

MIANYIMEI JISHU
YUANLI HE YINGYONG

免疫酶技术

原理和应用

朱培坤 编著



山东科学技术出版社
www.lkj.com.cn

免疫酶技术 原理和应用

朱培坤 编著



山东科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

免疫酶技术原理和应用/朱培坤编著. —济南:山东科学技术出版社,2008

ISBN 978 - 7 - 5331 - 4506 - 4

I. 免… II. 朱… III. 酶—免疫技术 IV. Q55 Q939.91

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 142232 号

免疫酶技术原理和应用

朱培坤 编著

出版者:山东科学技术出版社

地址:济南市玉函路 16 号

邮编:250002 电话:(0531)82098088

网址:www.lkj.com.cn

电子邮件:sdkj@sdpress.com.cn

发行者:山东科学技术出版社

地址:济南市玉函路 16 号

邮编:250002 电话:(0531)82098071

印刷者:山东新华印刷厂临沂厂

地址:临沂高新技术产业开发区

邮编:271600 电话:(0539)2925608

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:16.5

版次:2008 年 12 月第 1 版第 1 次印刷

ISBN 978 - 7 - 5331 - 4506 - 4

定价:80.00 元

朱培坤



1978~1986 年任复旦大学生物学系植物病毒研究室助教。

1986 年底赴美国明尼苏达大学进行访问研究，后任美国明尼苏达大学医学院 RE-SEARCH FELLOW (研究员)。

曾任美国美亚联合生物技术公司资深科学家。

1999 年赴香港科技大学生物学系进行访问研究。

2001~2003 年在深圳筹建深圳市百绿生物科技有限公司；2003 年 4 月作为发起人注册建立深圳市百绿生物科技有限公司，任董事长兼首席科学家。

2007 年 9 月作为发起人注册建立深圳市百绿生物染色体杂交研究所，任所长兼首席科学家。

首创多项免疫化学测定技术，例如酶标醋酸纤维膜免疫电泳技术和酶标试纸等，并在《科学通报》和相关学报上发表几十篇学术文章。1983 年出版我国第一本免疫酶技术专著——《免疫酶技术》，2008 年在《免疫酶技术》的基础上修订出版《免疫酶技术原理和应用》。

发明植物染色体杂交技术，至今仍是全球唯一掌握该技术的人。应用染色体杂交技术，开启高等植物数量基因改造的大门，创造出豌豆—玉米、小麦—玉米、大米草—玉米、玉米—小麦、高粱—水稻、芝麻—油菜和大蕉—香蕉等一系列新类型植物。相继发表《多基因工程试论》、《高等植物纲间杂交的探索》、《植物遗传工程转化学初探》和《高等植物的第三类杂交》等学术文章。

1996 年 12 月被中外名人辞典编委会收录在《中外名人辞典》。

原 序

新技术、新方法、新概念和各学科相互渗透是当前科学发展的主流。这在生物科学中更加鲜明与突出。免疫化学测定技术的发展，特别是免疫酶技术的发展，对有关抗原或抗体进行检测与定位既灵敏又简便。我们要了解病毒和研究病毒病，尤其要控制病毒病，其前提是对病毒进行正确的鉴定诊断。根据有关方面的研究，在感染病毒的植物中，约有 15% 是隐症。如果没有正确有效的鉴定诊断，就无法进行控制。即使是症状明显的发病植物，引起近似病毒病症状的原因也很多，尚无适当的技术方法，误诊在所难免，从而不可能取得“对症下药”的效果。另外，从一般生物材料的鉴定来说，有化学、物理学等方法。但是，如果测定材料是微量的，传统的化学方法便无能为力。放射化学追踪技术虽然可以解决一般化学方法不能解决的问题，但是在使用时放射性元素对工作人员有辐射危险性，并且同位素试剂比较昂贵，当前难以普遍推广应用。而免疫技术特别是免疫酶技术，既高度灵敏，又是非放射性的，它能够实现在组织细胞内对有关抗原或抗体的定位，也能对溶液中的有关抗原进行定量测定。免疫酶技术的灵敏度与放射化学测定相仿，但试剂便宜，操作简便，使用安全，它既能用于细胞内亚显微结构的定位，又能大规模检测样品，为生物科学的有关研究开辟了一条新的途径。

