

反向炭凝法检测水稻普通矮缩病毒带毒体

林瑞芬 陈光堉 高东明 金登迪 陈声祥 阮义理

(浙江省农业科学院植物保护研究所, 杭州)

本文探讨了水稻普通矮缩病毒 (RDV) 抗血清制备免疫抗体的方法及其对带毒体的检测。

用化学纯活性炭为载体, 制备 RDV 抗血清免疫炭抗体, 抗血清需要纯化处理, 具有结合抗原活性的抗体碎片 $[F(ab)_2]$ 优于免疫丙球蛋白 (IgG)。 $F(ab)_2$ 浓度以每毫升约 1 毫克左右为宜, 致敏条件以 22—30°C 碾磨结合 30 分钟为优。

免疫炭抗体灵敏度高, 特异性强, 与水稻黄矮病 (RYSV)、黄萎病 (RYDV)、条纹叶枯病 (RSV) 等病株汁液, 及水稻健株汁液均呈阴性反应; 而对免疫原 RDV 病株和带毒虫则呈明显的凝集反应。能有效地检测病株不同部位 1 克重量内病毒相对浓度和介体昆虫黑尾叶蝉的带毒体。

以生物接种测定法为对照, 应用炭凝法测定 610 头黑尾叶蝉经卵带毒虫, 生物接种测定带毒率为 31.5%, 炭凝法为 32.8%, 平均检测符合率为 $83.9 \pm 8.5\%$ 。测定田间的越冬代和二、三代自然带毒黑尾叶蝉 1082 头, 生物接种测定带毒率为 0.56%, 炭凝法为 2.22%, 平均检测符合率为 $98.1 \pm 0.09\%$ 。结果表明二者对介体昆虫带毒体的检出率基本相近。

水稻普通矮缩病为我国南方稻区重要病害之一。主要由黑尾叶蝉 (*Nephotettix cincticeps*) 传病。因此介体昆虫的数量及其带毒率的高低, 与本病发生关系极为密切。过去对介体昆虫带毒率的检测, 一直用生物接种测定法, 其缺点是实验周期长, 易受自然条件限制, 因而难以及时应用于预测与指导防治。为寻求周期短和较为简便的检测方法, 近年来我们探索了几种血清学方法, 但实际应用中均不理想^[1,2]。本文初步报道反向间接炭凝法的试验条件及对介体昆虫黑尾叶蝉的检测结果。

材料与方 法

(一) RDV 抗血清制备

用氯仿处理, 聚乙二醇 (PEG) 沉淀与差速离心法, 抽提纯化病株中 RDV 为抗原 (图 1)。用无自然抗体 8—10 个月龄的公兔 (日本大耳种), 以等量全辅剂腿肌注射 3 次, 每次间隔一周, 第 4 周开始耳静脉注射 2—3 次, 每次间隔 2 天, 每头

试验兔共注射抗原 7—8 毫升, 第 5—6 周颈动脉采血。以健稻汁液吸收, 用试管沉淀法测定其滴度, 一般稳定在 4000—8000, 抗血清加防腐剂置 -20°C 低温冰箱中可贮存一年以上。

(二) 抗体纯化

1. 硫酸铵盐析提取免疫丙球蛋白: 以等量生理盐水稀释抗血清, 在冰浴条件下加硫酸铵达 48% 饱和度, 置 4°C 冰箱中数小时, 有乳白色沉淀时即可离心, 沉淀物加原抗血清量的生理盐水溶解。重复盐析二次, 盐析时加硫酸铵至 35% 饱和度, 最后将沉淀溶于少量的生理盐水中, 并对生理盐水透析至无铵离子为止, 然后用 0.1M 醋酸钠溶液透析过夜, 离心取上清液即为免疫丙球蛋白 (IgG), 用紫外分光光度计测其浓度。

2. 胃酶水解免疫丙球蛋白: 水解时免疫丙球蛋白液浓度以 20 毫克/毫升为宜, 先用 1N HCl 调 pH 至 3.4, 每毫升中加 7 个活力单位的胃酶, 胃酶先以少量 0.1M pH4.5 醋酸钠液溶解, 而后

本文于 1979 年 1 月 7 日收到。

本项工作在中国科学院生物化学研究所病毒组指导下进行。本文经曹天钦同志审阅并提出修改意见, 特此致谢。

取双孔凹玻片, 每孔先加抗原或被检液 0.05 毫升, 后加 0.025 毫升炭抗体, 立即置于微型血液振荡器上振荡 1—2 分钟, 使之充分混和, 于 37℃ 恒温条件下静止半小时, 取出后于室温下静止片刻, 在白色背景下, 以肉眼观察结果。另做正常兔炭血清与空白对照以资比较。凝集度判定标准见图 2。

