

·研究简报·

聚丙烯酰胺凝胶电泳方法检测马铃薯类病毒技术的改进

李学湛，吕典秋，何云霞，白艳菊，张儒喜，朱 财

(黑龙江省农业科学院生物技术研究中心，哈尔滨 150086)

摘 要：利用往复聚丙烯酰胺凝胶电泳方法进行类病毒的检测，通过对电泳技术的改进和使用液氮研磨、加入皂土等方法改变核酸的提取，使该方法在检测灵敏性、准确性、操作性和可行性上都得到了提高，更有益于该技术的普及。

关键词：电泳；马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVd)

中图分类号：S532 **文献标识码：**A **文章编号：**1001-0092 (2001) 04-0213-02

1 前 言

马铃薯纺锤块茎类病毒是发现最早的植物类病毒，它是一种不含蛋白外壳的 RNA 分子，可通过多种途径传播侵染。目前，对这种类病毒还没有治疗的办法，唯一的途径就是根除侵染的病株。因此，有效的控制这种类病毒就需要一种快速、准确、灵敏、低价，便于操作和判断，并且对人无危害的检测方法。自从 1964 年，Raymer 等人^[1]发现番茄可以作为马铃薯纺锤块茎类病毒的指示植物以来，这方面的工作飞速发展，但由于利用番茄接种鉴定病毒需要 5~7 个星期和较高温条件，又由于 PSTVd 弱系在番茄上发病比较轻微，不易鉴别，所以准确性不是很高。一些学者如 Schumana 等^[2]对比了聚丙烯酰胺凝胶电泳和番茄生物鉴定 PSTVd 的准确性，结果表明聚丙烯酰胺凝胶电泳比番茄生物鉴定快速、准确。因此，自从 Morris 等人^[3]首次把聚丙烯酰胺凝胶电泳法用于马铃薯纺锤块茎类病毒鉴定以来，聚丙烯酰胺凝胶技术已成为广大学者研究类病毒所普遍采用的方法。随着人们对类病毒结构的深入研究，这项技术逐渐完善起来。目前较通用的方法为往复双向聚丙烯酰胺凝

胶电泳^[4,5]，通过割胶、利用脲和高温进行变性^[6,7]，用苯酚进行提取。随着分子生物学的发展，核酸斑点杂交技术 (NASH) 被应用到类病毒检测方面，cDNA 探针和分子杂交技术灵敏可靠，但是有放射性，需要较高水平的技术人员和较好的实验条件和设备才能完成，不便于推广应用，并且 NASH 方法不能区分 PSTVd 强系和弱系。

本实验通过对聚丙烯酰胺电泳技术的改进，不采取割胶的方式，只利用加热，同样取得了较好的实验效果。

2 材料与方 法

2.1 材料

取自本单位茎尖脱毒的试管苗 40 份。

2.2 方 法

采用改进后的往复聚丙烯酰胺凝胶电泳方法进行检测。

2.2.1 核酸的提取

取试管苗植株 3 cm 长，放在研钵中，液氮研碎。加 1 ml 缓冲液 (0.53M NH₄OH, 0.013MED-TA, 用 Tris 调 pH 7.0, 4 m LiCl)，再加入 1% 皂土和 1 ml 0.05 M Tris 溶液饱和酚 (含 0.1g 8-羟基喹啉)，在整个提取过程中，保持样品温度 4~5℃，然后放入离心管中，在 4℃ 下离心 15 min, 7.710 g，取上层核酸液加入 2 倍体积的乙醇，在 -20℃ 放置 30 min，然后每个样品中加入 20 μl 的 4 M 醋酸钠，

收稿日期：2001-01-09

作者简介：李学湛 (1956-)，女，黑龙江省呼兰县人，黑龙江省农科院副研究员，从事马铃薯病毒检测技术研究。

通过离心收集沉淀。在空气中自然干燥, 加入高盐缓冲液 100 μ l (40m M this, 20m M NaAc, 2m MEDTA), 然后, 将核酸放入冰箱冷冻保存或直接用来电泳。

2.2.2 电泳 (使用 Hoefer 公司的 SE-600 电泳设备)

在提取的核酸溶液中加入 40% 蔗糖和 10 μ l 溶有 1% 的二甲苯兰和 1% 溴酚兰指示剂。

2.2.3 制板上样

将电泳槽固定好, 用封口胶 (1% 琼脂) 封好, 倒入制好的胶液 (5% 丙烯酰胺, 0.125% 的 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺 14×16×0.15 cm)。每个样品孔加入核酸样品 15 μ l。

