

# 柑桔黄龙病的血清学检测 与诊断方法的初步研究<sup>\*</sup>

李德望 唐伟文 范怀忠  
(植保系)

**摘要** 用提纯的柑桔黄龙病病原 (CYSO) 免疫小鼠制备出抗体 IgG, 其浓度与 2.7 mg/ml, 并证明它对 CYSO 具有特异性。效价测定结果, ELISA 达 1:640, 间接免疫荧光 (IIF) 达 1:1 000, 斑点酶联免疫技术 (Dot-ELISA) 达 1:1280, 斑点免疫荧光技术 (Dot-IF) 达 1:1 280。检测纯化抗原滴度, ELISA 达 1:256, IIF 达 1:4 096, Dot-ELISA 达 1:8 192, Dot-IF 达 1:32 768。ELISA 只能用于检测典型的蕉柑和椪柑病材料, 而 IIF, Dot-ELISA 和 Dot-IF 还可用于甜橙的检测, 用 4 种方法均不能检测出未显症材料的 CYSO。

**关键词** 酶联免疫; 免疫荧光; 斑点酶联免疫; 斑点免疫荧光

柑桔黄龙病是我国华南地区柑桔的毁灭性病害, 由类细菌 (BLO) 引起。迄今其防治方法主要着眼于无病苗木的培育和病株的清除。因此, 快速检测诊断病株, 特别是未显症或初显症的早期病株, 就成为一个极为重要而急待解决的问题。

目前, 人们在电镜检查<sup>[1]</sup>生理生化以及荧光染色<sup>[2]</sup>等方法上进行了研究, 但都不够稳定可靠。因而, 血清学方法以其简捷而灵敏的特点成为最有希望的途径。采用长春花 (*Citharanthus roseus* L.) 作为繁殖材料来提纯抗原, 柯穗等已作过一些探索<sup>[3]</sup>。Bove 等也利用其粗提物来免疫小鼠所制备出的单克隆抗体<sup>[4]</sup>只能专化性地检测某些地域的柑桔青果病 (与柑桔黄龙病属同类病害, 其病原也是 BLO), 但不能检测柑桔黄龙病。因此, 有必要制备出效价高, 能广泛检测可能存在的不同菌系的病原抗体, 同时摸索出一些快速简便而又具有高分辨力的血清学的检测方法。

近年来, 血清学检测技术在细菌学, 病毒学和植物菌原体学上已有迅速的发展, 在力求高灵敏度<sup>[5]</sup>的同时, 向经济实用, 准确稳定的方向发展, 如 Dot-ELISA<sup>[6, 10]</sup>等技术可以借鉴。

本试验应用常规的间接 ELISA 和间接荧光技术 (Indirect Immunofluorescence IIF) 进行检测, 同时还尝试了应用斑点酶联免疫方法和斑点免疫荧光方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

1.1.1 CYSO 系由柑桔黄龙病株经菟丝子 (*Cuscuta campestris*. L) 传到长春花上, 再经嫁接。

1.1.2 参试的抗原材料 (1) 感染 CYSO 的长春花; (2) 感染 CYSO 的椪柑; (3) 感染芝

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金资助项目

1991-04-08 收稿

麻丛枝病 (MLO) 的长春花; (4) 感染苦楝丛枝病 (MLO+BLO) 的长春花; (5) 感染番茄巨芽病 (MLO) 的长春花; (6) 健康长春花; (7) 健康椪柑。

1.1.3 供试的病、健材料 从下述柑桔品种的病树上采取症状典型的叶片及旁侧的“无症状”叶片,并用同种的健康实生苗的绿色叶片和黄化老龄叶作对照:(1)椪柑(*Citrus reticulata* Blanco cv. *Ponkan*); (2)蕉柑(*C. reticulata* Blanco cv. *lankan*); (3)甜橙(*C. sinensis* Osbeck); (4)感染柑桔衰退病 (Tristiza) 的椪柑。

