

植物病毒血清学 技术

梁训生 张成良 张作芳 编



农业出版社

植物病毒血清学技术

梁训生 张成良 张作芳 编

农 业 出 版 社

内 容 简 介

本书全面地介绍了植物病毒的抗原、抗体、抗原与抗体反应的基本概念和原理；植物病毒提纯、抗血清制备以及应用的方法，其中包括近些年来发展起来的酶联免疫吸附测定等二十多种各类血清学检测技术的原理和实验细则。对最近使用的蛋黄抗体（IgY）和单胞系抗体的制备方法也作了相应的描述。附录中列举了植物病毒抗原纯化和抗血清制备的实例，以及试验过程中常用器具的洗涤、灭菌和溶液的配制方法等，便于读者查阅参考。

本书可供高等院校及专业技校从事生物、微生物和植物保护专业工作的师生，以及农、林、牧业从事植保、森保和检疫工作的科研人员及生产干部参考。

植 物 病 毒 血 清 学 技 术

梁训生 张成良 张作芳 编

* * *

责任编辑 胡志江

农业出版社出版（北京朝内大街130号）

新华书店北京发行所发行 农业出版社印刷厂印刷

850×1168毫米32开本 9.25印张 221千字

1985年12月第1版 1985年12月北京第1次印制

印数 1—2,706册

统一书号 16144·3030 定价 1.75元

前 言

近十多年来，随着现代科学技术的不断发展，免疫生物学进展迅速。它已从生物的器官、组织及细胞水平的研究，发展到了亚细胞结构，并深入到分子水平的研究。

在免疫生物学的发展过程中，以医学领域中的血清学进展最快，植物病毒领域中的血清学发展较慢，因此植物病毒血清学仍属于免疫生物学领域中的一门年青学科。近代，又有人将这门学科列入了新兴的植物免疫化学范畴。

植物病毒血清学的应用研究，时间虽然不久，但是它却在科研和生产中有着无限的生命力。正如马铃薯病毒抗血清，早在50年代，就为荷兰等国的植物检疫及良种繁育部门所应用。目前已在许多国家的良种繁育田、植物检疫苗圃和检疫口岸广泛采用。对杜绝检疫病毒病害的输出与输入起着积极的快速诊断作用。

我国植物病毒血清学技术，在科学工作者们的辛勤劳动下，虽然对水稻普通矮缩病毒、小麦丛矮病毒、马铃薯X及Y病毒、烟草花叶病毒、大白菜上的芜菁花叶病毒、玉米矮花叶病毒等抗血清方面开展了许多应用研究工作，获得一定的成果。但是到目前为止，国内尚无较完善的植物病毒血清学技术方面的参考书。

为了有助于植物病毒学及植物免疫化学的发展，我们收集并参阅了国内、外有关植物病毒抗血清方面的资料，特别是近年来的先进成果，结合我们的实践体会，编写了此书。

在本书编写过程中承蒙曹华林、沈淑琳、陈长余、杜宝善、

李文蔚、胡伟贞、陆家珏、郑志刚及魏哲轩等同志给予了鼓励与支持，帮助并提供有关资料，审阅或修改了有关部分文稿，并提出宝贵意见，在此一并致谢。

由于编者水平有限，书中的缺点和错误，殷切希望读者批评指正。

编 者

目 录

前 言

一、植物病毒血清学概念	1
二、抗原	8
(一) 抗原的定义	8
(二) 抗原的基本类型	8
(三) 构成抗原的基本条件	11
(四) 抗原的一般性质	13
(五) 抗原结构及其抗原性	16
(六) 植物病毒抗原的制备	20
三、抗体	39
(一) 免疫球蛋白的种类和结构	39
(二) 抗体的产生	47
(三) 植物病毒抗血清的制备	57
(四) 植物病毒免疫母鸡制备蛋黄抗体 (IgY)	71
(五) 单胞系 (单克隆) 抗体及其制备	73
四、抗原—抗体反应	80
(一) 抗原—抗体反应的特点	80
(二) 抗原—抗体反应原理	83
(三) 稀释液和稀释法	87
(四) 抗原—抗体最适比值及其测定	89
(五) 血清学试验的应用	91
五、植物病毒血清学试验技术	94
(一) 试管沉淀试验	94
(二) 玻片凝集试验	99
(三) 环状界面凝集试验	101

