

拮抗黄瓜花叶病毒(CMV)细菌粗提蛋白对 CMV 粒体形态的影响

王芳¹, 王凤龙², 申莉莉², 钱玉梅², 杨金广², 刘晓霞¹

1 中国农业科学院研究生院, 北京 100081;

2 中国农业科学院烟草研究所, 青岛市崂山区科苑经 4 路 11 号, 266101

摘要: 为研究拮抗细菌活性蛋白对 CMV 的影响, 从烟田耕作层土样中分离到对 CMV 有拮抗作用的细菌菌株 B6, 通过离子交换层析和凝胶过滤层析初步确定其活性物质是分子量大小为 40.6 kD 的蛋白质。粗提病毒经活性蛋白处理后, 检测活性蛋白对病毒的抑制率, 体外混合对 CMV 粒体形态的影响及利用叶圆片法, 检测活性物质处理后寄主体内病毒复制特点, 结果表明: 1) 拮抗细菌 B6 发酵产生的活性蛋白对 CMV 的体外钝化作用为 86.97%; 2) 电镜下观察到活性蛋白能使 CMV 粒体变形, 从而降低侵染力; 3) 寄主体内的病毒复制作用受到了拮抗活性物质的抑制, 并且随着拮抗活性物质浓度的增加病毒的复制作用减弱。

关键词: 拮抗蛋白; 病毒粒子; 抑制作用

doi:10.3969/j.issn.1004-5708.2010.04.018

中图分类号: TS414

文献标识码: A

文章编号: 1004-5708(2010)04-0089-03

Effects of inhibitor protein from CMV antagonistic bacteria on CMV particles

WANG Fang¹, WANG Feng-long², SHEN Li-li², QIAN Yu-mei², YANG Jin-guang², LIU Xiao-xia¹

1. Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101, China;

2. Graduate School of CAAS, Beijing 100081, China

Abstract: Bacteria strain B6 which has strong antagonist activity to Cucumber Mosaic Virus (CMV) was isolated from diseased tobacco to study effects of inhibitor protein from CMV antagonistic bacteria on CMV particles. Results showed that the active material was protein with relative molecular mass of subunit of 40.6kD through cation exchange chromatography and molecular sieve chromatography. The inhibition rate of active material was detected after being treated by the antagonistic protein, Results also showed that inhibitors from zymosis fluid of B6 had passivation effects of 86.97% on CMV. Samples mixed with the inhibitors were found to destroy regular configuration of virus particles under electron microscope and the combination was non-reversible.

Key words: antagonistic protein; virus particles; inhabitation effect

CMV 是雀麦花叶病毒科 (*Bromoviridae*), 黄瓜花叶病毒属 (*Cucumovirus*) 的典型成员。它是种正单链 RNA 病毒, ssRNA 占 18%, 蛋白质占 82%。侵染 85 科, 365 属 1000 多种单、双子叶植物^[1], CMV 引起的植物病毒病是一种在世界范围内传播的病害^[2]。由 CMV 引起的烟草黄瓜花叶病毒病发生遍及各烟区, 危害严重, 使烟田减产, 造成大量经济损失。本试验从烟田耕作层

土样中分离到对 CMV 有拮抗作用的细菌菌株 B6, 其分泌的抗病毒蛋白经室内生测和作用方式的初步分析, 认为能有效地钝化 CMV 粒子, 与病毒粒子进行不可逆的结合, 抑制病毒复制, 对病毒侵染具有预防作用。本试验提取菌株 B6 发酵产生的活性蛋白与提纯的 CMV 病毒液混合, 进行透析电镜观察。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株: 2007 年 11 月由青岛即墨市烟田土样中筛选到对 CMV 有拮抗作用的菌株 B6。

供试枯斑寄主苋色藜 (*Chenopodium amaranticolor*),

作者简介: 王芳, 女, 硕士研究生, 研究方向为烟草病毒学, E-mail: wangfang1378@126.com

王凤龙(通讯作者), 男, 博士, 研究员, 研究方向为烟草病毒病, E-mail: wangfl64@sohu.com

收稿日期: 2008-12-01

青州烟草研究所病毒实验室保存的纯化 CMV 活体毒源三生-NN 烟 (*Nicotiana tabacum* var. SamsunNN)。

1.2 试验方法

1.2.1 黄瓜花叶病毒粗提液制备(二次聚乙二醇沉淀法)^[3]