《免疫酶技术》是朱培坤同志根据自己的工作实践体会，并参阅了国内外大量资料编写而成。这本书可以使读者较为全面地了解与掌握免疫酶技术。我想这本书的出版定能为广大读者服务，为开展免疫酶技术的研究和应用起促进作用。

王鸣岐
1982 年 10 月

前 言

免疫酶技术是一项先进的免疫化学测定技术，自 20 世纪 60 年中期间世 70 年代初发展以来，引起了许多学者和有关技术人员的重视。这是因为免疫酶技术有其独特的优点，主要表现在以下几个方面：

专一性强。抗原与抗体的免疫反应是专一反应，而免疫酶技术以免疫反应为基础，所检测的对象是抗原（或抗体），使用的抗体除标记了酶以外，与普通抗体的免疫反应特性并无多大差别。

灵敏度高。由于抗体联结上了酶，因此，借助于酶与底物的显色反应，显示抗原与抗体的结合，大大提高了检测的灵敏性，使检测水平接近放射免疫测定法。

样品易保存。经过酶反应显示的有色产物大多比较稳定，因此有利于样品的保存。

结果易观察。对检测结果既可用肉眼观察，又可用显微镜观察，也可以用分光光度计进行比色测定，还可用电子显微镜观察。这是因为某些酶反应产物能使电子密度发生改变，从而引起被检物的显示。

可以定量测定。溶液中的抗原物质，应用酶免疫吸附技术进行比色测定，依据光密度值的变化，可以定量。预计用细胞分光光度计可对组织内的抗原进行免疫酶技术的定量测定。

可以大规模测定样品。如有成千上万份样品需要进行检测，免疫酶技术都能在较短时间内完成。

仪器和试剂简单。对免疫酶技术来说，不需要荧光显微镜，也不需要测试放射性的特殊仪器，所用仪器及试剂均属一般性仪器与试剂，普通实验室及生产应用单位均易购置。

此外,各项免疫酶技术,操作比较简便,工作人员的操作安全性较高。

如果将抗原联结了酶,那么,用所得到的酶标记抗原就可以检测相应的抗体。

20世纪60年代末70年代初,Sternberger, L. A.等先后报道了非标记免疫酶的技术方法,即通常所称的“抗体搭桥”法和PAP染色法。非标记免疫酶技术对抗原或抗体的检测与定位,无论是用光学显微镜还是用电子显微镜观察,灵敏度均很高,据估计,要比免疫荧光反应灵敏100~1000倍。非标记免疫酶技术可以避免标记处理时给酶与抗体的活性所带来的损害,以及标记抗体与非标记抗体对抗原竞争所带来的干扰。因此,尽管非标记免疫酶技术方法比较繁琐,但是使用它的人越来越多。

20世纪80年代和90年代,免疫酶技术发展出现了许多与生物素-亲和素、电化学、光学和DNA聚合酶链式反应相结合的新技术,出现了与分子生物学PCR技术交叉联合的趋势,从而扩大了免疫酶技术的使用范围,进一步提高了检测的灵敏度,提高了在短时间内检测大量样品的能力。

另外,免疫酶技术在电子显微镜技术中的应用,形成免疫酶电子显微镜技术。可以应用免疫酶技术对动植物组织内的有关抗原物质予以定位,然后用电子显微镜在亚显微结构的水平上,对有关抗原物质以及抗原与细胞亚显微结构的关系进行观察与研究,这项免疫酶电镜技术的工作内容同样有必要向读者作些介绍。

本书将免疫酶标技术、非标记免疫酶技术和免疫酶电镜技术统称为免疫酶技术。经过许多科学家和技术人员的努力,免疫酶技术的三大类技术又各自衍生出许多分支,其中有免疫酶标固相载体方法的酶联免疫吸附测定法,即ELISA和dot-ELISA;具有吸附能力的小球状物载体方法,即DASS等;免疫酶标组织化学方法;非标记免疫酶的“抗体搭桥”法和PAP法以及免疫酶标电镜技术和非标记免疫酶电镜技术等。这些技术可以根据不同的材料和不同的研究课题予以采用。

