

烟草花叶病毒 (TMV) 和马铃薯 X 病毒 (PVX) 的 提纯及抗血清的制备

吕典秋, 李学湛, 何云霞, 白艳菊, 张儒喜, 朱 财

(黑龙江省农科院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086)

摘要 在温室内将提纯的 TMV 和 PVX 病毒, 通过摩擦接种在普通烟 (*Nicotiana tabacum* L.) 上做为繁殖植物。通过 PEG 沉淀和差速离心, 获得提纯病毒。病毒含量分别为 21.42mg/100g 鲜重和 24.50mg/100g 鲜重。在紫外分光灯下测定 OD 值, 分别在 248nm (TMV) 和 246nm (PVX) 为最低, 260nm 为最高。消光系数 OD 260/280 分别为 1.20 和 1.22。提纯抗原进行回接试验, 指示植物产生明显症状, 用 Freund 佐剂分三次肌肉免疫家兔, 所得抗血清效价为 1:2048, 然后利用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 提取球蛋白, 并利用 HRP 进行酶标记, 制备出的抗血清现已应用于生产。

关键词: 烟草花叶病毒 (TMV); 马铃薯 X 病毒 (PVX); 提纯; 抗血清制备; 球蛋白; 酶标

中图分类号: S532 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0092 (2000) 04-0212-03

1 前言

马铃薯病毒病是引起马铃薯退化的主要原因, 而 TMV 和 PVX 是较常见的二种病毒, 尤其 TMV 病毒传播非常广泛, 它可通过根、茎、残物、土壤和吸烟人的手等传播, 而且体外保毒、稀释限点、致病性都很强。在国外, 很多国家都不把它做为马铃薯脱毒薯的检测范畴。在我们的生产实践中, 常常发现感染 TMV 的马铃薯, 这严重影响种薯质量和产量。PVX 是马铃薯普通花叶病毒, 是发现最早、传播最广的一种马铃薯病毒 (Smith, 1931)。其症状较轻或潜隐, 一般可减产 10% 左右。但当它和 PVX 复合感染时常可造成大幅度减产, 很多品种均感染有轻花叶病毒。所以, 利用血清学方法鉴定筛选无主要病毒试管苗及脱毒种薯是非常重要的, 而对于高质量、高效价、专一性强的抗血清及酶标抗体是提高马铃薯种薯质量的关键。

本试验通过总结前人的经验, 结合我们当前国内高质量、专业化强的血清缺乏的实际情况, 成功地制备了优质的抗血清及酶标抗体, 为生产和科研服务。

收稿日期: 2000-05-20

2 材料与方法

2.1 病毒的繁殖

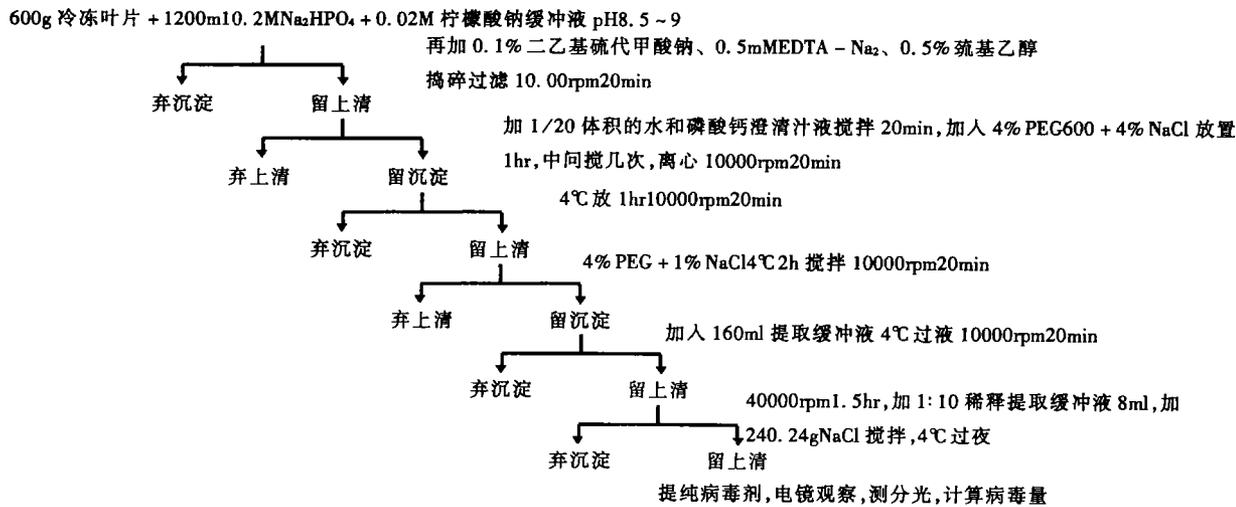
TMV 的繁殖: 我们将保存的 TMV 干粉 (由崔荣昌先生提供) 以摩擦方式接种在 20 盆普通烟“黄苗榆 (*Nicotiana tabacum* L.) 上, 接种前在黑暗中放置 10h, 然后, 施足 N 肥为主的复合肥, 接种后表现花叶, 25d 后收集叶片, 去叶柄和主脉, 称重 600g 放于 -20°C 冰箱冷冻, 以待提纯。

