

制备水稻黄矮病毒抗血清的初步研究

浙江农业大学植保系水稻病毒病组

(杭州)

水稻黄矮病我国最早于1964年发生于广东、广西等地^[1,2],1966年在浙江省文成、平阳等县发生,1970—1971年间遍及浙江省大部地区造成危害^[3]。台湾省也有发生,称之为“黄叶病”^[4,5]。传毒试验证明,此病在广东等地由大斑黑尾叶蝉(*Nephotettix apicalis*)、浙江由黑尾叶蝉(*N. cincticeps*)传播。病毒粒子弹形,电镜负染色观察粒子大小为 $88-100 \times 120-136$ 微米,超薄切片中粒子大小为 $50-75 \times 100-125$ 微米,粒子杆状^[6-8]。迄今未见有关水稻黄矮病毒抗血清制备之确切报道。1977年我们试制成水稻黄矮病毒抗血清,现将研究初步结果报道如下:

一、材料和方法

1. 抗原粗提纯和抗血清制备

典型水稻黄矮病株采自浙江省衢县塔石公社豆付王大队田间。将病叶连同叶鞘剪碎后,按1:1(重量/体积)比例加入pH5.5 0.01M氯化镁-0.1M甘氨酸液,于组织捣碎器中捣碎,双层纱布过滤,滤液经低速(4000转/分)离心除去粗渣,上清液经硅藻土膜(厚约0.3公分)抽滤进一步除去植物残渣,滤液加入6%(重量/体积)的聚乙二醇(Polyethylene glycol,分子量6000,简称PEG,下同)和3%氯化钠,溶解后放在4℃冰箱中过夜,次日以 $10000 \times g$ 离心1小时,沉淀溶于0.01M氯化镁-0.1M甘氨酸液中,最终每300克病叶(连同叶鞘)得到4毫升,低速离心除去不溶物质后用作免疫抗原,加入等量 Freund's 不完全佐剂充分乳化后注射于一只家兔后腿肌肉中。共注射二只家兔。

同时以差速离心法提取。病叶捣碎后即以低速离心(6000转/分)除去大部分植物残渣,上清液同样以PEG-氯化钠处理,经 $15000 \times g$ 高速离心,所得沉淀溶解后用作免疫抗原,同样按每300

克病叶最后得4毫升溶液加入等量 Freund's 不完全佐剂乳化后注射于一只家兔后腿肌肉中,共注射二只家兔。

一定时期后,将上述二组家兔分别采血测定抗血清效价。

2. 血清反应

测定用抗原为黄矮病叶磨碎榨取汁液以及加PEG处理所得沉淀等,并以同样处理之健叶和普通矮缩病叶为对照。

用环状反应和琼脂双扩散法测定。环状反应:抗血清用含0.9%氯化钠的10%甘油稀释,抗原用pH6.8含0.9%氯化钠的1/30M磷酸缓冲液(简称PBS,下同)稀释,取直径2—3毫米的玻璃管,先用毛细管将0.1毫升抗血清滴于玻管下层,再小心地把0.1毫升抗原溶液加在其上层,注意勿使两层混淆,在25—30℃下60分钟内观察界面上有无白色沉淀环产生。

琼脂双扩散测定:用前将琼脂在0.9%氯化钠液中透析48小时,然后配成含0.9%氯化钠的0.8%琼脂液,倒在直径55毫米的培养皿中,每皿加8毫升,充分凝固后打孔,中央一孔,四周4—6孔,一般抗血清放在中孔,抗原放在四周几孔中。测定用抗血清以0.9%氯化钠液稀释,加入抗原、抗血清后,保湿,室温下放置48小时后加入0.5%亮绿染色,观察记载有无白色沉淀带产生。

二、结 果

1. 以pH5.5、0.01M氯化镁-0.1M甘氨酸液提取水稻黄矮病病叶,经抽滤除渣处理,作免疫抗原注射的一组二只家兔,于注射后4周采血,以琼脂双扩散法测定抗血清效价为1:320,重复

本文于1977年8月18日收到。

7次测定结果一致,环状反应测定时有达1:5120的。证实已成功制得水稻黄矮病毒抗血清。

为检查所得抗血清的专化性,进行下列对比试验:以健株汁液、水稻普通矮缩病叶汁液、水稻黄矮病叶磨碎汁液作抗原,与黄矮病毒抗血清反应时,在琼脂双扩散反应中,只有黄矮病叶汁液孔与黄矮病毒抗血清孔之间形成白色沉淀带,其他两种抗原和黄矮病毒抗血清无反应(图1)。其次又分别以水稻普通矮缩病毒抗血清和健全水稻植株提取汁液的抗血清与水稻黄矮病叶提取汁液反应,无特异性沉淀带产生。说明所得抗血清对水稻黄矮病毒具特异性。上述结果经多次重复得到证明。

