

· 专论与综述 ·

分子靶标烟草花叶病毒外壳蛋白的 结构生物学研究进展

李向阳, 陈卓, 杨松, 宋宝安*

(贵州大学 精细化工研究开发中心, 绿色农药与农业生物工程国家重点实验室培育基地/教育部重点实验室, 贵阳 550025)

摘要: 病毒外壳蛋白(CP)是烟草花叶病毒(TMV)基因结构的重要组成部分,其主要功能除保护核酸物质不被降解外,还与TMV的远距离移动及寄主症状有关。目前研究较多的是CP基因介导的抗性、药剂干扰CP的聚合等,而有关靶标CP与药剂的作用机理尚未有系统全面的报道。从结构生物学的角度出发,详细介绍了TMV CP在电镜及单晶衍射技术下的三维结构;比较了国内已报道的CP的基因序列;综述了CP在基因工程领域的应用及其受药剂分子的干扰作用等方面的研究进展。以毒氟磷药剂为例,分析了其可能作用于TMV CP的分子机理,预测了毒氟磷小分子与TMV CP大分子可能的作用位点。有助于进一步研究和发现新型抗TMV药剂。

关键词: 烟草花叶病毒; 外壳蛋白; 分子靶标; 结构生物学; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1008-7303.2010.04.03

中图分类号: S481.1

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2010)04-0391-11

Research progress of structure biology of tobacco mosaic virus coat protein as molecular targets

LI Xiang-yang, CHEN Zhuo, YANG Song, SONG Bao-an*

(Research and Development Center for Fine Chemicals, State Key Laboratory Breeding Base of
Green Pesticide and Agricultural Bioengineering, Key Laboratory of Green Pesticide and
Agricultural Bioengineering, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Coat protein(CP) is an important part of the genomic structure of the tobacco mosaic virus (TMV), its main function not only includes the protection of DNA from degradation, but also has a close relationship with the TMV long-distance movement and host symptoms. Presently, the study of TMV CP mainly focus on CP-mediated resistance, interference the polymerization of CP by agent and so on, while the mechanism of agent action with target CP has not been comprehensively reported. From the perspective of structural biology, the three-dimensional structure of TMV analyzed by electron microscopy and diffraction techniques using TMV CP as a molecular target was detailed; the CP gene sequences which had been reported in China was compared; the progress of applying TMV CP in genetic engineering and interfering of agent molecules with CP were reviewed. Moreover, the possible mechanism of agent(dufulin) on TMV CP was analyzed and the active sites between dufulin molecule and macromolecules of TMV CP were forecasted, which would facilitate further research and

收稿日期: 2010-05-20; 修回日期: 2010-08-07.

作者简介: 李向阳(1983-), 男, 山东临沂人, 博士研究生; * 通讯作者(Author for correspondence): 宋宝安(1963-), 男, 湖南益阳人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事新农药创制研究, 电话: 0851-3620521, E-mail: songbaoan22@yahoo.com

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2010CB126105); 国家自然科学基金(20872021)资助项目.

developing novel anti-TMV agents of tobacco.

Key words: tobacco mosaic virus (TMV); coat protein (CP); molecular target; structural biology; research progress

由烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)引起的病害给农业生产造成了极大的损失,据有关专家估计,全球每年因该病毒危害造成的损失达1亿多美元^[1-2]。研究和探索防治烟草花叶病毒病的新技术、新途径已成为众多研究者普遍关注的焦点。作为单链正义的RNA病毒, TMV基因组核酸全长6 395个核苷酸,依次由5'端非编码区、126/183 kDa复制酶、30 kDa运动蛋白基因编码区、17.6 kDa外壳蛋白基因编码区和3'端非编码区组成(图1)。其中,17.6 kDa蛋白由亚基因组翻译而来,为TMV的外壳蛋白(coat protein, CP),其功能除了保护TMV体内的核酸物质不被降解外,还与病毒远距离移动及寄主症状有关^[3],可以作为药剂作用的分子靶标。药剂进入生物体内后,以某种蛋白质或核酸等作为其作用的位点,该作用位点即为分子靶标^[4]。选择药剂分子靶标时要考虑到靶标的有效性及副作用^[5]。目前,有关以TMV CP作为分子靶标的研究报道大多集中在药剂小分子干扰了受体靶标CP的聚合上,而有关药剂与靶标TMV CP作用机理的研究尚处于起步阶段,对药剂分子与靶标CP直接作用的分子机理亦未有系统、全面的报道。

