

## 双链 RNA 技术与植物病毒研究

张晓婷, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉  
(福建农林大学植物病毒研究所, 福建 福州 350002)

**摘要:** 90% 以上的植物病毒基因组是 RNA。含 RNA 基因组的病毒会产生特异的双链 RNA(dsRNA)。从受到病毒感染的植物组织中提取病毒相关的 dsRNA, 进行病毒的检测和分类, 诊断植物病毒病, 探索生物防治植物病毒病的新途径, 是植物病毒研究的重要内容。本文就双链 RNA 技术在植物病毒研究中的应用做一综述。

**关键词:** 双链 RNA; 植物病毒

**中图分类号:** S 432      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004 - 390X(2005)04 - 0455 - 04

### dsRNA Isolation Method and Research of Plant Virology

ZHANG Xiao-ting, WU Zu-jian, LIN Qi-ying, XIE Lian-hui

( Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China )

**Abstract:** dsRNA isolation method, widely used in virology, is a basic technique for dsRNA research. In tissues of plants infected by viruses, dsRNA is specific for each of them. So the extraction of dsRNA can be used to detect whether a virus exists. And we can also try to find ways to control the disease. The dsRNA isolation method is very useful in the research of plant virology. Recent years, this technique has developed greatly and its application has expanded a lot. The development has been discussed, and the advantages or disadvantages have been analysed. Also, its aboard usage in diagnosis and taxonomy of viruses, gene engineering and biocontrol has been reviewed here.

**Key words:** dsRNA; plant virus

双链 RNA 的提取是研究 RNA 病毒和双链 RNA 因子的首要步骤,在以 RNA 病毒为主的植物病毒的研究中应用广泛。20 世纪 60 年代 FRANKLIN 纯化了 RNA 噬菌体 R17 的复制中间体<sup>[1]</sup>,走出了 dsRNA 提取的第一步。1979 年 MORRIS 和 DODDS 将此项技术成功地应用于植物和真菌病毒的研究。现在,双链 RNA 技术步骤更加简化,提取效率更高,在植物病毒的检测和分类,植物病毒病的诊断等方面应用广泛。

外源双链 RNA 片段介导的基因沉默即 RNA 干扰的发现和 RT-PCR、分子克隆等技术的发展,为双链 RNA 技术应用于研究病毒基因组功能和生物防治植物病毒病奠定了基础。

#### 1 植物中的双链 RNA

收稿日期: 2004 - 06 - 15  
受到病毒感染的植物体内可能存在稳定的 dsRNA 分子,从事植物病毒学研究。

dsRNA。这些 dsRNA 有 4 种可能的存在形式:单链 RNA 病毒的复制中间体,称为复制型分子(RF);双链 RNA 的基因组核酸;卫星 RNA 的复制型分子;起源未知的环状双链 RNA。环状双链 RNA 在一些正常植物体内也有发现,其发生原因不明,分子量较小( $< 10^6$ ),不影响 dsRNA 作为植物受到 RNA 病毒感染的特异性标志用于 RNA 病毒的检测。

依据国际病毒分类委员会(ICTV)第 7 次会议的分类系统,植物病毒共分为 15 个科,其中 + ssRNA 病毒 7 个科,-ssRNA 病毒 2 个科,ssRNA(RT)病毒 1 个科,dsRNA 病毒 2 个科。RNA 病毒占植物病毒总数 90% 以上。这些病毒在复制过程中产

生的 dsRNA 中间产

物性质稳定,且具有病毒特异性,不因寄主的不同而不同。提取植物组织中的 dsRNA,进行纯化分析,方法简单,可以广泛用于鉴定病毒种类,诊断病毒的侵染,以及探索植物病毒分子生物学性质。

## 2 双链 RNA 的提纯和分析技术

### 2.1 从植物组织中直接提取 dsRNA

dsRNA 可以直接从植物组织中提取。但其中存在的大量碳水化合物和植物自身的 DNA、ssRNA 等,干扰病毒 dsRNA 的提纯,降低提取效率。所以从植物组织中直接提取 dsRNA 就是要去除碳水化合物(主要是蛋白质)和其它形式的核酸。

