

# 拮抗 TMV 细菌发酵产物对 TMV 粒体形态的影响

申莉莉, 王凤龙, 钱玉梅, 陈德鑫, 吴惠惠, 何京美

中国农业科学院烟草研究所, 青岛市崂山区科苑经四路 11 号 266101

**摘要:**通过对拮抗细菌发酵产物抑制 TMV 活性的测定及体外混合对 TMV 粒体形态的影响研究,表明:1)拮抗细菌 by33、by88 发酵产生的活性蛋白对 TMV 的体外钝化作用分别为 85.38% 和 87.47%。2)电镜下观察到活性蛋白能打破 TMV 粒体的规则排列,与 TMV 粒子不可逆的结合,从而降低侵染力。

**关键词:**抗病毒蛋白;病毒粒体;抑制作用

中图分类号 S432.41

文献标识码 A

文章编号 1004-5708(2007)06-0044-03

## Effect of inhibitor protein from TMV antagonistic bacteria on TMV particles

SHEN Li-li, WANG Feng-long, QIAN Yu-mei, CHEN De-xin, WU Hui-hui, HE Jing-mei

Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101, China

**Abstract:** Research on inhibition of protein from antagonistic bacteria to TMV infection and the impact of two inhibitor proteins on TMV particles were carried out. Results showed that the two inhibitors from zymosis fluid had the passivation effects of 85.38% and 87.47% on TMV respectively. Samples mixed with the two inhibitors were found to destroy the regular array of virus particles under the electron microscope and the combinative mixtures were not reversible.

**Key words:** antiviral protein; virus-particles; inhabitation effect

从烟田耕作层(15 cm)土样中分离到对烟草花叶病有拮抗作用的菌株 by33、by88,其分泌的抗病毒蛋白经过室内生测和作用方式的初步分析,认为能有效地钝化 TMV 粒子,与病毒粒子进行不可逆的结合,抑制病毒体内复制,对病毒侵染具有预防作用。为进一步明确活性物质与 TMV 的作用机制,本试验提取菌株发酵产生的活性蛋白与提纯的 TMV 病毒液混合,进行透射电镜观察。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试菌株:2005年9月由青州烟田土样中筛选到,对 TMV 有拮抗作用的菌株 by33、by88。

供试烟草品种为三生-NN 烟(*Nicotiana tabacum* var. Samsun NN),青州烟草研究所病毒实验室保存的

作者简介:申莉莉(1976-),女,硕士,主要从事烟草病毒病研究。

E-mail: sdrzsl@tom.com

收稿日期:2007-06-15

纯化 TMV 活体毒源 NC89。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 烟草花叶病毒精提液制备(硫酸铵沉淀法)<sup>[1]</sup>

纯化的活体毒源 NC89 叶片 100 g,研磨,离心去植株组织,按 100 mL 病毒澄清液加 25 g 硫酸铵的比例提纯病毒。

#### 1.2.2 拮抗细菌发酵活性蛋白液制备(硫酸铵沉淀法)<sup>[2-3]</sup>及体外钝化作用测定

菌株 by33、by88 经 NB 发酵培养 2 d,离心、细菌过滤(0.25 μm)除菌体,得无菌发酵液。取 100 mL 发酵液在冰水浴中加入 56.1 g 硫酸铵,缓慢搅拌 30 min,4℃静置过夜,8000 r/min、4℃离心 20 min,沉淀用 10 mL PBS 溶解。沉淀和上清经 PBS 透析 2 d,得粗蛋白提液、去蛋白上清液。分别与 TMV 汁液混合 15 min 后,半叶法接种三生烟<sup>[4-5]</sup>检测活性。

#### 1.2.3 电镜样品制备(负染法)<sup>[6-8]</sup>及病毒粒体形态观察

取 1 mL 的 TMV 精提液与等量的蛋白粗提液混合,以与等量无菌水混合为对照,在室温下(25℃)放

置 25 min 后,用带膜样品载网膜面向下吸附 1~3 min,取出滤纸吸干。用镊子移到磷钨酸(2%,pH 6.7)中,染色 1~2 min,取出滤纸吸干染液,放在垫有滤纸的平皿中,干燥后在 JEM-100CX(放大倍数 3000×1.45)透射电镜下,观察病毒粒体形态。

