

以酵母嗜杀系统为基础的抗病毒药物筛选模型的建立

潘 力, 黄耀威*, 叶燕锐, 王亚琴

(华南理工大学生物科学与工程学院 广州 510641)

摘 要 根据嗜杀酵母 T158c/S14a 中 L-A 病毒-1 移码效率改变影响 M1 病毒的存活, 导致 K1 毒素减少, 在低 pH 的美蓝平板上用杯碟法通过抑菌圈的大小检测酵母 K1 毒素的嗜杀活性, 建立了一个以酵母嗜杀系统为基础的抗病毒药物筛选模型。研究了杯碟法检测酵母毒素嗜杀活性的各种条件。对不同 pH 和温度下酵母的嗜杀活性进行了研究, 确定了模型用于筛选的最适 pH 范围为 4.3 ~ 4.7, 最适温度范围为 20 ~ 22°C。运用该模型研究了几种中药对嗜杀活性的抑制作用, 发现了金银花和升麻具有一定的抗病毒作用。该模型为抗病毒药物的高通量初筛奠定了基础。

关键词: 抗病毒药物; 嗜杀酵母; 筛选模型; 嗜杀作用

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)03-0517-05

病毒引起的疾病感染传播迅速, 难以控制。目前对病毒的防治主要是研制抗病毒疫苗和抗病毒药物。抗病毒药物主要是针对病毒特异性的核酸或蛋白质, 如核苷酸类似物或蛋白酶抑制剂, 但病毒进化后会迅速产生耐药性。目前针对宿主细胞翻译系统的抗病毒药物很少。

双链 RNA 病毒及单链 (+)RNA 病毒, 如免疫缺陷病毒(HIV)、人和动物的冠状病毒等能使延伸中的核糖体发生一定频率的程序性-1 移码事件^[1-5]。移码事件的效率决定了病毒结构蛋白与 RNA 聚合酶蛋白的比例, 从而决定病毒粒子的正常装配^[6-9]。一旦移码效率改变, 就会严重抑制病毒颗粒的正常装配, 使病毒不能繁殖^[8]。酿酒酵母的病毒嗜杀系统包括嗜杀酵母、L-A 病毒和 M 卫星病毒^[7, 10-13]。L-A 病毒是基因组外可自主复制的双链 RNA 病毒, 它在宿主中并不产生可观察的表型, 其正链 RNA 有两个部分重叠的开放阅读框, 只有在翻译过程中发生-1 移码, 才能表达出病毒的结构蛋白与 RNA 聚合酶的融合蛋白, 指导 L-A 病毒本身以及 M 卫星病毒的复制^[14]。M 卫星病毒表达毒素蛋白, 分泌到胞外, 实现对敏感酵母的嗜杀作用。程序性-1 核糖体移码效率发生很小变化, 都会严重影响 M 卫星病毒颗粒的正常装配, 使 M 病毒颗粒数量减少, 毒素的表达量降低, 从而导致对敏感酵母的嗜杀能力下降^[8, 15]。

目前在高等真核生物基因中仅发现哺乳动物 Edr 基因在翻译其 C 端时有-1 移码现象^[16], 因此可将程序性-1 核糖体移码作为抗病毒药物的靶位^[17, 18]。本文以酵母的病毒嗜杀系统为基础, 利用嗜杀酿酒酵母中 L-A 病毒-1 移码效率的改变, 对分泌的毒素杀死敏感酵母表型影响, 建立一个简单有效的高通量抗病毒药物初筛模型, 并对目前 19 种具有抗病毒活性的中药进行了初筛, 初步确定其中升麻、金银花提取物具有抑制嗜杀酵母的嗜杀作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 嗜杀酵母 T158c/S14a(ATCC 46427) 敏感酵母 S6 均为酿酒酵母, 由美国的 Bussey 教授(Maryland University)惠赠。T158c/S14a 含有 M1 病毒, 能够分泌毒素蛋白 K1, S6 对 K1 敏感。

1.1.2 培养基: YPD 培养基: 葡萄糖 2%, 蛋白胨 2%, 酵母粉 1%, YPD 固体培养基加入 2% 琼脂粉。酵母嗜杀表型检测用 YPD 低 pH 美蓝平板^[8, 19]。

