

中图分类号: S532 文献标识码: B 文章编号: 1672-3635(2014)04-0233-02

## 利用往返电泳法(R-PAGE)检测马铃薯 纺锤块茎类病毒技术要点

邱彩玲<sup>1,2\*</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 目前国内普遍采用的往返电泳法是检测马铃薯类病毒的主要方法之一, 但该方法存在灵敏度低, 重复性差等问题。因此, 针对上述问题总结出一些技术要点: (1) 保证植物生长环境及正确取样; (2) 提高凝胶中RNA的浓度和质量; (3) 控制好反向电泳的温度和时间; (4) 及时更换染色液。

**关键词:** 往返电泳; 马铃薯类病毒; 技术要点

## Technical Points of Return-polyacrylamide Gel Electrophoresis (R-PAGE) on Detection of Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd)

QIU Cailing<sup>1,2\*</sup>

(1. Virus-free Seedling Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China;  
2. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

**Abstract:** At present, return-polyacrylamide gel electrophoresis (R-PAGE) is a commonly used method for potato spindle tuber viroid (PSTVd) detection in China. But, there are some drawbacks in this technique, such as low sensitivity and poor repeatability. In response to the problems mentioned above, some technical points were pointed out based on the author's experience for PSTVd detection: (1) optimization of plant growth environments and proper sampling; (2) increasing the concentration and quality of RNA in the gel; (3) the control of temperature and time in reverse electrophoresis; and (4) replacing the staining solution timely.

**Key Words:** return-polyacrylamide gel electrophoresis (R-PAGE); potato spindle tuber viroid (PSTVd); technical point

马铃薯纺锤块茎类病毒(Potato spindle tuber viroid, PSTVd)是第一个发现的类病毒,其病原是一种比一般病毒小得多的低分子量物质<sup>[1,2]</sup>,具有高度的侵染性,极易通过接触、农具、衣物和切刀等进行汁液传播,也可通过花粉和子房传到种子中。据报道,PSTVd还可以通过某些昆虫传播,如:绿盲蝽蟊、蚜虫和马铃薯甲虫等,传播途径十分广泛。PSTVd强系可引起减产60%,弱系减产20%~35%,造成较大经济损失<sup>[3]</sup>。马铃薯

纺锤块茎类病毒是威胁中国马铃薯生产的重要病害,该病害在中国从南到北均有发生,并呈逐年上升趋势,在北部的马铃薯主产区严重危害马铃薯生产和实生种子的品质,是种薯生产和实生种子利用中亟待解决的问题<sup>[4]</sup>。

往返电泳(R-PAGE)技术的原理及方法是:类病毒分子在自然和变性条件下电泳迁移率存在明显不同,变性所引起类病毒核酸的环状结构使其电泳迁移率明显慢于相同分子量的其它线性RNA

收稿日期: 2014-06-14

基金项目: 哈尔滨市应用技术与开发项目(2013AE6AW059); 现代农业产业技术体系专项资金资助项目(CARS-10-P14)。

作者简介: 邱彩玲(1976-),女,博士研究生,主要从事马铃薯病害检测技术研究。

\*通信作者(Corresponding author): 邱彩玲, E-mail: 279145673@qq.com。

分子, 第一次电泳在非变性条件下, 类病毒 RNA 的棒状核酸同寄主核酸分离出来, 第二次电泳是在变性条件下变换电极, 此时, 类病毒核酸由棒状变成单链环状, 比同样大小的核酸迁移慢, 因此, 类病毒 RNA 会产生一条明显的带, 据此, 结合可靠灵敏的银染色技术测定类病毒。R-PAGE 的优点是操作简单, 要求的实验条件比较简单, 一般的实验室都能满足, 可以普遍采用。然而, R-PAGE 方法的灵敏度不及 NASH 和 RT-PCR 法, 并且重复性不好, 因此, 笔者通过一系列的方法对该技术进行了改进, 以期提高 R-PAGE 的灵敏度和重复性, 确保检测结果的准确可靠。

