维普资讯 http://www.cqvip.com

第6卷第4期
1991年11月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol.6 No.4
Dec. 1991

水仙病毒血清学研究

I. 水仙花叶病毒抗血清的制备及其应用

谢瑛辉 郑祥洋 林奇英

（福建农学院病毒室，福州，350002）

提 要

经人工接种分离纯化的水仙花叶病毒（NMV），以表现局斑的苋色藜叶片为提纯材料，经聚乙二醇（PEG_{6000}）沉淀、差速离心和蔗糖密度梯度离心提纯后，进行6次家兔免疫注射制备抗血清。结果表明注射后3周左右效价最高，经毛细管沉淀方法测定可达1：5,000。用琼脂双扩散方法将此NMV抗血清与来自荷兰的NMV抗血清进行比较，结果发现二者的抗体性相同。应用此法制成的NMV抗血清，以琼脂双扩散、ELISA方法分别对30份水仙组培脱毒试管苗样本进行带毒率检测。结果表明所测得的平均带毒率分别为33.3%和80.0%，并用IEM测定方法验证了ELISA结果的可靠性和准确性。

关键词： 水仙花叶病毒 抗血清 制备与应用

水仙花叶病毒（Narcissus mosaic Virus, NMV）几乎发生于世界所有的水仙产区[1]。近年来在我国也相继报道了该病毒[2,3]、且据作者的田间调查研究发现，该病毒是福建水仙产区的主要病毒之一。为了给生产上和检疫部门提供大量抗血清，用于检疫和检测各种脱毒水仙样本，以期向生产上供应大量水仙无毒苗或脱毒苗，作者进行了NMV抗血清的制备及其应用研究。

材料与方法

一、病原提纯材料： 以采自产区混合感染的水仙病叶经人工接种分离纯化后，在苋色藜上表现为局斑的叶片作为病毒提纯材料。

二、抗血清检测材料： 以福建农学院园艺系组培室提供的30份水仙组培脱毒试管苗样本（1～3个叶片）为检测对象。

三、抗原制备： 取苋色藜局斑叶片250克置于－20℃冰箱中冷冻24小时后，以2：3（W/V）的比例加入0.1mol/L（pH7.8）磷酸缓冲液（内含0.2% Na_2SO_3），捣碎榨汁，经PEG沉淀、差速离心和蔗糖密度梯度离心后所得的提纯病毒制剂作为抗原，具体步骤如下：

本文于1990年12月18日收到，1991年3月6日修回

本课题为福建省科委和中国花协资助项目，荷兰C. J. Acijes博士赠送了NMV抗血清，谨致谢忱。

维普资讯 http://www.cqvip.com

处理好的材料250克
↓ 加入375ml 0.1mol/L PBS（pH7.8）捣碎，过滤
榨出液
| 加入15%氯仿，充分搅拌，4000r/m 15min
↓弃沉淀　↓上清液
| 加入6%PEG_{6000}，0.2mol/L NaCl，搅拌溶解，置4℃过夜，12000r/m 30min
↓弃上清液　↓沉淀
| 用少量生理盐水洗涤，4000r/m 30min
↓弃沉淀　↓上清液
| 35000r/m 2h.
↓弃上清液　↓沉淀
| 按原液每100ml加入5ml生理盐水，充分洗涤，5000r/m 30min
↓弃沉淀　↓上清液
| 用20～50%蔗糖密度进行梯度离心，30000r/m 3h.
↓非病毒部分　↓病毒沉降带
| 40000r/m 2h，进行蔗糖洗脱
↓弃上清液　↓沉淀
| 加入少量0.1mol/L（pH7.8）充分洗涤，5000r/m 30min
↓弃沉淀　↓上清液（即为提纯病毒抗原）

提纯抗原用日立557型紫外-可见分光光度计进行紫外扫描，并经负染后在日立JEM-100CX电镜下观察。

健株材料作用同样处理为对照。

四、抗血清制备：从1990年3月6日开始将上述制备的抗原分6次进行家兔免疫注射。前4次为肌肉注射（每次注射将抗原与等量的Freund不完全佐剂均匀混合，共4ml），每次间隔1周，随后进行2次静脉注射（分别为1.0和2.0ml），其间间隔4天。此后分别于4月15日、25日、30日采血，析出抗血清，以毛细管沉淀方法测定其效价。

