

用 DNA 杂交技术测定烟草花叶病毒 与长叶车前花叶病毒的关系

康良仪 田颖川 田波

(中国科学院微生物研究所,北京)

从油菜上分离的属于烟草花叶病毒组的油菜花叶病毒 15(YMV₁₅)和从大白菜上分离到的白菜花叶病毒(CcMV)的外壳蛋白中,都含有组氨酸和甲硫氨酸,类似于长叶车前花叶病毒(RMV)。用 YMV₁₅-、RMV-和番茄花叶病毒(ToMV)突变体 N₁₄-RNA 的 cDNA 与 YMV-RNA、RMV-RNA 和 CcMV-RNA 进行了同源和异源的分子杂交试验。从分子杂交的 Rot 曲线和杂交产物的 T_m 值看, YMV₁₅ 和 CcMV 都不同于 RMV, 其饱和杂交率表明, CcMV 与 YMV₁₅ 有一定核苷酸序列的同源性, 两者都与 RMV 没有核苷酸序列同源性, 说明它们属于烟花叶病毒组的不同亚组。

关键词: 烟草花叶病毒组, cDNA 分子杂交

用互补 DNA (cDNA) 分子杂交技术测定病毒 DNA 核苷酸序列的同源性, 是进行病毒亚组分类的一种新方法。由于它可对病毒的整个基因组作比较, 比仅由基因组 10% 的核苷酸编码的外壳蛋白氨基酸成分的分析更为可靠。我们已用这种技术研究了几个烟草花叶病毒组病毒 RNA 序列的同源性^[1], 结果表明, 烟草花叶病毒普通株 (TMVc)、番茄花叶病毒 (ToMV) 及其突变体 (ToMV-N₁₄)、杨树病毒 (PV)、地黄退化病毒 (DDV) 可归于 TMV-U₁ 株所代表的亚组。油菜花叶病毒 15 号 (TMV-YMV₁₅) 与 TMV-U₁ 株无关。根据 YMV₁₅ 外壳蛋白氨基酸组成中含有组氨酸和甲硫氨酸^[2], 它与长叶车前花叶病毒 (RMV) 相近。最近, 根据氨基酸组成的电子计算机分析, 把 YMV₁₅ 与 RMV 放在一个亚组^[3]。

本文进一步测定了中国十字花科植物上分离的烟草花叶病毒组的病毒与长叶车前花叶病毒 (RMV) 的关系。

材料与方 法

(一) 病毒和核酸

YMV₁₅ 系由十字花科植物上分离的烟草花叶病毒组的油菜花叶病毒 15 号; CcMV 系上海郊区大白菜上分离的一株病毒, 由中国科学院上海生物化学研究所朱本明提供; 长叶车前花叶病毒 (RMV) 系由澳大利亚国立大学 A. Gibbs 博士赠送; 还有 ToMV 病毒 N₁₄ 突变株系。

提纯的病毒用酚法抽提核酸, 加 2 倍体积的 95% 乙醇沉淀, 12000 × g 离心 10 分钟, 沉淀物用重蒸乙醚洗 3 次, 12000 × g 离心 10 分钟后, 沉淀物溶于无菌蒸馏水, 使核酸浓度达 1.0 mg/ml, 保存于 -10℃ 备用。

(二) cDNA 的制备

YMV₁₅-RNA 和 ToMV-N₁₄-RNA 的 cDNA 分别按以前所叙述的方法制备^[1]。RMV-RNA 的 cDNA 除反应底物中的标记底物用 5'-³H-dATP (26.5 Ci/m mol, 1 mCi/ml, 加 50 μl) (上海原子核研究所)

本文于 1982 年 7 月 19 日收到。

感谢澳大利亚国立大学 A. Gibbs 博士赠送长叶车前花叶病毒和上海生物化学研究所朱本明提供上海郊区大白菜花叶病毒分离物。

外,其余均与制备 YMV₁₅-RNA 和 ToMV-N₁₄-RNA 的 cDNA 方法相同。实验中所用的禽类白血病病毒反转录酶由美国马里兰州国家癌症研究所 J-Beard 博士赠送。

(三) 互补 DNA 与 RNA 的杂交

cDNA 与 RNA 的饱和杂交率、cDNA 与 RNA 杂交的 Rot 曲线和 cDNA · RNA 杂交物 Tm 值的测定按以前所叙述的方法进行^[1]。实验中所用的单链特异的核酸酶 S1 由本实验室制备^[1]。

