

往复双向电泳法(R-PAGE)检测马铃薯 纺锤块茎类病毒(PSTVd)核酸制备的改进

黄元璜

(黑龙江省农科院绥化农科所, 绥化 152052)

摘要: 双向往返电泳(R-PAGE)法是检测马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)的有效手段, 本试验通过对该方法中马铃薯纺锤块茎类病毒核酸提取步骤的改进, 提高了核酸纯度, 使检测结果更为准确、清晰, 且灵敏度高。

关键词: 马铃薯纺锤块茎类病毒; 往复双向电泳; 核酸

中图分类号: S 513 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2003)04-0028-02

Improve on Nucleic Acid Prepared of Return Polyacrylamide Gel Electrophoresis Methods for Potato Spindle Tuber Viroid

HUANG Yuan-huang

(Suihua Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Suihua 152052)

Abstract: Return polyacrylamide gel electrophoresis methods is better for potato spindle tuber viroid detected. Through the step of PSTVd nucleic acid prepared was advanced, PSTVd nucleic acid was improved. That make the examination result more accurate, clear and sensitive.

Key words: potato spindle tuber viroid; return polyacrylamide gel electrophoresis methods; nucleic acid

马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)在世界各地马铃薯产区均有发生, 是马铃薯种薯检疫规程中的检疫对象, 也是马铃薯抗病育种中的重要问题。PSTVd 具有高度的侵染性, 极易通过接触、农具、衣物、切刀等进行传播, 也可通过花粉和子房传到种子中, 传播途径十分广泛, 且感病植株不能通过茎尖脱毒获得无类病毒植株。感染 PSTVd 的植株症状是: 矮化, 感病植株的块茎变小, 纺锤形、龟裂、块茎数亦减少, 具有大量的浅芽眼, 薯皮变色, 严重影响马铃薯产量和品质, PSTVd 强系感染可引起减产 60%, 弱系减产 20%~35%, 造成较大经济损失, 是我国种薯生产和实生种子利用中亟待解决的问题^[1]。

我国年产种薯 6 000 万 t, 按国际标准和国家标准每年须检 5 000 万份样品, 目前常用的 PSTVd 检测方法为双向往返电泳(R-PAGE)法^[2,3]和植物学性状鉴定^[4], 由于受时间和空间的限制, 植物学性状鉴定法不适用如此大量样品的快速检测。R-PAGE

法检测是基于类病毒分子在自然和变性条件下电泳迁移率存在明显不同, 变性所引起类病毒核酸的环状结构, 使其电泳迁移率明显慢于相同分子量的其它线性 RNA 分子, 因而在第二向电泳中类病毒核酸的环状结构明显滞后, 据此, 结合可靠灵敏的银染色技术测定类病毒。研究表明: 该方法在原方法的基础上, 对核酸提取进行改进, 提高了核酸纯度, 使检测结果更为准确、清晰。改进的双向往返电泳(R-PAGE)法检测 PSTVd 具有快速、准确、灵敏、操作简单和一次可检测较多数量的待测样品, 制备待测样品方法简单, 能够实现目前标准化种薯检测的需求。

