

国外农业科技资料 (34)

植物病毒病及研究方法

沈阳农学院科技情报室编译

1981. 11.

目 录

诊断植物病毒病的酶联免疫吸附测定法 (ELISA).....	(1)
植物病毒的血清学诊断——多孔穴盘法.....	(7)
采用酶联免疫吸附测定法对辣椒病毒做快速测定 及滴定价测定.....	(11)
植物病毒的侵染部位.....	(17)
关于烟草花叶病毒侵入的机制.....	(19)
植物病毒病的热疗法及其应用.....	(21)
干热种子消毒对大豆紫斑病和病毒病的效果.....	(25)
蚜虫对植物病毒的非持久性传播.....	(29)
日本烟草发生的病毒种类、系统和鉴别方法.....	(39)
使用迪纳染色剂鉴定由类菌原体引起的植物病害.....	(48)
在日本国发生的水稻病毒病.....	(51)
采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测菜豆黄斑 花叶病毒.....	(57)
烟田里烟草花叶病毒 (TMV) 的土壤残留.....	(61)
种子“携带”芸豆普通花叶病毒与莴苣花叶病毒 的血清学诊断法.....	(66)
用酶联免疫吸附测定法鉴定大麦黄矮病毒.....	(73)
飞虱叶蝉类的人工饲养法和营养要求.....	(83)

诊断植物病毒病的酶联免疫 吸附测定法(ELISA)

农林水产省果树试验场口之津支场

久原重松

I. 酶联免疫吸附法的概况

利用抗体结合标志的物质,用这种结合的抗体做血清学的反应进行诊断的技术,过去曾有结合荧光物质的荧光抗体法,及结合放射性物质的放射性标志抗体法。上述均为现在广范应用的极好诊断法,但多数样本并不易处理,还必须具有荧光显微镜和暗室才能鉴定。一般的讲,对于抗原鉴定定性和定量的检测也尚存在困难。上述后一方法,虽有极高敏感的鉴定能力,可做高精度定量测定,现在也可鉴定出多数样本,然而尚须考虑到对人体及环境的影响,操作技术的熟练和设备等。

把抗体和酶结合起来以进行诊断的方法,即是酶联抗体法,对高敏感的鉴定和定量,无需特别设备,安全易于操作,因此迅速发展,遂成为血清学诊断中起重要作用的一种技术。

关于抗体联合酶试用于鉴定抗原,过去曾由(Avranceas (1969、1971)为解决组织内抗原存在的部位为目的开展的。利用酶联抗体以鉴定液体抗原,称为酶联免疫吸附测定法[Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)、日本称酵素结合抗体法],Engvall (1971)曾做过定量实验法和竞争放射标记抗体法有同样的鉴定高感度,并可做定量测定。其后 Engvall (1972)采用

聚苯乙烯试管,以间接法记数,按 ng/ml (毫微克/毫升)鉴定各种抗原。1974年 Vollen 等鉴定出虐疾抗原时,采用了聚苯乙烯制的微皿,以便放置多数鉴定样本,此后 Wolters 等 (1975)、Batlett 等 (1976)发展了使用微皿的双抗体(夹心)法[double antibody sandwich method],显示出优越的鉴定精度。自酶联抗体可以定量鉴定抗原始(1971)到使用双抗体法止,在此5年期间,对酶联免疫吸附测定法(以下简称酶联法——译者)的鉴定做了很多探讨并有很大进展,以致鉴定出各种激素、变态反应素,而后才开始应用于病毒、细菌、菌类、纤毛虫及广泛的动物感染性病原鉴定,近来又利用到各种植物病毒病的诊断上来。

II. 酶联法的实际

1. 主要的鉴定技术

酶联法的创始经过及对象抗原加入的方法,存在一些差异,即:(1)间接法[indirect method],(2)竞争法[competitive method],(3)双抗体(夹心)法,(4)抗异种球蛋白抗体法[anti-globulin antibody method],(5)抗酶抗体法[anti-enzyme antibody method]等5种方法,每种方法操作容器的大小,试样的多少,又分为微量法和大量法等区别。

(1) 间接法:①将样本装入试管或微

皿的孔内,使容器壁吸附抗原,再冲洗容器,然而容器壁尚可残余一些抗原。②将酶联抗体液滴入微皿各穴,使抗原与抗体起反应,再冲洗,便残留一些抗原和结合了的酶联抗体。③再加入酶的底物,经一定时间,因酶联抗体中酶的作用,使底物渐变色,达到充分变色时则酶的作用便停止,此时肉眼可判断变色程度,做定量测定时用光电比色计操作。

(2) 竞争法:①先将提纯的抗体液加入容器内,使容器壁吸着抗体,冲洗,以除壁面未能吸着的多余抗体,②在实验容器内加入结合酶的抗原液及抗原样品混合液,在对照容器内加入酶结合的抗原液,洗净,但前处理的抗体在壁面起反应抓住了抗原,这部份仍然残存着,③添加底物使之变色,和间接法同样进行测定,供试区和对照区,根据变色差异以鉴定样品中的抗原并进行定量测定。

(3) 双抗体法:此法是采用提纯的抗体及酶联抗体两个方面,①将抗体液倒入容器内,壁面吸着,冲洗,②加样品液使抗原与壁面的抗体结合,洗净残余抗体和已结合的残余抗原,③添加酶联抗体,使之吸附壁面的抗原,再冲洗,除去未能结合抗原的一部份酶联抗体,④加入酶的底物,亦如间接法同样测定之。

(4) 抗异种球蛋白抗体法:先制作抗家兔球蛋白的山羊抗体,使它和酶结合用做酶联抗体,①抗原吸附处理,②家兔抗体处理,③酶联抗家兔的山羊抗体的处理,④底物的处理。这方法由于使用了家兔的特异性抗血清,使用这种酶联抗体则能通用于鉴定各种抗原。

