

苹果茎沟病毒的提纯和检测*

王小凤 黄 谊 王文慧 刘 骏**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 用生物学和血清学方法从苹果分离鉴定出苹果茎沟病毒 G-2 和 TC-3 分离物, 采用皂土澄清、15% 蔗糖垫超离心、10%~40% 蔗糖梯度离心等步骤, 获得提纯的病毒样品, 紫外吸收比值 $A_{260/280}$ 为 1.15。13% SDS-PAGE 法测定的病毒外壳蛋白分子量为 31000。用提纯的苹果茎沟病毒 G-2 分离物制备的兔抗血清, PTA-ELISA 测定的效价为 1 / 64000, 特异性强。用 PAS-ELISA 可成功地检测出苹果茎沟病毒, 此外还试验了 DAS-ELISA, 并证明其检测苹果茎沟病毒的效果与 PAS-ELISA 一致。

关键词 苹果茎沟病毒, 提纯, 外壳蛋白, 检测

苹果茎沟病毒(Apple stem grooving virus, ASGV)是苹果潜隐病毒之一。根据 ICTV 第 5 次报告, ASGV 被确定为毛发状病毒组(Capillovirus)的典型成员^[1]。该病毒常与其他苹果潜隐病毒(苹果褪绿叶斑病毒 ACLSV, 苹果茎痘病毒 ASPV)一起, 在苹果商业品种中复合感染, 造成苹果的慢性衰退症。已证实以上三种病毒同为苹果“高接病”的病源^[2]。ASGV 在植物粗汁液中的钝化温度较高, 是苹果热处理过程中不易脱除的病毒。ASGV 在梨上的潜隐感染也较普遍, 与苹果上的情况相似, 在砧木不耐病时, 引起梨严重衰退^[3]。近几年在日本和我国均发现柑桔碎叶病毒(CTLV)与 ASGV 有血清学关系^[4, 5], 已有人建议将 CTLV 列入 Capillovirus 组的可能成员。

De Sequeira 等(1969)研究了 ASGV 的提纯方法及基本特性^[6]。1980 年以后, ASGV 的 ELISA 检测方法逐步应用于苹果无病毒苗木的筛选^[7, 8]。我们在 ASGV W-29 分离物研究的基础上^[9], 从苹果分离鉴定出毒力较强的 ASGV G-2 和 TC-3, 改进并完善了提纯和检测方法, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 病毒来源

ASGV G-2 和 TC-3 分别从北京西山农场和辽宁省果树科学研究所提供的苹果材料中分离, S-3 由英国 East Malling 果树站提供, 作为比较研究的材料。

1.2 鉴定

1.2.1 生物学方法: 苹果嫩叶按 1:5 (W / V) 加入磷酸缓冲液, 在研钵中研磨^[9], 用汁液摩擦法接种草本指示植物。感染 ASGV 的昆诺藜粗汁液的稳定性按常规方法测定。

*国家“八五”攻关课题资助。

**河南农业大学 郑州 450002。

本文于 1996 年 4 月 5 日收到。

1.2.2 血清学方法: 用英国 East Malling 果树站提供的 ASGV 抗血清和 PAS-ELISA法^[10] 鉴定。

1.3 提纯

以感染 ASGV G-2分离物的昆诺藜作为主要的提纯材料, 除参照 De Sequeira 等 (1969)^[6]的方法外, 在提纯过程中采用兔抗健昆诺藜蛋白的血清吸附杂蛋白和 15% 蔗糖垫超离心, 最终用 10%~40% 蔗糖梯度离心纯化病毒。

1.4 电镜观察

病毒样品吸附在碳膜加固的火棉胶膜上, 用 2% 醋酸铀负染。免疫吸附电镜制片法参照文献 [11]。在日立 H-500电镜下观察。

1.5 紫外吸收值测定

病毒样品稀释 1 / 1 000 (V / V), 在紫外分光光度计 LKB ULTROSPEC 4050 上测定。

1.6 外壳蛋白分子量测定

13%SDS-PAGE方法参照文献 [12]。标准分子量蛋白(磷酸化酶 b94000, 牛血清白蛋白 67000, 肌动蛋白 43000, 碳酸酐酶 30000, 烟花叶病毒外壳蛋白 17500)为中国科学院生物物理研究所工厂产品。

