

## 葡萄扇叶病毒移动蛋白在寄主体内的 动态检测和免疫金标记\*

李红叶<sup>1</sup> 周雪平<sup>1</sup> 洪 健<sup>2</sup> 陈力耕<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学农业与生物技术学院; <sup>2</sup> 浙江大学分析测试中心 杭州 310029)

**摘 要** 利用葡萄扇叶病毒法国分离物 F13( *Grapevine fanleaf virus*, GFLV-F13) 移动蛋白抗体对杭州分离物 GFLV-H 移动蛋白进行 Western blot 分析表明移动蛋白在接种 GFLV-H 3d 后的苋色藜( *Chenopodium amaranticolor* ) 系统叶中就可检测到, 随着时间推移, 其积累量逐渐升高, 接种 16d 后达到最高值。接种 32d 后的病叶已经枯黄, 但移动蛋白积累量并没有减少。超薄切片电镜观察发现, 在感染 GFLV-H 的昆诺藜( *C. quinoa* ) 和苋色藜的叶肉组织薄壁细胞中, 病毒粒子呈纵列整齐地排列在小管状结构中, 在胞间连丝中也发现有管状结构。免疫金标记显示胶体金能定位在细胞质、细胞壁和胞间连丝上, 在管状结构也发现有少量的金粒子。这些结果进一步说明了 GFLV 是通过管状结构实现细胞间移动的。

**关键词**: 葡萄扇叶病毒, 移动蛋白, Western blot 分析, 免疫金标记

中图分类号: 432.4 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)05-0550-05

病毒对植物系统侵染的建立需要病毒在植物体内复制, 并从最初感染的细胞向其它部位扩散, 即必须实现细胞间移动(短距离运输)和通过维管束系统的长距离移动。在胞间移动过程中病毒必须克服细胞壁的屏障。已知病毒编码的移动蛋白( movement protein, MP) 在此过程中起着重要作用, 它能参与对胞间连丝的修饰或形成专门的结构体, 使得病毒能克服胞间连丝大小的限制而顺利通过。已知植物病毒的胞间运动有用两种方式: 一种是以烟草花叶病毒( TMV) 为代表, 病毒粒子脱除衣壳后, 在移动蛋白的协助下以病毒核酸(即非粒子)形式通过胞间连丝; 另一种是以豇豆花叶病毒( CPMV) 为代表, 其移动蛋白能作用于植物细胞形成贯穿细胞壁的管状结构, 病毒粒子包裹在此结构中实现胞间移动<sup>[1-2]</sup>。

葡萄扇叶病毒( *Grapevine fanleaf virus*, GFLV) 属豇豆花叶病毒科( Comoridae) 中的线虫传多面体病毒属( *Nepovirus* ), 为典型的多面体粒子, 基因组为正义单链双组分 RNA, 在 5' 端存在一个基因组共价结合蛋白( VPg), 3' 端则存在 poly( A )<sup>3]</sup>。RNA1 包含 7342nt, 编码一个决定病毒复制和多聚蛋白加工的 253kD 多聚蛋白( P1 )<sup>[4-7]</sup>。RNA2 包含 3774nt, 编码外壳蛋白和与病毒扩散有关的多聚蛋白 P2, 离体翻译表明, P2 通过 RNA1 编码的 24kD 蛋白酶切割成 28kD( P28) N-端蛋白、38kD( P38) 蛋白和 C 端 CP 蛋白<sup>[8-9]</sup>。Rizenthaler 等利用

\* 浙江省自然科学基金资助( 399486 )

