



制备单克隆抗体,成功地筛选得到两个单克隆株(分别为非洲的GO和印度GO单克隆抗体株)、用ELISA法和荧光免疫显微法成功地分别检测了南非的和印度的青果病。可是,1987年他们在福州和广州检测黄龙病却无效。

也是在人工培养困难这种情况下。有些研究者则企图从发病植物筛管里直接抽提并提纯出较大量的类菌原体或类立克次氏体等来制备抗血清,Smith(1981)<sup>[12]</sup>和Chen(1987)<sup>[10]</sup>认为抽提分离溶液的渗透压,离心力和离心时间是保持这类病原菌的活性和完整形态结构的重要因素。Chen(1987)<sup>[10]</sup>还认为甘露醇有保护膜结构稳定性的作用,而Sinha<sup>[11]</sup>和French<sup>[5]</sup>用MgCl<sub>2</sub>-甘氨酸溶液等成功地提纯了翠菊黄化,三叶草变叶等类菌原体和桃伪果类立克次氏体。

受上述工作者特别是Chen和Sinha等的启发我们从1987年起开始进行了本项研究工作。

## 一般材料和方法

本实验采用YSO系福建农科院果树研究所用木虱(*Diaphoria crtri*)接种到芦柑(*Citrus ponkar*)实生苗上,再由非洲菟丝子(*Cuscuta campestris*)转移到长春花(*Catharanthus roseus*)上保持存的。YSO的繁殖是按常规顶芽嫁接法接种到长春花上来进行的,长春花发病后采病叶作提纯试验材料。设对照,试验用的长春花均用健康长春花单株扦插繁殖。冬季放在温室(21~28℃)内,夏季放在防虫网室(23~32℃)内。每月喷杀虫剂一次。

## 提纯试验结果

### (一) 材料和方法

提纯和电镜检查参考内外有关原核生物提纯方法<sup>[10][11][12]</sup>,针对分离溶液和高速离心时间(35,000×g)进行提纯比较试验,以确定本试验采用的提纯方法。提纯结果以电镜下提纯的YSO数量,粒体完整性和内外结构分辨清晰状况,污染程度作评定标准。

负染法:按常规电镜负染法点样。2%pH6.0磷钨酸染色、检查提纯液。

切片法:用1.0%琼脂色埋提纯沉淀物,琼脂样品包埋块按常规电镜法、切片和染色后电镜检查。

### (二) 试验结果

1. 几种影响提纯效果的因素的筛选结果:(1)分离溶液的选择:下列各种分离溶液配制后,用阿贝析射仪测其相对渗透浓度。

结果表明: 无机盐缓冲液(如: 磷酸缓冲液、柠檬酸缓冲液, Tris—HCl缓冲液)渗透浓度均太低, YSO易破碎, 所以不宜作分离溶液; 50m mol/L HEPES—PVP缓冲液(pH7.2)提纯效果不好, 提纯得到的YSO较多, 但多数是空泡或内部电子密度很低; 0.1mol/L MgCl<sub>2</sub>—0.5mol/L 甘露醇—0.8~1.0mol/L 甘氨酸(三种浓度)搭配的溶液(pH7.4) YSO的内含物聚集在YSO细胞中间, 浓缩成一团电子密度区, 壁膜分离, 外围壁膜显得薄而不清楚。但是, 当甘氨酸浓度为0.3~0.7mol/L时, 提纯效果较好。

为了选择最佳的分离溶液, 用上述五种不同的甘氨酸浓度(0.3~0.7mol/L)搭配的溶液作为分离溶液来进行试验, 结果表明, 在上述五种溶液中, 甘氨酸浓度0.6mol/L的提纯效果最好, 膜状物, 碎片和空泡的病原物等均较少。病原物都保持较好的完整性和清晰可见的结构。因此, 作为提纯分离溶液应暂以此溶液为最佳选择。

(2) 高速离心时间的选择: 为了选择最佳离心时间, 在35,000×g离心力下, 分别出高速离心时间2hr、1.5hr、1hr、50min、40min、30min、20min 7种处理进行提纯试验。

