

马铃薯种薯生产的研究

III. 马铃薯 Y 病毒抗血清制备和诊断方法

张鹤龄 郭素华

张秀华 马德芳 杨希才

(内蒙古大学生物系,呼和浩特)

(中国科学院微生物研究所病毒室,北京)

赵 娥 英

(内蒙古乌兰察布盟农业科学研究所,集宁)

用 0.1 M Tris-HCl (内含 0.05 M EDTA) 或 0.5 M PB 作提取液,以含 0.5 M 尿素的 0.01 M PB 回溶病毒沉淀,以防止病毒凝聚。通过 PEG 沉淀和反复两次差速离心,提取了由马铃薯“男爵”分离的 PVY 分离物。电镜照片表明为形态均一的弯曲长线状粒体。产量约为 2 毫克/100 克鲜重叶片。以 PVY-I 抗原免疫家兔,用 Freund 全佐剂进行肌肉注射的方法,制备出 PVY-I 抗血清,其效价在 2560—5120。抗血清和 PVX、TMV 分离物,以及正常烟草叶片汁液无明显反应。应用 PVY-I 抗血清冻干剂,用微量凝聚和微量沉淀的方法鉴定马铃薯幼芽和感 Y 病毒叶片汁液中的 Y 病毒,表明具有一定可靠性。由制备的抗血清提取免疫球蛋白致敏乳胶,可测出提纯的 PVY 抗原最低含量为 1.52—2.2 微克/毫升,可测出感染烟草叶片汁液的最高稀释度为 1:100。制备的抗血清冻干粉和微量凝聚的血清学方法已用于 1978 和 1979 年内蒙古自治区乌盟后旗无病毒原种场的种薯田间鉴定。

PVY 是引起我国马铃薯“退化”的主要病毒^[1]。它传播广泛,危害很大,当复合侵染时,能引起更严重的病症。由于 PVY 在感病植株中浓度较低,在提纯过程中又易于凝聚,给抗血清制备和病毒诊断带来许多困难,致使 PVY 的血清学诊断至今在国内外没有成为常规的病毒鉴定方法,国外还在不断改进 PVY 的血清鉴定技术^[2,4-6]。我们从 1976 年以来也进行了这方面的工作,本文是关于马铃薯 Y 病毒抗血清制备和诊断方法的研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 病毒提纯

毒源为中国科学院微生物研究所病毒室从马铃薯“男爵”品种上获得的分离物——PVY-I 和黑

龙江省克山农业科学研究所马铃薯组由马铃薯“疫不加”品种上分离的 PVY-E。病毒增殖在普通烟“黄苗榆”上,3—5 叶龄时接种,接种后 2—4 周,当呈现症状时采收叶片。病毒提纯系参照 Маккоик 等的报告以及 Uyeda 等提纯马铃薯 Y 病毒组中菜豆黄花叶病毒的方法^[8,11],按每克冰冻叶组织加入 2 毫升 0.01 M pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液(内含 0.05 M EDTA)或加入 0.5 M 磷酸缓冲液(pH6.5),两种情况下,均加入 0.1% 的巯基醋酸。用绞肉机绞碎叶片,经尼龙纱布榨汁。每 2 毫升滤液中加入 1 毫升氯仿,剧烈搅拌 30 分钟,3,000 rpm 离心 30 分钟,取上清。加入 4%

本文于 1979 年 9 月 12 日收到。

这项工作是在田波同志指导下进行的。庞瑞杰、江立群同志协助完成部分试验,并承蒙中国科学院林业土壤研究所电镜室拍摄电镜照片,特此一并致谢。

聚乙二醇 (PEG, 分子量为 6,000) 和 2% NaCl, 静置 1 小时。在 MSE-18 型高速离心机上, 12,000 g 离心 15 分钟, 收集病毒沉淀。用 0.01 M、pH7.4 的磷酸缓冲液 (内加 0.5 M 尿素) 悬浮病毒沉淀, 充分研磨溶解, 3000 rpm 离心 20 分钟, 取上清。用 PEG 重复沉淀两次, 再经两次差速离心作为抗原。另外以 30% 硫酸铵沉淀提取的抗原作为对照^[3]。