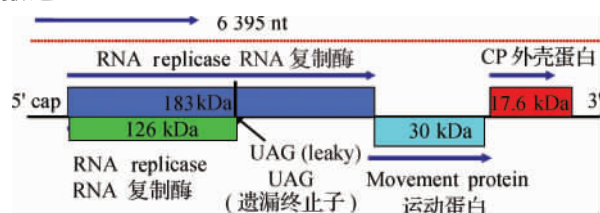


图1 烟草花叶病毒的基因组结构^[6]

Fig. 1 The genomic structure of TMV^[6]

目前利用TMV CP的结构生物学技术进行抗病毒研究已成为植物病毒学家关注的新热点。对分子靶标CP的结构和功能的认识,可以很好地带动植物抗病毒的相关理论和应用实践研究。本文从生物化学、分子生物学、结构基因组学和结构生物学等角度出发,综述了分子靶标CP在结构和功能方面的研究进展,并运用EST数据库工具、Clustalx多序列比对分析软件等对TMV CP序列进行了分析,运用PDB数据库进行了蛋白的空间结构模拟,运用Dock、Discovery Studio等分子对接软件对分子靶标

CP与新型抗植物病毒药剂毒氟磷(dufulin)的作用进行了模拟对接,以助于进一步了解抗烟草病毒药剂的分子作用机理。

1 TMV及TMV CP的结构生物学研究

1974年,Stubbs等^[6]通过电镜技术发现TMV病毒由2 130个相同的蛋白亚基和1个约6 400个核苷酸的单股RNA组成。其中,围绕单股RNA的蛋白亚基包含158个氨基酸残基,且蛋白亚基具有螺旋形结构,其螺距为2.3 nm。随后,在1976年,Champness等^[7]用多重同晶置换和非晶体学对称的方法获得了磁盘状的TMV电子云密度图,发现连接在亚基间的轴线恰是RNA开放型结构的轴线。近年来,电镜技术已逐渐用于测量“脆弱”(freeze-fractural)病毒的精细结构。2007年,Sachse等^[8]以蛋白的螺旋和折叠等精细结构为研究对象,利用低温电镜技术建立病毒粒子的三维结构,采用经电镜校正电子云密度模型图的空间细化策略来构建TMV的原子模型,将该模型用于研究TMV的较低的半径区域,即残基88-109,经过处理后该区域表现出更有序的二级结构模型,可以清晰且直观地看出TMV的结构和TMV RNA及TMV CP的相互关系(PDB登陆号:2OM3)。与早期的螺旋结构相比,Sachse研究发现:通过低温电镜技术获得的TMV精细结构中, TMV RNA的磷酸骨架像三明治一样夹在2个精氨酸的侧链之间,增强了TMV CP和TMV RNA之间的相互联系;而一簇2个或3个羧基端处于疏水环境中,与邻近的亚基相区别。Sachse最先揭示了TMV CP的生命活动与TMV特殊结构的疏水性有关,并推测这种羧基的功能可能与TMV的解螺旋和组装有关(图2)。

20世纪50年代,X-射线晶体衍射技术使人们在原子水平上测定病毒的结构成为可能,加深了对TMV CP与TMV RNA相互作用关系的认识。1989年,Namba等^[9]通过纤维衍射的方法确定了蛋白质与核酸的相互作用,发现TMV结构模型包含了非氢原子的RNA和蛋白、71个水分子和2个钙离子的结合位点,病毒在磷酸-羧酸对以及羧酸-羧酸对之间的静电排斥力下解除自组装,由磷酸-羧酸对和至少一对羧酸-羧酸对作用于钙离子结合位点,