1.1.3 试剂和药品: 牛津杯(外径 8 ± 0.1mm, 内径 6 ± 0.1mm, 高 10 ± 0.1mm)购自广东环凯微生物科技有限公司。天花粉、夏枯草、金银花、板蓝根、鱼腥草、甘草、升麻、苏叶、柴胡、淫羊藿、黄精、白扁豆、丹皮、荆芥、苦参、黄勺、黄岑、五味子、青蒿, 19 种中

基金项目: 广东省自然科学基金项目(04020061)

* 通讯作者。Tel: 86-20-87114220; Fax: 86-20-87113441; E-mail: huangyaowei2000@sohu.com

作者简介: 潘 力(1967 -)男, 副教授, 贵州省贵阳市人, 主要从事工业微生物和医药微生物方面的研究。E-mail: btlipan@scut.edu.cn

收稿日期: 2006-10-11; 接受日期: 2007-11-21; 修回日期: 2007-02-28

药,全部购自广州市健民药店。

1.2 酵母嗜杀表型的检测

采用杯碟法检测。敏感酵母 S6、嗜杀酵母 T158c/S14a 在 30℃ 下培养过夜;在 YPD 低 pH 美蓝平板上涂布 0.5mL 培养到对数生长期的敏感酵母 S6(细胞浓度约 1×10^8 cfu/mL),静置 30min 后放置牛津杯;每个牛津杯中加入嗜杀酵母 0.1mL,培养 2d 后测量抑菌圈大小。

1.3 中药的提取

采用索氏提取法对中药进行提取。称取中药 5g 置于索氏提取器中,在索氏烧瓶中加入 50mL 超纯水,煮沸循环提取 4h,提取液用超纯水将定容至 50mL 4℃ 保存备用。

1.4 检测中药对嗜杀作用的影响

T158c/S14a 培养培养过夜,接种至 10mL YPD 液体培养基中,并分别加入待测药物 500 μ L,以不经药物处理的 T158c/S14a 作为阴性对照。在 30℃ 下培养 2d 后用杯碟法检测药物对嗜杀活性抑制的效果,根据产生抑菌圈大小来反映分泌的 K1 毒素的量,通过与阴性对照实验的比较,可以对影响 L-A 病毒-1 移码效率的抗病毒药物进行筛选。

2 结果

2.1 程序性-1 核糖体移码机制筛选模型的建立

2.1.1 杯碟法检测酵母的嗜杀活性:采用杯碟法检测酵母嗜杀活性。如图 1-A 所示,被杀死敏感酵母 S6 在美蓝的染色下形成深蓝色的抑菌圈,这是由于 T158c/S14a 分泌出毒素蛋白 K1,并与敏感酵母细胞

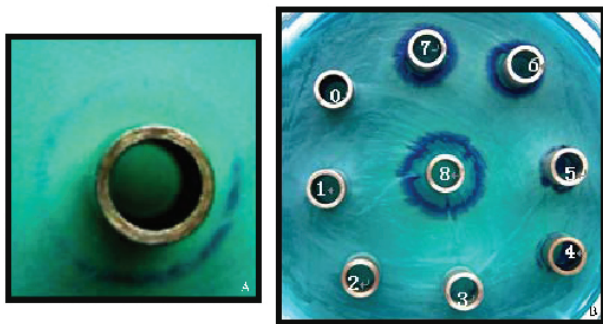


图 1 嗜杀酵母 T158c/S14a 对敏感酵母 S6 的嗜杀作用 (A) 和不同浓度下的嗜杀酵母 T158c/S14a 对敏感酵母 S6 的嗜杀作用 (B)

Fig.1 (A) The killing effect of the killer yeast T158c/S14a on the sensitive yeast S6;(B) Killing effects of the killer yeast T158c/S14a on the sensitive yeast S6 under different concentrations. No. 1~8 were the concentrations of T158c/S14a from 1×10^1 to 1×10^8 cfu/mL; No.0 was negative control (YPD liquid medium).

