

由上述的一些应用可见光散射技术, 不仅能获得分子的大小和形状, 而且可测量平动和转动扩散常数, 迁移率等分子的物理化学性质, 它可跟踪溶液中生物大分子的变性过程, 研究聚合和解离和分子之间相互作用的过程。可得到构象变化的有关信息和某些热力学和动力学数据。因此动态光散射是研究溶液中生物分子的一个很有力的工具, 它已发挥和将进一步发挥它的作用。

阮康成、朱林福、张宇, 于德源和杨慧儒等同志参加了本文讨论。

参 考 文 献

- [1] Berne, B. J. et al.: *Light Scattering*, Interscience, New York, 1974.
- [2] Flygrae, W. H. et al.: *Molecular Electro-Optics*, part 1, (Chester T. O'Konski, ed.) Marcel Dekker, INC., New York and Basel, 1976, p. 321.
- [3] Chu, B.: *Laser Light Scattering*, Academic Press, New York, 1974.

- [4] Cummins, H. Z. and Swinney, H. L.: *Light beating Spectroscopy*, in *Progress in Optics*, Vol. 8, Wolf, E. Ed., North-Holland, Amsterdam, 1970, 135.
- [5] Schurr, J. M.: *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 4(4), 371, 1977.
- [6] Ware, B. R. et al.: *Chem. Phys Lett*, 12, 81, 1971.
- [7] Birnboim, M. H. et al.: *Polym. Rept.*, 13, 203, 1972.
- [8] Dubin, S. B. et al.: *J. Chem. Phys.*, 54, 5158, 1971.
- [9] Wang, C. C. et al.: *Biophysical Chemistry*, 439, 1980.
- [10] Gabler, R. et al.: *Biophys. J.*, 15, 747, 1975.
- [11] Schmitz, K. S. et al.: *Biopolymers*, 12, 1543, 1973.
- [12] Wun, K. L. et al.: *Biopolymers*, 14, 111, 1975.
- [13] Olson, T. et al.: *J. Mol Biol.*, 102, 193, 1973.
- [14] Dubin, S. B. et al.: *J. Mol Biol.*, 54, 547, 1971.
- [15] Camerini-Otero, R. D. et al.: *Biochemistry*, 13, 960, 1974.
- [16] Benbasat, J. A. et al.: *J. Mol. Biol.*, 95, 335, 1975.

[本文于 1981 年 3 月 22 日收到]

植物病毒研究中的一些血清学技术

朱本明 徐伟军 熊立民

(中国科学院上海生物化学研究所)

血清学技术也称为免疫学技术, 近十余年来在植物病毒研究中应用较多, 进展较快^[1]。

1928 年 Purdy 首先报道了由患花叶病的烟草植株所得汁液, 包含一种特异的专一性抗原, 而在健株和其他病毒侵染的烟草中却不存在。这些特异的专一性抗原就是植物病毒本身^[2]。

病毒由蛋白质外壳和核酸芯子组成, 病毒的抗原活性部分是外壳蛋白。大多数血清学试验取决于病毒蛋白, 而侵染性试验则由病毒核酸决定。Bawded^[3] 和 Stanley^[4] 指出: 侵染性和血清学活性并不必然有联系^[3,4]。植物病毒血清学研究主要对象是病毒蛋白。

植物病毒血清学技术应用很广, 由于血清反应特异性强和灵敏度高, 可以检测出感病植

物中的微量抗原, 因此可用于植物病毒病的早期诊断和大规模检测种子或块茎中的病毒。如马铃薯 X 病毒。利用已知病毒抗血清可鉴别病毒和了解病毒不同株系之间关系。用血清学技术还可以研究病毒质粒的结构及增殖和在被感染植物组织中的病毒分布, 测定一个病毒制剂中病毒核酸或蛋白质含量和媒介昆虫带毒率。这些方法灵敏、快速、简便、准确, 可用于植物病毒病的综合防治, 在农业生产上具有很大的实用价值。

进行血清学测定, 首先要纯化病毒, 制备出植物病毒抗血清。这些方面可参考有关文献^[2, 5]。下面介绍我们在植物病毒研究中应用的一些血清学技术。

一、沉淀反应

当可溶性抗原与其相应的抗体在溶液或凝胶中彼此相遇时,产生的抗原抗体复合物为不溶性沉淀物。许多血清学技术都是根据这个原理设计的。沉淀反应简单方便、准确可靠,重复性好,通常在试管中进行,我们改用毛细管进行沉淀反应,可以节省材料,达到微量水平,能检测单株是否带毒。

