

# 应用 NASH 方法检测马铃薯类病毒 (PSTVd)

李学湛<sup>1</sup>, 吕典秋<sup>1</sup>, 白艳菊<sup>1</sup>, 何云霞<sup>1</sup>, 张儒喜<sup>1</sup>, 朱 财<sup>1</sup> 王 毅<sup>2</sup>, L. Salazar<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 黑龙江省农科院生物技术中心, 哈尔滨 150086; <sup>2</sup> 国际马铃薯中心, 北京 100081)

中图分类号: S435.621.2<sup>+</sup>9 文献标识码: A 文章编号: 1001-0092 (2001) 02-0087-02

## 1 前 言

马铃薯纺锤块茎类病毒 (Potato Spindle Tuber Viroid, 简称 PSTVd) 是引起马铃薯纺锤块茎病的原因, 该病害发现于 1922 年, 但直到 1967 年及以后的研究中才发现该病由一种叫类病毒的病原引起的。分布十分广泛, 是危害我国北方马铃薯生产的重要病害之一, 严重影响马铃薯的质量和产量, 一般弱系可造成减产 20%~35%, 强系可达 60%。对其检测有指示植物方法 (利用指示植物鲁格斯番茄 Rutgers, 新茼蒿等), 在我国, 目前较常用的检测方法为聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 而随着分子生物学的发展, 杂交技术已广泛应用于核酸分析中, 核酸斑点杂交法 (NASH) 作为目前国际上较先进的一种检测方法。它已被一些国家列为检测 PSTVd 的标准检测方法, 它的应用已扩大到病毒检测, 本文就利用荧光标记探针, 通过斑点杂交非放射性检测 PSTVd 方法做一些详细的介绍。

## 2 NASH 方法的原理

核酸斑点杂交技术最初用于在液体内形成 RNA 和 DNA 的杂交分子。现在, 将含有核酸的溶液 (如感染了病毒和类病毒的提取液) 点在硝化纤维素膜上, 然后将膜和探针溶液一起孵育。探针是用纯化的病毒和类病毒核酸制备并经标记的互补 DNA 和 RNA, 可直接合成或采用 DNA 重组体方法。和探针一起孵育之后, 在膜上的核酸形成杂交

分子, 探针可用放射自显影检测出来。

所有已知的生物和许多病毒的遗传材料是 DNA, 但大量病毒 (包括类病毒 PSTVd) 的遗传材料是 RNA。核酸的变性和解链是两条链分离的过程。在适当的条件下这种变性是可逆的, 而复性是用来描述两条分离的互补链恢复为碱基配对的双螺旋链的能力, 这个过程经扩展可使任何两个互补核酸退火。当不同来源的核酸退火时, 反应被称为杂交。

两段核酸序列之间的互补程度将决定形成的杂交分子的特异性。因此, 在部分病毒和类病毒核酸与它的互补链之间形成的杂交分子的特异性最大, 而在这样的核酸和其它病毒株系互补链之间形成的杂交分子特异性较低。因为两个无关的病毒 (类病毒) 核酸通常具有最多的不同序列, 一条它们的互补链将无法与其它的病毒核酸退火, 从而无法形成杂交分子。

## 3 试验方法

### 3.1 样品制备

#### 3.1.1 叶、芽样品

采集样品于塑料袋中, 加入适量提取缓冲液 (1.0 ml/0.5 g 组织) 研样 (提取缓冲液为 37% 甲醛, 10×SSC), 然后移入 Eppendorf 管, 加入等量苯酚/氯仿 (各 1/2 体积), 混匀, 12000 rpm 离心 5 min。吸取 4 μl 上清液于尼龙杂交膜上将点样膜置于 80 °C 烘烤 1 h 或用紫外交联仪处理 5 min。

#### 3.1.2 种子样品

取足量种子 (约 50 粒) 放入试管中蒸馏水浸泡过夜, 倒掉蒸馏水, 在研钵中加 0.5 ml 提取缓冲液研样, 研液倒入 Eppendorf 管中, 加入等量苯酚/氯仿各 1/2 体积, 混匀 12000 rpm 离心 5 min,