(二) 抗血清的制备

静脉注射和肌肉注射方法同前^[1], 在最末一次注射后一周, 由心脏采血, 测定血清中抗体滴度。用微量沉淀和免疫双扩散法测定抗血清效价和特异性^[9]。

(三) 琼脂双扩散

采用 Ouchterlony 免疫双扩散的方法。将纯净优质琼脂粉, 溶解于 0.05 M、pH 7.0 的 PBS 中, 使成 0.85% 浓度, 加入 0.1% 的 NaN₃, 滴加抗血清和抗原后, 保湿, 并于 37℃ 保温, 7—14 小时或两、三天, 取出观察沉淀线。然后将平板冲洗, 干燥, 用氨基黑 (Amino black) 染色, 用 1 M 醋酸脱色, 制成永久保存的标本^[10]。

(四) 乳胶凝聚

参照 Bercks 的方法^[11], 用硫酸铵沉淀法提取免疫球蛋白。取 0.1 毫升免疫球蛋白, 加入 0.1 M、pH 7.2 Tris-HCl 缓冲液 4.9 毫升和稀释 15 倍的乳胶 5 毫升混合, 23℃ 保温 30 分钟, 经 3,000 rpm 离心 30 分钟, 取沉淀。加 10 毫升 0.1 M Tris-HCl 缓冲液和 0.2 毫升 1% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP) 溶液, 离心洗涤三次。沉淀用 10 毫升 Tris-HCl 缓冲液溶解, 内加 0.2 毫升 PVP 和 0.6 毫升 3% 硫柳汞为致敏乳胶。测定在玻璃板上进行, 先加 0.1 毫升抗原稀释液, 再加 0.05 毫升免疫球蛋白致敏乳胶, 23℃、10 分钟后, 观察结果。

结 果 和 讨 论

(一) 抗原提取

经紫外吸收光谱分析证明, 用 30% 硫酸铵沉淀提取的抗原, 260/280 毫微米光密度比值为 0.97, 而用 PEG 沉淀法提取的 PVY 抗原, 其比值为 1.16。经 PEG 沉淀和差速离心提取的抗原, 最高吸收峰在

260 毫微米, 最低吸收在 247 毫微米, 260/280 毫微米光密度比值为 1.3, 260/247 毫微米光密度比值为 1.1 (见表 1、图 1), 接近文献上提纯样品的数值。取提纯抗原, 用磷钨酸负染, 电镜检查, 为长形弯曲线状粒体 (图版 I-1)。收率约为 2 毫克/100 克鲜重叶片。

表 1 不同方法提取的 PVY 抗原紫外吸收光谱

提取方法	抗原 稀释	光密度 260 毫微米	光密度 280 毫微米	光密度 260/280 毫微米
两次硫酸沉淀	1/10	0.579	0.60	0.97
PEG 沉淀	1/10	0.840	0.724	1.16
PEG 沉淀两次 差速离心	1/10	0.432	0.343	1.30

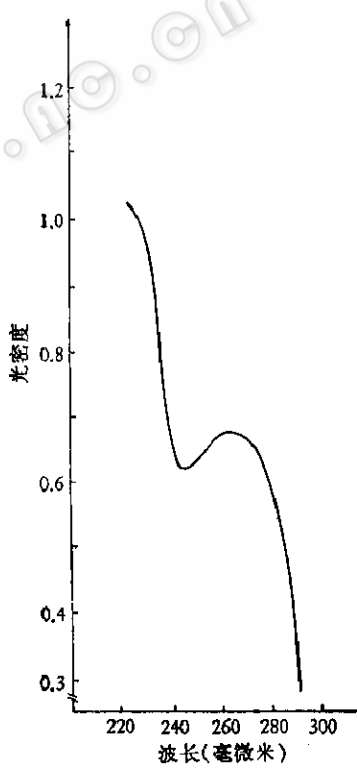


图 1 用 PEG 沉淀, 经两次差速离心提纯的 PVY-I 紫外吸收光谱

(二) 抗血清制备

将不同方法提取的抗原, 用静脉注射和肌肉注射的方法免疫家兔, 用微量沉淀试验测定抗血清效价, 结果列于表 2。

表2 不同提纯方法和免疫方法制备的马铃薯 Y 病毒抗血清效价

抗原提取方法	免疫方法	家兔数	测定效用 抗原	抗血清效价	
				PVY-I	PVY-E
PEG 沉淀	静脉注射	4	PVY-I 部分提纯抗原	1:2560	—
	肌肉注射	3	”	1:5120	—
30% 硫酸 沉淀	静脉注射	3	”	1:1280	—
	肌肉注射	2	”	1:2560	—
		2	PVY-E	—	1:2560

