

## 槟榔黄化相关病毒的提纯及抗血清制备

张海越<sup>1,2</sup>, 路洁<sup>1,2</sup>, 高保森<sup>1,2</sup>, 王洪星<sup>2\*</sup>

1. 海南大学热带农林学院, 海南儋州 571737; 2. 海南大学南繁学院(三亚南繁研究院), 海南三亚 572025

**摘要:** 槟榔黄化相关病毒(Areca palm velarivirus 1, APV1)引起的槟榔黄化病严重危害槟榔种植业, 为防控槟榔黄化病的快速蔓延, 亟需开发 APV1 病毒的快速检测技术。本研究以 APV1 侵染性克隆侵染的本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)作为分离提纯 APV1 病毒粒子的材料, 利用聚乙二醇沉淀法、超速离心沉淀法、不连续蔗糖密度梯度离心法、亲和磁珠法等方法分离提纯 APV1; 利用透射电镜观察、SDS-PAGE、Western blot 等方法鉴定提纯 APV1 病毒粒子的质量, 将提纯的 APV1 病毒粒子免疫 BALB/c 小鼠制备 APV1 多抗血清用于 APV1 病毒检测。结果表明: 使用 5% 聚乙二醇 6000 (PEG-6000) 和 0.6% NaCl (m/V) 可以将 APV1 病毒粒子从烟草匀浆液中充分沉淀, 重悬经 55% 蔗糖垫超速离心后, APV1 病毒粒子分布于蔗糖层下部或沉淀于离心管底部; 粗提纯的 APV1 病毒粒子经 30%、40%、50%、60%、70% 不连续蔗糖密度梯度 140 000×g 离心 2 h 进行精提纯, 分级取样检测显示 APV1 病毒粒子富集于 60%、70% 蔗糖层; 亲和磁珠可以富集 APV1 病毒粒子, 但洗脱时少量抗体脱落影响病毒纯度。提纯的病毒粒子在透射电镜下呈细长线形, 长为 650~2200 nm, 直径为 10~13 nm; 将提纯的 APV1 病毒粒子免疫小鼠, 获得对 APV1 高度特异、效价为 1:25 600 的抗血清。该研究结果为 APV1 的分离提纯提供新的思路, 为 APV1 病毒快速检测提供重要的技术支撑。

**关键词:** APV1; 病毒提纯; 聚乙二醇; 密度梯度离心; 抗血清制备

中图分类号: S763.7 文献标志码: A

## Purification and Preparation of Anti-serum Against Areca Palm Velarivirus 1 (APV1)

ZHANG Haiyue<sup>1,2</sup>, LU Jie<sup>1,2</sup>, GAO Baosen<sup>1,2</sup>, WANG Hongxing<sup>2\*</sup>

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; 2. School of Breeding and Multiplication (Sanya Institute of Breeding and Multiplication), Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China

**Abstract:** Areca palm velarivirus 1 (APV1) is identified as a causative agent of yellow leaf disease (YLD), which emerges as a prominent threat to betel palm plantation. Developing methods for rapid detection of APV1 is necessary for preventing and controlling YLD in betel palm cultivation. In this work, APV1 virions were extracted from APV1-infected *Nicotiana benthamiana* by using polyethylene glycol (PEG) precipitation, ultracentrifugation, sucrose density gradient centrifugation, and affinity magnetic beads. The purified APV1 virions were identified by transmission electron microscopy (TEM), SDS-PAGE and Western blotting. The purified APV1 virions were used to immunize BALB/c mice to produce polyclonal antiserum for detection of APV1. APV1 virions were precipitated from *N. benthamiana* homogenates by applying 5% PEG6000 and 0.6% NaCl. After resuspension and ultracentrifugation with 55% sucrose cushion, APV1 virions were distributed in the lower part of the sucrose layer or precipitated at the bottom of the centrifuge tube. APV1 was purified by 30%, 40%, 50%, 60% and 70% discontinuous sucrose density gradient centrifugation at 140 000×g for 2 h, and the results showed that APV1 was enriched in 60% and 70% sucrose layers. Affinity magnetic beads could efficiently purify APV1 virions. The purified virions were elongated, about 650–2200 nm in length and 10–13 nm in diameter. BALB/c mice were immunized with the extracted APV1 virions to obtain antiserum

收稿日期 2025-02-18; 接受日期 2025-05-14

基金项目 三亚崖州湾科技城管理局“崖州湾”菁英人才科技专项 (No. SCKJ-JYRC-2023-11); 国家自然科学基金项目 (No. 32160373)。

作者简介 张海越 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 作物遗传育种。\*通信作者 (Corresponding author): 王洪星 (WANG Hongxing), E-mail: 181721@hainanu.edu.cn。

with high specificity for APV1 and titer of 1 : 25 600. The results would provide a new idea for the separation and purification of APV1, and an important technical support for rapid detection of APV1.

**Keywords:** Areca palm velarivirus 1 (APV1); virus purification; polyethylene glycol (PEG); density gradient centrifugation; antiserum preparation

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.09.012

槟榔 (*Areca catechu* L.) 属于棕榈科常绿乔木, 是我国四大南药之一<sup>[1]</sup>。槟榔在海南种植面积达 20 万  $\text{hm}^2$ , 槟榔产业年产值达 1 000 亿元, 成为海南 200 万农村人口主要的经济来源<sup>[2-3]</sup>。槟榔黄化病 (yellow leaf disease, YLD) 是严重威胁槟榔种植业的一种传染性病害, 染病植株大多数表现为叶片黄化型症状, 症状最初从最下部叶片的小叶尖端和中冠开始; 黄化 (泛黄) 向维管组织方向扩展, 而中脉保持绿色, 形成黄绿色边界<sup>[4]</sup>; 随后叶片黄化症状逐年加重, 槟榔树冠幅变小, 抽生的花穗短小, 果实常提前脱落, 少量存留的果实也品质变差, 并在 5~7 年内枯顶死亡<sup>[5]</sup>。槟榔黄化病在海南迅速蔓延, 造成槟榔园减产甚至失收, 成为限制槟榔产业持续健康发展的重要因素之一<sup>[6-7]</sup>。2015 年在海南槟榔黄化病样品中鉴定出一种新病毒, 该病毒被命名 *Areca palm velarivirus 1* (APV1, 直译为槟榔隐症病毒 1)<sup>[8]</sup>, 但未受到重视。WANG 等<sup>[9]</sup>发现 APV1 与 YLD 高度相关, APV1 很可能是 YLD 的病原。进一步通过双条拂粉蚧 (*Ferrisia virgata*) 和柑橘棘粉蚧 (*Pseudococcus cryptus*) 以非循环半持久型方式传播到槟榔植株并引发 YLD 典型症状<sup>[10-11]</sup>, 证明 APV1 是侵染槟榔引发 YLD 的关键病原之一。由 APV1 引起的槟榔黄化病田间症状会随季节变化而发生改变, 夏季高温, 病毒积累量低, 黄化症状得到缓解, 而冬季气温低, 病毒积累量高, 黄化症状加重, 并且感染病毒的槟榔幼苗症状不明显<sup>[12]</sup>。因此, 在槟榔生长早期, 根据田间症状特征难以准确识别 APV1 引起的 YLD, 建立快速准确的病毒检测方法迫在眉睫。