在免疫酶技术诞生不久,单克隆抗体技术也紧随其后问世。单克隆抗体的出现使人类对蛋白质和抗原决定簇的研究进入分子生物学水平,使人类对病原体的检测和分析达到前所未有的深度,从而最终得以确定艾滋病。所以在介绍免疫酶技术的同时,也介绍单克隆抗体的制备和应用,使免疫酶技术的内容更加充分和完备,使免疫酶技术的应用具有更坚实的专一性基础。

任何新兴的先进的科学技术,总有其自身存在的基础。免疫酶技术成功应用的基础主要取决于:①抗原的纯化以及纯化抗原的量。只有获得相当数量的纯化抗原,才有可能制备高效价的专一性抗血清和获得理想的免疫球蛋白。

②制备出高效价的优质的抗体是免疫酶技术最重要的基础工作,本书向读者详尽地介绍了普通抗体和单克隆抗体的制备。③酶的纯化及其数量。只有获得一定数量的纯化酶才能用于抗体(或抗原)的标记,或者在非标记免疫酶技术中作为抗原使用。④使酶与抗体(或抗原)交联起来的方法与条件,直接影响酶标抗体(或抗原)的活性,从而影响免疫酶技术的使用。⑤在免疫酶技术的固相载体方法中,固相载体的选择是否合适,会影响实验结果;在免疫酶技术的组织化学方法中,则要注意消除组织中内源酶染色与非特异性染色的干扰,否则会使实验达不到理想的效果。

上述诸因素虽然非常重要,但也不能忽略其他的一些实验条件,尤其是对连续步骤处理的免疫酶技术,不容许任何环节的脱节。本书在介绍免疫酶技术的应用时,为了使读者能将免疫酶技术较快地应用到自己的工作中去,特别注意每项实验处理的连贯性。

另外,当前研究领域的互相渗透,促进了各项技术之间密切相关的联系,就免疫酶技术的应用来说,还牵涉到一些常规的生物化学实验技术、电子显微镜技术与组织制片技术等,这些相关的实验技术有些读者或许已经了解,但是,在使用一些不常用的技术时,对于一些还不了解这些技术的读者来说,可能会感到查阅文献的不便。为此,本书特选择某些相关的常规实验技术作为参考内容,这对掌握和应用免疫酶技术是十分有益的。

虽然本书将植物病毒作为介绍免疫酶技术的实验材料,但是这些理论与实验方法同样适用于其他学科。这是因为,理论上说,只要有抗原抗体反应的实验,均能使用免疫酶技术。免疫酶技术的应用范围十分广泛,不管是人、动物、植物,还是微生物,只要存在可以作为抗原的物质,就能采用免疫酶技术进行研究和观察。因此,对于医生、化验师、植保人员、检疫人员、兽医和微生物工作者以及对于那些从事生物化学、医学、药理学、细胞学、植物生理学、植物病理学、植物病毒学、动物生理学、动物病理学、微生物学和遗传学等有关医药、农学、生物学的研究人员、大中专院校有关学科的师生,尤其是进行科学研究与教学实验的生命科学领域的研究生均有必要了解和掌握免疫酶技术。

1983年笔者出版了《免疫酶技术》,25年过去了,免疫酶技术与其他新兴技术一样,有了很大的发展。现在许多学科的实验室广泛采用免疫酶技术,使免疫酶技术的发展有了扎实的基础。可以这样说,凡是原来可用免疫荧光技术或放射免疫技术测定的工作,几乎均可使用免疫酶技术。加之免疫酶技术在其他技术的配合下不断地更新与进步,经常增添新内容,从而在检测灵敏度、测定样品数量和测定方法简便化等方面,均取得了重大进展。因此笔者深感有

必要在 1983 年《免疫酶技术》的基础上增加新发展的内容,使《免疫酶技术》能与时俱进。本书和 1983 年版的《免疫酶技术》相比较,无论是深度还是广度,都有明显发展,反映了免疫酶技术在这 20 多年中的进展。当然任何技术不管如何发展,都有其基础性的内核。可以说,本书介绍的内容是该领域从事免疫酶技术具体操作的基础性知识,对从事实验操作者特别有用。

1978 年笔者进入复旦大学生物学系植物病毒研究室开始植物病毒免疫化学的科学研究,接触并从事免疫酶技术的工作,已有 30 多年了。本书是笔者 30 年的工作总结。从改变高等植物的遗传结构实现植物抗病毒、抗病菌的目标出发,笔者发明了植物染色体杂交技术,今后的漫长岁月,笔者的主要精力将从事高等植物的数量基因改造。

