

## 棉花黄萎病菌毒素结合位点初探

刘凤权, 胡白石

(农业部病虫监测与治理重点实验室, 南京农业大学植保学院, 南京 210095)

**摘要:**以纯化的棉花黄萎病菌毒素(PLPC)免疫新西兰白兔制备了 PLPC 特异性抗血清。将 PLPC( $15 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )用不同浓度的抗体( $1 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  IgG)吸附后处理泗棉 3 号的切根苗, 毒素所引起的症状都有不同程度的减轻。表明所制备的抗体在与毒素发生特异性免疫学反应的同时, 可部分封闭毒素分子上与毒素受体结合的位点。利用竞争 ELISA 测定了泗棉 3 号幼苗子叶的质膜制剂与 PLPC 的结合活性。结果表明, 质膜制剂与毒素结合后能部分阻断毒素与其抗体的免疫学反应, 即质膜制剂中含有毒素的结合位点。分别用胰蛋白酶和煮沸处理质膜制剂后, 质膜制剂对毒素与其抗体的反应的抑制作用消失, 初步表明质膜制剂中与毒素结合的是蛋白质。

**关键词:**棉花; 黄萎病菌毒素; 竞争 ELISA; 结合位点; 质膜

**中图分类号:** S435.621 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-7807(2005)01-0029-04

## Preliminary Probe to Binding Sites of a *Verticillium dahliae* Phytotoxin

LIU Feng-quan, HU Bai-shi

(Key Lab of Monitoring and Management of Plant Diseases and Pests, Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** A phytotoxic protein-lipopolysaccharide complex (PLPC) produced by *Verticillium dahliae* of cotton was purified by Fast Protein, Peptide and Polynucleotide Liquid Chromatography (FPLC). A specific polyclonal antibody against the phytotoxin was prepared by injecting the New Zealand rabbits with the purified PLPC. When the PLPC ( $15 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) was absorbed by the prepared antibody of different concentration ( $1 \sim 20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  IgG), the wilting symptom of cotton seedlings (cv. Simian 3) caused by the PLPC was alleviated to different degree, and the disease index was decreased from 13.4% to 56.2%. The result showed that the prepared antibody not only immunologically react with the PLPC, but also partly block some sites (groups) of PLPC molecular which can recognize the binding sites on the cotton plant cells. The binding of the plasma membrane preparation of cotton cotyledon with the PLPC was determined by the indirect competitive ELISA. Results demonstrated that the immunological reaction of the PLPC and the antibody can be inhibited by the plasma membrane preparation (the inhibition varied from 8.2% to 54.8%), which hints that the plasma membrane preparation contains the binding sites of the PLPC, and the binding sites of PLPC maybe exist in the plasma membrane preparation of seedling cotyledons of cotton. When the plasma membrane preparation was treated by  $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  L-trypsin for 30 min or boiled at  $100^\circ\text{C}$  for 15 min, the immunological reaction of the PLPC and the antibody can not be blocked perfectly by the membrane preparation, which shows that some proteins in plasma membrane preparation are probably responsible for binding with the PLPC.

**Key word:** cotton; phytotoxin; competitive ELISA; the binding sites; plasma membrane

**收稿日期:** 2004-11-15 **作者简介:** 刘凤权(1964-), 男, 副教授, 博士. fqliu20011@sina.com

**基金项目:** 国家自然科学基金(39800090)

毒素的作用位点和受体蛋白的研究是阐明病原与寄主植物识别的关键。毒素作为致病因子或毒性因子的作用具有分子—细胞识别的特征,一般毒素在病原菌与寄主接触初期产生,扩散到达植物细胞上的作用部位,与植物细胞的受体位点结合后引发寄主的细胞学反应<sup>[1-2]</sup>。毒素的结合位点以及与细胞间识别作用的研究始于70年代,寄主专化性毒素(HST)与植物受体间的识别作用研究较早,获得的研究结果也较多。HST与植物细胞的结合位点大多在质膜(如AK毒素、HV毒素和HS毒素等)、线粒体膜(如HMT毒素)和叶绿体膜(如ACT毒素)等膜系统上<sup>[1-2]</sup>。

棉花黄萎病是我国棉花生产上的重要病害之一,大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)产生的毒素是病害发生的主要致病因子。目前有关棉花黄萎病菌毒素结合位点的研究还不多,这些工作大多是通过毒素的作用机制以及毒素对植物细胞结构和功能的影响来推测毒素的结合位点的<sup>[3-4]</sup>。本文以纯化的PLPC制备抗体,通过免疫化学方法来确定棉花黄萎毒素的结合位点。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒素分离纯化与鉴定