免疫学检测方法是一种重要的植物病毒病检测技术, 其中的酶联免疫吸附法 (ELISA) 使用经标记的抗体, 可以快速地通过颜色变化显示结果<sup>[13-14]</sup>。病毒的特异性抗体是免疫学检测方法的基础, 将完整的病毒粒子或病毒蛋白注射到动物体内, 可以诱发动物的免疫反应产生对应的病毒抗体。因此制备抗体需要先提纯病毒粒子。

病毒提纯过程一般分为提取缓冲液配制、植

物材料匀浆、抽提液澄清、病毒粒子浓缩与分离等步骤。提纯方法有沉淀法、凝胶过滤法、超速离心法、密度梯度离心法等<sup>[15-17]</sup>。APV1 属于长线形病毒科 (*Closteroviridae*)、隐症病毒属 (*Velarivirus*), 由于病毒粒子主要分布于寄主槟榔韧皮部, 提纯较为困难, 目前尚无提纯 APV1 病毒粒子制备抗体的报道。同一个科、属的病毒通常提纯方法相似, KLAASSEN 等<sup>[18]</sup>提纯莴苣传染性黄化病毒 (*Lettuce infectious yellows virus*, LIYV) 使用的超速离心的方法是长线形病毒科病毒最经典的提纯方法, 以此提纯方法为基础改良成功提纯了多种同科其他病毒<sup>[19-20]</sup>。关于柑橘衰退病毒 (*Citrus Tristeza Virus*, CTV) 的提纯研究较多, 已报道的有超速离心法、聚乙二醇沉淀法、凝胶柱层析法等提纯方法<sup>[21-23]</sup>。除上述方法外, 又新兴了亲和磁珠法分离植物病毒的方法<sup>[24]</sup>。

本研究以 APV1 侵染性克隆侵染的本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 为材料, 在参考长线形科病毒提纯方法的基础上, 比较聚乙二醇沉淀法和超速离心沉淀法粗提纯 APV1 病毒粒子的提取效率和得率, 进一步利用蔗糖密度梯度离心法或亲和磁珠法精提纯 APV1 病毒粒子, 免疫 BALB/c 小鼠, 制备 APV1 鼠多抗血清, 该研究结果为 APV1 检测及病毒防控提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 APV1 侵染的本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*), 由本实验室构建的 APV1 侵染性克隆侵染野生型本氏烟草获得<sup>[25]</sup>。

待测 APV1 槟榔样品, 在海南三亚崖州区随机取样。

1.1.2 实验仪器 超速离心机 (Thermo Scientific™ Sorvall™ WX90+), 高速离心机 (HITACHI CR22G III) 等。

### 1.2 方法

1.2.1 APV1 侵染的本氏烟草检测 使用天根生化科技 (北京) 有限公司生产的多糖多酚植物总

RNA 提取试剂盒 (#DP441) 提取本氏烟草总 RNA, 利用赛默飞世尔科技(中国)有限公司生产的 RevertAid 第一链 cDNA 合成试剂盒 (#K1622) 进行反转录; 使用生工生物工程(上海)股份有限公司生产的 2×SanTaq PCR Mix 预混液 (#B532061) 和检测引物 CP-new、YLDV4<sup>[26]</sup> 进行 RT-PCR 扩增。

1.2.2 聚乙二醇沉淀法沉淀 APV1 经检测确认被 APV1 侵染的本氏烟草, 取其叶片和茎秆置于研钵中, 加液氮研磨成粉末, 按 1:5 (*m/V*) 比例加预冷至 4 °C 的提取缓冲液 (0.1 mol/L Tris-HCl, 0.5% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 0.5% TritionX-100, 0.5% β-巯基乙醇, 5% 蔗糖, pH 为 7.4), 搅拌 1 h, 于 4 °C, 13 400×g 离心 15 min, 弃沉淀, 上清液中加入 5% 聚乙二醇 (PEG-6000) 和 0.6% NaCl (*m/V*), 搅拌 1 h 至 PEG-6000 完全溶解, 于 4 °C, 8000×g 离心 15 min 弃上清液, 沉淀按 1:10 (*m/V*) 用 TE 缓冲液 (0.01 mol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 为 7.4) 重悬, 重悬液置于透析袋中透析过夜; 第 2 天于 4 °C, 25 000×g 离心 10 min, 取上清液, 沉淀再次用 TE 缓冲液重悬, 于 4 °C, 25 000×g 离心 10 min, 取上清液, 合并 2 次上清液。

1.2.3 超速离心沉淀法粗提纯 APV1 在离心管底部依次注入 1 mL 20% 蔗糖、2 mL 55% 蔗糖, 加入 1.2.2 中得到的病毒提取液补齐至离心管的瓶颈处, 于 4 °C, 90 000×g 离心 3 h, 分别收集蔗糖层和沉淀, 沉淀用 TE 缓冲液重悬后, 于 4 °C, 10 000×g 离心 10 min 去除沉淀, 获得的上清液即为病毒粗提取液。

1.2.4 蔗糖密度梯度精提纯 APV1 用 TE 缓冲液分别配制 30%、40%、50%、60%、70% 蔗糖溶液, 制备不连续蔗糖密度梯度。加入 1.2.3 中得到的病毒粗提取液补齐至离心管瓶颈处, 于 4 °C, 140 000×g 离心 2 h。从上至下依次收集密度梯度蔗糖层, 经 Western blot 检测确定 APV1 病毒粒子分布。

