

一种食用菌提取物 y3 对烟草花叶病毒的钝化作用及其机制*

吴丽萍, 吴祖建, 林奇英**, 谢联辉

(福建农林大学植物病毒研究所, 福建福州 350002)

Study on inactivation of *Tobacco mosaic virus* by y3 fromMushroom (*Coprinus comatus*)

WU Li-ping, WU Zu-jian, LIN Qi-ying **, XIE Lian-hui

(Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: A antiviral protein y3, from mushroom *Coprinus comatus*, could inactivate *Tobacco mosaic virus* (TMV) *in vitro*. The inhibition rate against is 50.0% when the concentration of y3 is 2.0 μ g/mL. When RNase was added to the mixture of TMV and y3, the infection rate of TMV was 61.74%, decreased by 38.26% in contrast with the control. It was also shown that y3 can break TMV particles when observed under electron microscope.

Key words: *Tobacco mosaic virus*; Inactivation

摘要: 测定了从食用菌毛头鬼伞 (*Coprinus comatus*) 中提纯的 y3 蛋白对烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 的钝化作用, 结果表明 y3 对 TMV 有较强的体外钝化作用, 在心叶烟枯斑寄主上对 TMV 的抑制中浓度约为 2.0 μ g/mL; y3 在 pH9.0 时较稳定; TMV 与 y3 混合后用 RNase 处理, 测得侵染率为 61.74%, 比未用 RNase 处理的对照降低了 38.26%, 说明 y3 具有一定的体外脱衣壳作用; 另外电镜观察发现 y3 可使部分 TMV 粒体发生裂解, 变短。

关键词: 烟草花叶病毒; 钝化

中图分类号: S436.341

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)01-0054-04

植物病毒病害给农作物生产带来严重的经济损失, 据估计全世界每年仅由烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 造成的损失就达一亿美元以上。由于病毒在植物细胞中专性寄生, 其复制所需的物质、能量和场所完全依赖寄主, 且植物没有完整的免疫代谢系统, 使得植物病毒病的防治尤为困难, 至今尚无完全有效的化学治疗药剂^[1,2]。研究表明, 许多健康植物和微生物的提取物或代谢物质能在一定程度上抑制植物病毒的侵染和复制^[3], 这些天然的抗植物病毒物质具有无污染、无药害等优点, 在生产实践中的潜力非常巨大。本实验室从食用菌毛头鬼伞中提取到活性物质 y3, 实验证明 y3 具有抗肿瘤, 凝集素等活性。在此基础上, 初步探讨 y3 对 TMV 的钝化作

用机理, 为其应用于生产提供可靠的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

烟草花叶病毒 (TMV) 保存于本实验室, 检测抗 TMV 活性所用枯斑寄主为心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*), 系统侵染寄主为普通烟 (*Nicotiana tobacum*) K₃₂₆ 品种。y3 蛋白为本实验室从毛头鬼伞菌提取。

1.2 TMV 的提纯

按 Gooding 方法^[4]提纯, 略加修改。经 200-300nm 紫外扫描确定其纯度及浓度。

1.3 y3 蛋白对 TMV 侵染抑制率测定

采用半叶法, 分别用 0.01mol/LPBSpH7.2 液及

收稿日期: 2003-07-11, 修回日期: 2003-10-08

* 基金项目: 教育部骨干教师资助项目 (2000-65)、福建科委重点项目 (98-2-178, 99-2-193)

作者简介: 吴丽萍 (1975-), 女, 江西籍, 博士研究生, 研究方向为植物病毒学。

** 通讯作者: 林奇英 (1936-), 女, 福建籍, 博士生导师, 研究方向为植物病毒学。

Corresponding author. Tel: 3769714, E-mail: linqiying@126.com

等体积的 y3 蛋白溶液稀释病毒液, 使其最终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 稀释液等量接种在枯斑寄主的左、右半叶上, 每个样品接种 5-6 片叶。待出现明显枯斑后, 及时记录枯斑数, 取平均值, 实验重复 3 次, 按下公式计算抑制率:

抑制率(%)=[1-(处理的枯斑数/对照的枯斑数)] \times 100

1.4 y3 抑制 TMV 侵染的温度稳定性测定

取 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y3 蛋白溶液数份, 分别在不同温度的水中处理 10min, 迅速冷却至室温; 然后加入 TMV, 按照方法 1.3 (以清水为对照) 接种心叶烟, 计算抑制率。

