

膜蛋白和糖蛋白免疫原对植物 青枯菌血清分型比较

刘琼光 曾宪铭 董 春 肖火根

(华南农业大学资源环境学院 广州, 510642)

摘要 以青枯假单胞菌膜蛋白和糖蛋白为免疫原对植物青枯菌的血清分型进行了比较研究。4 个菌株的膜蛋白抗血清和相应的 4 个糖蛋白抗血清的琼脂双扩散试验, 在近抗原孔处, 同源菌株均产生 1 条或 2 条清晰的沉淀带。膜蛋白和糖蛋白具有相似的特异性和种下区分作用, 其血清分型结果完全一致。

关键词 膜蛋白; 糖蛋白; 免疫原; 青枯假单胞菌; 血清型

中图分类号 S 432. 22

由青枯假单胞(*Pseudomonas solanacearum*)引起的植物青枯病是一类世界性的毁灭性病害, 寄主种类多、分布范围广。青枯菌是一个复杂群体, 关于它的种下分类, 许东等(1986)认为应以血清型作为主要依据, 但有关青枯菌血清分型研究较少。Schaad 等(1978)用青枯菌膜蛋白为免疫原将巴西 6 种作物 19 个青枯菌株分为 5 个血清型; 许东等(1986)用桑青枯菌的糖蛋白制备的抗血清将广东 5 种作物的 24 个青枯菌株分为 8 个血清型, 两者研究所用的免疫原不同, 分类标准也不一样。膜蛋白具有亚种水平特异免疫原已在其它植物病原细菌的研究中有报道(Schaad et al, 1978; Yakus et al, 1979; Thaveechai et al, 1986; Azad et al, 1988)。糖蛋白也具有特异性抗原(许东等, 1986)。本文对究竟哪一种免疫原对青枯菌的血清分型研究更为理想进行了研究。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株来自烟草 *Nicotiana tabavum* L., 番茄 *Lycopersicon esculentum* Mill, 马铃薯 *Solanum tuberosum* L., 桑 *Morus alba* L., 辣椒 *Capsicum frutescens* L., 甘薯 *Ipomoea batatas* Lam, 花生 *Arachis hypogaea* L, 生姜 *Zingiber officinale* Roso, 茄子 *Solanum melongena* L., 广霍香 *Pogostemon cablin* Bence, 金光菊 *Rudbeckia laciniata* L., 排草 *Lysimachia capillipes* Hems, 木棉 *Bombax maliabaricum* De., 木麻黄 *Casuarina equisetifolia* L. 等 14 种植物 200 个青枯菌株。菌株均由华南农业大学植物细菌研究室提供。

参加试验的还有 5 个常见细菌属的代表菌株: 根癌野杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*、胡萝卜软腐 欧氏菌软腐亚种 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*、密执安棒杆菌环腐亚种 *Clavibacteri michiganensis* subsp. *sepedonicus*、野油菜黄单胞菌野油菜致病变种 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 和丁香假单胞菌黍致病变种 *Pseudomonas syringae* pv. *panici*。

1996-04-07 收稿 刘琼光 男, 31 岁, 讲师, 硕士

1.2 免疫原提取

选用代表不同生化型的4个菌株:烟草菌株(Tb32,生化型III)、番茄菌株(Tm58,生化型IV)、马铃薯菌株(Po4,生化型II)、桑菌株(M8,生化型II-2)分别在含有2,3,5-三苯基四唑化氯(TZC)的培养基上划线复活,挑取毒性菌落扩大培养。

1.2.1 膜蛋白提取 供试菌株在523培养液中28~30℃振荡培养48 h后,按Frash等(1974)方法提取膜蛋白,程序如下:菌悬液 1×10^4 g (4℃,下同)离心5 min,取沉淀每10 g湿重菌体加200 mL 0.2 mol/L LiCl溶液,于45℃恒温处理2 h后,经12 000 g离心20 min,上清液用 3×10^4 g离心40 min,弃沉淀,取上清液经 1×10^5 g离心2 h,沉淀即为膜蛋白粗提液。

