

## 齿兰环斑病毒的鉴定及其抗血清的制备与应用\*

明艳林\*\*，郑国华，李梅

(厦门华侨亚热带植物引种园，国家农作物国外引种隔离检疫基地，福建厦门 361002)

### Identification and Serological Study of *Odontoglossum ringspot virus*

MING Yan-lin\*\*，ZHENG Guo-hua，LI Mei

(Xiamen Overseas Chinese Subtropical Plant Introduction Garden, National Plant Introduction Quarantine Base, Xiamen, Fujian 361002 China)

**Abstract:** A virus isolated from cattleya in Xiamen, China was identified as an isolate of *Odontoglossum ringspot virus*, based on its biological properties, particle morphology, serological characterization and RT-PCR. Mechanical inoculation test with the isolate was carried out to 27 species of 6 families of indicative plants, of which 8 species of 4 families showed symptoms. The result is different from that of *Tobacco mosaic virus*. The thermal inactivation point of the isolate was about 92 ~ 94 °C, and the longevity in vitro was beyond 3 months. Electron microscopic examination of the purified virus particle preparations showed straight particles of about 300nm long and 18nm wide. The pure viral coat protein was estimated to be about 17 kDa. The serological test showed that the virus isolation reacted positively with the antiserum against ORSV while weakly with TMV antiserum. Antiserum was prepared by immunizing rabbit, and used to detect ORSV in Xiamen orchid's plant by Dot-ELISA.

**Key words:** Cattleya; Identification; Antiserum; *Odontoglossum ringspot virus*

**摘要:** 根据病毒生物学特性、粒体形态和血清学性质等初步确定从在厦门地区种植的表现为褪绿、褐色坏死斑症状的卡特兰(*Cattleya*)病株上分离的一个病毒分离物为齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)。通过摩擦接种 6 科 27 种(或品种)指示植物,结果其中 4 科 8 种(或品种)表现症状,与烟草花叶病毒不同;理化性质试验表明稀释限点为  $5 \times 10^{-5}$ ,致死温度为 92 ~ 94 °C,体外存活期超过 3 个月。提纯病毒为长约 300nm,宽约 18nm 杆状粒体。SDS-PAGE 电泳分析表明其外壳蛋白分子量约为 17kDa。该分离物与 ORSV 抗血清具有强阳性反应、而与 TMV 抗血清反应微弱,认为该病毒为 ORSV 分离物。用纯化病毒免疫家兔,成功地制备出特异性抗血清,并通过 Dot-ELISA 法对厦门地区种植的兰花病株进行了检测研究。

**关键词:** 卡特兰; 鉴定; 抗血清; 齿兰环斑病毒

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0064-04

齿兰环斑病毒(*Odontoglossum ringspot virus*, ORSV)属烟草花叶病毒属(*Tobamovirus*),是严重危害世界各地兰花的主要病毒之一<sup>[1,2]</sup>。自 1951 年 Jensen 等首次发现 ORSV 以来,该病毒受到世界上各兰花种植国的普遍关注。近年来,随着兰花产业的发展,兰花的国际国内贸易和种质交流十分频

繁,该病毒病相应也在全球范围内广为传播,给兰花种植业造成极大的损失<sup>[3~5]</sup>。郑平等<sup>[6]</sup>对我国兰花病毒病的调查研究结果表明我国不同地区的兰花均不同程度地受到 ORSV 的侵染,因此开展该病毒分离物的血清学和分子生物学研究,以及建立一套完整的检测体系,对国内兰花产业的发展至关重要

收稿日期: 2005-09-02, 修回日期: 2005-10-13

\* 基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(B9910027); 厦门市科技创新资金计划项目(3502Z20031037)。

\*\* 通讯作者: 明艳林(1974-), 男, 湖北黄冈籍, 助理研究员, 研究方向为植物病毒学。

Corresponding author. Tel: 0592-2065016, E-mail: xmyanlin@yahoo.com.cn

要。本研究从厦门一株表现褪绿、褐色坏死环斑的卡特兰病叶中获得一杆状病毒, 根据病毒的生物学鉴定、电镜观察、血清学检测鉴定其为 ORSV。同时, 制备了高效价抗血清, 建立了该病毒的斑点酶联 (Dot-ELISA) 检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒源分离

采集厦门一兰圃自然发病的卡特兰病叶, 参照 Barker<sup>[7]</sup>的间接酶联免疫实验方法对采集样品进行血清学筛选, ORSV 由新加坡国立大学 Wong 教授惠赠。阳性样品以苋色藜 (*Chenopodium amaranticolor*) 为枯斑寄主, 3 次单斑分离后, 在苋色藜上进行繁殖。

