

328-333

8428 (14)

第7卷第3期
1992年9月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol. 7 No. 3
Sep. 1992黄瓜花叶病毒衣壳蛋白存在于被其侵染的烟草叶绿体中^①

朱水方

R. I. B. Francki

(农业部植物检疫实验所, 北京100026)

(澳大利亚Adelaide大学)

Fra., RIB

提 要

S432.41

用原生质体法制备出高纯度的完整叶绿体经 SDS-PAGE 电泳, 银染后, 发现黄瓜花叶病毒 (CMV) 侵染的烟草病叶叶绿体蛋白质图谱和健叶叶绿体相比, 多出一条染色较弱的迁移率与 CMV 衣壳蛋白质相同的带, 经 Western 转移, 用 CMV 游离衣壳蛋白亚基抗血清进行斑点酶联 (Immunoblot) 检测, 证明这条带就是 CMV 衣壳蛋白质。健康叶绿体中加入去掉叶绿体的病叶汁液而制备出的叶绿体中无 CMV 衣壳蛋白质, 说明这不是在叶绿体提纯过程中得到的假象, 即衣壳蛋白质存在于被 CMV 侵染的完整叶片叶绿体中。这个结果否认了以往报道的 CMV 衣壳蛋白质不存在于烟草叶绿体中的结论。另外还发现, 叶绿体中的衣壳蛋白质浓度与叶片症状严重程度呈正相关。

关键词: 黄瓜花叶病毒 衣壳蛋白质 叶绿体 烟草 斑点酶联

CMV 分布世界各地, 寄主范围极广。能自然侵染包括象禾谷类、果树、蔬菜、花卉等重要农作物的 470 多种、67 科植物。它引起的主要症状是花叶, 即叶片的不均匀褪绿黄化。引起花叶的一个重要原因, 就是病毒破坏叶绿体正常的结构和功能, 如有病的叶绿体变小、基质片层发育不良, 叶绿体含量下降等等^[1,2]。但 CMV 通过什么途径破坏叶绿体目前尚不清楚。在最近几年植物病毒的致病机制研究中, 发现烟草花叶病毒 (TMV) 衣壳蛋白质在引起植株花叶中起了决定性的作用, 已发现 TMV 衣壳蛋白质存在于叶绿体中, 并特异地结合到光合系统 II 上, 阻止电子在传递链中的传递, 从而使光解水生成的氧原子不能生成氧气而释放出来, 而大量氧原子破坏叶绿素, 从而使叶绿体结构和功能被破坏^[3,4,5]。

而 CMV 在电镜下从来未观察到病毒颗粒存在于叶绿体中^[6], 而且用胶体金标记方法, 也未发现 CMV 衣壳蛋白质抗原存在于叶绿体中^[7], 这样 CMV 衣壳蛋白在其致病机制中的作用受到极大的关注, 是否 CMV 具有新的致病机制, 因此, 研究 CMV 衣壳蛋白质是否真正存在于叶绿体中, 成为解决这个问题的第一步。

材 料 与 方 法

一、病毒来源和试剂 CMV-M 株系, 寄主为三生烟 (*Nicotiana tobacco xanthi*), M 株系

本文于 1991 年 8 月 2 日收到, 12 月 25 日修回。

① 本工作在澳大利亚 Adelaide 大学完成, 谨以此文献给我的导师——去年逝世的 R. I. B. Francki 教授。

游离衣壳蛋白抗血清为 Dr. Hajamirad 提供, 蛋白酶 Thermolysin (Sigma), 纤维素酶 (Onozuka R-10), 果胶酶 (Macrozyme R-10), 碱性磷酸酯酶标记羊抗兔 IgG 及显色底物 (BCIP, NBT, PMS) 均为 Sigma 产品。

二、病毒提纯和衣壳蛋白制备 病毒繁殖在克烟 (*N. clevelandii*) 上, 根据 Mossop 等方法提纯^[10], 衣壳蛋白制备根据 Habili 等方法^[11]。