1.2.5 亲和磁珠精提纯 APV1 制备 APV1 亲和磁珠。将原核表达 APV1 外壳蛋白制备的兔多抗血清<sup>[27]</sup>与 Protein A/G 磁珠 (金瑞思公司) 交联, 按说明书操作, 将 APV1 亲和磁珠, 按 100 μL 磁珠加 5 mL 病毒粗提液的比例混合, 于 4 °C 孵育过夜, 用洗涤液 (20 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.0) 洗涤 3 次, 用洗脱液 (0.1 mol/L glycine, pH 3.0) 洗脱。

1.2.6 不同方法提纯病毒粒子 SDS-PAGE 和 Western blot 分析 取适量样品与 5×SDS 上样缓冲液混合煮沸变性, 点样, 电泳 (150 V, 50 min) 经 10% SDS-PAGE 胶 (雅酶公司) 分离不同蛋白, 将分离胶浸泡于考马斯亮蓝染色液 1 h, 用脱色液脱色; 通过电转方法将 SDS-PAGE 胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上, PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后转移至 5% 脱脂奶粉稀释的 APV1-CP 小鼠单克隆抗体<sup>[28]</sup> (1:5000), 于 4 °C 孵育过夜, 经 PBST 洗涤后, 再将 PVDF 膜移至稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG (1:5000), 常温孵育 2 h, PBST 洗涤后, 在 PVDF 膜上滴加赛默飞 ECL 显影剂, 用化学发光检测仪器观察结果。

1.2.7 多抗血清制备 用蔗糖密度梯度提纯的 APV1 病毒粒子注射 6~8 周龄的 BALB/C 小鼠制备多抗血清<sup>[29]</sup>。每只小鼠注射 30 μL 的 APV1 病毒粒子和 30 μL 弗氏完全佐剂的混合物, 共免疫 3 次。每次间隔 2 周, 最后 1 次注射 1 周后, 从小鼠脸颊取少量血样检测抗血清效价, 抗血清效价达到预期后利用眼球取血法取小鼠全血, 于 5 000 r/min 离心 10 min 得到抗血清, 保存于 -80 °C, 备用。

1.2.8 利用 ELISA 检测疑似 YLD 样品 待测槟榔样品用适量 PBST 缓冲液充分研磨, 取上清液用抗原包被液按 1:10 稀释, 添加到酶标板上, 每孔加样 100 μL, 盖上酶标板盖于 4 °C 过夜; 倒掉包被液, 用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 加入封闭液, 于 37 °C 孵育 2 h; 倒出封闭液, 每孔加入 200 μL 洗涤缓冲液洗涤, 每 5 min 1 次, 共洗涤 3 次; APV1 小鼠多抗用抗体稀释液按 1:5 000 稀释, 每孔加样 100 μL, 于 37 °C 孵育 2 h; 倒出抗体稀释液, 每孔加入 200 μL PBST 洗涤, 每 5 min 1 次, 共洗涤 3 次; HRP 标记的山羊抗小鼠抗体用抗体稀释液按 1:5000 稀释, 每孔加样 100 μL, 于 37 °C 孵育 2 h; 倒出抗体稀释液, 每孔加入 200 μL PBST 洗涤, 每 5 min 1 次, 共洗涤 3 次; 每孔加入显色底物 100 μL, 避光室温放置 30 min。每孔加入 50 μL 1 mol/L HCl 终止反应, 观察颜色变化或利用酶标仪测量 OD<sub>450</sub> 数值。

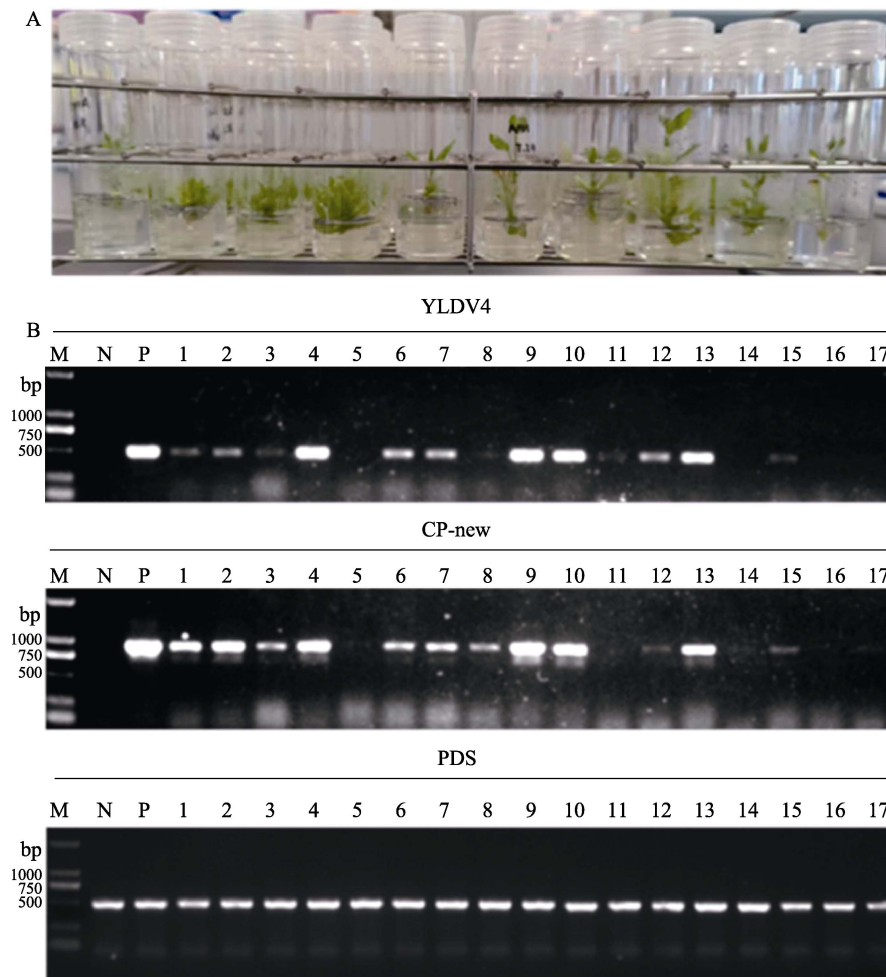
## 2 结果与分析

### 2.1 本氏烟草 RT-PCR 检测

由于通过农杆菌注射接种 APV1 侵染性克隆侵染本氏烟草效率较低<sup>[25]</sup>。本研究所用侵染 APV1 病毒本氏烟草由 APV1 侵染性克隆侵染阳性植株组培