### 1.2 寄主范围测定

用汁液磨擦接种法将保存在苋色藜上的病毒分离物接种于葫芦科 (Cucurbitaceae)、豆科 (Leguminosae)、藜科 (Chenopodiaceae)、苋科 (Amaranthaceae)、十字花科 (Cruciferae)、茄科 (Solanaceae) 等 6 科 27 种供试植物, 观察发病情况, 接种实验重复 2 次。

### 1.3 病毒提纯及电镜观察

病毒提纯参考刘志昕等方法<sup>[8]</sup>。用 MBA2000 型紫外分光光度计测定提纯病毒  $OD_{260}$  和  $OD_{280}$  值, 计算其浓度。提纯病毒用 2% 磷钨酸负染色, 透射电镜观察。

### 1.4 病毒理化性质测定

苋色藜病叶, 充分显症后采下研磨, 3 层纱布过滤备用。以苋色藜为寄主植物, 测定灭活温度、稀释限点和体外存活期, 各测定重复 2 次。

### 1.5 外壳蛋白分子量测定

SDS-PAGE 后用 0.2% 考马斯亮蓝 R-250 染色, 甲醇冰乙酸脱色后观察蛋白条带数并估计分子量大小。

### 1.6 抗血清的制备及效价鉴定

选用 2kg 重的雄性家兔作免疫动物, 用加等量 Freund 氏不完全佐剂乳化的提纯病毒做免疫原, 采用 3 次肌肉注射和 2 次静脉注射免疫家兔。每次注射病毒的量分别是 0.5mg、0.75 mg、1 mg、1.5 mg 和 2 mg, 间隔时间为 7d, 最后一次注射后 7d~10d 采血 2 次, 析出抗血清用琼脂双扩散法测效价。

### 1.7 斑点酶联检测方法的建立与应用

参照周雪平等<sup>[9]</sup>方法建立该病毒斑点酶联快速检测方法, 并对该方法的检测灵敏度及自制抗血清的特异性进行测定。同时应用斑点酶联检测法对厦

门地区种植的大花惠兰、蝴蝶兰、卡特兰和石斛兰感染 ORSV 情况进行初步调查。

## 2 结果与分析

### 2.1 寄主反应

用汁液磨擦接种 6 科 27 种供试植物, 该分离物侵染苋色藜、昆诺阿藜、普通烟、心叶烟、番杏、千日红等 4 科 8 种指示植物 (表 1)。其中在克氏烟上系统发病。

表 1 接种指示植物症状表现

Test plant	Symptom	Time(d)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	N	>30
<i>Nicotiana glutinosa</i>	NLL	7~12
<i>N. tabacum</i>		
<i>N. tabacum</i> .cv. Havana 38	N	>30
<i>N. tabacum</i> .cv. Samsun-NN	NLL	7~14
<i>N. tabacum</i> .cv. Turkish	N	>30
<i>N. tabacum</i> .cv. White Burley	N	>30
<i>N. tabacum</i> .cv. Xanthi-NC	NLL	7~14
<i>N. tabacum</i> .cv. Huangmiaoyu	N	>30
<i>N. tabacum</i> .cv. Lianghuangyan	N	>30
<i>N. benthamiana</i>	N	>30
<i>N. debneyi</i>	N	>30
<i>N. clevelandii</i>	S, M	7~14
<i>N. rustica</i>	N	>30
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	NLL	3~5
<i>C. quinoa</i>	NLL	7~14
<i>C. murale</i>	N	>30
<i>Datura stramonium</i>	N	>30
<i>Pisum sativum</i>	N	>30
<i>Vigna unguiculata</i>	N	>30
<i>Phaseolus vulgaris</i>	N	>30
<i>Vigna radiata</i>	N	>30
<i>Cassia occidentalis</i>	N	>30
<i>Cucumis sativus</i>	N	>30
<i>Cucurbita pepo</i>	N	>30
<i>Gomphrena globosa</i>	NLL	7~14
<i>Zinnia elegans</i>	N	>30
<i>Tetragonia expansa</i>	NLL	3~5

Note: NLL-Necrotic local lesions; N-No symptoms; S-symptoms; M-Mosaic.