(四) 毛细管沉淀试验·····	103
(五) 微量沉淀试验·····	104
(六) 定量沉淀试验·····	106
(七) 免疫扩散技术·····	108
(八) 免疫电泳技术·····	139
(九) 对流免疫电泳技术·····	150
(十) 火箭免疫电泳技术·····	152
(十一) 间接血球凝集试验·····	154
(十二) 炭凝集试验·····	166
(十三) 皂土絮凝试验·····	169
(十四) 乳胶凝集试验·····	172
(十五) 荧光抗体技术·····	176
(十六) 补体结合试验·····	200
(十七) 放射免疫测定技术·····	207
(十八) 酶联免疫吸附法·····	209
(十九) 免疫电子显微镜法·····	222
附录一 植物病毒的提纯方法·····	225
附录二 制备植物病毒抗血清的参考项目·····	250
附录三 试验器皿的洗涤与消毒·····	266
附录四 溶液的配制方法·····	273
附录五 离心速度和离心力的换算·····	280
附录六 蛋白质含量测定法·····	282
附录七 常用度量衡表·····	288

一、植物病毒血清学概念

在公元 16 世纪以前，我们的祖先就开始接种牛痘，预防天花，这是人类在医学上应用免疫学的开端。免疫现象是人或热血动物对侵入自己机体的异物物质作斗争的一种自卫保护反应。当具有抗原性的异物物质进入人或动物的机体内，这种异物物质就刺激机体产生一种相应的抗体。这种相应的抗体通过一系列复杂的过程来消灭侵入机体内的有害异物物质，从而获得免疫性。抗原与相应的抗体具有专化性，并且可以在机体内、外产生专化性的结合。

人们利用异物物质抗原与相应抗体在机体外的专化性结合反应，鉴定异物物质。由于抗体存在于血清中，所以含有抗体的血清称为抗血清。抗原的提纯、抗血清的制备与应用就构成了这门具有现代化水平的血清学。

异物物质抗原，除包括生物的细胞及其研磨物、自溶物或提取物外，还包括病毒、细菌、真菌、毒素、类菌原体及立克次氏体等，此外还包括许多种大分子的物质，如蛋白质、蛋白质多糖复体、脂蛋白多糖复体、多糖及多肽等。由于这些物质在动物的血液中可以产生相应的抗体，当析出含有这种抗体的抗血清时，就可以鉴定专化性异物物抗原的存在情况。不仅能定性，往往也能定位和定量。以植物病毒为对象的抗血清，称为植物病毒抗血清。没有经过任何异物刺激的正常健康动物的血清，称为正常血清。正常健康植物的组织或蛋白等制备的抗血清，称为正常植物

抗血清。

植物病毒抗血清的研究，首先是 Purdy Beale (1928) 将侵染烟草花叶病毒 (Tobacco mosaic virus, TMV) 病株的汁液注射到动物体内，获得了与 TMV 起专化性反应的抗血清，说明 TMV 就是病株中的专化性抗原。随后，Gratia (1933) 证明了一些植物病毒是具有抗原性的，并且可以制备出专化性抗血清。Birkeland (1934) 及 Chester (1935) 等证明，凡相关的植物病毒或相关的植物病毒株系，所制备的抗血清均可以相互起专化性反应。从而认为可以根据病毒血清反应来确定植物病毒的分类系统。随着现代植物病毒与血清学研究技术的发展，不仅植物病毒血清学可以应用到植物病毒分类鉴定上，而且在植物检疫、快速诊断及测报防治上均有广泛的前景。