去除蛋白质常用 SDS-酚/氯仿法<sup>[1~4]</sup>。SDS(十二烷基磺酸钠)是一种阴离子去垢剂,可以溶解病毒,使核酸从核蛋白体上游离出来。用苯酚、氯仿处理,使游离的蛋白质变性,并层析分离有机相中的蛋白质和水相中的核酸。另外还有酸性硫氰酸胍法<sup>[5]</sup>和蛋白酶 K 法<sup>[6]</sup>,即在酸性条件下用硫氰酸胍使蛋白质变性或用蛋白酶 K 消化蛋白质,然后将其离心去除。有些病毒如传染性法氏囊病毒(IBDV),基因组与蛋白强烈互作,提取时一部分核酸随蛋白质分离,溶于有机相,降低提取效率。AYDEMIR 等以 IBDV 为材料比较了酸性硫氰酸胍法和蛋白酶 K 法两种方法,发现对小 dsRNA 片段(<1 201 bp),蛋白酶 K 消化法提取效率较高,而且扩增长片段(1 958 bp) dsRNA 效果较好<sup>[7]</sup>。仅用无机溶剂 SDS/KOAc 除去组织匀浆中蛋白质的方法<sup>[8]</sup>,毒性低,易操作,但所得核酸纯度较低。

去除其它形式的核酸有两种方法, LiCl 沉淀法<sup>[5,9]</sup>和纤维素柱层析法<sup>[1,2,4,10]</sup>。DsRNA 与 ssRNA 和 DNA 相比较,性质稳定,不易被核酸酶降解,在 LiCl 中有不同的溶解度,通过 LiCl 沉淀即可分离出 dsRNA。

纤维素柱层析法是根据 dsRNA 在乙醇含量为 15% 时能被纤维素粉特异性吸附,先用含乙醇 15% 的 STE 缓冲液洗去 DNA 和 ssRNA,再用不含乙醇的缓冲液洗脱得到纯化的 dsRNA。STE 缓冲液浓度影响 dsRNA 的产出量,不同试验材料适合不同浓度的缓冲液<sup>[11]</sup>。但其中乙醇含量必须在 15% 左右,因为乙醇浓度达 20% 时,ssRNA 最易与纤维素粉结合,若乙醇浓度小于 10%,虽然可以完全去除 ssRNA, dsRNA 的所得量也将减少<sup>[4]</sup>。为了避免 DNA 与 dsRNA 竞争吸附纤维素粉,可以调

节反应在低盐浓度和酸性条件下进行,或在第一步洗脱之后用 DNase 处理。

组织材料的性质对 dsRNA 的提取有很大影响。就大多数病毒而言,幼嫩、新鲜的组织最好,老的组织产出 dsRNA 较少。

### 2.2 从病毒粒体中提取 dsRNA

如果试验材料中 dsRNA 病毒含量高且粒体稳定,可以先提取病毒粒体,去除蛋白质部分,得到纯化的 dsRNA。由于病毒粒体中核酸成分固定,无须考虑其它类型核酸的干扰,所得 dsRNA 纯度相对较高。董长垣等报道的冷盐沉淀法,用 SDS/KCl 处理病毒粒体,沉淀蛋白质,再用酚:氯仿:异戊醇提取病毒的核酸,可以同时获得病毒的蛋白成分和 dsRNA 成分<sup>[2]</sup>,有利于进一步试验。

## 3 双链 RNA 技术在植物病毒研究中的应用

### 3.1 病毒或类病毒病的诊断

双链 RNA 技术用于诊断植物的病毒或类病毒病,方法简便,无需特殊设备,且没有病毒或寄主特异性,不易受试验材料或环境影响,可以方便地检测出病毒的复合侵染,甚至发现预想不到的新病毒,弥补传统血清学测定的不足。但它只能检测 RNA 病毒,且对于有些 RNA 病毒如黄症病毒(Luteovirus)和多数马铃薯 Y 病毒(Potyvirus),产生 dsRNA 很少,应用双链 RNA 技术检测比较困难。