参照Meyer等<sup>[5]</sup>的方法。活化后的棉黄萎病菌VD-8菌株(江苏农科院吴蔼民先生提供)接种于查彼克培养液中,25℃下培养7~9d后,过滤、离心,培养滤液经丙酮(4倍体积)沉淀、无水水溶解后,过Sephrose CL-6B柱,对各吸收峰进行生物活性测定。

### 1.2 毒素抗体制备与鉴定

以纯化毒素(PLPC)为免疫原,按常规方法免疫新西兰大白兔,经2次基础免疫(皮下、皮内注射)和4次强化免疫(静脉注射)后,颈动脉采血,获得PLPC的抗血清。以(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>沉淀法纯化提取抗血清中的IgG,抗体IgG鉴定按常规方法进行<sup>[2,6]</sup>。

### 1.3 抗体对毒素生物活性抑制作用测定

按章元寿<sup>[3]</sup>的方法进行。将毒素PLPC(15 μg·ml<sup>-1</sup>)用不同浓度的抗体(1~20 μg·ml<sup>-1</sup> IgG)吸附30 min后,处理泗棉3号的切根苗,24 h后测定抗体对毒素生物活性抑制作用。抑制作用以病情指数下降百分率表示(以未用抗体处理的毒素的生物活性为标准)。

### 1.4 竞争ELISA方法的工作流程

参照文献<sup>[2,6]</sup>的方法,其测定程序为:先用5 μg·ml<sup>-1</sup>蛋白A 200 μl包被酶标板,然后依次加入100 μl不同稀释度的抗体IgG、纯化毒素或毒素与质膜制剂结合物或毒素与胞内全蛋白制剂结合物或阴性对照、抗血清、酶标蛋白A(HRP-Protein A),再加入底物(TMB)反应液,终止反应后测定OD<sub>450</sub>值。

### 1.5 棉花幼苗子叶质膜制剂制备

参照文献<sup>[7]</sup>的方法。将泗棉3号幼苗子叶切成0.5 cm小块,取10 g组织放在25 ml均浆液(250 mmol·L<sup>-1</sup>蔗糖,3 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA,2 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>ATP,10% (V/V)甘油,1.0% (W/V) BSA,0.5% (W/V) PVP(分子量40000),2 mmol·L<sup>-1</sup> PMSP,15 mmol·L<sup>-1</sup> β-巯基乙醇,4 mmol·L<sup>-1</sup> DTE和70 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl,pH8.0)中,浸润10 min后,均浆、纱布过滤、离心(13000 g,3 min,4℃),取上清。上清离心(13000 g,25 min,4℃)后得到微粒体膜。将微粒体沉淀悬浮在悬浮缓冲液(250 mmol·L<sup>-1</sup>蔗糖,10%甘油,1 mmol·L<sup>-1</sup> DTE和1 mmol·L<sup>-1</sup> PMSP,2 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-MES,pH7)中,并用700 μl 25% (W/V)和300 μl 35% (W/V)的不连续蔗糖垫进行梯度离心(13000 g,4℃,1 h)。离心后,从25%/35%接触面处移出质膜,存放在-70℃或立即使用。

### 1.6 质膜制剂与毒素的结合活性测定

将不同浓度的泗棉3号幼苗子叶的质膜制剂与毒素PLPC(15 μg·ml<sup>-1</sup>)吸附1 h后,利用竞争ELISA测定质膜制剂与PLPC的结合活性。以未经质膜制剂吸附的毒素与其抗体的免疫学反应(B<sub>0</sub>)为标准,测定经质膜制剂吸附后,毒素与抗体的反应(B)。以抑制率(1-B/B<sub>0</sub>)表示质膜制剂与毒素的结合活性。

### 1.7 质膜制剂中活性成分鉴定

将质膜制剂分别用5 μg·ml<sup>-1</sup> L-胰蛋白酶处理30 min或煮沸处理(100℃,15 min)后,利用竞争ELISA方法测定毒素与处理后质膜制剂的结合活性。

### 1.8 毒素PLPC和抗体IgG蛋白测定

以牛血清白蛋白为对照,以考马斯亮蓝法测定毒素PLPC和抗体IgG蛋白含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 毒素分离纯化与鉴定

培养7~9 d的棉黄萎病菌VD-8菌株培

养滤液经丙酮沉淀、无菌水溶解后,用快速蛋白液相色谱(FPLC)层析后,获得两个吸收峰。其中40~60 ml洗脱液间出现峰1,其分子量约为195000,为主要活性峰(图1),处理棉花幼苗可引起典型的萎蔫和坏死症状。洗脱液浓缩后通过琼脂糖凝胶电泳纯化,获得电泳纯毒素(PLPC)。PLPC对感病品种泗棉3号棉花幼苗具生物活性的最低浓度为15  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

