

应用免疫电镜技术快速检测菜豆黄花叶病毒、马铃薯M病毒和燕麦花叶病毒*

陈 剑 平

(浙江省农业科学院病毒学实验室, 杭州 310011)

提 要

应用免疫吸附电镜技术(ISEM)可有效地检测病汁液中的菜豆黄花叶病毒(BYMV)、马铃薯M病毒(PVM)和燕麦花叶病毒(OMV)。BYMV, PVM和OMV三种抗血清的适宜工作浓度和对铜网的适宜包被时间均为1000倍和1小时, 对同源病毒的适宜捕获时间分别为4℃下2、2和8小时。PVM和OMV的病汁液检测灵敏度均为稀释4000倍, 而BYMV病汁液稀释16000倍时还能检测到少量病毒粒子。ISEM捕获法和修饰法的结果表明, 这三种病毒之间无血清学交叉反应。

关键词: 免疫吸附电镜 检测 菜豆黄花叶病毒 马铃薯M病毒 燕麦花叶病毒

菜豆黄花叶病毒(Bean Yellow Mosaic Virus, BYMV)粒子长约750nm, 属马铃薯Y病毒组, 马铃薯M病毒(Potato Virus M, PVM)粒子长约650nm, 属香石竹潜病毒组。这二种病毒都由蚜虫以非持久性的方式传播, 汁液接种也很容易, 在世界范围内都有分布^[2,16]。燕麦花叶病毒(Oat Mosaic Virus, OMV)粒子长约600—750nm, 属大麦黄花叶病毒组^[9], 由土壤中禾谷多粘菌*Polymyxa graminis* L.传插, 能用汁液接种, 但较困难, 此病至今只分布在美国、英国和新西兰^[4]。对于这三种病毒, 快速、灵敏、特异的检测技术是需要的。免疫吸附电镜(Immunosorbent Electron Microscopy, ISEM)技术由Derrick^[3]首次应用于植物病毒学以来, 因其检测灵敏度高、方法简单, 且能直接观察所检测的病毒粒子而不是反应产物, 克服了假阳性反应, 因而发展很快。本文报道应用ISEM对上述三种线状病毒的检测, 并对检测条件进行一些探讨。

材 料 和 方 法

一、病毒 BYMV(RG₂株系)和PVM毒源均由P. Jones(洛桑)提供, 分别摩擦接种蚕豆*Vicia*和蕃茄*Lycopersicon esculentum*(PVM的系统感染但无症状寄主)。接种二星期后, 蚕豆新叶上表现花叶症状, OMV按Adams等^[1]方法摩擦接种, 并置于人工气候室培养, 一个月后部分植株表现花叶症状。取各病株的叶片, 作为本研究的毒源。

本文于1990年5月28日收到, 6月20日修回

*本工作在英国洛桑试验站完成。P. Jones提供抗血清和部分病毒, S. Robert帮助洗印照片, 在此一并致谢。

二、抗血清 BYMV (RG₂株系), PVM和OMV的兔抗血清均由P. Jones提供。

三、ISEM捕获法

1. 抗血清包被铜网: 将新制备的喷有碳膜的铜网, 膜面朝下, 漂浮于 20 μ l 经 0.05 mol/L 碳酸钠缓冲液 pH9.6 稀释 1000 倍的抗血清上, 室温下孵育 1 小时, 然后用 ISEM 缓冲液 (0.03 mol/L 磷酸缓冲液 pH7.0, 含 0.1 mol/L EDTA) 漂洗铜网 2 次, 每次至少 5 分钟, 漂洗后用滤纸吸去铜网表面多余的缓冲液, 使之仅留下一层薄薄的液面。

2. 病毒的捕获 将经抗血清包被的铜网, 膜面朝下, 漂浮于滴在石蜡板上的 20 μ l 病汁液 (0.1 克病叶加 5ml ISEM 缓冲液, 用研钵研碎) 上, 4 $^{\circ}$ C 下保湿孵育, BYMV, PVM 和 OMV 分别孵育 2、2 和 8 小时, 然后每个铜网均分别用 20 滴重蒸水轻轻冲洗, 并用滤纸吸干。

