

准确、简易的检测马铃薯纺锤块茎类病毒 的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳技术

姜成模 金顺福 崔哲官 崔永一

(延边州农业科学研究所 龙井市 133400)

马铃薯纺锤块茎类病毒 (Potato Spindle Tuber Viroid, PSTV-d) 是危害我国马铃薯生产的重要病害之一, 一般减产 20% ~ 30%, 有的品种由于薯形畸变、龟裂, 几乎完全失掉商品价值。对类病毒病害的防治主要靠早期诊断, 即生产马铃薯原原种用的基础试管苗要定期检测其带类病毒的状况, 肯定不带类病毒后, 才能用于生产原原种; 准备脱除病毒的品种材料, 则首先要检测筛选出无类病毒的植株或块茎, 然后再行脱毒。

马铃薯纺锤块茎类病毒是共价闭合的环状核糖核酸分子, 在天然状态下为类似于棒状的结构, 而在变性过程中成为打开的环状分子。这种环状分子在 5% 的聚丙烯酰胺凝胶中的迁移率比相同分子量的寄主线状核酸分子慢得多, 利用这一性质, 在变性条件下电泳可将类病毒核酸和寄主核酸在凝胶中分开, 染色后识别, 达到检测鉴定类病毒的目的。

1983 年 Schumacher⁽¹⁾ 基于上述原理建立了双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (Bidirectional Electrophoretic Technique) 检测类病毒的技术。1986 年他又建立了往复聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (Return Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 检测类病毒技术⁽²⁾。

我们在使用国产普通电泳仪 (DYY-Ⅲ 8B 型, 最高电压 600 伏, 最大电流 100 毫安) 和电泳槽 (DYY-Ⅲ 28 或 45 型夹芯式电泳槽), 用往复电泳法检测类病毒试验过程中发现:

a. 凝胶板上的类病毒核酸带扩散, 着色浅, 不易辨认结果, 检测结果的重复性也不好, 尤其是类病毒含量低的样品, 检测的重复性更低。

b. 第二向电泳时, 由于其电极缓冲液要保持 70~75℃ 的高温, 用水浴或其它方法加温时, 电泳槽常漏水, 使用几次以后电泳槽常变形损坏。

因此, 在使用国产普通电泳设备的条件下, 提高检测类病毒电泳方法的灵敏度和使其适于常规大量样品的检测, 仍是急需解决的问题。

1 材料与方法

1.1 对比试验三种检测类病毒凝胶电泳法的灵敏度

这三种方法是:

a. 往复聚丙烯酰胺凝胶电泳法: 用 5% 丙烯酰胺、0.125% 亚甲基双丙烯酰胺凝胶。用提取缓冲液 (0.53M NH_4OH , 13 mM EDTA, 用 Tris 调为 pH7.0,

4M LicL) 和水饱和酚提取类病毒。第一向电泳(从负极到正极)在常温下进行。用 TBE 缓冲液(89mM Tris, 89mM 硼酸, 2.5mM EDTA, pH8.3) 作电极缓冲液。当二甲苯兰示踪染料泳到凝胶板底部边缘时停止电泳。第二向电泳(从正极到负极)在 75℃ 温度条件下进行。用 1/8 TBE 缓冲液作电极缓冲液。当二甲苯兰带走到凝胶板顶部时停止电泳(第二向电泳的时间可与第一向电泳相同)。用银染法染色凝胶板。

b. 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法: 第一向电泳用 5% 丙烯酰胺、0.125% 亚甲基双丙烯酰胺凝胶, 在室温条件下电泳; 第二向电泳在凝胶中加 8M 脲, 即所谓变性胶, 在 65℃ 温度条件下进行。用 TBE 缓冲液作电极缓冲液。具体做法是, 当溴酚兰示踪染料泳出胶板(指应用 DYY-28 型电泳槽), 此时二甲苯兰染料正处于凝胶板中部, 切下二甲苯兰带并把它移到胶板底部, 然后灌入含 8M 脲的变性胶, 聚合后开始从正极到负极的第二向电泳。其它如核酸提取, 加样, 电泳时间和胶板染色等都与往复电泳法相同。

c. 简易双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法: 本法与方法 b 基本相同。不同之处是当二甲苯兰染料带正处于凝胶板中部时, 停止电泳, 切下二甲苯兰带并把它移到胶板底部, 灌入含 8M 脲的变性胶, 把胶板装入电泳槽开始从正极到负极电泳, 当二甲苯兰带泳进新灌的变性胶中以后, 拆下凝胶板, 放入温度为 80℃ 的水浴中处理 30 分钟。然后把胶板装进电泳槽, 在室温条件下进行第二向电泳。