1.2.2 糖蛋白提取 供试菌株在无TZC的基础培养基上28~30℃培养48 h,然后用灭菌生理盐水制成菌悬液,按稍作修改的Digat等(1976)所述方法提取糖蛋白,程序如下:菌悬液经XW-80型漩涡混合器剧烈振荡30 min后,6 000 g离心30 min,取上清液并加入等量饱和硫酸铵溶液,4℃静置过夜,再经8 000 g离心30 min,取沉淀加少量生理盐水溶解,4℃下透析即为糖蛋白粗提液。

1.3 抗血清制备

以Tb32, Tm58, Po4, M8的膜蛋白和糖蛋白为免疫原,分别免疫重2~2.5 kg的新西兰白兔。蛋白抗原和福氏不完全佐剂等量混合,肌肉和皮下注射,免疫3次,每次间隔10 d,各次免疫的蛋白量分别为0.5、2、3 mg,最后一次免疫10 d采血,采用试管凝集试验测抗体效价。

1.4 血清反应

采用琼脂双扩散法,按常规进行。膜蛋白抗原用经0.2 mol/L LiCl溶液45℃处理2 h时的菌体,糖蛋白抗原直接用菌体,不作任何处理,5个常见植物细菌属的代表菌株同时参加试验,重复3次。

2 试验结果

2.1 抗血清及其效价

经免疫后得到膜蛋白和糖蛋白各4种抗血清,其中膜蛋白抗血清效价达1:3 200~6 400以上,糖蛋白的抗血清效价达1:3 200以上。

2.2 琼脂双扩散(ODD)试验

膜蛋白和糖蛋白共8种抗血清与相应的同源抗原之间至少产生2条沉淀带,近抗原孔带更清晰。根癌野杆菌、胡萝卜软腐欧氏菌软腐亚种、密执安棒杆菌环腐亚种、野油菜黄单胞菌野油菜致病变种等4个属的菌株与8种抗血清都不产生沉淀带,丁香假单胞菌黍致病变种在近抗原孔一端不产生沉淀带,只与Tm58和Po4的糖蛋白抗血清在近抗体孔一端产生模糊沉淀带。表明膜蛋白和糖蛋白具有种的特异性。

膜蛋白和糖蛋白抗血清与所有青枯菌株的ODD试验:8个抗血清与所有菌株反应,同源菌株在靠抗原孔处产生1条清晰的沉淀带,但M8抗血清(A_sM8,包括膜蛋白和糖蛋白,下同)则形成一细一粗2条紧邻的带,而异源菌株有的有这条带,且相连情况各异,有的菌株则不产生这条带;在此带之后(A_sM8含2条带)有另外一条为所有青枯菌株共有,除Po4与Tb32膜蛋白抗血清部分交叉外,其它均吻合相连。此外,抗血清于异源菌株反

应还产生 0~2 条清晰度不同的沉淀带, 相连情况也有差异。这一结果表明, 近抗原孔一端的那条清晰的沉淀带(AsM8 含 2 条带)具有种下特异性, 因此, 把它作为血清分型的依据, 根据该带的有无及交叉情况(见表 1), 将 200 个青枯菌株分为 8 个血清型(见图 1)。而且膜蛋白和糖蛋白血清分型结果相似。

表 1 不同血清型菌株与 8 个抗血清同源菌株的 ODD 反应沉淀带情况¹⁾

血清型	代表菌	膜 蛋 白 抗 血 清					糖 蛋 白 抗 血 清				
		Tb32	Tm58	Po4	M8		Tb32	Tm58	Po4	M8	
					细带	粗带				细带	粗带
I	Tb32	++	—	—	—	++	++	—	—	—	++
II	Tm58	+	++	++	—	+	+	++	++	—	+
III	Po4	—	++	++	—	±	—	++	++	—	±
IV	M8	++	—	—	++	++	++	—	—	++	++
V	Tb20	+	—	++	—	—	+	—	++	—	—
VI	Tm62	++	++	—	—	+	++	++	—	—	+
VII	M2	+	+	—	—	+	+	+	—	—	+
VIII	Pe1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

