

• 专栏 •

三环己基氯化锡对烟草花叶病毒的抑制作用

李 祝², 周蕴贇¹, 陈 伟¹, 毛明珍¹, 李一鸣¹,
李玉新¹, 李正名^{*}, 唐 蜜¹, 宋宝安²

(1.南开大学 元素有机化学国家重点实验室,天津 300071; 2 贵州大学 生命科学院, 贵阳 550025)

摘 要:以心叶烟为试材,采用活体钝化法测定了三环己基氯化锡对烟草花叶病毒(TMV)的抑制作用,并通过电镜、琼脂糖凝胶电泳及紫外光谱法分别测定了三环己基氯化锡对TMV、TMV-RNA及TMV-外壳蛋白(TMV-CP)的体外作用。活体钝化结果显示:500 μg/mL的三环己基氯化锡对TMV的抑制率达到75.77% ± 0.11% (P < 0.01);三环己基氯化锡与TMV体外作用30 min电镜下观察,显示病毒粒体出现断裂现象,粒体结构遭到破坏;琼脂糖凝胶电泳显示,三环己基氯化锡对TMV-RNA具有体外降解作用;紫外光谱法测定结果表明,三环己基氯化锡对TMV-CP的体外聚合过程具有抑制作用。

关键词:三环己基氯化锡;烟草花叶病毒;抑制作用;作用机制

DOI 10.3969/j.issn.1008-7303.2010.03.07

中图分类号: S432.2 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2010)03-0279-04

Mechanism of tobacco mosaic virus by tricyclohexyltin chloride

LI Zhu², ZHOU Yun-yun¹, CHEN Wei¹, MAO Ming-zhen¹, LI Ying¹,
LI Yuxin¹, LI Zheng-ming^{*}, TANG Mi¹, SONG Bao-an²

(1. State Key Laboratory of Elemento-organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2 The College of Life Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract Inactivation methods were used to study the inhibition effects of tricyclohexyltin chloride against tobacco mosaic virus (TMV). The inhibition effects of tricyclohexyltin chloride against TMV, TMV-RNA and TMV coat-protein (TMV-CP) were studied by electron microscope, agarose gel electrophoresis and ultraviolet spectroscopy, respectively. Electron microscope study indicated that the TMV particles were fractured after treated with 500 μg/mL tricyclohexyltin chloride for 30 min in vitro (inhibition rate up to 75.77% ± 0.11%, P < 0.01). The experimental results also showed that TMV-RNA degraded and the polymerization of TMV-CP inhibited by treated with tricyclohexyltin chloride.

Key words tricyclohexyltin chloride; tobacco mosaic virus; inhibition effects; mechanism

烟草花叶病是由烟草花叶病毒(TMV)引起的一类世界性重要病害^[1-2],一般会造成烟草减产

20%~30%,流行年份则导致毁种甚至绝收,严重影响了烟叶产量和质量^[3]。因此,控制烟草花叶病的

收稿日期: 2010-05-19 修回日期: 2010-09-25

作者简介: 李祝(1978-),女,贵州人,博士,副教授,主要从事细胞生物学研究, E-mail: zhuliluck@163.com; * 通讯作者(Author for correspondence): 李正名(1931-),男,上海人,教授,中国工程院院士,主要从事新农药创制研究,电话: 022-23503732, E-mail: nkznm@vip.163.com

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目(09JCZDJC21300)。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为害已成为当前烟草生产中急需解决的问题。

国内外一直十分关注 TMV 防治的研究工作。已有研究表明,防御酶系的变化与植物的抗病性关系密切^[4-5]。本课题组在抗 TMV 药物筛选试验中,发现化合物三环己基氯化锡(分子式 $C_{18}H_{33}SnCl$ CAS号: 3091-32-5)具有较好的活性。有机锡化合物具有杀菌、杀螨及抗癌等多种生物活性,在工业、农业和医药等领域曾有广泛的应用^[6-8],但有关有机锡抗 TMV 活性的研究尚未见报道。本课题组以心叶烟-TMV 为试材,对三环己基氯化锡的作用浓度进行了钝化筛选,并对三环己基氯化锡抗 TMV 的作用机制进行了研究。通过电子显微镜观察了药剂作用前后 TMV 粒子结构的变化,采用琼脂糖凝胶电泳检测了 TMV-RNA 的体外降解情况,以及紫外光谱检测了 TMV-CP 的体外聚合过程。现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 试验材料和仪器