三、完整游离叶绿体的制备 切叶法: 根据 Fish 等方法略加改进^[12], 健康叶或病叶蔽荫 24 小时后取样, 于 0℃ 预冷 30 分钟后切丝, 加入 2 倍预冷至 0℃ 的抽提缓冲液 (0.33 mol/L Sorbitol, 10 mmol/L Na₂P₂O₇, 1 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L Naiso-ascorbate pH 7.5) 两层实验用卫生纸过滤离心 (水平转头) 1500g 1 分钟, 用悬浮液 (0.33 mol/L Sorbitol, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L MnCl₂, 50 mmol/L Hepes-KOH, 0.2% BSA, 5 mmol/L Na₄P₂PO₇, 10 mmol/L NaHCO₃, 2 mmol/L Naiso-ascorbate pH 7.6) 冲洗叶绿体沉淀表面 1~2 次后, 加少许悬浮液悬浮叶绿体, 经 Percoll 不连续梯度离心 (10%, 20%, 40%, 80%) 3500g, 15 分钟, 从离心管侧面取出 40% 与 80% 之间的一层叶绿体即为完整的叶绿体。叶绿体的完整性及有无杂质通过相差显微镜检测。原生质体法, 根据 Waker 等的方法改进而成^[13], 烟草叶片经消溶液 (2% Cellulase, 0.3% Pectinase, 0.5 mol/L Sorbitol, 1 mmol/L CaCl₂, 5 mmol/L Mes, pH 5.5) 25℃ 处理 3~5 小时后, 经 80μm 尼龙膜过滤得到原生质溶液, 经 20μm 尼龙膜过滤 3~5 次后释放出叶绿体, 离心后, 沉淀物再经 Percoll 不连续梯度离心, 可得到完整的叶绿体。

四、叶绿体经过蛋白酶处理 根据 Clive 等方法^[14] 去掉叶绿体外膜蛋白及外膜粘着蛋白, Thermolysin 溶液 (1 mg/ml, 溶解在 Hepes-Sorbitol 叶绿体悬浮缓冲液中) 加入到提纯完整叶绿体溶液中, 再加入 CaCl₂ 至最终浓度为 5 mmol/L, 4℃ 处理 1 小时后, 加入 EDTA 至最终浓度为 10 mmol/L, 离心悬浮后, 经 Percoll 梯度, 得到完整叶绿体。全部提纯过程都在 0℃、黑暗条件下进行。

五、蛋白质抽提和定量 酶处理过的完整叶绿体, 加入抽提缓冲液 (25 mmol/L Tris, 10% Glycerol, 0.5% SDS, 2 mmol/L EDTA, 2% BMCE, pH 8.0), 用等体积氯仿抽提, 除去色素, 再加入 2~3 倍体积丙酮沉淀蛋白质, 悬浮在没有 EDTA 只有 0.1% SDS 抽提缓冲液中, 沸水中煮 1~2 分钟, 1500g 离心 5 分钟除去不溶物, -20℃ 保存, 或者用 Bradford 方法进行蛋白质定量^[15,16]。

六、蛋白质电泳及斑点酶联 (immunoblot) 蛋白质根据 Laemmli 方法^[14], 用 5%, 12% 的不连续 SDS-PAGE 电泳分离, 在同一电泳槽使用检测样品完全相同的两块胶板, 其中一块胶用银染色^[17], 另一块胶用电转移到硝酸纤维素膜上 (100V, 70 分钟), 根据 Ashman 等方法^[18] 进行斑点酶联检测。含有样品的硝酸纤维素膜在 PBS 缓冲液 (10 mmol/L Na₂HPO₄, 10 mmol/L NaH₂PO₄, 250 mmol/L NaCl, pH 7.2) 中, 37℃ 处理 16 小时, 用含 1% Triton X-100 洗脱液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA) 冲洗, 用含 3% BSA 洗脱液处理 1~2 小时, 再用 CMV 衣壳蛋白抗血清 IgG (1 μg/ml) 标记 1~2 小时。冲洗后用碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔 IgG 标记 1~2 小时, 冲洗后用底物 (BCIP, +NBT+PMS) 进行显色。