DODDS 从病株中提取出了甜菜黄化病毒(BYV)、香石竹坏死斑斑驳病毒(CNFV)、柑橘衰退病毒(CTV)的 dsRNA<sup>[12]</sup>;MOSSOP 等在葡萄病株韧皮部和栓皮组织中发现了难于分离的线形病毒粒子和分子量是这些线形粒子基因组大小两倍的 dsRNA,但未能确定病原,直到 1991 年,REZAIAN 等应用 dsRNA 技术进行研究,发现葡萄卷叶病是一系列病毒复合侵染的结果<sup>[10,13]</sup>;香蕉束顶病毒(BBTV)的病毒粒体存在于寄主植物的韧皮部组织,含量很低,在乳胶和丹宁等物质的干扰下很难纯化,病原类型一直不能确定,1986 年 DALE 等从表现典型症状的病株中分离到了 dsRNA,争议才略有平息<sup>[14]</sup>;牛建新等结合 RT-PCR 检测技术,以 dsRNA 为模板检测了梨脉黄病毒<sup>[13]</sup>。FRENCH 等从番茄组织中检测到了马铃薯纺锤块茎类病毒的 dsRNA<sup>[15]</sup>。

对于粒体不稳定或只能机械传播的病毒,双链

RNA技术可用于纯化病毒的dsRNA,进行人工接种,研究其侵染和传播。

### 3.2 病毒的分类和比较

基因组大小、种类和片段数目是划分病毒属的依据。电泳检测可以初步确定dsRNA病毒的分类地位,进一步RT-PCR扩增测出病毒的基因组全序列,可将病毒分类定位到种的水平。这一方法已用于多种病毒的鉴定<sup>[6,16,17]</sup>。

1987年SPIEGEL从草莓病株中分离观察到了3条dsRNA电泳条带,经比较,确认草莓轻型黄边病毒属于黄症病毒科(Luteoviridae)。水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)与玉米粗缩病毒(MRDV)都可以侵染玉米而造成粗缩症状,二者同属呼肠孤病毒科(Reoviridae)斐济病毒属(*Fijiviruses*),曾被怀疑是同一种病毒。通过提取病毒的dsRNA,测定基因组序列,与两种病毒的已知序列比较,发现中国北方所谓的玉米粗缩病是由水稻黑条矮缩病毒(RBSDV)而不是玉米粗缩病毒(MRDV)引起的。

双链RNA技术还用于鉴定同一属或同一种病毒不同株系的分化,进行株系间的比较,确定亲缘关系。黄瓜花叶病毒(CMV)可以由70多种昆虫传播,侵染700多种植物,株系分化明显。根据血清学鉴定和生物学鉴定,仅中国分离株就划分为50多个株系。PARES等通过比较病毒的dsRNA,将26个CMV分离物划分为7个不同的株系,更能反映它们的亲缘关系,与生物特性更加相关<sup>[15]</sup>。王燕平等提取了心里美萝卜不同变种的dsRNA,克隆后用cDNA杂交检测,发现它们具有亲缘性<sup>[18]</sup>。HUTCHINSON等用双链RNA分析技术比较了糖用甜菜中分离的土传病毒和其它管状病毒<sup>[19]</sup>。

### 3.3 病毒卫星RNA的检测

病毒卫星RNA是伴随病毒基因组的裸露环状RNA分子。目前已报道30多种植物病毒带有卫星。卫星RNA自身复制过程中产生dsRNA,可以用双链RNA技术检测。

DODDS等在1983年分离3种长线病毒属病毒(Closteroviruses):甜菜黄化病毒(BYV)、香石竹坏死斑驳病毒(CNFV)、柑橘衰退病毒(CTV)的dsRNA时,意外发现了分子量比ssRNA复制形式小的dsRNA<sup>[12]</sup>。1984年他在CMV侵染的番茄和辣椒中发现了CMV卫星RNA复制产生的dsRNA。1986年他分析了10个CTV株系,发现引起矮化和

