

柑橘衰退病毒中国分离物 HB1 的血清学特性研究

王彩霞^{1, 2}

(1. 青岛农业大学 植物保护学院, 山东 青岛 266109; 2. 华中农业大学 植物科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 利用 3 种不同来源的柑橘衰退病毒(*Citrus tristeza virus*, CTV) 抗体(PAb-L5、PAb-I、MAbs-S4)对武汉地区发生的 CTV 进行检测, 筛选到一个表现特异血清学性状的分离物 CTV-HB1, 该分离物仅同来源于中国的多克隆抗体 PAb-L5 发生血清学反应。为揭示该血清学差异的分子机制, 对 CTV-HB1 和其他几个分离物 CP 基因序列进行了分析, 结果显示: CTV-HB1 CP 基因与其他 19 个分离物的核苷酸序列相似性在 90.4% ~ 99.4%, 但 CTV-HB1 和 CTV-L5 的 CP 基因氨基酸序列间仅存在 3 个位点的变异, 暗示: 此 3 个氨基酸位点可能与 CTV-HB1 的血清学特性有关。

关键词: 柑橘衰退病毒; CP 基因; 抗体; 序列分析

中图分类号: S436.661 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)03-0212-03

The Study of Serological Property of CP Gene From a Chinese Citrus Tristeza Virus Isolate HB1

WANG Cai-xia^{1, 2}

(1. College of Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In this study, a Chinese Citrus tristeza virus(CTV) isolate HB1 showing unusual serological characteristic was identified using three antibodies from different sources (PAb-L5, PAb-I, MAbs-S4) in Wuhan, Hubei province. CTV-HB1 could only be recognized by a polyclonal antibody(PAb-L5) raised against a Chinese isolate L5 in both ELISA and DTBIA. To understand the molecular mechanisms underlying such anomalous serological property, the sequences of CP gene were identified for CTV-HB1 and other isolates. Comparison of the CP gene sequences from CTV-HB1 with those of other 19 isolates published in GenBank revealed that the sequence similarity was 90.4% to 99.4% at nucleotide level. However, only three amino acid residues in the CP gene from CTV-HB1 were different from that of CTV-L5. All the above results suggested that the three changed position(s) might be correlated to the serological property of CTV-HB1.

Key words: Citrus tristeza virus; CP gene; Antibody; Sequence analysis

柑橘衰退病毒为长线形病毒属(*Closterovirus*)成员, 病毒粒子细长弯曲, 其引起的衰退病是影响全球柑橘生产的重要病害之一^[1]。CTV 主要通过蚜虫和嫁接传播, 病毒基因组为正义单链 RNA。CTV 具有明显的株系分化现象, 且株系间存在致病性的差异。近些年来, 采用特异性抗体和 ELISA 法来区分不同 CTV 株系的研究取得了较大进展^[2, 3]。Pemmar 等^[2]筛选出可以区分美国佛罗里达速衰和非速衰株系的单克隆抗体 MCA-13, 随后, Nikolaeva 等^[4]又建立了用于区分美国佛罗里达和加利福尼亚茎陷点和非茎陷点株系的间接 DAS-ELISA 法, 但两者的应用仅局限于美国的佛罗里达、加利福尼亚等地, 在其他国家或地区的使用效果均不理想, 表明不同国家或地区发生的 CTV 株系特点及血清学关系存在差异。

本研究利用针对我国 CTV 分离物制备的多克隆和单克隆抗体^[5]及针对意大利分离物制备的广谱性多克隆抗体对武汉地区发生的 CTV 进行了检测, 筛选到一个与其他分离物存在血清学差异的 CTV 分离物命名为 CTV-HB1, 并对该分离物 CP 基因的序列进行了分析, 旨在从分子水平上揭示该 CTV 分离物的血清学特性与其外壳蛋白氨基酸序列间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 抗体 CTV 多克隆抗体 PAb-L5 和 10 株单克隆抗体 MAbs-S4 均由本实验室制备并保存, CTV 多克隆抗体 PAb-I 针对 CTV-0002 分离物制备, 由意大利作物病毒与类病毒研究所 Martelli 教授提供。

收稿日期: 2009-01-06

基金项目: 国家“863”计划(2006AA10Z434-04); 青岛农业大学高层次人才启动基金(630812)