扩繁; 鉴于组培具有一定脱毒概率, 需要对组培得到的本氏烟草进行 APV1 检测, 随机选择 17 株组培获得的本氏烟草用于检测, 选取 APV1 检测阳性

本氏烟草用于病毒粒子提纯, 检测引物为 CP-new 和 YLDV4, 烟草 PDS 基因为内参, 经 RT-PCR 检测结果显示组培本氏烟草带毒率为 76% (图 1)。



A: 侵染 APV1 本氏烟草组培苗。B: RT-PCR 检测, M 为 D2000 DNA ladder, N 为空载体本氏烟草负对照, P 为感染 APV1 病毒本氏烟草, 1~17 为样品。

A: Propagated APV1-infected *N. benthamiana* via tissue culture. B: RT-PCR detection, M is D2000 DNA ladder, N is the negative control inoculated with an empty vector, P is APV1-infected *N. benthamiana* serving as the positive control, 1-17 are samples.

图 1 RT-PCR 检测组培本氏烟草

Fig. 1 RT-PCR detection of tissue cultured *N. benthamiana*

## 2.2 聚乙二醇沉淀法和超速离心法粗提 APV1 病毒粒子

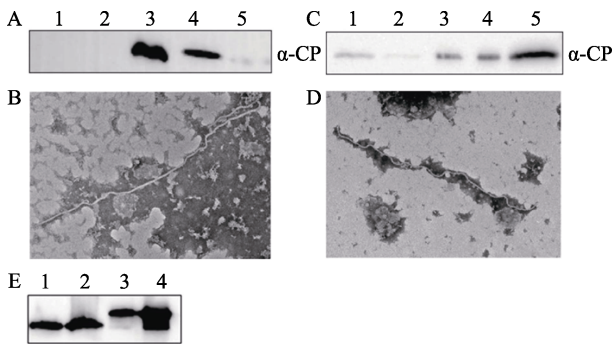
对聚乙二醇沉淀法提纯中不同阶段的样品进行 Western blot 检测, 结果显示经 PEG-6000 沉淀后的上清液中未检测到 APV1 特异性条带, 沉淀重悬后的上清液中含有 APV1。沉淀重悬后剩余的沉淀中也存在 APV1, 但含量少于重悬上清液中的 APV1 (图 2A)。说明 PEG-6000 可以将 APV1 从提取液中充分沉淀下来, APV1 可以重新悬浮于缓冲液中。在沉淀和重悬的过程中, 去除了大量本氏烟草的成分, 实现了 APV1 的粗提纯。透

射电镜显示, 聚乙二醇沉淀法粗提纯的病毒粒子为细长线形, 长为 650~2200 nm, 直径为 10~13 nm (图 2B)。

利用超速离心法粗提 APV1 后, 提取液颜色变淡, 在蔗糖层和提取液之间聚集了绿色物质, 离心管底部存在少量沉淀。对未处理提取液, 超速离心后的上清、蔗糖层、沉淀进行了 Western blot 检测, 结果显示超速离心后 APV1 主要存在于离心管底部的沉淀中, 蔗糖层中也存在部分 APV1, 上清液中也存在少量 APV1。经超速离心后, 病毒粒子大部分沉淀于离心管底部, 而大部

分的本氏烟草成分无法穿过蔗糖层而与病毒分离,沉淀下来的病毒粒子重悬后低速离心又去除了部分本氏烟草成分(图 2C)。透射电镜下超速离心粗提取的病毒粒子为细长线形,长为 650~2200 nm,直径为 10~13 nm(图 2D)。

粗提纯产物与原核表达的 CP(携带 his 标签)标准品的 WB 灰度值分析估算聚乙二醇沉淀法粗提纯病毒的浓度为 1 ng/ $\mu$ L,超速离心沉淀法粗提纯的病毒浓度为 2 ng/ $\mu$ L(图 2E),超速离心沉淀法提纯的病毒得率高于聚乙二醇沉淀法。



A: 聚乙二醇沉淀法粗提 APV1 病毒粒子 Western blot 检测。1: 本氏烟草匀浆液; 2: PEG6000 浓缩后上清液; 3: PEG6000 浓缩后沉淀第 1 次重悬上清液; 4: PEG6000 浓缩后沉淀第 2 次重悬上清液; 5: PEG6000 浓缩后沉淀 2 次重悬后剩余沉淀。B: 聚乙二醇沉淀法提纯病毒粒子透射电镜观察。C: 超速离心粗提纯 APV1 病毒粒子 WB 分析。1: 本氏烟草匀浆液; 2: 超速离心后上清; 3: 蔗糖层上部; 4: 蔗糖层下部; 5: 沉淀。D: 超速离心提纯 APV1 病毒粒子电镜观察。标尺: 200  $\mu$ m。E: 2 种方法提纯病毒粒子与标准 CP 蛋白的 Western blot 检测。1: 聚乙二醇沉淀法粗提病毒粒子; 2: 超速离心沉淀法粗提纯病毒粒子; 3: 1 ng/ $\mu$ L 标准 CP; 4: 10 ng/ $\mu$ L 标准 CP。根据条带灰度值估算提纯病毒离子浓度。

A: Western blot analysis of APV1 virions extracted by PEG precipitation. 1: *N. benthamiana* homogenates; 2: The supernatant after PEG6000 precipitation; 3: The suspended pellets of PEG6000 precipitation (1st round); 4: The suspended pellets of PEG6000 precipitation (2nd round); 5: The unsuspended pellets of PEG6000 precipitation (2nd round). B: TEM analysis of APV1 virions extracted by PEG6000 precipitation. C: Western blot analysis of APV1 virions extracted by ultracentrifugation. 1: *N. benthamiana* homogenates; 2: The supernatant after ultracentrifugation; 3: The upper section of sucrose cushion; 4: The lower section of sucrose cushion; 5: The pellets after ultracentrifugation. D: TEM analysis of APV1 virions extracted by ultracentrifugation. Bar=200  $\mu$ m. E: Western blot detection of 2 methods for purifying virus particles and standard CP protein. 1: Polyethylene glycol precipitation method for crude extraction of virus particles; 2: Purification of virus particles by high-speed centrifugal precipitation method; 3: 1 ng/ $\mu$ L standard CP; 4: 10 ng/ $\mu$ L standard CP. Estimate the concentration of purified virus ions based on the grayscale value of the band.