1.7 抗血清制备

提纯的病毒样品与等体积福氏不完全佐剂(GIBCO)乳化, 免疫家兔, 第 1 次多点注射脊柱两侧和脚趾间, 第 2、3、4、5 次为肌肉注射, 每隔两周注射 1 次, 末次注射 6 周后取血, 分离抗血清。

1.8 SDS-免疫双扩散

0.5% 琼脂(含 0.5%SDS)双扩散法参照文献 [9]。

1.9 ELISA 检测

PTA-ELISA(间接法)^[13]只用于检测昆诺藜粗提液。PAS-ELISA(间接法)^[10]和 DAS-ELISA(直接法)^[14]用于检测昆诺藜和苹果粗提液。DAS-ELISA中所用的 ASGV IgG 提取和辣根过氧化物酶标记方法参照文献 [15]。聚苯乙烯微孔板的反应体积 200 μ l, 反应终止后, 在酶联免疫检测仪 DG-3022 上测 OD_{490} , 一般情况下, P / N(阳性 / 阴性)值 > 2 确定为阳性反应。

1.10 植物粗提液制备

昆诺藜和苹果叶片按 1:5(W / V)加入 PBST(含 0.45% 铜试剂, 2%PVP 44000 和 0.2% 卵蛋白), 研钵中研磨, 低速离心取上清液。如此制备的昆诺藜粗提液可根据需要在较大范围内稀释使用, 苹果粗提液直接用于检测。

2 结果

2.1 生物学特性

2.1.1 寄主范围: 接种草本指示植物的结果见表 1, ASGV G-2在昆诺藜和 TC-3在心叶烟上的症状见图版 F-1, 2。虽然 ASGV G-2, TC-3均感染昆诺藜, 但 G-2在昆诺藜上的症状较 TC-3持久、稳定。它们在心叶烟等其他寄主上的感染情况各异。

2.1.2 汁液稳定性: ASGV G-2, TC-3分离物感染的昆诺藜粗汁液稀释限点为 1 /

1000, 致死温度为 65℃, 室温和 4℃ 下的存活期 8 天以上。

2.2 血清学关系

用 PAS-ELISA 法和 ASGV 抗血清 (East Malling 果树站提供) 测定 G-2 和 TC-3 分离物感染的昆诺藜粗提液, OD_{490} 分别为 0.65 和 1.07, 阳性对照 ASGV S-3 感染的昆诺藜和阴性对照健昆诺藜粗提液 OD_{490} 分别为 0.70 和 0.29, 表明 G-2 和 TC-3 均属于 ASGV 分离物。

2.3 形态

用提纯的 ASGV 样品制片, 在电镜下观察到大量均一、完整的线状病毒颗粒, 其大小与文献 [9] 报道一致 (图版 I-3)。

表1 ASGV分离物的寄主反应

Table 1 Host reaction of ASGV isolates

分离物 Isolates	昆诺藜 <i>Chenopodium quinoa</i>	心叶烟 <i>Nicotiana glutinosa</i>	笋瓜 <i>Cucurbita maxima</i>	四季豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>
G-2	接种叶上产生密集的针状枯斑, 顶叶出现褪绿斑驳, 叶缘反卷、扭曲, 植株生长抑制	系统轻斑驳, 发病率 10%左右	0	0
TC-3	同G-2, 但环境温度偏高时, 系统感染率下降	系统斑驳, 发病率 50%左右	系统极轻斑驳, 发病率低	0
S-3	同G-2	-	-	接种叶红褐色针状斑点及系统坏死症

注: 0不感染; -未试。

Note: 0 No infection; -No test.