在长度约 40—50 毫米(内径约 1 毫米)的毛细管底部加入一小滴待测植株样品的抽提液(液柱高度约 3—5 毫米),然后再加入相同量的抗血清。尽量保持两者间的界面清晰,以便准确地观察反应结果。加有反应液的毛细管插入可垂直放置的塑料架、每次测定时均用缓冲液代替待测抗原液作为正常对照,一般在 60 分钟内观察沉淀反应结果。在暗室内,用 8 瓦日光灯作为背景,判断有无反应发生。

毛细管沉淀反应已成功地用于检测水稻普通矮缩病毒^[6]和小麦丛矮病毒^[7]。用这种方法检测小麦单株与生物测定法的符合率达 90% 左右,表明完全可以用这种操作简单,反应快速的方法代替准确性较差,测定时间长,工作量大的生物测定法。

二、反向间接血凝法

当抗原和抗体数量过少时,它们就不能形成肉眼可见的抗原-抗体复合物沉淀。若将抗体(或抗原)设法结合在比它体积大 4 万倍的血球表面形成致敏血球时,就只需少量相应的抗原(或抗体),即可使这些致敏血球因抗原抗体结合出现不同程度的血球凝集现象,从而检测出相应的病毒抗原。以检测一平均直径为 100 微米的质粒为例,血凝反应要比沉淀反应灵敏 500 倍^[8]。

由于抗原较抗体易提纯,一般用抗原致敏血球,所以检查抗原时通常用间接血凝法。反向间接血凝法则将抗体按相同手续吸附在红血球上,用来检查相应抗原。我们用反向间接血凝反应检测了小麦丛矮病植株^[7],还成功地用

来测定水稻普通矮缩病传毒昆虫——黑尾叶蝉(*Nephotettix cincticeps* Uhler)带毒率^[6]和小麦丛矮病传毒昆虫——灰飞虱(*Laodelphax striatellus*, Fallem)带毒率^[7]。

抗血清中含有过多杂蛋白,可先用酶水解免疫球蛋白 G(IgG),得到较大的 $F(ab)_2$ 断片和 $F'c$ 断片。其中 $F(ab)_2$ 断片能与抗原分子结合,用它来致敏血球,可以减少抗原与抗体致敏血球反应的空间障碍,使反向间接血凝反应得以顺利进行。下面以检测小麦丛矮病毒为例,介绍这种方法的操作步骤(图 1)。

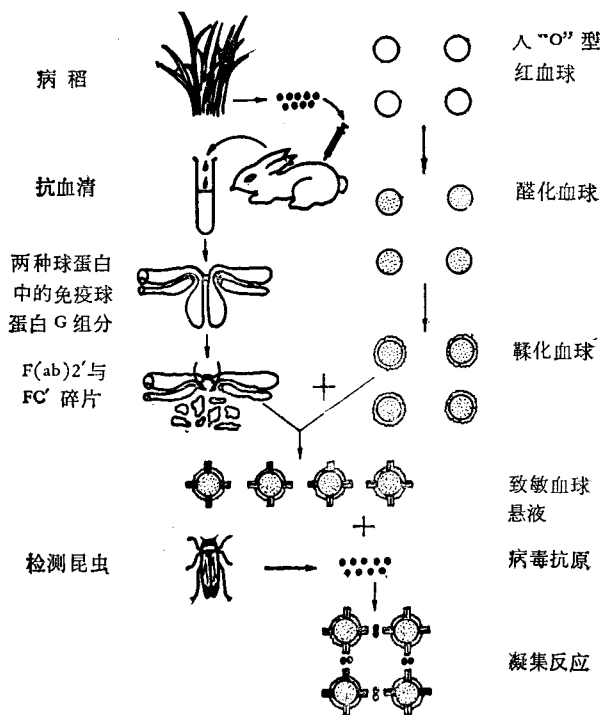


图 1 反向间接血凝反应示意图

1. 提取免疫球蛋白 从小麦丛矮病毒核外壳制备的抗血清,用 40% 饱和度硫酸铵盐析,离心收集沉淀,用生理盐水溶解。使体积大致与原来抗血清相等。再用 35% 硫酸铵盐析二次,将离心收集的沉淀用少量生理盐水溶解,然后对生理盐水透析,直到透析液中无铵离子为止。再对 0.1 M 乙酸铵透析过夜,3000 转/分离心 15 分钟弃去沉淀,上清液即为免疫球蛋白溶液,可测定其蛋白浓度。