## 图 2 聚乙二醇沉淀法和超速离心粗提病毒粒子及其电镜观察

Fig. 2 Crude extraction of APV1 virions by polyethylene glycol (PEG) precipitation and ultracentrifugation and transmission electron microscopy (TEM) analysis of extracted virions

## 2.3 蔗糖密度梯度与亲和磁珠法精提纯 APV1 效果分析

密度梯度离心后,用长针头分层收集蔗糖层,从上至下共取 6 层,每层约 1 mL。对收集的蔗糖层进行 Western blot 和 SDS-PAGE 检测,结果表明蔗糖密度梯度离心后,在 SDS-PAGE 胶上分级 6 可见较清晰的与病毒外壳蛋白(CP)大小一致的条带(图 3A),未见其他明显条带,说明所得病毒粒子纯度较高。Western blot 结果表明分级 5 和 6 存在最亮的 CP 特异性条带(图 3B)。病毒主要集中在分级 5 和 6,对应的离心管位置为 60% 和 70%蔗糖层。

对亲和磁珠提纯 APV1 过程中的洗涤液和洗脱液进行 Western blot 检测,结果显示在第 2 次洗脱液中存在病毒(图 3C),说明亲和磁珠可以吸附病毒粒子,且结合足够紧密不会在洗涤过程中脱落,也较容易洗脱,在第 2 次洗脱时即可全部洗脱,但偶联在磁珠上的抗体也有少量脱落(图 3A)。

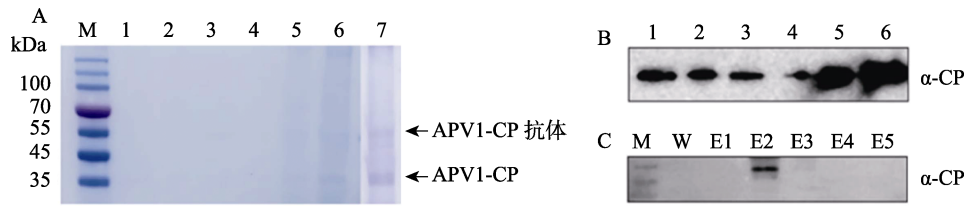
蔗糖密度梯度法精提纯的 APV1 病毒粒子,病毒粒子会分散到的不同梯度蔗糖层;而磁珠法精提纯的 APV1 病毒粒子被集中到洗脱液中,但洗脱步骤中病毒粒子抗体可能会被洗脱液洗脱下来(图 3A)。结果显示,磁珠法提纯的病毒粒子浓度更高,但由于病毒粒子抗体被洗脱,混入提纯的病毒粒子,易造成病毒粒子不纯,纯度不如蔗糖密度梯度离心法提纯的病毒粒子,因此本研究利用蔗糖密度梯度法提纯病毒粒子免疫小鼠。

## 2.4 多抗血清效价和特异性

采用间接 ELISA 法测定制备的多抗血清效价,多抗血清从 1:200 开始倍比稀释,以健康槟榔样品作为阴性对照,结果显示当抗体稀释到 1:25 600 时仍能检测出 APV1 病毒,表明制备的抗血清满足要求(图 4A,图 4B)。提取感染 APV1 的槟榔叶片总蛋白,用制备的多抗血清作为第一抗体进行 Western blot 检测,抗血清稀释比例为 1:6400,以纯化的原核表达 APV1-CP 制备的小鼠单克隆抗体<sup>[25]</sup>作为对照,结果显示,制备的多抗血清与原核表达 APV1-CP 制备的小鼠单克隆抗体存在一致的条带,无明显杂带,表明该多抗血清特异性高(图 4C)。

## 2.5 APV1 病毒抗血清田间准确性检测

为了确认 APV1 病毒多抗血清用于血清学检测的准确性,在海南三亚崖州区随机取 21 份槟榔

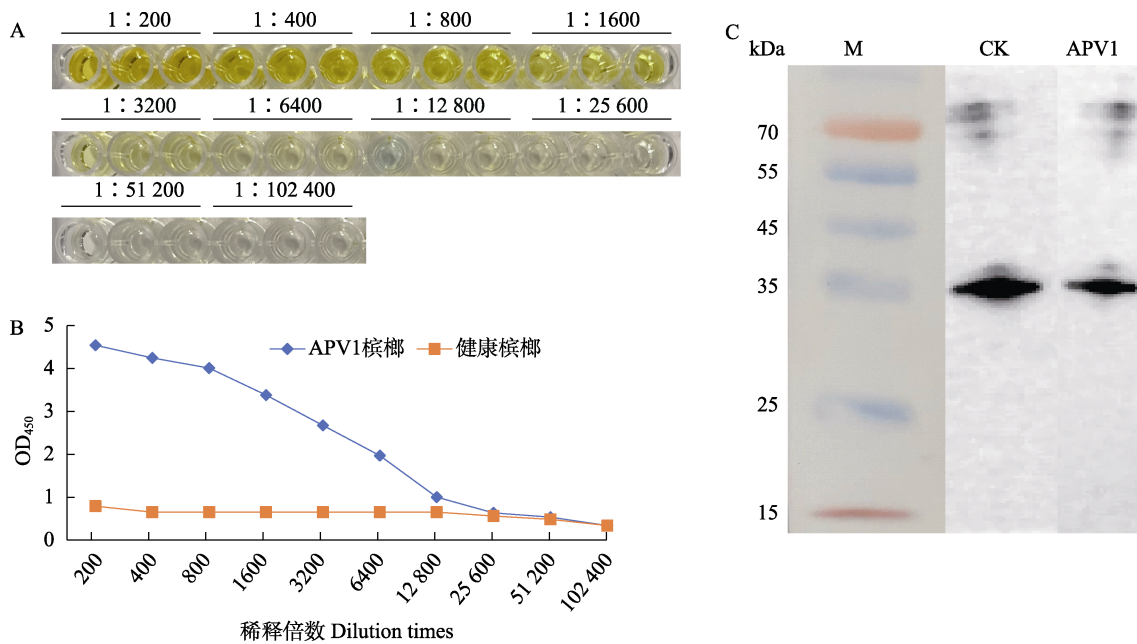


A: SDS-PAGE 检测, M: 蛋白质标准, 1~6: 蔗糖梯度离心不同蔗糖层样品, 7: 亲和磁珠洗脱样品。B: Western blot 检测, 1~6: 不同蔗糖层样品蔗糖密度梯度提纯病毒。C: Western blot 检测, M: 蛋白质标准, W: 洗涤液, E1~E5: 洗脱液。

A: SDS-PAGE detection, M: Prestained protein marker, 1~6: Sucrose gradient centrifugation of samples from different sucrose layers, 7: Affinity magnetic bead elution sample. B: Western blot detection, 1~6: Purification of viruses using sucrose density gradient from samples with different sucrose layers. C: Western blot detection, M: Prestained protein marker, W: Wash solution, E1~E5: Serial elution solution.