试验结果表明: 高速离心时间长于1小时, 沉淀物切片镜检查结果、病原物都是破碎的或无内含物的空泡; 提纯液负染后则检查到大量膜状物, 碎片、少量颗粒状物以及污染物。高速离心时间短于20分钟, 离心效果很差, 表现在沉淀物疏松、沿离心管壁分布而不集中于管底, 在沉淀物的切片里病原数量少, 个体多数大(300~600×800~1400nm), 提纯液负染后可见到很多结构完整的小颗粒。高速离心时间在30~50分钟内, 离心效果较好, 在沉淀物切片里可见较多完整性好的病原物, 其内部结构基本上与组织切片中的病原物相同; 处围壁膜结构清楚, 但比起病组织中病原显得紧密和偏厚些, 少数病原物壁膜有损伤。

综合上述情况, 可见30~50分钟的高速离心时间为最佳。获得的提纯结果最好。

2. 提纯试验结果: 提纯方法是将病叶叶脉剪碎、加入三倍(v/w) pH7.4的0.1mol/L MgCl<sub>2</sub>~0.5mol/L甘露醇—0.6mol/L甘氨酸分离溶液。用调节分散器匀浆, 匀浆液在35℃经纤维醇(1mg纤维素酶/1ml匀浆液)消解3小时, 过滤, 滤液在4℃下离心(4,000rpm, 20'); 上清液在4℃下高速离心(35,000×g, 40'), 用分离溶液悬浮沉淀, 重复差速离心一次, 取沉淀物作常规电镜制样, 镜检提纯结果大部份沉淀用0.5mol/L甘露醇—30m mol/L半胱氨酸溶液(pH7.0)悬浮。静置半小时后, 低速离心(4,000rpm, 20')。提纯液分别进行, 镜检和作抗原用。大约30g鲜重病叶脉可得1ml抗原, 对照用健康长春花。

试验结果表明: 上述提纯方法可获得较好结果, 镜检提纯物切片, 在一个铜网上有3~18万病原物个体, 这些病原物个体多数呈圆形, 椭圆形, 少数呈长椭圆形; 还有长椭圆带缢缩现象, 形似8字的, 看来是正处于分裂期的病原形(图1、2)。病原物大、小为30~600×500~1400nm, 共三层: 外层结构的电子密度较浓, 往往表现波纹状起伏不平的外形(见图2); 内层与细胞膜相似, 电分密度也比较浓, 内层膜比外层壁

薄,中间层是电子密度透明层。在较高放大倍数下,病原物内部具有颗粒状和纤丝状物质结构,还有许多电子密度较浓密的小区块结构(图3)提纯的病原物有寄主植物叶脉筛管细胞中的YSO以及文献上记载的YSO<sup>[1]</sup>。在外部形态和内部结构特征上完全相同。对照没有发现任何上述病原物。这说明提纯沉淀物中确实含有YSO,也说明这种提纯方法是可行的。将这些沉淀物制成澄清悬浮液可做抗原用。

## 血清学试验结果

### (一) 材料和方法

普通纯种小白鼠购于福州生物药品厂,免疫用的小鼠为7~10周龄,雌雄不分,腹水瘤株(Ehrlich)来自福建省医药研究所。

1. 抗原制备:接上述提纯方法制备黄龙病抗原和对抗原。

2. 小鼠腹水抗体的制备:按参考文献<sup>[2]</sup>稍加修改。第一次免疫将抗原1 ml与等量佛氏完全佐剂充份混合成乳剂,从小鼠腹股沟注射入腹腔内,每小鼠注射抗原乳剂0.5ml,每种抗原免疫4只小鼠,两周后进行第二次免疫,方法同上,但小鼠注射0.5ml与不完全佐剂混合乳剂。一周后再进行第三次免疫,每小鼠经腹腔或尾侧静脉或腹腔加尾侧静脉分别注射0.7ml或0.1ml或0.7ml抗原水剂。三天后注射新抽腹水瘤细胞0.2ml/小鼠,七天后,小鼠腹部膨胀,待胀大到一定程度后抽腹水,腹水经2000×g离心15分钟,除去瘤细胞,分装在已消毒的小瓶中,加入0.1%NaN<sub>3</sub>,立即使用或贮存在-20℃下备用。该小鼠再从腹腔注射0.5ml抗原水剂,腹部膨胀后重复抽腹水,直至死亡。各小鼠的腹水分别存放。