2.2.4 双向电泳

第一次电泳电泳液为 1×TBE, 电压 100V, 电流 25 mA, 电极为从正极到负极, 电泳时间为 4 hr, 电泳在常温下进行, 当二甲苯兰指示剂跑到胶板与琼脂糖封口的交接处时, 停止电泳。

第二次电泳, 调换电泳电极, 电泳温度为 65~70 °C, 在恒温箱中进行, 电泳电压为 200 V, 电流为 75 mA, 电泳时间为 1.5 hr。

2.2.5 结果判读

将凝胶放入倒有 200 ml 固定液 (10% 乙醇, 0.5% 乙酸) 的塑料盘中, 振荡 10 min, 倒掉固定液, 加入 200 ml 染色液 (0.15%~0.2% 硝酸银溶液), 染色 15 min, 将硝酸银倒回瓶中, 用蒸馏水漂洗 4 次, 每次 15 s, 再加入 200 ml 显影液 (0.4M NaOH, 2.3 mM 硼氢化钠, 0.4% 甲醛) 轻轻振荡, 直到显出清晰的核酸带为止, 倒掉显影液, 用自来水洗涤凝胶, 加入 0.75% 碳酸钠溶液增色, 然后将凝胶铺在玻璃板上, 进行观察。

2.2.6 利用 R. P Singh^[5]h T. J. Morris^[6]等人原有的聚丙烯酰胺电泳方法检测

对 40 个样品进行检测, 比较改进后的电泳方法的灵敏性和准确性。

3 结果与结论

改进后的方法与 Singh 等人的方法不同之处有如下几点:

a. 在核酸提取上, 我们采取了液氮研磨样品, 在冷冻的情况下可抑制 Rnase 等活性。

b. 加入少量皂土螯合剂, 可使 RNA 酶活性失活, 保护 RNA。

c. 加大上样量, Singh 等人的上样品为 6 μ l, 改进后方法的上样量为 15 μ l。

d. 在电泳时, Singh 等人在第一次电泳时用 1×TBE, 在第二次电泳时采用 1:8 稀释后的电泳缓冲液, 而我们在二次电泳中均采用 1×TBE 的电泳缓冲液, 不需更换电泳液。因此, 使步骤更简单。

e. 另外, 在第二次电泳中以往的方法需要恒温水浴设备或进行割胶, 较麻烦, 改进后的方法在恒温箱中进行, 不需要恒温水浴等设备, 这样可降低对实验设备的要求。

通过对两种检测方法的比较, 可以看出, 改进后的方法检测的结果和原方法一致, 在 40 个样品中, 发现 4 个阳性反应, 其中 3 个为弱系, 1 个为强系。而改进后的方法在核酸带的颜色上比原方法更加清晰, 原方法的 4 个阳性反应中, 有一个样品核酸带较模糊。

因此, 通过本实验, 我们认为改进后的方法在灵敏度, 操作性和可行性上均好于以往的检测方法, 更便于普及应用。

参 考 文 献

- [1] Raymer W B., M J. O'Brien, D. Merriam. Tomato as a Source of an indicator plant for the potato spindle tuber Virus. Amer. Potato J. 1964, 14: 311-314.
- [2] Schumann G L., H D Thurston, R. K. Horsl, S. D. Kawamoto and G. I Nemoto. Comparison of tamato bioassay and slab gel electrophoresis for detection of potato spindle tuber viroid in potato phytopathology 1978, 68: 1256-1259.
- [3] Morris T J., and N S Wright. Detection on polyacrylamide gel of a diagnostic acid form tissue infected with potato spindle tuber viroid. Amer. potato J, 1975, 52: 57-63.
- [4] 崔荣昌. 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳法鉴定马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTV) 的鉴定技术与应用. 马铃薯科学, 1983, 4: 53-60.
- [5] Singh R P and Boucher, A. Electrophoretic Separation of Severe From Mild Strains of Potato Spindle Tuber Viroid Phytopathology, 1987, 77: 1588-1591.
- [6] Morris, T J and Smith E M. Potato spindle tuber disease: Procedures for the detection of viroid RNA and certification disease-free potato tubers. Phytopathology, 1977, 67: 145-150.