1)++——完全吻合;+——部分交叉;±——完全交叉;———无特异带

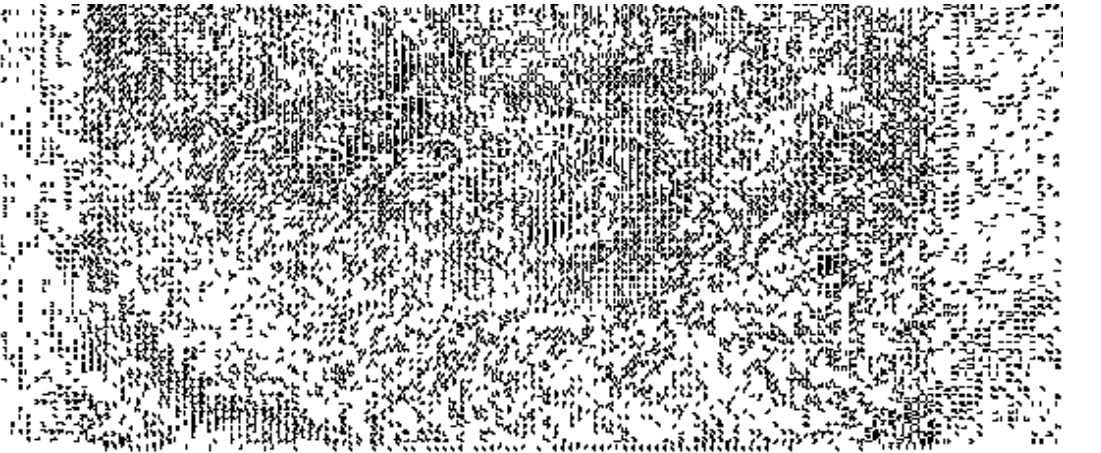


图 1 8 个血清型 ODD 反应的沉淀带

中央孔为抗血清: A, E) AsTb32; B, F) AsTm58; C, G) AsPo4; D, H) AsM8
外围孔为抗原: A: 1, 2, 4) Tb32, 3) Tm58, 5) M8, 6) Po4; E: 1, 4) Tb32, 2) M2, 3) Pe1, 5) Tm62, 6) Tb20; B: 1, 3, 4) Tm58, 2) Tb32, 5) M8, 6) Po4; F: 1, 4) Tm58, 2) M2, 3) Pe1, 5) Tm62, 6) Tb20; C: 1, 4, 6) Po4, 2) Tb32, 3) Tm58, 5) M8; G: 1, 4) Po4, 2) M2, 3) Pe1, 5) Tm62, 6) Tb20; D: 1, 4, 5) M8, 2) Tb32, 3) Tm58, 6) Po4; H: 1, 4) M8, 2) M2, 3) Pe1, 5) Tm62, 6) Tb20

3 讨论与结论

以膜蛋白和糖蛋白为免疫原制备的抗血清,根据琼脂双扩散(ODD)反应产生的特异带,都能将14种寄主植物的200个青枯菌株分为一致的血清型。Digat等(1976)报道用糖蛋白抗血清和经吸收的菌体抗血清研究了14个青枯菌株之间的特异抗原和共同抗原,但没有进行血清分型。许志刚等(1990)比较了水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)的戊二醛固定的热杀死细胞、膜蛋白、糖蛋白和粗制糖蛋白等几种免疫原相应的抗血清的血清反应,结果显示它们具有相似的特异性和型的区分作用。本研究分别以膜蛋白和糖蛋白为免疫原,对植物青枯菌进行血清分型研究的结果也表明,两者具有相似的特异性和种下区分作用,说明这两类蛋白都具有亚种和小种水平特异免疫原。因此,在进行青枯菌的血清学研究时,用糖蛋白为免疫原将是适宜的,因其提取方法与膜蛋白比较,简单快捷,操作方便,费用较低。