作者简介: 王彩霞(1977-), 女, 山东德州人, 讲师, 博士, 主要从事果树病毒学研究工作。

1.1.2 植物材料和病毒分离物 所有 CTV 分离物均采自湖北省，嫁接于一年生墨西哥来檬(*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle)和甜橙(*C. sinensis* (L.) Osbeck)的实生苗上，其中 HB1 来源于 HB 柚(*C. grandis*(L.)Osbeck, Hirada Buntan)，N3 来源于 PG 杂柑，L5、S4、A4、HN-K 来自于甜橙(*C. sinensis*)，砧木均为枳壳(*Poncirus trifoliata*)。所有嫁接后感染 CTV 的柑橘材料均保存于防虫隔离温室中。以健康墨西哥来檬实生苗作阴性对照材料。

1.2 CTV-HB1 的血清学特性

利用 PAb-L5、10 株单克隆抗体的混合液(MAbs-S4)及 PAb-I 三种不同来源的 CTV 抗体，分别采用 A 蛋白夹心(PAS-)ELISA、三抗体夹心(TAS-)ELISA 和直接组织印迹(DTBIA)法对武汉地区采集的柑橘样品进行检测，所有试验均重复多次。

1.3 总 RNA 的提取及 RT-PCR 扩增

总 RNA 的抽提按照华舜公司的 RNArise Reagent RNA/DNA 同步抽提试剂盒说明书进行。CP 基因的扩增引物参照 Karasev 等^[4]报道的 CTV 序列设计，互补引物为 5'-ATGACGACGAAACAAAGA-3'，同源引物为 5'-TCAACGTGTGTGAATTTC-3'，由上海生工生物工程有限公司合成。

RT 反应体系：5× 反转录 Buffer 4 μL，dNTPs 0.5 mmol/L，RNA 酶抑制剂 20 U，互补引物 0.25 μmol/L，M-MLV 反转录酶 50 U，总 RNA 1 μL，DEPC 处理水补足总体积 20 μL。RT 反应程序：42℃温育 60 min，95℃酶灭活 3 min，立即置于冰上，4℃保存备用。

PCR 扩增体系：10× Buffer 2.5 μL，dNTPs 200 μmol/L，同源引物与互补引物各 0.4 μmol/L，Taq DNA 聚合酶 1.0 U，模板 cDNA 1.0 μL，灭菌双蒸水补足总体积 25 μL。扩增条件为：94℃预变性 3 min，94℃变性 30 s，53~56℃退火 30 s，72℃延伸 45 s，循环 30 次后 72℃延伸 5 min。扩增结束后，取 8 μL PCR 产物于 1.2%的琼脂糖凝胶中进行电泳检测。

1.4 CTV-HB1 CP 基因的克隆及序列测定

CP 基因的克隆按照 A-T 克隆试剂盒说明书进行。以重组质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增，扩增条件同前。经 PCR 和质粒酶切鉴定为阳性的单克隆菌液，随机挑取 3 个交付上海基康生物公司进行测序。测序结果运用 NCBI BLAST 进行同源性搜索，采用 GenDoc、DNASar 等分子生物学软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 CTV-HB1 的血清学特性

利用 PAb-I、PAb-L5 和 MAbs-S4 3 种不同来源抗

体，采用 PAS-、TAS-ELISA 和 DTBIA 法分别对 16 个柑橘样品进行了检测(表 1 和图 1 仅列出部分结果)。结果显示，除 HB1 外，所有样品在几种血清学试验中的检测结果均一致；而 HB1 仅在单独利用 PAb-L5 的 PAS-ELISA 和 DTBIA 试验中检测结果为阳性，使用 PAb-I 和 MAbs-S4 的试验中，其检测结果均为阴性。所有样品均在不同年份进行了多次取样检测，其检测结果均一致。

表 1 不同来源抗体采用 ELISA 法检测柑橘样品 CTV 的部分结果

Tab. 1 Partial serological detection results of CTV from different samples by three ELISA methods with antibodies from different sources

样品 Samples	A 蛋白夹心 (PAb-I)ELISA PAS-ELISA	A 蛋白夹心 (PAb-L5)ELISA PAS-ELISA	三抗体夹心 ELISA TAS-ELISA
N3	+	+	+
HB1 *	—	+	—
L5	+	+	+
S4	+	+	+
HN-K	+	+	+

注：+，阳性反应(P/N>2)；—，阴性反应(P/N<2)；*，3 种 ELISA 方法检测结果不一致的样品。

Note: +, Positive reaction (P/N>2); —, Negative reaction (P/N<2); *, The sample showing different reactions in three ELISA methods.