进入 21 世纪后,曾经出现危害人类的非典型性肺炎传染病,后来在鸟类、家禽中出现的禽流感疾病,对人类的健康造成很大的危害。免疫酶技术在诊断、检测、防治与研究这类传染病中是可以大有作为的。本书出版后,希望能对生命科学与动植物疾病的检测、防治与研究贡献更大的力量。

朱培坤

2008 年 8 月于深圳市百绿生物科技有限公司

深圳市百绿生物染色体杂交研究所

www.bioroad.com

目 录

第一章 专一性抗血清的制备	(1)
第一节 抗原及其纯化	(1)
第二节 机体的特异性免疫反应及制备抗血清的免疫程序	(6)
第三节 抗血清效价及纯度测定	(12)
第四节 病毒抗血清制备的实例	(14)
第二章 免疫球蛋白的制备	(20)
第一节 免疫球蛋白及其性质	(20)
第二节 免疫球蛋白的制备方法	(26)
第三节 免疫球蛋白的效价、纯度与定量测定	(30)
第四节 病毒抗血清免疫球蛋白的制备实例	(32)
第三章 单克隆抗体的制备	(34)
第一节 单克隆抗体的发明	(34)
第二节 制备单克隆抗体的抗原及其免疫动物	(37)
第三节 单克隆抗体的制备程序	(39)
第四节 病毒单克隆抗体制备实例	(47)
第四章 标记酶及其制备	(67)
第一节 作为标记抗体用的酶	(67)
第二节 酶纯化的一般原理和方法	(68)
第三节 酶纯化的实例	(70)
第五章 酶标记抗体的制备	(80)
第一节 酶与抗体的交联	(80)
第二节 酶标记抗体制备的实例	(87)



第三节	酶标记抗体的定量及其摩尔比值	(95)
第六章	酶底物的配备	(96)
第一节	酶底物的选择与合理使用	(96)
第二节	酶底物的配备法	(99)
第七章	免疫酶标固相载体方法	(105)
第一节	免疫酶技术的产生、发展、分类及其命名	(105)
第二节	免疫酶标固相载体方法	(108)
第八章	免疫酶标组织化学方法	(127)
第一节	组织细胞内源过氧化物酶的抑制	(127)
第二节	组织及组织内有关抗原的固定	(130)
第三节	标本的制备	(135)
第四节	免疫酶标组织化学法原理及实验	(139)
第九章	非标记免疫酶技术	(146)
第一节	“抗体搭桥”法	(147)
第二节	PAP 法	(150)
第三节	非标记免疫酶固相载体方法	(157)
第十章	免疫酶电子显微镜技术	(159)
第一节	制备电子显微镜样品常识	(159)
第二节	免疫酶标电镜技术	(164)
第三节	非标记免疫酶电镜技术	(168)
第十一章	免疫酶技术的应用	(174)
第一节	免疫酶技术的应用简况	(174)
第二节	免疫酶技术应用实例介绍	(178)
第三节	关于免疫酶技术应用的说明	(186)
第十二章	免疫酶技术的进展	(188)
第一节	酶免疫电泳技术	(188)
第二节	酶联免疫电扩散测定技术	(189)
第三节	酶标记抗原对流免疫电泳技术	(191)
第四节	酶标醋酸纤维膜免疫电泳技术	(192)
第五节	用酶标试纸检测组织或器官内有关抗原	(194)
第六节	免疫酶技术的发展趋势	(196)
第七节	免疫酶技术的新进展	(199)



第十三章 相关的实验技术	(205)
附录	(227)
一、试剂(包括缓冲液)配方	(227)
二、缩写检索	(238)
参考文献	(242)
编后语	(250)

第一章 专一性抗血清的制备

制备高效价专一性抗体(Antibody,简称Ab)是免疫酶技术的基础。对免疫动物来说,抗体就是指机体在抗原(Antigen,简称Ag)刺激免疫系统后形成的、具有与相应抗原发生特异性免疫结合反应的一类免疫球蛋白(Immunoglobulin,简称Ig)。

从制备方式和来源上可将抗体分为两种:多克隆抗体(Polyclonal Antibody,简称PAb)和单克隆抗体(Monoclonal Antibody,简称MAb)。

