维普资讯 http://www.cqvip.com

柑桔衰退病毒的提纯

李开本 扬苏 吴如健 徐洁 柯冲

（福建省农科院中心实验室，福州350003）

提 要

从甜橙病株的嫩梢皮组织提纯柑桔衰退病毒（Citrus Tristeza Virus, CTV），冰冻组织按每克鲜组织加入5ml0.1mol/L Tris缓冲液pH8.4（内含0.15% Triton X—100）进行匀浆。经几次差速离心和两次PEG（分子量6,000）沉淀后，将获得的病毒粗提液铺在不连续蔗糖密度梯度液上，HITACHI RPS40 T转头30,000r/m离心3小时，收集位于300mg/ml和400mg/ml梯度层之间的分离带，洗脱、浓缩后获得CTV提纯物。提纯的CTV粒子大小为1.000—1,500×12nm，与美国的CTV抗血清起阳性反应。

关键词：柑桔 衰退病 提纯

柑桔衰退病是由蚜虫传播的一种病毒病。其病原病毒是1700—2000×12nm的线状病毒粒子。该病在世界上分布甚广，危害严重，是一种对柑桔有经济影响的重要病毒病[9]。在我国，一些柑桔产区柑桔树普遍受到它的侵染。病树表现黄化、茎陷点或隐症的病状。生势衰退、产量下降乃至全株枯死。柯冲等[4]使用美国CTV抗血清。用ELISA测定方法对我国南方一些省的CTV的分布作调查，发现CTV广泛地在我国南方柑桔产区蔓延。由于柑桔树往往复合感染衰退病、黄龙病等病害。[1,2]，因此，目前尚无法估侧单一衰退病的危害程度。自从Bar-Joseph提纯CTV成功以来[5]，国外已普遍利用其抗血清对本病及其病原进行诊断、检测和病毒品系等方面的研究。在我国，除上海生物化学研究所病毒组等[3]，在作柑桔黄龙病的提取中，曾获得可能是CTV的线状病毒粒子外，迄今尚未见过提纯CTV的报道。本研究是纯化CTV，其目的为进一步制备CTV抗血清和单克隆抗体提供有效的抗原。

材料和方法

一、毒源繁殖：1986年春，从福建果树研究所品种园采集经鉴定只携带CTV的开县无核橙（*Citrus sinesis*〔L.〕Osbeck），接穗，通过芽接接种到种子经过温水处理，而后播种育成的一年生盆栽冰糖橙（*C. sinesis*〔L.〕Osbeck）和墨西哥莱檬（*C. aurantifolia*（Chritm）Swing）的实生苗上。接种的植株放在防虫网室内，按常规管理，每月喷杀虫剂一次。待用作阳性对照的墨西哥莱檬表现茎陷点或脉明等典型的CTV病状，从接种的冰糖橙植株采样作电镜观察并确定含有病毒后，采集其嫩梢皮作提纯用的毒源。

二、提纯分离：采集冰糖橙病株的嫩梢皮50g，经冰冻处理后加0.1mol/L pH8.4Tris缓冲液

本文于1989年8月12日收到。

维普资讯 http://www.cqvip.com

250ml（内含0.15%Triton X-100），在组织捣碎机内匀浆，三层纱布过滤经9000r/m离心20分钟后，取上清液，加入40%PEG（分子量6000）和0.8%NaCl（w/v），在4℃下搅拌1小时后，静置3小时，浑浊液经10,000r/m离心20分钟，取沉淀按0.3ml/g组织比例加入0.04mol/L pH8.0磷酸缓冲液，并在4℃下搅拌、匀浆1小时，经5,000r/m离心10分钟。取上清液加5%PEG和1%NaCl按同法进行第二次PEG沉淀。取沉淀，加入20ml，0.05mol/L pH8.0Tris缓冲液悬浮，5,000r/m离心10分钟，所获粗提液留下作蔗糖密度梯度离心。其梯度浓度从上至下为200mg/ml、300mg/ml、400mg/ml、600mg/ml，各加2.0ml，最后加粗提液2.5ml，HITACHI，RPS40T转头30,000r/m离心3小时，分带收集。收集液加入0.05mol pH8.0 Tris缓冲液稀释10倍。HITACHI RP42转头40,000r/m离心3小时，收集沉淀，加入0.05mol/L pH8.0缓冲液1ml左右悬浮。悬浮液经5,000r/m离心10分钟后，留上清液作电镜观察和ELISA测定。