上述样本均取其叶片主脉,以1:5或1:10加入提纯液,匀浆后经1 500 g离心20 min,贮于-20℃下备用。

## 1.2 CYSO 小鼠抗腹水制备

1.2.1 CYSO 的部分提纯 采用柯穗等的方法<sup>[2]</sup>每次提纯产物贮于-20℃下备用。

1.2.2 抗腹水的制备 参考前人的方法<sup>[2,4]</sup>将提纯的抗原反复冻融20次以上,随后免疫一月龄的♂鼠,第一次用等量福氏完全佐剂乳化,以后各次用不完全佐剂,共5次,每次间隔7~10天注射剂量依次为0.2, 0.5, 0.7和0.7 ml,并在第2和第4次除腹腔注射外,并在腿,胸各肌注2点,每点注射0.1 ml,末次免疫3天后,注射从小鼠膨胀腹部新抽出来的腹水0.2 ml。待小鼠腹部膨胀到一定程度,抽取抗腹水,经2 000 g离心15 min,加入0.1%NaN<sub>3</sub>,分装,保存于0℃下备用。

## 1.3 间接 ELISA 法

参考前人方法<sup>[10]</sup>,用羊抗鼠 IgG-辣根过氧化的酶(羊抗鼠 IgG-HRP,工作浓度1:1 000),为结合物,用0.5%牛血清白蛋白(BSA)作封闭剂,0.05 mol/L的PBS (pH7.4,含0.05% Tween-20)作稀释液,0.02 mol/L PBS (pH7.2)作洗涤液,底物为邻苯二胺(OPD)。

## 1.4 间接免疫荧光法 (IIF)

1.4.1 切片法 参考前人方法<sup>[6]</sup>,经固定或新鲜材料,用冰冻切片或徒手切片,切片厚度与15~30 μm,检测时每次取1个切片置于载玻片上,加1滴抗体溶液孵育,以羊抗鼠 IgG-异硫氰酸荧光素(羊抗鼠 IgG-FITC)与结合物,用L-1100荧光显微镜检查。

阳性反应判断标准:切片韧皮部四周见排列较规则的黄色至黄绿色荧光点,健康对照无此反应。

1.4.2 涂片法 参考前人方法<sup>[9]</sup>,取少量病叶提纯液,系列稀释后分别取3~5 ml置于多孔载玻片或凹载玻片上,用牙签展匀,在室温下置空气中干燥后,加1滴固定液(3%戊二醛中加入10%甲醛或70%乙醇),固定20 min后,用0.5%BSA封闭10 min,加抗体 IgG 和羊抗鼠 IgG-FITC 孵育,用荧光显微镜检查。

阳性反应判断标准:在荧光显微镜100×F,每视野的荧光斑点超过10个。荧光强度中等以上为“+”,荧光斑点5~10个时为“±”,5个以下且荧光较弱者为“-”。

## 1.5 Dot-ELISA 法

参考前人方法<sup>[11]</sup>,用1 mg/ml的部分提纯抗原作标准抗原,检测时用经1 000 g离心20 min的典型病叶叶脉的粗提物作抗原,程序如下:(1)将硝酸纤维素膜(NCM)切成8 cm×6 cm大小,每隔0.5~1 cm用铅笔或针头打点,将 NCM 展于 CB 中10 min,取出药面向上,空气干燥;(2)点样:抗原用0.05 mol/L CB液 (pH9.6)作2倍系列稀释,用微量进样器每点加2 ml或5 ml;(3)洗涤:用 PBS-Tween 洗涤液 (0.05 mol/L) pH7.2,含0.5% Tween-20及0.25%明胶)洗涤3次,每次2~3 min;(4)封闭:用10 ml 封闭液(洗涤液中加入0.5%

BSA, 1%干酪素 pH7.4) 在室温下封闭10 min; (5) 加抗体: 用吸水纸将 NCM 压干后加抗体, 在室温下孵育1h 或在37℃下30 min; (6) 洗涤; (7) 再封闭; (8) 加酶标: 加入以洗涤液加入0.5%BSA 稀释液的酶标羊抗鼠 IgG, 在室温下孵育30 min; (9) 洗涤; (10) 加底物(1 mg/molOPD 每10 ml 加入20 ml30% $H_2O_2$ ), 在室温下避光孵育30 min, 或在37℃15 min; (11) 终止反应: 用自来水冲洗5~10 min, 观察颜色反应, 红褐色斑点为阳性反应。

### 1.6 Dot-IF 法

试验程序: (1) ~ (6) 同 Dot-ELISA, (8) 浸入荧光标记的羊抗鼠 IgG 中, 室温下避光孵育10~30 min, (9) 冲洗后用荧光显微镜检查。