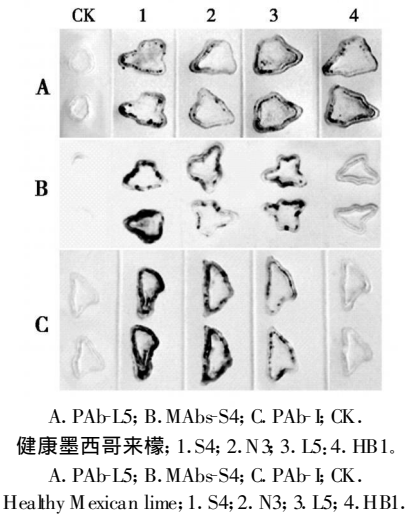


图 1 不同来源抗体采用 DTBIA 法检测柑橘样品 CTV 的部分结果

Fig. 1 Serological detection partial results of CTV from different samples by DTBIA with antibodies from different sources

2.2 CTV-HB1 的 RT-PCR 检测结果

以总 RNA (约 1 μg) 为模板在 M-MLV 反转录酶的作用下进行反转录得到 cDNA，以其为模板进行 PCR 扩增，扩增产物在 1.2%的琼脂糖凝胶中进行电泳检测。从图 2 可看出，样品 HB1、A4、Y1 及阳性对照 L5 均能扩增出预期大小(672 bp)的目标片段，且扩增产物在琼脂糖凝胶上条带清晰，在阴性对照

样品中没有得到任何扩增产物,但是从 HB1 样品扩增得到的目标产物量明显的比其他感染 CTV 样品得到的产物量少(图 2,泳道 6)。

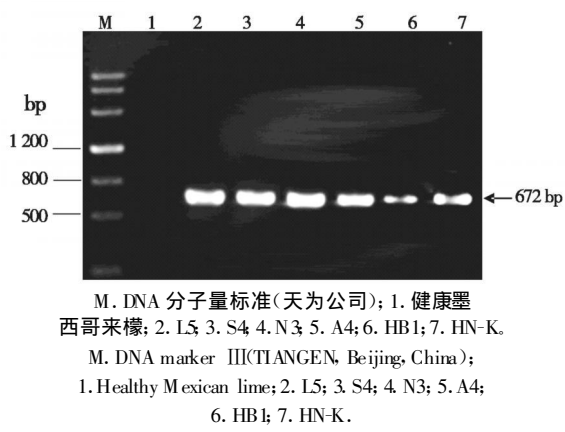


图 2 RT-PCR 检测不同柑橘样品 CTV 的结果
Fig. 2 Detection of CTV in different samples by RT-PCR

2.3 CTV-HB1 CP 基因的序列测定及分析

随机取 3 个酶切鉴定后的克隆送上海基康生物工程公司进行测序,结果表明,3 个克隆的序列均完全一致。克隆的 HB1 CP 基因 cDNA 全长为 672 bp,推测编码 223 个氨基酸。该基因已在 GenBank 上注册,登记号为 EF028324。

利用 DNASTar 和 GeneDoc 分子生物学软件中的 Clustal W 方法对 CTV-HB1、CTV-0002 (AJ518841)、CTV-S4、CTV-L5,本实验室以前测序的 5 个 CTV 分离物 HN-K (AY953982)、JX-1-1 (AY953983)、JX-2-7 (AY953980)、ML-12 (EF028325)和 ML-13 (EF028326)以及 GenBank 上已报道的 11 个有代表性 CTV 分离物的 CP 基因序列,进行核苷酸和推定氨基酸水平上的多重比对分析。序列比对分析结果表明,CTV-HB1 CP 基因与其他 7 个中国分离物、意大利 CTV-0002 分离物和 11 个 GenBank 上已报道 CTV 分离物的核苷酸序列形似性在 90.4%~99.4%,推定氨基酸的序列相似性在 94.2%~98.7%,其中 HB1 与 L5、SY568、13C 和 NUagA 的核苷酸和推定氨基酸的序列相似性均在 97%以上,而与速衰分离物 T36 的核苷酸和氨基酸序列相似性较低,分别为 92.9%和 94.2%,与弱毒分离物 T385 和 T30 的氨基酸序列相似性也仅为 94.7%。