以心叶烟 *Nicotiana glutinosa* 作为 TMV 的枯斑寄主,按文献[9]方法提取病毒。三环己基氯化锡(tricyclohexyltin chloride),由南开大学李正名院士提供,用微量二甲基亚砜(DMSO)溶解,用无菌水配制成质量浓度分别为 125、250、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的药液供试;2% 宁南霉素(ningnanmycin)水剂,四川金珠生态农业科技有限公司产品,配制成有效成分质量浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的药液备用;其余试剂均为分析纯。

Pow er Pac300型垂直电泳仪, Bio-RAD 凝胶成像系统;H-8100透射电镜(Hitachi公司产品)。

1.2 试验方法

参照文献[10]方法进行。

1.2.1 三环己基氯化锡对 TMV 的抑制作用 将病毒提取液分别与 125、250、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的三环己基氯化锡水溶液按体积比 1:1 的比例混合钝化 0.5 h,分别摩擦接种于长势一致的 5~6 叶期心叶烟的左半叶片;将病毒提取液与溶媒(无菌水中含有与配制三环己基氯化锡时所加的等量的 DMSO)按体积比 1:1 的比例混合后摩擦接种于右半叶,以之为阴性对照。每处理 3 株(共记 9 片叶),重复 3 次,72 h 后统计心叶烟枯斑数,按(1)式计算病斑抑制率。

抑制率 $\% = [(\text{对照枯斑数} - \text{处理枯斑数}) / \text{对照枯斑数}] \times 100$ (1)

1.2.2 三环己基氯化锡对 TMV 物理结构的影响

向提纯后的 TMV 粒体溶液中加入等体积的 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的三环己基氯化锡溶液,室温下混合放置 30 min,用具有福尔马膜的铜网吸附混合液,磷钨酸进行负染,干燥后在电镜下观察 TMV 的粒体形态。

1.2.3 三环己基氯化锡对 TMV-RNA 的影响

1.2.3.1 TMV-RNA 的提取 向病毒提纯液中加入 Trizol 提取液,室温下静置 30 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、 1.2×10^4 r/min 下离心 15 min,取上清液,加入 1/5 体积的氯仿,混匀,静置 5 min,再离心 15 min,取上层水相,加入等体积的异丙醇,混匀后静置 10 min,再在 1.2×10^4 r/min 下离心 15 min,弃上清液,于沉淀中加入 1 mL 质量分数为 70% 的乙醇,于相同转速下离心 15 min,弃上清液,倒置于吸水纸上自然晾干,加入焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)水溶液,备用。

1.2.3.2 琼脂糖凝胶电泳检测 将提取得到的 TMV-RNA 分别与 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的三环己基氯化锡和 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的宁南霉素混合,制得 TMV-RNA 上样液,使其在 65 $^{\circ}\text{C}$ 下温浴 15 min 后取出置于冰上,加入 RNA 上样缓冲液(1 \times TBE),取 5 μL 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,用 Bio-RAD 凝胶成像系统检测、照相。以未经药剂处理的 TMV-RNA 为阴性对照,以 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 宁南霉素处理为阳性对照。

1.2.4 三环己基氯化锡对 TMV 外壳蛋白体外聚合的影响

1.2.4.1 透析袋的预处理 在碱性乙二胺四乙酸(EDTA)溶液(含碳酸钠 10 g/L, EDTA 1 mmol/L, pH = 8.0)中将透析袋煮沸 15 min,用蒸馏水彻底清洗,再于 EDTA 溶液中煮沸 15 min,于冰箱中 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

1.2.4.2 TMV 外壳蛋白(TMV-CP)的制备 将 TMV 在质量分数为 67% 的冰醋酸中浸渍 60 min,于 3 500 r/min 下离心 20 min,取上清液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 蒸馏水中透析 96 h(每天换水数次)。加入 3 mol/L 的醋酸钠缓冲液(pH = 5.2)少许,于 10 000 g 下离心 30 min,收集沉淀得到纯化的 TMV-CP。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、0.033 mol/L 的磷酸缓冲液(pH = 7.0)中保存备用。

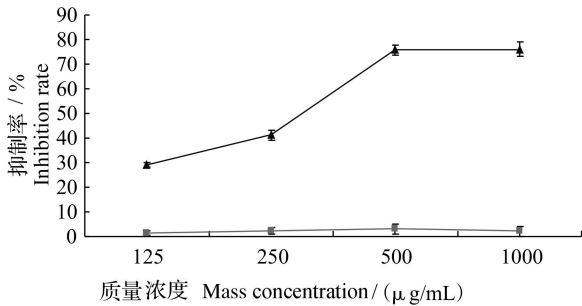
1.2.4.3 三环己基氯化锡对 TMV-CP 体外聚合的影响 将三环己基氯化锡用 0.033 mol/L 的磷酸缓冲液(pH = 7.0)溶解后,加入到 1 mL 已经纯化的 TMV-CP 中,用 0.033 mol/L 的磷酸缓冲液(pH =