作者简介: 李红叶( 1963 - ) 女, 浙江缙云人, 浙江大学农业与生物技术学院副教授, 博士, 主要从事植物病理学教学与研究。

收稿日期: 2001-09-10, 修回日期: 2001-11-22

免疫亲和纯化的 GFLV P38 抗体,证实在昆诺藜接种叶内,P38 蛋白(MP)是多聚蛋白 P2 稳定的最终产物,P38 蛋白主要存在于细胞质内,但也存在于膜和细胞壁中。利用 P38 抗体所进行的免疫金标记还将 GFLV 的 P38 蛋白定位于感病的昆诺藜叶肉细胞质的管状结构上,并且还发现这些管状结构在其感染的昆诺藜原生质体上也能形成,因此初步认为 P38 与 GFLV 的胞间扩散有关<sup>[10-11]</sup>。

作者在杭州分离鉴定了一个 GFLV 分离物(GFLV-H),本文报道了该分离物移动蛋白在苋色藜系统叶片中的动态检测,并通过免疫胶体金标记方法将该蛋白定位于寄主特定部位。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒源

GFLV-H 由作者从浙江大学实验农场果园分离,经生物学、形态学、血清学和 PCR 等方法鉴定,保存并繁殖于昆诺藜(*Chenopodium quinoa*)上。

### 1.2 抗体和免疫胶体金

GFLVP38 的重组蛋白兔抗血清(效价 1:5000)和胶体金标记的羊抗兔抗体(12nm, 15nm)由法国 Strasbourg 植物分子生物学研究所的 Pierre Pfeiffer 博士馈赠。

### 1.3 GFLV-H 移动蛋白的 Western blot 分析

7~8 叶期的苋色藜(*C. amaranticolor*)和昆诺藜幼苗经常规磨擦接种后培养在 15℃~25℃温室中。移动蛋白动态检测时,在接种 1d、2d、3d、4d、8d、16d 和 32d 后分别取苋色藜接种叶上方的系统叶 0.5g,提取叶片总蛋白。总蛋白样品制备、缓冲液配制、SDS-PAGE、转膜和 Western blot 分析均参照文献<sup>[12]</sup>进行。

### 1.4 低温包埋和超薄切片制作

分别取呈典型症状的苋色藜和昆诺藜叶片,切成 1mm×3mm 的小片,用 Karnovsky 2.5%戊二醛-2%多聚甲醛混合液 4℃固定 2h,0.1mol/L 磷酸缓冲液(PBS, pH7.2)冲洗组织块 3 次,然后于 -20℃下进行 50%、70%、80%、90%和 100%乙醇系列脱水(最后一步重复一次)。采用 Lowicryl K<sub>4</sub>M (Polysciences Inc 产品)低温包埋树脂在 -20℃下进行渗透。然后将组织块竖放在离心管中,加入包埋剂,盖上盖子,在 -20℃冰箱中用 360nm 紫外光照射 1~2d,使样品聚合固化,再在室温紫外光照射 1d,使样品完全固化。包埋材料经修块、定位后,用 Reichart-Jung ULTRACUT E 型超薄切片机切片,切片厚度 70nm。

### 1.5 超薄切片免疫金标记

标记在室温下进行,切片先用 BL 封闭液封闭 30min 后,用 BL 封闭液稀释(1:50)的移动蛋白抗体上孵育 3h,用 0.1mol/L PBS(在磷酸缓冲液中加 0.05%吐温 20)冲洗 4 次,再经 BL 封闭液封闭 30min 后,与胶体金标记的羊抗兔抗体(1:150 稀释)反应 1h, PBST 冲洗 3 次,双蒸水洗 3 次。最后超薄切片用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色各 15min。

### 1.6 透射电镜观察

以上样品均在日本 JEOL 公司的 JEM-1200EX 型透射电镜下观察拍照,加速电压为 60~80kV。

## 2 结果

### 2.1 GFLV-H 在苋色藜和昆诺藜上的症状

当苋色藜和昆诺藜接种叶达到成熟叶片大小时,接种叶通常不出现任何症状;当尚未达到成熟叶大小时接种,接种叶呈局部褪绿黄斑。系统叶症状在接种 8~10d 后出现,呈褪绿黄斑,黄斑大小不一,直径最大可达 2mm。黄斑在叶基部密集,向叶尖逐渐减少。随着植株生长,苋色藜上的症状逐渐减轻直至消失;昆诺藜上的症状则通常不消失,而且新生小叶自叶尖或叶缘变灰褐色向叶背卷曲、坏死,严重时叶片尚未完全展开时即脱落。