五、抗血清的血清学特性分析：配好1.0%琼脂（内含0.1%NaN_3），在琼脂凝胶板上打3个孔穴，使它们成为等边或等腰三角形的3个顶点，然后分别加入NMV抗原、制备好的NMV抗血清和荷兰提供的NMV抗血清，室温下24小时后观察结果。

六、组培脱毒试管苗的检测：分3次取组培脱毒试管苗样本各10份。第一次样本研磨后的稀释倍数为1：1（w/v），后两次样本榨出液的稀释倍数则为1：3(w/v)。将每份样本进行血清学检测。

1. 琼脂双扩散测定：配好1.0%琼脂（内含0.1%NaN_3），以制备好的抗血清（稀释100倍）为抗体，置于中央孔穴中，组培脱毒试管苗的榨出液为抗原，置于周围小孔中，24小时后观察结果。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2. ELISA检测：以脱毒试管苗榨出液为抗原，以制备好的抗血清（稀释500倍）为抗体，辣根过氧化酶标记羊抗兔IgG（卫生部北京生物制品研究所出品），为酶标抗体（使用浓度以商品化产品的说明为准，即将该产品稀释1000倍），以自制的抗血清处理过的水仙榨出液为阴性对照。用DG_{3022}型酶联免疫吸附检测仪（国营华东电子管厂出产）进行间接法检测。

3. IEM检测：采用Derrik技术与装饰法相结合的方法[4]进行制样，在JEM-1200CX电镜下观察，以验证ELISA检测的可靠性。

结 果

一、病毒提纯制剂的紫外吸收和电镜观察

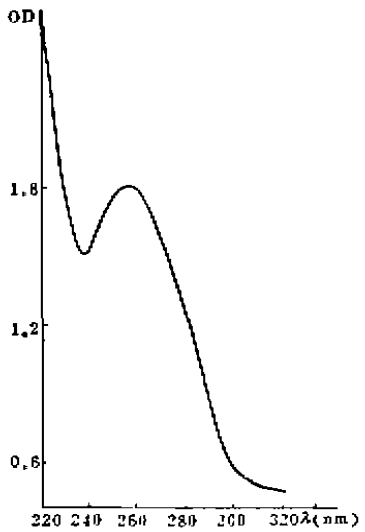

图1 提纯病毒的紫外吸收光谱

Fig. 1 UV absorbance of the purified virus

提纯抗原的紫外吸收光谱具典型的核蛋白吸收峰（图1），最大吸收波长为260nm，最小吸收波长为240nm，$A_{260/280}=1.442$。电镜下病毒粒体为线状，大小在550×13nm（图版Ⅴ 2）。

二、抗血清效价测定

用毛细管沉淀方法测定所制备的抗血清的效价，结果表明，以注射后约3周时的效价最高，可达1：5000（表1）

三、抗血清的抗体特性

从图版Ⅴ 3可以看出，我们制备的NMV抗血清（Ab_1）和荷兰NMV抗血清（Ab_2）在琼脂扩散中，与我们提纯的抗原（Ag）所产生的沉淀线完全愈

表1 毛细管沉淀法测定不同时间采血的抗血清的效价

Table 2 Titre of antiserum by precipitin reactions in capillary pipettes

免疫时间（天）periods of immune-injection(day)	抗血清稀释度 dilutions of antiserum									
	1/8 1/100	1/16 1/200	1/32 1/500	1/64 1/1000	1/128 1/2000	1/256 1/5000	1/512 1/10000	1/1024 1/20000	1/2048* 1/50000**	CK_d
10*	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
20**	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−
25**	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−

* 为免疫10天的抗血清的稀释度

Dilutions of antiserum 10 days after immunization

** 为免疫20、25天后的抗血清的稀释度

Dilutions of antiserum 10 and 25 days after immunization

维普资讯 http://www.cqvip.com

合，说明两个抗血清的抗体性是一致的。

四、水仙组培脱毒试管苗的检测

1. 琼脂双扩散测定：将琼脂双扩散的沉淀分为明显（++）、微弱（+）和无沉淀（－）三级（图版Ⅴ4）。测定结果表明，30份样本的带毒率在20～50%，平均为33.3%（表2）。但以4月28日的样本的带毒率为最高，这可能与该次样本榨出液的稀释倍数较低有关，说明这些组培脱毒试管苗并非真正脱毒，而只是起到降低病毒浓度的作用。

表2　琼脂双扩散测定水仙组培试管苗的带毒率

Tab. 2　Detection of rate of virus-carried specimens of tissue culture plantlets by agar-gel immunodiffusion

