



类病毒的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳检测技术

陈 炜 田 波

(中国科学院微生物研究所)

类病毒为已知的最小的致病因子,只含核酸,不含外壳蛋白。类病毒能在若干高等植物上引起重要病害,在一些经济作物上造成损失。防治类病毒侵染,主要靠早期诊断。可以用聚丙烯酰胺凝胶电泳法,生物学方法^[1,2],以及分子杂交^[2]等方法检测类病毒。用生物学方法检测,即接种一定的鉴别寄主,周期长,费时费力;用分子杂交方法须用放射性同位素,探针的制备也较困难,在一般的实验室不大容易进行;以往有些单位及本实验室用单向聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测类病毒,有一定的效果,但由于有些类病毒在原寄主中含量往往很低,加上寄主中一些分子量与之相近的核酸带的干扰,使结果的判断较困难。因此需要有简便可靠的检测类病毒的方法。Schumacher 和 Riesner 等人发展了可靠、灵敏、简便的用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳检测类病毒的方法^[3,4],本文是结合本实验室的工作对该方法做一介绍。

(一) 原理

类病毒为共价闭合的环状 RNA 分子,不同于寄主中的其它核酸。由于其分子内存在着高度的碱基配对,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。两种构型的电泳迁移率在一定浓度的聚丙烯酰胺凝胶中相差甚大。在变性的过程中所有的寄主核酸都从不同程度的碱基配对状态转变为线形分子,只有类病毒例外,其形成的环状分子在 5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移率比相同分子量的线状分子慢得多,利用这一性质可以

将类病毒和寄主核酸区别开来。根据这一原理发展了双向电泳法,即第一向在不变性的条件下电泳,第二向在变性的条件下电泳,利用类病毒核酸迁移较慢,使之区别于寄主的核酸。

(二) 样品

所用的样品不需提纯,粗提一下即可。取 0.2g 植物组织,用 2 ml 提取缓冲液(90 mM Tris, 90 mM 硼酸, 5 mM Na₂EDTA, 0.2 M 氯化钠, 1% 十二烷基硫酸钠, 1% 亚硫酸钠, 1% 二乙基二硫代氨基甲酸钠), 2 ml 水饱和的酚(含 0.1% 8-羟基喹啉), 2 ml 氯仿,在研钵中充分研磨,转入离心管中, 4000 rpm 离心 10 分钟,取出上清水相,必要时可再用酚和氯仿去一次蛋白,水相用 2.5 倍体积的冷乙醇沉淀,离心干燥。样品溶于 80 μ l 的指示剂缓冲液中,即 TBE 缓冲液(90 mM Tris, 90 mM 硼酸, 3 mM Na₂EDTA, pH 8.3) 加入 30% 甘油, 0.02% 溴酚蓝, 0.04% 甲苯胺蓝。取出提取样品的 1/5 至 1/10 上样电泳。(以上样品的用量指用银染色法)。

(三) 电泳条件

电泳槽,用夹芯式垂直板块凝胶电泳池及附件(江苏吴县科研仪器厂产)。该电泳槽有循环水装置。另用超级恒温水浴加热,电泳池内缓冲液的温度即为电泳的温度。

平板胶的大小为 12 \times 10 \times 0.15 cm。第一向电泳为不变性电泳, 5% 丙烯酰胺, 0.17% 双丙烯酰胺, TBE 缓冲液,电泳电压 200V。

第二向在变性条件下电泳,变性胶的浓度

和缓冲系统与第一向电泳相同,但加入 8 M 脲作为变性剂。提高电泳温度,所用的电泳温度视所检测的类病毒的性质而定。例如在 8 M 脲存在时,马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTV)^[1] 和菊花矮化类病毒 (CSV)^[2] 在 50℃ 即可变性,而对牛蒡矮化类病毒^[3] 和与美人蕉矮化病相关的类病毒则 65℃ 才能达到变性(均指用 TBE 缓冲液)。电泳电压 200V。