### 2.2 GFLV-H 移动蛋白在苋色藜中的积累状态

取 GFLV-H 接种 14d 后具典型症状苋色藜系统叶片提取总蛋白,经 12.5% SDS-PAGE 电泳,以 GFLV 法国分离物 F13 的 P38 蛋白(移动蛋白)兔抗血清(1:1000)为第一抗体,碱性磷酸酯酶标记的羊抗兔 IgG 作第二抗体,进行 Western blot 分析,结果表明:GFLV-F13 的 P38 抗血清 IgG 能特异性地检测到 GFLV-H 感染寄主中的相应蛋白,而未经接种的对照反应呈阴性。

GFLV-H 移动蛋白在苋色藜系统叶片中的积累动态如图 1 所示。移动蛋白在接种 3d 后就可检测到(第 4 条泳道),随后随着时间推移,其浓度逐渐上升,至第 16d 时到达最高值(第 7 泳道)并且在接种 32d 后,虽然叶片已枯黄,但移动蛋白量并没有减少(第 8 泳道)。在未接种的对照植株中检测不到该条带(第 1 泳道)。

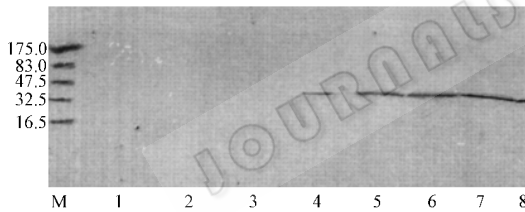


图 1 GFLV-H 移动蛋白在苋色藜系统叶中的积累动态

Fig. 1 Accumulation dynamics of movement protein of GFLV-H in systemically infected leaves of *C. amaranticolor* at different days past of inoculation

M Marker; line 1: Control( non-inoculated ); line 2~8: 1d, 2d 3d 4d 8d 16d and 32d days past of inoculation.

### 2.3 移动蛋白在寄主组织中的免疫定位

在免疫金标记前先对昆诺藜和苋色藜系统感病叶片进行超薄切片观察,发现无论是昆诺藜或苋色藜叶肉组织的薄壁细胞细胞质内常存在一些球形病毒粒子分布,这些病毒粒子呈纵列整齐地排列在一小管状结构中(图版 I-1)。小管直径约 40nm,众多小管相互平行排列在一起,形成结晶状的小管聚集体。另外还可以看到病毒粒子由小管结构横跨胞间连丝在细胞间运转的状况(图版 I-2, 箭头所示)。

对昆诺藜和苋色藜系统感病叶片的低温包埋超薄切片进行免疫胶体金标记定位,发现金颗粒分布在感病细胞的细胞质中,尤其在靠近细胞壁的部位(图版 I-3, 箭头所示),在细胞壁上也可以见到少量的金颗粒(图版 I-4, 箭头),位于细胞壁的胞间联丝可以被金颗粒很好地标记,曾观察到有数颗金颗粒集中标记在胞间联丝内的情况(图版 I-5 和 I-6 箭头所示)。在包含病毒粒子的管状物聚集体上亦有少量金颗粒标记(图略)。

