



马铃薯普通花叶病毒抗血清的一种制备方法

内蒙古大学生物系微生物教研室*

(呼和浩特)

抗血清的应用效果主要取决于它的特异性及其滴度。要制备特异性强、效价高的植物病毒抗血清,除提高注射抗原的纯度和浓度外,注射途径的选择也是很重要的。据报道,对同一种动物来说,不同注射途径不仅影响抗体产生的数量和稳定性,而且还影响抗体的特异性^[1]。

近年来,愈来愈多地采用将植物病毒乳化在 Freund 佐剂中进行肌肉注射的方法制备植物病毒抗血清。此法和静脉注射比较,其优点不仅是抗原用量少,而且所产生的抗体在注射后较长时间内保持较高水平。试验结果表明,应用这一方法由马铃薯隐潜花叶病毒(PVS)免疫家兔产生的抗体,能在注射后三个月内保持稳定^[2]。如果用足够数量的稳定的抗原免疫家兔,获得的抗血清效价,可以保持长期不变,每2—3周采血一次,可连续采血一年。有人^[3]曾经应用肌肉注射或肌肉注射结合静脉注射的方法制备马铃薯普通花叶病毒(PVX)、隐潜花叶病毒(PVS)、副皱缩花叶病毒(PVM)、重花叶病毒(PVY)和轻花叶病毒(PVA)抗血清^[4-7]。

为提高马铃薯普通花叶病毒抗血清的效价,应用少量抗原获得大量较高效价抗血清,我们采用 Freund 佐剂肌肉注射的方法免疫家兔,并和静脉注射方法进行了比较,得到一些初步结果。试验证明,将马铃薯普通花叶病毒乳化在 Freund 佐剂中,用肌肉注射的方法免疫家兔,所产生的抗血清效价较之静脉注射为高,能在较长时间内保持稳定,且抗原用量可节省一半,有利于抗血清的生产。这一方法已在 1975 年用于马铃薯普通花叶病毒抗血清的生产。

材料和方法

一、材料

(一) 抗原的制备

马铃薯 X 病毒是中国科学院微生物研究所植物病毒组从男爵马铃薯(Irish cobbler)上分离的,繁殖寄主为普通烟(Nicotiana tabacum)。我们按如下方法制备抗原:取经-20℃冷冻过夜的感病烟叶用绞肉机绞碎,榨汁,纱布过滤,滤液内加入 1M 柠檬酸钠使浓度达 0.05M,加入 1/10 滤液量的氯仿,激烈搅拌 30 分钟,4,000 转/分离心 30 分钟,取上清液,在 0.05M 柠檬酸钠溶液中连续透析两次,每次 12 小时。透析液再在 2,000 转/分离心 20 分钟,取上清液。每 1,000 毫升上清液内加入 190 克硫酸铵,溶解后,室温静置一小时,4,000 转/分离心 30 分钟,取沉淀,用 0.05M 柠檬酸钠使其溶解,2,000 转/分离心除去大颗粒。如此反复盐析三次,直至溶液无色为止。最后在生理盐水内透析 8 小时,供免疫用。

(二) Freund 佐剂的配制

1. 不完全佐剂: 9 份液体石蜡与 1 份羊毛脂混合乳化灭菌,注射前加等量抗原,为使抗原充分乳化在佐剂中,可利用 8—9 号粗针头的注射器来回吸射 50 次,直到滴一小滴乳浊液于水面不扩散时,即可用于注射。

2. 完全佐剂: 每毫升不完全佐剂加 1 毫克卡介苗混合乳化。注射前加等量抗原。

(三) 抗原加卡介苗

每毫升抗原加 10 毫克卡介苗。

(四) 家兔选择

选择体重在 3 公斤以上的健康雄兔。

二、方法

(一) 免疫方法

1. 静脉注射: 对家兔行耳静脉注射,每三

* 试验用的病毒株是由中国科学院微生物研究所植物病毒组分离和供给的,并承内蒙古乌兰察布盟农业科学研究所马铃薯组进行病毒繁殖。

天注射一次，共注射 7 次。每只家兔共注射抗原 20 毫升（第一次 1 毫升，第二次 2 毫升，第三次 2.5 毫升，第四次 3 毫升，第五次 3.5 毫升，最后两次各 4 毫升）。

