

马铃薯卷叶病毒的分离、提纯及抗血清制备

张鹤龄 马志亮 张宏孟 清陈晓峰 苑普庆 侯燕军

(内蒙古大学生物系,呼和浩特)

由马铃薯品种“小叶子×多子白”和“米拉”分离了马铃薯卷叶病毒。用 0.2M 磷酸缓冲液榨汁,滤渣经液氮冷冻,捣碎,匀浆以代替加入酶制剂,在差速离心后,用 Sephadex G-200 凝胶过滤和蔗糖密度梯度离心,从蚜虫接种的马铃薯和洋酸浆的茎叶中提纯了 PLRV。其紫外最大吸收在 260 nm,最低吸收在 240 nm, O.D 260/280 nm 比值为 1.70。提纯的病毒粒体在电镜下观察为等轴 20 面体,表面形态亚单位清晰可见。粒体平均直径为 23.98 nm。用提纯的 PLRV 免疫豚鼠和家兔,在国内首次制备出高效价特异性的 PLRV 抗血清。用对流免疫电泳测得抗血清最高效价为 1/4096。应用适当稀释的抗血清,以对流免疫电泳的方法,可直接诊断感染卷叶病的马铃薯茎叶中的 PLRV。

关键词 马铃薯卷叶病毒;分离提纯;抗血清制备;对流免疫电泳

马铃薯卷叶病毒 (Potato leafroll virus, PLRV) 引起的马铃薯黄化、矮缩、卷叶、僵化是导致马铃薯“退化”的主要病毒病害。我国南北方许多重要马铃薯栽培种均受其危害。由于 PLRV 在寄主体内含量低和严格虫传等特点,使这一病毒的研究工作长期以来曾进展缓慢。直到近十几年,才在病毒提纯、核酸成份、抗血清制备和鉴定技术方面有了较大进展^[1-4]。由于改进了病毒提纯方法,日本学者 Murayama 和 Kojima (1974) 首次制备出高效价特异性的抗血清。用环状沉淀测得效价为 1/4096,并在琼脂免疫双扩散中得到沉淀线^[5]。荷兰 Maat 等 (1978),瑞士 Gugerli (1979), Rowhani 和 Stace-Smith (1979), 以及 Tamada 等 (1980) 也制备出较高效价的 PLRV 抗血清^[4,6-8]。Casper (1977) 首次用酶联免疫吸附测定技术鉴定了马铃薯和洋酸浆中的 PLRV^[9]。其后,许多学者相继报道用 ELISA 鉴定马铃薯叶片、幼芽、休眠芽、茎、根、块茎以及洋酸浆叶、茎、根中的 PLRV^[6-8,10,11]。Roberts 和

Harrison (1979) 应用免疫吸附电镜技术诊断了马铃薯汁液中的 PLRV^[12]。抗血清制备成功使 PLRV 鉴定技术有了新的进展。

迄今国内尚未见到有关 PLRV 分离、提纯和抗血清制备方面的报告。马铃薯卷叶病毒的诊断仍然停留在田间症状观察和用桃蚜传洋酸浆等方法。我国自 1975 年以来开展的马铃薯无病毒种薯生产和抗病病毒育种均需要应用 PLRV 抗血清和有效的鉴定方法进行种薯检验、抗病毒鉴定和卷叶病害的防治。本文报告马铃薯卷叶病毒分离、提纯和抗血清制备的试验结果。

材 料 和 方 法

(一) 无霉桃蚜

将早春采自本校园内桃树上的桃蚜 (*Myzus persicae*), 饲养在室内培养的白菜或白花刺果曼陀罗上,加防虫纱罩。用无翅蚜进行传毒试验。

(二) 无病毒马铃薯“里外黄”和“紫花白”