结 果

从图 1 叶绿体蛋白质图谱中可以看出, 在病、健叶绿体及各种处理的叶绿体总蛋白组份没有多大区别, 但在有病的叶绿体中 (2, 5, 7 号样品) 多出一条染色较弱的分子量为 24500dt、迁移率与 CMV 衣壳蛋白质相同的蛋白质带。

图 1 中样品经电转移到硝酸纤维素膜上后, 用 CMV 衣壳蛋白质游离亚基抗血清

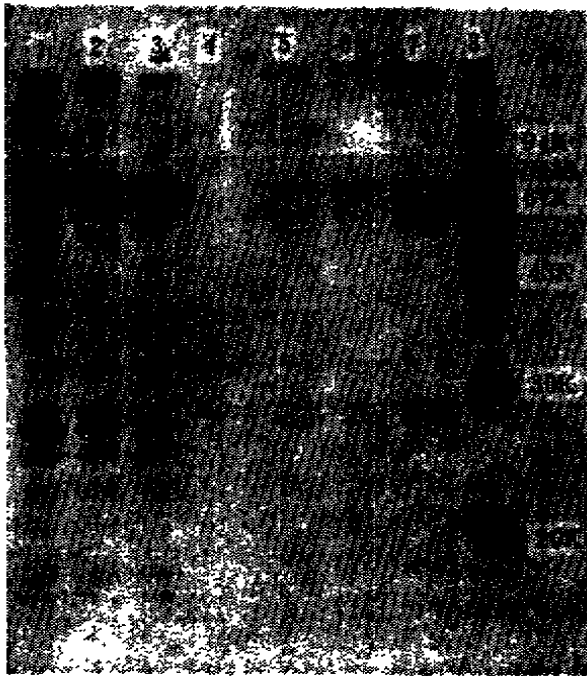


图 1. 叶绿体蛋白质经 SDS-PAGE 分离一银染色图谱, 其中 1, 6 为健康叶绿体; 2, 5 为有病叶绿体; 3 为健康叶绿体加入去掉叶绿体病叶汁液, 0℃ 黑暗处理 1 小时, 离心去掉病汁液, 经蛋白酶处理后, 再分离出完整叶绿体; 4. 提纯病毒衣壳蛋白质; 7. 切丝法制备的病叶叶绿体; 8. 标准蛋白质分子。(注: 除 7 号样品外, 其他叶绿体均为原生质体法制备的。)

Fig 1. Total intact chloroplast protein pattern after separation by SDS-PAGE and silver staining. 1, 6 health chloroplast, 2, 5 diseased chloroplast; 3, health chloroplast incubated in diseased sap which was free of chloroplast, 0℃ 1hr at dark condition, then got ride of diseased sap, after proteinase treatment, intact chloroplast was obtained by Percoll gradient; 4, purificative CMV coat protein; 7, diseased chloroplast by leaf cutting; 8, standard molecular weight proteins.

做斑点酶联, 从图 2 中可以发现这条多出的带和提纯的 CMV 衣壳蛋白质带相似, 都能与 CMV 衣壳蛋白抗血清有明显的结合反应。用切丝法从病叶中制备的叶绿体 (7 号) 和用原生质体法制备的有病叶绿体 (2, 5 号) 均呈阳性反应, 并在这条完整衣壳蛋白质带的上方出现一条分子量为 46000dt 反应带, 在这条带的下方出现一条分子量