图 3 蔗糖密度梯度及免疫磁珠提纯 APV1 病毒验证

Fig. 3 Purification of APV1 virions by sucrose density gradient centrifugation and immunomagnetic beads



A: APV1 病毒粒子抗血清间接 ELISA 测定。B: 血清稀释度曲线。C: 多抗血清的特异性 Western blot 检测, M: 蛋白质标准; CK: 原核表达 CP 单克隆抗体; APV1: 病毒粒子抗血清。

A: Indirect ELISA analysis of the antiserum titer. B: Dilution curve of the antiserum. C: Western blot analysis of the antiserum specificity, M: Prestained protein marker; CK: Prokaryotic expression of CP monoclonal antibody; APV1: Virus particle anti serum.

图 4 多抗血清间接 ELISA 检测和特异性检测

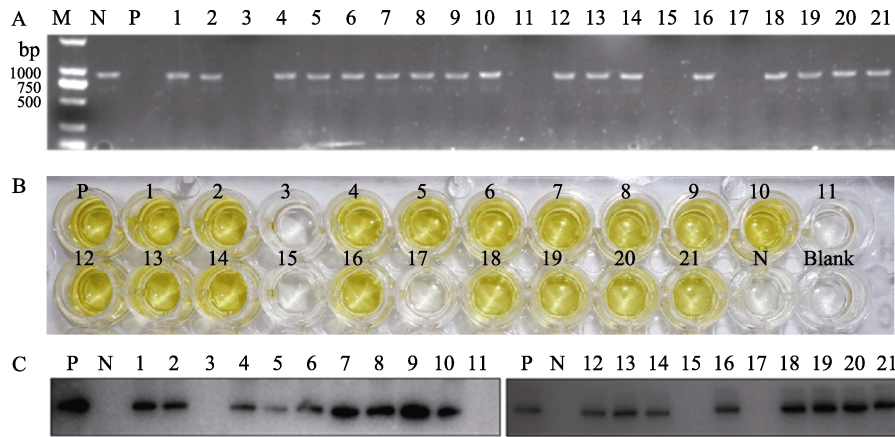
Fig. 4 Multi antibody serum indirect ELISA detection and specificity detection

叶片, 采用 RT-PCR、APV1 病毒鼠多抗血清间接 ELISA 和 APV1 病毒 CP 单克隆抗体 Western blot 检测方法分别对 APV1 进行检测 (图 5)。结果表明, 3 种方法的检测结果一致, 说明 APV1 病毒鼠多抗血清用于血清学检测具有较高的准确性。

### 3 讨论

槟榔黄化病的爆发和蔓延给槟榔产业带来毁灭性危害, 由此造成的海南农民返贫问题非常突出, 其中 APV1 病毒引起槟榔黄化病危害最大<sup>[6]</sup>, 迫切需要快速有效的病毒检测技术。目前 APV1 病毒检测主要包括 RT-PCR<sup>[5]</sup>、TaqMan 实时荧光

定量 PCR<sup>[30]</sup>、ELISA<sup>[27]</sup>等技术, 然而 PCR 技术需要提取槟榔 RNA, 成本高, 费时费力, 不利于大规模田间检测<sup>[31-32]</sup>。血清学检测具有速度快, 能够进行大批量样品检测的优点, 因此建立槟榔 APV1 病毒血清学检测方法显得极为重要。目前, 基于原核表达 APV1 病毒外壳蛋白 (capsid protein, CP) 制备多克隆抗体, 通过 ELISA 检测 APV1 病毒已有报道<sup>[27]</sup>。原核表达通常仅表达病毒的 CP, 免疫后获得的抗体多针对该特定蛋白的线性表位或其在原核环境中可能形成的局部结构表位。由于缺乏病毒颗粒的完整结构, 抗体可能对病毒粒子中的其他蛋白或完整病毒颗粒的构象表



A: RT-PCR 检测。B: 间接 ELISA 检测。C: Western blot 检测。M: D2000 DNA ladder; N: 负对照; P: 正对照; 1~21: 样品。  
A: RT-PCR detection. B: Indirect ELISA detection. C: Western blot detection. M: D2000 DNA ladder;  
N: Negative control; P: Positive control; 1~21: Samples.

图 5 APV1 病毒田间检测

Fig. 5 Detection of APV1 from betel palm samples

位没有反应<sup>[27]</sup>。通过分离提纯病毒粒子免疫动物获得抗血清可避免出现上述问题,病毒粒子包含完整的衣壳蛋白及其正确组装的三维结构,同时可能还包括病毒基因组及其他附属因子。免疫后获得的抗体不仅针对 CP,还可能识别病毒粒子表面的构象表位及其他病毒相关成分,特异性更广<sup>[33]</sup>。

由于 APV1 为韧皮部限制病毒,在槟榔叶片细胞中的含量低,同时槟榔叶片具有蜡质层,粗纤维多,病毒粒子本身容易与叶片纤维纠缠断裂,病毒纯化难度较大<sup>[22]</sup>。本研究利用农杆菌介导的 APV1 侵染性克隆侵染本氏烟草体系,得到被 APV1 病毒侵染的本氏烟草作为提纯材料<sup>[25]</sup>。采用聚乙二醇沉淀法、超速离心沉淀法、不连续蔗糖密度梯度离心、亲和磁珠等方法分离提纯 APV1 病毒粒子,聚乙二醇沉淀法粗提病毒的缺点是宿主成分与病毒一起沉淀,病毒因杂质覆盖较难重悬而得率较低,但对设备要求低,一次可以处理大量材料;超速离心沉淀法的优点是蔗糖层阻隔了大部分宿主成分,病毒容易重悬所以得率高,缺点是超速离心机价格昂贵,转子容量较小,一次只能处理少量材料;密度梯度离心对设备和操作要求均较高,但提纯的病毒具有较高的纯度;磁珠法操作简单,无需离心设备,理论上可以获得高纯度病毒,但前提是已经存在对应的病毒抗体,本研究中使用原核表达的 CP 抗体制备亲和磁珠,该磁珠可以有效富集 APV1 并集中洗脱,但由于抗体偶联磁珠技术不成熟,在洗脱时部分抗体会脱落,影响病毒的纯度。提纯的病毒粒子在透射电镜下均呈细长线形,长为 650~2200 nm,