把家兔和山羊抗人血球蛋白抗体及酶联合起来应用,只要有抗原时人体液中各种抗体便可以鉴定出来,故多在医学方面使用之。

(5) 抗酶抗体法:使酶和抗体进行化

学的结合,不必再制做酶联抗体。①抗原的吸附,②家兔抗体处理,③抗家兔球蛋白山羊抗体的处理,④抗酶家兔抗体的处理,⑤酶处理,⑥基质物质处理。这个方法除处理手续繁多外,也有某些精确度降低的倾向,假若使用抗酶抗体与抗家兔球蛋白山羊抗体,则不需要制作每个酶联抗体,只要准备出特异性的抗血清,可共同利用以鉴定各种各样的抗原。

除上述外,若将含抗原的样品液与标准抗体液混合,使抗原与抗体结合,可把残余的抗体做定量鉴定,此称为抑制法。而且①通过间接法把酶联抗原以②的竞争法把酶联抗体加以使用,使抗原与抗体置换,以鉴定出抗体,并可定量测定。

2. 鉴定操作顺序

用酶联抗体法做诊断时,必须制备特异抗血清,为此应有纯化病毒抗原,注射于实验动物中,采血并获取高效价抗血清的手段。(略)以下将酶联法实际操作顺序加以叙述。

(1) 实验容器:纤维素,聚丙烯酰胺,聚苯乙烯,聚丙烯,碱性乙烯树脂,聚乙烯等材质做成的试管(大量间接法情况下),并也用于微皿实验。特别在进行多数样本测定时,使用后者更为方便,植物病毒的诊断也是使用后者的容器。

(2) 实验容器壁对抗原或抗体的吸附:容器壁的抗原或抗体吸附的操作,使液体抗原或抗体吸附于固体表面,则系操作上很重要的方面。壁面吸着抗原材料的情况为间接法,而抗体球蛋白吸附的情况为双向抗体法及竞争法。

任何情况下把抗体或样品溶液放入容器内(大量法用1 ml,微量法用0.2 ml)放置一定时间,此时抗体或样品的浓度、温度、pH、及时间等条件,须根据各种鉴定对象,摸索各情况最适的方法。一般吸附材料若是蛋白质时,则浓度可为1—10 μ g/ml,

并用碳酸缓冲液 (pH9.6)。而且, 吸附温度在较低温 (4℃) 和较高温 (37℃) 时会有不同, 前者为12—18小时, 后者多为3—6小时。

(3) 清洗: 在酶联法处理前, 材料处理以及酶联抗体的处理之后必须清洗。清洗对鉴定的定量测定结果影响很大, 必须慎重进行。清洗只是要加0.015 M或0.02 M吐温 (Tween) 加于磷酸缓冲液里 (PBS-Tween), 一般置放5分钟反复3次, 有时也须振荡冲洗。此外重复冲洗要有一定规律为好。

样品的配制: 在测定血清或体液的抗原及抗体量时, 要用PBS-Tween 稀释。试样如系球蛋白时, 要用0.05M 碳酸缓冲液做5—100μg/ml的稀释。然而, 诊断植物病毒时先磨碎供试植物, 必须除去固体物质, 在鉴定多量样本之时, 这种固体物质是最大的障碍。在木本的情况下, 其磨碎汁液中要加入聚乙烯吡咯 (分子量25000—44000), 低速离心, 取上清液再稀释用于鉴定。如欲求得鉴定界限及和标准试材比较时, 尚须用数次阶段的稀释液, 只做鉴定的情况下最好用同一浓度的稀释液。

双重抗体法样品的处理: 植物病毒鉴定上重要的双重抗体法, 前已述及其样品的处理是和间接法样品的处理不同的, 要在前处理完毕后再进行, 即经前处理之后, 在微皿内加入样品溶液, 每穴约0.2ml, 加入重复2次, 放于4—6℃下培育16—18小时, 或37℃下, 4—5小时。

酶联抗体: 和抗体结合的酶需具有高稳定的反应性, 并要容易放置, 过氧化物酶, 碱性磷酸酶以外, 还有葡萄糖氧化酶, β—半乳糖苷酶, 在鉴定实验常用前二种, 特别在植物病毒诊断上, 现在又采用碱性磷酸酶。关于酶和抗体的结合, 则系利用化学结合的抗酶抗体法。化学结合通常用谷氨醛法, 并分为第1阶段和第2阶段两个阶段。

前者是将酶和抗体混合, 加入谷氨醛培育一定时间, 再进行透析。这一方法所得结合抗体含有多重结合物质, 将它们再与抗体球蛋白混合, 制成酶和抗体的结合物, 获得两方面都有均一分子比率的物质。第一阶段的抗体与酶的混合比率, 也有各种不同情况, 如碱性磷酸酶为1:3或1:2, 过氧化物酶则按1:4左右可获良好的结果。而且, 使用谷氨醛处理的浓度及时间为1/500, 2小时; 或者1/2000, 4小时, 但多用前一数据。

多数情况下对酶与使之结合的抗体球蛋白, 须先用硫酸或硫酸苏打充分精制, 通过柱状色层分析精制时, 其非特异变色亦不见少, 故使用时要使稀释倍率放大一些, 植物病毒的诊断则多采用后者情况为多。

酶联抗体的使用浓度以及处理的时间, 须经最适浓度试验决定, 普通抗体蛋白多用0.1μg/ml—10μg/ml左右。观察处理时间, 短的37℃, 10分钟左右就可, 但37℃, 都以处理2—3小时者为多, 特别在植物病毒鉴定时, 几乎均以37℃, 3—4小时为多, 而且, 酶联抗体保存于4℃时, 其活性可维持一年。

酶的底物: 酶的底物应采用起初无色, 但经酶作用分解后起变色作用。当用碱性磷酸酶与抗体结合时, 应使用对位硝基磷酸, 因该基质具有高度反应表现黄色。普通10%二氨基乙醇缓冲液 (pH9.8), 使用浓度为1μg/ml。酶的活性可由添加2—3 M碱性酪蛋白而中止, 可获得强稳定性的变色。使用与过氧化物酶结合抗体的情况下, 可用混合过氧化氢的水杨酸氨或邻苯基硫酸素, 前者, 底物2.25μg/ml的溶液用9ml, 加入0.05%过氧化氢液1ml, 等到变褐色后, 再添加1%NaN₃液使反应停止。再可加入0.05M硫酸液使其稳定, 而且后者情况下变为桔黄色反应。