质膜上受体结合并在细胞膜上形成离子通道,使敏感酵母细胞内的 K^+ 、 H^+ 和 ATP 等渗漏到胞外而死亡^[11,20]。不同浓度的 T158c/S14a 所形成的抑菌圈如图 1-B 所示,嗜杀酵母浓度在 1×10^8 cfu/mL 以上时,产生的抑菌圈直径明显比其他的大,浓度在 10^7 与 10^8 之间抑菌圈大小随加入的嗜杀酵母细胞数变化很大,浓度小于 10^5 几乎不产生抑菌圈。本研究用于筛选抗病毒药物的嗜杀酵母的浓度采用 1×10^8 cfu/mL。

2.1.2 酵母嗜杀作用最适 pH 的测定:参考文献的方法^[9],用 K_2HPO_4 和柠檬酸调节 pH 到 3.5、4.0、4.3、4.7、5.0、5.5 和 6.0 配制美蓝平板,杯碟法检测抑菌圈大小(图 2-A)。T158c/S14a 分泌的 K1 毒素在 pH 4.3~4.7 之间显示出较高的嗜杀活性,并在 pH 为 4.7 时达到最大,当 pH 大于 4.7 时,嗜杀活性迅速下降,当 pH 为 6 时几乎不形成抑菌圈。本实验用于筛选抗病毒药物的美蓝平板 pH 均为 4.7。

2.1.3 酵母嗜杀作用最适温度的测定:嗜杀酵母在 pH 4.7 的美蓝平板上,分别在温度 20℃、22℃、25℃、30℃、37℃ 和 40℃ 下用杯碟法检测抑菌圈大小(图 2-B)。在 20℃~22℃,T158c/S14a K1 毒素的嗜杀活性较高,并且较稳定;随着温度的升高,嗜杀活性逐渐减小,温度达到 40℃ 时则完全没有抑菌圈。本研究用于筛选抗病毒药物的温度是 22℃。

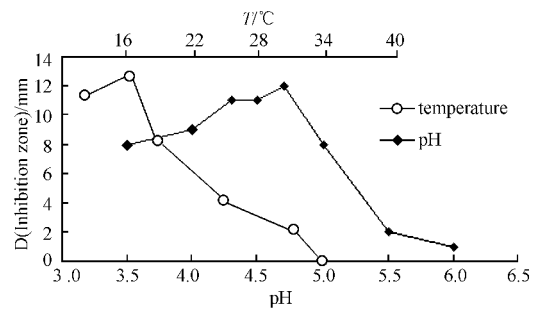


图 2 不同 pH (A) 和温度 (B) 下嗜杀酵母 T158c/S14a 对敏感酵母 S6 的嗜杀作用

Fig.2 Killing effects of the killer yeast T158c/S14a on the sensitive yeast S6 under different pH (A) and temperature (B) conditions.

2.2 抗病毒中药的初筛

用天花粉、夏枯草、金银花、板蓝根、鱼腥草、甘草、升麻、苏叶、柴胡、淫羊藿、黄精、白扁豆、丹皮、荆芥、苦参、黄芩、黄芩、五味子和青蒿共 19 种中药提取物分别对 T158c/S14a 进行处理,发现升麻和金银花提取物处理的 T158c/S14a 产生的抑菌圈明显比阴性对照小,而其他 17 种中药提取物所产生的抑菌圈与阴性对照则没有明显区别(图 3);茴香霉素

(Anisomycin) 是一种转肽酶抑制剂, 可以抑制 tRNA 氨基酸臂与核糖体中转肽酶中心受体位点的结合, 导致-1 移码效率的下降, 病毒颗粒因无法正常装配而丢失, 因此无法编码毒素蛋白, 不能产生抑菌圈

(图 3-A)。分别对比图 3-B 和图 3-D、图 3-C 和图 3-D, 升麻提取物和金银花提取物对 T158c/S14a 产生抑菌圈大小有明显的减小, 说明升麻提取物和金银花提取物可以抑制 T158c/S14a 的嗜杀活性。