三、提纯病毒检测：取蔗糖密度梯度离心的各分离带经过洗脱、浓缩、悬浮后的样品，用2%磷钨酸负染，在JEM-100C×电镜下观察。并用美国农业部orlando园艺实验室S.M.Gavnsey博士赠送的美国CTV抗血清进行间接ELISA测定。

结　果

一、蔗糖密度梯度离心：经过离心形成明显的四条分离带(图1)。从上到下第一条

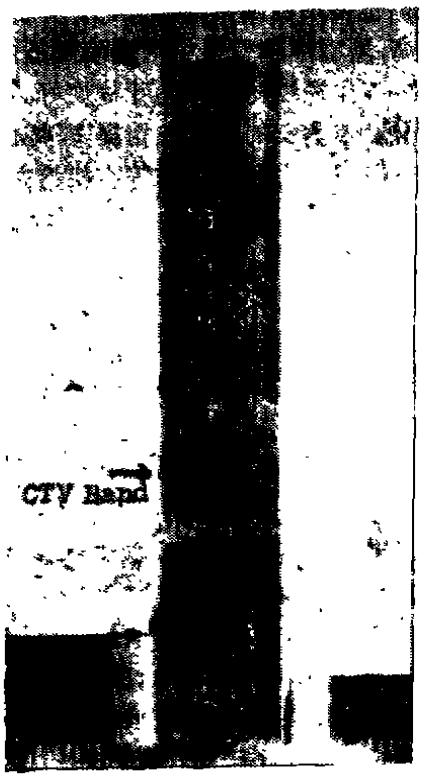

图1　蔗糖密度梯度离心的分离带
Fig.1 The centrifuged bands with sucrose density gradient

维普资讯 http://www.cqvip.com

分离带在200mg/ml层上，呈绿色；第二条分离带在300mg/ml层上，呈深绿色；第三条带在300mg/ml和400mg/ml层之间呈淡绿色；第四条带在600mg/ml垫层上，呈浓绿色，管底有少量的沉淀，呈深绿色。

二、电镜观察：在电镜下，第一、第二条分离带中未发现病毒粒子，但观察到许多类似植物细胞膜状结构的东西。第三条分离带中观察到大量的病毒粒子，直径12nm，长1000—1500nm、多数在1,000—1100nm左右（图2）。病毒粒子多数分散分布，少数聚集、互相缠绕在一起。在第四条分离带中，也可观察到少量的病毒粒子，但往往与寄主的杂质缠绕在一起。

三、间接ELISA测定：采集美国CTV抗血清测定结果表明它与第一、二条分离带呈阴性反应，与第三条分离带呈强阳性反应，与第四条分离带呈弱阳性反应。

讨　论

本试验所用的毒源是只感CTV的冰糖橙病株、而提纯病毒粒子明显是线状的，大小为1000—1500nm，与美国CTV抗血清有强阳性反应，所以提纯获得病毒无疑是CTV。用冰糖橙病株比用墨西哥莱檬作毒源更为理想。以往报道多采用墨西哥莱檬作为CTV提纯材料，并获得较高的产量[8]，我们也曾用墨西哥莱檬作为CTV提纯材料，但与冰糖橙相比，病毒的提纯量还不及冰糖橙的高，所以冰糖橙是CTV增殖的适宜寄主，也是提纯CTV的较好材料，而采集冰糖橙的嫩植茎皮作提纯材料又比叶片更好。因为匀浆后的叶片汁液中叶绿体、细胞模状结构等杂质含量较茎皮的高，在粗提取离心过程中易造成病毒粒子的损失。另一方面，试验中未采用四氯化碳、氯仿等有机溶剂作脱色去污剂，以减少处理过程中CTV的降解和断裂，而叶片内的叶绿体含量比茎皮的高会给脱色造成困难。所以采用茎皮作CTV提纯材料较叶片理想。

CTV是线状粒子，长度较长，且存在于寄主的维管束筛管细胞内，在粗提纯过程中易与寄主的维管束纤维及其它寄主杂质缠绕在一起，随弃渣丢失。在匀浆过程中加入0.15%的TvitonX-100作活化剂，减少了病毒粒子与杂质以及细长病毒粒子间的相互缠绕，使用密度梯度离心过程中，由于病毒粒子与寄主成份的密度不同，得到不同的分离带。第一分离带主要是一些色素；第二分离带主要是一些细胞膜状结构；第三分离带是TCV粒子；第四条带以细胞器为主夹杂CTV，管底沉淀是些未彻底粉碎的组织碎片。

