

☆☆☆☆☆☆
☆ 综 述 ☆
☆☆☆☆☆☆

马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTV) 检测方法的研究进展

赵 宁 王人元

(东北农学院)

马铃薯纺锤块茎病于1922年已被发现,但其病原鉴定的研究进展十分缓慢,直到1967年Diener等首次发现该病由是马铃薯纺锤块茎类病毒(Potato Spindle Tuber Viroid简称PSTV)所致。PSTV的寄主范围很广,但绝大多数属于无症侵染。早期PSTV的诊断主要靠生物鉴定的方法进行,后来很多学者试图利用血清学方法进行检测,但由于PSTV是1个没有蛋白质衣壳的小分子量核酸,不具抗原性,故不能制备其抗血清。Morris等1975年首次报道了用单向聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide Gel Electrophoresis简称PAGE)法检测PSTV;Owens等1981年报道了用互补DNA核酸杂交方法检测PSTV;1983年Schumacher等又报道了用反向聚丙烯酰胺凝胶电泳法(R-PAGE)检测PSTV,后来几位学者进一步完善了该方法。目前PSTV的检测正向着快速、准确和实用的方向发展,现将各检测方法及其优缺点分述如下。

1 生物鉴定检测

Raymer等1964年首先发现PSTV可在某些番茄品种上产生明显的系统症状,提出可用番茄品种Rulgers鉴定PSTV,但仅PSTV的强系在番茄上表现出可见症状,弱系并无症状。Fernow1967年根据PSTV强弱系间存在

有明显的交互保护作用,提出通过重复接种的方法,利用番茄可同时鉴定出PSTV强系和弱系来。具体方法见图1

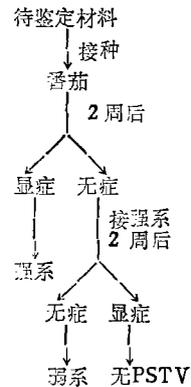


图1 重复接种鉴定PSTV

Singh 1971年发现莨苳(Scopolia Sinensis)是PSTV的一个枯斑寄主,无论强系和弱系均可在其上产生局部枯斑(强系7~10天显症,弱系10~15天显症),但有时反应不稳定。

Singh 1984年报道,用一种野生马铃薯(Solanum Berthaultii)的无性系可以鉴定PSTV,该鉴定寄主的鉴定条件要求不严(温度20~27°C,一般光照条件均可),接种后10~14天表现明显症状(叶上产生水浸状斑点,叶柄坏死,最终垂叶坏死)。PSTV强弱系均可产生相同症状,而PVX、PVY和PVS在其上均无症。

2 单向聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

Morris 1975年首次利用单向PAGE方法检测PSTV, 但其提取PSTV过程十分复杂, 甲苯胺兰染色亦需时较长, 完成1次检测要3天的时间才能完成。后来经 Morris 等及 Pfannenstiel等改进, 简化了PSTV的提取过程, 并采用溴化乙啶染色, 使全部检测可在1天内完成, 大大提高了检测效率。但由于该方法的灵敏度不很高(检出PSTV的最低浓度为0.2 μ g/g组织, 而不同品种茎尖PSTV含量变化范围为0.22~0.64 μ g/g组织)常常发生PSTV漏检现象。

Mosch 1982年报道了一个PSTV电泳检测的标准化程序。具体方法是, 先将待检测材料接种在番茄上, 2周后再进行单向PAGE检测, 由于PSTV在番茄上的浓度要比在马铃薯上高得多, 大大提高了检测的准确度, 防止了漏检现象。

3 互补DNA核酸杂交检测

Owens 等 1981年首次报道了应用互补DNA核酸杂交方法检测PSTV, 从而使得PSTV的检测向着准确、定量、高灵敏度的方向飞跃了一步, 该方法检测PSTV的最低浓度可达40ng/g组织。具体方法如下。

a. PSTV—RNA的提取

采取酚淬取, 乙醇沉淀, 最后凝胶电泳的方法分离出PSTV—RNA。

b. 合成PSTV的互补DNA (cDNA)