从表2结果看,用 PEG 沉淀提取抗原制备的马铃薯 Y 病毒抗血清的效价,较硫酸法为高。不同注射方法免疫家兔的试验表明,肌肉注射较静脉注射所得抗血清滴度高。

图2表明,经三周肌肉注射后,家兔体内抗血清滴度在五周内变化情况。在最末一次注射后的第一周,抗血清效价达到高峰,第二周抗血清效价有明显下降。三至四周后下降至1:40—80,此时如补光注射,则效价又可迅速上升到高峰。这和用 PVX 免疫家兔时血清内抗体滴度变化情况是不同的^[3]。用 PVY 肌肉注射免疫家兔,采血时间最好不迟于注射后的第一周。

抗血清特异性鉴别试验表明,用 PEG 沉淀提取抗原制备的抗血清和马铃薯 X 病

毒, TMV 以及正常烟草叶片汁液均不发生反应,而用硫酸沉淀提取抗原制备的抗血清中,却存在有少量和正常烟草汁液反应的抗体。

(三) 不同 PVY 分离物间的血清学反应

为了解不同 PVY 分离物之间的血清学反应,我们用 Ouchterlony 免疫双扩散的方法,对 PVY-I、PVY-E 和感染 PVY 的马铃薯 S₄₁₉₅₆、Eersteling 叶片汁液进行测定。结果表明,当 PVY-I 抗血清和 PVY-I、PVY-E 抗原相互扩散时, PVY-I 抗血清和同源抗原沉淀线清楚,和 PVY-E 及 S₄₁₉₅₆ 沉淀线比较细弱,且不完全愈合,似乎抗原组分部分相同,部分不同。PVY-E、S₄₁₉₅₆ 及 Eersteling 中的 Y 病毒,能和 PVY-I 抗血清反应并生成沉淀线,表明具有共同抗原组分;而 S₄₁₉₅₆ 和 Eersteling 中的 PVY,似乎具有完全相同的抗原,沉淀线愈合(见图版 1-2)。由此可以推测,用 PVY-I 抗血清鉴定“男爵”、Eersteling、S₄₁₉₅₆ 以及“疫不加”等品种中的 Y 病毒是可行的。

一般认为完整的 PVY 病毒粒体较长,在琼脂中不易扩散。试验中得到的病毒和抗血清反应的沉淀线,很可能是由于存在于汁液中 PVY 病毒具有不同长度的粒体(见图版 1-1 电镜照片),而沉淀线最初主要是由较短的易于扩散的病毒粒体和抗体反应形成的。几天后,某些较长粒体相继扩散至沉淀线处并参与反应。这同 D. No-

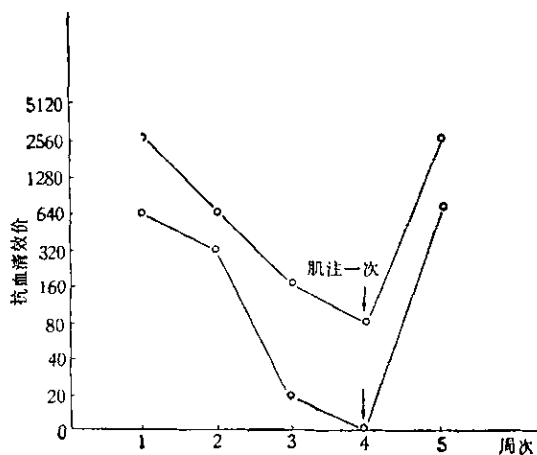


图2 肌肉注射免疫家兔后 PVY 抗血清 5 周内滴度变化曲线

ordam 在 0.7% 和 1% 琼脂双扩散中,得到长线状病毒 PVX 的清晰沉淀线的结果是类似的^[12]。

(四) 乳胶凝聚试验

我们用乳胶凝聚试验测定了提纯的 PVY 抗原和感染 PVY 的烟草叶片汁液的灵敏度,并将这一方法和微量沉淀法进行对比,结果见表 3。

表 3 乳胶凝聚试验鉴定 PVY 的灵敏度

抗原	可测出 PVY 抗原的最低含量(微克/毫升)	可测出感染 PVY 烟草叶片汁液的最高稀释度
致敏乳胶		
PVY 免疫球蛋白致敏乳胶	1.52—2.2	1:100
微量沉淀试验	220	1:10