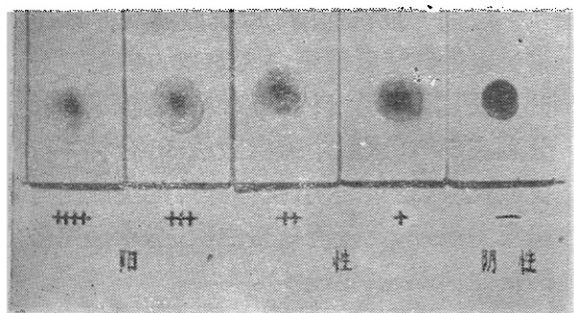


图 2 RDV 炭凝集反应判定标准

注: “+”为阳性反应; “-”为阴性反应。反应强度如下:

“+++”炭粉完全凝集于孔底, 呈疏松粒状小球, 边缘清晰, 液体澄清。

“++”炭粉凝集于孔底, 呈疏松球状, 但边缘不整齐, 有时可见少量分散凝集的炭粒, 液体澄清。

“+”炭粉凝集于孔底呈较大圆形, 边缘不整齐, 液体尚清。

“-”凝集炭粒分散, 液体混浊。

“-”炭粉不凝集。

(五) 介体昆虫带毒体检测方法

供试人工饲养的 RDV 经卵带毒虫为 4 龄(若虫至成虫), 田间采集的自然带毒虫为成虫。先用 3 叶期稻苗单虫单苗(虫、苗对应编号)饲食接种

48 小时, 连续接种 2—3 次, 将稻苗栽植于防虫条件下, 观察其发病。回收虫置于指形管内, 加少量磷酸盐缓冲液冰冻保存备用, 也可以立即测定。测定时将虫移入匀浆管内, 加 0.2 毫升 0.1M pH7.0 磷酸盐缓冲液充分碾磨呈糊状, 4000 转/分离心 20 分钟, 取上清液以玻片凝集法进行检测, 每虫重复 2 次。

(六) 植株带毒检测方法^[3]

取冰冻供试稻株 1 克剪碎, 加 2 毫升 0.1M pH7.0 磷酸盐缓冲液碾磨成糊状, 纱布过滤, 滤液 3000 转/分离心 20 分钟, 取上清液用玻片凝集法进行检测。

试 验 结 果

(一) 炭抗体致敏条件

1. pH 值

以不同 pH 值的 0.1M 磷酸盐缓冲液稀释抗体(浓度为 1.1 毫克/毫升), 30℃ 水浴碾磨致敏 30 分钟, 分别用相应 pH 值的 2% 正常兔血清磷酸盐缓冲液洗涤和悬浮致敏炭粉, 与抗原反应结果见表 1-I。另以不同 pH 值磷酸盐缓冲液稀释抗体致敏炭粉, 用同一 pH 值的 0.1M 磷酸盐缓冲液配成的 1% 正常兔血清洗涤, 2% 正常兔血清-1% 硼酸生理盐水悬浮炭粉, 反应结果见表 1-II。结果表明, 与稀释抗体时所用缓冲液的 pH 值关系较大, pH 7.2—8.2 反应灵敏度与凝集力最好, pH6.2 以下灵敏度下降, 而洗涤

表 1 缓冲液 pH 值对免疫炭抗体效果的影响

pH 值	抗 原 稀 释 度									ck ₁	ck ₂
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120		
I	4.2	+++	++++	++++	++	+	-	-	-	-	-
	6.2	+++	++++	++++	+++	+	-	-	-	-	-
	7.2	+++	++++	++++	+++	++	+	-	-	-	-
	8.2	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	-	-	-
II	5.0	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
	7.0	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
	8.0	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-

注: ck₁ 空白对照, ck₂ 正常兔炭血清对照(下同)。

与悬浮用的缓冲液的 pH 值对其灵敏度与凝集力的影响则不明显。

2. 温度

用 0.1 M pH 7.2 磷酸盐缓冲液稀释抗体, 分别在 10℃、22℃、30℃ 恒温水浴中碾磨致敏 30 分钟, 与抗原反应, 结果表明, 致敏炭粉对温度的要求幅度较宽, 10—30℃ 致敏的炭抗体, 灵敏度基本一致, 但 22—30℃ 致敏的凝集力较强(见表 2)。