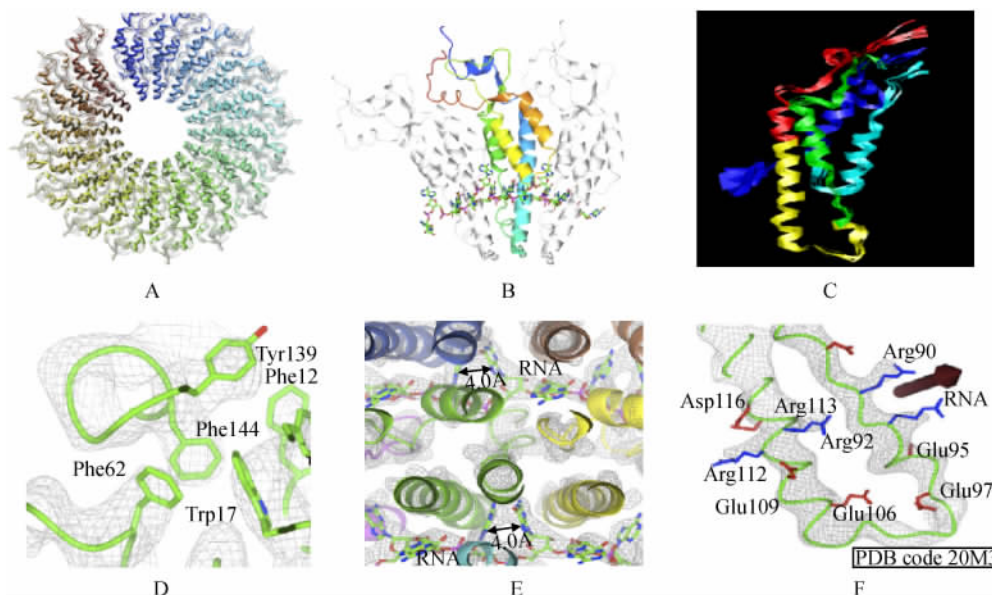


图2 低温电镜下观察到分辨率为 0.45 nm (4.5 Å) 的 TMV CP、RNA 及 TMV CP 与 RNA 的相互作用关系^[6-8]

Fig.2 Density map of TMV CP, RNA and the interaction between TMV CP and RNA at about 0.45 nm (4.5 Å) resolution analysis with electron cryo-microscopy^[6-8]

注: (A) 平行于 α 螺旋的由 16 个单个亚基组成的密度图和原子叠加效果; (B) 包括 RNA 的邻近的亚基平均结构; (C) PDB 数据库中的单个 TMV 亚基结构图; (D) CP 亚基高半径区域疏水区的侧链密度 (Phe12, Trp17, Phe62, Tyr139, Phe144) 图; (E) RNA 位于 CP 亚基低半径区域的 4 个螺旋之间; (F) RNA 交联于“三明治”结构中带负电荷的磷酸基团的 Arg 92 和 Arg 90 之间。

Note: (A) Density map of a single turn comprising 16 subunits and superimposed atomic coordinates viewed parallel to the helical axis. (B) The average structure and adjacent subunits including RNA. (C) A single TMV subunit chart from PDB (20M3). (D) Hydrophobic cluster with strong side-chain density (Phe12, Trp17, Phe62, Tyr139, Phe144) at higher radius of the CP subunit. (E) RNA located between four-helix bundles of lower and upper subunit neighbors at lower radius. (F) Upon RNA binding Arg 92 switches conformation to sandwich the negatively charged phosphate groups with Arg 90.

该作用方式与特异性的核苷酸和 2 个鸟嘌呤的特定氢键共同识别 TMV 鸟嘌呤残基上的自身 RNA。该研究对 TMV RNA 与 TMV CP 的关系有了进一步的了解。1992 年, Pattanayek 等^[10] 向 PDB 数据库提交了 TMV 单晶衍射数据信息, 标志着对病毒的研究已经进入到了单晶衍射的精细结构研究阶段。1999 年, Stubbs^[11] 通过单晶衍射的方法发现 TMV CP 亚基呈螺旋状排列、镶嵌在 RNA 螺旋链上, 1 个 CP 的亚基和 3 个核苷酸相结合, 并同时发现 1 个完整的 TMV 粒子上的 4 个 CP 亚基和 RNA 链上的 12 个核苷酸交联在一起。该结构特征在电子云密度图中清晰可见(图 3)。

随着病毒学家对 TMV 结构研究的深入, 近年来在其结构组装行为研究等方面也取得了新的进展。2006 年, Willem 等^[12] 发现 TMV 粒子水溶液中的 CP 和 RNA 在适当的温度、pH 值和离子强度下可以进行 CP 磁盘的自组装和螺旋自解聚, 他们发现在温度函数 T 为 273 K、盐离子浓度为 0.1 mol/L、

pH 为 7.0 的条件下, TMV 粒子的磁盘处于稳定的自组装状态。该理论的定量验证为 TMV 的自组行为奠定了理论基础。

随着对 TMV 结构解析研究的深入, 材料学家发现, TMV CP 的超结构可应用于纳米领域。他们把主要的关注点集中到 TMV CP 本身极其规律的螺旋堆积方式上, 将 TMV CP 作为氧化物及金属附着的模板, 通过修饰病毒内外表面 CP 上特殊的氨基酸, 使 CP 带有诸如导电性、聚合性等特征。2010 年, Dedeo 等^[13] 报道了利用 N -末端氨基作用/脲化方法, 可以重新将 TMV CP 的 N 和 C 端定位到一个新的磁盘突变中心, 形成较稳定的突变磁盘结构, 大大提高了这一材料组装形式的实用性。此外, TMV 等生物纳米粒子具有可控功能化^[14]、可控组装化等特性^[15], 这些特性在制备细胞培养基材料以及药物输送^[16] 等领域具有重要作用。同时, 使用 TMV 模板合成无机-有机纳米管, 利用 TMV CP 中的 Glu、Asp、Arg 和 Lys 等残基进行无机物质的矿