(四) 双向电泳方式

根据第二向电泳,即变性电泳所用的具体方法不同,可分为垂直双向电泳,反向双向电泳及不切胶的反向双向电泳三种。

(1) 垂直双向电泳: 第一向电泳当溴酚蓝走到接近胶的底部,二甲苯蓝约走到胶的中部时,停止电泳。如图 1 所示,按实线所示的位置纵向切下胶条,转 90° 角,平放于第二次胶的底部,灌上变性系统胶,提高温度,保温 15 分钟后,自下而上电泳,待二甲苯蓝走了约三分之二距离后,停止电泳。染色后可见寄主的核酸以及可能含有的多糖和多酚氧化物按其分子量大小形成一个大致的对角线形状(图 1 中斜线所示),而环状的类病毒分子的迁移则明显的落后于该对角线。图 2 为从患有锈果病的苹果和健康的苹果中提取的粗提核酸样品的垂直双向

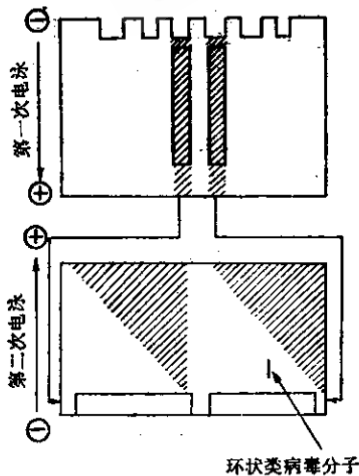


图 1 垂直双向电泳示意图

阴影部分表示寄主核酸及可能含有的多糖和多酚氧化物形成的大致的对角线,环状类病毒分子(箭头所示)明显落后于对角线前沿

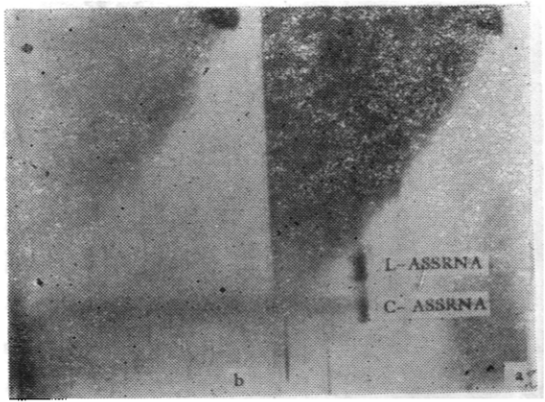


图 2 从患有苹果锈果病的苹果 (a) 和健康的苹果 (b) 提取的核酸样品的垂直双向电泳图,图中示出与苹果锈果病相关的 RNA (ASS RNA) 的环状分子 (C-ASS RNA) 和线状分子 (L-ASSRNA)

电泳图,电泳后用银染色^[6]。箭头表示出类病毒 RNA 分子的带的位置。

(2) 反向双向电泳: 图 3 为反向双向电泳示意图。第一向电泳待溴酚蓝走到接近胶的底部,二甲苯蓝在胶的中部时停止电泳。在本实验给定的条件下,二甲苯蓝与 PSTV, CSV 几种类病毒迁移在相近的位置,因此可以作为指示剂,指示可能存在的类病毒迁移的大致位置。沿二甲苯蓝的位置,按图中实线所示,横向切下约 1.5cm 宽的胶条,平移至胶的底部,灌上变性系统胶。提高温度,自下而上电泳。待二甲苯