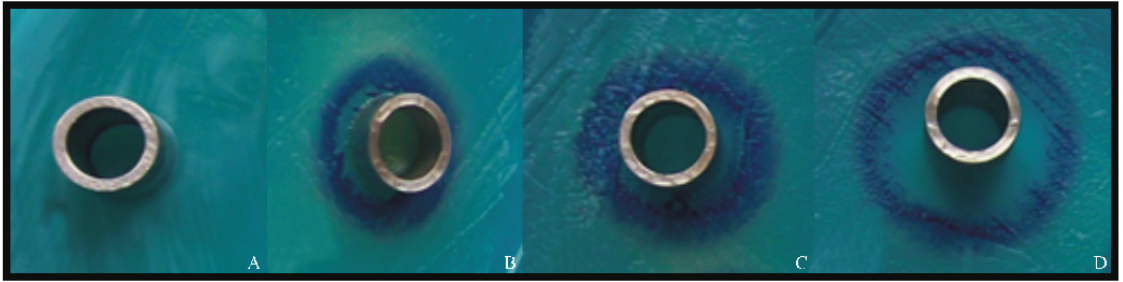


图 3 升麻、金银花提取物对嗜杀酵母 T158c/S14a 嗜杀作用的消除

Fig.3 Killing effect elimination of the killer yeast T158c/S14a by *Flos Lonicerae* extract and *Rhizoma Cimicifugae* extract. A T158c/S14a treated by *Rhizoma Cimicifugae* extract ; B T158c/S14a treated by *Flos Lonicerae* extract ; C :Negative control was T158c/S14a ; D :Positive control was T158c/S14a treated by Anisomycin with a final concentration of 150µg/mL.

2.3 升麻和金银花抗病毒作用效果的初探

2.3.1 不同浓度的升麻和金银花提取物对嗜杀酵母 T158c/S14a 嗜杀作用的影响: 称取 10g 中药进行提取, 用超纯水定容至 50mL, 使终浓度为 0.2g/mL。在 10mL YPD 液体培养基里分别 100µL T158c/S14a (细胞浓度 1×10^8 cfu/mL), 加入不同体积的药物提取物使药物终浓度分别为 0.01、0.008、0.006、0.004、0.002 和 0.001g/mL, 在 30°C 下培养 2d 后用杯碟法检测抑菌圈大小(图 4)。

比对照的 T158c/S14a 小, 但当浓度升至 0.006g/mL 时, 抑菌圈直径逐渐增大。而当浓度升至 0.008g/mL 时, 抑菌圈则完全消失。

图 4-A 所示, 随着升麻提取物浓度的增加, 抑菌圈大小并没有规律性减小。升麻提取物浓度在 0.001 ~ 0.002g/mL, 0.006 ~ 0.008g/mL 之间时, 抑菌圈的直径与对照的 T158c/S14a 相差不明显; 当浓度为 0.004g/mL 和 0.01g/mL 时, 抑菌圈直径明显比对照的 T158c/S14a 小。不同浓度的金银花提取物对嗜杀酵母 T158c/S14a 的嗜杀作用的影响如图 4-B 所示。浓度在 0.00 ~ 0.004g/mL 之间时, 抑菌圈直径

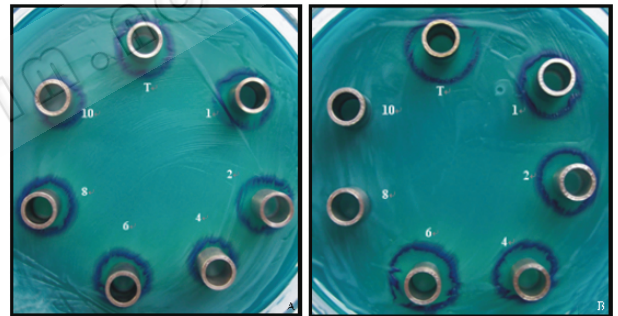


图 4 不同浓度的升麻、金银花处理物对嗜杀酵母 T158c/S14a 嗜杀作用的消除

Fig.4 Killing effect elimination of the killer yeast T158c/S14a by *Flos Lonicerae* extract and *Rhizoma Cimicifugae* extract under different concentrations. A : *Rhizoma Cimicifugae* extract ; B : *Flos Lonicerae* extract ; T : Negative control (T158c/S14a); 1 ~ 10 : different concentrations from 0.001 to 0.01g/mL.