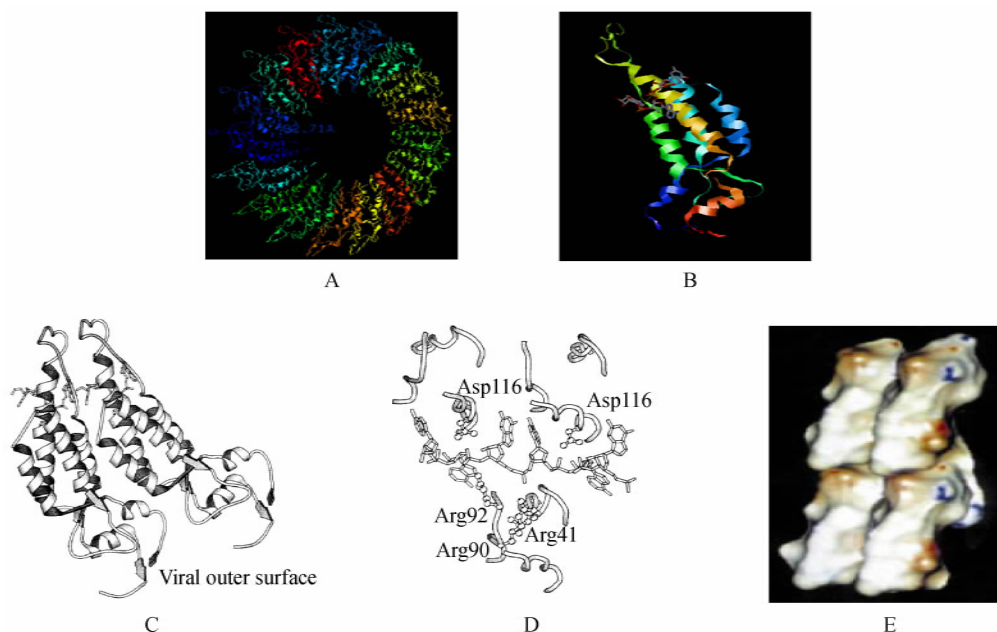


图3 X-射线衍射下 TMV CP 亚基与 TMV RNA 的相互作用及 4 个 CP 亚基电子云密度图^[9-10]

Fig. 3 The interaction of TMV RNA and TMV CP subunits under X-ray diffraction and the electron density map of the four CP subunits^[9-10]

注: (A) 16 个 TMV CP 亚基组; (B) 单个 TMV CP 亚基; (C) TMV CP 亚基连同具有代表性的 6 个核苷酸骨架的丝带图; (D) 用球和棒图代表侧链与磷酸基团的相互作用, α -螺旋包括 Arg41, 且 Arg41 通过 α -偶极螺旋来稳定磷酸基团上的负电荷; (E) TMV 的 4 个亚基电子云表面密度图, 红色为带负电荷的区域, 蓝色为带正电荷的区域。

Note: (A) 16 flats in the TMV CP subunit group. (B) A single TMV CP subunits. (C) Ribbon diagram of two subunits of the TMV CP, together with a skeletal representation of six nucleotides. (D) Side chains interacting with the phosphate groups are shown as ball-and-stick models; the α -helix that includes Arg41 which stabilizes the negative charge on a phosphate group through its helix dipole. (E) Electrostatic surface potentials of four subunits of TMV, viewed from inside the virus with the viral axis vertical. Negatively charged areas are shown in red, positively charged areas in blue.