大量时用1ml左右的底物溶液, 而微皿鉴定时每个小穴只用0.3ml左右。酶底物

反应时间和变色强度表示出直线的关系,到对照样本变色差最为明显的时候才停止。为了避免添加底物时间差异引起变色的误差起见,须要变色的时间一般以30分钟以上为好。也可能会有变色时间过度的现象,调节反应时间须要变更前处理的抗体浓度,样本溶液的稀释倍数及结合抗体的浓度等方面。

结果的检查:把各样本的变色情况与对照样本做比较,肉眼可以判断阳性或阴性。有些情况下把样本经一系列稀释的变色程度与对照做比较,以便确定显示阳性的最大稀释比值。如果超过变色强度的某一鉴别标准时,若要以对照区变色强度与样本的比率来判别是否为阳性,以及依照变色强度尚欲探知样本中病毒的浓度等情况时,那么还须借助光电比色计来测定。用对硝基磷酸为底物时测定为405nm,水杨酸氨的情况下测定为560nm。

Ⅲ. 植物病毒的诊断

应用酶联免疫吸附法诊断植物病毒,是1976年Voller等和Clark等创始的。当时对南芥菜花叶病毒(AMV),洋李痘疮病毒(PPV),苹果花叶病毒(ApMV)的鉴定上表现了优异的技术。后来,根据Clark等(1977)、Thresh等(1977)对酒花麻花叶病毒(HMV),悬钩子环斑病毒(RRV)等做了进一步的研究,才对植物病毒诊断上建立了有利用价值的基本方法。1977年英国在有关的会议上,做了对马铃薯Y病毒,菜豆花叶病毒,烟草环斑病毒,番茄黑环病毒,烟草脆裂病毒,水仙花叶病毒等多种植物病毒采用本法鉴定的报告。以后,1978年又做了黄瓜花叶病毒(CMV),马铃薯卷叶病及柑桔类螺旋体的鉴定,及樱桃属环斑病毒血清学株系的诊断,1979年又有关于鉴定菊B病毒,唐菖蒲的菜豆黄花叶病毒及CMV,柑桔速衰病毒(CTV)的报告,而且国内也有关于柑桔的温州萎缩病(SDV)及柑桔花叶

病(CiMV)的鉴定试验。这样一来,利用酶联法对植物病毒的诊断,这几年间有迅速的进展。

植物病毒病的诊断,是用微皿做双重抗体法的。酶联法对植物病毒鉴定的灵敏度极高,在使用提纯病毒的情况下,最高只需 $1-X\text{ ng/ml}$,对于动物抗原的鉴定也有相同的灵敏度。而且从草本植物组织鉴定病毒,以烟草的洋李痘疮病毒(PPV)及酒花麻花叶病毒(HMV)的鉴定试验看,前者为 10^5 倍,后者只要 5×10^4 倍稀释液就能测定出来。此外,即使不这样显著,则 10^3-10^4 倍稀释液,也有不少鉴定出来。根据鉴定的精确度以及植物汁液的影响等,对于纯化的AMV及PPV溶液里加入黄瓜及烟的汁液来分析时,它的显色强度和鉴定精确度几乎并没有变化。然而,木本植物汁液对病毒的反应弱,其非特异性反应高。Clark等(1977)将染AMV的醋栗芽磨碎液,做10倍稀释时则阻碍反应,而做100倍稀释就无法阻碍现象。盛夏采集的桃叶磨碎液及几种木本植物叶的磨碎液,均显示有一些强的非特异性反应。而且这样的非特异反应如在磨碎液中加入聚乙烯吡咯烷酮加以改善后,那么这种桃叶液据报导,虽检测的灵敏度低微,但全生育期均有测定出来的可能性。而且,由于非特异性反应上显色稍少,加入牛血清蛋白液,植物病毒的鉴定效果也不升高。

对于酶联法及其它鉴定法的鉴定灵敏度,以PPV的鉴定浓度限点比较,则酶联法是扩散法的1000倍,沉降法的300倍,电显法的100倍,以平均1个病斑为判断的标准,则是接种鉴定法的100倍,此外,酶联法显示了最高度的鉴定能力,如将酒花麻叶磨碎液做坏死环斑病毒鉴定试验,及黄瓜叶上接种鉴定,汁液可稀释到125倍,但酶联法把汁液稀释到2000倍也能鉴定出来。至于CMV不仅植物汁液,且媒介蚜虫也能鉴定出来,因此酶联法是高精度鉴定许多病毒的

方法。

以酶联法做定量鉴定时,由于植物体内病毒的浓度可因季节的移动或植物部位不同浓度不同,也能测定。以PPV言,从桃花内调查,萼和雄蕊显示多。五月采集的生长部的酒花麻AMV最多,次为叶和茎部,至7月则以有病症的旧叶内最多,次为无病症的叶部,而幼叶的尖端部认为病毒少。

用酶联法做诊断时,把与血清反应没有关系的其它病毒加入到试样液后,并不影响鉴定。对重复感染植物鉴定时,把抗体球蛋白及酶联抗体仅做交换,对于含有这种或那种病毒也是可能鉴定的,因此在多数场地取得重复感染的多数样本,做病毒病发生实态调查及做无毒母树,无毒种苗鉴定时,花费劳力多,一旦只用磨碎汁液诊断就颇容易,因此本法极为有用。

对于病毒的株系及近缘病毒的诊断,即使其间血清学反应很弱,亦能区别诊断。此外,在血清反应上相互不能区分的株系,以及有近缘关系的病毒,亦有用酶联法并不能区分者,然其中也有可以区别以及出现显色强度差异者,因此,还应考虑到今后应增加使用本法诊断株系和近缘病毒的技术,此种想法是否能够成功,尚须考虑到对特异性抗原及特异性抗体做怎样的准备才行。