#### 1.2.4 拮抗物质与 TMV 的结合方式测定(透析法)<sup>[10]</sup>

TMV 与粗提蛋白液混合 25 min,流水透析 3 d;TMV 与粗提蛋白液混合后 4℃静置 3 d;对照为 TMV 透析 3 d。半叶法接种三生烟,记录枯斑数。

## 2 结果与分析

### 2.1 活性蛋白对 TMV 的体外钝化作用测定

表 1 粗提蛋白液、去蛋白上清对 TMV 活性检测

(半叶平均枯斑数)

	粗提蛋白液(by33)		上清(by33)		粗提蛋白液(by88)		上清(by88)		不接菌处理	
重复 1	3.92	40.0	41.2	62.9	6.75	41.13	30.25	44.88	20.67	10.67
重复 2	6.17	29.25	37.4	54.2	5.75	32.13	37.63	49.38	27.67	36.67
重复 3	5.0	38.25	26.4	34.1	6.0	43.38	53.88	54.63	40.33	65.67
重复 4	3.91	22.45	35.3	56.8	3.0	55.14	25.0	30.5	49.33	41.33
平均	4.75	32.49	35.06	52.0	5.38	42.95	36.69	44.85	34.5	38.59
防效	85.38%		32.58%		87.47%		18.22%		10.60%	

结果见表 1,菌株 by33、by88 的粗提蛋白液对 TMV 的体外钝化作用分别为 85.38%、87.47%,而上清液和不接菌处理对 TMV 钝化作用微弱,说明活性物质的主要成分为蛋白质类。

### 2.2 活性蛋白对 TMV 粒体形态的影响

通过 JEM-100CX 电镜观察 TMV 的粒体形态:TMV 与无菌水混合的图片(图 1a),TMV 粒体刚直、匀

称,呈杆状,排列规则。而 TMV 与无菌活性蛋白 by33、by88 混合的图片(图 1b、图 1c),TMV 粒体小片段数目多,排列凌乱,呈聚集状。这可能是因为活性蛋白破坏了病毒衣壳蛋白亚基之间的作用力,导致病毒粒体断裂,结构松散,排列凌乱,而小片段的病毒感染力降低<sup>[7-8]</sup>。

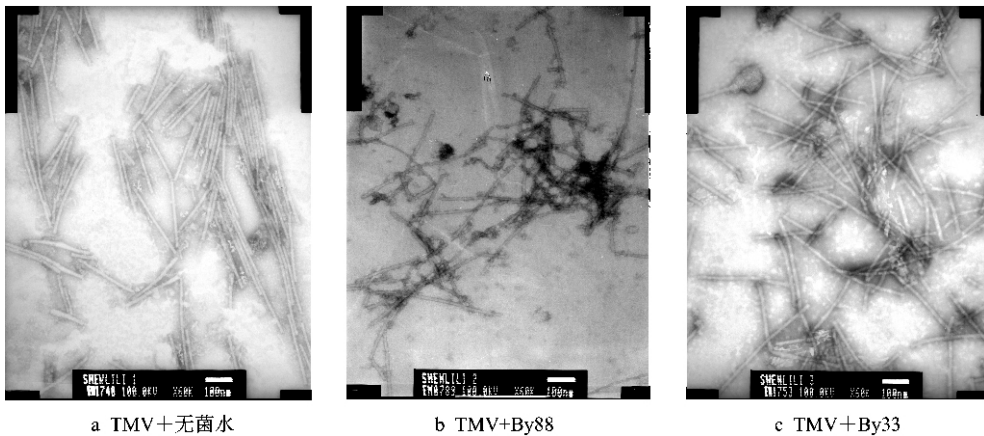


图 1 电镜观察到的不同处理的 TMV 粒体形态

表 2 粗提蛋白液与 TMV 结合方式的测定

	By33 + TMV	TMV 透析	By33 + TMV 透析	TMV 透析	By88 + TMV	TMV 透析	By88 + TMV 透析	TMV 透析
重复 1	26.0	110.75	4.75	59.75	14.33	36.33	36.0	68.0
重复 2	13.5	67.0	20.25	86.25	19.0	53.0	31.0	53.0
重复 3	13.75	64.0	26.8	105.4	23.25	80.5	19.8	53.2
平均	17.58	80.58	17.27	83.8	18.86	56.61	28.93	58.07
防效	77.97%		79.39%		66.68%		50.18%	