2. 肌肉注射：①加完全佐剂的抗原；②加不完全佐剂的抗原；③加卡介苗的抗原。每周注射一次，共注射 8.5 毫升（第一周 2 毫升，第二周 3 毫升，第三周 3.5 毫升）。注射部位为家兔大腿外侧臀肌群，两侧各注射一半。

(二) 采血

静脉注射和肌肉注射免疫的家兔，在最末一次注射后一周开始，由心脏采血，测定抗血清效价，每周测定一次，连续测定六周。

(三) 抗血清效价测定

采用试管沉淀反应，测定血清稀释终点。

结果与讨论

为比较不同免疫方法的免疫效果，我们采用以下四种方法免疫家兔：①静脉注射抗原；②肌肉注射抗原加完全佐剂；③肌肉注射抗原加不完全佐剂；④肌肉注射抗原加卡介苗。结果见图 1。

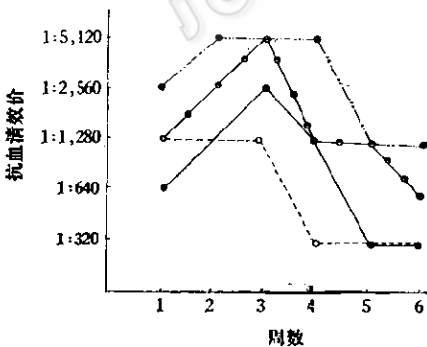


图 1 不同免疫方法对马铃薯普通花叶病毒抗血清效价的影响

从图 1 中可以看出，经静脉注射抗原者，在最末一次注射后第一周抗体效价就达到最高峰（1:1,280），并可维持 2—3 周，到第四周则下降到 1:320。而肌肉注射抗原加完全佐剂者则不同，在最末一次注射后抗体浓度继续上升，第

2—3 周达最高峰（1:5,120），最高浓度可保持 1—2 周，和静脉注射相比，在注射后 2—6 周内，总的抗体浓度都保持在较高水平。也就是说抗血清效价保持较高水平的时间比静脉注射的三周延长约两倍，这和文献上的报道是一致的^[2]。

肌肉注射抗原加不完全佐剂者，抗体浓度和所持续时间均不如注射抗原加完全佐剂者，但较静脉注射抗原者不仅抗血清效价高，且稳定在较高水平。肌肉注射抗原加卡介苗者，注射后第三周抗体效价达到 1:2,560，但随后即下降，到第 5—6 周达到 1:320，和静脉注射者降到同一个水平。

用抗原加入完全佐剂和抗原加不完全佐剂进行肌肉注射，仅需要小剂量抗原，其用量不及静脉注射的一半。

注射 Freund 完全佐剂和抗原之后，反应良好的家兔体温可上升到 39.5—40.5℃。

一般认为佐剂能增强抗原的免疫原性或改变免疫反应类型；延迟抗原在局部破坏，并使之缓慢释放。若将佐剂引流到淋巴结内，则产生抗体的细胞增多。近年研究认为佐剂大多具有刺激动物网状肉皮系统的作用，使这些组织增生，加强了巨噬细胞的吞噬活动，促进了淋巴细胞之间的接触，增强了协同细胞的协同作用，从而增强了免疫反应。

参 考 资 料

- [1] Matthews, R. E. F.: *Plant virology*, p. 475—506, Academic Press, New York and London, 1970.
- [2] van Slogteren, D. H. M. (eds.): *Viruses of potatoes and seedpotato production*, p. 87—101, Centre for Agricultural Publishing and Documentation, 1972.
- [3] Kado, C. I. and Agrawal, H. O.: *Principles and techniques in plant virology*, p. 466—490, New York, VNR, 1972.
- [4] Shepard, J. F. and Secor, G. A.: *Phytopathology*, 59:1838—1844, 1969.
- [5] Sampson, P. J. and Taylor, R. H.: *Phytopathology*, 58:489—493, 1968.
- [6] Shepard, J. F. et al.: *Phytopathology*, 61:874—875, 1971.
- [7] Gnutova, R. V. and Krylov, A. V.: *Phytopathologische Zeitschrift*, 83:311—319, 1975.
- [8] 孟广霖: *微生物学通报*, 1 (1): 29—36, 1974.