阳性反应判断: 用涂片 IIF 法。

## 2 试验结果

### 2.1 抗腹水的特异性测定

经健康抗原吸收的抗腹水, 用琼脂双扩散法测得其效价为1:8; 用微量沉淀法测得其效价为1:512。健康对照芝麻丛枝病 MLO, 苦楝丛枝病 MLO+BLO 和番茄巨芽病 MLO 等均不与该腹产生反应, 说明它对 CYSO 具有特异性。

### 2.2 抗体的效价测定

用 ELISA 法, IIF 涂片法, Dot-ELISA 法和 Dot-IF 法测定抗体效价。结果(见表1), Dot-ELISA 和 Dot-IF 法测得的效价较高, 为1:1 280, 其次是 IIF 法为1:1 000, 最低是 ELISA 法为1:640。

健康对照及正常抗腹水空白对照都只在1:4以下时才有非特异性反应。

表1 抗体效价不同检测方法比较<sup>a</sup>

方 法	ELISA		IIF <sup>b</sup>		Dot-ELISA		Dot-IF	
稀释倍数	640	1.280	1 000	10 000	1 280	2 560	1 280	2 560
抗体浓度 <sup>c</sup>	4.34	2.17	2.78	0.28	2.17	1.08	2.17	1.08
结果判断 <sup>d</sup>	+	±	+	±	+	±	+	±

a, 各种方法均重复4次以上; b, IIF 采用涂片法; c, 为对应稀释度的抗原浓度的粗略值, 用  $\mu\text{g/ml}$  表示; d, “+”——在此稀释度或低于此稀释度时均呈阳性反应; “±”——重复之间由于误差亦有阴性反应, 而高于此稀释度时均呈阴性反应。

### 2.3 几种检测方法的灵敏度比较

对1:1 000的部分提纯抗原进行1:2系列稀释后, 用 ELISA 法, IIF 涂片法, Dot-ELISA 法和 Dot-IF 法测定, 结果(见表2), Dot-IF 法灵敏度最高, 为0.031  $\mu\text{g/ml}$ , Dot-ELISA 法次之, 为0.12  $\mu\text{g/ml}$ , IIF 涂片法为0.24  $\mu\text{g/ml}$ , 而 ELISA 法最低, 为3.91  $\mu\text{g/ml}$ 。

表2 不同检测方法抗原滴度的比较<sup>a</sup>

方 法 <sup>b</sup>	ELISA		IIF <sup>c</sup>		Dot-ELISA		Dot-IF	
稀释倍数	2.56	512	4 096	8 192	8 192	16 384	32 768	65 536
抗原浓度 <sup>c</sup>	3.91	1.96	0.24	0.12	0.12	0.062	0.031	0.016
结果判断 <sup>d</sup>	+	-	+	-	+	±	+	±

a, 各种方法均重复4次以上; b, 抗体浓度; ELISA, IIF 用1:50; Dot-ELISA, Dot-IF 用1:500; c, IIF 采

用涂片法; d, 与对应稀释度的抗原浓度的粗略值, 用  $\mu\text{g}/\text{ml}$  表示; e, “+” — 在此稀释度或低于此稀释度时, 均呈阳性反应, “±” — 重复中有阴性反应的, 高于此稀释度, 均呈阴性反应, “-” — 在此稀释度或高于此稀释度呈阴性反应。

## 2.4 样本检测

2.4.1 ELISA 法 用 ELISA 法检测在10月上旬在田间采集到的样本, 结果如下 (见图1): 蕉柑和椪柑的病株的曲线与健株曲线差别明显。蕉柑和椪柑其粗抗原稀释度分别为1:32。而甜橙的病株曲线与健株曲线十分相近。按阳性反应判断标准, 用 ELISA 法只能检测出蕉柑和椪柑病株, 而检测不出甜橙病株。

### 2.4.2 IIF 法

切片法: 检测典型长春花病叶叶脉切片, 可见到韧皮部有一圈排列较规则的黄绿色荧光斑点 (见图版1), 当抗体浓度较高 (1:50) 时, 病株上的邻近病叶的“无症状”叶片的叶脉切片也显现较弱的黄色荧光斑点, 经检测150个, 符合率达100%; 而健康对照株切片, 经染色或不染色, 均未见上述荧光斑点 (见图版2)。

用同样方法检测柑桔样本, 当抗体浓度为1:50时, 蕉柑和椪柑的病叶叶脉切片均在韧皮部内周出现一圈细而较密的黄色荧光斑点 (见图版3)。经检测的蕉柑病叶叶脉切片207个, 其符合率为69.5%; 椪柑切片189个, 符合率为23.8%; 甜橙切片123个, 符合率与0%。健康材料或感染衰退病的椪柑叶脉切片经染色或不染色, 均未见上述的荧光反应。

