

陈炜 田波

(中国科学院微生物研究所,北京)

摘要 描述了改进的快速灵敏诊断类病毒的方法,通过对马铃薯纺锤块类病毒(PSTV)、菊花矮化类病毒(CSV)和苹果锈果类病毒(ASSV)的检测表明,该方法快速灵敏、经济、可靠。

关键词 类病毒;往复电泳;双向电泳

类病毒的检测方法主要有生物学方法、分子杂交法和凝胶电泳法。在类病毒的鉴定中,三种方法互为补充。我们曾介绍过用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳,结合高灵敏度的银染色法^[1]检测类病毒,已得到广泛应用。为进一步简化操作程序,降低使用费用,减少所需的仪器设备等,使之适合大规模常规检测,对原法中的核酸提取、电泳、银染色等步骤做了改进,对马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTV)^[2],菊花矮化类病毒CSV^[3],苹果锈果类病毒ASSV^[4]等几种我国常见的类病毒进行检测都得到了满意的结果。

材料和方法

(一) 核酸提取

1. 取0.2g叶组织,如马铃薯叶(检测PSTV),菊花叶(检测CSV),或0.8g苹果果肉(检测ASSV),在没有果子的季节可用叶或枝条。加3ml提取缓冲液(含0.5M NaCl, 0.1M Tris-HCl pH 8.0, 5mM EDTA, 1% SDS, 25%乙醇),使用前加一滴2-巯基乙醇或1%二乙基二硫代氨基甲酸钠,在研钵中充份研磨或用小匀浆器匀浆,4000 r/min 离心10分钟,上清乙醇沉淀后静置。沉淀离心后用70%乙醇洗1—2次,抽干后溶于200 μl 电泳缓冲液中,取出20 μl 电泳检测。

2. 将待检测的组织加3ml提取缓冲液(0.5M NaCl, 0.1M Tris-HCl pH 8.0, 5mM EDTA, 1% SDS),使用前加一滴2-巯基乙醇或1%二乙基二硫代氨基甲酸钠,2ml水饱和酚,充份研磨或匀浆,4000 r/min 离心10分

钟后取出上清水相,乙醇沉淀,其它步骤与上述相同。

若类病毒在组织中含量较高可选用方法1,若含量较低,方法2较合适。

(二) 凝胶电泳

1. 半切胶,往复式,连续或不连续浓度缓冲液凝胶电泳:用夹芯式垂直板凝胶电泳池。凝胶中含5%丙烯酰胺,0.17%双丙烯酰胺,2M 脲,40mM TBE(40mM Tris, 40mM 硼酸, 1mM EDTA, pH 8.3)。第一次电泳的电泳缓冲液为40mM TBE,二甲苯蓝作指示染料,待二甲苯蓝走到胶的中部时停止电泳,沿二甲苯蓝的下沿切胶,切下的下半部分弃去,同时为了使加入缓冲液时不出气泡,在胶的两边各切去约0.2—0.5cm(图1-a),重新装好电泳板,准备第二次电泳。

第二次电泳的电泳缓冲液可与第一次相同,亦可用较稀浓度如10mM TBE(10mM Tris, 10mM 硼酸, 0.25mM EDTA pH 8.3)。将电泳缓冲液加热至70—80℃,倒入电泳槽中,其间缓冲液温度降低约十几度,10分钟后开始第二次电泳,电压300V,如室温较低,在约60℃的烤箱中进行,使电泳缓冲液维持在50—55℃,待二甲苯蓝走到胶头时,停止电泳,进行银染色(图1.b)。

2. 一次灌胶的垂直双向电泳:第一向电泳胶的制备,浓度,缓冲液等与上述相同,但只在第二孔(做一份样品时),或者在第一孔与中间一孔(做二份样品时)加样,待二甲苯蓝走到胶的中部时按图2-a所示切胶,留下的部分转90