将植物病毒抗原物质注射到动物机体以后，刺激机体产生一系列的免疫反应。包括产生抗体和致敏免疫活性细胞的作用，属于抗原的免疫原性。同时还包括抗原与相应抗体产生专化性的反应，属于抗原的反应原性。如果抗原具备了免疫原性及反应原性就称为完全抗原。如果抗原中仅有反应原性就称为不完全抗原。

植物病毒是核蛋白。多数植物病毒属于完全抗原。不是整个的核蛋白分子均起着抗原的作用，而是核蛋白分子上的抗原决定簇起着作用。这些抗原决定簇称为抗原结构。不同种植物病毒的粒体表面所具有的抗原结构是不相同的。而相关植物病毒的粒体表面，必然具有一定数量的共同抗原结构，这就体现了抗原的专化性。

植物病毒的抗体，是机体通过植物病毒抗原所刺激产生的一组特殊免疫球蛋白。到目前为止，已发现 5 种免疫球蛋白，即免疫球蛋白 G、M、A、D 及 E (简称 IgG、IgM、IgA、IgD 及 IgE)。具有抗体活性的主要是免疫球蛋白 G。抗体球蛋白常通过

脾脏、骨髓、肺和淋巴等组织的某些细胞来合成。抗体主要存在于血清、组织液及分泌物中，产生的基础是巨噬细胞。抗体的主要功能是与相应的植物病毒抗原产生专化性结合反应。在多数情况下，抗体对机体是有益的，在一定程度上能解除或减弱相应病原微生物或毒素的为害作用，所以说抗体的产生，实际上是保卫机体的一种专化性免疫反应。

随着生物化学与分子生物学的发展，认识到抗原和抗体均与蛋白质密切相关，抗原和抗体均属于蛋白质结构与功能的重要组成部分。因此，植物病毒的抗原与相应抗体的专化性结合，实质上就是免疫化学反应。

植物病毒抗血清反应包括下列几个类型：

（1）中和反应：属于植物病毒蛋白的一种中和反应。使植物病毒的汁液与植物病毒抗血清中的抗体充分结合，当抗体过量时，可以将所有的植物病毒抗原全部吸收掉。这样的植物病毒汁液中已没有病毒粒体存在，因此失去侵染性。此种反应不仅可以对植物病毒进行定性，还可用于定量的测定。此法应用较早，目前特别适用于植物组织培养或原生质体培养的侵染性试验。

（2）凝集或沉淀反应：在介质中，将一系列稀释度的抗原（病毒）以及一系列稀释的抗体（抗血清）分别混合。当两者的稀释比例适合时，就出现凝集或沉淀反应，以两者在最适比值时的反应最快，出现的凝集或沉淀量也最多。有人认为这种现象与凝集素有关。此类反应中，包括常用的玻片凝集反应、试管沉淀反应、琼脂扩散反应，还包括现代的免疫电泳等。此类方法的灵敏度为毫克水平。

（3）致敏、吸附抗体或抗原：血凝反应系致敏的红血球与抗原（或抗体）结合，然后再与相应的专化性抗体（或抗原）进行抗血清反应。由于抗原（或抗体）结合了大量的肉眼易见的红

血球，形成了红血球—抗体—抗原的大聚合物，这样就提高了分辨力。吸附反应系利用抗原或抗体先吸附碳粉、皂土或乳胶粒等，然后再与相应的专化性抗体或抗原进行抗血清反应。同样可以提高分辨力。因此这类的反应灵敏度较高，一般可达到微克水平。这类方法适用于植物病毒的定性与定量测定，但是方法繁琐。

(4) 标记抗体或抗原：荧光抗体反应系通过适当的荧光素与抗体先结合后，再与相应的专化性抗原进行抗血清反应。这种反应专化性最强，适用于植物病毒的定性及定位，特别适用于组织培养病毒的侵染与增殖等方面的研究。但是操作繁琐，有时出现非专化性荧光反应。同位素标记反应，系同位素标记到抗体或抗原上，再进行抗血清反应。根据标记进行追踪，便于定性、定位。此法灵敏度很高，由于设备条件要求严格，安全性差，一般很少采用。近几年来，新发展了酶联免疫吸附试验，系将酶标记在抗体或抗原上，通过酶联免疫吸附的血清反应学进行植物病毒的定性、定量测定。此法专化性强，灵敏度很高，与同位素标记近似，可以达到毫微克水平。此法要比同位素标记法安全，要求设备简单，操作方便，国内已有专门生产此试验所需的仪器、设备和化学试剂，为该技术应用用于植物病毒研究创造了条件。