PVX 病毒通过含 X 和 Y 病毒的皱缩花叶的“红纹白”品种经过千日红 (*Gomphrena globosa*) 挑单斑分离和白花刺果蔓陀萝 (*Datura stramonium*) 摩擦接种, 提纯出 PVX 病毒, 然后摩擦接种在 20 盆普通烟“黄苗榆”上, 接种前在黑暗中处理 10h, 然后, 施足 N 肥, 在 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$, 光照 $3000\sim 4000\text{lx}$, 20d 后收集叶片, 去主脉和叶柄, 称重 500g, 贮于 -20°C 冷冻, 待提纯。

2.2 病毒的提纯

TMV 的提纯主要参考 S.M. Paul Khurana 等人的方法, 略有改动。PVX 的提纯方法和 TMV 病毒的提纯大体一致, 只是提取缓冲液用 $0.1\times$ PBS。

TMV 提纯方法



2.3 提纯病毒的回接试验

将提纯的病毒稀释 20 倍, 摩擦接种到指示植物心叶烟 (TMV) (*N. Ghutinosa*) 上和千日红 (PVX) (*G. Globosa*) 上, 观察是否有局部侵染。

2.4 病毒的生物学鉴定

2.4.1 酶联免疫吸附反应

用已有的抗血清和试剂盒 (CIP 提供), 利用 DAS-ELISA 方法, 检测已系统花叶发病的普通烟 (TMV 引起) 和心叶烟 (由 PVX 引起), 经检测除分别含有 TMV 和 PVX 外, 是否含有 PLRV、PVY、PVS、PVM 等病毒。

2.4.2 利用电镜观察

将提纯病毒稀释 20 倍。取 1 滴滴在铜网上, 2min 后用滤纸吸干, 再滴一滴 2% 钨酸水溶液, 1min 后用滤纸吸干, 自然干燥后, 在电镜下观察病毒粒体形状。

2.5 抗血清的制备

在兔免疫之前, 于耳静脉上少量取血, 做为健康血清, 与免疫后血清对照。

已提纯的 TMV、PVX 病毒分别注射到 2.5kg 以上健康的公兔上, 采取肌肉免疫方法, 用福氏 (Freund) 佐剂与抗原 1:1 混合乳化, 每周注射 1 次, 连续注射 3 次, 注射量为 2ml、2ml、3ml。注射部位为兔两后腿外侧臂肌群, 左右各半, 最后一次注射 7d 后开始取血, 取血前一天晚上停食, 只能少量饮水 (可避免血清混浊)。分别采取颈动脉杀兔取血 (TMV) 和耳颈动脉取血 (PVX)。其中耳颈动脉分别在最后注射 7d 和 12d 后取。把抽取

的抗血清放入灭菌容器 (小烧杯) 中, 摆成斜面 30° 角, 在 4℃ 下放 1h, 使红血球沉淀凝固, 取上面血浆 (橙黄色), 即为抗血清。

2.6 ELISA 试剂的制备

免疫球蛋白 (IgG) 的制备, 用硫酸铵沉淀提取 IgG, 进一步用 DEAE 纤维素离子交换层析提纯。把两种抗血清各 1ml, 分别加 9ml 蒸馏水, 加 10ml 饱和 (NH₄)₂SO₄ 溶液, 室温下放 60min, 然后 10000rpm 10min, 弃上清、留沉淀, 再溶于 1/2 离子强度的 PBS, 并对 1/2PB500ml 透析过夜, 然后再用 3~5mIDE₅₂ 纤维柱过滤, 用 1/2 离子强度的 PBS 缓冲液平衡 DE₅₂ 纤维柱, 并用之洗脱, 再在 280nm 下监视洗脱液。