2.4 紫外吸收值

病毒样品的 $OD_{260/280}$ 为 1.15, 与文献 [6] 报道一致。病毒浓度用 260nm 的消光系数 $OD_{0.1\%/1cm}=2.7$ 计算, 从 1kg 昆诺藜叶片可提取到 2.7mg ASGV。

2.5 外壳蛋白分子量

13% SDS-PAGE 分析表明, ASGV G-2、TC-3 和 S-3 分离物的外壳蛋白均在相同的位置形成一条带, 根据标准蛋白测出的 ASGV 外壳蛋白分子量为 31000 (图 1)。

2.6 抗血清的效价和特异性

2.6.1 SDS-免疫双扩散: 试验结果表明, 稀释 1/2、1/4、1/8 和 1/16 的 ASGV G-2 抗血清与其抗原之间形成清楚的免疫沉淀线, 当抗血清稀释 1/32 时, 其免疫沉淀线较浅 (图版 I-4a)。此外 ASGV G-2 抗血清只与自身抗原反应产生免疫沉淀线, 不与健昆诺藜粗提抗原反应 (图版 I-4b)。

2.6.2 ELISA 测定: 用 ASGV G-2 感染的昆诺藜粗提液作抗原, 以相应的健康材料作阴性对照, PTA-ELISA 测定的 ASGV G-2 抗血清效价为 1/64000, 此时 OD_{490} 为 0.18, P/N 为 3.6, 最佳工作浓度为 1/2000~1/4000, 此时 OD_{490} 为 1.32~1.10, P/N 为 13.2~13.8。用 ASGV 阳性的富士苹果 143 粗提液作抗原, 以木本指示植物弗吉尼亚小苹果相应的粗提液作阴性对照, PAS-ELISA 测定, 当一抗 1/5000, 二抗 1/2000 时, 测定的 P/N 值 6.96。两种 ELISA 测定一致表明, ASGV 抗血清效价高, 特异性强。

2.6.3 免疫吸附电镜观察: 用提纯的 ASGV G-2 样品及其抗血清 (稀释 1/200), 免疫吸附电镜法, 观察到 ASGV G-2 抗血清与其病毒颗粒之间产生的特异性免疫反应 (图版 I-5)。

2.7 检测

2.7.1 PAS-ELISA 的灵敏度:

ASGV G-2提纯样品稀释成 12~0.005 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 测试。结果表明, PAS-ELISA 检测提纯的 ASGV 的灵敏度为 0.1 $\mu\text{g} / \text{ml}$, 此时的 P / N 值为 3.4, 具有可靠性(表 2)。用 PAS-ELISA 对 ASGV 感染的昆诺藜粗提液的系列稀释液测定的结果如图 2, 在所测的稀释度范围内, P / N 值约 2.6~5.0, 最高测定稀释度在 2.5×10^{-5} 以上。

表2 PAS-ELISA检测提纯ASGV的灵敏度

Table 2 Sensitivity of detection of purified ASGV by PAS-ELISA

Virus concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	病毒浓度	
	ASGV	TMV
0.005	0.14	0.11
0.02	0.16	0.13
0.1	0.44	0.13
0.5	1.07	0.13
1	1.58	0.20
4	1.91	0.16
12	1.98	0.18

2.7.2 DAS-ELISA: 用 DAS-ELISA 对木本指示植物 (*Virginia crab*) 鉴定为 ASGV 阳性的苹果树苗检测, 结果表明这两种方法的阳性符合率为 90%(表 3), 其中 No4 北斗, 用 PAS-ELISA 检测也是阴性, 因此, DAS-ELISA 的检测结果是可靠的。

2.7.3 PAS-ELISA 和 DAS-ELISA 比较: 用 PAS-ELISA 和 DAS-ELISA 对 12 个热处理脱毒的苹果组培苗进行的检测结果表明, 这两种方法检出的 ASGV 阳性率完全一致, 各组数据的 P/N 值也相近, 从而说明它们有同样的灵敏度和可靠性(表 4)。