3. 病毒粒子负染及观察 将经第 1、2 步处理的铜网, 分别用 5 滴 1% 磷钨酸 pH7.0 负染, 滤纸吸干, 待干燥后置 PHILIPS 201 电镜观察, 并在 30000 倍下统计任意 20 个视野/铜网中的病毒粒子数量。

四、ISEM 修饰法 继 ISEM 捕获法第 1、2 步后将铜网漂浮在 20 μ l 经 ISEM 缓冲液稀释 20 倍的抗血清液滴上, 室温下孵育 30 分钟, 20 滴重蒸水冲洗、吸干后再进行捕获法第 3 步处理。

结 果

一、包被抗血清适宜工作浓度的确定

将 BYMV、PVM 和 OMV 的抗血清分别经包被缓冲液稀释成 40、200、1000、5000、25000 等 5 种浓度, 并以包被缓冲液为对照。铜网在各种浓度的抗血清或缓冲液上于室温下均孵育 1 小时, 然后在同源病汁液上 4 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时, 经负染后置电镜观察, 二次重复, 结果表明, 三种抗血清对其同源病毒捕获的最适工作浓度均为稀释 1000 倍, 其中以 BYMV 抗血清捕获到的粒子最多 (293/20 个视野), OMV 次之 (60.5/20 个视野), PVM 较少 (24/20 个视野), 分别是对照的 75、16 和 12 倍 (对照中 BYMV, OMV 和 PVM 20 个视野中所检测的病毒粒子分别为 4、1.5 和 2 个)。随着抗血清浓度增大或缩小, 抗血清对同源病毒的捕获能力均迅速下降。当抗血清浓度增大到稀释 40 倍时, BYMV, PVM 和 OMV 抗血清对其同源病毒的捕获能力分别仅为对照的 21、6 和 7 倍。反之, 当浓度缩小到稀释 25000 倍, 三种抗血清对同源病毒捕获能力均几乎丧失 (图 1)。因此, 我们选择以稀释 1000 倍作为这三种抗血清包被的适宜工作浓度。

二、抗血清包被铜网适宜工作时间的确定

以稀释 1000 倍的 BYMV, PVM 和 OMV 的抗血清分别包被铜网, 包被时间均分别为室温下 1/12, 1/6, 1/2, 1, 2 或 4 小时, 然后再在 homologous 病毒汁液上 4 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时, 经负染后置电镜观察, 并以浸出法为对照, 二次重复, 结果表明, 在抗血清包被 1/12 到 1 小时时间范围内, 三种抗血清所捕获到的病毒数量均随包被时间延长而迅速增加, 包被 1 小时所捕获到的粒子数量 20 个视野中 BYMV, PVM 和 OMV 分别为 363, 30 和 63 个, 分别是浸出法的 45、8 和 16 倍 (图 2), 当抗血清包被时间超过 1 小时, 所捕获到的病毒粒子数均随着时间的延长而变化不大, 达到饱和状态。因此, 我们选择以包被 1 小时作为这三种抗血清的适宜包被时间。

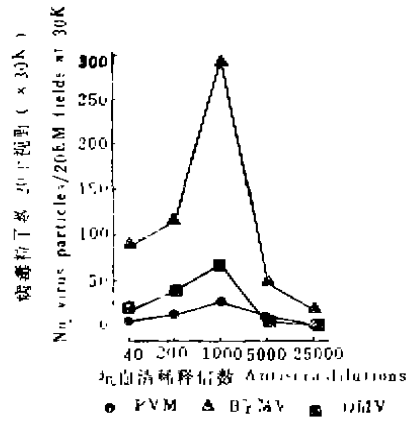


图1 三种抗血清对其同源病毒捕获的适宜工作浓度
Fig1. Suitable dilution of the three antisera for trappings of their homogenous viruses