涂片法: 蕉柑的粗提物呈现阳性反应的最大稀释度为1:128 (见图版4); 椪柑为1:32; 甜橙为1:16。

健康对照及感染衰退病的椪柑粗提物的系列稀释液均为阴性反应 (见图版5)。

2.4.3 Dot-ELISA 法 用1:10的典型病叶叶脉粗提物作抗原, 用健康叶脉粗提物作对照, 用 Dot-ELISA 法检测, 呈阳性反应的最大稀释度为: 长春花为1:256; 对照的为1:4; 蕉柑的为1:64, 对照的为1:8; 椪柑的为1:64, 对照的为1:4; 甜橙的为1:16, 对照的为1:4。 (见图版6)

2.4.4 Dot-IIF 法 用典型病叶叶脉的1:10粗提物作抗原。同样处理的健康粗提物作对照。用 Dot-IIF 检测, 呈阳性反应的最大稀释度: 长春花的为1:128, 对照1:4; 椪柑的为1:32, 对照的为1:4; 蕉柑的为1:32, 对照1:8; 甜橙的为1:8, 对照1:4。

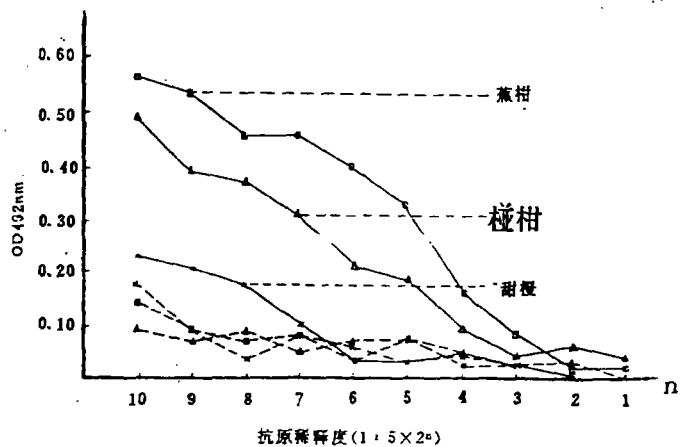


图1 不同样本的 ELISA 测定曲线  
— 发病材料    ..... 健康对照

## 3 结论与讨论

本试验用部份提纯的抗原免疫小鼠, 制备出 CYSO 的抗腹水, 经用各种参试的对照材料检测证明其对 CYSO 具有特异性, 其效价在前人的基础上有较大提高, 测定结果: ELISA 为1:640; IIF 为1:1 000; Dot-ELISA 为1:1 280; Dot-IIF 为1:1 280。检测纯化抗原滴定度, ELISA

为1:256; IIF为1:4 096; Dot-ELISA为1:8 192; Dot-IF为1:32 768.

本文首次报道应用多克隆抗体结合ELISA等方法来检测植株体内的CYSO, 试验结果表明, 用ELISA法只能检测出蕉柑、椪柑和典型症状的长春花病材料中的CYSO, 而对甜橙病株则检测不出, 而用IIF涂片法, Dot-ELISA和Dot-IF均能检测出蕉柑, 椪柑, 甜橙和长春花的典型病株中的CYSO均比ELISA灵敏. Dot-IF法是根据Dot-ELISA法的基本原理首次被提出来的, 它具有Dot-ELISA的简便, 省时, 准确和节省抗原, 抗体用量的优点, 但其灵敏度比dot-ELISA更高.

用荧光技术检测柑桔黄龙病, 前人已作过一些研究<sup>[1]</sup>, 其原理是利用感病植株的坏死组织产生的自发荧光. 本试验结果证明, 感染衰退病的柑桔叶片以及生理性黄化叶片也会出现上述现象. 因此, 认为该方法可能对黄龙病不具专化性, 这一缺点用血清学方法可以克服. 本试验结果表明, 应用CYSO的腹水抗体IgG, 除感染黄龙病的蕉柑与椪柑的典型病叶脉切片的韧皮部内周围出现一圈排列较整齐的荧光斑点的特异性免疫荧光反应外, 其他材料包括感染衰退病的叶片和生理黄化叶片都没有出现. 但本试验有不足之处是: 检测蕉柑和椪柑时虽有特异性反应, 但荧光强度中等, 且符合率不够高. 另外, 用切片法检测甜橙病株无效, 其原因是抗体效价不够高, 还是甜橙树体内病原浓度低, 有待进一步研究.