2. 用胃酶水解 免疫球蛋白溶液用 1 N 盐

酸调至 pH 3.4。用少量 pH 4.5、0.1 M 醋酸缓冲液溶解胃酶。在每毫升免疫球蛋白溶液中加入 7 个活力单位(以酪蛋白为底物计算)胃酶,于 37℃ 水浴中水解 1 小时,用 1N 氢氧化钠调到 pH 8.0,终止反应。然后再加入用 40% 饱和硫酸铵盐析一次,用 35% 饱和硫酸铵盐析二次,透析后,用无菌安瓿瓶分装抗体,于 -20℃ 低温保存备用。

3. 鞣化血球 在 100 毫升 1% 戊二醛溶液中,轻轻搅拌加入 8 毫升压积血球,4℃ 固定 45 分钟,再依次用生理盐水和蒸馏水各洗 5 次。用无菌生理盐水配成 15% 浓度,加 1/10,000 硫柳汞防腐冷藏。于 0℃—4℃ 保存半年仍可用。

取 1 毫升 15% 鞣化血球,用 20 毫升、pH 7.2, 0.075M 磷酸生理盐水(简称 PBS)离心洗涤 3 次,并用此 PBS 配成 5% 浓度。加 3 毫升 1/10,000 鞣酸液于血球液内,37℃ 保温 50 分钟,每隔 5 分钟充分混匀一次,然后用 5 倍量 pH 7.2 PBS 洗涤 3 次,最后用 pH 6.4、0.075M PBS 离心洗一次后,再用此缓冲液配成 2.5% 的鞣化血球液。

4. 血球致敏 用 2.5% 浓度的鞣化血球与不同抗体浓度反应,找出血球与抗体的合适配比。在 37℃ 水浴中致敏 90 分钟,需经常搅拌混合,于冰箱放置过夜后,2500 转/分离心 15 分钟。先后用 pH 7.2 PBS、含有 1/400 明胶和 1% 正常兔血球的 0.01 M、pH 7.2 PBS 各洗一次,并用后者配成浓度为 2.5% 的血球液,加 1/10,000 硫柳汞防腐,分装于无菌安瓿瓶内,存放在 4℃ 冰箱中备用。

5. 检测小麦单株 取鲜重为 0.05—2.0 克的单株健苗或病菌叶片,用 pH 8.0, 0.3M 甘氨酸缓冲液(内含 0.01 M 氯化镁)抽提,3000 转/分离心 20 分钟。上清液加入聚乙二醇至 6%,氯化钠至 3%,搅拌均匀后于冰箱放置过夜。3000 转/分离心 15 分钟,沉淀用上述甘氨酸缓冲液抽提。取一滴抽取液(约 0.025 毫升)加于微量血凝板孔内,再加一滴致敏血球,在微型混合器中充分混合 1 分钟,37℃ 放置 30 分钟后观

察结果。每次实验都在另一孔内加一滴缓冲液和一滴致敏血球作对照,每次实验对照均为阴性反应。红血球在管底中央呈平滑的圆状或钮扣状者为阴性反应,呈颗粒凝集者为阳性反应,按其反应程度可分为—、±、+、++、+++、++++、六个等级(图 2)。用本法检测的小麦病、健苗与外观表现相比较,符合率平均为 90%。

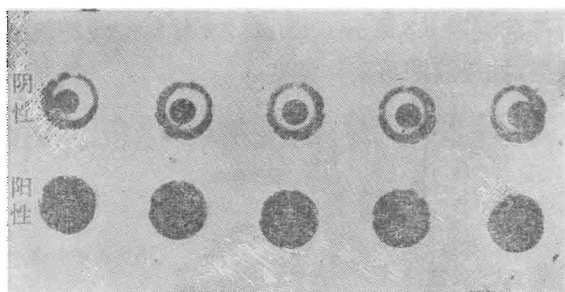


图 2 血球凝集反应示意图

三、酶联免疫吸附测定法

许多重要病毒,由于其浓度低、病毒质粒形态不稳定,或在植物抽提液中存在病毒钝化剂或抑制剂等,使一些血清学技术不能应用。酶联免疫吸附测定法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay 简称酶联法或 ELISA 法)可在很大程度上克服这些限制,因而广泛用于检测和定量测定植物病毒。这是一种具有高度特异性和灵敏性的检测方法。其基本原理是:利用双功能试剂制备抗体(或抗原)与酶的结合物,这种结合物既可保留抗体(或抗原)的免疫学活性,又可保持酶的活性,酶作用于相应而合适的底物溶液所产生的颜色反应可以定量测定。本法能在极低浓度下定量检测特异的抗原(或抗体),其检测水平与同位素放射免疫相仿,适宜于大规模检测用。E. Engvall 和 Van Weemen 等^[10]在 1971 年分别建立 ELISA 方法,1977 年起,开始应用于植物病毒^[11]。我们已应用 ELISA 方法检测小麦丛矮病植株^[12]和地黄黄斑病毒^[13]。现以检测小麦丛矮病植株为例略加说明。