利用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记 IgG。方法为: 10mg 辣根过氧化物酶溶于 0.2m 11.25% 戊二醛, 室温下放置 18hrs 用 Sephadex 柱洗脱, 再在 4℃ 下用蔗糖浓缩为 1ml, 0.15MNaCl 溶液中溶 IgG 1.5ml, 再加 0.1ml pH9.5 碳酸盐缓冲液, 4℃ 放 24h, 再加 0.1ml 0.2ML-赖氨酸和等量饱和 (NH₄)₂SO₄, 离心, 用 1/2 饱和度的 (NH₄)₂SO₄ 沉淀 2 次, 再将沉淀溶液于 1ml pH7.4 0.02MPBS 中, 透析 24h, 测 OD280nm。

2.7 利用 DAS-ELISA 进行免疫球蛋白 IgG 及其酶标工作浓度的测定

- (1) 将提纯的 IgG 和 IgG-G 稀释成 1/50、1/100、1/500、1/1000、1/1500、1/2000、1/2500。
- (2) 用已知感病植株叶片做为检测阳性样品。
- (3) 在 ELISA 平板上的分布见图 3, 没用的

边缘孔应用每一步的缓冲液滴加。

3 结果

3.1 病毒的提纯

经提纯后的病毒制剂, 在 754 紫外分光光度计下测定 220~290nm 下的 OD 值, 其吸收曲线如图 1, 其中最高吸收峰在 260nm。TMV 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.20, PVX 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.22。TMV 和 PVX 的消光吸数 E_{0.1%}^{260nm} 分别为 3.1 和 2.97。病毒提纯量为 8ml, 稀释 20 倍后测 OD 值, 所获得病毒量分别为:

$$\text{TMV} \frac{2.49}{3.1} \times 8 = 128.5\text{mg}/600\text{g}$$

$$\text{PVX} \frac{2.14}{2.97} \times 8 = 122.7\text{mg}/500\text{g}$$

表 1 TMV 血清效价的测定

处 理		结 果												
免疫抗血清	稀释倍数	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	
	病毒粗提样	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	±	
	健株粗提样	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
未免疫健康血清	稀释倍数				1/2				1/4				1/8	
	病毒粗提样				-				-				-	
	健株粗提样				-				-				-	

注: +++ 表示立刻有明显絮状沉淀; ++ 表示有明显絮状沉淀; +4℃ 过夜后有絮状沉淀; ±4℃ 过夜后有轻微絮状沉淀; -4℃ 过夜后无明显絮状沉淀。

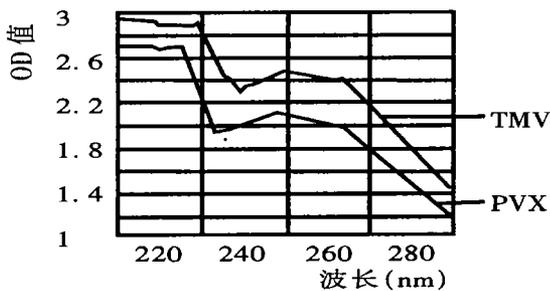


图 1 提纯病毒的紫外吸收曲线

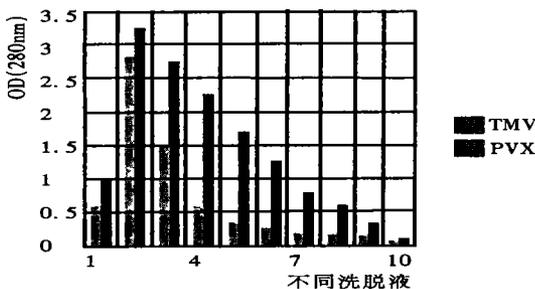


图 2 在 280nm 下不同洗脱液的 OD 值

3.2 提纯病毒的回接试验

将 TMV 提纯病毒稀释 20 倍, 接种在心叶烟 (*Nicotiana glatinosa*) 上产生局部环斑, PVX 在千日红上接种 5~7d, 在接种叶片上出现紫环枯斑。

3.3 病毒的生物学鉴定

利用电镜在 7 万倍下观察, 可看到 TMV 的杆状病毒粒子, PVX 的线状毒粒子。利用 CIP 提供的试剂盒和现有的抗血清通过 DAS-ELISA 检测, 均不含有 PVY、PVS、PVM、PLRV 病毒, 分别只含有 TMV 和 PVX 病毒。

3.4 抗血清效价的测定

利用倍数稀释法进行测定 TMV 抗血清效价测定结果如表 1。

TMV 的抗血清效价为 1:2048, PVX 抗血清效价和 TMV 相似, 也为 1:2048。

3.5 球蛋白的提取及酶标记

用硫酸铵沉淀提取的 IgG, 再用 DEAE 纤维素离子交换层析提纯并洗脱后, 在 280nm 下监测洗脱液, 用小管接, 每管接 1.5ml, 不同洗脱液的值见图 2。取 OD > 0.4 的洗脱液, 1ml 血清所得 TMV 的 IgG 量为 6.15ml, PVX 的 IgG 量为 12.9mg。