按 Owens 等 1978 年的方法进行, 详见图 2。

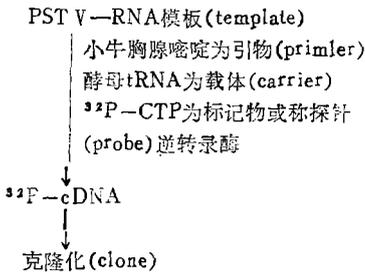


图2 PSTV互补DNA的合成

c. 核酸杂交检测PSTV

按Salazar等1983年的方法进行, 详见图

3。

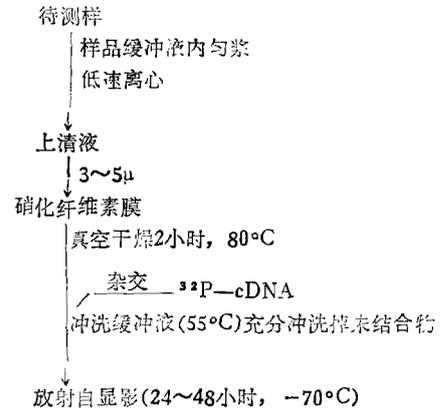


图3 核酸杂交检测PSTV程序

结果利用闪烁计数器进行定性定量分析, 显出黑色点的为存在有放射性³²P, 说明检测到PSTV, 根据黑点的大小, 可计算PSTV的含量。

4 反向聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

Schumacher等1983年首次报道了用R—PAGE法检测PSTV, 后来经过几位学者的完善, 使其成为一般实验室检测PSTV的常规方法。该方法的灵敏度很高, 可检测出PSTV的最低浓度为60ng/g组织, 所需的间时很短(1天内即可完成)不需任何特殊的仪器设备, 并且可区分出PSTV的强系与弱系, 还可检测单粒实生种子内的PSTV。现将该方法详述如下。

4.1 原理

PSTV为单链共价闭合的环状RNA分子, 由于其分子内高度的碱基配对, 自然状态下为近于棒状结构, 但在变性过程中转变为打开的环状结构, 两种构型在一定浓度的聚丙烯酰胺凝胶中的电泳迁移率相差极大。寄主核酸变性后均变为线状结构, 而PSTV的

环状结构的电泳迁移率比分子量相近的线状结构慢得多。根据这一原理提出了 R—PAGE 法鉴定 PSTV, 即第一相电泳在正常条件下进行, 第二相电泳在变性条件下进行, 从而使 PSTV 明显区别于寄主核酸。

4.2 PSTV 核酸的提取

按 Schumacher 1986 年的方法进行, 详见图 4。

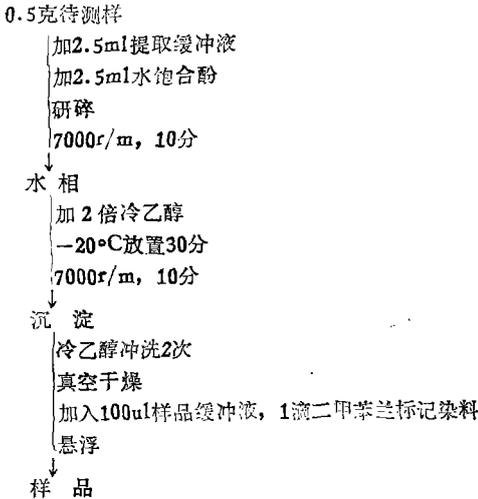


图4 PSTV核酸的粗提取

4.3 电泳

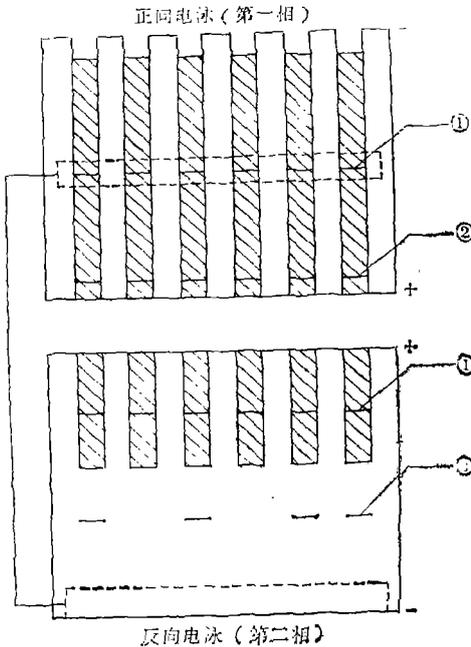


图5 切割胶的反向电泳
注: ①二甲苯兰; ②溴酚兰; ③PSTV。

a. 切割胶的R—PAGE (按Schumacher 1983年的方法进行)

正向电泳: 阴极在上, 阳极在下, 在室温下进行电泳, 采用高浓度电泳缓冲液 (0.089M Tris, 0.09M 硼酸, 含0.003M Na₂-EDTA, pH8.3) 待溴酚兰走至胶前沿, 二甲苯兰走至胶中间时停止电泳, 沿二甲苯兰染料带横切下 1 cm 宽的 1 个胶条 (见图 5), 将该胶条置于胶板槽底部, 重新灌胶, 然后进行反向电泳。