田间调查时,利用酶联法诊断灵敏度高的特点,代替每个植株的检测,只需几个样本便有检测全情的可能,故特希望在种苗鉴定上效率再加提高。

■. 对柑桔花叶病毒(CiMV)的应用

近来日本国内在防治CiMV上,重要办法之一,便是把酶联法用于母树、苗木及接穗的带毒鉴定,已有迅速进展。极早熟的温州官

本早生,在各地品种更新上需求很大,可是官本早生中一部分已经污染了CiMV,混入种苗分散各地,不但使商品果实表现症状,而且也渐渐扩散并有土壤传染性。

口之津分场用SDV抗血清对CiMV做通用反应试验,从病毒研究所取来SDV抗血清,用碱性磷酸酯酶作酶联抗体,进行SDV及CiMV的双重抗体法鉴定实验,易于鉴定新芽,并正在改进中。

结 束 语

以上即酶联法的梗概,此法适于多种样本操作简单可靠,需量约仅0.2克,即使用植物粗榨液灵敏度亦较高诊断迅速,且对形态及性质不同的许多病毒病也有诊断的可能性。此外在不利的季节和部位有鉴定出的可能性,即使在玻璃温室内培育的鉴定植物,也无须控制温度、因此认为这种诊断法对设备、经费、劳力等是极为节省的。

酶联法对田间病毒感染的实态调查,土壤传染,虫媒传染等方面传染机制的阐明,对潜伏侵染寄主植物的调查,植物体内病毒的浓度及品种间差异和环境条件关系的探索,病毒病生态方面的研究等,正期待能起更大的作用。关于维持供给无毒种苗的带毒测定,对病毒浓度低的草本鉴定植物,以及要经几年才现症的,此法均能起到常年作物的鉴定作用。

对于消灭病害、弱毒探索及利用时,检查完成程度和监视病毒浓度都可起重要作用。为此设想这样的酶联免疫吸附测定法,对于植物病毒病生态及防治的研究,以及防治实践的推进,都是极为重要的。

译自《[日]植物防疫》34(3):129—135(1980) 译者:韦石泉

1000



植物病毒的血清学诊断—多孔穴盘法

仙北俊弘 李淳炯 小岛诚 四方英四郎

绪 言

植物病毒应用血清学的反应范围甚广,这种方法至今已有很多改进。著者等对于植物病毒的血清反应最近又做了探讨,将微量沉淀素试验(microprecipitin test)的改良法做了报告。微量沉淀试验法原系Van Slogteren最初做过报告的,其后欧美各国对于很多植物病毒的检定采取此法。在日本,一部分的研究者使用了微凝集反应,可是未能广泛实用。本法与沉降反应混合法,重层法,玻片法等比较,容易观察到多数的反应,所用的抗原及抗血清数量均小,并有液体石蜡油防止干燥,在暗视野观察下具有明确判别反应的优点。著者等按Van Slogteren的原法作了一些改进,使极少量的抗原和抗血清容易发生反应。这一改良法所用的容器称为多孔穴盘法(multi-dish tray method)。

实验材料及方法

① 反应的顺序 原法为覆盖聚乙烯甲醛膜的培养皿,而著者采用组织培养用的多孔穴盘 multi-dish disposable tray (Linbro Chemical 社制)。予备实验所得的结果,以一种平底有穴的盘(直径6mm有穴96个)最为适用,以下的实验皆用这种穴盘。此外加入少量抗原及抗血清所用工具为微量选择吸管(Micro selectapette, clay Adams 社制),只能滴入各穴抗原及抗血清0.025毫

升,将盘轻轻振荡使液体搅拌之后,为了防止反应液的干燥,并向各穴加入液体石蜡油约0.03毫升。放于37℃下静置2小时后,可以观察到反应,其后置于4℃一夜再观察反应情况。观察反应可将暗视野双眼显微镜(奥林巴司JMTTr型)加以改良使用,通常用16倍至25倍检镜。

② 抗原 所用抗原为马铃薯X病毒(PVX),马铃薯Y病毒(PVY),马铃薯S病毒(PVS),黄瓜绿斑花叶病毒(CGMMV),水稻矮缩病毒(RDV)5种。粗汁液的抗原使用了感染PVX的番茄冷冻叶片,感染PVS的马铃薯(男爵)的叶片,感染(CGMMV)的黄瓜叶片,以及感染水稻RDV的冷冻叶片。此外提纯的材料为按照李等方法制作PVX、PVY、四方等方法制作CGMMV,木村等方法制作RDV。各抗原用生理食盐水稀释制备。

③ 抗血清 制配各病毒抗血清是各种纯化的病毒液与弗朗德完全佐剂(Ereund's complete adjuvant)等量混合注射到家兔的肌肉中,其后经一周内做3—4回静脉注射进行免疫,所得的抗血清全用生理食盐水做2倍稀释。

实验结果

PVX、PVY、PVS、CGMMV、RDV各感病叶粗汁液与纯化的病毒液做2倍稀释之后,以多孔穴盘滴定法测定各抗血清的反应终点(如表1)。

表1

多孔穴盘法测定各种病毒病抗血清的效价

反应	供试病毒		PVX ^b	PVY ^c	PVS	CGMMV ^d	RDV ^e
方法	抗原	抗原稀释倍数	抗血清终点稀释倍数	抗血清终点稀释倍数	抗血清终点稀释倍数	抗血清终点稀释倍数	同左
多孔穴盘法	粗汁液	1			4096	128	128
		2	1024		4096	256	128
		4	1024		256	256	256
		8	64		4	512	256
		16	64			512	512
		32	128			1024	512
		64	256			1024	128
		128	256				
	纯化病毒液	2		512		4096	
		4	8192	256		4096	
		8	2048	64		2048	
		16	2048	32		1024	1024
		32	1024	4		512	512
		64	512			256	512
		128					256
		256					128
		512					8
重层法	纯化病毒液		2048	512			

a. 以上的稀释在粗汁液中判断其他的沉淀是困难的 b. $OD_{260}=0.3$ c. $OD_{260}=0.3$ d. $OD_{260}=0.4$

e. $OD_{260}=0.32$ f. $OD_{260}=0.05$ g. $OD_{260}=0.1$

① PVX 将感PVX病毒的番茄粗汁液抗原做2—16倍的稀释,如表1所记抗血清终点稀释液证实抗原抗体反应而得的聚集沉淀反应,在此以上的稀释浓度时抗血清显著地表现出绿色沉淀反应,因此,判断凝集反应是困难的。在32—64倍稀释的抗原与8—16倍稀释的抗血清范围内的反应,最易