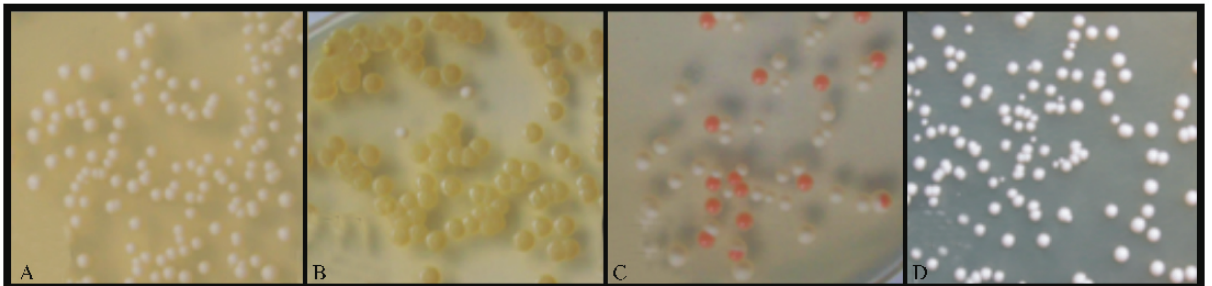


图 5 升麻、金银花共培养的 T158c/S14a 菌落形态

Fig.5 The colonial morphology of T158c/S14a co-cultured with *Rhizoma Cimicifugae* and *Flos Lonicerae*. A :Negative control (T158c/S14a); B T158c/S14a co-cultured with *Rhizoma Cimicifugae* ; C T158c/S14a co-cultured with *Flos Lonicerae* ; D :Positive control T158c/S14a co-cultured with Anisomycin.

2.3.2 升麻和金银花对嗜杀酵母特性的影响 将与升麻、金银花提取物共培养的 T158c/S14a 稀释至一定的浓度,涂至 YPD 平板,30℃培养 2d,长出的单菌落如图 5 所示。阴性对照和阳性对照的 T158c/S14a 在 YPD 平板上单菌落都呈白色。而经升麻共培养的 T158c/S14a 在 YPD 平板出现白色和黄色两种不同表型的菌落,而且数量上黄色菌落比白色菌落多。经金银花共培养的 T158c/S14a 在 YPD 平板出现两种不同表型,白色和红色,而且两种表型的单菌落在同一平板上数量相差不大。

挑取以上不同表型的单菌落至 YPD 液体培养基 30℃培养 2d,杯碟法观察抑菌圈大小(图 6)。作为阴性对照的 T158c/S14a(图 6c)抑菌圈最大,而与升麻共培养的 T158c/S14a 两种表型单菌落(图 5-B 中白色和黄色菌落)的抑菌圈相差不大,但两者的抑菌圈都比阴性对照的 T158c/S14a 的抑菌圈小。与金银花共培养的 T158c/S14a 的两种表型单菌落(图 5-C 中白色和红色菌落)的抑菌圈则完全不同,白色菌落的抑菌圈(图 6b)与对照的 T158c/S14a 相差不大,而红色菌落(图 6a)则没有抑菌圈,这表明红色的 T158c/S14a 不能分泌出 K1 毒素。

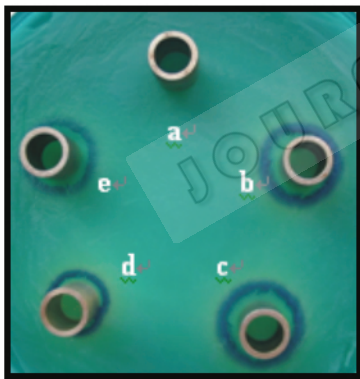


图 6 经升麻、金银花共培养的嗜杀酵母 T158c/S14a 不同形态菌落的嗜杀作用

Fig.6 Killing effect of the killer yeast T158c/S14a with different colonial co-cultured with *Rhizoma Cimicifugae* and *Flos Lonicerae*. a: red colony of T158c/S14a co-cultured with *Flos Lonicerae*; b: white colony of T158c/S14a co-cultured with *Flos Lonicerae*; c: white colony of T158c/S14a without Chinese crude drug; d: white colony of T158c/S14a co-cultured with *Rhizoma Cimicifugae*; e: yellow colony of T158c/S14a co-cultured with *Rhizoma Cimicifugae*.