### 3. 血清测定方法

(1) 腹水抗体IgG的提纯及吸:提纯腹水抗体IgG的方法按参考文献<sup>[1]</sup>、病株抗腹水IgG与健株抗原配成1:1的已吸收的病抗腹水IgG。同样,按健(株对)抗腹水IgG与YSO抗原配成1:1的已吸收的YSO抗原,充分摇匀上述已吸收的病抗腹水和已吸收的病抗原后,在37℃下保湿孵育两小时或在普通冰箱中过夜。4000rpm离心20分钟,留上清液分别作病抗腹水和病抗原。

(2) 检测方法: a、微量沉淀试验,按参考文献<sup>[4]</sup>方法进行,健康(对照)抗腹水IgG、无免疫正常腹水IgG和1:1已吸收的病抗腹水IgG,按2倍连续稀释法用生理盐水稀释、健康抗原和稀释液作对照。共9种处理系列。 b、环状界面凝集试验:方法按引用文献<sup>[4]</sup>,用含10%甘油的生理盐水作稀释液。按2倍连续稀释法分别稀释各抗腹水IgG、对照的设立同实验a,共9种处理系列。 c、琼脂双扩散反应,方法按参考文献<sup>[4]</sup>,同实验b方法稀释各抗腹水IgG和设立对照,稀释液为生理盐水,共9种处理系列。 d、免疫电泳,方法按实验a稀释各抗腹水IgG和设立对照,共9种处理系列。试验方法。用铜网蘸上抗腹水IgG,25℃下保湿孵育30分钟用生理盐水数滴冲洗,滴上抗原,32℃下保湿孵育4小时,生理盐水冲洗,再加相应浓的抗体IgG,

保湿孵育15分钟, 蒸馏水冲洗, 2% pH6.0磷钨酸负染, 电镜观察。

## (二) 试验结果

吸收结果以1:1已吸收的病抗原腹水, 1:1已吸收的病抗原为最佳, 似已除去病抗原和病抗腹水中的大部份非特异性反应成分。

重复血清学测定, 结果表明: 该抗腹水有特异性免疫反应, 但效价较低。微量沉淀反应效价为1:640, 环状界面凝集反应效价为1:8、免疫电镜效价为1:320(图4)琼脂双扩散反应阴性。对照均为阴性反应。

## 讨论和结论

本试验结果: YOS从发病长春花的维管束中分离和提纯后, 用以制备小鼠抗腹水已初步获得成功, 但该抗腹水效价较低, 还有待进一步研究提高。

我们的分离和提纯试验结果, 完全支持了前人<sup>[10][12]</sup>关于抽提和提纯分离溶液的渗透压必需能够保持难培养菌的活性及菌体形态完整性。从MgCl<sub>2</sub>—甘露醇—甘氨酸分离溶液的渗透压的适用范围为535.0~710.0 mosm/kg为最佳选择。此外, 我们的试验过程中还显示了一个病理生理问题, 寄主植物的病株叶脉压榨液的渗透浓度都比健株的高出1/3至1/2, 其中的奥妙很值得引起注意和研究。

本试验制备的鼠抗腹水效价较低, 并伴随有非特异性反应干扰, 其主要原因可能是抗原的浓度和纯度较低。虽然该抗腹水用免疫电镜方法检测很成功, 但此方法难于推广应用。因此, 这个问题值得今后特别着重研究解决。