(5) 补体结合反应：补体是正常血清中存在的一种不抗热的物质，它参与植物病毒抗血清的反应过程。一对是植物病毒抗原与其相应的抗体系统；另一对是红血球抗原与其相应的溶血素抗体作为颜色指示系统。当这两对系统在同一容器内进行抗血清反应时，由于利用补体的多少不同，使指示系统的红血球溶血表现的红色深浅不一，从而进行定性或定量。其灵敏度接近于吸附抗体法。此法应用较早，方法繁琐，有时操作不慎易出现非专化性颜色反应，目前采用不多。

在应用植物病毒血清学技术的过程中，总会遇到一些实际问

题。应吸取前人经验，减少不必要的试验反复与损失，以便早日达到试验的目的。

在植物病毒抗原的提纯过程中，Van Regenmortel 曾经指出：“要防止在提纯的植物病毒中混杂具有抗原性的植物蛋白质，否则制备出来的抗血清，必定混杂着寄主植物的抗体，影响试验结果”。

值得注意的是，有些植物如茄科植物的汁液中含有对免疫动物有毒害的物质，因此这些植物的病毒汁液要通过加温等进行澄清。但是在澄清的过程中往往又会损失大量病毒。

有关植物病毒的侵染性与抗原性问题，Bauden 等及 Stanley 认为植物病毒的侵染性与抗原活性未必相关；另一方面，通过紫外线照射的植物病毒，尽管病毒钝化，但是并不影响抗原的活性。Markham 及 Smith 指出：“离心的芜菁黄色花叶病毒汁液，无论是含有核糖核酸(RNA)的底层组分，还是不含有核糖核酸的上层组分，它们均具有同样的血清学反应”。Bawden 认为，血清学的活性可能出现两种极端的情况：具有高度侵染性的植物病毒提纯汁液可能没有抗原，说明提纯液中仅有核酸，没有蛋白；另一种情况则相反，具有良好血清学活性的植物病毒提纯汁液，并不具有侵染性，说明提纯液中仅具有病毒的蛋白，没有核酸。综上所述，植物病毒的侵染性与抗原性不是完全相关的。看来，植物病毒的核酸决定着侵染性，蛋白外壳决定着抗原性。

由于植物病毒抗血清具有高度的专化性，受病植株无论是显症还是隐症，无论是动物或植物的传播病毒介体，均可以通过血清学的方法准确地判断植物病毒的存在与否、存在的部位和存在的数量等；对植物病毒的定性、定量，对植物病毒侵染过程中的定位、增殖与转移等均起着快速诊断的作用。因此在现代化农业技术中，特别在植物病害诊断、病毒鉴定和检疫的应用上都有很

大的价值。

近几年来,随着学科间的相互渗透与衔接,已了解到植物病毒与动物的病毒,特别是与昆虫病毒,它们彼此相关,在分类系统上有着密切的血缘关系。在植物病毒种间与株系间更具有密切的血清学关系。

植物病毒抗血清通过低温冻干或滤纸片吸附等方法能够较长期的保存,这样就为植物病毒科研,植物检疫及生产上的应用带来很大的方便。特别是一些国家将植物病毒抗血清规格化、商品化以后,对抗血清的应用开辟了广阔的前途。在许多国家里,植物病毒抗血清已成为港口或产地植物检疫、良种繁育与复壮,甚至在测报防治中必不可少的重要环节。

植物病毒抗血清虽然应用较广,但是到目前为止还有许多种植物病毒没有找到合适的提纯或制备抗血清的方法。象具有高度专化性昆虫介体的某一些植物病毒,如马铃薯卷叶病毒等极难制成抗血清。分析其原因有以下几个方面:

(1) 繁殖病毒寄主植物的病毒浓度太低,或在提纯过程中病毒损失过多。

(2) 在提纯病毒过程中,通过温度等一系列处理使病毒降解,破坏了病毒粒体表面的抗原结构。

(3) 有的病毒抗原,不能长期忍受免疫动物的体温,在动物体内钝化了病毒,同时影响了抗原性。

(4) 繁殖寄主植物体内富有的单宁类物质,它易与病毒相结合,使其病毒降低或丧失了抗原性。

当然,免疫动物的方法及个体差异等也可能影响着抗原性,因此试验或制备抗血清时,有必要选用适宜的免疫方法和设置一定的重复。

在抗血清反应过程中,经常会出现一些原因不明的非专化性

凝集或沉淀反应等。因此试验的整个过程，均需从各个角度设置对照，如标准植物病毒抗血清对照、正常血清对照、健植株汁液抗血清对照及生理盐水对照等，以便在分析抗血清试验结果时，排除非专化性反应的干扰。但也可以通过辅助试验加以校正。

植物病毒抗血清是植物病毒研究过程中的一项重要手段，近些年来发展迅速。随着现代化科学技术的进展，植物病毒抗血清技术也必然会日新月异。

参 考 文 献

1. 裘维蕃著 1984 植物病毒学 农业出版社
2. 坂口进著 植物免疫化学实验法翻译小组译 1976 植物免疫化学实验法 上海人民出版社
3. 陈仁著 1965 免疫学 人民卫生出版社
4. 斯图尔德著 施秉仪译 1979 免疫化学 科学出版社
5. 方中达编 1979 植病研究方法 农业出版社
6. 哈伯尔等编著 中国科学院微生物研究所病毒学基本技术翻译小组译 1976 病毒学基本技术
7. 中山大学生物系生化微生物学教研组编 1978 高等学校教学参考书《生化技术导论》 人民教育出版社
8. Adrian Gibbs 1976 Plant virology the Principles
9. Kado et al. 1972 Principles and Techniques in Plant Virology
10. A. B. R. Beemster et al. 1965 Viruses of Plants
11. Matthews 1970 Plant Virology
12. K. M. Smith 1977 Plant Viruses (Fifth Edition)
13. 武谷健二编著 1973 免疫生物学 朝仓书店
14. 日高醇 1960 《植物ウイルス病》实验法と种类 朝仓书店
15. 明日山秀文等 1967 日本作物ウイルス病总览 日本植物防疫协会
16. 平井笃造等 1977 最新植物病理学概论 东京养贤堂
17. 明日山秀文等 1962 植物病理实验法 日本植物防疫协会
18. 平井笃造等 1978 新篇植物ウイルス学 东京养贤堂

二、抗 原

(一) 抗原的定义

抗原这一名词通常具有两种含义，一种是指通过注射能使动物产生抗体（致敏淋巴细胞的物质），另一种是指能与抗体起反应的物质，即具有抗原专化性的物质。

有一些物质能与抗体起反应，但不能引起动物产生抗体；另外，也有一些物质能引起某几类动物发生免疫反应，但不能使其它几类动物起免疫反应。所以，一般把抗原的定义概括为：凡是能刺激动物机体产生抗体，并能与所产生的抗体进行专化性结合的物质，称为抗原。前种特性叫免疫原性，后种叫做反应原性，这两种特性总称为抗原性。但是，从现代免疫学观点来看，这个定义还并不完全，因为很多抗原除了刺激动物机体产生抗体外，还能产生许多其它免疫效应因子而发挥不同的免疫作用。所以抗原的确切定义应该是：凡能刺激动物机体产生免疫反应的物质，称为抗原。

(二) 抗原的基本类型

1. 根据抗原的抗原性可分为完全抗原和不完全抗原（半抗原）两大类：

(1) 完全抗原：是指这种抗原物质具有免疫原性又有反应

原性。实验证明，极大多数高分子量的抗原物质，都具有这两个特性。

(2) 半抗原：那些单独的没有免疫原性而只有反应原性的低分子量的物质，如核酸、某些脂类、多糖和某些化学药品等叫做半抗原。但是这些低分子量的物质与蛋白质结合形成高分子量的复合物后，获得了免疫原性，这时低分子量的物质单独能与其相应的抗体进行结合。