褪绿症状的黄化株中不但有一种高分子量的dsRNA,还有一其它株系没有的较小的dsRNA<sup>[20]</sup>。

### 3.4 植物病害的生物防治

dsRNA性质稳定,可以直接作为模板制备探针或进行分子克隆,开发抗病毒转基因植物,防治植物病毒病。很多植物病原真菌体内有影响其致病性的dsRNA因子,用这些dsRNA选育弱毒菌株,通过交互保护防治真菌病害是病害生物防治的新途径。

核盘菌在自然条件下致病力衰退的现象,即弱毒现象,是由其核外可以遗传的dsRNA决定的<sup>[21]</sup>;栗疫病菌大量的弱毒株变异与其dsRNA有关<sup>[22~24]</sup>;立枯丝核菌的自然衰退现象由来已久,dsRNA因子调控病菌毒力的证据不断增加<sup>[25]</sup>;稻瘟病菌的dsRNA因子影响其自然群体的致病性变异<sup>[26]</sup>。鸭跖草叶点霉中也发现有dsRNA存在<sup>[27]</sup>,启示我们有可能利用杂草的病毒对其进行生物防治。

## 4 问题与展望

植物病毒中dsRNA存在广泛,随着RNAi即外源dsRNA介导生物体内同源基因沉默现象的发现,dsRNA日益受到关注。双链RNA技术步骤简单,提取效率高,为植物病毒各个领域的研究提供材料,是一项基本的病毒研究技术。dsRNA技术集成化、智能化,开发dsRNA提取和分析试剂盒,将推动双链RNA技术在病毒检测和病毒病诊断上的应用和植物病毒学研究的进展。利用分子生物学原理,完善dsRNA的转化和表达技术,寻找治疗遗传疾病或病毒病的新方法,是双链RNA技术向更深更广的领域发展的契机。

#### [参考文献]

- [1] MORRIS T J, DODDS J A. Isolation and Analysis of Double-stranded RNA from Virus-infected Plant and Fungi Tissue[J]. *Phytopathology*, 1979, 69(8): 854 - 858.
- [2] 董长垣, 陈晓, 陈保平, 等. 冷盐沉淀同步分离dsRNA病毒基因组和结构多肽的方法[J]. *湖北医科大学学报*, 2000, 21(4): 265 - 267.
- [3] 陈博言, 卢春. 传染性法氏囊病毒dsRNA核酸提取[J]. *南京农业大学学报*, 1996, 19(4): 73 - 76.
- [4] WEI Chuan-zhao, HIDEKI OSAKI. Molecular characterization of dsRNA segments 2 and 5 and electron mi-