于判断出清楚的雪片状凝集块。将纯化病毒试料作倍稀释($OD_{260}=0.3$)认为抗血清终点稀释倍数到8192倍。做为对照的重层法是 $OD_{260}=0.05$ 与抗原浓度对比之认为抗血清稀释至2048倍的反应,本法采用的16倍稀释的抗原($OD_{260}=0.075$)效价是一致的。在纯化病毒试料的情况下,4—8倍稀释的

抗原及16—64倍稀释的抗血清组合是最为明了的反应范围。

② **PVY** 在纯化病毒试料 ($OD_{260} = 0.3$) 做为抗原的情况下, 所得抗血清的终点稀释倍数达到512倍, 重层法的情况下, 抗原浓度为 $OD_{260} = 0.1$ 时, 认为抗血清的稀释倍数反应也达到512倍。在2—4倍稀释的抗原与16—32倍稀释的抗血清的组合范围内, 不断有很多清楚的凝集沉淀反应。

③ **PVS** 将感染PVS的马铃薯(男爵)粗汁液做为抗原, 与抗血清的反应稀释终点为4096倍, 特别是在2—4倍稀释的抗原与4—6倍稀释的抗血清作用的范围内最易继续的反应。

④ **CGMMV** 将感病的瓠子粗汁液做抗原, 以8倍以下稀释的抗原与表1所记稀释终点倍数的抗血清范围作用, 得到清楚的凝集沉淀反应, 其以上稀释倍数的抗血清对粗汁液呈绿病沉淀反应。得知在16—32倍稀释的抗原与8—16倍稀释的抗血清范围内, 凝集沉淀最多而且清楚, 此外使用纯化的病毒试料抗原 ($OD_{260} = 0.4$) 时, 显示了抗血清稀释4096倍, 比之粗汁液有较高的数值。

⑤ **RDV** 将感病水稻粗汁液做为抗原, 用8倍以下稀释的抗原与表1所示的抗血清稀释终点倍数作用得到清楚的凝集沉淀反应, 这些稀释了的抗血清对粗汁液起清楚的绿色凝集沉淀。在16—32倍稀释抗原与8—16倍稀释抗血清的组合范围及其反应最易于观察出来。此外以纯化的病毒试料与16倍稀释抗原 ($OD_{260} = 0.32$) 的情况下, 认为抗血清的稀释终点倍数为1024倍。这一情况下的反应和粗汁液同样地可以观察到凝集沉淀, 16—32倍的稀释抗原和8—64倍的稀释抗血清组合范围内最易产生反应。

讨 论

植物病毒血清学的技术直至今日已有很多改良, 因其具有反应锐敏及特异性等特点

应用范围很广。关于微量沉淀试验先有井上等对CGMMV做过鉴定, 其后麻谷等还用此法鉴定分离仙人掌X病毒(Cactus virus X)的报导, 而后又有井上以此法诊断兰病毒的例子。van Slogteren曾用小试管以沉淀反应混合法, 重层法、玻片法做了比较, 其有利之处为用一付培养皿可同时观察40—60个反应, 使用的抗原和抗血清的量各可以少至0.1毫升程度。而且加入液体石蜡油覆盖之后, 由于防止干燥, 可于低温下起长时间的反应, 而且有利之点则为在暗视野镜检观察下, 反应很为清楚。为此著者对此方法又进行了改良, 试用了简单的方法。然而采用培养皿为反应容器, 在抗原和抗血清搅拌之时, 唯恐邻接的反应液在振动时相混, 为此考虑到采用具有小穴的几种微量滴定盘及组织培养用的多孔穴disposo盘(Linbro chemical社制)。这样在搅拌或振荡时各种反应没有相混之虑。因此就用了组织培养用的平底暗视野观察容易的多孔穴盘, 它比U字形或V字形的微量滴定板更为适用。著者所用的这种盘为塑料制的有直径6毫米的小孔穴96个, 每一个盘大小为 8.5×12.5 厘米。加入一定量的液滴于盘的小孔穴中, 可用半自动微量吸管(Semi-auto micropipette)那样的微量选择式吸管(micro selectapette, clay Adams社制)移液。为了易于观察各穴的抗原与抗血清的反应, 各加入容积0.025毫升的液体已很足够。此用量比之历来试验的用量少多了。为了防止液体干燥加入液体石蜡油, 各穴加入0.03毫升也很足够了, 当检镜之时轻动盘体则可见白色絮状的沉淀物。假若以感病植物的粗汁液做为抗原之时, 只有PVX16倍以下, CGMMV, RDV各在8倍以下的浓度的粗汁液, 用抗血清稀释之后反应沉淀物则减少, 反而有植物汁液中仅有的绿色沉淀, 故判断产生困难, 对此相比以纯化病毒做为抗原时就可清楚地观察到絮状沉淀。井上用兰花病毒做凝

集反应诊断，将感病植物榨汁液以低速离心法分离之后，经滤纸过滤以澄清滤液用做诊断就不会产生误诊。著者的实验也是将感病植物的粗汁液低度稀释后用，将叶绿体及其淀粉沉淀于底部，遮住了暗视野的光线，抗血清浓度薄弱反应弱则判断凝集沉淀的发生有困难。然而本法也可以用感病植物粗汁液预先澄清之后，则判断结果较为容易。多孔穴盘法比历来所用的小试管沉降反应混合法及重层法所用抗原及抗血清数量均极少，操作和反应均很容易，而且多种反应同时进行之时，能够充分地应用于抗血清效价的判断及感病植物的诊断。