1 材料和方法

1.1 往复双向电泳(R-PAGE)检测方法

1.1.1 改进 R-PAGE 法样品核酸的制备 ①样品粗提液制备: 取样品 3 g 左右(试管苗或植株的叶、薯

• 收稿日期: 2003-04-10

作者简介: 黄元璜(1965-), 男, 黑龙江省绥化市人, 研实, 从事农产品研究。

块的薯肉)放入干燥的研钵中,加入液氮进行研磨。研碎后向小研钵中加入 10 mL 核酸提取缓冲液, SDS 粉(十二烷基磺酸钠)约 0.1 g、皂土约 0.1 g,再研磨 6~10 min。向小研钵中加入 120 μ L β -巯基乙醇,再研磨 6~10 min。加入 11 mL 苯酚,研磨 6~10 min。加入 12 mL 氯仿,再研磨 6~10 min。将研好的样倒入 50 mL 干净的离心管中,用氯仿平衡。4℃、9 000~10 000 r/min 离心 20~25 min,用微量可调移液器,将上层水相(样品粗提液)转移到另一离心管中,可现用,也可冻存(-20℃)。②核酸纯化:将有上清液的离心管拿出,并制备纤维素液,备用。装柱:向柱中加纤维素液,直至纤维素沉积至 3.5 mL 左右处。上样:将样品提取液缓慢加入到柱中,直到加完为止。用低盐溶液洗脱,每次加入 2 mL,共 20 次约 40 mL 左右。待柱中低盐将流尽时,加入 1 mL 高盐溶液进行清洗,用 8 mL 高盐溶液收集于 50 mL 干净离心管。向装有高盐洗液的 50 mL 离心管中加入冻存的 95%乙醇,加入量是离心管中液体的 3 倍左右,摇匀,放入-20~-70℃的冰箱中冷冻,时间不得少于 2 h。③总核酸提取:将冻存的离心管拿出来,用 95%的乙醇平衡,然后在 1~4℃、10 000 r/min 条件下离心 20 min,倒掉上清液,将离心管倒立在干净滤纸上。待水吸干后,向离心管中加 75%的乙醇,加入量是离心管容积的 1/3,进行清洗,时间为 10~20 min。用 75%乙醇平衡,1~4℃、10 000 r/min 下离心 10 min,倒掉乙醇,将剩余乙醇全部挥发掉。④试样获得:将 TAE 缓冲液 200 μ L 加入到盛有总核酸的 50 mL 离心管中进行溶解,然后用微量移液器将其移到 1.5 mL 干净的离心管中,再次用 200 μ L TAE 缓冲液进行清洗,将清洗液全部转移到 1.5 mL 离心管中。

1.1.2 原方法样品核酸的制备 取 1 g 待检样品,加入 2 mL 抽提缓冲液、2 mL 用抽提缓冲液饱和的酚、少许十二烷基磺酸钠(SDS)、一滴 β -巯基乙醇,研磨,同时设阴性对照、阳性对照。加入 2 mL 氯仿

异戊醇(24:1)继续研磨,4 000 r/min 离心 5 min,收集上清液。上清液加入 3 mol/L 醋酸钠使其终浓度为 300 mmol/L,并加入 3 倍体积 95%的冷乙醇,冰浴 1 h,10 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀抽干。用 400 μ L TBE 缓冲液溶解沉淀,备用。

1.1.3 双向往返电泳 样品采用 6%聚丙烯酰胺凝胶制板,核酸上样量为 10 μ L,在 TBE 电泳缓冲液中进行从负极到正极电泳,电压为 150V。当示踪染料迁移到凝胶底部时,停止正向电泳。将电泳槽中缓冲液倒掉,把电泳槽置于 75℃变性 15 min,再向电泳槽中加入 75℃的 TBE 缓冲液,75℃进行从正极到负极的反向电泳,电压调至 200V,当二甲苯兰示踪染料带迁移到胶板上方跑出水面时停止电泳,取出凝胶片进行硝酸银染色。

1.2 应用研究

1.2.1 改进方法和原方法检测 PSTVd 的比较 分别用改进方法和原方法进行 R-PAGE 法检测马铃薯 PSTVd,比较检测结果,样品为田间采集的 20 株具有典型马铃薯类病毒症状的马铃薯叶片。

1.2.2 改进方法与原方法灵敏度比较试验 取一份已知感病材料,品种为早大白,提取核酸,用紫外分光光度计测定总核酸浓度,核酸量按 5 倍系列稀释,200 μ g、40 μ g、8 μ g、1.6 μ g、0.32 μ g、64 ng、13 ng、2.6 ng、0.52 ng 和 0.104 ng,分别用两种方法检测。

2 结果与分析

在对 20 个样品的检测中(见表),用两种方法提取核酸后,经紫外分光光度计检测,改进的方法核酸纯度明显高于原方法。而且电泳后改进方法的类病毒特异性谱带比原方法清晰。二者结果比较,改进的方法检测阳性结果比原方法多一个,因为往复双向电泳检测类病毒出现假阳性的几率为零,说明改进的方法比原方法更准确,能够检测出类病毒含量更低的样品。

表 两种方法提取核酸检测 PSTVd 的比较

样品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
改进方法	++	-	-	++	+	-	++	+	-	-	-	++	-	-	+	+	-	-	++	-
原方法	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	++	-	-	+	+	-	-	+	-

在灵敏度比较试验中,两种方法提取核酸后,核酸量按 5 倍系列稀释,电泳检测改进的方法最低检出量为 2.6 ng,原方法最低检出量为 13 ng,说明改进的方法比原方法的核酸纯度和浓度都高,相应的