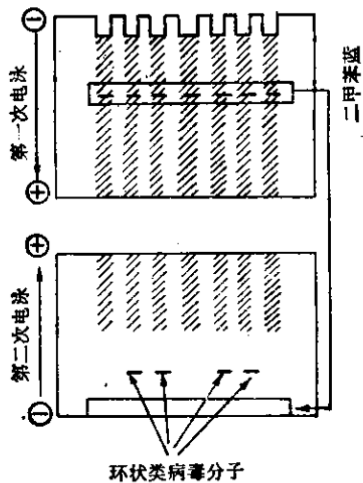


图 3 反向双向电泳示意图

第一向电泳后沿上图实线所示位置横向切下胶条,此胶条含有各样品中可能存在的类病毒核酸,将此胶条平移至第二次胶的底部(下图),灌上变性系统胶,自下而上电泳

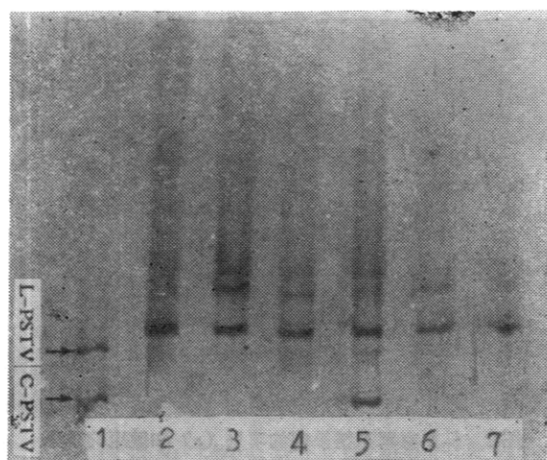


图4 从不同的样品中提取的核酸样品反向双向电泳 1,5号样品为从接种马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTV)的蕃茄叶中提取,其余的样品为从马铃薯的块茎和叶中提取,箭头所示为环状类病毒(C-PSTV)和线性类病毒(L-PSTV)的位置

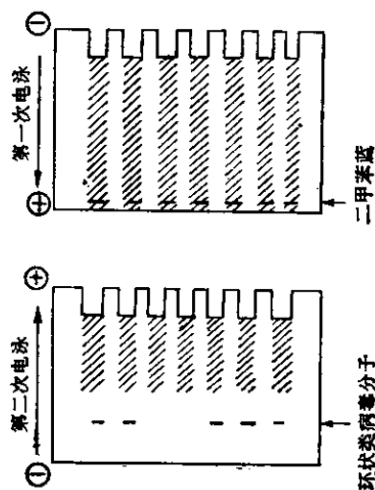


图5 不切割胶的反向双向电泳示意图 染色后可见环状的类病毒分子与寄主的核酸区分开(箭头所示)

蓝走了约三分之二的距离后,停止电泳。染色后可见类病毒分子迁移得慢,与寄主的核酸区别开来。第一向电泳后另一种确定类病毒的核酸带的位置的方法是,先纵向切下一条已知含类病毒的样品的胶条,用EB(溴化乙锭)染色(此胶孔的加样量要大些,使类病毒能在EB染色中检测出来),根据染色带的位置就可以知道在其它样品中可能存在的类病毒核酸的相应位置。

此方法适于大量样品的诊断用,用该电泳池一次可同时检测17个样品。图4为银染色的反向双向电泳图。样品为从土豆中和从PSTV接种的蕃茄中提取的样品。1号,5号样品含PSTV,其环形类病毒带的迁移大大落后;而不含类病毒的样品,2,3,4,6号在此相应的位置则没有核酸染色带。

(3) 不切割胶的反向双向电泳:为进一步简化诊断程序,发展了不用切割胶的反向双向电泳法,可以省去切胶和第二次灌胶的步骤。图5为示意图。第一向电泳在室温进行,让溴酚蓝指示剂跑掉,继续电泳,待二甲苯蓝指示剂走到接近胶的底部时停止电泳。换上新鲜的电泳缓冲液,调换电极方向,提高温度,因未加尿素,对PSTV和CSV用65℃恒温后,进行第

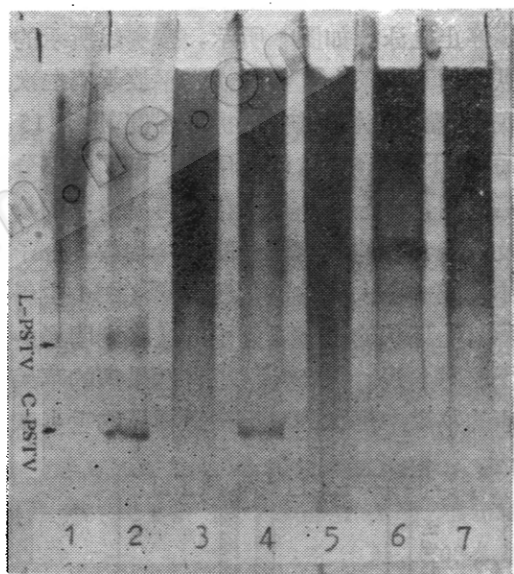


图6 不切割胶的反向双向电泳图 样品1、2、4号为从PSTV接种的蕃茄中提取;3、5、6、7号为从马铃薯块茎和叶中提取

二向电泳。只要所选择的两次电泳的条件能使类病毒核酸从不变性状态转变为变性状态,同样可以使类病毒和寄主的核酸分离开来,达到鉴定的目的。图6为不切割胶的双向电泳图,用银染色。样品为马铃薯的块茎和叶及接种PSTV的蕃茄中粗提的核酸。1,2,4号样品含PSTV,箭头指出类病毒核酸带的位置。3,5,6,7号样品不含PSTV,在相应的位置没有类病毒核酸带。