IgG 浓度	t												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1/50 A													
1/100 B			+	+	+	+	+	-					
1/500 C			+	+	+	+	+	-					
1/1000 D			+	+	+	+	+	-					
1/1500 E			+	+	+	+	+	-					
1/2000 F			+	+	+	+	+	-					
1/2000 G			-	-	-	-	-	-					
H													

图 3 TMV、PVX 的球蛋白和酶标工作浓度的测定 (在聚乙烯酶标板上的分部) IgG-C 浓度梯度

注: + 表示显阳性反应; - 表示显阴性反应或反应非常不明显; t 为缓冲液。

闽南山区脱毒马铃薯原原种夏繁试验初报

叶贻勋, 沈清景, 凌永胜

(福建省泉州市农业科学研究所, 晋江 362212)

摘要 在闽南海拔高度 1000m 山区进行脱毒马铃薯原原种夏繁试验, 结果表明: 夏繁成功的关键在于适当早播, 调节结薯期, 避过 7 月中下旬的高温, 而播种期掌握在 4 月上中旬、播种量不少于 15 万粒/hm² 和施足基肥、早施追肥是夏繁高产的主要技术措施。

关键词: 马铃薯; 脱毒原原种; 夏繁; 闽南

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1001-0092 (2000) 04-0215-03

1 前言

泉州市地处福建省东南沿海, 位于北回归线北侧, 东南和中部为南亚热带, 西北部为中亚热带, 光热资源丰富, 全年气候温暖。随着冬、春种脱毒马铃薯面积的迅速扩大, 加速脱毒原原种繁育, 满足农户对脱毒种薯之需, 已成为脱毒马铃薯推广应用的关键因素。由于闽南夏季天气炎热, 最热月 (7

收稿日期: 1999-12-21

月份) 平均气温 27~29℃, 极端最高气温 39.3℃, 冬、春季收获的脱毒原原种与原种一般要贮藏到秋季气温下降后才能播种, 这段贮藏期间正值夏季高温季节, 种薯养分消耗大, 种性退化快, 薯块较易腐烂, 贮藏条件要求高。如能在夏季利用山区高海拔地区繁育一季种薯, 既可解决种薯夏贮难点, 又可加快原种世代繁殖, 增加种薯总量。1998 年在福建德化国宝夏繁 1hm² 取得了成功, 一级原种繁育田平均产量 528kg/667m², 二级原种繁育田平均

球蛋白 IgG 和酶标抗体工作和浓度的测定:

利用 DAS-ELISA 方法在 96 孔聚乙烯板上进行测定, 测定结果如图 3。可见 IgG 的工作浓度为 1:1500, 酶标抗体工作浓度为 1:2000。

4 结语

4.1 关于试验材料的选择

我们选取的是接种烟草的叶片, 去掉叶柄和主脉, 因为这些部分含水多而病毒极少。接种在普通烟后 25d 采集叶片, 此时病毒在烟草中含量最高。另外在采集叶片前, 将烟草放在黑暗中 10h, 这样可以减少色素及杂质的影响。

4.2 病毒的提纯

我们将病叶放在 -20℃ 下冰冻 4d, 这样病叶易粉碎, 并有利于抑制寄主体内氧化酶的活性。在提纯时, 我们采取了 PEG 沉淀和差速离心相结合的方法, 并加入了还原剂巯基乙醇和 EDTA-Na₂,

可除去某些活化氧化酶时所需的铜离子, 同是可抑制多聚酚氧化酶。加入螯合剂 EDTA-Na₂ 和二乙基硫代甲酸钠, 可整合 Ca²⁺ 和 Mg²⁺, 使核糖处于不稳定状态, 以便除去。

TMV 和 PVX 在受侵叶片中含量很大, 而且病毒很稳定, 易于提纯, 但若想达到较理想的结果也是很难的, 因为杆状粒体易于首尾相接, 粒体长度往往受缓冲液的影响, 利用上述方法对两种病毒的提纯达到了满意的效果。

我们把提纯的病毒回接到指示植物上, 产生明显的症状, 证明所提纯的病毒具有侵染力。

4.3 球蛋白的提取及酶标记

在提取 r-IgG 球蛋白时, 利用硫酸铵沉淀提取 IgG, 然后通过透析脱盐, 再通过 DE₅₂ 纤维素柱过滤, 把血清球蛋白中 r-球蛋白分离出来。在进行酶标记时, 用戊二醛二步法进行酶标记, 也取得了较高工作浓度的酶标抗体。