and the detectable amount of unlabeled GFLV cDNA was 10pg by dot-blot hybridization when the biotin-labeled cDNA was used as a probe. The results of detection for GFLV by probe and ELISA have positive correlation. The minimum amount of grapevine tissue for detection by probe was 100 times lower than that by ELISA. The detection for grapevine samples is not limited by the seasons and the position of sampling.

Key words GFLV CP-gene cDNA probe labeled by long arm photosensitive biotin, molecular hybridization, GFLV detection

* Supported by Project of Chinese National Programs for Science and Technology Development(No. 85-722-10-02).