许东等(1986)提出青枯菌的种下分类以血清型更能反应它们之间的亲缘关系,本试验结果表明,膜蛋白和糖蛋白两类抗血清与所有青枯菌ODD反应,在近抗体孔处均产生吻合沉淀带,表明所有青枯菌都具有共同的抗原组分,同意许东等观点。但许东等(1986)用超声波破碎菌体的方法来提取糖蛋白,由此而得到的抗血清与同源菌株反应均产生4条沉淀带,而本试验用强烈振动菌体的方法来提取糖蛋白,抗血清与同源菌株反应,只产生2条沉淀带(AsM8 3条),说明超声波处理菌体可能将菌体细胞破坏而造成可溶性蛋白增多,抗原不纯,因此认为,用强烈振动比用超声波处理菌体的方法来提取糖蛋白更好。

膜蛋白位于细菌细胞外膜(Frasch et al, 1974),糖蛋白位于细胞壁外粘液层(Digat et al, 1976),两类蛋白都具有特异免疫原,表明青枯假单胞菌抗原成分复杂,它们是不是相同的特异抗原成分或具有相同的抗原决定簇,有待进一步研究。

本文比较了植物青枯菌膜蛋白和糖蛋白为免疫原的血清分型,为进一步研究青枯菌的特异抗原成分和分子遗传奠定了基础。

参 考 文 献

- 许东,赖文姜,范怀忠. 1986 桑青枯菌血清型与其他分型的比较. 植物病理学报, 16(1): 29~36
- 许志刚,曹景显,方中达. 1990 水稻白叶枯病菌的血清学研究. 植物病理学报, 20(3): 171~176
- Azad H, Schaad N W. 1988. Serological relationships among membrane proteins of strains of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. Phytopathology, 78: 272~277
- Digat B, Cambra M. 1976. Specificity of antigens *Pseudomonas solanacearum* and application of serology for studying bacterial wilt. See Ref, 26: 38~57
- Frasch C E, Gotschoich E C. 1974. An outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* group B responsible for serotype specificity. J Exp Med, 140: 87~104
- Schaad N W, Takatsu T, Dianese J C. 1978. Serological identification of strains of *Pseudomonas solanacearum* in Brazil. In: Anon, ed. Proc. 4th int. Conf. Plant Pathol. Bacterial Angers [s. n], 295~300
- Thaveechai N, Schaad N W. 1986. Serological and electrophoretic analysis of a membrane protein extract of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from Thailand. Phytopathology, 76: 139~147
- Yakus M, Schaad N W. 1979. Serological relationships among strains of *Erwinia chrysanthemi*. Phytopathology, 69: 517~522

COMPARATIVE STUDY ON SEROTYPE OF THE STRAINS OF *Pseudomonas solanacearum*

Liu Qionggang Zeng Xianming Dong Chun Xiao Huogeng

(College of Natural Resources & Environment, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

A comparative study on serotype of the strains of *Pseudomonas solanacearum* by using the immunogens of membrane protein and glycoprotein extracted from its strains was conducted. Four antisera were prepared to a kind of membrane protein and four corresponding antisera were done to a kind of glycoprotein respectively. It was found that one (or two) major bands of precipitin near the antigen well was consistently present when antigens of homologous strains were tested by Ouchterlong double diffusion(ODD). A same result in specificity serologically and serotyping the strains of *Pseudomonas solanacearum* was obtained with both membrane protein and glycoprotein.

Key word membrane protein; glycoprotein; *Pseudomonas solanacearum*; immunogen; serotype