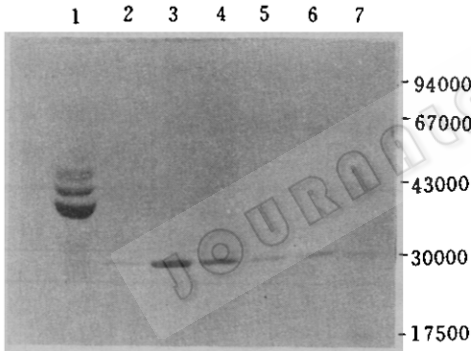


图1 提纯 ASGV 的 13%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 1 13% SDS-PAGE of purified ASGV 考马斯亮蓝染色后显示蛋白带。1. 健昆诺藜蛋白; 2. ASGV TC-3分离物; 3, 4. ASGV G-2分离物; 5, 6. ASGV S-3分离物; 7. 标准蛋白: 磷酸化酶 b, 牛血清蛋白, 肌动蛋白, 碳酸酐酶, 烟花叶病毒外壳蛋白。

The protein bands were visualized by staining with coomassie brilliant blue. 1. Proteins of healthy *C. quinoa*; 2. TC-3 isolate; 3 and 4. G-2 isolate; 5 and 6. S-3 isolate; 7. Protein markers: phosphorylase b, albumin, actin, carbonic anhydrase, TMV coat protein.

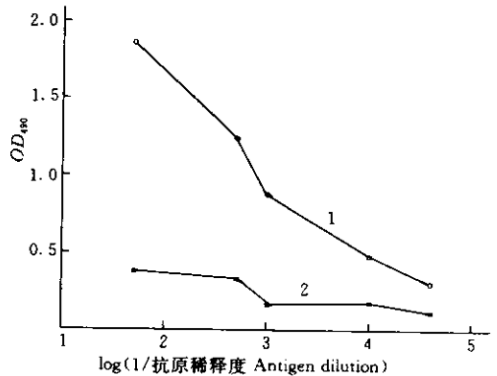


图2 PAS-ELISA检测感染的昆诺藜粗提液中的 ASGV

Fig. 2 PAS-ELISA-the detection of ASGV in crude extract of infected *C. quinoa*

1. ASGV 感染的昆诺藜 *C. quinoa* infected with ASGV; 2. 健昆诺藜 Healthy *C. quinoa*.

表3 DAS-ELISA检测苹果树苗中的ASGV

Table 3 Detection of ASGV in apple seedlings by DAS-ELISA

样品 No.	Sample 名称 Name	OD_{490}	P/N
1	A3 北斗	0.275	2.2 +
2	A8 绿光1	0.445	3.56 +
3	A8 绿光2	0.90	7.20 +
4	北斗	0.16	1.28 -
5	新富士	0.375	3.00 +
6	北9	0.575	4.60 +
7	B9	0.225	1.80 +
8	新嘎拉	0.275	2.20 +
9	P208	0.44	3.52 +
10	R12740-7A	0.125	1.00
阴性对照 Negative control			

注: 1. 样品No.1~9经木本指示植物弗吉尼亚小苹果鉴定, 证明感染ASGV; 2. 加减号代表阳性和阴性反应;
3. 每个样品的 OD_{490} 为两个重复试验的平均值。

Note: 1. Samples No.1~9 were proved to be infected with ASGV by identification on woody indicator *Virginia crab*; 2. '+' and '-' represented positive and negative reactions; 3. OD_{490} value per sample was the average of two repeated tests.