Bove等<sup>[9]</sup>用单克隆技术筛选得到一个抗印度GO和一个抗南非GO的单克隆抗体。但用以检测福州和广州的YOS时都无效。这初步表明了我国的YOS不但有可能与所谓“热敏型”的南非GO有所不同, 而且可能与许多人认为属于同类的“耐热型”的印度GO也有所不同。因此, 我们这个试验工作看来更为必要。由于Bove等的方法能够绕过抽提, 特别是分离和提纯这两个难关, 所以也很值得引用。并进行试验。

Garnett人工培养南非GO成功的试验结果没有被接受<sup>[9]</sup>这是不足为奇的。过去也有不少这类难培养菌的人工培养成功的报告都被否定了, 这只能表明难培养菌的确不是容易人工培养成功的。但是, 这个问题迟早必能所突破。在研究过程中, 我们注意到, 不但是YOS(包括GO), 而且许多其它难培养菌在长春花筛管里的密度都远比它们原来的寄主植物高得多, 表明了长春花筛管里的营养成份, 生活环境, 理化情况都更适宜于这类难培养菌生活、繁殖。进行这样的模拟试验看来是很有意义的。

## 引用文献

- [1] 北京医学院微生物教研组. 实验免疫学. 北京: 人民卫生出版社, 1980: 1—13
- [2] 陆家珏, 张作芳. 植物检疫. 1985: (2) 26~27
- [3] 柯冲, 陈辉, 陈元忠, 章连均. 科学通报, 1979; (10): 463~466
- [4] 梁训生, 张成良, 张作芳. 植物病毒学血清学技术. 北京: 农业出版社, 1985: 4~225
- [5] French, N. J., Christis, R. O., Stassi, D. T. 1977. *Phytopathology* 67: 945-948
- [6] Garnett, H. M., 1985. *The citrus and subtropical fruit journal* No. 611: 4-6
- [7] Garnier, M., Bove, J. M. 1983. *Phytopathology* 73: 1358-1363
- [8] Garnier, M., Denel, N., Bove, J. M. 1984a. In proceeding 9th Conference International Organization of Citrus Virologists. (S. M. Garnsey, eds.) University of California, Riverside
- [9] Garnier, M., Martin-Gros, G., Bove, J. M. 1987a. Regional Workshop on Citrus Greening Huanglungbin disease Held in Fuzhou-China FAO-UNOP Project coordinator in Fuzhou
- [10] Jiang, V. P., Chen, T. A. 1987. *Phytopathology* 77: 949-953
- [11] Sinha, R. C. 1974. *Phytopathology*, 64: 1156-1168
- [12] Smith, A. J., Meloy, R. E., Tsai, J. H. 1981. *Phytopathology* 71: 819-822

A PRELIMINARY STUDY ON PURIFICATION OF THE PATHOGEN OF  
CITRUS YELLOW SHOOT AND ITS SEROLOGY

(ke Sui Tang Weiwen Gao Qiaowen Faan Hwei-chung)

(ke Chung)

(Department of Plant Protection)