目前国外一般用氯化铯或硫酸铯制备梯度液[7,8]、其优点是纯化度高、能保持病毒粒子的完整性。但是试剂价格昂贵，提纯技术难度大，密度梯度离心时间长。本试验改用蔗糖制备梯度液，试剂便宜，操作简单，离心时间短，克服了上述的不足。用氯化铯或硫酸铯作梯度液病毒产量一般可达0.04—0.75mg/100g鲜组织[8]，本试验获得的CTV产量也达到上列指标。用氯化铯或硫酸铯作梯度液获得完整的CTV粒子长度为1.700—2.000nm。[7]虽然试验获得的CTV粒子较短，1.000—1.500nm，但与美国CTV抗血清产生强阳性反应，可见抗原性不受影响，可以用以制备中国的柑桔衰退病的抗血清和单克隆抗体。这项工作正在进行中。

维普资讯 http://www.cqvip.com

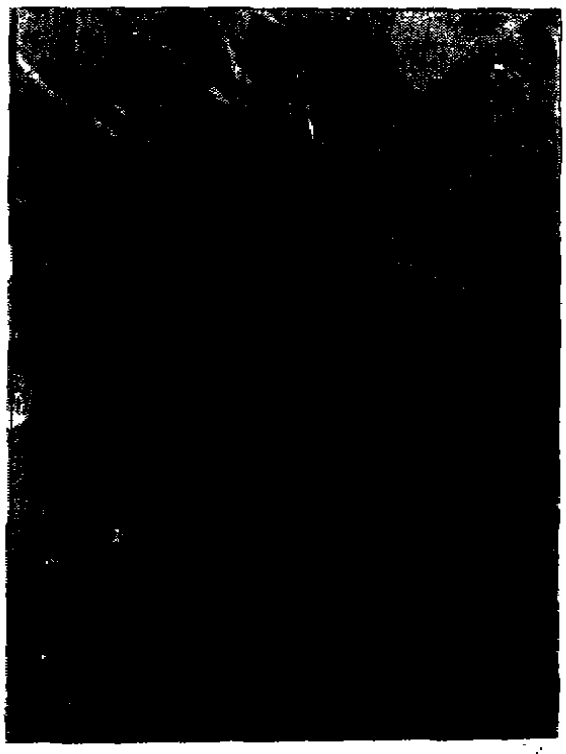

图2 纯化的CTV粒子(54,000×)
Fig.2 The purified CTV particles (54,000×)

参 考 文 献

〔1〕 柯冲等，1979，科学通报 10：436—466.
〔2〕 赵学源等，1979，中国柑桔(3)：33—44.
〔3〕 中国科学院上海生物化学研究所病毒组，1973，中国科学 3：313—325
〔4〕 C.ke.et al.，1984. p70—75，In：Garnsey，S. M.；L.W.Timmer and J.A. Dodds(eds)：*Proc. 9th Conf. IOCV*：*Univ. of Calif.*，Riverside：Califonia.
〔5〕 Bar-Joseph，et al.，1970：*Phytopathology* 60：75—78.
〔6〕 Gonsalves：D.et al.，1978，*Phytopathology* 68(4)：553—559.
〔7〕 R.F.Lee.et al.，1987，*Phytopathoology* 77(4)：543—549.
〔8〕 Bar-Joseph，1979，*Adv. Virus Res.* 25：93—168.
〔9〕 L.Navarro.et al.，1977，*Pro.Int.Soc.Citriculture* 3：973—987.

维普资讯 http://www.cqvip.com

The Purification of Citrus Tristeza Virus

Li Kai-ben Yong Su Wu Ru-jian Xu Jie Ke Chong

(*Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fushou* 350003)

This paper deals with the Purification method of citrus tristeza virus (CTV) from infected sweet orange(*Citrus sinensis*[L]. Osbeck). The frozen and infected tissues were homogenized with 0.1mol/L Tris-buffer pH8.4 which contains 0.15% TritonX-100. After several differential centrifugations including two times of precipitation with PEG (MW 6,000), the supernatant was centrifuged by incontinuous sucrose density gradient of 200—400mg/ml and 600 mg/ml at 30,000 r/m (Hitachi, RPT 40 rot) for 3 hours. Then the band is collected in 300 mg/ml. After one cycle of differential centrifugation, the supernatant is the purified CTV preparation. The purified virus is apparently filamentous-shaped particles of 1000-1500 × 12 nm size with PTA negative staining.

Key words: Citrus Tristeza virus Purification