T158c/S14a 与升麻、金银花共培养后,表型都产生了变化,而且嗜杀作用的大小也不同。与升麻共培养两种表型的抑菌圈都比对照的 T158c/S14a 小,这说明了这两种菌落所分泌的毒素 K1 减少,升麻抑制 T158c/S14a 毒素 K1 的分泌。而与金银花共培养红色表型单菌落的抑菌圈则完全消失,这表

明其完全不能分泌毒素 K1,金银花能够抑制 T158c/S14a 毒素的分泌。

3 讨论

目前发现 3 种肽酰转移酶抑制剂,茴香霉素、司帕霉素(Sparsomycin)和 Preussin 可以改变酵母细胞中-1 核糖体移码效率,而不影响酵母的正常生长^[10,19,21,22],而 2'-甲基寡聚核苷酸可以提高 HIV 的-1 移码效率^[23,24]。升麻提取液和金银花提取液对 T158c/S14a 的嗜杀活性具有较明显的抑制作用,可能是其有效成分影响-1 移码效率导致的结果,对此还需作进一步的研究。

许多逆转录病毒都利用程序性-1 核糖体移码翻译机制,如免疫缺陷病毒、T 细胞白血病病毒;人和动物的冠状病毒、环曲病毒、副粘病毒科的麻疹病毒、人星状病毒 1-5 号及很多植物病毒。本研究将程序性-1 核糖体移码作为抗病毒药物的靶位,以酵母的病毒嗜杀系统为基础,利用嗜杀酿酒酵母中 L-A 病毒-1 移码效率的改变,对分泌的毒素杀死敏感酵母表型影响,而建立一个简单有效的高通量抗病毒药物初筛模型,利用该模型可以对以上利用-1 核糖体移码机制的逆转录病毒进行抗病毒药物的筛选。

目前抗病毒药物筛选的细胞模型主要有单纯疱疹病毒(HSV-I VR733、HSV-II SAV 感染的 Vero 细胞株)、流感病毒(甲、乙型病毒感染的 MDCK 细胞株)和乙肝病毒(HBV 转染 HepG2 2.215 细胞株),这几种模型都是细胞模型,成本高,筛选速度慢。而以酵母为基础的筛选模型来研究翻译机制的调节和移码效率有以下特点:(1)有充足的证据表明酵母负责程序性核糖体移码的分子机制和人类基本相同^[7,8];(2)与动物模型和哺乳动物模型相比,酵母生长速度快,能够快速得到结果;(3)成本低,可实现在低成本下进行较大规模的抗病毒药物筛选,与传统的药物筛选方法相比,有其独特的优势。本实验对以酵母嗜杀系统为基础的抗病毒药物筛选模型的各种筛选条件进行了初步研究,并初步地应用于抗病毒中草药的筛选,结果表明该模型在进行抗病毒药物初筛上是可行的。天然药物中的许多活性成分具有抗病毒的作用,随着分离纯化技术的发展,天然药物活性成分抗病毒活性的研究已成为新药开发的方向。采用酵母病毒杀伤系统为基础的筛选模型,以程序性-1 核糖体移码为筛选机制,对天然药物进行高通量的筛选,对于天然抗病毒药物的研究开发具有良好的前景。