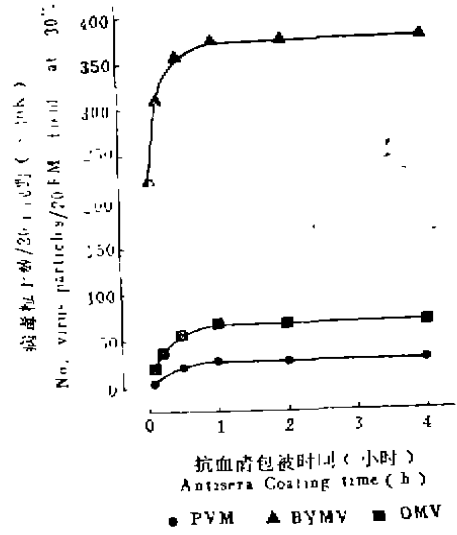


图2 三种抗血清对其同源病毒捕获的适宜包被时间
Fig2. Suitable coating time of the three antisera for trappings of their homogenous viruses

三、病毒捕获的适宜工作时间的确定

以均为稀释1000倍, 包被1小时BYMV、PVM和OMV抗血清的铜网分别捕获同源病毒, 在4℃下捕获时间分别均为1/4、1/2、1、2、4、8和16小时, 经负染后置电镜观察, 并以浸出法作为对照, 二次重复, 结果表明, 三种抗血清对其同源病毒的捕获数量均与捕获时间呈正相关, 但三种抗血清对病毒的捕获速度和能力则各自不同(图3), 其中以BYMV抗血清的捕获速度最快, 前2小时内所捕获到的病毒粒子数量递增很快, 以后就变化不大。PVM抗血清对同源病毒的捕获速度与BYMV相似, 前2小时内所捕获到的病毒粒子数量随时间递增较快, 以后递增速度就变慢, 但其捕获能力明显小于BYMV抗血清。相比之下, OMV抗血清对其同源病毒的捕获速度比较稳定, 在前8小时内, 所捕获到的病毒粒子数均随时间延长而缓慢增加, 即使是捕获时间从8小时延长到16小时, 病毒

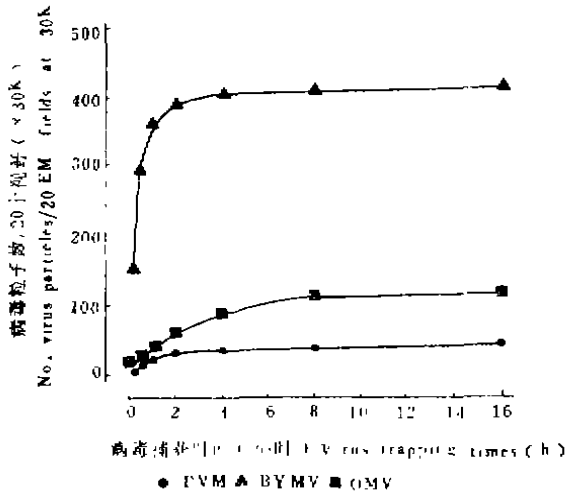


图3 三种抗血清对其同源病毒的适宜捕获时间(4℃)
Fig3. Suitable trapping times of the three antisera for their homogenous viruses at 4℃

粒子数量仍有所增加。因此, 我们选择BYMV、PVM和OMV三种抗血清对各自同源病毒的适宜捕获时间分别为4℃下2、2和8小时。

四、三种病毒抗血清检测各自同源病毒的灵敏度

以稀释1000倍的BYMV、PVM和OMV三种抗血清分别包被铜网1小时,然后于4℃在下各自同源病毒汁液上分别孵育2、2和8小时。三种病汁液的稀释倍数均为500、1000、2000、4000、8000和16000倍等6种浓度。经负染后置电镜观察,并在3万倍下统计任意100个视野/铜网中的病毒粒子数,二次重复,结果表明,PVM和OMV的检测灵敏度均为4000倍,而BYMV在稀释16000倍时还能检测到少量病毒(表1)。

表1 应用ISEM检测病汁液中PVM、BYMV和OMV的灵敏度
Table 1. Detective sensitivities of PVM, BYMV and OMV in diseased leaf saps by ISEM