7.0) 稀释成含三环己基氯化锡质量浓度为 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的药液。在不同温度下, 用紫外分光光度计于波长 320 nm 处测定 OD 值, 起始温度为 10°C , 每隔 5°C 测定 1 次, 35°C 时终止测定。

2 结果与讨论

2.1 三环己基氯化锡对 TMV 的抑制作用

不同质量浓度的三环己基氯化锡药液与 TMV 体外混合钝化 0.5 h 后, 其对 TMV 的抑制率见图 1。结果显示: $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的三环己基氯化锡对 TMV 的抑制作用与阴性对照相比表现出极显著差异 ($P < 0.01$); 但当浓度增加到 $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 抑制率表现出了饱和趋势。因 $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的抑制率与 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 差异不大 ($P > 0.05$), 故选取 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 为后续试验的药剂质量浓度。



▲ 三环己基氯化锡 tricyclohexyltin chloride ▬ 阴性对照 CK

图 1 不同质量浓度药剂对 TMV 的抑制率

Fig 1 Inhibition rate of different mass concentration of tricyclohexyltin chloride against TMV

2.2 三环己基氯化锡对 TMV 物理结构的影响

由电子显微镜下观察的病毒粒子形态(图 2)发现: 正常的 TMV 粒子刚直, 短杆状, 很少有粒子的断裂(图 2A); 但经 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的三环己基氯化锡处理的病毒粒子有断裂现象(图 2B)。表明三环己基氯化锡对病毒粒子的结构具有一定的破坏作用。

2.3 三环己基氯化锡对 TMV-RNA 的影响

TMV-RNA 的琼脂糖凝胶电泳结果(图 3)显示: 未经药剂处理的 TMV-RNA 呈现的是一条完整的亮带, 而经三环己基氯化锡 ($500 \mu\text{g}/\text{mL}$) 和对照药剂宁南霉素 ($500 \mu\text{g}/\text{mL}$) 处理的 TMV-RNA 已被降解, 形成弥散带。推测三环己基氯化锡对 TMV-RNA 的有体外降解作用。

2.4 三环己基氯化锡对 TMV-CP 体外聚合的影响

紫外光谱测定结果(图 4)显示: 在 $10\sim 35^\circ\text{C}$ 的

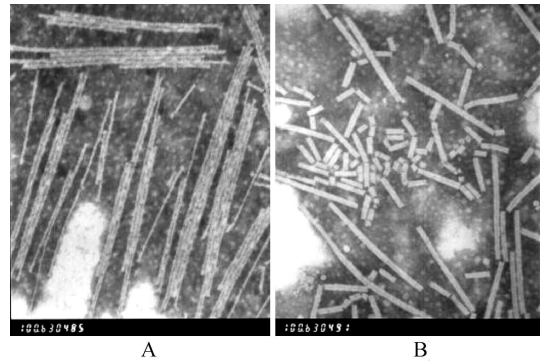


图 2 正常 TMV 粒子及经三环己基氯化锡处理的 TMV 粒子电镜图 ($1 \times 10^5 \times$)

Fig 2 The electron micrograph of normal TMV and tricyclohexyltin chloride treated TMV ($1 \times 10^5 \times$)

A: 正常 TMV 粒子的电镜图;

B: 经三环己基氯化锡处理的 TMV 粒子的电镜图。

A: The electron micrograph of normal TMV;

B: Tricyclohexyltin chloride treated TMV.

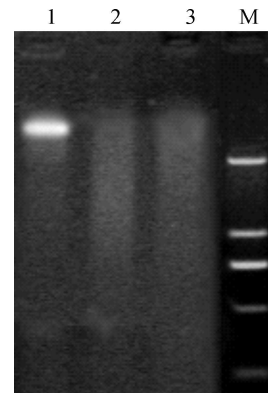


图 3 三环己基氯化锡对 TMV-RNA 的影响

Fig 3 The effect of tricyclohexyltin chloride on TMV-RNA

注: M. Marker; 1. 正常 TMV-RNA; 2. 用三环己基氯化锡处理的 TMV-RNA; 3. 用宁南霉素处理的 TMV-RNA。

Note: 1. Normal TMV-RNA; 2. TMV-RNA treated by tricyclohexyltin chloride;