表4 PAS-ELISA和DAS-ELISA对苹果组培苗ASGV检测的比较

Table 4 Comparative detection of ASGV in tissue cultured apple by PAS-ELISA and DAS-ELISA

样品 No. Sample No.	PAS-ELISA		DAS-ELISA	
	OD_{490}	P/N	OD_{490}	P/N
1	0.12	0.67 -	0.22	0.96 -
2	0.43	2.34 +	0.67	2.91 +
3	0.20	1.11 -	0.20	0.87 -
4	0.24	1.33 -	0.19	0.83 -
5	0.41	2.28 +	0.53	2.30 +
6	0.22	1.22 -	0.17	0.74 -
7	0.25	1.34 -	0.16	0.70 -
8	0.27	1.50 -	0.23	1.00 -
9	0.23	1.28 -	0.20	0.87 -
10	0.95	5.28 +	0.69	3.00 +
11	0.98	5.44 +	0.75	3.26 +
12	0.81	4.50 +	0.70	3.04 +
13	0.32	1.78 +	0.59	2.57 +
14	0.18	1.00 -	0.23	1.00 -

注: 1. No.13和14分别为ASGV阳性和阴性对照; 2. 加、减号代表阳性和阴性反应; 3. 每个样品的 OD_{490} 为两个重复试验的平均值。

Note: 1. No.13 and 14 were ASGV positive and negative control respectively; 2. '+' and '-' represented positive and negative reactions; 3. OD_{490} value per sample was the average of two repeated tests.

3 讨论

ASGV G-2和 TC-3分离物在其感染的昆诺藜粗汁液中的温度抗性和存活期与我们以前报道的 W-29分离物^[9]基本一致, 但 G-2和 TC-3的稀释限点为 1 / 1000, W-29的稀释限点只有 1 / 100, 故前者更便于提纯。由于 G-2和 TC-3在心叶烟上的感染率较低, 不感染或轻度感染笋瓜, 因此 ASGV 的提纯寄主首选仍为昆诺藜。

根据我们设计的提纯方法, 从 1kg 昆诺藜叶可提取到 2.7mg ASGV。De Sequeira 等 (1969) 提纯 ASGV 的产量为 2~2.5mg / kg 昆诺藜叶^[6]。因此, ASGV 的提纯得率较低的情况可能较为普遍。

经分析测定, ASGV G-2、TC-3和 S-3分离物外壳蛋白分子量为 31000, 与文献 [16] 报道的 27000 相近。

PAS-ELISA 法灵敏、可靠、广谱, 我们在苹果 ASGV 和 ACLSV 的检测中已推广应用多年^[17]。在此基础上, 我们试验的 DAS-ELISA 检测 ASGV 也是成功的, 并且此方法更为简便。Fuchs 等 (1985)^[7]曾用 DAS-ELISA 检测了大量来自苹果的 ASGV 分离物, 并未发现明显的株系特异性, 他指出, 在其国家地区内用一种 ASGV 抗血清即可满足苹果检测的需要。但是, Yanase 等 (1986)^[8]指出, 用间接 ELISA [F(ab')₂ 法] 检测 ASGV 的阳性率高于 DAS-ELISA 的检测结果。

目前, 我国研究报道的 ASGV 分离物为数不多, 因此, 在使用 PAS-ELISA 方法的同时, 对比使用 DAS-ELISA, 有利于发展 ASGV 的检测方法, 并逐步明确我国 ASGV 分离物的免疫学特性。

致谢 中国农业科学院兴城果树研究所洪霓, 辽宁省前所果树农场果树研究所刘新, 河北省昌黎果树研究所吴雅琴参加了部分检测工作, 辽宁省果树科学研究所王际轩先生及英国 East Malling 果树站给予支持帮助, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Francki R I B, Fauquet C M, Knudson D L *et al* ed. Classification and Nomenclature of Viruses, Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Virology Division of the International Union of Microbiological Societies, Archives of Virology. New York: Springer-Verlag Wien, 1991. Supplementum 2: 339~340.
- [2] Yanase H. *Ann Phytopathol Soc Japan*, 1990, **56**(3): 294~296.
- [3] Németh M ed. Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1986. 246~247.
- [4] Nishio T, Kawai A, Takahashi T *et al*. *Ann Phytopath Soc Japan*, 1989, **55**(2): 254~258.
- [5] 陈集双, 张天森, 周雪平, 等. 微生物学报, 1995, **35**(3): 173~180.
- [6] De Sequeira O A, Lister R M. *Phytopathology*, 1969, **59**(11): 1740~1749.
- [7] Fuchs E, Gruntzig M, Merker D. *Arch Phytopathol Pflanzenschutz*, 1985, **21**(6): 427~435.
- [8] Yanase H, Nakatani F, Munakata T *et al*. *Bulletin of Fruit Tree Res Station (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries)*, Series A, 1986, **13**: 69~81.
- [9] 王小凤, 李秋波, 王荣, 等. 微生物学报, 1992, **32**(2): 137~144.
- [10] Edwards M L, Cooper J L. *J of Virological Methods*, 1985, **11**: 309~319.
- [11] Roberts I M, Harrison B D. *Ann Appl Biology*, 1979, **93**(3): 289~297.