多克隆抗体是机体应答抗原刺激由B细胞分化成的浆细胞所产生的重要产物,主要存在于血液、组织液和外分泌液中。平常所称的抗体就是指多克隆抗体。含有抗体的血清称为免疫血清(Immune Serum),俗称抗血清(Anti Serum)。

单克隆抗体是由杂交瘤细胞(Hybridoma)分泌的。平常称单克隆抗体为单抗。Georges J. F. Köhler 和 César Milstein 于1975年创立了制备单克隆抗体的淋巴细胞杂交瘤技术,使免疫学发生了划时代的变革。但是制备抗血清的常规技术仍然十分重要,因为一方面抗血清具有广泛的用途,且制备简易快速;另一方面只有制备出高效价专一性抗血清后,才有可能制备出高效价专一性的单克隆抗体。为了获得高效价专一性抗血清,必须注意抗原的纯化以及免疫过程中技术上的一系列环节。

第一节 抗原及其纯化

一、抗原

1. 概述

所谓抗原,是指进入人或动物体内能刺激人或动物机体的免疫系统发生

免疫反应,从而引起人或动物机体产生抗体或形成致敏淋巴细胞,并能和这些抗体或致敏淋巴细胞发生特异性反应的物质。这些物质主要有蛋白质和复合蛋白质(如脂蛋白、糖蛋白和核蛋白)等。

抗原有两项基本属性:一项是免疫原性,即当抗原进入人或动物机体后具有激发免疫系统产生抗体或形成致敏淋巴细胞的能力;另一项是反应原性,即能与相对应的抗体或致敏淋巴细胞发生特异性反应。具备上述两项属性的物质,称为完全抗原,如病原体 and 异种动物血清;只有反应原性而没有免疫原性的物质,则称为半抗原,如青霉素和磺胺等。脂类物质虽然不能激发人或动物机体产生抗体,但是它可以与该脂类的蛋白相结合刺激人或动物机体产生抗体发生免疫反应。如果将半抗原结合于大分子载体上(例如人工合成的多肽),就能得到类似完全抗原的人工抗原。

依抗原不同的物理性状,常将抗原分为颗粒性抗原和可溶性胶体抗原。细胞和微生物属于颗粒性抗原,蛋白质一般属于可溶性胶体抗原。颗粒性抗原的免疫原性一般大于可溶性胶体抗原的免疫原性。

2. 影响制备高效价专一性抗血清的主要因素

(1) 抗原本身的有关性质:抗原刺激免疫动物产生抗体的能力,是否使用佐剂,注射途径及注射间隔时间等。

(2) 抗原必须纯化:对于免疫用的抗原,成分必须均一,除了作为免疫原的抗原物质外,不能含有可激发机体产生其他抗体的物质。在制备病毒抗血清时,必须去除寄主蛋白成分;假若这种材料是互不相同的病毒复合感染的,还必须将这些互不相同的病毒一一分离。只有制备了具有一定浓度的纯化的抗原,才有可能制备出高效价的专一性抗血清。

(3) 抗原与免疫动物必须具有异源性:虽然在动物机体里存在着自体的隔离抗原,例如甲状腺球蛋白和精子等,当机体功能发生紊乱时,隔离抗原会脱离束缚,成为自体免疫原,从而引起自身免疫方面的疾病。但是机体内绝大多数蛋白质和核酸对自身是不能激发产生抗体的。在正常情况下,种属差异相距愈近,其抗原物质使机体产生相应抗体的能力愈弱,反之则愈强。显然,从免疫过的兔子体内得到抗体后,在制备第二抗体时,就不能把兔子抗血清中提取的免疫球蛋白作为抗原再去注射另一只兔子,而是应该去注射羊、驴或马等种属关系相距较远的动物。

(4) 抗原分子必须具备一定的分子量和结构:作为蛋白质抗原,分子量一般不应该低于 10 000,但对于有些分子,情况就比较特殊,分子量仅为 451 的 N-乙酰-L-酪氨酸免疫豚鼠可以产生抗体,而角蛋白和非溶性的纤维蛋白分子量虽然远远大于 10 000,却不能激发机体产生抗体。从总的情况看,分子