3. TMV-RNA treated by nymphaeol.

测定区间内, 未经药剂处理的 TMV 随着温度的升高 320 nm 下的 OD 值明显升高, 经三环己基氯化锡处理的 TMV-CP 随着温度的升高 320 nm 下的 OD 值虽然也逐渐升高, 但总体 OD 值均低于未用药物处理的 TMV-CP。推测三环己基氯化锡可能引起了原有外壳蛋白寡聚体的解离, 从而抑制了 TMV-CP 的体外聚合过程, 降低了 TMV 的侵染率。

综上所述, 三环己基氯化锡一方面可对 TMV

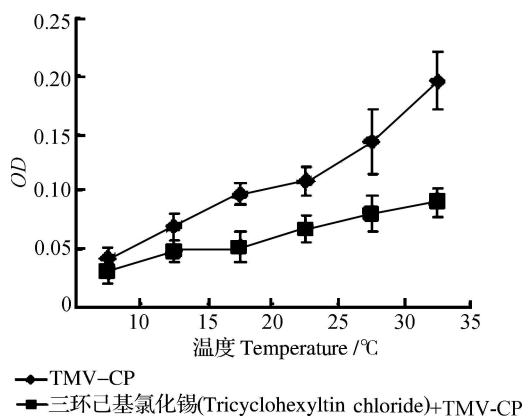


图 4 三环己基氯化锡对 TMV 外壳蛋白体外聚合的影响

Fig 4 Effect of tricyclohexyltin chloride on the TMV coat protein polymerization in vitro

起到活体钝化作用;另一方面,其在体外与 TMV 作用,可降低 TMV 的侵染率。

谨以此文敬贺钱传范教授八十华诞!

参考文献:

- [1] ZHANG Cheng-sheng(张成省), KONG Fan-yu(孔凡玉), LIU Chao-ke(刘朝科), et al 枯草芽孢杆菌 Tpb55 抗烟草普通花叶病毒(TMV)活性研究 [J]. Acta Tabacaria Sinica(中国烟草学报), 2009, 15(4): 48-51
- [2] THOMAS J S ELAINE C, TMOYTHY S. The structure of cucumber mosaic virus and comparison to cow pea chlorotic mottle virus [J]. J Virol, 2000 74(16): 7578- 7586

- [3] QN Bi-xia(秦碧霞), CAI Jian-he(蔡健和), ZHOU Xing-hua(周兴华). 几种药剂防治烟草花叶病毒病田间试验 [J]. Guangxi Agric Sci(广西农业科学), 2008, 39(1): 37- 39
- [4] ZHANG Shu-sheng(张树生), HU Lei(胡蕾), LIU Zhong-liang(刘忠良), et al 植物体内抗病相关酶与植物抗病性的关系 [J]. Anhui Agric Sci Bull(安徽农学通报), 2006 12(13): 48- 49.
- [5] MA Di(马镛), WU Yuan-hua(吴元华), ZHAO Xi-xiang(赵秀香). 寡糖类物质对烟草 TMV 的抑制及防御酶系的影响 [J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2009 15(4): 48- 51
- [6] WEI Rong-bao(魏荣宝), LIANG Ya(梁娅), WU Jin(吴锦), et al PVC 有机锡热稳定剂的研究 [J]. Chin J Appl Chem(应用化学), 1995 12(5): 29- 32
- [7] LÜ Yan(吕研), XIE Qing-kan(谢庆兰). 有机锡氧簇合物在有机合成中的催化作用 [J]. Chin J Syn Chem(合成化学), 2001 (9): 477- 450.
- [8] DAVESA G. Organotin Chemistry [M]. 2nd Ed Weinheim: John Wiley & Sons 2004 383- 384.
- [9] LÜ Dian-qiu(吕典秋), LI Xue-zhan(李学湛), HE Yun-xia(何云霞), et al 烟草花叶病毒(TMV)和马铃薯 X 病毒(PVX)的提纯及抗血清的制备 [J]. Chin Potato J(中国马铃薯), 2000 14(4): 1- 2
- [10] ZHU Chun-yu(朱春玉). The action mechanism of cytosinepeptide mycin on tobacco mosaic virus(噬肽霉素抗烟草花叶病毒(TMV)作用机制研究) [D]. Shenyang(沈阳): Shenyang Agricultural University(沈阳农业大学), 2005 73- 74.

(责任编辑: 金淑惠)