参 考 文 献

- [1] Jacks T ,Power MD ,Masiazk FR ,et al. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* ,1988 ,**331**(21): 280 - 283 .
- [2] Ian B ,Francisco J ,Dos R. Programmed ribosomal frameshifting in HIV-1 and the SARS-CoV. *Virus Research* ,2006 ,**119** :29 - 42 .
- [3] Pavel V ,Clark M ,Christine B. Programmed ribosomal frameshifting in decoding the SARS-CoV genome. *Virology* ,2005 ,**332** :498 - 510 .
- [4] Brierley I ,Gen V. Ribosomal frameshifting on viral RNAs. *Virology* ,1995 ,**76** :1885 - 1892 .
- [5] Dinman JD. Ribosomal frameshifting in yeast viruses. *Yeast* ,1995 ,**11** :1115 - 1127 .
- [6] Dinman JD ,Icho T ,Wickner RB. A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1991 ,**88** :174 - 178 .
- [7] Stahl G ,Bidou L ,Rousset JP ,et al. Versatile vectors to study recoding :conservation of rules between yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* ,1995 ,**23** :1557 - 1560 .
- [8] Dinman JD ,Wickner RB. Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-pol ratio are critical for yeast MI double-stranded RNA virus propagation. *J Virol* ,1992 ,**66** :3669 - 3676 .
- [9] Mario C ,Neil P ,Harold E. An RNA pseudoknot and an optimal heptameric shift site are required for highly efficient ribosomal frameshifting on a retroviral messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1992 ,**89** :713 - 717 .
- [10] Kinzy TG ,Harger JW ,Schmid AC ,et al. New targets for antivirals : the ribosomal A-site and the factors that interact with it. *Virology* ,2002 ,**300** :60 - 70 .
- [11] Schmitt MJ ,Breinig F. The viral killer system in yeast :from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev* ,2002 ,**26** :257 - 276 .
- [12] Marquina D ,Santos A ,Peinado JM. Biology of killer yeast. *Int Microbiol* ,2002 ,**5** :65 - 71 .
- [13] Walter M ,Stefania C ,Mara G ,et al. Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev* ,1997 ,**10** :369 - 400 .
- [14] Roasura PC ,Valle B ,Reed B. Elimination of L-A double-stranded RNA virus of *Saccharomyces cerevisiae* by expression of gag and gag-pol from an L-A cDNA clone. *Journal of virology* ,1993 ,**67** : 2764 - 2771 .
- [15] Dinman JD ,Wickner RB. Translational maintenance of frame mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with altered -1 ribosomal frameshifting efficiencies. *Genetics* ,1994 ,**136** :75 - 86 .
- [16] Shigemoto K ,Brennan J ,Walls E ,et al. Identification and characterisation of a developmentally regulated mammalian gene that utilises -1 programmed ribosomal frameshifting. *Nucleic Acids Res* ,2001 ,**29** :4079 - 4088 .
- [17] Rashi S ,Sunil K. A yeast assay for high throughput screening of natural anti-viral agents. *Lal Biochem Bioph Res Co* ,2002 ,**30** :218 - 221 .
- [18] Dinman JD ,Maria J ,Ruia E. Translating old drugs into new treatments- ribosomal frameshift. *Tibtech April* ,1998 ,**6** :190 - 196 .
- [19] Dinman JD ,Ruiz-Echevarria MJ ,Czaplinski K ,et al. Peptidyltransferase inhibitors have antiviral properties by altering programmed -1 ribosomal frameshifting efficiencies : development of model systems. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1997 ,**94** :6606 - 6611 .
- [20] Bartunek M ,Jelinek O ,Vondrejs V. Susceptibility of Individual Cells of *Saccharomyces cerevisiae* to the Killer Toxin K1. *Biochem Bioph Res Co* ,2001 ,**283** :526 - 530 .
- [21] Harger JW ,Dinman JD. An in vivo dual-luciferase assay system for studying translational recoding in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* ,2003 ,**9** :1019 - 1024 .
- [22] Arturas M ,Jason W ,Kristi L ,et al. Decreased peptidyltransferase activity correlates with increased programmed -1 ribosomal frameshifting and viral maintenance defects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* ,2003 ,**9** :982 - 992 .
- [23] Vickers TA ,Ecker DJ. Enhancement of ribosomal frameshifting by oligonucleotides targeted to HIV gag-pol region. *Nucleic Acids Res* ,1992 ,**20**(15) :3945 - 3953 .
- [24] Aupeix-Scheidler K ,Chabas S ,Bidou L ,et al. Inhibition of in vitro and ex vivo translation by a transplatin-modified oligo (2'-O-methylribonucleotide) directed against the HIV-1 gag-pol frameshift signal. *Nucleic Acids Res* ,2000 ,**28** :438 - 445 .

A model for screening anti-viral agents based on yeast killer system

PAN Li ,HUANG Yao-wei* ,YE Yan-rui ,WANG Ya-qin

(School of Biological Science and Engineering ,South China University of Technology ,Guangzhou 510641 ,China)

Abstract :Altering -1 frameshifting efficiency of L-A virus in yeast T158c/S14a will result in loss of MI virus and reduction of toxin K1 ,which induced a diminished of inhibition zone. According to the size of inhibition zone on methylene blue flat with low pH ,a model for screening anti-viral agents was developed. The conditions of assaying killing activity by well test assay were explored. With assaying the killing activity in different pH and temperature it was found that the optimum pH range of 4.3 ~ 4.7 and the optimum temperature range of 20 ~ 22°C in this screening model. To utilize this screening model ,Several Chinese crude drugs had been studied and were found *Flos Lonicerae* and *Rhizoma Cimicifugae* have anti-viral effect. Such a model was to establish foundation for high throughput screening of anti-viral agents .

Keywords : antiviral agent ; killer yeast ; screening model ; killing effect