由内蒙乌盟农科所马铃薯组提供。

本文于 1986 年 11 月 1 日收到。

(三) 感染卷叶病毒的马铃薯病株

感病的“小叶子×多子白”和“内薯3号”采自内蒙古农业科学院马铃薯研究中心实验田。“米拉”采自本校防虫温室。

(四) 蚜虫接种方法

取田间感卷叶病株枝条，去掉下部叶片，插入水中。用毛笔转上预先养在白菜或白花刺果曼陀罗上的无毒无翅桃蚜。经2—5天。再用毛笔将得毒的无翅蚜转移到两片真叶洋酸浆或无毒马铃薯幼苗上。每株5—10头蚜虫。2—5天后喷乐果杀蚜。转入防虫温室中培养。

(五) 病毒增殖

将经鉴定的分离自“米拉”和“小叶子×多子白”的病毒分离物，蚜传洋酸浆或无病毒马铃薯“里外黄”“紫花白”进行增殖。

(六) 病毒提纯

参照 Rowhani 等(1979)提取 PLRV 的方法和 Cleora 等(1983)提纯 BYDV、SWYV 的方法^[4,13]。改进之处是用 0.2 M pH 7.4 的磷酸缓冲液和冷冻的病组织研磨榨汁后，滤渣经液氮冷冻，在石臼中捣碎成粉，加入 0.1 M 磷酸缓冲液匀浆。用液氮冷冻代替加入酶。其次是在两次差速离心之后，经 Sephadex G-200 凝胶过滤，收集含病毒的高峰管部分。用蔗糖密度梯度离心进一步提纯。所用蔗糖的密度梯度为 40、30、20 和 10%。用 3×5 ml 的水平转头 (MSE-75 型离心机)，在 25,000 r/min 离心 3 小时。

(七) 抗血清制备

用提纯的马铃薯卷叶病毒作为抗原和等量的 Freund 完全佐剂乳化，免疫豚鼠。注射四次，每次注射间隔一周。第一次注射病毒 0.15 mg，第二、三次肌注 0.3 mg，第四次注射病毒量相同，但进行皮下多点注射。家兔免疫方法为每次肌注 0.8 mg 提纯 PLRV。注射前和等量不完全佐剂混合。每隔一周注射一次，共注射六次。前三次为肌肉注射，后三次为肌肉和背部皮下注射。免疫周较长。豚鼠和家兔均在最末一次注射一周后试血，两周左右采血。

(八) 抗血清效价测定

采用对流免疫电泳的方法测定抗血清效价。琼脂糖浓度为 0.75%。电泳缓冲液为 0.05 M

pH 8.6 巴比妥缓冲液。玻璃板大小为 6×10 cm，孔径 5 mm，孔距 3 mm。电泳条件：50 V，8—10 mA，电泳 1.5—2 小时。

(九) 电镜观察

将提纯的 PLRV 悬液滴加在载有经喷碳加固的火棉胶膜的铜网上，1—2 分钟。用 2% pH 6.3 的磷钨酸染色 40 秒或用醋酸双氧铀染色 1 分钟。干燥后在 H-600 电镜下观察。

试验结果

(一) 病毒分离

1983 年从田间和防虫温室中呈现卷叶症状的马铃薯“小叶子×多子白”、“米拉”和“内薯3号”病株上，用桃蚜传洋酸浆，分离了 PLRV。待洋酸浆出现病毒感染的症状后，再用桃蚜回接无病毒“里外黄”和“紫花白”观察症状，并对病毒进行鉴定。用指示植物和抗血清鉴定结果表明，分离自“小叶子×多子白”和“米拉”的 PLRV 较纯净，不混有其他病毒，而分离自“内薯3号”的分离物在“里外黄”上除引起卷叶外，还呈现条斑坏死，并提早死亡。表明感染有其他病毒。下面的病毒提纯，抗血清制备均系用分自“小叶子×多子白”和“米拉”的病毒分离物。

所分离的病毒蚜传洋酸浆后约 10 天，叶片开始微下垂；20—25 天上部叶片脉间褪绿，向后卷；新生叶片变小，褪绿，脉带；生长受抑制，植物矮小。

马铃薯初感染的症状为茎顶端节间明显缩短，缩顶，顶部叶片基部上卷，茎节膨大，叶腋生出短枝。后期有的病株在中上部叶腋处生出气生根。由洋酸浆蚜传“紫花白”和“里外黄”，15—20 天后即可出现上述症状。试验表明所分离的病毒在马铃薯和洋酸浆上引起的症状和文献上报道是一致的。