67 g 病组织叶加 134 mL 抽提缓冲液(0.5 mol/L 柠檬酸缓冲液, pH6.5, 含 0.1% 巯基乙醇), 在组织捣碎机中捣碎, 尼龙纱过滤, 过滤液加 25% 氯仿, 振荡 15 min, 置 4℃ 冰箱内 1 h, 然后 5000 r/min 离心 20 min, 取上清液加入 8% 聚乙二醇(PEG6000), 3% 氯化钠, 搅拌至 PEG 完全溶化后, 置 4℃ 冰箱内 4 h 后, 8000 r/min 离心 30 min, 取沉淀, 用悬浮缓冲液(重蒸水)悬浮过夜, 然后 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 其沉淀用悬浮缓冲液再洗一遍, 两次上清液合并, 其总体积为原体积的 1/10. 此上清液再加入 8% PEG, 3% 氯化钠沉淀 1 次, 其沉淀再用少量悬浮缓冲液溶解, 过夜, 然后 8000 r/min 离心 10 min, 其上清液即为二次 PEG 沉淀的粗提病毒制剂。

1.2.2 拮抗细菌活性蛋白制备(硫酸铵沉淀法)及体外钝化作用测定

拮抗细菌 B6 经 NB 培养基发酵培养 3 d, 离心, 细菌过滤器(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 60.3 g 硫酸铵, 缓慢搅拌, 4℃ 静止过夜, 8000 r/min, 4℃ 离心 15 min, 沉淀用 0.02 mol/L Tris-Hcl 缓冲液溶解, 溶解后的液体和上清用 0.02 mol/L Tris-Hcl 缓冲液透析 48 h 得蛋白粗提液和去蛋白上清液。分别与 CMV 汁液混合 15 min 后, 半叶法接种苜蓿^[4-5], 检测活性。将蛋白粗提液和蛋白上清液分别在 220 nm ~ 340 nm 进行紫外吸收扫描。

1.2.3 粗提蛋白质的离子交换层析和凝胶过滤层析

粗提蛋白质初步分离纯化, 方法见文献[6]。

1.2.4 抗病毒物质分子质量的测定

SDS-PAGE 采用 12% 的分离胶, 起始电压 80 V, 待溴酚蓝进入分离胶以后, 电压升为 100 V. 以标准分子质量蛋白为参照, 将制备好的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分析, 测定其分子质量。

1.2.5 电镜样品制备(负染法)^[7-9]及病毒粒体形态观察

取 1 mL CMV 病毒提纯液与等量的活性蛋白混合, 以与等量无菌水混合为对照, 在室温下(25℃)放置 20 min 后, 用带膜样品载网膜面向下吸附 1 ~ 3 min, 取出用滤纸吸干, 用镊子移到磷钨酸(2%, pH6.7)中, 染色 1 ~ 2 min, 取出用滤纸吸干染液, 放在垫有滤纸的平皿中, 干燥后在 JEM-100CX 透射电镜下, 观察病毒粒

体形态。

1.2.6 确定活性物质处理后寄主体内病毒复制特点

叶圆片法^[10]: CMV 接种在系统寄主 NC89 上 6 h 后, 取直径为 15 mm 的圆片叶, 分别在蒸馏水、不同浓度粗提蛋白液中漂浮, 48 h 后, 研磨、离心, 半叶法检测病毒含量。

2 结果与分析

2.1 活性蛋白对 CMV 的体外钝化作用测定

表 1 去蛋白上清液、蛋白粗提液对 CMV 活性检测(单叶平均枯斑数)

处理	蛋白粗提液		去蛋白上清液	
重复 1	119	19	67	59
重复 2	67	8	118	98
重复 3	74	7	87	89
平均	86.7	11.3	90.7	82.0
防效	86.97%		9.59%	

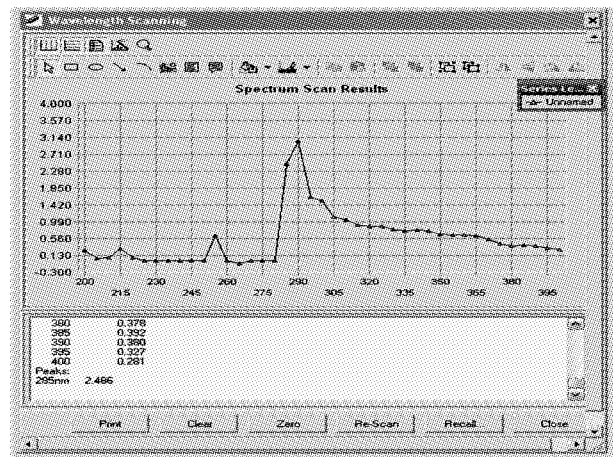


图 1 粗提蛋白在 220 nm ~ 340 nm 扫描结果

结果见表 1, 粗提蛋白液对 CMV 的体外钝化作用为 86.97%, 而去蛋白上清液对 CMV 钝化作用微弱, 仅有 9.59%, 说明活性物质的主要成分为蛋白类物质。为了进一步证实活性物质为蛋白类物质, 将活性物质进行紫外扫描, 由图 1 可知, 在 280 nm 处有最大吸收峰。