直径为 10~13 nm,与文献<sup>[5,25]</sup>报道一致;将提纯的 APV1 病毒粒子免疫小鼠,获得效价为 1:25 600 的多抗血清。以此建立的 APV1 间接 ELISA 检测方法,可用于 APV1 的快速检测,该方法与 RT-PCR、Western blot 等检测方法的结果基本一致。

目前许多农户对槟榔种植的热情很高,对栽培的槟榔种苗,未经检测,无法证明栽培的槟榔种苗是否健康,给槟榔黄化病的爆发和蔓延带来了隐患,导致健康种苗保障体系的建设不足,特别是缺乏便携且田间快速准确的槟榔黄化病检测产品。目前关于 APV1 病毒引起的槟榔黄化病,尚无有效的防治药剂,早期精准的病原诊断对黄化病的早期治疗和防控具有重要意义,基于病毒粒子制备的多抗血清的 ELISA 检测方法可以推动槟榔 APV1 病毒田间大规模普查,具有经济、便捷和高效的优势,实现黄化病的早发现、早控制、低蔓延,维护槟榔产业健康发展。

## 参考文献

- [1] 蔡欣航,薛嘉宁,王程宇,汤睿,赵容. 槟榔的本草考证及其综述[J]. 中国民族民间医药, 2023, 32(12): 58-63.  
CAI X H, XUE J N, WANG C Y, TANG R, ZHAO R. Herbal textual research and review of *Areca catechu* L.[J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2023, 32(12): 58-63. (in Chinese)
- [2] 徐涛,姬一帆,张德生. 槟榔产业经济研究综述[J]. 热带农业科学, 2024, 44(8): 122-127.  
XU T, JI Y F, ZHANG D S. Overview of economic research on betel nut industry[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2024, 44(8): 122-127. (in Chinese)

- [3] 吴元, 陈书贵, 王开勇, 陈贵州, 苏那一. 海南槟榔叶片致黄因子调查及防控[J]. 热带农业科学, 2020, 40(4): 62-69.  
WU Y, CHEN S G, WANG K Y, CHEN G Z, SU N Y. Survey and control of leaf yellowing of arecanut in Hainan[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2020, 40(4): 62-69. (in Chinese)
- [4] KHAN L U, ZHAO R B, WANG H X, HUANG X. Recent advances of the causal agent of yellow leaf disease (YLD) on areca palm (*Areca catechu* L.)[J]. Tropical Plants, 2023, 2: 7
- [5] 王洪星. 海南槟榔黄化相关病原筛选鉴定研究[D]. 海口: 海南大学, 2020.  
WANG H X. Study on screening and identification of etiological related pathogens of *Areca catechu* in Hainan[D]. Hainan: Hainan University, 2020. (in Chinese)
- [6] 车海彦, 罗大全. 槟榔黄化病研究进展[J]. 中国热带农业, 2022(2): 36-42.  
CHE H Y, LUO D Q. Advances in the researches on the arecanut yellow leaf disease[J]. China Tropical Agriculture, 2022(2): 36-42. (in Chinese)
- [7] 唐庆华, 孟秀利, 林兆威, 黄山春, 覃伟权, 宋薇薇. 海南槟榔致黄关键病害调查及为害特征分析[J]. 热带农业科学, 2022, 42(3): 62-67.  
TANG Q H, MENG X L, LIN Z W, HUANG S C, QIN W Q, SONG W W. A survey of key areca palm leaf yellowing-related diseases and analysis of their infection characteristics in Hainan province[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2022, 42(3): 62-67. (in Chinese)
- [8] YU H M, QI S S, CHANG Z X, RONG Q Q, AKINYEMI I A, WU Q G. Complete genome sequence of a novel velarivirus infecting areca palm in China[J]. Archives of Virology, 2015, 160(9): 2367-2370.
- [9] WANG H X, ZHAO R B, ZHANG H W, CAO X M, LI Z T, ZHANG Z. Prevalence of yellow leaf disease (YLD) and its associated Areca palm velarivirus 1 (APV1) in betel palm (*Areca catechu*) plantations in Hainan, China[J]. Plant Disease, 2020, 104(10): 2556-2562.
- [10] ZHANG H W, ZHAO X, CAO X M, KHAN L U, ZHAO R B, WANG H X, HANG X. Transmission of Areca palm velarivirus 1 by mealybugs causes yellow leaf disease in betel palm (*Areca catechu*)[J]. Phytopathology, 2022, 112(3): 700-707.
- [11] ZHAO X, ZHAO R B, CAO X M, WANG Y T, WANG H X, HUANG X. Transmission of Areca palm velarivirus 1 (APV1) by *Pseudococcus cryptus*[J]. Phytopathology Research, 2024, 6(1): 10.
- [12] KHAN L U, CAO X M, ZHAO R B, TAN H, XING Z Y, HUANG X. Effect of temperature on yellow leaf disease symptoms and its associated Areca palm velarivirus 1 titer in areca palm (*Areca catechu* L.)[J]. Frontiers in Plant Science, 2022(13): 1023386.
- [13] TEEWASIT P, RATCHANEE H, SIRIKUL W. Monoclonal antibody-based diagnostic assays for pepper mild mottle virus[J]. Journal of Plant Pathology, 2020, 102(2): 327-333.
- [14] HE W Q, WU J Y, REN Y Y, ZHOU X P, ZHANG S B, QIAN Y J, LI F F, WU J X. Highly sensitive serological approaches for Pepino mosaic virus detection[J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2020, 21(10): 811-822.
- [15] 史春霖, 王小凤. 植物病毒的提纯[J]. 微生物学通报, 1980(6): 273-278.  
SHI C L, WANG X F. Purification of plant virus[J]. Microbiology Bulletin, 1980(6): 273-278. (in Chinese)
- [16] ESKELIN K, LAMPI M, MEIER F, MOLDENHAUER E, BAMFORD D H, OKSANEN H M. Asymmetric flow field flow fractionation methods for virus purification[J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1469: 108-119.
- [17] AKIKAZU S, TAKASHI O. Virus capture using anionic polymer-coated magnetic beads (review)[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2012, 30(1): 3-7.
- [18] KLAASSEN V A, BOESHORE M, DOLJA V V, FALK B W. Partial characterization of the lettuce infectious yellows virus genomic RNAs, identification of the coat protein gene and comparison of its amino acid sequence with those of other filamentous RNA plant viruses[J]. The Journal of General Virology, 1994, 75: 1525-1533.
- [19] PRATOR C A, KASHIWAGI C M, VONČINA D, ALMEIDA R P P. Infection and colonization of *Nicotiana benthamiana* by Grapevine leafroll-associated virus 3[J]. Virology, 2017, 510: 60-66.
- [20] JARUGULA S, GOWDA S, DAWSON W O, NAIDU R A. Development of infectious cDNA clones of Grapevine leafroll-associated virus 3 and analyses of the 5' non-translated region for replication and virion formation[J]. Virology, 2018, 523: 89-99.
- [21] KAMBEROGLU M A, OZTURK S, YILMAZ M A. A simple alternative method for the purification of Citrus tristeza virus[J]. Phytopathol Mediterr, 2001, 40: 176-178.
- [22] 王彩霞, 张清明, 洪霓, 王国平. 柑橘衰退病毒的纯化及血清学检测[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2008, 25(1): 10-13.  
WANG C X, ZHANG Q M, HONG N, WANG H P. Purification and serological detection of Citrus tristeza virus[J]. Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science), 2008, 25(1): 10-13. (in Chinese)
- [23] ROBERTSON C J, GARNSEY S M, SATYANARAYANA T, FOLIMONOVA S, DAWSON W O. Efficient infection of