### 2.2 紫外吸收测定

提纯 ORSV 的紫外吸收曲线呈典型的核蛋白吸收曲线, 最高吸收值 268 nm, 最低吸收值 250 nm,  $OD_{260}/OD_{280}=1.23$ , 浓度为 22 mg/mL。

### 2.3 电镜观察结果

提纯病毒经磷钨酸负染后用透射电镜观察到长约 300 nm, 宽约 18 nm 的杆状病毒, 颗粒中轴可清楚分辨, 部分病毒头尾相连 (图 1)。

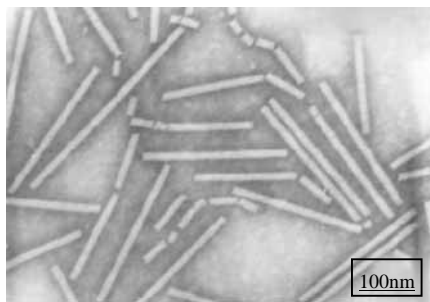


图 1 ORSV 颗粒电镜照片

Fig.1 Electron micrograph of ORSV particles

## 2.4 病毒理化性质

该病毒分离物灭活温度为 92 ~94 ，稀释限点为  $5 \times 10^{-5}$ ，体外存活期为 90d 以上。

## 2.5 外壳蛋白分子量

SDS-PAGE 分析表明该病毒分离物外壳蛋白分子量为 17 kDa，与已经报道的 ORSV 一致。且提纯样品只出现一条带，表明提纯病毒纯度较高(图 2)

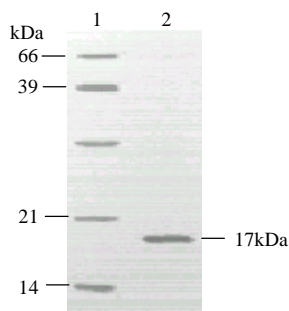


图 2 SDS-PAGE 测外壳蛋白分子量结果

Fig.2 Electrophoresis pattern of SDS-PAGE showing viral capsid protein

1, Standard protein molecular weight; 2, Virus coat protein.

## 2.6 抗血清的制备及效价测定

提纯病毒经紫外测定、电镜观察和电泳分析，确定其纯度较高，用其做免疫原成功制备出特异性抗血清。用 1 mg/mL 提纯病毒做抗原和系列稀释的抗血清进行琼脂双扩散反应，显示所制备的抗血清效价可达 1/128。

## 2.7 斑点酶联检测方法的建立与应用

利用自制的 ORSV 分离物抗血清建立了斑点酶联快速检测方法，通过该方法进行血清特异性测定，结果自制抗血清分别与 CMV、健康苋色藜及三种健康兰花（蝴蝶兰、文心兰、卡特兰）的汁液呈阴性反应，但与 ORSV 呈强烈的阳性反应，表明该抗血清与 ORSV 有强烈的血清学关系且特异性较高。将提纯病毒制剂以及染病组织汁液按梯度稀释成不同的倍数，通过该法进行灵敏度测定。如图 3

(A) 所示，将病叶浸出液稀释到 1 : 1 280，仍能明显检测到该病毒；如图 3 (B) 所示，将总浓度为 0.328mg/mL 的提纯病毒制剂稀释至 400 倍仍然被检测到，表明该方法的检测灵敏度最低可达 1.32ng 病毒粒子。应用斑点酶联法均能从厦门地区种植的大花惠兰、蝴蝶兰、卡特兰和石斛兰中检测出 ORSV。

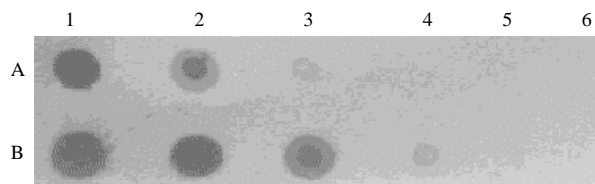


图 3 斑点酶联检测 ORSV 的结果

Fig. 3 The result of ORSV detected by Dot-ELISA

A: Dilutions of infected juice: 1, 1:320; 2, 1:640; 3, 1:1 280; 4, 1:2 560; 5, 1:5 120; 6, Healthy; B: Dilutions of purified virus: 1, 1:50(6.46ng\*); 2, 1:100 (3.28ng); 3, 1:200 (2.64ng); 4, 1:400 (1.32ng); 5, 1:800 (0.66ng); 6, 1:1 600 (0.3ng).

Note: \*Refers to the total amount of virus of each sample.