(二) 病毒提纯及电镜下形态观察

经液氮冷冻，高离子强度的磷酸缓冲

液提取,经两次 7% PEG 沉淀和差速离心所得病毒提取物,其紫外最大吸收峰在 260 nm,最低吸收在 240 nm O.D 260/280 nm 比值为 1.52—1.54。电镜观察表明差速离心后病毒粒体聚集程度尚不高,粒体不够清晰、仍混有较多的植物蛋白等颗粒。但将差速离心后的提取物经 Sepha-

dex G-200 凝胶过滤,则病毒提取物的 O. D 260/280 nm 比值便提高到 1.61—1.70。用 2% PTA 负染,在电镜下放大 4—5 万倍观察,病毒粒体为等轴 20 面体,大小比较均匀,表面形态亚单位清晰可见(图 1),进一步经蔗糖密度梯度离心之后,病毒粒体聚集程度增高,且呈均匀分散,纯度进

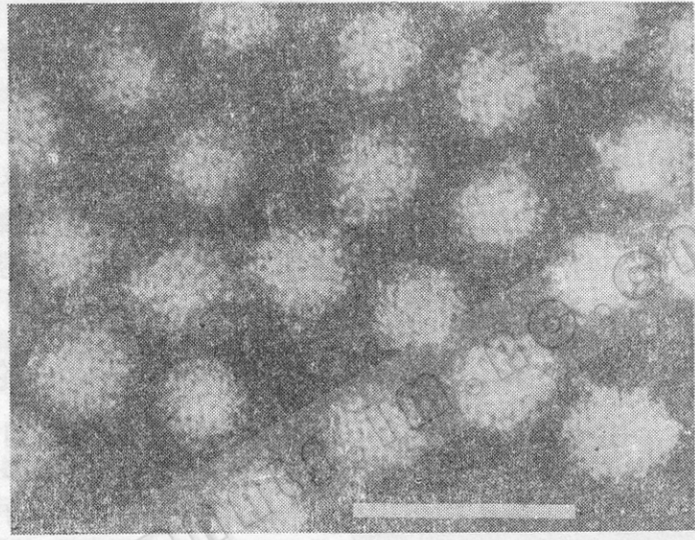


图 1 经 Sephadex G-200 凝胶过滤提纯的 PLRV 粒体电镜照片,PTA 负染(标尺为 50 nm)

Fig. 1 PLRV particles purified by filtration through sephadex G-200 and negatively stained with phosphotungstic acid
(The bar represents 50 nm)

一步提高。

在双筒解剖镜下,用游标卡尺量取电镜底片上的 PLRV 粒体直径,共测量 300 个粒体,其平均直径为 23.98 ± 1.2 nm。多数粒体直径在 22.6—25 nm 之间,其频率分布比较集中,其中直径为 23.6—24.5 nm 的粒体占病毒粒体总数的 54.34% (图 2)。

(三) 抗血清制备和效价测定

第一次用提纯的“小叶子×多子白”的病毒分离物,O.D 260/280 nm 为 1.7,以肌肉注射和皮下注射免疫雄性豚鼠。每次注射病毒量为 0.3 mg,免疫周期为四周。取豚鼠的抗血清,用对流免疫电泳测定效价

为 1/1280。抗血清和健康马铃薯叶片汁液产生沉淀线的最高稀释度仅为 1/2,和正常洋酸浆汁液不反应。

第二次用经蔗糖密度梯度离心提纯的同样病毒分离物,免疫家兔。经 6 次肌肉和皮下注射,每次注射抗原量为 0.8mg,免疫周期为 6 周。用对流免疫电泳测得抗血清效价为 1/4096 (图 3)。抗血清和健康马铃薯叶片汁液反应的稀释度 $<1/2$,和正常洋酸浆汁液不反应。