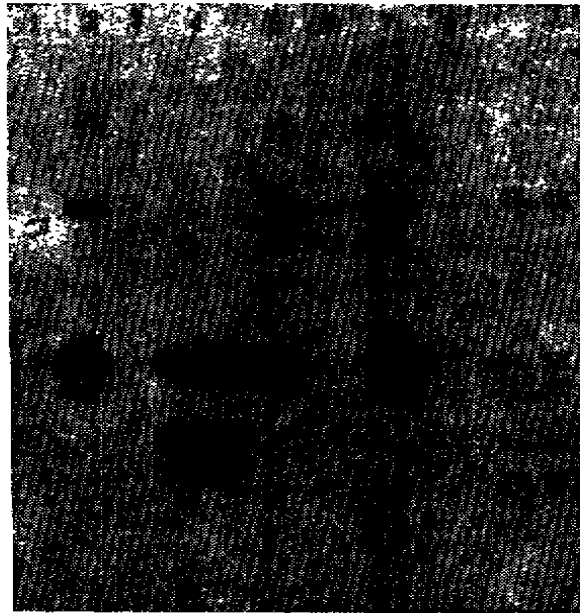


图 2. 与图 1 中相同的样品用 CMV 衣壳蛋白质游离亚基抗血清做的斑点酶联结果 (样品编号与图 1 相同)。

Fig. 2 The immunoblot result of the same samples as Fig. 1 with the antiserum against the free CMV coat protein subunit (The number means the same sample as Fig. 1).

为23400dt反应带,而在提纯病毒样品中(4号),除了一条完整衣壳蛋白质反应带外,还出现了两条和有病叶绿体不一样的低分子量反应带,一条为21800dt,一条为20500dt,而在健康叶的叶绿体(1,6号)及用病汁液处理的健康叶绿体中(3号)无任何反应,即在这两个样品中无CMV衣壳蛋白质或相同的抗原。

从图3中可以看出,随着症状严重程度的递增(从4到1顺序),叶绿体中CMV衣壳蛋白质抗原反应也递增,即CMV衣壳蛋白质在叶绿体中的浓度也在递增,而在典型黄化叶片转化为绿色叶片即症状恢复的过程中,叶绿体中的抗原反应由非常强烈(5号)变得很弱(7号),即CMV衣壳蛋白质浓度从高浓度降低到很低浓度。

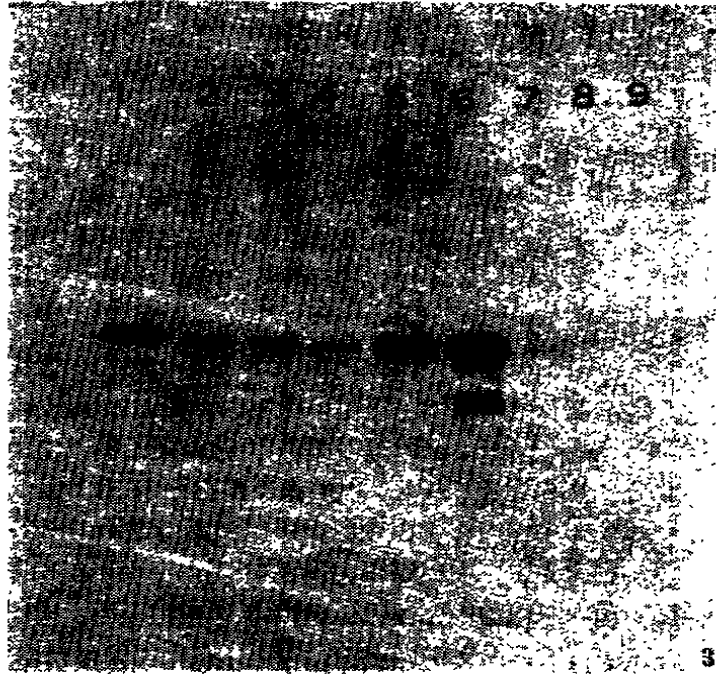


图3. 各种症状类型叶片叶绿体斑点酶联结果: 1. 出现症状16天后典型黄化叶片叶绿体; 2. 出现症状12天后不完全黄化叶片叶绿体; 3. 出现症状8天后部分黄化叶绿体; 4. 出现症状4天后沿脉黄化叶片叶绿体; 5. 黄化叶片症状恢复前的叶绿体; 6. 提纯CMV衣壳蛋白质; 7. 黄化叶症状恢复后叶绿体; 8. 健康叶绿体, 经过病叶汁液处理(同图1中3号样品); 9. 健康叶绿体(每个样品为15 μ g蛋白质, 提纯病毒为0.5 μ g衣壳蛋白质)。