1.2 本试验应用的核酸提取方法及电泳操作程序

a. 核酸提取: 0.2~0.5 克组织(叶片、块茎或试管苗)加 0.75 毫升提取缓冲液和 1 毫升水饱和酚, 研磨。离心后约吸取出 0.75 毫升上清液, 加 2 滴 4M 乙酸钠溶

液和 1.5 毫升 95% 乙醇, 在 -18℃ 条件下至少放置 30 分钟以沉淀核酸。离心收集核酸, 待乙醇控干和挥发后, 加入 40 微升样品缓冲液(含 40% 丙三醇的 TBE 缓冲液)和 1 滴 1% 二甲苯兰溶液。上样量为 6 微升。

b. 电泳: 用 DYY-III45 型夹芯式电泳槽(北京六一仪器厂生产)。这一型式电泳槽胶板宽 12.5 厘米, 长 21 厘米, 有 15 条泳道。用于简易双向电泳法检测时, 第一向电泳当二甲苯兰带走下 7 厘米时(从样品凹下边缘算起, 约需 70 分钟), 拆下凝胶板, 切下二甲苯兰带并把它移到胶板下边缘, 灌入含 8M 脲的变性胶, 开始从正极到负极电泳, 当二甲苯兰带已泳进新灌的变性胶后, 拆下胶板并把胶板放到 80℃ 的水浴中处理 30 分钟, 然后把胶板装进电泳槽, 进行第二向电泳, 电泳达到 130 分钟, 停止电泳, 用银染法染色凝胶板。

用双向凝胶电泳法检测类病毒时, 操作程序和上述方法相似, 在灌进含有 8M 脲的变性胶后, 在 65℃ 温度条件下, 进行从正极到负极的第二向电泳, 电泳达到 130 分钟时, 停止电泳。

用 DYY-III-45 型电泳槽进行往复电泳时, 可把上槽的玻璃板从上边截短 5 厘米, 保持上槽一面玻璃板为 16 厘米长, 这样第一、二向电泳的时间都约需 130 分钟。

电泳时的电流量为每厘米宽胶板 4.6 毫安, 即每块胶板需要 58 毫安。

1.3 对比检测用的类病毒毒源和其它对比检测材料

a. 类病毒毒源: 当地麻土豆的试管苗, 用 LKB2197 型电泳仪和 SE600 型电泳槽, 用往复电泳法经多次检测始终为阳性, 每次检测用它作阳性对照。

b. 本实验室保存的几个马铃薯品种的试管苗, 田间植株及其生产的块茎。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶板上类病毒带相对浓度的估价

类病毒浓度低: 以“+”表示, 类病毒带的宽度约为1毫米, 黄褐色。

类病毒浓度中等: 以“++”表示, 类病毒带的宽在1~3毫米之间, 褐色。

类病毒浓度高: 以“+++”表示, 类病毒带的宽度大于3毫米, 深褐色。

2 试验结果

2.1 三种聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测类病毒效果的对比

2.1.1 检测茎尖剥离培养的脱毒苗的带类病毒状况

共检测十批次140管试管苗。这些试管

表1 用三种凝胶电泳法对比检测脱毒试管苗带类病毒状况的结果

检测结果	往复电泳法	双向电泳法	简易双向电泳法
检测样品数	140	140	140
阳性样品数	8	22	20
阳性样品数占检测样品数的%	5.7	15.7	14.3
毒源对照的类病毒相对浓度	+	+++	+++

表2 用三种凝胶电泳法对比检测植株和块茎的结果

检测结果	往复电泳法	双向电泳法	简易双向电泳法
苗期植株	阳性植株数/检测植株数	7/10	10/10
	类病毒相对浓度	+	+++
开花期植株	阳性植株数/检测植株数	10/10	10/10
	类病毒相对浓度	++	+++
2厘米块茎	阳性块茎数/检测块茎数	4/10	10/10
	类病毒相对浓度	+	+++
收获期块茎	阳性块茎数/检测块茎数	8/10	10/10
	类病毒相对浓度	++	+++

从表2中三种电泳法检测类病毒的结果看出, 在检测已知的类病毒毒源及其生产的块茎时, 往复电泳法检测出的植株和块茎的阳性数比双向电泳法和简易双向电泳法检测出的阳性数都低, 而且既使用往复电泳法检测确认为阳性, 但其类病毒带表现扩散, 色

苗脱毒用的母薯, 都事先用往复电泳法检测证实为不带类病毒的块茎。组织培养脱毒后再次用三种凝胶电泳法对比检测, 并对比三种凝胶电泳法检测类病毒的效果。其结果见表1。