(四) 抗血清特异性鉴别

将制备的 PLRV 抗血清稀释至 1/2,加入中央孔,周围孔加入不同抗原,进行免

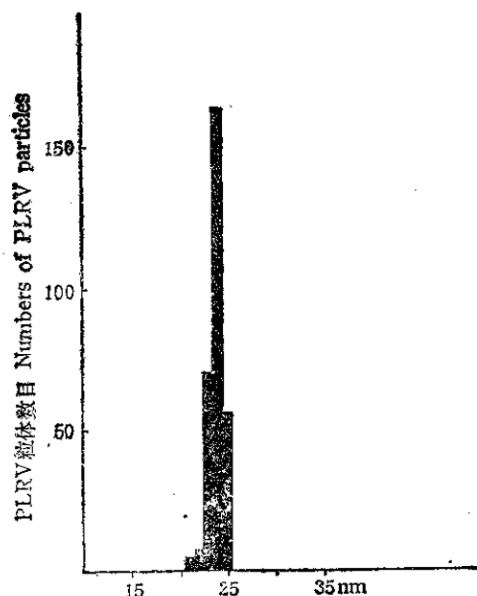


图2 马铃薯卷叶病毒粒体直径频率分布直方图

Fig. 2 Histogram of particle diameter distribution of PLRV



图3 用对流免疫电泳测定 PLRV 抗血清效价

第一排孔：采自家兔的 PLRV 抗血清的不同稀释浓度，自左向右分别为 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/4096。

第二排孔：提纯的 PLRV 抗原 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

Fig. 3 Counterimmunoelectrophoresis between antisera to PLRV and purified PLRV

The wells of first row: Antiserum to PLRV at dilutions 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/4096, from left to the right.

The wells of second row: purified PLRV antigen 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

疫琼脂双扩散，所制备的抗血清和提纯的 PLRV 能产生清晰沉淀线，和 BYDV 中的 RPV 和 DAV 株系，和 TMV，以及健康马铃薯茎和洋酸浆茎汁液均未产生沉淀线。

(五) 用对流免疫电泳诊断马铃薯茎叶中的 PLRV

为探讨对流免疫电泳用于茎叶中马铃薯卷叶病毒诊断的可能性，我们将制备的 PLRV 抗血清，用对流免疫电泳的方法，检测了桃蚜接种后有明显卷叶症状的马铃薯“里外黄”茎叶中的 PLRV。采样量为 2—4g，加 1—2 ml 0.1 M PB (pH 7.6) 研磨，提取汁液，再经 8000 r/min 离心 20 分钟，取上清进行测定，结果表明，和含病毒量较高的“里外黄”病株汁液反应，能产生可见沉淀线的 PLRV 抗血清最高稀释度为 1/128。和健康马铃薯汁液反应时，仅为 1/2—1/4。证明用适当稀释的 PLRV 抗血清，用对流免疫电泳的方法，可直接诊断马铃薯茎叶中的 PLRV。

讨 论

1. 尽管马铃薯卷叶病毒是一个已知的病毒，但国内关于这一病毒的基础研究甚少。我们由我国南方广泛栽培的轻度呈现卷叶症状的马铃薯“米拉”和严重感染卷叶病的“小叶子×多子白”分离到马铃薯卷叶病毒。分离物在无病毒“里外黄”和“紫花白”上，均可产生典型卷叶症状。病毒分离物经电镜下形态观察和粒体大小测定，表明和文献报道的 PLRV 基本一致^[4]。

2. 参照 Rowhani 等提纯 PLRV 的方法^[4]和 Cleora 等提纯 BYDV 及 BWYV 的方法^[13]，采用两项改进步骤提纯了 PLRV。一是将病组织粗提取后的滤渣，经液氮冷冻，捣碎后用 0.2 M 磷酸缓冲液匀浆抽提，回收病毒，代替使用酶制剂。二是在差速离心之后再经葡聚糖凝胶过滤，使病毒提取物的 O.D 260/280 nm 的比值提高，且电镜检查证明凝胶过滤后能聚集较多的较纯净的病毒粒体。再进一