## 3 讨论

ORSV 曾一度被认为是烟草花叶病毒的兰花株系(Orchid Rtrain of *Tobacco mosaic virus*, TMV-O)，但 1991 年日本学者 ISOMURA 等根据核酸序列比较表明 ORSV 并非 TMV-O<sup>[10]</sup>。随后，我国刘志昕等也发现 ORSV 紫外吸收曲线出现吸收峰向长波方向偏移，最高吸收值在 268nm，最低吸收值在 250nm<sup>[8]</sup>，说明 ORSV 与 TMV 具有不同核蛋白特征。后来又发现 ORSV 与 TMV 外壳蛋白的氨基酸序列存在较大差异<sup>[11]</sup>。所有这些都表明 ORSV 是单独的病毒种。本研究对该病毒分离物提纯制剂的紫外吸收测定符合已报道的 ORSV 的特征。同时寄主试验及血清学实验的结果也表明该分离物不同于 TMV。根据病毒粒体形态、理化性质、血清学关系及寄主范围鉴定该病毒分离物为 ORSV。

实验表明，应用斑点酶联法检测兰花中的 ORSV 时，抗血清最好先用 1 : 20 稀释度的健康寄主汁液吸附，以除掉非特异性抗体；同时病叶汁液务必经酚和氯仿处理，以降低本底的干扰，否则病叶在 1 : 1~1 : 200 稀释度内存在绿色干扰，不利于病毒早期诊断<sup>[9, 12]</sup>。应用斑点酶联法对厦门地区种植的感病大花惠兰、蝴蝶兰、卡特兰和石斛兰进行检测，从这 4 种兰花中均能检测出 ORSV，可见各种兰花普遍感染该病毒。斑点酶联法不仅保留了传统血清学方法的灵敏、快速及简便的优点，而且不

借助辅助仪器靠肉眼就能直接观察结果, 因此在兰花病毒检测上具有广泛的应用前景。

## References

- [1] Zhang J R, Sheng S L(张健如, 沈淑淋). A Manual of identification of viruses infecting flower [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publisher(上海科学技术出版社), 1984, 148-149.
- [2] Zettler F W, Ko N J, Wisler G C. Viruses of orchids and their control [J]. Plant Dis, 1990, 74(9): 621-626.
- [3] Ajjikuttira P, Loh C S, Wong S M. Reciprocal function of movement proteins and complementation long-distance movement of *Cymbidium mosaic virus* RNA by *Odontoglossum ringspot virus* coat protein [J]. J Gen Virol, 2005, 86(Pt 5): 1543-1553.
- [4] Wong S M, Mahtani P H, Lee K C, et al. Cymbidium mosaic potexvirus RNA: complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis[J]. Arch Virol, 1997, 142 (2): 383-391.
- [5] Zhou G H, Chen X Q, Li M H (周国辉, 陈晓琴, 李梅辉), et al. Identification and detection of two major viruses infecting orchids by molecular technique[J]. Virologica Sinica(中国病毒学), 2004, 19(2): 149-152.
- [6] Zheng P, Liu R W, Xu M Q (郑平, 刘荣维, 徐明全), et al. Investigation of two major domestic viruses infecting orchids[J]. Guangdong Agricultural Science(广东农业科学), 2001, 6: 37-40.
- [7] Barker I. Development and routine use of ELISA in plant virus diagnosis pesticide[J]. Science, 1989, 26(3): 319-320.
- [8] Liu Z X, Pan J S, Zheng X Q(刘志昕, 潘俊松, 郑学勤). Identification and serological detection of *Odontoglossum ringspot virus* infecting[J]. Chinese J Tropical Crops(热带作物学报), 1994, 15(supplement): 41-48.
- [9] Zhou X P, Pu Z Q(周雪平, 濮祖芹). Detection of plant virus by Dot-immunobinding assay[J]. Virologica Sinica (病毒学杂志), 1990, 3: 317-321.
- [10] Isomuar Y, Matumoto Y, Murayama A, et al. Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the *Odontoglossum ringspot virus* coat protein gene[J]. J Gen Virol, 1991, 72: 2247-2249.
- [11] Liu Z X, Pan J S, Shao H S(刘志昕, 潘俊松, 邵寒霜), et al. Molecular cloning and sequencing of coat protein gene of *Odontoglossum ringspot virus*[J]. Chinese J Virol (病毒学报), 1998, 14: 87-90.
- [12] Wei M S, Huang C(魏梅生, 黄冲). Detection of *Odontoglossum ringspot virus* by Protein-A-gold complexes and DAS-ELISA [J]. Plant Quarantine(植物检疫), 2000, 14(6): 344-346.