1.5 y3 抑制 TMV 侵染的酸碱稳定性测定

取等量 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y3 蛋白溶液数份于透析袋中, 分别放入用 HCl, NaOH 溶液调的不同 pH 的蒸馏水中, 平衡 4h 后用蒸馏水透析 12h, 期间换水 3 次。加入 TMV, 按照方法 1.3 (以清水为对照) 接种心叶烟, 计算抑制率。

1.6 TMV 病毒粒体电镜观察

提纯的 TMV 粒体溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)加入纯化的 y3 蛋白, 采用负染法^[5]进行 TMV 粒体电镜观察。TMV 病毒和 y3 蛋白的混合液中加入特异性的抗体进行免疫胶体金标记负染^[6]。

1.7 ELISA 检测 y3 蛋白对 TMV 外壳蛋白的裂解作用

TMV 粒体 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 y3 蛋白的混合液作为抗原, 一抗为 TMV 抗血清。采用间接 ELISA 法。^[7,8]

1.8 y3 对 TMV 的体外脱衣壳作用^[7,8]

0.5mL 的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TMV 精提液中加入 500 μL 的 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y3, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 30min; 加入 1 μL 的 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase(以不加入 RNase 为对照), 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 10min, 半叶法接种于心叶烟, 每个处理 12 张叶片, 重复 3 次, 4d 后调查枯斑数并计算枯斑抑制率。

2 结果与分析

2.1 y3 蛋白抑制 TMV 侵染检测结果

采用不同浓度 y3 蛋白检测其抑制 TMV 侵染作用, 从表 1 中可以看出 y3 蛋白对 TMV 的抑制作用强弱与蛋白浓度呈相关性, 中浓度约为 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 不同浓度 y3 蛋白对 TMV 的体外抑制效果

Concent-ration($\mu\text{g}/\text{mL}$)	25	12.5	6.25	3.125	1.563	0.781
Inhibition rate(%)	100	83.0	79.6	73.7	42.7	38.7

2.2 不同温度下处理的 y3 蛋白对 TMV 的抑制效果

经不同温度处理的结果表明 y3 蛋白能耐高温, 温度高达 80 $^{\circ}\text{C}$ 时对 TMV 的抑制率依然很高(表 2)。这可能与此蛋白的特性有关。y3 蛋白含糖量丰富, 可能在一定程度上保护蛋白质活性中心。

表 2 不同温度下处理的 y3 蛋白对 TMV 的抑制效果

Temperature($^{\circ}\text{C}$)	40	50	60	70	80	90	98
Inhibition rate(%)	96.25	92.53	93.25	87.32	92.33	70.51	60.27

2.3 不同 pH 下处理的 y3 蛋白对 TMV 的抑制效果

y3 蛋白在中性偏碱条件较稳定, 最适 pH 9 左右, pH 4 以下则对 TMV 不再有抑制作用(表 3)。这可能与蛋白的等电点有关。由于 y3 为碱性蛋白, 强酸环境可能会破坏其活性中心。

表 3 不同 pH 下处理的 y3 蛋白对 TMV 的抑制效果

pH	4	5	6	7	8	9	10	11
Inhibition rate(%)	0	54.37	66.11	74.5	77.8	100	88.4	75.0

2.4 y3 蛋白对 TMV 形态的影响

提纯的 TMV 经负染后电镜观察, 视野中很容易见到典型 TMV 粒体形态, 且病毒粒体数量较多, 无降解现象(图 1-B)。当 y3 蛋白与 TMV 孵育以后电镜观察, 则视野中所见病毒粒体数量大大减少, 且病毒粒体长度也有所缩短, 表明病毒粒体已经受到破坏(如图 1-A)。

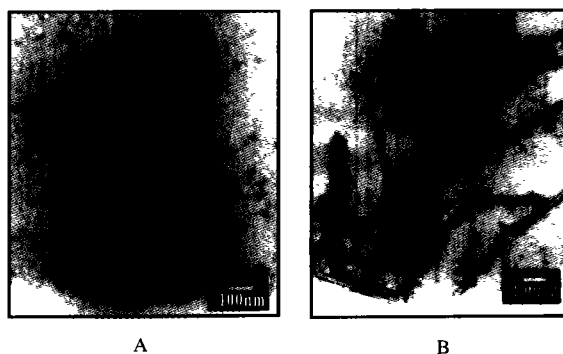


图 1 y3 蛋白处理的烟草花叶病毒粒体电镜图

Fig.1 The images of electron microscope of TMV virion incubated with y3

A, TMV virion incubated with y3 protein; B, TMV virion as control.