实验结果

(一) cDNA 与同源和异源的 RNA 分子杂交

图 1 是 ToMV-N₁₄-、YMV₁₅-和 RMV-RNA 的 ³H-cDNA 与它们同源和异源的 RNA 杂交反应动力学曲线。由图可见,三种 ³H-cDNA 与它们同源的 RNA 杂交动

力学所得到的 Rot 1/2 值, N₁₄-³H-cDNA · N₁₄-RNA 为 5.62 × 10⁻³; YMV₁₅-³H-cDNA · YMV₁₅-RNA 为 5.62 × 10⁻³; RMV-³H-cDNA · RMV-RNA 为 3.98 × 10⁻³mol. S. L⁻¹。在所用的条件下,这些 cDNA 与它们同源的 RNA 饱和杂交率分别为 75%、89% 和 65% 以上。

三种 cDNA 与异源 RNA 的杂交动力学表明,只有 YMV₁₅-³H-cDNA 与上海郊区大白菜病毒-RNA 杂交所得的 Rot 1/2 值为 11 × 10⁻³, 杂交率为 65% 以上,其余的 ³H-cDNA 与异源 RNA 杂交均没有明显的杂交率。根据其 Rot 1/2 值可估计出上海郊区大白菜病毒-RNA 与 YMV₁₅-RNA 之间具有约 51.1% 核苷酸序列同源性,而 N₁₄-RNA 和 RMV-RNA 与 YMV₁₅-RNA

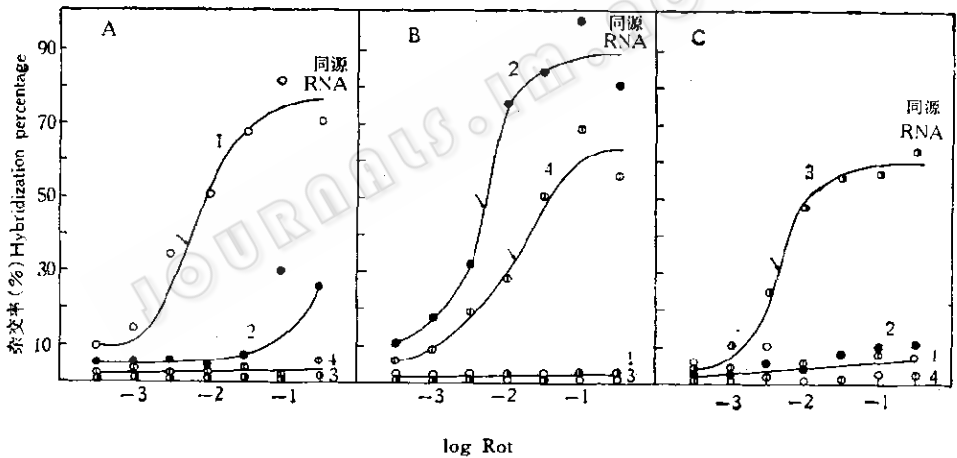


图 1 杂交反应动力学曲线

Fig. 1 Kinetics of hybridization between cDNAs and RNAs

A, B and C 分别为 ³H-N₁₄-cDNA, ³H-YMV₁₅-cDNA 和 ³H-RMV-cDNA 与其同源的和异源的病毒 RNA 的杂交反应

1. N₁₄-RNA; 2. YMV₁₅-RNA; 3. RMV-RNA; 4. CcMV-RNA

A, B and C represent the hybridization of ³H-N₁₄-cDNA ³H-YMV₁₅-cDNA and ³H-RMV-cDNA with their homologous and heterogenous viral RNAs, respectively

之间没有序列同源性,彼此无相关性。

(二) 饱和杂交率

在使 ³H-cDNA 与它们同源和异源的 RNA 杂交达最大 Rot 值的条件下,测定了

三种 ³H-cDNA 与它们同源和异源 RNA 的饱和杂交率。若以每种 ³H-cDNA 与其同源 RNA 杂交率为 100% 计,则只有上海郊区大白菜病毒-RNA 与 YMV₁₅-³H-cDNA