(五) 应用 PVY 抗血清诊断马铃薯块茎幼芽的试验

我们应用 PVY-I 抗血清以几种鉴定方法测定了一批“退化”的“里外黄”幼芽和“卡它丁”幼芽。以稀释浓度为 1:20 和 1:40 的 PVY 抗血清进行微量沉淀,微量凝集反应,并用酸浆和地雷松接种作比较。结果见表 4。

表 4 几种方法对“里外黄”、“卡它丁”幼芽中 PVY 鉴定效果比较

品 种	诊断方法	鉴定株数	阳性株数	检出率(%)
里外黄	微量凝集	77	47	61.04
	微量凝集	77	44	57.14
	酸 浆	36	21	58.33
	地 雷 松	41	19	46.34
卡它丁	微量凝集	30	3	10.00
	微量凝集	30	3	10.00
	酸 浆	30	4	11.10
	地 雷 松	30	3	10.00

从表 4 可以看出,“退化”“里外黄”的 PVY 检出率大约在 50—60% 左右,而对 PVY 有抗性和过敏反应的“卡它丁”只有 10%,且阳性反应都比较微弱。

试验中发现微量凝集的诊断效率总是略高于微量沉淀。为进一步查明,是由于植物汁液中正常成份引起的非特异性反应,还是凝集反应在这种条件下检出率较高,我们把所用抗血清用健康烟草汁液进行了吸收。将吸收的抗血清与不经吸收的抗血清进行了对比,结果见表 5。

表 5 吸收前后的马铃薯 Y 病毒抗血清对“里外黄”的鉴定效果(微量凝集试验)

抗血清	鉴定株数	阳性株数	检出率(%)
吸收前	41	19	46.34
吸收后	41	18	46.40
地雷松	41	19	46.34
酸 浆	41	21	51.21

表 5 说明经过普通烟正常汁液吸收后的马铃薯 Y 病毒抗血清,用微量凝集试验鉴定“里外黄”中 Y 病毒的带毒率和不经过吸收的抗血清基本一致。不经吸收的抗血清的凝集反应有一定可靠性。

(六) 诊断感染马铃薯 Y 病毒的叶片汁液

我们用马铃薯 Y 病毒分离物,人工感染无病毒“深眼窝”和“里外黄”的幼小植株,待出现病症之后,取其感病叶片用 0.01 M、pH 7.2 的磷酸缓冲液榨取叶片汁液,以微量凝聚(汁液不经离心澄清)、半澄清的微量凝聚(经 2000 rpm 离心 20 分钟)和微量沉淀法(按 1:1 加氯仿,离心澄清),鉴定感病马铃薯和烟草叶片汁液中的 Y 病毒,结果见表 6、7。

试验结果表明,感染 PVY^N 和 PVY^O 株系的普通烟叶片,用此三种方法,均可有效地进行鉴定(见表 7)。但感 Y 病毒的马铃薯叶片,因症状和诊断方法不同而诊断效果不同。似乎感染 Y 病毒的马铃薯植株叶片上症状越是严重(皱缩坏死),越是难于测出其中的 Y 病毒。三种鉴定方法对比结果表明,加氯仿彻底澄清的汁液,可能由于病

表 6 微量凝聚和微量沉淀试验
诊断马铃薯叶片汁液中 PVY 的效果

品 种	接种病毒	植株症状	测定样品数	检 出 数 目		
				微量凝聚	微量凝聚 (半澄清)	微量沉淀 (絮仿澄清)
深眼窝	Y-E	轻花叶 轻度皱缩 顶叶叶片变小	10	8	8	5
里外黄	Y ^N -S	花叶 皱缩花叶	13	10	11	6
总 数			23	18	19	11
检出率				78.3	82.6	47.8
结果判断				不十分清楚	清晰易判断	清晰易判断

表 7 烟草叶片中 PVY 诊断效果

烟 草	接种病毒	测 定 样品数	微量凝聚		微量凝聚(半澄清)		微量沉淀(加絮仿澄清)	
			阳性数	检出率%	阳性数	检出率%	阳性数	检出率%
黄苗榆	PVY-I	10	10	100	10	100	10	100
黄苗榆	PVY ^N -S	8	8	100	8	100	8	100

毒损失较大,检出率低,但结果易判断。半澄清的微量凝聚法,检出率较上法为高,反应清晰,结果容易判断,而不经离心澄清的常规的微量凝聚试验,检出率较好,但结果常不易判断。