当前, 进行黄龙病血清学检测技术的研究的首要目标应是对未显症或初显症的材料进行检测. 但是, 本试验用几种方法检测病株上典型症状叶片相邻的“无症状”叶片都没有成功, 而同样地应用于长春花病株上与典型病叶相邻的“无症状”叶片上, 则反应很明显, 由此可推测, 在各种柑桔病株枝条上, 即使是与典型病叶片相邻的“无症状”叶片, 所含CYSO的浓度极低, 还未达到目前可以检测得出的水平, 这对于黄龙病的早期诊断是一大难题, 因而还需要在检测手段的灵敏度上作进一步研究.

#### 参 考 文 献

- 1 柯冲等. 柑桔黄龙病与类立克次氏体及线状病毒的初步研究. 科学通报, 1979, (10): 463~466
- 2 柯穗等. 柑桔黄龙病病原物提纯方法和血清学的初步研究. 华南农业大学学报, 1989, (1): 1~8
- 3 吴世盘. 柑桔黄龙病的直接荧光诊断法. 华南农业大学学报, 1987, (2): 45~48
- 4 郑光宇等. 应用斑点免疫结合法检测植物病毒. 病毒学报, 1988, 4: 151~155
- 5 Chen C S, Chen T A. Comparison of immunized mouse ascites fluids and rabbit sera in serological tests of two spiroplasma. *Phytopathology* 1980, 70: 279~282
- 6 Garnier N, et al. Monoclonal antibodies against the bacterium-like organism associated with citrus greening disease. *Ann Inst Pasteur/Microbiol*, 1987, 138: 639~650
- 7 Jiang Y P, Chen T A. Purification of mycoplasma-like organism from lettuce with aster yellows disease. *Phytopathology*. 1987, 72: 945~953
- 8 Lin C P, Chen T A. Comparison of monoclonal and polyclonal antibodies in detection of the aster yellows mycoplasma-like organism. *Phytopathology*. 1986, 76: 45~50
- 9 Schaad N W. Use of direct and indirect immunofluorescent tests for identification of *Xanthomonas campestris*. *Phytopathology*. 1978, 68: 249~252
- 10 Sinha R C, Benhamou N. Detection of mycoplasma-like organism antigens from aster yellow diseased plant by serological procedures. *Phytopathology*. 1983, 73: 1199~1202
- 11 Smith T d antarri, E. E. Eot-ELISA on nitrocellulose membranes for detection of potato leafroll virus. *Plant dis.* 1987, 71: 795~799

PRELIMINARY STUDIES ON THE METHODS OF RAPID SEROLOGICAL DETECTION AND  
DIAGNOSIS OF THE BLO ASSOCIATED WITH CITRUS SHOOT-YELLOWING