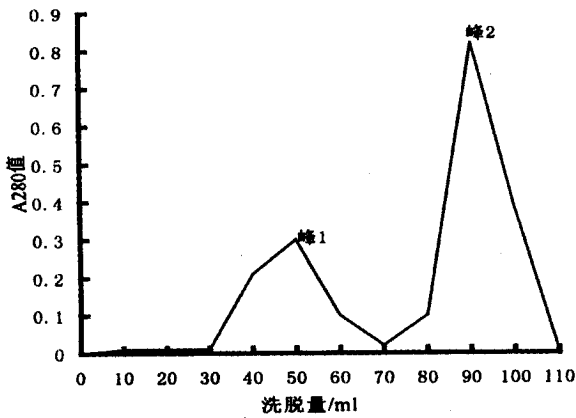


图1 棉花黄萎毒素的分离纯化  
Fig. 1 Purification of PLPC extracellular products from *V. dahliae*

### 2.2 毒素抗体 IgG 鉴定

经测定,毒素抗体 IgG 的效价为 1 : 102400。抗体特异性测定结果表明,PLPC 抗体与棉花黄萎病菌(VD-8 和 VD-5)的培养滤液呈阳性反应,而非黄萎病菌如棉枯萎病菌、棉立枯病菌、棉红腐病菌、西瓜枯萎病菌、水稻纹枯病菌、稻瘟病菌、油菜菌核病菌和小麦赤霉病菌等的培养液均呈阴性反应。

### 2.3 抗体对毒素生物活性抑制作用

将毒素 PLPC 用不同浓度的抗体吸附后,处理泗棉 3 号的切根苗,抗体对毒素生物活性的抑制作用见图 2。PLPC 在泗棉 3 号的切根苗上所引起的症状都有不同程度的减轻,病情指数下降了 13.4%~56.2%。这表明毒素抗体在与毒素发生特异性免疫学反应的同时,还能部分封闭 PLPC 分子上与植物细胞上毒素受体结合的位点,即在一定程度上能识别 PLPC 分子上与毒素受体结合的位点。用抗体处理毒素后,干扰了毒素与植物细胞的识别作用,进而影响了毒素的致萎作用。

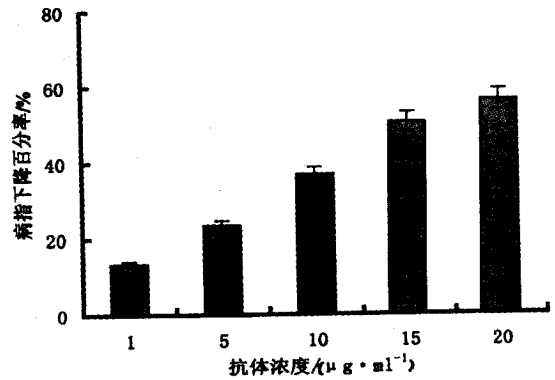


图2 抗体对毒素生物活性的抑制作用  
Fig. 2 Inhibition of biological activity of PLPC by IgG against PLPC

### 2.4 质膜制剂与毒素的结合活性

将棉苗子叶的质膜制剂与毒素结合后,利用竞争 ELISA 测定其与 PLPC 的结合活性(图 3)。质膜制剂与毒性肽结合后能部分阻断毒素与其抗体的反应,不同浓度的质膜制剂对毒素与其抗体反应的抑制率为 8.2%~54.8%。这表明,棉花子叶的质膜制剂中含有毒素的结合位点,即棉花黄萎毒素的作用位点可能存在于细胞的质膜上。

### 2.5 质膜制剂中的活性成分

分别用胰蛋白酶和煮沸处理质膜制剂后,质膜制剂对毒素与其抗体的反应的抑制作用消失(图 3),表明质膜制剂中与毒素结合的活性成分是蛋白质。

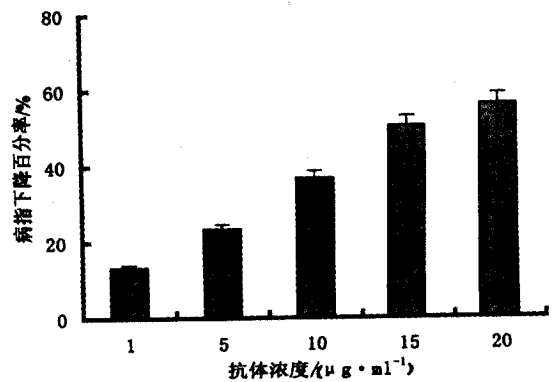


图3 质膜制剂与毒素的结合活性  
Fig. 3 Binding of PLPC to plasm membrane preparation of cotton cotyledon by indirect competitive ELISA