TMV 与 y3 蛋白一起孵育后, 以 TMV 抗血清为第一抗体加入免疫胶体金进行电镜观察, 视野中

很少看见 TMV 粒体的完整结构, 多为游离的胶体金 (图 2A), 而对照病毒溶液中没有加 y3 蛋白以 TMV 抗血清为第一抗体加入免疫胶体金进行电镜观察可见 TMV 粒体完整, 胶体金吸附在病毒外壳上 (图 2B)。这进一步表明病毒粒体已经受到破坏。

2.5 ELISA 检测结果

以不同浓度的 y3 蛋白溶液与相同浓度 TMV 混合后加入 96 孔板中, 以提纯的 TMV 为阳性对照, y3 蛋白液为阴性对照, 空白对照为相同体积的包被缓冲液。重复 3 次。表 4 结果表明不同浓度下蛋白能对 TMV 造成不同程度的破坏。

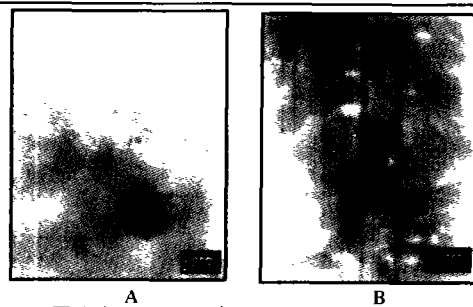


图 2 y3 蛋白与 TMV 孵育以后的胶体金染色电镜图
Fig.2 The electron micrograph of TMV stained with colloidal gold after incubated with y3

A, TMV viron incubated with y3 protein; B, TMV viron as control. The first antibody is anti-TMV.

表 4 不同浓度 y3 蛋白破坏 TMV 粒体的 ELISA 测定结果

Table. 4 The results of y3 breaking TMV particles determined by ELISA

y3(μg/mL)	y3 (μg/mL)+TMV protein and TMV							TMV	Blank
	25	12.5	6.25	3.125	1.563	0.781			
1	0.086	0.142	0.16	0.154	0.159	0.206	0.433	0.871	0.004
2	0.081	0.142	0.143	0.147	0.163	0.217	0.244	0.817	0.006
3	0.09	0.141	0.15	0.145	0.166	0.187	0.338	0.714	0.006

2.6 y3 对 TMV 的体外脱衣壳作用

TMV 与 y3 混合后经 RNase 处理,用枯斑半叶法接种,结果见表 5。RNase 可以消化从 TMV 衣壳蛋白中脱离出的核酸,而对 TMV 粒子没有直接的

作用^[8]。由表 5 可知, RNase 处理后 TMV 的侵染率为 61.74%, 枯斑抑制率为 38.26%, 表明 y3 对 TMV 有一定的体外脱衣壳作用。

表 5 TMV 与 y3 混合后经 RNase 处理的 TMV 侵染率

Table.5 The infectious rate of TMV after RNase in condition of the mixture of TMV and y3

Treatment	Numbers of necrotic local lesions				Infection rate(%)	Inhibition rate(%)
	1	2	3	Average		
TMV+y3+RNase	35	45	41	40.33	61.74	38.26
CK(TMV+y3)	59	69	68	65.33		

3 讨论

随着实验手段的日臻完善, 许多天然抑制剂的有效成分得到分离纯化, 这些抑制剂对靠机械传播的病毒特别有效。从现有的研究结果看, 高等植物中, 抑制病毒的有效成分属于碱性蛋白或蛋白类似物, 诸如多肽、酶等。这些蛋白或多肽对其所来源的植物或近缘植物上的病毒没有抑制作用。这似乎表明这些物质所表现出的抑制作用依赖于不同的寄主, 而非病毒本身。本文所提取的抗 TMV 有效成分 y3 也是一碱性蛋白, 分子量约为 12.0kD。而由于 y3 来源于低等的真核生物, 它与高等植物的近缘关系较远, 这有可能可以克服其他类似抗病毒抑制物的具有寄主选择性这一缺陷。目前从食用菌中提取的抗植物病毒蛋白种类不多, 研究较为深入的有从香