测定时间 test date	样品序号 specimen orders										带毒率(%) virus-carried specimens(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
4.28.	+	++	－	－	－	+	－	－	++	+	50
5.14.	－	－	－	－	－	－	－	+	+	－	20
5.23.	－	+	++	－	－	－	+	－	－	－	30

2. ELISA检测：水仙组培脱毒试管苗经ELISA间接法测定指出，其带毒率在70～90%，平均为80.0%，仍以4月28日样本的带毒率为最高，但差异不如琼脂扩散的大，这与ELISA检测的灵敏度高有关。

表3　ELISA测定水仙组培试管苗的带毒率

Fig. 3　Detection of rate of virus-carried specimens of tissue culture plantlets with ELSIA

测定时间 test date	样本序后 specimen orders										带毒率(%) virus-carried specimens(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
4.30.	+	+	－	+	+	+	+	+	+	+	90
5.17.	+	－	－	+	+	+	－	+	+	+	70
5.25.	－	+	+	+	+	+	+	+	－	+	80

3. IEM检测：在电镜下可以看到经抗体捕获聚集的抗原粒体（图版Ⅴ5），30份样本的测定结果与ELISA相似，说明本试验中所采用的ELISA方法是可靠的。

讨　论

一、抗血清的制备及其特性

我们经过人工接种分离纯化后，以苋色藜褪绿斑叶片作为NMV提纯材料，经聚乙二醇（PEG_{6000}）沉淀、差速离心和蔗糖密度梯度离心后，可获得相当纯净的NMV抗原，经家兔免疫后，获得了高效价的抗血清。

将制备好的NMV抗血清与来自荷兰的NMV抗血清进行比较，经琼脂扩散测定表

维普资讯 http://www.cqvip.com

明，二者的抗体性完全一致，说明我们所分离的NMV与荷兰的NMV相同。Brunt也报道过他所分离的NMV可与荷兰水仙花叶病分离株的抗血清起反应[6]，这说明NMV不存在血清型的差别。不过Koenig曾报道过NMV所用的繁殖寄主可能会对NMV抗血清的异源反应产生一些影响，他发现从千日红上制备的抗原所产生的抗血清比从克利夫兰烟上制备的抗原所产生的抗血清具有较低的同源反应和较高的异源反应[6]。

二、水仙分生组织培养管苗的检测

应用分生组织培养进行脱毒一直是人们努力的目标，在水仙上有许多成功的例子[7-9]。其中检测手段是这一技术能否成功应用于生产的关键所在。在我们所试验的三种检测方法中，琼脂扩散虽然灵敏度低，但由于其操作简便，且对抗原和抗血清的纯度要求不高，因此在初检时有一定的应用价值，尤其是对水仙这样一类受多种病毒混合感染的作物更是如此。

ELISA作为检测培组脱毒试管苗是一种理想的方法，其灵敏度高，且可克服试管苗材料少的缺点，在试管苗培养早期便可淘汰选择，但该方法需要严格设置阳性对照，而目前生产上和实验室内尚未发现无毒的水仙满足这一要求，故我们在进行该试验的同时，自制了水仙病毒混合抗血清，并用该混合抗血清去吸收水仙榨出液，离心去除沉淀物后，再以这种处理过的水仙榨出液作为ELISA检测水仙组培试管苗试验的阴性对照。

为了验证上述ELISA检测的可靠性和准确性，同时探索其它检测方法，我们将同样的样本进行了灵敏度与ELISA相似甚至更高的检测手段——免疫电镜（IEM）[4]。结果表明用我们制备的混合抗血清处理过的水仙榨出液作为ELISA检测的阴性对照是可行的。IEM作为检测试管苗也是一种很好的方法，除了用料省、灵敏度高等优点外，此方法无需阴性对照，可克服ELISA的局限性，但其需要复杂昂贵的设备，从而限制了它在生产上的广泛应用。

参 考 文 献

〔1〕 Mowat, W. P., 1971, CMI/AAB. Description of Plant Viruses, NO.46
〔2〕 谢光元，1985，福建农学院学报，14(2)：171—176.
〔3〕 谢联辉等，1987，植物病理学报（摘要）17(1)：145
〔4〕 田波等，1987，植物病毒学技术，第252—254页，科学出版社.
〔5〕 Brunt, A. A., 1966, *Ann. Appl. Biol.* 58(1): 13—23
〔6〕 Koenig, R., 1975, *Phytapathologishe Zeitschrift* 84(3): 193—200.
〔7〕 Mowat, W. P., 1980, *Acta Horticulturae* 109: 513—521.
〔8〕 Stone, O. M., 1973, *Ann. Appl. Biol.* 73(1): 45—52.
〔9〕 Brunt, A. A. et al, Ann. Rep. Glasshouse Crops Res. Inst. 1983(1984): 109—116.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Studies on the Antisera to Narcissus Viruses