从表1的结果可以看出, 双向电泳法和简易双向电泳法在检测效果和检测灵敏度方面都优于往复电泳法。从三种方法检测类病毒毒源所反映出的类病毒相对浓度表现, 也充分说明了这一点。

2.1.2 三种电泳法检测植株、块茎的对比

在田间种植了10株类病毒毒源植株, 于苗期和开花期用三种电泳法对比检测了叶片; 在块茎直径达2厘米和收获期, 用三种电泳法对比检测了块茎。检测结果见表2。

洋淡, 表明类病毒的相对浓度也低。值得指出的是, 用往复电泳法检测确认为阳性、而类病毒相对浓度较低的结果(+), 对于经验少的操作人员来说, 一般是难以辩认的。

2.2 对比往复电泳法、双向电泳法和简易双向电泳法检测类病毒的灵敏度

从上述结果已经看出, 双向电泳法和简易双向电泳法检测类病毒的灵敏度比往复电泳法高, 但是高到如何程度呢? 我们把用往复电泳法检测确认为阳性的类病毒毒源样品(类病毒相对浓度为+), 用二倍稀释法一直稀释到 1: 256。然后用双向电泳法和简易双向电泳法检测, 以确定两种电泳法检测类病毒的灵敏度。结果见表 3。

表 3 双向电泳法和简易双向电泳法检测类病毒的灵敏度

用往复电泳法检测类病毒相对浓度为“+”的毒源的稀释度	双向电泳法	简易双向电泳法
1	+++	+++
1: 2	+++	+++
1: 4	+++	++
1: 8	++	++
1: 16	++	++
1: 32	++	+
1: 64	+	+
1: 128	-	-
1: 256	-	-

从表 3 看出, 往复电泳法对双向电泳法说来是一种改进, 但却导致检测类病毒灵敏度的明显降低。还有一个共同的缺点, 即二者的第二向电泳都是在高温下进行, 这就常使电泳槽变形损坏。改进的简易双向电泳法检测类病毒的灵敏度与双向电泳法基本一致, 而且促进类病毒变性的高温处理是在电泳槽外单独进行的, 这就避免了损坏电泳槽, 也便于试验操作。往复电泳法第一、二向电泳都分别需要 130 分钟, 凝胶长度为 14 厘米, 从样品凹下边缘算起, 用简易双向电泳法检测类病毒, 在第一向电泳 70 分钟时切下二甲苯兰带, 灌变性胶, 再用 80℃ 温度处理胶板 30 分钟, 所有这些操作需要 60 分钟, 花在第一向电泳的时间与往复电泳法相同。我们这些试验结果和 Popp 所报道的初步试验结果是一致的。

3 结 论

a. 在应用普通电泳仪、电泳槽和离心机的条件下, 用往复电泳法、双向电泳法和简易双向电泳法对比检测了类病毒毒源、试管苗、田间植株和块茎等供试材料共 14 批次看出, 简易电泳法检测类病毒的灵敏度比往复电泳法高 64 倍, 甚至取一段 2 厘米长、重 40 微克的试管苗嫩茎进行检测也可获得准确的结果, 而且检测结果易于辨认, 检测所需的时间和往复电泳法相同, 是一种灵敏度高、快速, 效果好的检测马铃薯纺锤块茎类病毒的聚丙烯酰胺凝胶电泳法。

b. 往复电泳法和双向电泳法的第二向电泳都需要在高温条件下进行, 这常使电泳槽漏水而不便于操作, 并在使用几次后使电泳槽变形损坏; 而简易电泳法促使类病毒变性的高温处理步骤是在电泳槽外单独处理凝胶板, 因而不会损坏电泳槽, 并使整个电泳程序趋于简易。

c. 本实验所使用的仪器全部是国产普通型号仪器。因此, 简易双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法是一种适于我国农业科研机构检测类病毒的准确、快速和简易的方法。

参 考 文 献

1 Schumacher J J, W Randles and D Riesner. A Two-dimensional Electrophoretic Technique for the Detection of Circular Viroids and Virusoids. Analytical Biochemistry, 1983, 135: 288—295

2 Schumacher J, N Meyer, D Riesner, and H L Weidemann. Diagnostic Procedure for Detection of Viroids and Viruses with Circular RNAs by "Return" Gel Electrophoresis. J Phytopathol., 1986, 115: 332—343

3 Poppr J. The Method of Detection of Potato Spindle Tuber Viroid and Chrysanthemum Stunt Viroid in Czechoslovakia. Viroids of Plants and Their Detection International Seminar, 1986. Warsaw Agricultural University.