在未加第一抗体的对照处理中,细胞核、叶绿体等部位以及细胞外区域只有极少的金颗粒散布,表明免疫反应的非特异性吸附极少,实验反映出真实的免疫标记状况。

### 3 讨论

利用 Western blot 方法跟踪检测 GFLV-H 接种后 1~32d 苋色藜接种叶上方系统叶中移动蛋白的积累状态,发现移动蛋白最早在接种后 3d 即可得到检测,并且在叶片枯黄(接种后 32d)时仍然保持较高的浓度,表明 GFLV-H 移动蛋白在苋色藜中是相当稳定的。该结果与 Ritzenthaler<sup>[11]</sup>以昆诺藜接种叶为材料所得的结果一致,进一步明确该蛋白的稳定性不受寄主因子的影响,也不受症状消退和叶片老化的影响。与此相反,与 GFLV 同属的葡萄铬色花叶病毒(GCMV)和烟草黑环病毒(TBRV)对应蛋白在寄主体内却是瞬间表达<sup>[13~14]</sup>。可见不同病毒的移动蛋白在寄主体内的稳定性存在差异。

Ritzenthaler<sup>[5]</sup>对感染 GFLV 的昆诺藜叶片通过亚细胞结构分离后发现,与其它病毒的移动蛋白主要存在于与胞间连丝有关的细胞壁中状况不同,GFLV 移动蛋白主要存在于细胞质中,在细胞壁和细胞膜上较少。免疫金标记、免疫荧光和免疫银染证明该移动蛋白与管状结构有关,是管状结构的组分<sup>[11]</sup>。我们以自己分离到 GVLV-H 为材料,同时对发病的昆诺藜和苋色藜叶片进行免疫金标记,所获得的结果表明胶体金能很好地标记在细胞质、细胞壁和胞间连丝上。但在管状结构表面只标记上少量的金粒子,推测是实验系统不同引起的差异。

关于移动蛋白是否是 GFLV 诱导的管状结构的唯一组分,也即除移动蛋白外是否还有其它病毒蛋白或寄主组分参与管状结构的形成,至今尚无报道。对番茄斑萎病毒(TSWV)<sup>[16]</sup>、豇豆花叶病毒(CPMV)和花椰菜花叶病毒(CaMV)<sup>[17]</sup>所作的研究表明管状结构的形成无需病毒的其它蛋白参与,管状结构不仅能在发病的寄主植物细胞、原生质体中形成,还能在非寄主植物拟南芥原生质体中,甚至在昆虫细胞中形成。这些结果意味着管状结构的形成无需特异性寄主成分的参与,或所参与管状结构形成的蛋白在植物和动物中都是高度保守的。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Citovsky V, Zanbryski P. *Ann Rev Microbiol*, 1993 **47** :167 ~ 197.
- [ 2 ] Mclean B M, Waignann E, Cilovsky V. *Trends Microbiol*, 1993 **1** :105 ~ 109.
- [ 3 ] Van Regenmorte M H V, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. *Virus Taxonomy*. 7th Report of ICTV. New York: San Diego Academic Press 2000. 691 ~ 701.
- [ 4 ] Ritzenthaler C, Viry M, Pinck M, et al. *J Gen Virol*, 1991 **72** :2357 ~ 2365.
- [ 5 ] Viry M, Serghini M A, Hans F, et al. *J Gen Virol*, 1993 **74** :169 ~ 174.
- [ 6 ] Margis R, Viry M, Pinck M, et al. *Viol*, 1991 **85** :779 ~ 787.
- [ 7 ] Margis R, Pinck L. *Viol*, 1992 **90** :884 ~ 888.
- [ 8 ] Serghini M A, Fuchs M, Pinck M, et al. *J Gen Virol*, 1990 **71** :1433 ~ 1441.
- [ 9 ] Margis R, Ritzenthaler C, Reinbolt J, et al. *J Gen Virol*, 1993 **74** :1919 ~ 1926.
- [ 10 ] Ritzenthaler C, Schmit A C, Michler P. *J Gen Virol*, 1995 **76** :379 ~ 387.
- [ 11 ] Ritzenthaler C, Schmit A C, Michler P, et al. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1995 **8** :379 ~ 387.
- [ 12 ] 李德葆, 周雪平, 许建平, 等. 基因工程操作技术. 上海: 上海科技出版社, 1996. 146 ~ 150.
- [ 13 ] Hanbrand L, Le Gall O, Candresse T, et al. *J Gen Virol*, 1992 **73** :2093 ~ 2098.
- [ 14 ] Demangeat G, Hemmer O, Reinbot J, et al. *J Gen Virol*, 1992 **73** :1609 ~ 1614.

