

用琼脂双扩散法检测马铃薯卷叶病毒(PLRV)

王人元 吕文清

(东北农学院植物病理教研室, 哈尔滨)

APPLICATION OF AGAR-GEL DOUBLE DIFFUSION TEST TO THE DETECTION OF POTATO LEAFROLL VIRUS (PLRV)

Wang Ren-yuan Lu Wen-qing

(Department of Phytopathology, Northeast Agricultural College, Harbin)

马铃薯卷叶病毒(PLRV)早已在1916年发现,但由于植株体内病毒的浓度极低,提纯十分困难,使得血清学检测的研究进展很慢。1974年日本Murayama等^[5]首次制备了高效价的抗血清,也仅能与提纯的病毒制剂起反应。以后瑞士Gugerli^[2]、荷兰Maat等^[4]、美国Clarke^[1]和Hepp^[3]等以及张鹤龄等^[8]虽也相继制备出抗血清,但均不能用琼脂双扩散法进行检测,必须将病毒进行提纯或半提纯后才能见到反应沉淀线,使得这种方法的应用受到了限制。本文报道了用琼脂双扩散法检测植株体内经简单浓缩的PLRV。

材料和方法

抗血清是由日本北海道大学Kojima提供的血清冻干粉,效价为1/2048(环状沉淀反应),用生理盐水稀释。

被检测材料为田间采集的具有典型卷叶症状并经ELISA检测的马铃薯植株下部叶,在马铃薯开花后(7月30日)进行采样。共检测了16个样品,其中与ELISA反应结果一致的为12个。

待测抗原的处理:取叶柄及主脉10克,加入8毫升0.2mol/L磷酸缓冲液,PH7.4,用研钵充分碾碎,将汁液低速离心(6000r/m)15分钟,弃沉淀,下面分两种方法。方法一、PEG浓缩法:向上清液内(约8ml)加入2ml40%PEG(聚乙二醇,分子量6000),内含0.8M NaCl,充分混匀后离心(10000转/分)20分钟,弃上清,加入0.2ml上述缓冲液,充分悬浮后为抗原。方法二、蔗糖透析浓缩法:将上清液倒入透析袋内,然后将透析袋埋于蔗糖粉内,浓缩至约0.5ml为抗原。

本文1986年9月2日收到。

琼脂培养基配方：称取0.75%的琼脂糖粉(agarose)和0.02%NaN₃，溶于0.02M磷酸缓冲液内，PH6.5，倒于培养皿内，冷却后用打孔器打孔(孔径6mm，孔距4mm)。中央孔滴加抗体，四周孔加抗原，置室温下反应24小时后观察结果。

结 果 与 分 析

无论是直接用抗血清还是用提取的r-球蛋白与经简单浓缩后的抗原反应均可产生清晰的沉淀线(见图1)。

不同稀释度的血清与浓缩抗原反应的结果见表1：

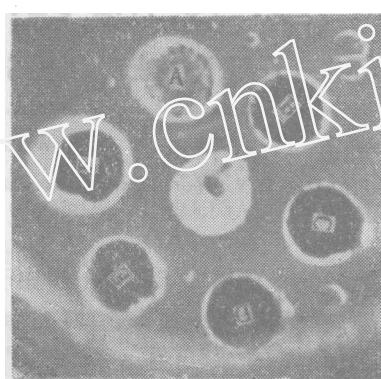


图1 琼脂双扩散试验
A:待测样1 经PEG浓缩
B:待测样1 未经浓缩
C:阴性对照 经PEG浓缩
D:阴性对照 未经浓缩
E:待测样2 经PEG浓缩
F:待测样2 未经浓缩
中央孔为稀释1/8的抗血清

Fig.1 Agar-gel double diffusion test
A:sample 1 concentrated by PEG
B:sample 1 not concentrated
C:negative check concentrated by PEG
D:negative check not concentrated
E:sample 2 concentrated by PEG
F:sample 2 not concentrated
Central well: antiserum diluted to 1/8

表1 不同稀释度的血清与抗原反应结果
Fig 1 The results of serum and antigen reaction in different dilution

抗 原	血 清					
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
PEG 浓缩	+	+	+	+	-	-
蔗糖透析浓缩	+	+	+	+	-	-
未经浓缩	-	-	-	-	-	-
健康对照(经浓缩)	-	-	-	-	-	-

*+可见反应沉淀线 -无反应沉淀线

由表1可见，将血清稀释1/2、1/4、1/8、1/16倍后与经过简单浓缩的抗原反应均可产生反应沉淀线，超过1/32倍以后无反应沉淀线，而与未经浓缩的抗原及健康对照均不产生反应沉淀线。两种简单浓缩法的结果一致。

结 论 与 讨 论

用琼脂双扩散法可以直接检测马铃薯植株体内的PLRV，但由于植株体内的病毒浓度极低，必须将其进行简单浓缩后才能见到反应沉淀线。两种浓缩抗原的方法各有长处，建议在离心条件比较好的单位应用PEG浓缩法为好，在离心条件不够好的单位应用蔗糖透析浓缩法为好。

我们认为，简单浓缩抗原的方法简便易行，对于那些植株体内浓度极低的病毒（如大麦黄矮病毒BYDV、甜菜潜隐病毒BCV等）的琼脂扩散法检测，可以作为借鉴。

参 考 文 献

- (1) Clarke, B.C., 1981, *Am. Potato J.* 58:291-298.
- (2) Gugerli, P., 1979, *Phytopathol. Z.* 96:97-107.
- (3) Hepp, R. G., et al., 1978., *Am. Potato J.*,55:125-139.
- (4) Maat, D.Z., et al., 1978, *Neth.J.Pl.Pathol* 84 : 149-156.
- (5) Murayama, D., et al., 1974, *Pro.Japan Acad.* 50 : 322-327.
- (6) 张鹤龄等, 1984, 马铃薯(2) : 1-5.