3. 时间和方法

以 0.1 M pH 7.2 磷酸盐缓冲液稀释抗体, 在 30℃ 恒温水浴中用碾磨法与搅拌法分别致敏 10、30 和 50 分钟, 与抗原反应, 结果表明, 搅拌法优于碾磨法, 但搅拌法在制

备过程中, 炭粉易沉淀较难掌握合适浓度, 常影响检测结果的判定。致敏时间 10—30 分钟的反应效果基本一致, 但凝集力以 30 分钟为强, 50 分钟碾磨致敏的, 由于时间长致使磨干, 可能影响吸附而无反应(见表 3)。

(二) 抗体纯度对免疫炭抗体效果的影响

以同一批抗血清, 取抗血清(稀释 20 倍)纯化免疫球蛋白(IgG 0.94 毫克/毫升)及抗体碎片[F(ab)₂ 0.96 毫克/毫升], 分别在 30℃ 水浴中碾磨致敏 30 分钟, 与抗原反应, 结果表明, 抗体碎片的灵敏度与凝集力最好, 免疫球蛋白次之, 未经纯化的抗血清最差(见表 4)。

表 2 致敏温度对免疫炭抗体效果的影响

温 度 (℃)	抗 原 稀 释 度									ck ₁	ck ₂
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120		
10	++	+++	+++	+++	++	++	+	—	—	—	—
22	++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—
30	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+	—	—	—	—

表 3 致敏方法、时间对免疫炭抗体效果的影响

方 法	时 间 (分)	抗 原 稀 释 度									ck ₁	ck ₂
		20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120		
搅 拌 法	10	++	+++	+++	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—
	30	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	—	—
	50	++	+++	++++	++++	++++	+++	+++	—	—	—	—
碾 磨 法	10	++	+++	++++	++++	+++	+++	++	—	—	—	—
	30	++	++++	++++	++++	++++	+++	+	—	—	—	—
	50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

表 4 抗体纯度对免疫炭抗体效果的影响

血清代号	处 理	抗 原 稀 释 度									ck ₁	ck ₂
		20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120		
A	抗血清	+	++	++	++	++	++	—	—	—	—	—
	IgG	+	++	+++	+++	+++	+++	—	—	—	—	—
	F(ab) ₂	++++	++++	++++	++	++	++	++	—	—	—	—
75	IgG	+++	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—
	F(ab) ₂	+++	++++	++++	++	—	—	—	—	—	—	—

(三) F(ab)₂ 浓度对免疫炭抗体效果的影响

取同批纯化的 F(ab)₂ 用 0.1M pH 7.2 磷酸盐缓冲液稀释至不同浓度, 25℃ 碾磨致敏 30 分钟, 与抗原反应, 结果表明, 致敏浓度在 0.48—0.96 毫克/毫升的效果基本一致, 低于 0.24 毫克/毫升有所下降 (见表 5)。

(四) 免疫炭抗体的稳定性与特异性

用活性炭致敏抗体, 与红血球相比不需要严格的无菌操作, 且较易保藏, 在 4℃

冰箱中 60 天, 其灵敏度与凝集力并不降低, 贮存 274 天仍有一定的灵敏度。

免疫炭抗体特异性强, 与水稻条纹叶枯病 (RSV)、水稻黄萎病 (RYDV)、水稻黄矮病 (RYSV) 病稻榨出液均呈阴性反应, 对相应抗原水稻普通矮缩病 (RDV) 病株汁液呈明显的凝集反应, 并能检测病株不同部位 1 克重量内病毒相对浓度 (见表 6)。

(五) 炭凝法对介体昆虫黑尾叶蝉带毒体的检测

表 5 F(ab)₂ 浓度对免疫炭抗体效果的影响

浓 度 (毫克/毫升)	抗 原 稀 释 度									ck ₁	ck ₂
	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120		
0.24	++++	++++	++++	++++	++	++	+	+	-	-	-
0.48	++++	++++	++++	++++	++++	++	++	+	±	-	-
0.96	++++	++++	++++	++++	++++	++	++	+	±	-	-