步经过蔗糖密度梯度离心, 可获得提纯的 PLRV。

3. 用提纯的 PLRV 免疫豚鼠和家兔, 在国内首次制备出 PLRV 高效价抗血清。用对流免疫电泳测得抗血清效价达 $1/4096$ 。特异性反应鉴别试验表明, 所制备的抗血清和大麦黄矮病毒的缢管蚜株系和管蚜株系、TMV 以及健康的马铃薯和洋酸浆茎的汁液均不反应。1974 年日本 Murayama 等首次成功制备出高效价 PLRV 抗血清, 用环状沉淀测得抗血清最高效价为 $1/4096$ ^[4], 但文献中并未提供最高效价的照片。环状沉淀中抗血清用量较多, 而且反应终点常不易判断, 也不便照相记录, 而免疫琼脂双扩散的灵敏度又不高。我们在本试验中采用的对流免疫电泳, 其灵敏度比琼脂双扩散提高数十倍, 所产生的沉淀线清晰, 终点易于判断。

4. Rowhani 等报道, 在琼脂免疫双扩散中, PLRV 抗血清只能和提纯的 PLRV 抗原反应产生可见沉淀线^[4]。马铃薯茎叶汁液中的 PLRV 不能用普通琼脂双扩散测出, 而只能用较灵敏的血清学方法如 ELISA 进行测定。我们的试验证明, 快

速、灵敏的对流免疫电泳, 不仅可成功地用于 PLRV 抗血清效价测定, 同时, 用适当稀释的抗血清, 也可用于马铃薯茎叶中 PLRV 的直接诊断。由于对流免疫电泳比 ELISA 简易、迅速, 结果观察直观可靠, 且样品和抗血清用量少。这一方法可能成为诊断那些寄主体内含量低的黄症病毒组成员的简单有效的方法。

参 考 文 献

- [1] Aria, K. et al.: *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, 35: 10—15, 1969.
- [2] Sarkar, S.: *Virology*, 770: 265—273, 1975.
- [3] Sarkar, S.: *Abstract 3rd Congress Plant Pathol.*, 54: 1, 1978.
- [4] Rowhani, A. et al.: *Virology*, 93: 45—54, 1979.
- [5] Murayama, D. et al.: *Proc. Japan Acad.*, 50: 322—327, 1974.
- [6] Maat, D. Z. et al.: *Neth. J. Pl. Path.*, 84: 149—156, 1978.
- [7] Gugerli, P.: *Phytopath. Z.*, 96: 97—107, 1979.
- [8] Tamada, T. et al.: *Ann. Appl. Biol.*, 95: 209—219, 1980.
- [9] Casper, R.: *Phytopath. Z.*, 90: 364—368, 1977.
- [10] Gugerli, P. et al.: *Potato Res.*, 23: 353—359, 1980.
- [11] Tamada, T. et al.: *Ann. Appl. Biol.*, 96: 67—78, 1980.
- [12] Roberts, I. M. et al.: *ibid.*, 93: 289—297, 1979.
- [13] Cleto, J. et al.: *Phytopathology*, 73: 755—759, 1983.

ISOLATION, PURIFICATION AND ANTISERUM PREPARATION OF POTATO LEAFROLL VIRUS

Zhang Heling Ma Zhiliang Zhang Hong Meng Qing Cheng Xiaofeng
Yuan Puqing Hou Yanjun

(Department of Biology, Inner Mongolia University, Huhhot)

PLRV was isolated from potato varieties, B76-16 \times 292-20 and Mira and purified by differential centrifugation, followed by filtration through Sephadex G-200 column and density gradient centrifugation, using infected virus-free potato plants and *Physalis floridana* as sources of virus. The uniform isometric particles with diameter of 23.98 nm were observed. The antiserum against isolated PLRV with the titer of 1/4096 in counterimmunoelectrophoresis was prepared. The

PLRV in infected potato leaf extracts were detected by counterimmunoelectrophoresis. This is the first report on isolation, purification and antiserum preparation of potato leafroll virus in China.

Key words

Potato leafroll virus; Isolation and purification; Antiserum preparation; Counterimmunoelectrophoresis