用聚苯乙烯微量血凝板作为吸附抗体和进行反应应用,每块板上有 40 个孔。按前述^[7]制

备小麦丛矮病毒抗血清,用毛细管沉淀反应测定其效价为1:280。抗血清用硫酸铵沉淀,经DEAE-纤维素柱制成免疫球蛋白G。用戊二醛作交联剂,制备免疫球蛋白和碱性磷酸酶的结合物。底物为1毫克/毫升对硝基苯酚磷酸盐。

取待测样品植株叶片340毫克,剪碎后用0.3M甘氨酸缓冲液抽提,每100毫升抽提液加入6克聚乙二醇,3克氯化钠放置过夜,离心后所得沉淀用0.8毫升0.1MpH7.0甘氨酸缓冲液抽提,抽提液即可用作测定。

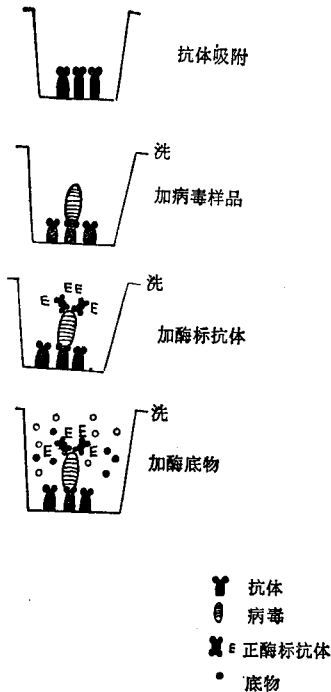


图3 酶联免疫吸附法检测病毒抗原示意图

ELISA 方法检测的操作过程见图3。

将1:2000稀释的抗体溶液200微升分别加入微量血凝板的各个小孔内,冰箱放置过夜。次日用磷酸缓冲液-去垢剂(吐温“Tween”-20)作为洗涤液洗三次。加待测样品200微升,37℃保温2小时再用同样洗涤液洗三次后,加稀释的酶-抗体结合物200微升于各小孔内。37℃保温2小时,再用同样洗涤液洗三次后,加200微升底物溶液于各小孔内。1小时后用50微升3M氢氧化钠溶液中止反应。用微量分光光度计在405毫微米处测定所生成的对硝基苯酚黄

色溶液的光密度值(在一定的病毒浓度范围内,光密度值与病毒浓度成正变关系)。感染小麦丛矮病毒的小麦,看麦娘,元麦植株的光密度值分别为0.95、1.22、0.93,而健麦只有0.10,感染无关病毒——小麦红矮病毒的植株只有0.07以上,结果表明ELISA方法能成功地用于检测小麦丛矮病毒^[12]。

四、测定媒介昆虫带毒率

许多植物病毒都由媒介昆虫传播。测定大田里媒介昆虫带毒率,对大田病情的预测预报和及时采取综合防治措施有重要作用。目前一般都采用生物接种法,将被测单只媒介昆虫饲养在单株健苗上,在温室条件下观察植株是否发病。这种方法工作量大,检定的媒介昆虫数量有一定限制,实验周期长达一月,而且准确性较差。媒介昆虫有间歇传毒现象,若病毒浓度较低不足以引起发病或植株带毒不发病,就得不到正确结果。我们曾用电子显微镜检查生物测定阴性的虫子,发现确有病毒质粒存在。我们用血清学方法(反向间接血凝法和酶联法)测定媒介昆虫带毒率,为植物病毒病预测预报和早期诊断,提供了一种快速准确的测定方法。

用反向间接血凝法测定的具体操作为:取虫子一头,加入pH7.2、0.1M磷酸生理盐水约0.1毫升,匀浆器研磨后,7000转/分离心15分钟,取上清液1滴(约0.025毫升)置于微量血凝板孔内,加致敏血球1滴,轻轻振动混合2分钟,37℃放置30分钟后观察结果。

我们用反向间接血凝法分别测定水稻普通矮缩病媒介昆虫——黑尾叶蝉和小麦丛矮病媒介昆虫——灰飞虱的带毒率,与生物测定法相比,二者符合率分别为86%^[6]和89%^[7]。

如用pH7.5、0.3M甘氨酸缓冲液研磨虫子后离心所得上清液作为样品,用酶联法也可准确地测定灰飞虱的带毒率,与生物测定法相比,二者符合率为86%^[14]。

参 考 文 献

[1] Van Regenmortel M. H. V.: *Ann. Rev. Phyto-*

pathol., 16, 57, 1978.