汁液稀释倍数 Sap dilutions	PVM		BYMV		OMV	
	铜网1	铜网2	铜网1	铜网2	铜网1	铜网2
	grid 1	grid 2	grid 1	grid 2	grid 1	grid 2
500	70*	55	580	575	180	155
1000	30	35	315	355	115	80
2000	7	15	135	265	50	45
4000	3	2	85	120	4	11
8000	0	0	20	30	0	0
16000	0	0	8	3	0	0

*放大30000倍下100个电镜视野中所检测到的病毒数

*No. of virus particles checked in 100 EM fields at magnification of 30K

五、三种病毒之间的交叉反应

1. 捕获反应:用分别包被1000倍BYMV、PVM和OMV抗血清1小时的铜网分别孵育于三种病汁液,4℃下2~8小时,并以浸出法为对照。二次重复,结果表明(表2)抗血清与同源病毒处理后所观察到的病毒数量高于抗血清与异源病毒处理的数十倍;抗血清与异源病毒处理所观察到的病毒数量与浸出法差不多,说明三种抗血清均只能捕获其同源病毒,而与异源病毒不发生交叉反应。

表2 三种抗血清对其同源病毒的捕获作用
Table 2. Trappings of the three antisera to their homogeneous and heterogeneous viruses by ISEM

病汁液 Diseases leaf saps	抗血清				Antisera to		浸出法	
	PVM		BYMV		OMV		Leaf dips	
	铜网1	铜网2	铜网1	铜网2	铜网1	铜网2	铜网1	铜网2
	grid 1	grid 2	grid 1	grid 2	grid 1	grid 2	grid 1	grid 2
PVM	51*	94	4	2	3	7	3	5
BYMV	12	9	375	402	14	12	8	8
OMV	3	7	5	5	88	73	2	6

*放大30000倍下任意20个电镜视野中所检测到的病毒粒子数

*No. of virus particles in 20 EM fields at magnification of 30K

2. 修饰法: 用分别包被1000倍的BYMV, PVM和OMV抗血清的铜网分别孵育于三种病汁液, 后分别在同种抗血清(稀释20倍)室温下孵育半小时, 经负染后置电镜观察, 结果表明, 只有抗血清与同源病毒才有强烈的修饰反应(图版VI 4 A、B、C), 而与异源病毒之间不发生修饰反应。

讨 论

BYMV, PVM和OMV均为线状病毒, 形态也相近, 但它们分别属于不同的植物病毒组, 血清学性质彼此不相关。PVM感染番茄后不表现症状^[16]。迄今为止, 有关OMV的报道较少, 此病毒只感染燕麦, 并在植株中含量很低, 直接电镜检查不大容易。我们建立的ISEM技术能有效地检测这二种病毒。BYMV感染寄主后, 病毒含量较高, 直接电镜观察比较容易, 但此病毒的不同株系, 在血清学上存在有很大差异^[2], 所以, 应用ISEM, 根据所检到的病毒数量和修饰及反应程度, 可以协助鉴定不同的株系。

在前人的一些报道中, 用0.05mol/L Tris-盐酸缓冲液pH7.2^[3,11,12]、0.1mol/L磷酸缓冲液pH7.0^[7,8]或0.06mol/L磷酸缓冲液^[14,15]稀释抗血清均能获得理想结果。在我们的实验中, 使用ELISA实验中所用的包被缓冲液, 结果也很好。当不同抗血清稀释1000倍左右时, 所捕获到的病毒粒子均为最多, 而稀释倍数较低时, 所捕获到的病毒粒子较少, 这可能是血清中的非免疫球蛋白和免疫球蛋白竞争吸附碳膜表面, 从而抑制了病毒的有效捕获^[7,11,12]。这种抑制与抗血清的效价无关^[7], 其程度因不同病毒而有差异^[10]。用提纯免疫球蛋白代替完全血清, 即使浓度较高, 也不出现这种抑制现象^[6]。有人报道, 在室温下将铜网在抗血清上孵育5分钟, 就可吸附所有抗体^[8,13], 我们的比较试验表明, 适当延长孵育时间至1小时, 所获得的结果更佳。当铜网包被抗血清后, 在捕获病毒前, 用缓冲液漂洗铜网这一步也是必要的。因为这一步可以除去多余的抗血清, 使捕获作用仅在吸附于铜网上的抗体与病毒之间发生, 从而捕获作用更加有效。