菇(*Lentinus edodes*)、杨树菇 (*Agrocybe aegerita*)、金针菇 (*Flammulina velutipes*)、榆黄蘑 (*Pleurotus citrinopileatus*) 等食用菌中纯化的蛋白 FBP、AAVP、Zb 及 YP46-46, 但是均侧重对此类蛋白生化特性的研究, 对植物病毒 (如 TMV) 的抑制仅进行了初测, 很少涉及到机理, 且未有后续报导^[9-12]。

本试验初步明确了 y3 对 TMV 具有显著的体外钝化作用, 当 y3 浓度为 2.0μg/mL 时经钝化后的 TMV 侵染率降低为 50%。这一作用强弱与蛋白浓度呈相关性, 在中性偏碱环境下蛋白较为稳定, 而土壤环境略偏酸性, 对其抗 TMV 活性可能会有一定影响, y3 经 80℃ 处理后对 TMV 仍具有 73.25% 的抑制率, 这可能与此蛋白含糖量较高 (另有文章发表), 能在一定程度上保护蛋白结构有关。通过电镜观察发现 y3 可使 TMV 粒体发生裂解现象, 使

之失去侵染活力, 而经 RNase 处理的结果证明 y3 对 TMV 具有体外脱衣壳作用, ELISA 检测结果进一步表明 y3 蛋白对 TMV 具有破坏作用。由此推测, y3 通过对 TMV 体外钝化而降低病毒侵染率可能是由于 y3 阻断了病毒衣壳蛋白亚基之间的作用力, 使病毒颗粒衣壳蛋白结构松散, 导致病毒颗粒的裂解, 不完整的病毒粒子侵染率较低; y3 蛋白与衣壳蛋白结合, 使病毒核酸暴露于寄主组织后受寄主体内 RNase 的消化, 从而降低了病毒的侵染率。至于 y3 蛋白能否作为一种酶消化降解 TMV 的外壳蛋白, 则需要通过其他分子生物学手段如 SDS-PAGE, 酵母双杂交系统等进一步确定。y3 可能对植物病毒的初侵染具有抑制作用。本试验在寄主体外测定了 y3 对 TMV 的钝化作用, 如果试验模拟能准确反应 y3 对 TMV 的体内钝化作用, 将更有实际意义。

参考文献

- [1] 江山, 韩熹莱. 植物病毒病化学防治的研究进展[J]. 中国病毒学, 1995, 10(1): 1-7.
- [2] 安德荣. 植物病毒病化学防治的研究现状和所面临的问题[J]. 生命科学, 1994, 6(2): 15-18.
- [3] 刘学端, 张碧峰. 抗植物病毒剂的研究和应用[J]. 国外农学——植物保护, 1994, 7(3-4): 8-11.
- [4] Gooding G V jr, Hebert T T. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities[J]. Phytopathology, 1967, 57(11): 1285.
- [5] 田波, 裴美云. 植物病毒研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1987, 201-203.
- [6] Muller G, Baigent C L. Antigen controlled immuno diagnosis- 'ACID test'[J]. J Immunol Methods, 1980, 37(2): 185-90.
- [7] FRENCH C J. Flovonoid inhibit infectivity of Tobacco Mosaic Virus[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1991, 13(1): 1-6.
- [8] 李红霞, 康绍兰, 李兴红, 等. 植物源抗病毒制剂 VA 对烟草花叶病毒(TMV)体外钝化作用的初步研究[J]. 河北农业大学学报, 2000, 23(4): 67-70.
- [9] Kobayashi N, Hiramastu A, Akatuka T. Purification and chemical properties of an inhibitor of plant virus infection from fruiting bodies of *Lentinula edodes*[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, 51(3): 883-890.
- [10] 孙慧, 吴祖建, 谢联辉, 等. 杨树菇 (*Agrocybe aegerita*) 中一种抑制 TMV 侵染的蛋白质纯化及部分特性[J]. 生物化学与生物物理学报, 2001, 33(3): 351-354.
- [11] 付鸣佳, 吴祖建, 林奇英, 等. 金针菇中一种抗病毒蛋白的纯化及其抗烟草花叶病毒特性[J]. 福建农林大学学报, 2003, 32(1): 84-88.
- [12] 付鸣佳, 吴祖建, 林奇英, 等. 榆黄蘑中一种抗病毒蛋白的纯化及其抗 TMV 和 HBV 的活性[J]. 中国病毒学, 2002, 17(4): 350-353.