- croscopy of a novel reovirus from a hypovirulent isolate, W370, of the plant pathogen *Rosellinia necatrix* [J]. *Gen Virol*, 2003, 84: 2431 - 2437.
- [5] CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162 (1): 156 - 159.
- [6] 孙建和, 蒋静, 陆莘, 等. 一步法扩增 IBDV 上海株全长基因组 cDNA [J]. *中国预防兽医学报*, 2002, 24 (3): 194 - 197.
- [7] AYDERMIR AKIN, CHING CHING WU, TANG LONG LIN. A comparison of two RNA isolation methods for double-stranded RNA of infectious bursal disease virus [J]. *Journal of virological method*, 1998, 74: 179 - 184.
- [8] DEPAULO J J, POWELL C A. Extraction of Double-Stranded RNA from Plant Tissues Without the Use of Organic Solvents [J]. *Plant Disease*, 1994, 79 (3): 246 - 248.
- [9] DIAZ-RUIZ J R, KAPER J M. Isolation of viral double-stranded RNAs using a LiCl fractionation procedure [J]. *Prep Biochem*, 1978, 8(1): 1 - 17.
- [10] 周雪平, 李德葆. 双链 RNA 技术在植物病毒中的应用 [J]. *生物技术*, 1995, 5(1): 1 - 40.
- [11] 李东栋, 牛建新, 潘立忠. 葡萄卷叶病毒双链 RNA (dsRNA) 提纯分析研究 [J]. *石河子大学学报*, 2000, 4(3): 205 - 210.
- [12] ALLAN DODDS J, MOSHE BAR-JOSEPH, DOUBLE-STRANDED. RNA from Plants Infected with Closterovirus [J]. *Phytopathology*, 1983, 73(3): 419 - 423.
- [13] 牛建新, 李东栋. 葡萄病毒病的双链 RNA (dsRNA) 检测技术研究 [J]. *果树学报*, 2002, 19(3): 149 - 152.
- [14] 孟清, 曹先维. 香蕉束顶病毒研究进展 [J]. *中国病毒学*, 1997, 12(2): 97 - 102.
- [15] 田文会, 王江柱. 双链 RNA 分析技术在鉴定 RNA 病毒中的应用 [J]. *河北农业大学学报*, 1995, 18 (4): 112 - 117.
- [16] 游志勇, 陈涛, 何英等. 环状病毒 M14dsRNA 基因组的进一步研究 [J]. *病毒学报*, 1990, 6(2): 189 - 374.
- [17] 胡建芳, 张珈敏, 杨娟, 等. 单引物法扩增马尾松毛虫 CPV 基因组第 8 片段及其序列分析 [J]. *中国病毒学*, 2003, 18(1): 39 - 43.
- [18] 王燕平, 陈爱裙, 张竞, 等. 心里美萝卜 dsRNA 的克隆和 cDNA 杂交法检测不同变种萝卜 dsRNA 的亲缘性 [J]. *病毒学报*, 1992, 8(4): 364 - 366.
- [19] HUTCHINSON P J, HENRY C M, COUTTS R H. A comparison, using dsRNA analysis, between beet soil-borne virus and some other tubular viruses isolated from sugar beet [J]. *Journal of General Virology*, 1992, 73: 1317 - 1320.
- [20] 叶寅, 郝麟惠, 田波. 卫星 RNA 研究进展: 结构与功能表达 [J]. *中国病毒学*, 1992, 7(4): 367 - 374.
- [21] 李国庆, 姜道宏, 王道本, 等. 同核盘菌菌株 Ep-1PN 弱毒性状相关的 RNA 及其属性 [J]. *自然科学进展*, 1999, 9(12): 1245 - 1249.
- [22] 全勇, 梁平彦, 陈开英, 等. 我国和欧美洲栗疫苗低毒株 dsRNA 同源性比较 [J]. *微生物学报*, 1992, 34 (1): 1 - 5.
- [23] 王克荣, 成桂英, 刘怡君, 等. 栗疫病菌的营养体亲和性基因和 dsRNAs 对病毒传播的影响 [J]. *菌物系统*, 1997, 16(1): 30 - 35.
- [24] 周尔勋, 王克荣, 刘凤权, 等. 单克隆抗体检测栗疫菌 dsRNA 的研究初报 [J]. *植物病理学报*, 1993, 25 (1): 91 - 92.
- [25] 张剑冰, 梁平彦. 棉立枯丝核菌的 dsRNA 与致病力的研究 [J]. *微生物学报*, 1992, 32(2): 91 - 98.
- [26] 方祥, 叶华智, 曹燕, 等. 四川省稻瘟病菌中 dsRNA 因子的检测 [J]. *四川农业大学学报*, 2000, 18(4): 315 - 318.
- [27] 张艳华, 杜娟, 白容霖, 等. 鸭跖草叶点霉生物学特性及致病力强弱的机理 [J]. *吉林农业大学学报*, 2000, 22(3): 27 - 29.