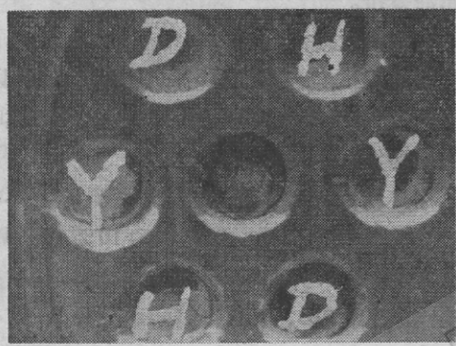


图1 琼脂双扩散图

说明:中孔加入黄矮病毒抗血清;
Y孔加入黄矮病病叶汁液;
H孔加入健株叶片汁液;
D孔加入普通矮缩病叶汁液。

中孔和Y孔间有白色特异性沉淀带形成。

以差速离心法提取作免疫抗原的一组两只家兔得到的抗血清效价极低(1:10)。

2.新鲜水稻黄矮病病叶或经冰冻贮藏之水稻黄矮病病叶的磨碎汁液均可直接用作测定的抗原。如病叶1份加入等量(重量/体积)pH6.8的PBS磨碎液作原液,依次进一步稀释为2、4、8倍等。用1/10或1/20的黄矮病毒抗血清,在琼脂双扩散反应中稀释4—8倍的病叶汁液仍有正反应(图2)。

多次试验均观察到稀释2倍的抗原在反应中常可见最明晰的沉淀带。

3.从杭州华家池农场、肖山临浦城山公社、衢县塔石公社田间采集表现典型黄矮病状的水稻病株叶片磨碎榨汁后和水稻黄矮病毒抗血清用琼脂双扩散法进行测定,结果都产生了特异性

白色沉淀带。对照健株汁液和黄矮病毒之间无反应。进一步证实所得抗血清的特异性。

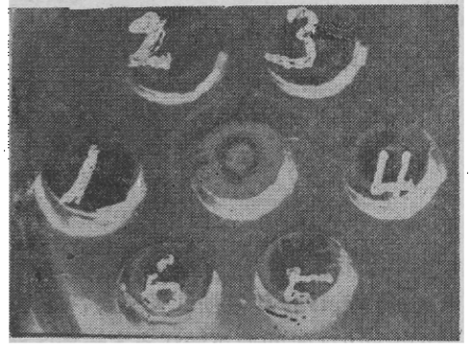


图2 琼脂双扩散图

说明:中孔加入1/10或1/20的水稻黄矮病毒抗血清。周围各孔分别加入不同稀释度的抗原汁液。

1.原液, 2.稀释2倍, 3.稀释4倍,

4.稀释8倍, 5.稀释16倍, 6.稀释32倍。

在4孔与中孔之间尚可见不十分清楚的沉淀带。

4.为检查提取方法,测定下述各项的抗原性。(1)用PEG第一次沉淀。

(2)上述上清液第二次加入PEG后的沉淀。

(3)病叶直接磨碎汁液。

(4)同(1)项但加氯仿处理后的PEG沉淀。

(5)上述各种材料加30%吡啶处理。结果在琼脂双扩散反应中,(1)(2)(3)作抗原与抗血清有反应形成白色特异性沉淀带。经氯仿处理后的PEG沉淀(4)基本丧失了抗原性,只有一次测定中有正反应。处理(5)各种材料与抗血清均无正反应。用第二次PEG沉淀测定时,有时无抗原性。

5.琼脂所用浓度初步试验以0.8%较好,含0.9%的氯化钠。与水稻普通矮缩病相比,水稻黄矮病毒血清反应如用琼脂双扩散反应法测定时,需2—3天才可观察结果。

水稻黄矮病毒抗血清初步制成,其效价尚需进一步提高,许多问题尚有待进一步明确。

参 考 资 料

- [1] 范怀忠、黎毓干等:植物保护,3:(4)143—145,1965。
- [2] 周成德:植物保护,3(4),141—142,1965。
- [3] 浙江省农业科学院植物保护研究所:《水稻病害病》,农业出版社,1975。
- [4] Ling, K. C.: Rice Viruses diseases. IRRRI, Los

(下接第172页)

(上接第 174 页)

Banos, Philippines P89, 1972.

- [5] Su, H. J.: The Virus Diseases of the Rice Plant. IRRI, Los Banos, Philippines P13—14, 1967.
- [6] 复旦大学电镜室、植物病毒组: 科学通报, 21

(12), 551—552, 1976。

- [7] 中国科学院上海生物化学研究所、浙江农业科学院植物保护研究所病毒组: 科学通报, 22(2), 93—94, 1977。
- [8] Shikata E. & Chen, M. J.: *J. Virol.*, 3: 261—264, 1969.