表 6 炭凝集法检测普通矮缩病株各部位病毒结果

病株部位	与不同浓度(倍数)汁液反应结果							ck ₁	ck ₂
	原 液	20	40	80	160	320	640		
心 叶	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
老 叶	+++	++++	+++	++	+	-	-	-	-
叶 鞘	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-
根	+++	+	+	-	-	-	-	-	-
无症状老叶	-	-	-	-	-	-	-	-	-
健 稻	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 7 炭凝法与生物接种测定法检测 RDV 经卵带毒黑尾叶蝉结果比较(1977—1978 年)

抗血 清号	F(ab) ₂ 浓 度 (毫克/毫升)	测定 虫数	生物接种测定法				炭 凝 法								符 合 率		
			阳性		阴性		阳性符合		阴性符合		假阳性		假阴性		虫数	%	标准差
			虫数	%	虫数	%	虫数	%	虫数	%	虫数	%	虫数	%			
A 号	0.94	273	92	33.7	181	66.3	77	83.6	165	91.1	16	5.9	15	5.5	242	88.6	± 7.8
	0.63	83	21	25.3	62	74.7	13	61.9	56	90.3	6	7.3	8	9.6	69	83.1	± 6.6
	0.24	85	37	43.5	48	56.5	26	70.2	39	81.2	9	10.5	11	12.9	65	76.5	±11.8
75号	1.2	59	6	10.2	53	89.8	5	83.3	44	83.0	9	15.2	1	1.7	49	83.1	
1 号	1.3	90	27	30.0	63	70.0	21	77.7	51	80.9	10	11.1	8	8.9	72	80.0	
沪号	0.96	20	9	45.0	11	55.0	6	66.7	9	81.8	2	10.0	3	15.0	15	75.0	
合 计		610	192	31.5	418	68.5	148	77.1	364	87.1	52	8.5	46	7.5	512	83.9	± 8.5

表 8 炭凝法与生物接种测定法检测田间自然带毒黑尾叶蝉结果比较(1978 年)

采集地点	代次	测定虫数	生物接种测定法				炭凝法								符合率		
			阳性		阴性		阳性符合		阴性符合		假阳性		假阴性		虫数	%	标准差
			虫数	%	虫数	%	虫数	%	虫数	%	虫数	%	虫数	%			
萧山 金华 东阳	越冬代	204	1	0.5	203	99.5	1	100	197	97.0	6	2.9	0	0	198	97.1	
		177	3	1.7	174	98.3	2	66.7	171	98.0	3	1.7	1	0.6	173	97.7	
		120	0	0	120	100	0	0	119	99.1	1	0.8	0	0	119	99.2	
萧山 金华 东阳	二、三代	109	0	0	109	100	0	0	108	99.0	1	0.9	0	0	108	99.0	
		150	2	1.3	148	98.6	2	100	146	98.6	2	1.3	0	0	148	98.6	
		322	0	0	322	100	0	0	316	98.1	6	1.9	0	0	316	98.1	
合 计		1082	6	0.56	1076	99.4	5	83.3	1058	97.7	19	1.7	1	0.1	1062	98.1	±0.09

注: 测越冬代虫: 炭抗体为 75 号抗血清, 浓度 1.2 毫克/毫升。

测二、三代虫: 炭抗体为沪号抗血清, 浓度 0.9 毫克/毫升。

1. 经卵带毒虫的检测结果:

先后检测 RDV 经卵带毒虫 610 头, 用生物接种测定法作对照, 生物接种测定法带毒率为 31.5%, 炭凝法为 32.8%, 平均检测符合率达 $83.9 \pm 8.5\%$ (见表 7)。

2. 自然带毒虫的检测结果:

分别采集不同病区绿肥田越冬代与早稻田二、三代黑尾叶蝉。共测定 1082 头成虫, 生物接种测定法带毒率为 0.56%, 炭凝法为 2.22%, 平均检测符合率为 $98.1 \pm 0.09\%$ (见表 8)。

讨 论

应用 RDV 炭抗体可以灵敏地检出稻株与介体昆虫体内病毒的存在。在实际应用时应十分注意免疫炭抗体的灵敏度和凝集力, 经多次试验, 免疫炭抗体必须能与免疫原 (每毫升不少于 25 克 RDV 病株的提纯抗原) 1:2560 倍起明显反应, 且凝集力不低于 2^+ 。炭抗体的灵敏度与凝集力受 $F(ab)_2$ 的质量、浓度等因子的影响。而 $F(ab)_2$ 质量是与抗血清的滴度、抗体精制的纯度、胃酶水解的适度有关。由于每批抗血清精制后所得 $F(ab)_2$ 的含量和质量不尽相同, 所以在制备免疫炭抗体前应先进