Fig. 3. The immunoblot result of the chloroplasts from leaves with different symptoms

1. diseased chloroplast from typical yellow leaves 16 days after symptom appearance
2. diseased chloroplast from incomplete yellow leaves 12 days after symptom appearance
3. diseased chloroplast from partial yellow leaves 8 days after symptom appearance
4. diseased chloroplast from vein-banding leaves 4 days after symptom appearance
5. diseased chloroplast from yellow leaves before symptom recovery
6. purificative CMV coat protein
7. diseased chloroplast from symptom recovered leaves
8. diseased sap treated health chloroplast (as Fig. 3 sample)
9. health chloroplast (every lane 15 μ g protein was loaded except the purificative CMV coat protein only loaded 0.5 μ g)

讨 论

在有病的叶绿体全蛋白电泳图谱中,发现一条反应较弱的分子量和迁移率与 CMV 衣壳蛋白质一致的带,经斑点酶联实验表明这条带就是 CMV 衣壳蛋白质。在以前的叶绿体提纯研究中基本上都采用切丝法来制备叶绿体^[1],我们在实验中发现,用这种方法制备的叶绿体很难去掉微量表皮细胞的污染。但改用原生质体法,能够制备出没有表皮毛污染的高纯度的完整叶绿体,保证了实验材料的可靠性。

在实验中,用健康叶绿体加入去掉叶绿体的病叶汁液在黑暗条件下处理 1 小时,以后按一般叶绿体提取方法制备完整叶绿体,经蛋白酶处理后供斑点酶联分析,结果这类叶绿体和健康叶绿体一样,没有 CMV 衣壳蛋白质反应抗原性。这解释了两个问题:一是有病叶绿体中的 CMV 衣壳蛋白质抗原不是在提纯过程中人为的物理或化学因素造成的,而是在完整的叶片中就存在于叶绿体中;二是蛋白酶 (Thermolysin) 处理消解了可能粘着在叶绿体外膜上的病毒衣壳蛋白质。在预备实验中,我们发现在本实验条件下 Thermolysin 能有效地完全降解提纯的 CMV 衣壳蛋白质,说明 CMV 衣壳蛋白质存在于叶绿体中。

在斑点酶联实验中,经常发现比单体分子量大出将近 2 倍或 3 倍的反应带,一般认为是单体聚合成的二联体或三联体^[3,4],在本实验中也出现了分子量接近 CMV 衣壳蛋白质 2 倍 (46000dt) 的一条带,并且还出现了低分子量的反应带,在提纯病毒和有病叶绿体中还不一致。这些小分子量带可能是 CMV 衣壳蛋白质降解带,因为我们知道在提纯的病毒和裂解的叶绿体中不可能有蛋白质的合成。假如有蛋白质的合成,合成产物也应该是分子量呈连续分布的带谱,而不是特异的几条带。我们已经知道在细胞质和叶绿体中的蛋白质降解系统是不一样的^[17],因此,与 CMV 衣壳蛋白抗血清有结合反应的低分子量带的存在,进一步说明在有病的叶绿体中存在 CMV 衣壳蛋白质抗原。

实验中,还发现症状的严重程度和叶绿体中衣壳蛋白质浓度呈正相关。症状越重叶绿体 CMV 衣壳蛋白质浓度越高,症状恢复则浓度变低,这说明了 CMV 衣壳蛋白质和症状有一定的相关性。