（六）染色方法

这里介绍高度灵敏的银染色法^[6]和较为灵敏的 EB（溴化乙锭）两种染色方法。

（1）**银染色法：**电泳后将平板胶放入大玻璃皿或搪瓷盘中，加入 9.5% 乙醇，0.5% 乙酸的水溶液，振荡 15 分钟，用水泵吸去溶液，加入 0.19% 硝酸银溶液，振荡 20 分钟以上，用大注射器将溶液吸回瓶中（此硝酸银溶液可重复使用 10 次），用蒸馏水洗 4 次，每次约 20 秒钟均振荡，将水吸干，加入显影液（每升 0.4M 的氢氧化钠中含 100 mg 硼氢化钠，4 ml 甲醛），充分振荡，待显出淡褐色的带（约 5—10 分钟）停止显影，用水泵将显影液吸掉，加入 0.75% 碳酸钠，可使带更加清晰，防止胶的胀大，如显影后直接放入水中会使胶胀大，约 1 小时后将胶放入水中可较长时间保存。表 1 为银染色法步骤的简表。

表 1 银染色法步骤

步骤	溶 液	振荡时间
固定	9.5% 乙醇，0.5% 乙酸	15 分钟
染色	0.19% AgNO ₃	20 分钟以上
漂洗	蒸馏水	20 秒×4
显影	NaBH ₄ 100mg，甲醛 4 ml 溶于 1 升 0.4M NaOH 中	5—10 分钟
增色	Na ₂ CO ₃ 0.75%	1 小时（不振荡）

（2）**EB 染色法：**电泳后将胶放入 1 μg/ml 的 EB 水溶液中染色 15 分钟，在暗室中紫外灯下观察。

银染色法是近年来发展起来的一种非常灵敏的染色方法，本实验室的工作表明，灵敏度可达 0.5 ng 以上，染色后的胶在水中可保存二个月以上，便于对结果进行分析、比较，拍照等，亦可制成干板长期保存。EB 染色法虽较银染色法简单，但灵敏度较银染色法低得多（当然比甲苯胺蓝染色法灵敏），约 0.1 μg 的类病毒即可被检测出来^[3]，此外观察和拍照时都需紫外灯和暗室设备。

（七）结果分析

这里介绍的双向聚丙烯酰胺凝胶电泳法，结合高灵敏度的银染色技术对寻找鉴定新的类病毒和较多样品的诊断（如在马铃薯的无病毒原种生产中诊断 PSTV）都是很有用的。垂直双向电泳特别适合于未知样品的鉴定，不须对照样品即可判断是否含有环状类病毒分子（图 2 a）。反向双向电泳适合于大量样品的诊断（图 4，图 6）。双向电泳法检测类病毒要求的设备简单，样品不须提纯，比其它检测方法所需时间少，整个工作可以在两天内完成。而用分子杂交方法至少四天，用生物学方法则需更长的时间。这里介绍的双向电泳和银染色技术容易掌握，所需的材料和设备都是比较容易得到的，即使在较小的农业实验室里也可以进行常规操作。方法的灵敏度达 0.5ng，与早期报道的分子杂交的灵敏度相似。其灵敏度高，一方面是由于银染色法非常灵敏，另一方面由于两次电泳分离，使类病毒核酸带同寄主核酸及背景（多酚氧化物，多糖等）分离开来，提高了灵敏度，因此往往有些用单向电泳检测不出来的情况，用双向电泳则可以检测出来。此外，由于双向分离，类病毒的核酸和寄主的核酸可以清楚分离开，使结果易于判断（图 2，4，6），避免了把寄主核酸误认为类病毒核酸的错误判断，因此可以说用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳检测类病毒是一种可靠、灵敏、简单、快速的可行方法。

参 考 文 献

- [1] 田波等：病毒学集刊，1：119—122，1982。
- [2] 陈炜等：科学通报 26：886—889，1981。
- [3] Schumacher, J. et al.: Analytical Biochemistry, 135: 288—295, 1983.
- [4] Riesner, D. et al.: Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 1: 669—688, 1983.
- [5] 陈炜等：微生物学报，22(3): 241—247, 1982。
- [6] Sammons, D. W. et al.: Electrophoresis 2: 135—141, 1981.