行预备试验, 以得出 $F(ab)_2$ 的最适浓度是很重要的。同时在每批测样时除设空白和正常兔炭血清对照外, 最好再测数头已知带毒和无毒虫, 以核对检验符合率。

应用抗血清检测介体昆虫带毒体, 无论是血凝法或是炭凝法, 与生物接种测定法相比较均会出现假阳性及假阴性现象, 其原因除病毒在昆虫体内逐步增殖产生的病毒量的不同, 和带毒虫具有明显的间歇传毒的生物因素, 以及检测过程中技术操作所导致的误差外, 与不同血清学方法的灵敏度也有很大关系。如应用灵敏度高的反向间接血凝法检测, 一般出现的假阳性率为 9.1%、假阴性率为 3.5% 左右。而采用灵敏度稍低的炭凝法则假阳性率为 8.5%、假阴性率为 7.5% 左右。就在炭凝法中采用同一 $F(ab)_2$ 不同浓度致敏的炭抗体检测解体昆虫带毒体时, 当其浓度最适时, 假阳性和假阴性率低, 检测符合率就高。因此, 在制备免疫炭抗体过程中需注意抗血清的质量, 精确掌握水解适度和 $F(ab)_2$ 的最适浓度, 是减少假阳性或假阴性现象提高检出符合率的技术关键。至于由生物因素所诱致的假阳性或假阴性, 由于通常在生物接种测定法中也会发生误差, 故此种现象是

难以避免的。

从检测的 1692 头介体昆虫看,带毒率高的经卵带毒虫,其检测符合率低于带毒率低的自然带毒虫;由于后者阴性虫多,受假阳性假阴性的影响小,故总符合率高;但二者阳性检出符合率是相近的,前者为 77.1%,后者为 83.3%。此外,从二者检出的带毒率看,带毒率高的经卵带毒虫,生物接种测定的带毒率为 31.5%,炭凝法检测的为 32.8%;带毒率低的自然带毒虫,生物

接种测定的带毒率为 0.56%,炭凝法检测的为 2.22%,炭凝法检出率接近或稍高于生物接种测定法。因此,认为炭凝法在生产上具有一定的应用价值。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院生物化学研究所病毒组、浙江省农业科学院植保所水稻病毒组: 生物化学与生物物理学报 10(4): 355—361, 1978。
- [2] 鲍行豪: 微生物学报 14(1): 112—119, 1974。
- [3] 木村郁夫, 宫岛成寿: 日本植物病理学会报, 42: 266—271, 1976。

STUDIES ON THE APPLICATION OF THE REVERSED PASSIVE CARBON AGGLUTINATION TEST TO THE DETECTION OF VIRULIFEROUS INDIVIDUALS OF RICE DWARF VIRUS

Lin Rui-fen Chen Guang-yu Gao Dong-ming Jin Deng-di
Chen Sheng-xiang Ruan Yi-li

(Zhejiang Academy of Agricultural Science, Hangzhou)

This paper deal with the method of preparation, a method of preparation the rice dwarf virus (RDV) carbon antiserum and its use for detection of viruliferous insects and hosts.

The experimental results indicated that the antiserum must be hydrolyzed into fractions $[F(ab)_2]'$ if the preparation of the RDV carbon antibody was made with pure chemical active carbon as carrier. It was better that the $F(ab)_2'$ concentration was diluted about 1 mg/ml in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.2, and was combined with carbon by grinding at the temperature of 22—30°C for 30 minutes.

This carbon antibody namely the reversed passive carbon agglutination (RPCA) was highly specified and very sensitive. It showed marked agglutination reaction with immune agent of RDV and sap in 1 g weight of diseased plant

and single viruliferous insect, but it is negative response to the healthy rice sap rice stripe virus, rice yellow stunt virus and rice yellow dwarf.

It is checked with biologically inoculation (BI), 610 transovarial insects were detected for RDV by RPCA techniques. The average coincidence rate was $83.9 \pm 8.5\%$, the RDV positive rate by RPCA techniques was 32.8%, whereas by BI techniques was 31.5%. In addition, 1082 field insects were detected, the average coincidence rate was $98.1 \pm 0.09\%$, the RDV positive rate by RPCA techniques was 2.22%, the RDV positive rate by BI techniques was 0.56%.

The experimental results showed that the by RPCA techniques and BI techniques were closely about, therefore this RPCA techniques would be useful practically in production.