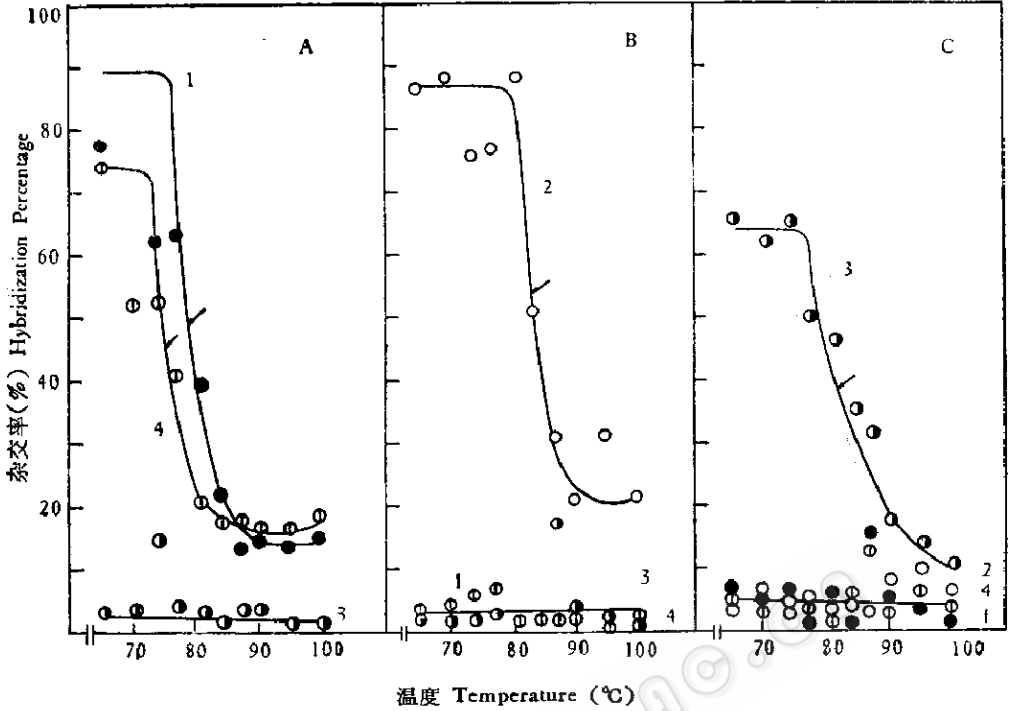


图 2 不同杂交物的热变性曲线

Fig. 2 Thermal denaturation of different hybrids

A, B, C 分别表示 $^3\text{H-YMV}_{15}$ -cDNA, $^3\text{H-N}_{14}$ -cDNA, $^3\text{H-RMV}$ -cDNA 与其同源和异源病毒 RNA 杂交反应物的热变性曲线

1. YMV_{15} -RNA 2. N_{14} -RNA 3. RMV -RNA 4. CoMV -RNA

箭头指示杂交物的 T_m 值

A, B, C indicate the thermal denaturation curves of the hybrids between $^3\text{H-YMV}_{15}$ -cDNA, $^3\text{H-N}_{14}$ -cDNA and $^3\text{H-RMV}$ -cDNA and RNAs from homologous and heterologous viruses

Arrows indicate the T_m values of the hybrids

的饱和杂交率达 67%，其余的均在 13% 以下(表 1)。进一步说明上海郊区大白菜病毒与 YMV_{15} 亲缘关系较近，而与其余两个属于不同亚组的病毒 ToMV-N_{14} 和 RMV

无亲缘关系。

(三) 杂交产物的 T_m 值

由图 2 计算出 YMV_{15} - $^3\text{H-cDNA}$, N_{14} - $^3\text{H-cDNA}$ 和 RMV - $^3\text{H-cDNA}$ 与它们同源 RNA 杂交物的 T_m 值分别为 79°C , 84°C 和 82°C 。在三种 $^3\text{H-cDNA}$ 与异源 RNA 的杂交中，只有上海郊区大白菜病毒-RNA 与 YMV_{15} - $^3\text{H-cDNA}$ 的杂交物 T_m 值为 76°C ，很接近 YMV_{15} - $^3\text{H-cDNA}$ 与其同源 RNA 杂交物的 T_m 值，表明 CcMV-RNA 与 YMV_{15} - $^3\text{H-cDNA}$ 杂交百分率不是由于错误配对所致，而是确实存在着核苷酸序列的同源性。

表 1 饱和杂交率

Table 1 Saturated Hybridization Rate (%)

RNA	$^3\text{H-cDNA}$		
	YMV_{15}	N_{14}	RMV
YMV_{15}	100	—	12
CcMV	67	1.4	8.9
N_{14}	—	100	6.5
RMV	9.0	12.9	100