- citrus plants with different cloned constructs of Citrus tristeza virus amplified in *Nicotiana benthamiana* protoplasts[J]. International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings, 2005, 16(16): 1957-2010.
- [24] 魏梅生, 尤佳, 马洁, 李桂芬, 张永江. 免疫磁珠 RT-PCR 法检测葡萄扇叶病毒[J]. 植物检疫, 2014, 28(4): 32-35.  
WEI M S, YOU J, MA J, LI G F, ZHANG Y J. Detection of Grapevine fanleaf virus by immunomagnetic separation and RT-PCR[J]. Plant Quarantine, 2014, 28(4): 32-35. (in Chinese)
- [25] 赵瑞白. 槟榔黄化相关病毒(APV1)侵染性克隆构建[D]. 海口: 海南大学, 2022.  
ZHAO R B. Construction of infectious clone of areca yellowing associated virus (APV1)[D]. Haikou: Hainan University, 2022. (in Chinese)
- [26] CAO X M, ZHAO R B, WANG H X, ZHANG H W, ZHAO X, KHAN L U, HUANG X. Genomic diversity of Areca palm velarivirus 1 (APV1) in areca palm (*Areca catechu*) plantations in Hainan, China[J]. BMC Genomics, 2021(22): 725.
- [27] 陈阳, 王洪星, 黄惜. 槟榔 APV1 病毒多克隆抗体制备及酶联免疫检测[J]. 分子植物育种, 2022, 20(2): 518-523.  
CHEN Y, WANG H X, HUANG X. Polyclonal antibody preparation of betel palm APV1 virus and enzyme-linked immunoassay[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(2): 518-523. (in Chinese)
- [28] 陈阳. 槟榔黄化相关病毒 APV1 的酶联免疫检测技术研究[D]. 海口: 海南大学, 2021.  
CHEN Y. Enzyme-linked immunosorbent assay technology of betel nut yellowing-related virus APV1[D]. Haikou: Hainan University, 2021. (in Chinese)
- [29] LIU K, WENG H, HUANG Q R. A method for obtaining a large number of antibodies by immunizing BALB/c mice[J]. Immunological Journal, 1988(2): 140.
- [30] 林兆威, 牛晓庆, 唐庆华, 宋薇薇, 孟秀丽, 覃伟权. 槟榔隐症病毒 1 型 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 热带作物学报, 2021, 42(11): 3087-3092.  
LIN Z W, NIU X Q, TANG Q H, SONG W W, MENG X L, QIN W Q. Development of a TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR method for detection of Areca palm velarivirus 1[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(11): 3087-3092. (in Chinese)
- [31] 阮佳, 张薇薇, 刘鑫, 苏会岚. 蔬菜中食源性病毒富集方法研究[J]. 中国测试, 2020, 46(10): 11-17.  
RUAN J, ZHANG W W, LIU X, SU H L. Study on concentration of foodborne viruses in vegetables[J]. China Measurement & Test, 2020, 46(10): 11-17. (in Chinese)
- [32] 阳海怡, 江慧敏, 曾会玲, 渠林, 练惠敏, 邱明, 杨明达, 谢春燕, 陈泽玲, 卢晓贤, 刘璇, 刘贺, 梁均和, 郑焕英, 陈亮, 杨颖, 陆靖. 基于磁珠吸附的污水病毒高通量富集方法研究[J]. 病毒学报, 2023, 39(6): 1623-1632.  
YANG H Y, JIANG H M, ZENG H L, QU L, LIAN H M, QIU M, YANG M D, XIE C Y, CHEN Z L, LU X X, LIU X, LIU H, LIANG J H, ZHENG H Y, CHEN L, YANG Y, LU J. Study on a high-throughput enrichment method for sewage virus based magnetic beads adsorption[J]. Chinese Journal of Virology, 2023, 39(6): 1623-1632. (in Chinese)
- [33] 饶黎霞, 黄德青, 周雪平, 钱亚娟, 吴建祥. 甘蔗花叶病毒单克隆抗体的制备及其血清学检测应用[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(11): 1989-1995.  
RAO L X, HUANG D Q, ZHOU X P, QIAN Y J, WU J X. Preparation and serological detection application of monoclonal antibodies against Sugarcane mosaic virus[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(11): 1989-1995. (in Chinese)