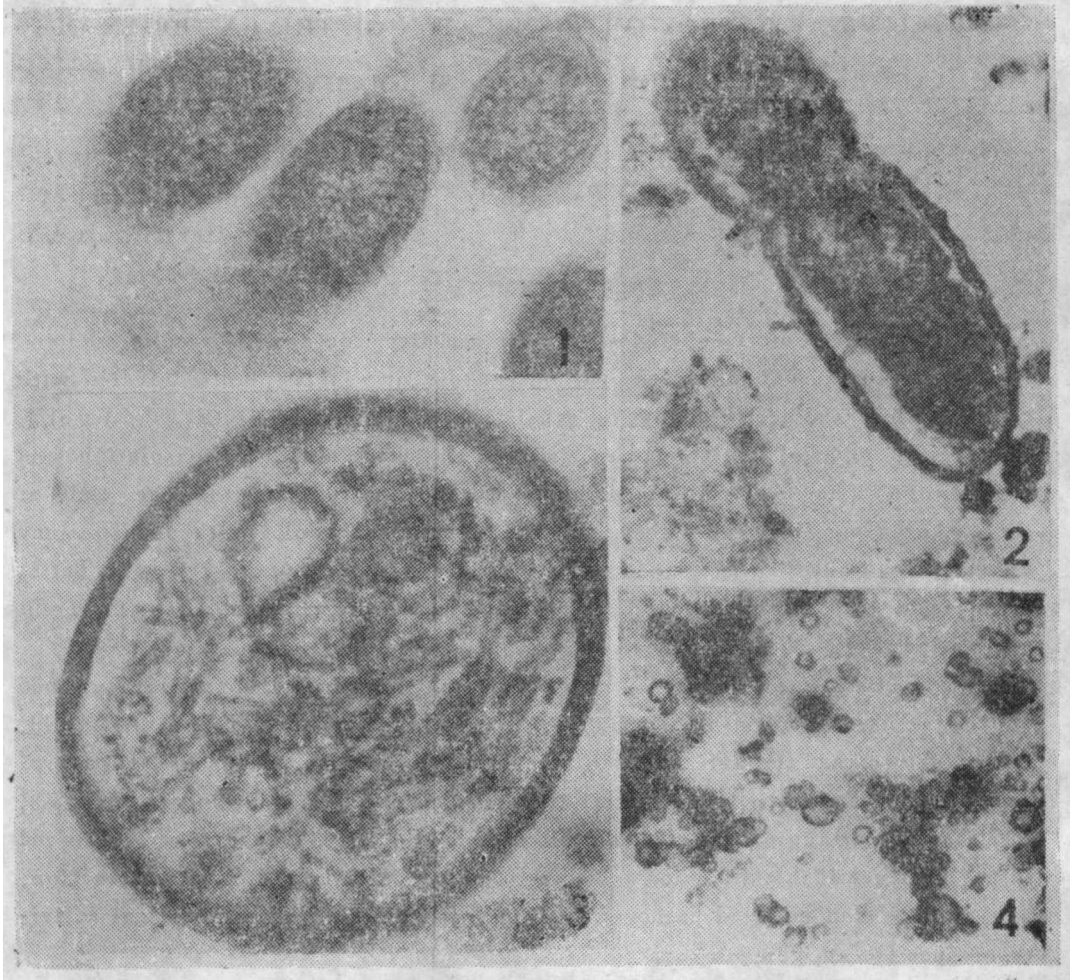
(Fujian Academy of  
Agricultural Sciences)

ABSTRACT

A purification method combined with cellulase digestion and differential centrifugation was found to purify the pathogen from citrus plants infected with citrus yellow shoot. The solution consisting of 0.1 mol/L  $MgCl_2$ , 0.5 mol/L D-mannitol, 0.6 mol/L glycine was used as the medium for the isolation and purification. The results obtained in the present study showed that the yield of the pathogen purified was higher, and the external morphology, the transparency of wall-membrane structure and internal structure of the pathogen were better maintained. Meanwhile, the purification method gave consistent results in different replications.

The purified pathogen of citrus yellow shoot obtained with the method mentioned above was used as antigen to immunize mice for the preparation of ascitic fluid. It was shown that the antibodies in the fluid had specific response. The micro-precipitation titer was 1:640, the titer of ring surface agglutination reaction 1:8, and that of immunosorbent electron microscopy 1:320. NO reaction was observed in the agar gel double diffusion assay test. Controls all showed negative reaction. The isolated and purified pathogen was thus recognized to have biological activity of specific antigen.

**Key words:** Citrus yellow shoot disease, Greening disease, Purification, Serology



图版 1. 0.1mol/L  $MgCl_2$ —0.5mol/L 甘露醇 0.6mol/L 甘氨酸分离溶液 (pH7.4),  
35,000×g.40分钟离心的YSO部分提纯电镜照片。(×150,000)  
2. 部分提纯中有形状如8字形的YOS正处于分裂期。(×150,000)  
3. 部分提纯YSO的内部结构。(×300,000)  
4. YSO抗腹水(1:320)免疫电镜照片。(×12,000)