讨 论

根据本文报道和以前^[1]用 cDNA 分子杂交技术测定的烟草花叶病毒组 RNA 序列同源性的分析结果, 可将我国分离的烟草花叶病毒组的一些成员划分为两个不同的亚组, TMVc, ToMV 及其突变体 N₁₄, PV, DDV 属于以 TMV-U₁ 株为代表的亚组, 根据杂交物的 T_m 值又可划分为 TMVc、ToMV N₁₄ 以及 PV 和 DDV 两个病毒群, 而 YMV₁₅, CcMV 为另一亚组。

从本文所报道的结果看, CcMV-RNA 与 YMV₁₅-³H-cDNA 的异源杂交和 YMV₁₅-³H-cDNA 与 YMV₁₅-RNA 同源杂交比较, 它们具有相近的 $\text{Rot} \frac{1}{2}$ 值 (图 1 B), 较高的饱和杂交率, 以及杂交产物具有相近的 T_m 值 (图 2 B)。表明两种病毒 RNA 序列有同源性。因此, CcMV 与 YMV₁₅ 应属同一个亚组。这与它们的外壳蛋白均含有组氨酸和甲硫氨酸^[5]是一致的。而上海郊区大白菜病毒 RNA 与属于 TMV-U₁ 株为代表的亚组中的 N₁₄-RNA 的 ³H-cDNA 则不能杂交, 表明 RNA 之间没有序列同源性。

Gibbs 等^[3] 根据中国分离的几个烟草花叶病毒组的病毒蛋白氨基酸组成的电子计算机分析, 将 YMV₁₅ 和 RMV 归为一个亚组, 但本文结果证明, 无论是 RMV-³H-cDNA 与 YMV₁₅-RNA, 还是 YMV₁₅-³H-cDNA 和 RMV-RNA 都没有明显的杂交, 表明 RMV-RNA 和 YMV₁₅-RNA 没有序列的同源性。RMV-³H-cDNA 与 N₁₄-RNA 和 N₁₄-³H-cDNA 与 RMV-RNA 杂交结果也表明没有序列的同源性。因此, YMV₁₅, RMV 和 N₁₄ 应属于不同的亚组, 说明仅根据氨基酸组成来分类的局限性, 而用 cDNA 分子杂交技术分析病毒 RNA 基因组序列的同源性是目前将病毒进行组以下分类较为可靠的方法。

参 考 文 献

- [1] Palukaitis, P. 等: 生物化学与生物物理学报, 14(3): 217—223, 1982。
- [2] Chang Yushang et al.: *Scientia Sinica*, 8: 1421—1432, 1964。
- [3] Gibbs, A. et al.: *Intervirology*, 18: 160—163, 1982。
- [4] 杨希才、康良仪: 微生物学通报, 10(2): 77—79, 1983。
- [5] 朱本明等: 生物化学与生物物理学报, 13: 217, 1981。

DETERMINATION OF RELATIONSHIP BETWEEN TWO TOBAMOVIRUSES ISOLATED FROM CRUCIFERAE PLANT IN CHINA AND RIBGRASS MOSAIC VIRUS BY MOLECULAR HYBRIDIZATION TECHNIQUE USING COMPLEMENTARY DNA

Kang Liangyi Tian Yingchuan Tian* Po
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The coat proteins of both rape (*Brassica campestris* L. var. *youcai*) mosaic virus (YMV₁₅) and Chinese cabbage mosaic virus (CcMV), isolated from Chinese cabbage in the suburbs of Shanghai, contain histidine and methionine and resemble to ribgrass mosaic virus (RMV). In order to determine the relationship among these viruses, experiments of homologous and heterogeneous molecular hybridization between cDNA and YMV₁₅-RMV- and N₁₄-RNA and YMV₁₅-RNA, RMV-RNA and CcMV-RNA were carried out.

From Rot curves of molecular hybridization and T_m values of hybrids, it can be seen that both YMV₁₅ and CcMV are diffe-

rent from RMV. The percentage of their saturation hybridization showed that the nucleotide sequence homology between CcMV and YMV₁₅ is present, but there is no homology between these two viruses and RMV. It is concluded that according to the results of molecular hybridization YMV₁₅ and CcMV are different from RMV, and should belong to different subgroups of Tobamoviruses.

Key words

Tabamoviruses, cDNA molecular hybridization

* i. e. Tien po