利用 GeneDoc 对 CTV-HB1、CTV-0002、CTV-L5、CTV-S4、JX-1-1、JX-2-7、ML-12、ML-13 和 HN-K 9 个分离物的推定氨基酸序列进行多重比对分析,其中后 7 个分离物在利用 PAb-L5、PAb-I 和 MAbs-S4 3 种不同来源抗体检测时均表现阳性反应。结果显示,CTV-HB1 和 CTV-L5 的 CP 基因仅有 3 个位点的氨基酸序列发生了改变,分别发生在 84(S→L)、98(G

→D)和 190(G→C)位;而这 3 个氨基酸位点在 CTV-0002、CTV-L5 和 CTV-S4 以及 GenBank 中报道的其他 CTV 分离物中都是保守的,由此可以推测 CTV-HB1 和 CTV-L5 CP 基因氨基酸序列他上 3 个位点的改变可能导致了 CTV-HB1 不能被 PAb-I 和 MAbs-S4 抗体所识别。

3 讨论

CTV 不仅广泛分布于世界各柑橘产区,且高度变异,存在明显的株系分化现象,有关 CTV 分离物存在血清学性状差异的现象,国外已有较多报道^[2-4]。尽管我国研究者应用指示植物鉴定法早已证实衰退病在我国普遍发生,但有关我国 CTV 分离物的血清学特性及其相关研究在国内尚未见报道。本课题组成员曾利用制备的 CTV 特异性抗体,对江西、湖南和湖北三省主要柑橘栽培区发生 CTV 的血清学性状进行了调查,结果显示,3 种不同来源的 CTV 抗体(PAb-I、PAb-L5 和 MAbs-S4)可以识别我国发生的大部分 CTV 分离物^[3],但在对武汉地区田间柑橘样品发生的 CTV 进行血清学检测时,筛选到一个表现特异血清学性状的分离物 CTV-HB1,此分离物仅能同 PAb-L5 发生免疫反应,而与 PAb-I 和 MAbs-S4 均不产生任何免疫信号。通过对序列分析发现 CTV-L5 和 CTV-HB1 序列间仅有 3 个氨基酸位点[84(S→L)、98(G→D)和 190(G→C)]发生了改变,而这 3 个氨基酸位点在其他所有的分离物中都是保守的。考虑到 CTV-HB1 和本研究中其他中国 CTV 分离物血清学上的差异,我们推测此 3 个氨基酸位点的改变可能导致了 CTV-HB1 不能被 PAb-I 和 MAbs-S4 抗体所识别。当然,要证实此 3 个氨基酸位点在 CTV-HB1 被抗体识别过程中的作用尚需要进一步的试验证据。

参考文献:
[1] Bar Joseph M, Marcus R, Lee R F. The continuous challenge of citrus tristeza virus control [J]. Annu Rev Phytopatho, 1989 27: 291—316.
[2] Pemar T A, Gamsey S M, Gumpf D J, et al. A monoclonal antibody that discriminate strains of citrus tristeza virus [J]. Phytopathology, 1990 80: 224—228.
[3] Nikolaeva O V, Karasev A V, Powell C A, et al. Mapping of epitopes for citrus tristeza virus-specific monoclonal antibodies using bacterially expressed coat protein fragments [J]. Phytopathology, 1996 86: 974—979.
[4] Nikolaeva O V, Karasev A V. Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange [J]. Plant Dis, 1998 82: 1276—1280.
[5] 王彩霞, 王国平, 姜波, 等. 柑橘衰退病毒多克隆和单克隆抗体的制备及检测效果分析 [J]. 生物工程学报, 2006 22(4): 629—634.
[6] Karasev A V, Boyko V R, Gowda S, et al. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome [J]. Virology, 1995, 208: 511—520.