1. The Preparation and the Use of Antiserum to Narcissus Mosaic Virus

Xie Lian-hui Zhen Xiang-yang Lin Qi-yin

(Lab. of Plant Virology, Fujian Agricultural College, Fuzhou, 350002)

Narcissus mosaic virus (NMV) was obtained from the mixed infected narcissus plants and purified from the inoculated leaves of *Chenopodium amaranticolor*. The procedures of purification involved precipitation with 6% PEG (M. W. 6000), differential centrifugation and 20—50% sucrose density-gradient centrifugation.

After 6 times of immune injection to rabbit with the purified preparation of NMV, an antiserum was prepared with a titre of 1:5000 tested by precipitation reactions in capillary pipettes about 4 weeks after the final injection. The antiserum was compared with an NMV antiserum come from Netherlands(presented by Dr. Asjes) by agar-gel immunodiffusion and showed that the properties of the two antisera are the same.

The prepared antiserum was used to detect NMV in the narcissus plantlets of tissue culture and showed that in the 30 specimens the virus-carried specimens are 33.3% in agar-gel immunodiffusion, 80.0% in ELISA, 70—80% in IEM respectively.

Key words: Narcissus Mosaic Virus Preparation and use of antiserum

维普资讯 http://www.cqvip.com

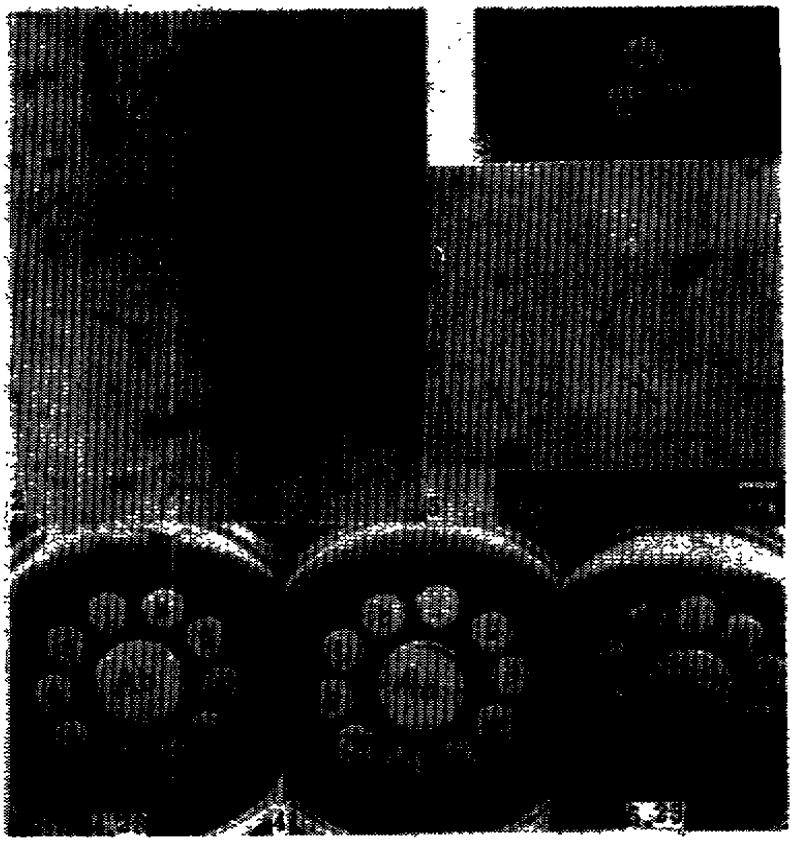

图2 提纯病毒的电镜粒体（30000×）

Fig.2 Electron micrograph of purified virus

图3 中国NMV抗血清与荷兰NMV抗血源的抗体性比较

Fig.3 Comparison of antibodies of NMV-antiserum from China with NMV-antiserum from Netherlands

图4 水仙组培脱毒苗的琼脂双扩散测定

Fig.4 Detection of virus-carried specimens of tissue-culture plantlets by agar-gel immunodiffusion

图5 水仙组培脱毒试管苗的IEM粒体

Fig.5 Detection of virus-carried specimens of tissue-culture plantlets by IEM