Hosokawa 等用金标记方法,未能在叶绿体中检测出 CMV 衣壳蛋白质抗原,作者认为失败的可能原因有两个:一是在植物病毒中,目前尚未有完整的病毒颗粒存在于叶绿体的报道,如病毒衣壳蛋白质以亚基形式存在于叶绿体中,则用完整病毒抗血清去检测单个亚基灵敏度下降许多;二是胶体金标记本身灵敏度不高,如果 CMV 衣壳蛋白质也象 TMV 衣壳蛋白质一样和寄主成分相结合,则会进一步降低和胶体金的反应。而我们采用的斑点酶联实验,首先用 SDS 和高温解除了病毒衣壳蛋白质和叶绿体蛋白可能的非离子键的结合,通过电泳又富集浓缩了样品中的衣壳蛋白质,酶联检测灵敏度又高,这样就能检测出叶绿体中即使是微量的 CMV 衣壳蛋白质。事实上,在烟草叶绿体中 CMV 衣壳蛋白质含量也确实较低(在蛋白质银染中反应也较弱)。

因此,通过本次实验,否认了 CMV 衣壳蛋白质不存在于烟草叶绿体中的结论,证明有病烟草叶片中 CMV 衣壳蛋白质存在于叶绿中,并且和症状严重程度呈正相关。

参 考 文 献

- (1) Kurstak, E. (ed)., 1981, *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, pp258—277, Elsevier/North-Holland Biomedical press.
- (2) Francki, R.I.B, et al (ed)., 1985, *Atlas of Plant Viruses* pp. 53—65. CRC press.
- (3) Reinaero A et al., 1986, *Plant Physiology*, 89 : 111—116.
- (4) Hodgson, R.A.J, et al., 1989, *FEBS. Lett.* 245 : 267—270.
- (5) Hodgson, R.A.J, et al., 1989, in *Proceedings of the International Congress on Photosynthesis*, Stockholm, Sweden, Aug, 6—11, 1989.
- (6) Houda, Y, et al., 1974, *Phytopathology*, 64 : 534—539.
- (7) Hosokawa, D, et al., 1988, *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 54 : 620—624.
- (8) Messop and Francki., 1976, *Virology*, 74 : 544.
- (9) Kabitli and Francki., 1974, *Virology*, 57 : 392.
- (10) Fish, L.E, et al., 1982, *Plant Physiology*, 70, 1107—1114.
- (11) Walker, D.A (ed)., 1990, *Techniques in Biochemistry and Photosynthesis*, pp. 118—131, Springer-verleg.
- (12) Cline, k. 1934, *Plant Physiology*, 75 : 675—678.
- (13) Bradford, M., 1976, *Anal. Biochem*, 72 : 248—254.
- (14) Laemmli, U.K., 1970, *Nature*, 227 : 680—685.
- (15) Andrzei, D, et al., 1988, *Analytical Biochem*, 159 : 323—328.
- (16) Ey, P.L, et al., 1986, *Meth Enzymol*, 121 : 497—509.
- (17) Vicestra, R, (ed)., 1989, *The Biochemistry of Plants*, Vol. 15, pp 521—539, Academic press.

Cucumber Mosaic Virus Coat Protein Inside the Chloroplast of the Infected Tobacco

Zhu Shui-fang

Francki, R.I.B

(Plant Quarantine Inst. Beijing 100026)

(Adelaide Univ. Australia 5064)

The intact chloroplasts were made through protoplasts. In the SDS-PAGE-silver stained gel, one extra protein band, which had the same mobility and molecular weight as the cucumber mosaic virus coat protein (CMV-cp), was found in the diseased chloroplast comparative to the health chloroplast. In the immunoblot testing, the band was highly reactive to the antiserum against the free CMV-cp, while the healthy and diseased sap treated healthy chloroplasts had no reaction. The result provides an evidence for the CMV-cp existence in the chloroplast. It was also found that the concentration of CMV-cp inside chloroplast was positively related to the severity of the symptom.

Key words: CMV Coat protein Chloroplast Tobacco Immunoblot