## 3 讨论

近年来,人们试图从毒素与植物细胞间的识别,信号传递以及植物对毒素的细胞学连续反应来探求毒素致病作用的分子机理以及植物的抗病

机制,并在毒素的作用位点、植物受体及其性质等方面进行了不少研究,并取得了一些研究成果<sup>[1,3,7]</sup>。

自从 Keen 等<sup>[8]</sup>首次报道棉花黄萎病菌毒素是一种非寄主专化性毒素(NHST)——蛋白脂多糖复合物(PLPC)以来,国内外学者通过该毒素作用机制研究以及毒素对植物细胞结构和功能的研究推测该毒素的结合位点可能在细胞质膜上,但相关研究还缺乏直接证据<sup>[1,3,7]</sup>。本研究利用免疫化学技术来确定毒素的结合位点,这是一种新的尝试。其关键是获得针对毒素分子上特定基团的抗体探针,这种抗体除能与毒素分子上的特定基团发生免疫学反应外,还能封闭(或部分封闭)毒素分子上与毒素结合位点具有识别作用的特定基团(位点)。

由于棉花黄萎毒素是一种蛋白脂多糖复合物,毒素分子上具有识别作用的特定基团数量和类型可能较多,笔者曾经通过杂交瘤技术获得了一些针对不同特定基团的单抗,但是研究表明任一种单抗对毒素分子特定基团的封闭作用都很小,即用这些单抗处理毒素后对毒素生物活性的影响都较小(资料另发表)。从理论上讲,最好的方法是获得针对毒素分子上所有特定基团的不同类型的单抗后,将它们混合作为抗体探针。在本研究中笔者选择了多抗作为抗体探针,研究表明多抗对毒素分子特定基团的封闭作用较好。然而,多抗实际上是一种混合抗体,其中不仅含有针对特定基团的抗体分子,也含有针对其它基团的抗体分子,后者对本研究有一定影响,特别是在定量测定质膜制剂与毒素的结合活性时,由于针对其它基团的抗体分子的存在部分掩盖了质膜制剂与毒素结合后对毒素与其抗体的反应的阻断作用。在本研究中,这种阻断作用仅为 55% 左右。为了减少这种影响,笔者曾通过在毒素中加入过量质膜制剂后再与抗体反应,并将测定值作为本底值予以消除,效果较好(资料另发表)。

本研究利用免疫化学方法对毒素结合位点进行研究的成果与前人通过生化方法推测的结果一致<sup>[3,4,7]</sup>,即棉花黄萎病菌毒素的结合位点存在于植物细胞的质膜上,质膜上具有结合活性的成分是蛋白质。利用免疫化学技术对毒素结合位点在不同组织中进行定位、结合蛋白的分离及其受体功能的鉴定等有待进一步的工作。

#### 参考文献:

- [1] 董金皋,李树正. 植物病原菌毒素研究进展[M]. 北京:中国科学技术出版社,1997.
- [2] JONES W T, Harvey D, Sutherland P W, Reynolds P H S. Production of anti-idiotypic monoclonal antibodies that mimic the phytotoxin Dothistromin[J]. Food and Agricultural Immunology, 1998, 10(1):67-68.
- [3] 章元寿,王建新,刘经芬,等. 大丽轮枝菌毒素的分离、提纯及生物测定[J]. 真菌学报,1989,8(2):140-147.
- [4] 吕金殿,甘莉,阎龙飞. 棉花黄萎病菌毒素的纯化与特性研究[J]. 植物病理学报,1991,21(2):129-133.
- [5] MEYER R, Slater V, Duber I A. A phytotoxic protein-lipopolysaccharide complex produced by *Verticillium dahliae* [J]. Physiology, 1994, 35(6):1448-1454.
- [6] 陈永萱,刘凤权,薛宝娣. A 蛋白双抗体夹心法检测西瓜花叶病毒的研究[J]. 病毒学杂志,1988,18(4):357-363.
- [7] DUBERY I A, Meyer R. Specific binding of a *Verticillium dahliae* phytotoxin to protoplasts of cotton, *Gossypium hirsutum* [J]. Plant Cell Reports, 1996, 5(10):777-780.
- [8] KEEN N T, Long M. Isolation of a protein-lipopolysaccharide complex from *Verticillium albo-atrum* [J]. Physiol Plant Pathology, 1972, 2(4):307-315.