量越小则进入机体后越容易被排除。另外,抗原的免疫原性还取决于抗原分子表面的某些化学基团(即抗原决定簇)的性质,如数目、电荷、光学构型和空间构象,而抗原决定簇的特异结构又与整个蛋白质的立体结构密切相关。完整结构的病毒粒子、病毒的外壳蛋白和病毒蛋白亚基单体三者之间的免疫原性是互不相同的。

在制备抗血清时,最重要的是要注意抗原的纯化。否则,制备的抗血清将很难在免疫酶技术中使用。

二、抗原纯化的一般方法

抗原物质的纯化方法很多,下面介绍抗原的一般纯化方法。

1. 微生物、类立克次体、类菌质体和病毒等抗原的纯化

首先应分离出纯化的株系或毒株,并对该株系或毒株进行生物化学、血清学、紫外吸收光谱、电镜观察等鉴定,然后将经过鉴定的纯化株系或毒株进行生物学繁殖,在适当时间再将所需株系或毒株提纯,得到大量材料,最后再予以鉴定,并测定其浓度。

在此要特别注意以下几点:①材料本身是否稳定,如果不太稳定就要寻找使它稳定的条件;②材料是否容易从寄主中提纯,得率是否高,要尽量寻找得率高的提纯方法;③材料本身免疫原性(即抗原性)是否强,经提纯所得材料免疫原性是否损失,要尽量寻找免疫原性强的材料作为抗原,而提纯的方法也以不损害材料的生物活性和抗原性为前提。

所以在进行微生物等抗原纯化的时候,必须熟悉材料的性质、了解材料的繁殖方法和掌握抗原的提纯方法,对工作环境所具备的提纯设备及其功能要心中有数。总之,不能草率纯化微生物等抗原。

2. 动植物(包括人体)器官组织内的各种蛋白质成分(如激素和酶等)作为抗原物质的纯化

必须解决这些蛋白质或蛋白质复合体与器官和组织内的其他成分的分离,并且要保证所需蛋白质或蛋白质复合体不因为提纯过程的处理而变性,影响免疫原性。因此,熟悉所提纯蛋白质或蛋白质复合体的理化性质,掌握必要的生物化学实验技术,是获得器官组织内蛋白质抗原的前提。对于该抗原物质也要进行纯度鉴定,并且要测定浓度。

三、植物病毒纯化实例——长叶车前花叶病毒的纯化

长叶车前花叶病毒(Ribgrass Mosaic Virus,简称RMV)属于烟草花叶病毒(Tobacco Mosaic Virus,简称TMV)群中的一种,对十字花科植物具有严重

的危害性,为棒状质粒,直径大约 18nm,长度大多为 300nm 左右。性质稳定,非虫传,可土传,摩擦接种效果好。该病毒免疫原性强,提纯得率与烟草花叶病毒的得率相仿,每千克青菜病叶材料提纯得病毒为 1~3mg。由此可以看出,长叶车前花叶病毒作为制备抗血清的抗原是理想的。由于该病毒对国内某些地区种植的蔬菜造成较严重的危害,因此制备它的抗血清,对诊断和防治该病毒很有必要。

长叶车前花叶病毒的纯化方法如下:

1. 器材与设备

包括用于单斑分离的匀浆器;组织捣碎机;搅拌机;普通离心机;超速离心机;电子显微镜;紫外分光光度计。

2. 材料与试剂

①感染 RMV 的青菜病叶;②指示植物心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)、三生烟(*Nicotiana tabacum* var. *Samsun*)、曼陀罗(*Datura stramonium*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)和长叶车前(*Plantago lanceolata*);③繁殖寄主青菜(*Brassica chinesis* cv.);④0.4mol/L pH 7.5PB(配方见附录);⑤0.2mol/L pH 7.2BB(配方见附录);⑥聚乙二醇(简称 PEG,分子量为 6 000);⑦氯化钠。

3. 实验程序

(1)生物学纯化:

①在田间摘取具有长叶车前花叶病毒引起退绿和明脉症状的青菜叶片。

②进行温室接种。指示植物可选择心叶烟、曼陀罗、三生烟、长叶车前、黄瓜和菜豆。如果在心叶烟、曼陀罗上发生枯斑,在三生烟上发生系统花叶症状,在长叶车前上发生花叶症状,而不感染黄瓜和菜豆,则可以初步肯定是烟草花叶病毒群中的长叶车前花叶病毒。在接种指示植物时,必须考虑选用能将该病毒与其他病毒分离的植物。在完成长叶车前花叶病毒的生物学纯化后,要进行上述指示植物的接种,然后将在长叶车前上发生花叶症状的叶片捣碎,人工摩擦接种于心叶烟上,待心叶烟发生枯斑。