样品制备方法和样品与铺有抗血清的铜网反应是获得理想结果的关键步骤。尽管0.05mol/L Tris-盐酸pH7.2^[3], 0.1mol/L磷酸缓冲液pH7.0^[8]和0.06mol/L磷酸缓冲液pH6.5^[14]均是常用的ISEM缓冲液, 但用于病毒提纯的抽提缓冲液可能更为合适。在有些寄主-病毒体系中, 由于病汁液植物蛋白酶(主要是羧肽酶)的作用, 从而导致病毒的降解, 以致电镜检测不到病毒或结果不理想。例如, 在*Solanum lacineatum*和小苍兰属植物的病汁液中, 用电镜检测不到BYMV粒子, 只有当缓冲液中加入0.1—0.2mmol/L的苯甲基磺酰氟时, 才能检测到此病毒。我们在ISEM缓冲液中加入适量的EDTA, 也是为了抑制汁液中一些植物氧化酶对病毒的降解作用。在较低的温度条件下捕获, 病毒在铜网中分布比较均匀。不同病毒, 抗血清对其捕获速度各有差异, 在我们的实验中, BYMV抗血清对其同源病毒的捕获速度较快, 在短时间内就达到饱和, 相比之下, PVM和OMV抗血清对各自同源病毒的捕获速度要慢得多。这与其他工作者用其他病毒所做的工作结果类似^[5,15]。

参 考 文 献

- [1] Adams M. J. et al., 1986, *Ann. appl. biol.* 109: 561—572.
 [2] Bae L., 1970, *CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 40.*
 [3] Derrick K.S., 1973, *Virology* 56: 652—653.
 [4] Hebert T.T. et al., 1975, *CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 145.*
 [5] Lesemann D.E., 1982, *Acta Hortic.* 127: 159—173.
 [6] Lesemann D.E. et al., 1980, *Acta Hortic.* 110: 119—129.
 [7] Lesemann D.E. et al., 1980, *J. Gen. Virol.* 48: 257—264.
 [8] Milne R.G. et al., 1977, *Marmarosch K. and Koprowaki H. (eds), Methods in Virology, Vol. 6.* Academic Press, New York, pp265—281.
 [9] Murrant A.F. et al., 1986, *CMI/AAB Descriptions of plant viruses.*
 [10] Nicolaieff A. et al., 1980, *Ann. Virol. Inst. Pasteur* 131E: 95—110.
 [11] Paliwal Y.C., 1977, *Phytopathol. Z.* 89: 25—36.
 [12] Paliwal Y.C., 1979, *Phytopathol. Z.* 94: 8—15.
 [13] Robert I.M., 1981, *Proceeding AAB workshop on electronmicroscope serology, John Innes Institute, Norwich, England,* pp10—12.
 [14] Robert I. M. et al., 1980, *Ann. Appl. Biol.* 96: 187—192.
 [15] Robert I. M. et al., *Ann. Appl. Biol.* 93: 189—197.
 [16] Wetter C., 1972, *CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 87.*

Rapid Detection of Bean Yellow Mosaic Virus, Potato Virus M and Oat Mosaic Virus Using Immunosorbent Electronmicroscopy

Chen Jian-ping

(Virology Laboratory, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences,
Hangzhou 310021)

Bean yellow mosaic virus (BYMV), potato virus M (PVM) and oat mosaic virus (OMV) were rapidly detected in infected leaf extracts using immunosorbent electron microscopy. The suitable dilution and time for coating the three antisera in carbon coated grids were 1000 and 1 h at room temperature. The suitable trapping time for BYMV, PVM and OMV were 2, 2 and 8 h respectively at 4°C. The detective sensitivities in leaf saps were 4000 dilutions for PVM and OMV, and a few virus particles could still be seen at the dilution of 16000 of BYMV infected leaf sap. No cross reaction happened among these 3 viruses by trapping and decorating tests.

Key words: Immunosorbent electronmicroscopy Detection Bean yellow mosaic virus Potato virus M Oat mosaic virus