反向电泳: 交换电极 (阳极在上, 阴极在下), 在65°C的变性条件下电泳, 采用低浓度电泳缓冲液 (1/8~1/10高浓度缓冲液), 内含 8 M 脲或不含脲均可。待二甲苯兰走至凝胶 2/3 处时停止电泳, 经染色后 PSTV 远落后于寄主核酸的后面。

b. 不切割胶的 R—PAGE (按Singh 等 1987年的方法进行)

正向电泳: 条件同前正向电泳, 只是待二甲苯兰走至凝胶底部时才停止电泳, 然后进行反向电泳 (见图 6)。

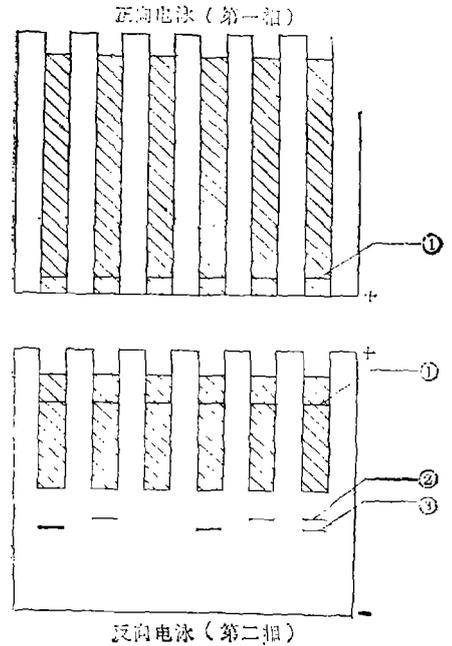


图6 不切割胶的反向电泳
注: ①二甲苯兰; ②PSTV弱系; ③PSTV强系。

反向电泳: 阳极在上, 阴极在下, 采用低浓度电泳缓冲液。先将下槽电泳缓冲液预热至 87~90°C, 然后倒入下槽, 再在 70~71°C 恒温条件下反向电泳, 待二甲苯兰走至凝胶 2/3 处停止电泳, 经染色后, PSTV 强系落在最后, PSTV 弱系在强系前 3~5 mm 处。

表 1 银 染 色 法 步 骤

| 步 骤 | 溶 液 | 振 荡 时 间 |
|-----|--|-----------|
| 固 定 | 10%乙醇, 0.5%乙酸溶液 | 10分 钟 |
| 染 色 | 0.19% AgNO ₃ 水溶液 | 15分 钟 |
| 漂 洗 | 蒸 馏 水 | 4次, 15秒/次 |
| 显 影 | 2.3mM NaBH ₄ , 0.4%甲醛(37% W/V), 溶于 0.375M NaOH溶液中(现用现配) | 不超过10分钟 |
| 增 色 | 0.07M Na ₂ CO ₃ | 5分 钟 |

染色后 PSTV 带染成黑色, 胶板染成黄棕色, 结果清晰易辨。

5 对几种检测方法的评价

5.1 生物鉴定检测

生物鉴定准确可靠, 但常需要特殊的条件来保证。PSTV 接种番茄需要高温强光照的条件(27~32°C, 20000Lx); 而接种莴苣则要低温弱光照的条件(18~22°C, 4000Lx), 自然条件很难满足二者的要求; *S. berthaultii* 要求的条件虽不严, 但不能区分 PSTV 的强系和弱系。生物鉴定费时费力, 需要一定的温室面积, 接种莴苣和 *S. berthaultii* 需要2周后才能得到结果, 而番茄则至少要1个月才能得到结果, 因此大量检测受到制约。

5.2 单向PAGE检测

简单的单向PAGE 检测虽速较快, 但常发生漏检现象, 而标准的检测程序虽避免了

4.4 染色

Sammons 等1981年首次报道了可用银染色法对电泳后凝胶中的多肽进行染色, 该方法的灵敏度要比常规的染色方法高几十倍, 并且在1小时内便可完成, 目前已被广泛采用, 具体方法见表1(按Schumacher等1986年的方法进行)。

漏检现象, 但仍由于PSTV与寄主 9s 核酸的电泳迁移率差异较小, 有时不易正确判断结果, 另外该程序需要人工接种番茄, 得到结果至少要2周以上的的时间, 使其效率大大降低。单向PAGE不能区分PSTV强弱株系, 因此该方法的应用受到了限制。