摘 要

采用一种多孔穴盘试验做为植物病毒血清学的改良方法，这种改良方法叫做多孔穴盘法。这种反应容器为直径6毫米平底的穴

盘，横列12列，纵列8列，共计96个孔穴，它是组织培养用的塑料制品称做多孔穴盘——multi-dish disposable tray (Linbro chemical社制)。所用的吸管为微量选择吸管 (micro selectapette) (clay Adams社制)。抗原及抗血清各用0.025毫升混合，为防止其干燥再加上一滴0.03毫升液体石蜡油，于暗视野显微镜下用16倍或25倍作观察。用PVX、PVY、PVS、CGMMV、RDV等5种病毒的感病植物的汁液，或纯化病毒试料供本法使用，结果为：此法与历来的重层法有同样的反应，易于判断。这种多孔穴盘法操作简便，其有利之处为：使用一个盘可能测定多数反应，所用抗原，抗血清之量极少，用暗视野显微镜观察时，其反应清楚正确，而且也容易判断抗血清的效价。

译自《日本植物病理学会报》

45 (2) : 142—146 (1979)

译者：韦石泉

采用酶联免疫吸附测定法对辣椒病毒 做快速测定及滴定价测定

以色列 The Volcani Center. 病毒学系

S. Marco 和 S. Cohen

摘 要

酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 能够快速而准确地测定辣椒的马铃薯Y病毒 (PVY)、黄瓜花叶病毒 (CMV)、苜蓿花叶病毒和烟草花叶病毒。这种方法的灵敏度使之可能测定 CMV 或 PVY: 分别在接种后 4—6 天; 直接地在不须先均质化的叶盘上; 用被感染的和健壮的植株以 1:50 的比率作为混合的一批样本。使用后者能较易在床苗筛选辣椒秧苗或进行田间病毒的测定。ELISA 也能用于测定马铃薯 (叶和块茎)、番茄、烟草、洋酸浆 (*Physalis floridana*) 和心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 的 PVY 病毒。除马铃薯外, 用如上所有寄主及用黄瓜、芹菜、甜瓜、南瓜和曼陀罗 (*Datura stramonium*) 可测定 CMV。使用 ELISA 还可评价辣椒病毒 CMV 或 PVY 的相对滴定率, ELISA 在辣椒育种中也是很有用的, 它可以提供病毒抗性的数量估价。

辣椒 (*Capsicum annum* L.) 通常受许多病毒的侵染, 其中马铃薯病毒 Y (PVY) 和黄瓜花叶病毒 (CMV) 在经济上大概就是危害最严重的。PVY 病毒和 CMV 病毒两者包含有许多株系, 寄主分布广泛, 并由蚜虫作非持久性的传播。施行各种栽培措施可以减少辣椒病毒的危害, 但这些措施只能解决部分

问题, 所以, 抗病育种才是抵制辣椒病毒的主要手段。现已发现抗 PVY 和 CMV 的来源, 并且把它们引入到了不同的辣椒栽培品种中来, 但是这些抗性品种的大多数都因出现病毒的其他株系易遭破坏, 培育辣椒的抗病品种, 仍然只能依据可见症状的严重程度来估价, 但是除去许多其他限制之外, 除非差异显著是不能选择出的, 这些差异通常是单基因抗性的结果。估价滴定度的数量抗性可以改进选择性, 使得多基因遗传得以应用, 可是滴定度的估价似乎在辣椒上并不实际, 因为从这种植株机械传布到一个局部病斑寄主上存在困难, 也许是由于病毒抑制剂或由于病毒滴定度低的原因。目前的任务就是要寻找一种对病毒尤其是对辣椒 CMV 和 PVY 病毒进行定性和定量测定的快速方法。

材料和方法

病毒的测定可在天然的或人工接种受侵染的植株上进行。供试植物种植在防虫的温室里, 并在幼苗期 (头两个真叶完全发育就用实验室常规培养的病毒进行机械接种。接受一种以上病毒的植株每隔 1—2 天就进行接种。实验所用的辣椒幼苗是感病本地栽培品种, Zahov Naharia。在天然感染的辣椒中, 鉴定病毒是通过使用嫁接检验植株、确定典型寄主范围的方法进行的, 也常使用电子显

微观察进行鉴定。用沉淀素和琼脂双扩散法检验这些植株的汁液不能获得可靠的结果。

酶联免疫吸附测定法(ELISA)检验进行步骤正如Clark和Adams所叙述:(1)叶(5mg)或叶盘(直径6mm)用含0.05% Tween—20% 磷酸盐—缓冲液的盐溶液和2%聚乙烯吡咯烷酮(PBS—缓冲液)[2% Polyvinylpyrrolidone (PBS—buffer)]使之均质化。等到小孔已经吸附了纯化的用“包被缓冲液(Coating buffer)”稀释的 γ -球蛋白($A_{280nm}=1.4$)时,将这种提取液200微升(μl)加入到微皿的小孔穴内(本材料采用Linbro Scientific CO, Hamden, CT 06511制品)。在某些试验中完整的叶盘(6mm直径)可直接地不须均质化就浸入皿内孔穴中。经过培育期后,加添酶标记的 γ -球蛋白(结合的抗血清);这样就可引起酶和底物p-硝基苯基磷酸盐的显色反应,显色强度用比色计测量至 A_{405nm} 。

抗性是根据 schaffer 用较低病毒滴定率求相关性的。为评定抗性,至少要把每品系待检的几株辣椒幼苗种植在防虫的温室里,在2个真叶期时进行机械接种。同时,每个品系的相同10株幼苗要用水磨擦对照。这些肉眼检查和ELISA测定要和对照进行比较。

结 果

在人工或田间感染的辣椒中, PVY、CMV、苜蓿花叶病毒和 TMV 用具有高度精确性的 ELISA 在2天内就能检测出来。用3种异源的抗血清和不同时期的植株实验,几次都获得了这些结果。