在鉴定中,马铃薯所以出现上述不同于烟草的复杂情况,很可能是植株内 Y 病

毒浓度低的原因。

(七) 应用 PVY 抗血清诊断马铃薯种薯叶片带毒率

1978 年夏季在马铃薯开花期我们用 PVY 抗血清(稀释至 1:40),以微量凝聚方法对一般生产田和内蒙古乌盟察右后旗一级原种场和几个二级原种场的“里外黄”、“深眼窝”、“紫花白”三个品种的田间 Y 病毒感染率进行了诊断,结果见表 8。

参 考 文 献

- [1] 田波,张秀华,林传光:植物病理学报,6(1):63—86,1960。
- [2] Beemster, A. B. R. and Rozendaal; In "Virus of Potato and Seedpotato Production", J. A. de Bokx, 124—127, 1972.
- [3] Cremer, Margaretha, C.: Proc. Confer. Pot. Virus Dis., Wageningen 85—87, 1952.
- [4] Sampson, P. J. and R. H. Taylor: *Phytopathol.*, 58: 489—493, 1968.
- [5] Smith, R. H. and J. H. Tremaine: *Phytopathol.*, 60: 1785—1789, 1970.
- [6] Makkouk, M. and D. J. Gumpf: *Phytopa-*

表 8 应用微量凝聚试验诊断田间马铃薯 PVY 感染率

品种	采样地点	采样数	阳性 反应	PVY 感 染率(%)
里 外 黄	一般大田	100	37	37
	后旗一级原种场(1)	250	0	0
	后旗一级原种场(2)	250	1	0.4
	后旗一级原种场(3)	250	0	0
深 眼 窝	一般大田	45	19	42.2
	后旗二级场	100	0	0
	前旗二级场	100	0	0
	卓资县二级场	100	1	1
紫花白	后旗一级原种场	250	1	0.4

- thol.*, 64: 1115—1118, 1974.
- [7] Uyeda, I. et al.: *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, 41: 192—203, 1975.
- [8] 内蒙古大学生物系微生物教研室: 微生物学通报, 5(1):34—35, 1978.
- [9] 马铃薯种薯生产协作组: 微生物学报, 17(1): 29—33, 1977.
- [10] Ross Noel R. et al.: *Methods in Immunodiagnosis*, 4—8, 1973.
- [11] Bereks, R.: *Phytopathol.*, 58: 1—17, 1967.
- [12] Noordam, D.: *Identification of Plant Viruses, Methods and Experiments*, 127—137, 1973.

STUDIES ON THE TECHNIQUES OF SEED-POTATO PRODUCTION

III. THE PREPARATION OF ANTISERA AGAINST POTATO VIRUS Y AND METHODS OF DIAGNOSIS

Zhang Heling Guo Suhua

(Section of Microbiology, Department of Biology, Nei Mongol University, Huhhot)

Zhang Xiuhua Ma Defang Yang Xicai

(Research Group of Plant Virus, Institute of Microbiology Academia Sinica, Beijing)

Zhao Eying

(Plant Virus Group, Agricultural

Institute of Ulanqab District, Nei Mongol

Autonomous Region, Jining)

A partially purified preparation of potato virus Y was obtained by extraction with 0.1M tris-HCl buffer, pH 7.0, containing 0.05M EDTA or 0.5 M phosphate buffer, pH 6.5, and precipitation with 4% polyethylene glycol and one or two cycles of differential centrifugation. After PEG precipitation the pellet was resuspended in 0.01M phosphate buffer containing 0.5M urea for dispersion of aggregated viruses. This resuspended medium effectively prevented virus aggregation and usually produced higher yield of virus.

This preparation was used to immunize rabbits through 3 successive intramuscular injections of virus suspension emulsified in Freund's complete adjuvant in three weeks. The antisera had titers of 1:2560—5120 as determined by means

of micro-precipitin test.

The polystyrene later particles were sensitized with purified r-globulin fraction from this antisera and the sensitivity of the test was determined. The minimum amount of 1.52—2.2 μ g/ml purified PVY can be determined by this method.

The antisera have been used for the detection of infected sproutes and leaves of potatoes by micro-precipitin and micro-agglutination tests in comparison with local-lesion hosts *S. demissum* and *P. floridana*. The micro-agglutination tests were efficient and practicable.

Prepared antisera have been used for diagnosis of virus diseases in seed-potato production in Nei Mongol Autonomous Region since 1978.