5.3 互补DNA核酸杂交检测

互补DNA 核酸杂交检测具有很高的灵敏度和准确性, 是几种检测方法中灵敏度最高的1种, 同时可以进行株系签定。虽合成互补DNA的过程十分复杂, 需要昂贵的药品、特殊的实验条件和受过专门训练的专业技术人员, 但合成后的检测过程并不很复杂, 可同时对定量测定大量样品。但使用放射性物质需要特殊的防护条件及实验室, 因此该检测方法的推广应用受到一定的限制。

1989年内蒙古大学的张鹤龄等又首次将生物素标记的cDNA 探针检测技术应用于PSTV的检测, 其灵敏度与³²P—cDNA 探针法检测几乎相等。生物素标记的cDNA探针

很稳定, 在 -20°C 条件下至少可贮存1年, 且不需要操作同位素所需的仪器和防护条件, 为推广应用带来方便。

5.4 反向电泳检测

R-PAGE 检测 PSTV 的灵敏度虽不及 cDNA 核酸杂交检测, 但是以检测出马铃薯植株、块茎及实生种子内的 PSTV。该方法简单易行, 不需要特殊的仪器设备, 操作人员也不需要受专门的训练, 检测结果很容易判断, 检测的准确度很高, 完成1次检测仅需要1天时间, 并可以进行较为大量的检测, 容易推广应用。

参 考 文 献

- [1] 张鹤龄等. 用生物素标记的 cDNA 探针检测马铃薯纺锤块茎类病毒. 病毒学报, 1989, 5: 72~76
- [2] Bagnall R H. Serology of the potato spindle tuber virus. *phytopathol*, 1967, 57: 533~534
- [3] Ball E M et al. Serological studies of a virus that produced spindle tuber in potatoes. *Phytopathol*, 1964, 54: 887
- [4] Diener T O et al. Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. *Science*, 1967, 158: 378~381
- [5] Diener T O. Potato spindle tuber "virus". IV. A replicating low molecular weight RNA. *Virology*, 1971, 45: 411~423
- [6] Fernow K H. Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *phytopathol*, 1967, 57: 1347~1353
- [7] Morris T J et al. Detection on polyacrylamide gel of a diagnostic nucleic acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid. *Am. potato J*, 1975, 52: 57~63
- [8] Morris T J et al. Potato spindle tuber disease: Procedures for the detection of viroid RNA and certification of disease free potato tubers. *Phytopathol*, 1977, 67: 145~150
- [9] Mosch W H M. Development of a standard method for detection of potato spindle tuber viroid in potato plants. *Pathol*, 1982, 88: 113~122
- [10] Owens P A et al. Measurement of viroid sequence homology by hybridization with complementary DNA prepared in vitro. *Virology*, 1978, 89: 388~394
- [11] Owens R A et al. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science*, 1981, 213: 670~672.
- [12] Pfannenstiel M A et al. Detection of potato spindle tuber viroid in field-grown potatoes by improved electrophoretic assay. *Phytopathol*, 1980, 70: 1015~1018
- [13] Raymer R W et al. Tomato as a source of and indicator plant for the potato spindle tuber virus. *Am. Potato J* 1964, 41: 311~311
- [14] Salazar L F et al. Detection of potato spindle tuber viroid by nucleic acid spot hybridization: Evaluation with tuber sprouts and true potato seed. *Am. Potato J*, 1983, 60: 587~597
- [15] Sammons D W et al. Ultra-sensitive silver-based colour staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 1981, 2: 135~141
- [16] Sanger H L et al. Viroids are single-stranded covalently-closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73: 3352~3356
- [17] Schumacher J et al. A two dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Anal. Biochem*, 1983, 135: 288~295
- [18] Schumacher J et al. Diagnostic procedure for detection of viroids and virus with circular RNAs by "return" gel electrophoresis. *J. phytopathol*, 1986, 115: 332~343
- [19] Singh R P. A local lesion host for potato spindle tuber virus. *Phytopathol*, 1971, 61: 1034~1035
- [20] Singh R P. Experimental host range of the potato spindle tuber virus. *Am Potato J*, 1973, 50: 111~123
- [21] Singh R P. *Solanum berthaultii*, a sensitive host for indexing potato spindle tuber viroid from dormant tubers. *Potato Res*, 1984, 27: 163~172
- [22] Singh R P et al. Electrophoretic separation of a severe from mild strains of potato spindle tuber viroid. *Phytopathol*, 1987, 77: 1583~1591
- [23] Singh R P et al. Detection of the mild strains of potato spindle tuber viroid from single true potato seed by return electrophoresis. *phytopathol*. 1988, 78: 663~667