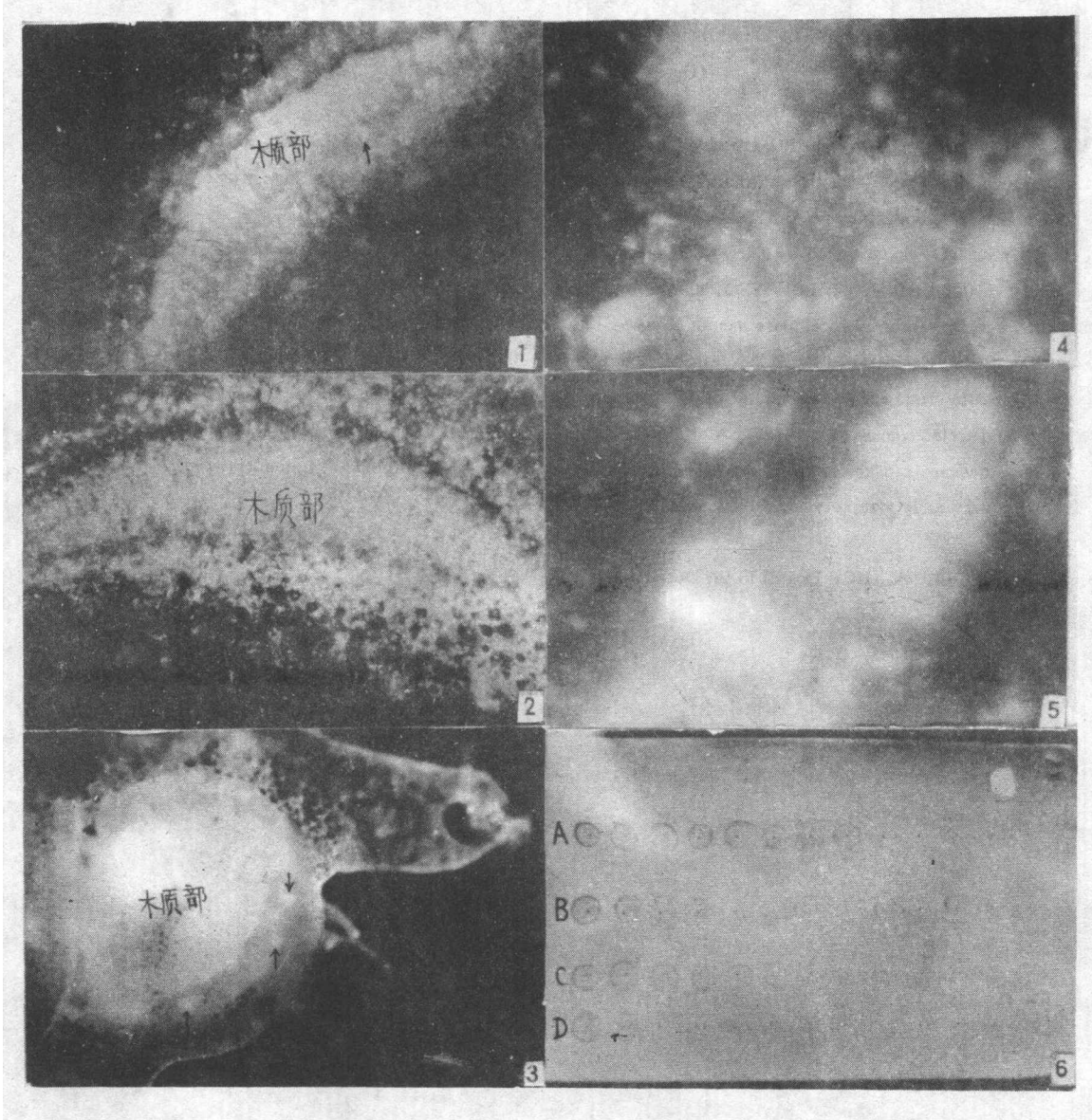
Li Dewang Tang Weiwen Faan Hweichung

(Department of Plant Protection)

**Abstract** Lots of partially purified citrus yellow shoot organisms (CYSO) were used as antigen to immunize mice for the roduction of anti-CYSO ascitic fluid. The ascitic fluid proved specific to CYSO. Its titer by agar gel diffusion was 1:8 and by microprecipitation 1:512

Anti-CYSO IgG was prepared by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation combined with DEAE-cellulose column chromatography. Using 1:5 000 partially purified CYSO, its titer by ELISA was 1:640, by IIF was 1:1 000, and that by both Dot-ELISA and Dot-IF on nitrocellulose membranes was 1:1 280. Using this IgG, a dilution of 391  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of partially purified CYSO was detected by ELISA, 0.24  $\mu\text{g}/\text{ml}$  by IIF, 0.12  $\mu\text{g}/\text{ml}$  by Dot-ELISA and 0.031  $\mu\text{g}/\text{ml}$  by Dot-IF. CYSO in crude extracts of typical diseased specimens from *Citrus reticulata* cv. *ponkan* and *Citrus reticulata* cv *tankan* could be detected consistently by ELISA at a certain dilution, yet those from either ponkan, tankan or *Citrus sinensis* could be detected sensitively by either IIF, Dot-ELISA or Dot-IF. None of the symptomless specimens and those showing very early symptom could be detected as positive.

**Key words** ELISA; IIF; Dot-ELISA; Dot-IIF



图版1. 感染 CYSO 的典型长春花病叶叶脉横切片的免疫荧光反应；

- 2. 健康长春花叶脉横切片的免疫荧光反应；
- 3. 蕉柑典型黄龙病叶叶脉横切片的荧光反应
- 4. 蕉柑黄龙病抗原的涂片免疫荧光反应
- 5. 健康蕉柑抗原的涂片免疫荧光反应
- 6. 椪柑粗提物的 Dot-ELISA 检测结果；A, C 两行为病样重复；B, D 两行为对照重复。