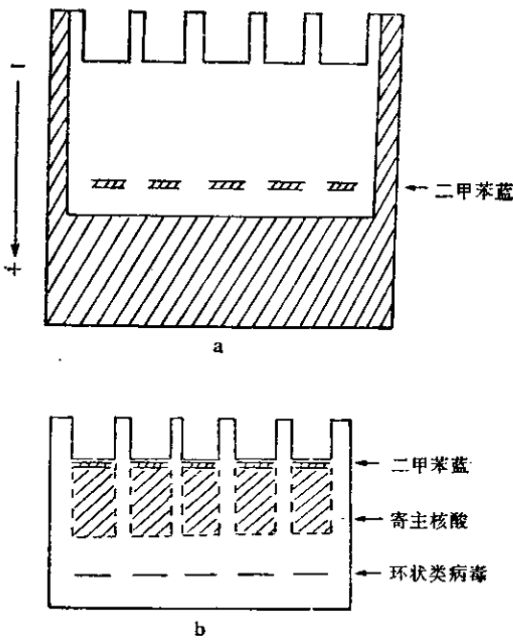


图1 半切胶、往复式凝胶电泳示意图

a. 第一次电泳在室温下进行, b. 第二次电泳在 50—55℃下进行, 电泳方向自下而上

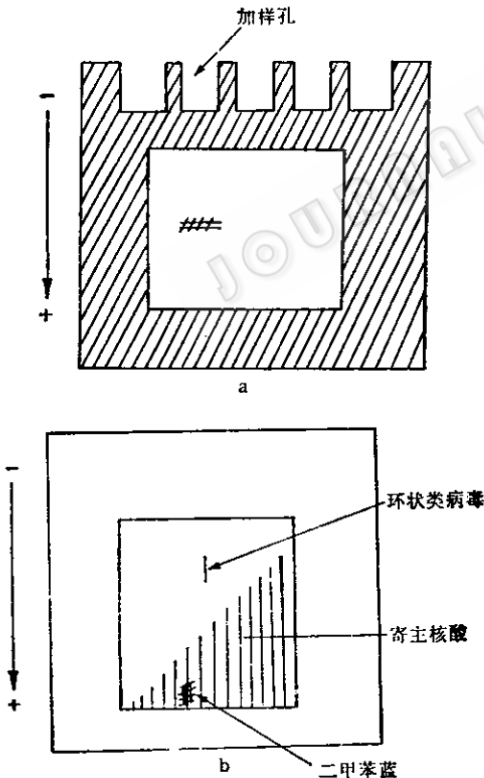


图2 一次灌胶连续或不连续缓冲液垂直双向电泳示意图

a. 第一次电泳在室温下进行, b. 第二次电泳在 50—55℃下进行

度,重新装好电泳板,进行第二向电泳,第二向电泳的条件亦与上述第二次电泳相同。待二甲苯蓝走到接近胶边缘时停止电泳,银染色。

(三) 染色

电泳后将胶片放在 9.5% 乙醇, 0.5% 醋酸的水溶液中,振荡 5—10 分钟,吸去溶液,加入 0.19% 硝酸银溶液,振荡 10 分钟,用蒸馏水洗四次,每次振荡约 10 秒,水吸干后加入显影液,1 升 0.4 M 氢氧化钠中含 100 mg NaBH_4 , 4ml 甲醛,振荡 5—10 分钟,待显出褐色的带,停止显影,吸去显影液,加入 0.75% 碳酸钠水溶液增色,使核酸带变得更清晰。

结果与讨论

(一) 半切胶、往复电泳法检测类病毒

用上述提取核酸和往复电泳方法对 PSTV、CSV、ASSV 等几种类病毒进行检测,均得到较好结果。例如对北京延庆地区马铃薯的抽样调查中,一次检测的 10 份样品中有二份含 PSTV,均为田间表现矮化簇叶症状,类病毒核酸带清晰,易判断。图 3 为含与不含 PSTV 的马铃薯叶核酸提取物的半切胶、往复式,不连续浓度缓冲液聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