③将这种枯斑进行三次单斑分离。用消毒剪刀剪下心叶烟上第三次发病的一个枯斑,再用洁净匀浆器碾碎,接种于心叶烟上,再将叶片单斑接种于系统寄主。第三次单斑分离的病毒枯斑接种于易感染并且症状为系统花叶症状的三生烟上,十多天后就能获得 RMV 病毒感染的三生烟叶片。

④将此病叶捣碎接种于青菜上,就能获得含有 RMV 的青菜叶片。在进行这步工作时要注意:从单斑到系统花叶症状的材料必须选择接种易成功、病毒增殖速度快的植物。三生烟具备这一特征,但是由于烟草叶片在提纯过程

中不容易去除色素,因此再将病毒转接到青菜上,可以使它既能大量繁殖又便于提纯。当然也可以在单斑分离后不经过接种三生烟,而直接接种到青菜上去。但是,以单斑分离后接种到三生烟上扩大病毒感染为宜。另外,用青菜作繁殖寄主的好处是病叶采摘后,长出的新叶同样感染有 RMV,在一定时间内,这些青菜就成为供应 RMV 纯化材料的小“仓库”。在单斑分离和生物学繁殖时,务必加强温室管理,要有隔离设备,严禁蚜虫出入,防止其他病毒污染,并对盆用土壤进行严格高压消毒。

(2) 物理化学纯化:

①将人工接种 RMV 的青菜叶片剪碎,然后放入捣碎机,加等量 0.4mol/L pH 7.5 的磷酸缓冲液,充分捣碎,再用尼龙纱布挤出汁液。

②对汁液边搅拌边滴加用量为汁液总体积的 8% 的正丁醇,加完后继续搅拌半小时左右,停止搅拌,对汁液离心 15min,转速 3 500r/min,去掉残渣沉淀,留取上部汁液。

③在上清液中加入 4% ~ 6% 的聚乙二醇(简称 PEG,分子量为 6 000)和 2% ~ 3% 的氯化钠,置于冰箱中过夜。

④次日离心 15min,转速为 3 500r/min,去掉上层液留取沉淀。用少量 0.2mol/L pH 7.2 硼酸缓冲液,反复洗涤沉淀 5 ~ 6 次。把多次洗涤后所得的溶液合并。

⑤然后进行超速离心 90min,转速为 35 000r/min,去掉上部汁液留沉淀,将沉淀用少量 0.2mol/L pH 7.2 硼酸缓冲液溶解,即得到部分含有大量 RMV 棒状质粒的病毒溶液(图 1)。

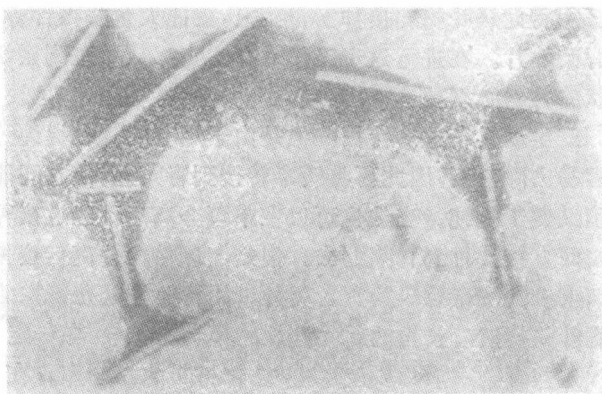


图 1 RMV 在电子显微镜视野中的形态($\times 10$ 万)

4. 提纯所得病毒溶液的鉴定

(1)生物活性鉴定:将提纯所得的 RMV 病毒溶液接种于指示植物,例如心叶烟上,看它是否发生枯斑,接种于长叶车前看它是否发生花叶症状,再回接于原始材料青菜叶片上看它是否发生相同症状。

(2)电子显微镜观察:在电镜下观察病毒要注意看它形态是否同一,直径是否相等,非 RMV 形态特征的病毒有否出现。

(3)紫外吸收光谱曲线的测绘:将病毒溶液在紫外分光光度计上进行测