

个洞内,注入待检测液。若待检测液内含有病毒粒体,其汁液通过凝胶扩散与A接触,就会出现白线(图9)。应用这种方法时,抗血清与待检测液间的距离,依病毒的浓度而定:病毒浓度高,距离可远;病毒浓度低,距离要近。三是,载玻片法。具体方法是,将琼脂涂布在载玻片上,一侧放置浸透抗血清的滤纸,另一侧放置待检测的圆形滤纸(图10)。然后,以白色沉淀线的有无,来确定检测结果。

4. 特异性核酸(dsRNA)检测法:前已述及,病毒粒体是由病毒核酸(DNA或RNA)和结构蛋白质亚单位的整齐复合物所组成。而类病毒在寄主细胞中,则是以裸露的RNA形态存在的。病毒复制过程是以单链RNA(ssRNA)为模板,合成双链RNA(dsRNA)的。dsRNA也叫作复制型RNA,简称RF。dsRNA对RNA氧化酶具有抗性,大小是RNA的2倍。因此,只要果树感染病毒和类病毒,树体内就会有dsRNA存在。未受病毒或类病毒侵染的植株,体内就没有这种高分子量dsRNA的同源片断。藉此,可以通过凝胶电泳分析,检测dsRNA的数目和大小,确定待检测病毒的类群。dsRNA检测法,具有快速、灵敏、简便等优点,既可有效地检测已知和未知的病毒,又不受寄主和组织的影响,同样可以检测类病毒。一个操作熟练的技术人员,48小时内就可以完成整个检测过程。每周可检测约100个样品。dsRNA检测法自1976年首次应用于检测植物病毒以来,已对20余种果树病毒进行了检测。dsRNA检测法,主要有以下3个步骤:一是,提取dsRNA。先选取新鲜组织样品10~40克(柱分析法),或0.1~0.5克(微量法),研成粉末后,分别转移到已冷冻的50~250毫升离心瓶中(柱分析法),或3毫升离心瓶中(微量法)。然后,立即加入1~5倍体积的双强STE(单强=0.1NaCl,0.05MTrisHCL,1MEDTA,PH7.0),0.1~0.5%的2-巯基乙醇,0.5毫克/毫升胍皂土(或1%PVP)进行提取。俟组织一融解,即加入等体积的STE饱和苯酚(用NH₄OH调整PH至7.0),和0.5倍体积的氯仿-异戊醇混合液(24/1=V/V),进行泥浆提取。在冰块上振荡半小时,悬浮液采用离心澄清,将水相调整后,使含乙醇15~18%(V/V)。二是,分离和浓缩dsRNA。即可采用标准柱法,也可应用微量法。采用标准柱法时,可取提取液的上清液,在CF-11纤维柱上纯化。层析柱含CF-11纤维素2.5克,载有溶于含15~18%乙醇的单强STE20~40毫升样品。用80~120毫升含15~18%乙醇的单强STE冲洗该柱。用14毫升单强STE,从柱上洗脱dsRNA。在样品中加入乙醇和醋酸钠,使其浓度分别达到67%和50mM,从而使dsRNA浓缩沉淀,最后在-20℃贮存4

小时以上。应用微量法时,要将含15~18%乙醇的单强STE平衡的50毫克CF-11纤维素,转移到1.5毫升微离心管中。然后,向管中加入由0.1~0.5克组织制成的上清液。将微离心管在冰块上振荡3次,每次振荡5分钟。使dsRNA更好地吸附到纤维素上。然后,离心集结纤维素-dsRNA复合物,分次向离心管中加入含15~18%乙醇的STE,每次0.1毫升,振荡离心,移至上清液,如此反复冲洗3~4次。最后一次冲洗后,加入0.5毫升单强STE,到纤维素吸移管中冲洗dsRNA,使dsRNA与纤维素分离。振荡,离心和转移含有dsRNA的上清液,至第二个微离心管中,dsRNA在乙醇中沉淀浓缩方法,与标准柱法相同。三是,检测dsRNA(凝胶电泳分析)。用含10%甘油的电泳缓冲液(40mMTris,20mM醋酸钠,10mMEDTA,PH7.8),再次悬浮已离心的乙醇沉淀。然后,将样品用于电泳。dsRNA在6~8%的聚丙烯酰胺凝胶板(0.8毫米×8厘米×10厘米)上分析。在常温下,30毫安(mA)、100伏(V)电泳2~4小时。凝胶用10~50毫克/升的溴化乙啶溶液染色10分钟(也可用AgHO₃染色),在水中脱色。

电泳前,要注意以下3个问题:第一,用已知RNA分子量的病毒,作为检测分子量的标记;第二,用健壮植株材料作对照;第三,将样品用10微克/毫升脱氧核糖核酸酶工,或核糖核酸酶处理,降解RNA和ssRNA等污染物。我国应用这种方法,在苹果花叶病毒的检测方面,取得了初步结果。张洪胜等(1989)以感染苹果花叶病毒的金冠叶片为试材,对APMV的dsRNA进行提取,经冰冻高速离心,E.M.K纤维素柱层析及核酸链酶降解,获得纯净的病毒特异性双链核糖核酸液。经紫外分光检测看出,病株在260nm处有一明显吸收峰,而无毒对照未出现吸收峰(图11)。(待续)

小 资 料

安徽涌现147个亿元镇 安徽省农村集镇目前已发展到2498个,建制镇754个,其中年国民生产总值超过1亿元的镇达147个。3000多个农村集贸市场和各类专业市场也在小城镇中诞生。

贵州有17个亿元乡镇 贵州省农村亿元乡镇从无到有,如今已“冒”出了17个亿元乡镇。农业产值比重小,非农业产值比重大,是贵州这17个亿元乡镇的显著特点。目前贵州省正在加紧建设100个亿元乡镇企业小区。

温州有72个亿元镇 浙江省温州市已有72个镇的总产值超亿元,其中工农业总产值超10亿元的镇达11个。