灵敏度也略高。

改进的方法核酸经过纤维素柱处理,使核酸杂质更少,纯度和浓度更高,检测灵敏度也相应提高,但操作比原方法略麻烦。

水稻施硅肥效果研究

王 军¹, 杜险峰¹, 孙耀伟¹, 袁 杰², 王艳玲³

(1. 黑龙江省阿城市热电厂, 阿城 150300; 2. 黑龙江省勃力县农业技术推广中心, 勃力 154600;
3. 黑龙江省密山市农业技术推广中心, 密山 158308)

摘要: 试验结果表明: 施硅可改善水稻产量结构, 提高抗逆性, 增产 3.5%~17.1%。含硅水稻专用肥的适宜用量是 750 kg/hm², 追施尿素不宜高于 75 kg/hm²。

关键词: 水稻; 硅肥; 施用效果

中图分类号: S 511.062 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2003)04-0030-02

Studies on the Effect of Silicon Fertilizer on Rice

WANG Jun¹, DU Xian-feng¹, SUN Yao-wei¹, YUAN Jie², WANG Yan-ling³

(1. Acheng Power Plant, Heilongjiang Province, 150300; 2. Extension Center of Agri-technique, Boli County, Heilongjiang Province, 154600; 3. Extension Center of Agri-technique, Mishan County, Heilongjiang Province, 158308)

Abstract: The experimental result showed that silicon fertilizer can improve yield structure and stress resistance of rice. It can increase yield by 3.5%~17.1%. The optimum dosage of rice special fertilizer containing silicon is 750 kg/hm². Top dressing of urea should be less than 75 kg/hm².

Key words: rice; silicon fertilizer; fertilizer application method

硅是水稻必需营养元素, 它有利于水稻的生长, 能够促进光合作用、提高抗病能力, 并促进对其它养分, 特别是氮、磷的吸收。水稻茎叶干物质中含 SiO₂ 达 15%~20%, 每季吸收 SiO₂ 量约 15~85 kg/667m², 远超过水稻对氮、磷、钾吸收量的总和。由于水稻每年从土壤中带走大量的 SiO₂, 导致水稻土中有效硅含量降低, 使水稻倒伏严重, 产量降低。为此, 我们于 2002 年在阿城进行了水稻施硅方法及效果的试验研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

含硅水稻专用肥是省农科院土壤肥料研究所与

阿城市热电厂共同研制的产品。含可溶性 SiO₂ 21.8%, N 14%, P₂O₅ 6%, K₂O 6%, pH 值为 8.2。供试水稻品种为东农 419。

1.2 试验方法与处理

在阿城市舍利、玉泉、大岭、小岭、红星、新乡、亚沟、平山、料甸、双丰和阿什河等 11 个乡镇, 安排 14 个试验点。并在料甸满族乡海沟村六组, 双丰乡新民村三组, 阿什河乡南城村八组, 建立了 3 个百亩示范方, 同时在 3 个百亩示范方内设立了 3 个不同处理的含硅水稻专用肥试验田。3 个百亩方的施肥是, 施含硅水稻专用肥 750 kg/hm², 结合耙地时一次施入, 在水稻孕穗期追施尿素 75 kg/hm²。试验田共设立

* 收稿日期: 2003-01-12

第一作者简介: 王军(1971-), 男, 黑龙江省伊春市人, 助理农艺师, 从事水稻专用肥的研制与生产。

参考文献:

- [1] 田波, 张秀华, 夏远南. 我国马铃薯纺锤块茎类病毒的初步研究[J]. 病毒学集刊, 1982, (1): 119-112.
- [2] M. A. 波凡尼斯特尔, S. A. 斯拉克, L. G. 兰尼. 用改良电泳方法检测马铃薯纺锤块茎类病毒[J]. 马铃薯科学, 1983, (1): 70-75.

- [3] 李学湛, 吕典秋, 何云霞, 等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳方法检测马铃薯类病毒技术的改进[J]. 中国马铃薯, 2001, (4): 87-88.
- [4] M. A. 波凡尼斯特尔, S. A. 斯拉克. 不同马铃薯品种对马铃薯纺锤块茎类病毒侵染后的反应[J]. 马铃薯科学, 1982, (2): 64-69.