### 1 保证植物生长环境及正确取样

由于马铃薯类病毒受温度和光照的影响, 因此, 试管苗和温室中种植的植株的生长环境应不低于 18℃ (最好高于 20℃), 并至少每天 16 h 光照, 试管苗应在培养 4~6 周后, 茎高达到 5 cm 后取样, 整株取样。作为阴性对照的试管苗应在温室种植一段时间后, 使之生长充分, 于开花前取样, 应取顶部充分展开的叶片<sup>[5]</sup>。

### 2 提高凝胶中 RNA 的浓度和质量

#### 2.1 确保 RNA 提取质量

在日常工作中总结出以下几点: (1) 在 RNA 提取过程中, 加入液氮可以迅速使细胞裂解, 充分释放出 RNA, 从而提高 RNA 提取效率; (2) 操作尽可能在冰上进行, 速度要快, 尽量减少 RNA 提取的时间; (3) 对试验中涉及的器皿、耗材等进行处理, 避免 RNA 酶降解。虽然 PSTVd 的结构比较稳定, 与一般的 RNA 相比不易降解, 但严格的操作对于确保试验成功仍然是必不可少的重要环节。

#### 2.2 提高 RNA 浓度

不言而喻, 回溶溶液的多少直接影响着样品中 RNA 的浓度, 因此, 在许可的范围内减少回溶溶液可以提高 RNA 浓度, 提高检测效率。另外, 使用大量样品提取 RNA 也可以取得很好的效果。

#### 2.3 增加上样量

凝胶中 RNA 的总量越多, 就越容易检测到含量较低的马铃薯类病毒, 提高检测的效果。因此, 在适当范围内, 应尽可能多的加入待检 RNA 样品, 以提高检测的效率。

### 3 控制好反向电泳的温度和时间

由于类病毒在自然条件下呈棒状高度配对的状态, 而在高温(70~80℃)条件下变性, 由棒状变成环状, 致使在丙烯酰胺中的迁移率减慢, 从而通过两次电泳将类病毒的核酸带与寄主中的其他核酸分离出来。因此, 必须严格控制反向电泳的温度, 避免类病毒复性或变性不充分, 使反向电泳的类病毒迁移率增加, 与寄主核酸区分不明显, 影响检测效率; 然而, 温度也不能过高, 否则高温对凝胶有损害, 使凝胶变形, 影响马铃薯类病毒的检测。

### 4 及时更换染色液

为了 AgNO<sub>3</sub> 染色液可以重复利用, 降低成本、减少工作量, 一般都重复使用, 但不宜使用的次数过多, 否则随着 AgNO<sub>3</sub> 浓度的降低, 染色效果会下降, 甚至可以出现假阴性, 因此, 当 AgNO<sub>3</sub> 溶液中出现较多的沉淀时, 应适时更换染色液, 以确保染色效果, 使阳性样品清晰的显示出来。

由于马铃薯类病毒可以通过接触、昆虫、种子等多种途径传播, 因此, 该病害必须要严格控制, 严把种薯关。另外, 由于目前没有有效的方法脱除, 且不能通过药剂防治, 因此, 预防马铃薯类病毒是马铃薯生产中亟待解决的大问题, 而目前解决的办法只有严格检测才能从根本上控制该病害。所以, 马铃薯纺锤块茎类病毒病的检测技术对于中国脱毒种薯生产、马铃薯产业的发展都至关重要。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 田波, 张秀华, 夏远南. 我国马铃薯纺锤块茎类病毒的初步研究 [J]. 病毒学集刊, 1982, 1(1): 119-122.
- [2] Diener T O. Potato spindle tuber 'virus': a replicating low molecular weight RNA [J]. Virology, 1971, 45(1): 411-428.
- [3] 程天庆. 马铃薯栽培技术 [M]. 2 版. 北京: 金盾出版社, 1996: 123.
- [4] 白艳菊, 李学湛, 吕典秋, 等. 用 NASH 方法检测马铃薯纺锤块茎类病毒 [J]. 杂粮作物, 2001, 21(3): 42-43.
- [5] PM 7/33(1). Diagnostic protocols for regulated pests, potato spindle tuber pospiviroid [S]. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 34, 257-269.