[2] Smith, K. M.: *Plant Viruses*. Chapman and Hall, 1977.

[3] Bawden, F. C. et al.: *Brit. J. exp Path.*, 17, 204, 1936.

[4] Stanley, W. M.: *Science*, 83, 626, 1936.

[5] 陈作义、朱本明:《生物化学与生物物理进展》, 1977年, 第5期, 第24页。

[6] 中国科学院上海生物化学研究所病毒组等:《生物化学与生物物理学报》, 1978年, 第10期, 第355页。

[7] 中国科学院上海生物化学研究所病毒组等:《生物化学与生物物理学报》, 1979年, 第11期, 第89页。

[8] Rose, N. R. etc: *Principles of Immunology*, 44, 1973.

[9] Engvall, E. etc: *Biochim. Biophys. Acta*, 251, 427, 1971.

[10] Van Weemen etc: *FEBS Letters*, 15, 232, 1971.

[11] Clark, M. F. etc: *J. Gen. Virol.*, 34, 475, 1977.

[12] 熊立民、徐伟军:《生物化学与生物物理学报》, 1980年, 第12期, 第101页。

[13] 朱本明、陈作义:《自然杂志》, 1981年, 第4期, 第3页。

[14] 熊立民、徐伟军:《生物化学与生物物理学报》, 1981年, 第13期, 第5页。

[本文于 1981 年 2 月 20 日收到]

pBR 322 DNA 的 *Hae*III, *Bam*HI 的酶切片段的核苷酸顺序

王 珩 甘人宝 刘定千 李载平

(中国科学院上海生物化学研究所)

DNA 是生物体的遗传物质。蛋白质和 RNA 分子结构信息以及调节基因的信息都编码在 DNA 的特定核苷酸顺序中。搞清楚蛋白质结构密码的编排十分重要, 而且在基因调控和基因组织的研究中同样重要。可以说 DNA 的顺序分析是分子生物学研究中最基本的问题

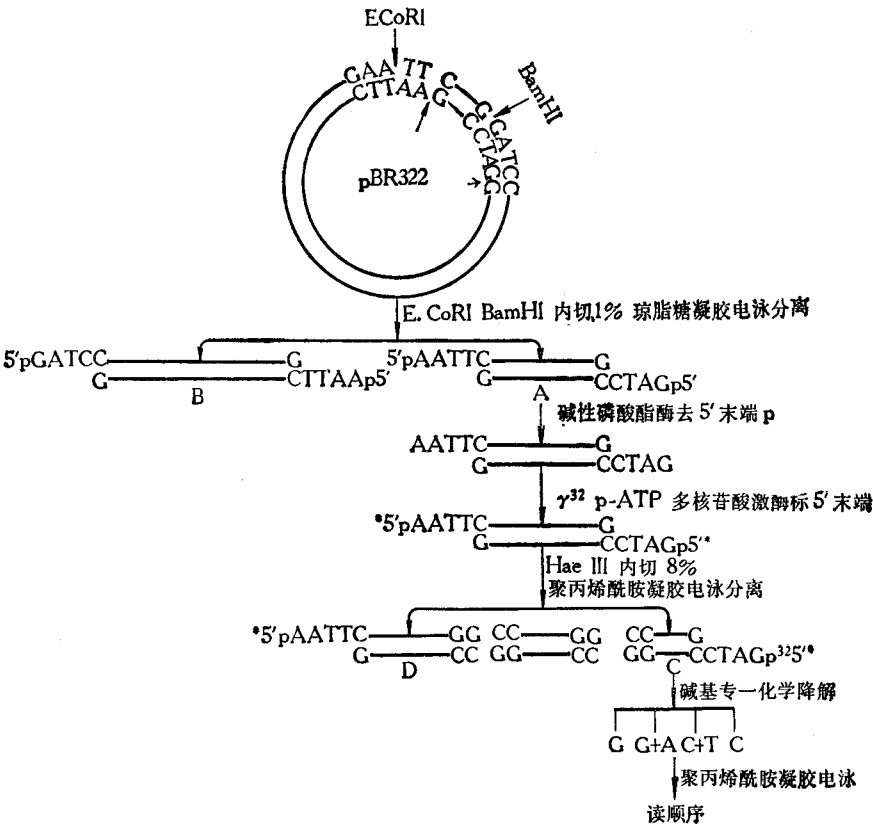


图 1 pBR322DNA 酶切片段的分离标记顺序分析流程