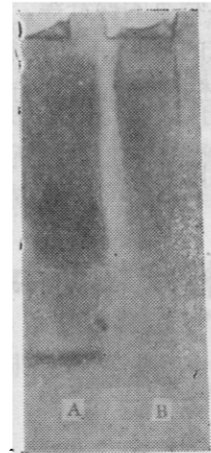


图3 马铃薯叶核酸提取物的电泳图

A: 含 PSTV, B: 不含 PSTV

(二) 垂直双向电泳法检测类病毒

用一次灌胶垂直双向电泳法对 ASSV、PSTV 等进行检测的结果与以前的两次灌胶法所得结果相同(图 4)。

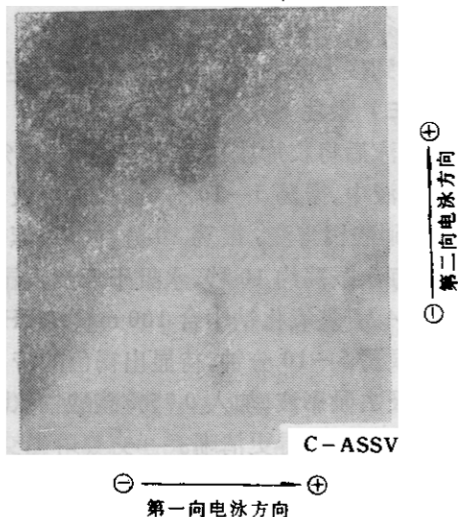


图4 一次灌胶法检测核酸提取物 (ASSV) 电泳图

检测类病毒的三种基本方法中,生物学方法由于周期长、需要温室培养等,一般不适于大规模检测。用放射性同位素标记的分子探针,用分子杂交法检测类病毒,一次可检测较多的样品,国际马铃薯中心用放射性同位素 ^{32}P 标记的探针进行了较大规模的检测^[5]。我们也曾用同位素标记的探针检测类病毒。但由于放射性同位素价钱昂贵, ^{32}P 的半衰期较短,以及每种同位素都需制备其特有的探针等,使分子杂交法的应用受到一定的限制。而用电泳法检测,快速经济,不受上述条件限制,成为实验室最常用的方法。

本方法与我们以前介绍的^[4]及 Schumacher

等人介绍的方法^[6]原理相同,主要改进有:①核酸提取上采用不加酚的一步提取法,减少对身体的危害;亦不用二乙基焦碳酸钠^[6],降低成本,效果相同。②第一次电泳不用 89 mM TBE 缓冲液,用 40 mM TBE,即降低成本,又可使与不连续浓度的缓冲液 (10mM TBE) 较快达到平衡。③第一次电泳后用半切胶法,与切胶的反向双向电泳比较,省去了第二次灌胶的步骤,较不切胶的反向双向电泳,节省时间。用半切胶法第一次电泳后寄主的主要核酸尚未进入缓冲液中,缓冲液可用于第二次电泳,进一步降低成本。④胶中加入 2M 脲,降低第 2 次电泳所需的变性温度,在不用恒温水浴的情况下易于维持,省去了恒温水浴装置。⑤一次灌胶法的垂直双向电泳与以前介绍的两次灌胶法的得到同样的结果。⑥银染色中某些步骤缩短了时间。

本方法与以前介绍的方法灵敏度和可靠性相同,但更经济简便,易于操作,节省时间,尤其适于较大规模检测。

参 考 文 献

- [1] 陈伟,田波: 微生物学通报, 12(3): 132—135, 1985。
- [2] 田波等: 病毒学集刊, 1: 119—122, 1982。
- [3] 陈伟等: 科学通报 26: 886—889, 1981。
- [4] 陈伟等: 病毒学报, 2(4): 366—371, 1986。
- [5] Salaza, L. F. et al.: *Amer. Potato J.*, 60: 587—597, 1983。
- [6] Schumacher, J. et al.: *Journal of Phytopathology*, 115: 332—343, 1985。