收稿日期: 2000-10-26

项目来源: 黑龙江省科委重大项目。

项目名称: 应用高新技术拓宽马铃薯种质与脱毒核心种薯的开发研究

作者简介: 李学湛, 男, 黑龙江省肇源县人, 黑龙江省农科院副研究员, 从事马铃薯病毒及检测技术研究。

中国知网 <https://www.cnki.net>

吸取 4 μl 上清液于尼龙杂交膜上, 并将点样膜置于 80 °C 烘烤 1 h 或用紫外交联仪处理 5 min。

### 3.2 预杂交和杂交

点样膜装入杂交塑料袋中, 加入所需体积的杂交缓冲液 (5XSSC, 1/20 封膜液, 0.1%/SDS, 5% (W/V) 硫酸葡聚糖 0.15 ml/cm<sup>2</sup> 杂交膜) 至 60 °C。注入盛有点样膜的塑料袋中, 恒温预杂交 1 h。然后将探针移入 Eppendorf 管 (2 μl/ml 杂交缓冲液)。不足 20 μl, 则用蒸馏水调至该体积, 煮沸使之变性, 5 min 后置于冰上骤冷。将变性探针注入预杂交缓冲液中 (不要加在膜上), 密封塑料袋, 混匀, 60 °C 轻缓振荡杂交 1 h。

### 3.3 漂洗、封闭和抗体孵育

#### 3.3.1 漂洗

将洗液 I (1XSSC, 0.1% (w/v) SDS) 预热 60 °C, 放入点样膜 (2~5 ml 洗液/cm<sup>2</sup> 杂交膜), 恒温轻缓振荡 15 min, 在上述温度下进行第二次漂洗 5 min, 再使用预热的洗液 II (0.5 × SSC, 0.1 (w/v) SDS)。

#### 3.3.2 封闭

室温下将点样膜在封闭缓冲液 (1 ml/cm<sup>2</sup> 杂交膜) 中孵育 1 h, 封闭液按 1:10 稀释液 (100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 9.5) 稀释。

#### 3.3.3 抗体孵育

用现配的 0.5% BSA 稀释缓冲液稀释抗荧光素碱性磷酸酶酶标抗体至 500 倍, 将点样膜放在稀释后的酶标抗体溶液中 (0.3 ml/cm<sup>2</sup> 杂交膜) 于室温下轻振 1 h。

#### 3.3.4 最后漂洗

室温下, 用 0.3% (w/v) 吐温浸泡 10 min, 轻轻振荡洗脱没有结合的抗体, 重复 3 次。

### 3.4 信号产生和检测

#### 3.4.1 信号产生

去掉膜上多余洗液, 向膜上加底物 CDP-Star (30~40 μl/cm<sup>2</sup> 杂交膜), 静置 5 min。揭起杂交膜除去多余底物, 夹在显影夹 (2 层透明的较硬塑料板中) 滚压挤出多余底物和气泡, 用热塑封口器密封, 在暗室内 (15W 以下的红灯) 将 Kodak X-OMAT X-AR-2 胶片放在点样膜上, 可夹在二个硬纸板中间, 曝光 1 h。取出胶片在 Kodak 显影液中浸 2 min 取出用清水冲洗后, 放入 Kodak 定影液中处理 2 min, 用水冲洗后凉干或烘干。

#### 3.4.2 结果判读

在柯达胶片上有明显黑色圆斑的为阳性反应, 没有现象的为阴性反应。

## 4 核酸杂交方法的优点

①省时。通常一个实验可在 1d 完成, 每次检测可根据自己的需要确定检测样品的数, 最多一次可测上百个样品。

②灵敏度高。NASH 可检测少至 0.33 pg 的类病毒。

③简单方便。可进行异地取样, 在样品提取上也可直接用样品的汁液点在杂交膜上, 在没有条件做此实验的地方, 可以进行远地方取样, 然后邮寄运输到有条件的单位进行检测。

④检测样品可长期保存在杂交膜上。

· 广 告 ·

## 浙江省台州市路桥日新筛网厂

(原新桥万富筛网厂)

向您优惠提供——尼龙防虫网、遮阳网

尼龙防虫网 (即尼龙筛网) 网罩, 广泛用于马铃薯等脱毒后隔罩, 蔬菜、油菜制种及无公害蔬菜生产等。规格 40 目~350 目, 40 目/1.60 元, 60 目/1.90 元。还生产尼龙种子袋、马铃薯合格证、吊签、插地牌等。

先汇款单位价优

汇款全称: 浙江省台州市路桥日新筛网厂

帐号: 331021089874014860

电话/传真: 0576-2615705、2665218

厂长: 章万富 (工程师)

开户行: 台州市路桥农行新桥分理处

通信地点: 台州市路桥区新桥镇凤阳章路 9 号

邮编: 318055

手机: 13701030208

联系人: 章桂青