- [ 15 ] Ritzenthaler C , Pinck L , Pink L , *et al.* *J Gen Virol* , 1994 **76** 907 ~ 915 .  
 [ 16 ] Storms M M H , Kormelink R , Peters D , *et al.* *Virology* , 1995 **214** 485 ~ 493 .  
 [ 17 ] Kasteel D , Perbal C M , Boyer J C , *et al.* *J Gen Virol* , 1996 **77** 2857 ~ 2864 .

## Accumulation Dynamics and Immuno-gold Location of Movement Protein of GFLV-H *in vivo* of *Chenopodium amaranticolor* and *C. quinoa*

Li Hongye<sup>1</sup> Zhou Xueping<sup>1</sup> Hong Jian<sup>2</sup> Chen Ligeng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Agriculture and Biotechnology , Zhejiang University ; <sup>2</sup> Analysis center , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China )

**Abstract** : The antiserum of the movement protein of Grapevine fanleaf virus F13 ( GFLV-F13 ) was used to detect corresponding protein accumulation of GFLV Hangzhou isolate ( GFLV-H ) in systematically infected leave of *C. amaranticolor* by Western blot analysis. The results showed that the MP was detectable 3 days past of inoculation ( dpi ) , and its amount raised as the time extending , reaching the highest level at 16dpi . Movement protein could be detected stably even though the infected leaves became yellow and drying . The observation of ultra sections of GFLV-H-infected leaves of *C. amaranticolor* and *C. quinoa* by transmission electron microscope found that the membrane-walled tubules contained virus particles often aggregated in cytoplasm . Virus particles are aligned in tubular structure in single line , protruding though the cell wall within plasmodesmata in systemically infected *C. quinoa* . The MP of GFLV-H was located in the cytoplasm near cell wall , cell wall , and plasmodesmata and also on the tubule structure in cytoplams of infected *C. quinoa* and *C. amaranticolor* by immuno-gold labeling . So , it could concluded that the movement of GFLV-H between cells is through the tubular structure .

**Key words** : Grapevine fanleaf virus ( GFLV ) , Movement protein , Western blot , Immuno-gold location

### 图版说明

Explanation of plate

- 1 病毒粒子呈单列排在小管结构中( 60 000 × ) ;
  - 2 病毒粒子有小管结构穿过胞间连丝( 箭头 × 38 000 ) ;
  - 3 定位在感染 GFLV-H 昆诺藜叶肉细胞质( 靠近细胞壁 ) 中的金粒子( 55 000 × ) ;
  - 4 定位在感染 GFLV-H 苋色藜叶肉细胞壁上的金粒子( 箭头 × 58 000 × ) ;
  - 5 定位在感染 GFLV-H 昆诺藜胞间连丝中金粒子( 箭头 × 60 000 × ) ;
  - 6 定位在感染 GFLV-H 苋色藜胞间连丝中的金粒子( 箭头 × 68 000 × ) .
1. The virus array in single-line within the small tubule structur( 60 000 × ) ;
  2. The cell-to-cell spreading of GFLV virus particles through plasmodesmata( arrow × 38 000 × ) ;
  3. Gold particles in cytoplasm ( near cell wall ) of *C. quinoa* infected with GFLV-H( 55 000 × ) ;
  4. Gold particles located in the cell wall of *C. amaranticolor* infected by GFLV-H( 58 000 × ) ;
  5. Gold particles superimposed to plasmodesmata ( arrow , *C. quinoa* )( 60 000 × ) ;
  6. Gold particles superimposed to plasmodesmata ( arrow , *C. amaranticolor* )( 68 000 × ) .