2. 根据抗原的来源可分为外源性抗原（如病毒、细菌、毒素、花粉、异体蛋白等）和内源性抗原（如病菌侵害等因素引起组织的变态原等）。

3. 根据抗原的化学组成可分为蛋白、糖、脂三类抗原。

(1) 蛋白质抗原：大多数蛋白质都是良好的抗原。天然的蛋白质抗原，通过水解、加热、强烈振荡、强碱、重金属盐类、酒精或乙醚等处理后，其抗原专化性可能改变。当蛋白通过加热或尿素等处理后，破坏了维持分子正常立体结构的链而重新组合，其中氨基酸的链并不受破坏，但是控制氨基酸链折叠方式的侧链则重新组合。如此，在抗原分子上某些原来的抗原决定簇被破坏而出现新的组合，因之，变性蛋白质常失掉大部分或全部原来的专化性，而代之以新的专化性。不同的变性蛋白，在免疫学上常呈现交叉反应，这可能是由于蛋白的原来结构被破坏后，它们又重新组合成较稳定的结构。但是在加热处理时，不同的抗原蛋白所受到的影响不同，如细菌蛋白比血清蛋白耐热，因此一些无动力、无荚膜的细菌抗原，经煮沸后所产生的免疫血清与未加热处理抗原所产生的免疫血清具有相同的抗原性。用加热到120℃持续30分钟（即高压蒸气处理）的家兔血清对家兔进行免疫，所产生的抗血清都能与同种的及其它哺乳类动物的经过高压处理的血清蛋白起沉淀反应。当蛋白质完全凝固时，即失去抗原

性。但是蛋白质的凝固作用逆转，则可重新获得刺激抗体形成的能力。加热时完全凝固的蛋白是比较少的，所以它们多少仍保持抗原性（因为免疫所需蛋白量可能很少）。

强酸与强碱可以减低或破坏蛋白的抗原性，而碱比酸的作用更强。例如蛋白质在室温中经过 5 个当量的盐酸处理 15 个小时后，仍保持一些有效的抗原性；但是，经过 1 个当量的碱处理 16 个小时后，血清蛋白则完全失去抗原性。碱处理过的蛋白质，当以硝酸处理使之变为黄色蛋白质（Xanthoprotein）时，还可重新恢复部分抗原性，但是其专化性发生了改变。此外，用适量的甲醛处理蛋白时，抗原性多不改变，因此这种方法常在免疫实验中采用。但是，蛋白经甲醛处理后，分子电荷发生改变，封闭了自由氨基，而产生甲烯化合物（ $\text{CH}_2=\text{N}-$ ）；其它基（如吡啶核、异吡唑环）与侧链的关系亦可能发生改变。若蛋白质是有生物学活性的，如有毒性作用，经此处理后即可变为无毒性的类毒素，而抗原性变化甚少。在用浓甲醛处理蛋白时，则可能失去其原有的部分专化性，而成为变性蛋白质。

（2）糖类抗原：一般小分子多糖不具有抗原性，而有些大分子多糖可能具有抗原性。

多糖抗原具有稳定部位，多为吡喃糖及呋喃糖。多糖对不同种动物的抗原性不同，如葡聚糖对家兔无抗原性，对人则有抗原性；纯化血型 A 及 B 物质对人是很好的抗原，但对家兔则无抗原性。

（3）类脂体抗原：类脂体是由有机酸与各种醇类所组成的，也包含其它的化学基，如磷酸盐、硫酸盐及含氮盐基等。类脂本身是否有抗原性，看法不完全一致，以前曾认为凡是可被酒精、乙醚及氯仿等溶剂所提取的物质均属于类脂体。实际上，在这些提取物中还存有少量足以引起抗体形成的蛋白质，因此，类