PVY 和 CMV (不检验 AMV 和 TMV) 也能在辣椒和辣椒老叶上检测出来。PVY 在被感染的马铃薯(叶和块茎)、番茄、烟草、洋酸浆和心叶烟上也能很容易地检测出来。除马铃薯外,在如上寄主上及在黄瓜、芹

菜、甜瓜、南瓜和蔓陀萝上也能检测出 CMV。

直接浸在 PBS——缓冲液中未均质的化完好的叶盘上,也很可能检测出 PVY 和 CMV 来。使用已感染 PVY 和 CMV 植株的单盘,用 ELISA 所获得的平均数 A_{405} 比起用健壮辣椒植株单盘所获得的 A_{405} 0.024 来,分别是 0.369 和 0.772。然而,这种方法对于定量测定似乎并不太适宜,因为在叶盘的数量和所获得的吸光率(absorbance)间未发现有什么相互关系。

在田间,辣椒可以受到几种病毒的侵染。若把 ELISA 用于诊断,而保证一种病毒的出现不妨碍对其它病毒的检测时将更令人满意。在各种可能结合的情况下,用 PVY、CMV、AMV 和 TMV 侵染辣椒幼苗,然后用 ELISA 检验。在3种独立的检验中,不同的病毒间没有干扰,根据使用抗血清获得了精确的结果。

辣椒幼苗种植在人工控制的条件下(22C、2,500勒克斯(lux)和一个16小时光照期)并且在2个真叶时用 CMV 和 PVY 接种;对照是用水接种。接种后以在不同的间隔时间里用 ELISA 法对接种株上未接种部分的叶尖样本做鉴定,就能检验出 CMV 和 PVY 的存在。这个结果(图1,2)表明 CMV 和 PVY 分别能在接种后4天和6天检测出来;3—4天后,两种病毒的症状都能在这些叶子上显示出来。

在其他3个实验里,我们探测一些健株和病株混合样本,能否测定的可能性。从一个 PVY 或 CMV 侵染的辣椒株上取来的叶盘做匀浆化,即从健壮辣椒株取来不同数量的叶盘,放到标准容量 5ml—PBS—缓冲液中匀浆搅拌,最后用于 ELISA 测定。这个结果(图1,3)表明在每100个健壮的叶盘含有一个被感染的叶盘的混合样本中,就能够检测 CMV 并且从1:50的混合样本中也能检测到 PVY。

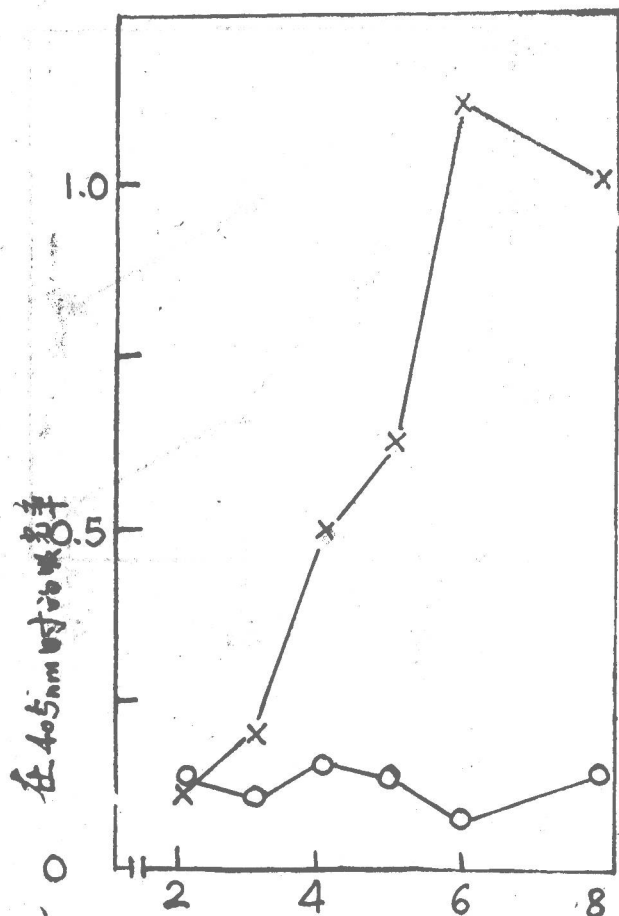


图1. 405nm时的吸光率是使用酶联免疫吸附测定法, 测定接种CMV (x-x) 或用水 (o-o) 机械接种的辣椒叶子样本混和浸出物 (1:100 w/v) 进行的。其结果是三个实验的平均数 (每个实验5棵植株), 在此三个实验中, 植株保持在22℃, 2.500lux, 和16小时的一个光照期。r-球蛋白用缓冲液稀释倍数是1:1000, 而结合抗血清稀释的倍数是1:2000。

图2. 在405nm时的吸光率是使用酶联免疫吸附测定法对已用马铃薯病毒Y (x-x) 机械接种或类似地用水磨擦 (o-o) 了的辣椒叶子混合浸出物 (1:100, w/v) 进行检验而得到的。其结果是三个实验的平均数 (每个实验5棵植株) 在此三个实验中, 植株保持在22℃, 2500lux 和16小时的一个光照期。r-球蛋白用缓冲液稀释的倍数是1:100, 而结合抗血清稀释的倍数是1:200。