- [12] Schleif R F, Wensink P C ed. *Practical Methods in Molecular Biology*. New York: Springer-verlag, 1981. 78~87.
- [13] Rocha-pena M A, Lee R F. *J of Virological Methods*, 1991, 34: 311~331.
- [14] Clark M F, Adams A N. *J Gen Virol*, 1977, 34: 475~483.
- [15] Harlow Ed, Lane D ed. *Antibodies, A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 342~344.
- [16] Coffin R S, Coutts R H A. *J of Gen Virol*, 1993, 74: 1475~1483.
- [17] 刘新, 王小凤, 吴喜冬, 等. 中国果树, 1996, 1: 20~22.

PURIFICATION AND DETECTION OF APPLE STEM GROOVING VIRUS

Wang Xiaofeng Huang Yi Wang Wenhui Liu Jun

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Abstract Apple stem grooving virus (ASGV) G-2 and TC-3 were isolated from apple, and identified by both biological and serological methods. The ASGV G-2 was purified according to the procedure including bentonite clarification, PEG-6000 precipitation, 15% sucrose cushion and 10%~40% sucrose density gradient centrifugation, etc. The purified ASGV solution gave a A_{260} / A_{280} ratio of 1.15. The MW of coat protein of ASGV was 31000 determined by 13% SDS-PAGE. The above-mentioned virus preparation was used to immunize rabbit. The antiserum with high titer of 1 / 64000 tested by PTA-ELISA was produced, and it displayed the strong specificity to ASGV. The PAS-ELISA has been used successfully to detect ASGV in apple. In addition, the DAS-ELISA showed the same detection efficiency of ASGV in apple.

Key words Apple stem grooving virus, Purification, Coat protein, Detection

图 版 说 明

Explanation of plate

1. ASGV G-2感染昆诺藜的症状; 2. ASGV TC-3感染心叶烟的症状; 3. 提纯的ASGV形态($\times 60\ 000$); 4. 0.5%琼脂(含0.5% SDS)免疫双扩散: a. ASGV兔抗血清效价测试: 中央孔A为提纯的ASGV抗原; 边孔a, b, c, d, e, f为ASGV兔抗血清稀释1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64; b. ASGV兔抗血清特异性测试: 中央孔A为ASGV兔抗血清稀释1/2; 边孔a, b, c为提纯的ASGV抗原0.8, 0.4, 0.2mg/ml, d, e, f为健昆诺藜粗提液(W/V) 1/5, 1/10, 1/20; 5. ASGV G-2的免疫吸附电泳($\times 25\ 000$).

1. Symptom on *C. quinoa* infected with ASGV G-2; 2. Symptom on *N. glutinosa* infected with ASGV TC-3; 3. Morphology of purified ASGV; 4. 0.5% Agar (containing 0.5% SDS) gel double diffusion: a. The titer determination of antiserum to ASGV G-2: central hole A—purified antigen; peripheral holes a, b, c, d, e, f—antiserum to ASGV G-2 diluted 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64; b. Specificity test of antiserum to ASGV: central hole A—ASGV antiserum diluted 1/2; peripheral holes a, b, c—purified antigen 0.8, 0.4, 0.2mg/ml; d, e, f healthy *C. quinoa* crude extract diluted 1/5, 1/10, 1/20; 5. ISEM of ASGV G-2.