2.2 活性蛋白对 CMV 粒体形态的影响

通过 JEM-100CX 电镜观察 CMV 的粒体形态: CMV 与无菌水混合的图片(图 2), CMV 粒体近球形, 圆润。而 CMV 与无菌活性蛋白混合的图片(图 3), CMV 粒体壁周围模糊, 有变形的趋势。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, 导致病毒粒体变形。

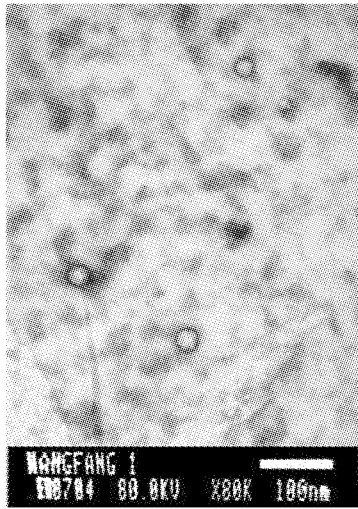


图2 CMV + 无菌水处理

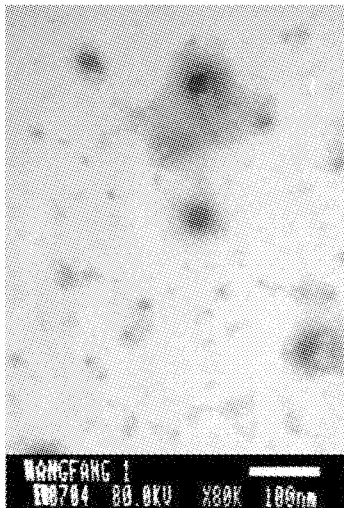


图3 CMV + 活性蛋白处理

表2 单叶平均枯斑数法检测拮抗物质对CMV 体内复制影响

	粗提液	0.5 倍粗提液	0.25 倍粗提液	悬浮在蒸馏水
重复 1	2.7	11.0	6.0	90.3
重复 2	1.3	2.0	4.3	8.6
重复 3	1.3	3.0	8.3	33.3
平均	1.8	5.3	6.2	44.0
防效	95.9%	87.9%	85.9%	—

2.3 病毒在寄主体内复制特性

如表 2 所示: 将经过粗提液和蒸馏水浸泡的叶片分别研磨接种, 发现粗提液的叶片接种后枯斑数降低 95.9%, 并且 1 倍浓度的粗提液、0.5 倍粗提液和 0.25 倍粗提液防效分别为 95.9%、87.9% 和 85.9%, 说明寄主体内的病毒复制作用受到了拮抗活性物质的抑制, 并且复制作用的大小与粗提液的浓度呈正相关。

3 结论与讨论

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坏死反应和诱导植物产生系统抗性。1997 年刘学端等^[11]报道利用商陆 (*Radix phytolaccae*), 甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*), 连翘等几种中草药自制复配的 MH11-4 可湿性粉剂对 TMV 和 CMV 有较强体外钝化作用, 其对 TMV 的钝化效果比植病灵和 NS83 分别高出 57.7% 和 16.13%, 对 CMV 的钝化效果比植病灵和 NS83 分别高出 63.7% 和 25.03%, 其在烟株体内对病毒增殖抑制效果为 65.7%。在病毒形成过程中, MH11-4 具有延缓和抑制病毒扩增的作用。

本试验筛选出对 CMV 有拮抗作用的菌株 B6, 其分泌的抗病毒蛋白对 CMV 粒子有体外钝化作用, 运用离子交换层析和凝胶过滤层析及 SDS-PAGE 等技术分离纯化活性物质, 得到活性蛋白, 其分子量为 40.6kD。研究表明: 活性蛋白对 CMV 抑制率强, 达 86.97%; 电镜观察, 抗病毒蛋白作用后 CMV 粒子周围边际模糊, 且球形粒子有变形; 叶圆片法检测表明, 寄主体内的病毒复制作用受到了拮抗活性物质的抑制, 并且复制作用的大小与活性物质的浓度呈正相关。但有关菌株及其分泌抗病毒蛋白的特性及其与 CMV 在烟株体内的作用机制, 仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Palukaitis P, Rooinck M J, Dietzgen R G, et al. Cucumber Mosaic Virus[J]. *Adv Virus Res*, 1992, 41: 281-348.
- [2] Chen Z L, Gu H Y, Li Y, et al. Safety assessment for genetically modified sweet pepper and tomato[J]. *Toxicology*, 2003, 188: 297-307.
- [3] 胡伟贞, 由雪娟, 张作芳, 等. 用聚乙二醇沉淀法粗提纯植物病毒[J]. *植物检疫*, 1989, 3(3): 173-176.
- [4] 吴元华, 朱春玉, 王春梅, 等. 嘧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] 军事医学科学院基础医学研究所. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 车海彦, 吴云锋, 杨英. 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.
- [11] 刘学端, 肖启明. 植物源农药防治烟草花叶病机理初探[J]. *中国生物防治*, 1997, 13(3): 128-131.