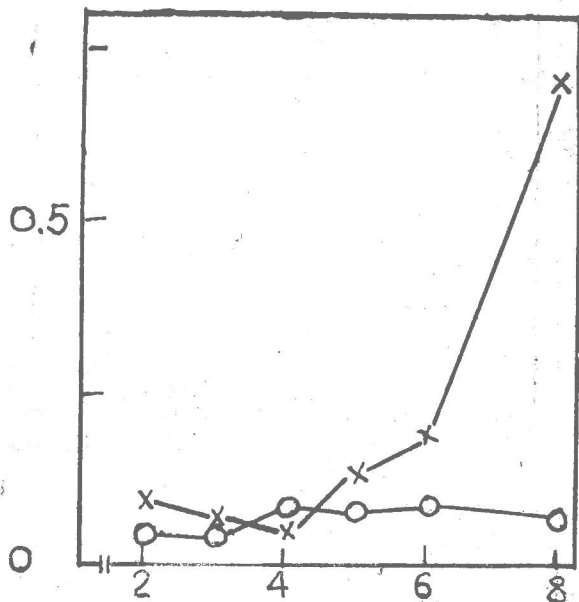
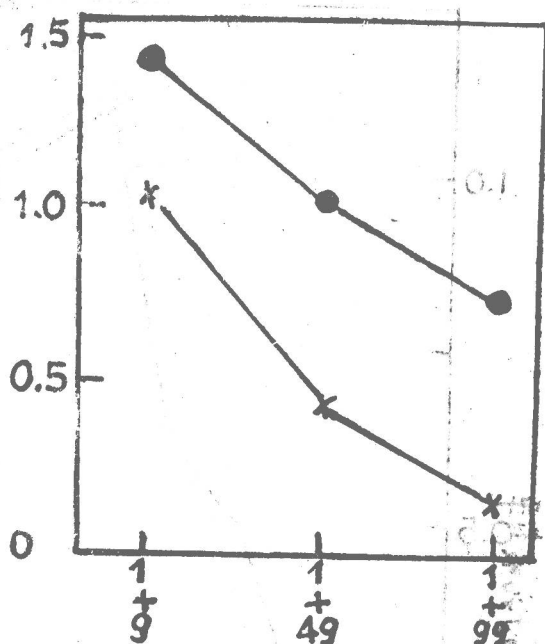


图3. 在405nm的吸光率是使用酶联免疫吸附测定法对健壮和已感染黄瓜花叶病毒(CMV)(●—●)或对健壮和已感染马铃薯病毒Y(x—x)的辣椒叶盘的混合浸出物进行检验而得到的。一棵被感染植株的一个单盘和许多健壮植株叶盘混合在一起,并且从混合物中制备浸出物。把用同样数量健株圆盘的浸出物所获得的吸光率校正后,其结果是两个实验的平均数。一个圆盘的量是5mg。r-球蛋白的稀释倍数对PVY是1:100而对CMV是1:1000,结合抗血清的稀释倍数分别为1:200和1:2000。



在405nm时的吸光率

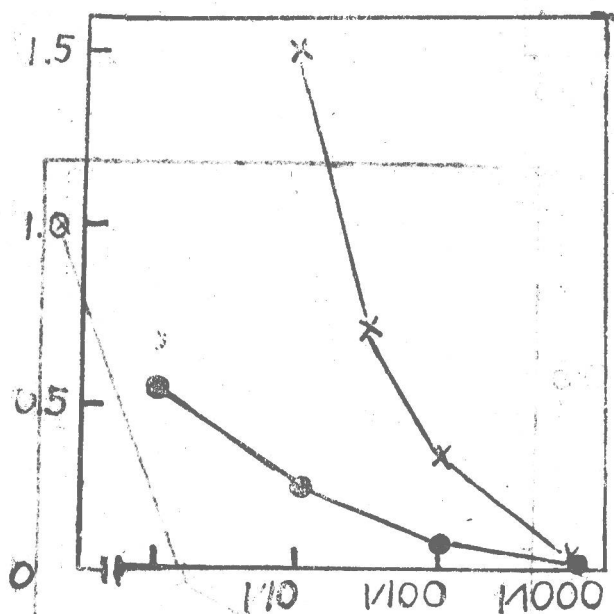


图4. 在405nm的吸光率是使用酶联免疫吸附测定法对辣椒叶片组织(●—●)和提纯的黄瓜花叶病毒(x—x)悬浮物的粗浸出物进行稀释测定而得到的。其结果是两个实验的平均数。CMV原浸出物(1:100, w/v)用相同的无病毒辣椒的提取液稀释。提纯的CMV(最初浓度0.68mg/ml)用pH9.0, 0.005M borate缓冲液加1%乙二胺四乙酸(1%EDTA)稀释。

表1. 吸光率 (A405nm) 的比较是使用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 和肉眼对接种后 3 和 6 周感染黄瓜花叶病毒的辣椒症状进行测定而得到的

黄瓜品系或 栽培品种	在下列时间内的症状和ELISA吸光率			
	3周		6周	
	肉眼测定	A405nm	肉眼测定	A405nm
43	中间型	0.100	中间型	0.085
18	"	0.160	"	0.180
66	易感型	0.230	易感型	0.160
68	"	0.280	"	0.300
39	"	0.300	"	0.250
13	"	0.390	"	0.190
21	"	0.400	"	0.150
31	"	0.410	"	0.350
Zohar	"	0.410	"	0.350
Maor	高度		高度	
	易感型	0.430	易感型	0.410
Agronomico-9	高度		高度	
	易感型	0.450	易感型	0.440

对健壮植株的吸光率校正后, ELISA 结果至少是来自10棵植株数据的平均数。r—球蛋白用缓冲液稀释倍数是1:500; 结合抗血清稀释倍数是1:2000, 植株浸出液的稀释倍数是1:200。最初CMV—抗血清的滴定率正如用环状界面沉淀素检验的结果一样是1:2.050。

表2. 405nm的吸光率对照表是使用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 和肉眼对接种后1周和5周感染马铃薯病毒辣椒的症状进行测定而得到的

品系或栽培品种	在下列时间内的症状和ELISA吸光率			
	1周		5周	
	肉眼测定	A405nm	肉眼测定	A405nm
Maor	无症状	1.384	易感型	0.316
197	"	0.849	抗性型	0.082
198	"	1.010	"	0.106
199	"	1.131	"	0.196
201	"	1.134	中间型	0.214

对健壮植株的吸光率校正后, ELISA 结果至少是来自10棵植株数据的平均数。接种后1周检验所做的稀释是: r—球蛋白用缓冲液稀释倍数1:100; 抗体血清1:200; 植株浸出液1:100。接种后5周所做检验稀释是: r—球蛋白用薄层缓冲液稀释