### 2.3 活性蛋白与 TMV 结合方式的不可逆性

由表 2 可见,by33 和 by88 的粗提蛋白液与 TMV 混合后,经过透析处理,其抑制效果分别为 79.39%、50.18%,与未经透析的抑制效果 77.97%、66.68% 相当,说明拮抗物质与 TMV 的结合方式是不可逆的结合,透析不能还原 TMV 与拮抗物质的这种结合作用。

## 3 结论与讨论

Mulvania 于 1926 年就发现被细菌污染的植物病毒汁液很快丧失侵染活力。日本学者 Ami-machi 和 Inashiki-gun 于 1987 年从香菇及弯叶丝兰的叶片中提取出抑制 TMV 侵染的活性物质<sup>[9]</sup>。美国康奈尔大学 1992 年从梨火疫病菌中分离研制出超敏蛋白 Haipin,能诱导植物产生过敏性反应和诱导植物产生系统抗性。这些活性物质具有良好的预防 TMV 侵染的作用,但对已感染 TMV 的植物不具有治疗作用。

本试验筛选出对 TMV 有拮抗作用的菌株 By33、By88,其分泌的抗病毒蛋白对 TMV 粒子有体外钝化作用,在电镜下可观察到抗病毒蛋白打破 TMV 粒子的规则排列,且试验证明抗病毒蛋白与 TMV 的结合方式为不可逆,从而可有效降低病毒粒子的侵染力,但有关菌株及其分泌抗病毒蛋白的特性,及其与 TMV 在烟株体内的作用机制,仍需进一步研究。

### 参考文献

- [1] 梁训生,张成良,张作芳. 植物病毒血清学技术[M]. 北京:农业出版社,1985:238-239.
- [2] 郑爱萍,李平,王世全,等. 水稻纹枯病拮抗菌 B34 分离鉴定及杀菌蛋白的获得[J]. 中国水稻科学,2002,16(4):356-360.
- [3] 付鸣佳,吴祖建,林奇英,等. 金针菇中一种抗病毒蛋白纯化及其抗烟草花叶病毒特性[J]. 福建农林大学学报,2003,33(1):84-88.
- [4] 吴元华,朱春玉,王春梅,等. 噁肽霉素对烟草花叶病毒病抑制作用研究[J]. 植物保护,2005,31(4):52-54.
- [5] Ami-machi, Inashiki-gun. Purification and Chemical Properties of an Inhibitor of Plant Virus Infection from Fruiting Bodies of *Lentinus edodes*[J]. Agric Biol Chem,1987,51(3):883-890.
- [6] 王学东,崔琳. 植物病毒电镜样品制备方法的研究[J]. 东北农业大学学报,1995,26(1):99-102.
- [7] 车海彦,吴云锋,杨英,等. 植物源病毒抑制剂 WCT-II 控制烟草花叶病毒(TMV)的作用机理初探[J]. 西北农业学报,2004,13(4):45-49.
- [8] 刘国坤,谢联辉,林奇英,等. 15种植物的单宁提取物对烟草花叶病毒(TMV)的抑制作用[J]. 植物病理学报,2003,33(3):279-283.
- [9] Ami-machi, Inashiki-gun. Properties of Two Inhibitors of Plant Virus Infection from Fruiting Bodies of *Lentinus edodes* and From Leaves of *Yucca recurvifolia* Salisb[J]. Agric Biol Chem,1987,51(3):897-904.
- [10] 付鸣佳,林健清,吴祖建,等. 杏鲍菇抗烟草花叶病毒蛋白筛选[J]. 微生物学报,2003,43(1):29-34.