化^[17-20]亦有着特殊的价值。

病毒外壳蛋白具有千变万化的形态和大小, 且具有大规模生产的可操作性, 在不久的将来或许会成为生产纳米功能材料的天然工厂。

2 靶标 TMV CP 的保守区基因组序列

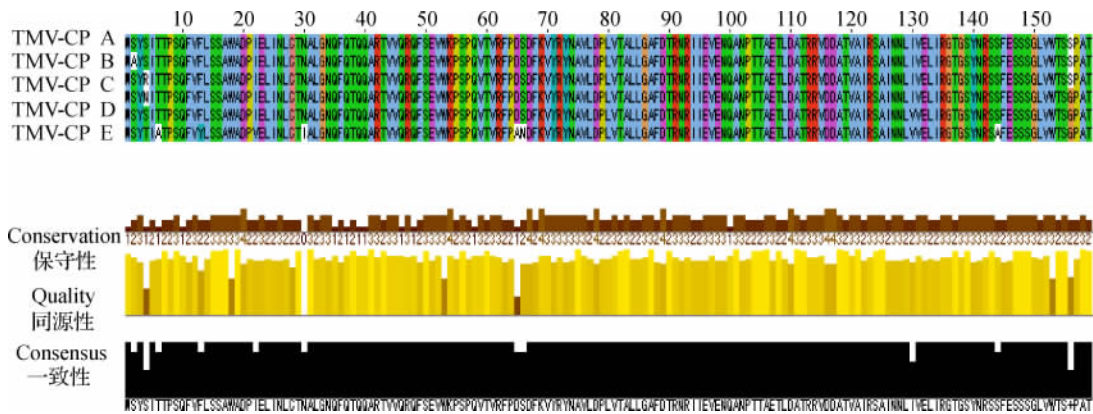
如何科学地获取 TMV CP 的基因组序列曾困扰了分子生物学家多年。直到 1982 年, Goelet 等^[21]的研究结果揭示, 寡核苷酸引物可以被用来产生 cDNA 文库, 覆盖 TMV 的整个 RNA 序列。经过一系列的分子克隆实验和测序分析, 他们获得了完整的 TMV RNA 序列。实验还表明, 该病毒是由基因组 3' 末端转录产生一到多个亚基因组 RNA, 从各个亚基因组 5' 端的开放阅读框架翻译出的功能性蛋白具有相同的羧基端序列。TMV CP 就是由 TMV 的一个亚基因组 RNA 编码的, 可通过亚基因组 RNA 策略和通读蛋白策略来获得 TMV CP。

自从 Goelet 等^[21]率先确定了 TMV-vulgare 株

系基因组全序列以来, 目前国外已经有 TMV-U1、TMV-Ob、TMV-Cr、TMV-Type、TMV-China、TMV-Rakkyo 等 20 多个 TMV 株系基因组全序列相继被确定^[22], 浙江大学周雪平等^[23]则报道了 TMV-B 株系的全序列。笔者等从 GeneBank 上获取了我国报道的 5 种 TMV CP 基因序列, 使用欧洲生物信息研究所 (EBI) 在线数据库 Clustalx 1.83 分析软件对这 5 种基因序列进行分析, 发现其同源性和一致性都在 93%~99% 之间 (图 4) (待发表)。由此可看出, TMV CP 基因序列在同一病毒不同株系中是保守的, 这一结果表明完整的 TMV CP 基因序列具有重要的研究价值。

3 靶标 CP 与寄主烟草的结构生物学研究

在 CP 的结构解析中, 主要研究热点集中在 TMV CP 基因介导的抗性方面。早在 1929 年, Mckinney^[24]就报道了交叉保护 (cross protection) 这一现象。直到 1964 年, 裴美云等^[25]才证明病毒株

图4 五种 TMV CP 基因序列比对结果^[22-23]Fig. 4 The alignment results of five TMV CP gene sequences^[22-23]

注: A、B、C、D 和 E 分别代表 5 种 TMV CP 基因序列,其 GenBank 登录号分别为 GQ370524.1、GQ370523.1、DQ352454.1、DQ352813.1 和 AY555269.1。

Note: A, B, C, D and E represent five kinds of TMV CP gene sequence, the GenBank accession number were GQ370524.1, GQ370523.1, DQ352454.1, DQ352813.1, and AY555269.1, respectively.

系间的交叉保护作用与 CP 有关。1985 年, Sanford 等^[24] 率先提出病原体引发抗性 (pathogen derived resistance, PDR) 的概念。同年, Sanford 等^[27] 提出了利用 CP 介导的病毒抗性 (coat protein-mediated viral resistance, CP-MVR) 的设想。1986 年, Beachy 等^[28] 将这一设想付诸实践, 首次将 TMV CP 基因插入修饰过的农杆菌质粒中, 并置于花椰菜花叶病毒 35S 启动子下, 经农杆菌侵染而将 TMV CP 基因转入烟草并成功获得了抗 TMV 侵染的转基因植株。这一突破性的研究成果证实了病原体引发抗性的概念, 并且标志着植物抗病毒基因工程的诞生。

1988 年, Register 等^[29] 根据从 TMV CP 基因获得抗病毒植株的实验结果, 得出了有重要意义的结论: 抗性水平与 CP 的表达量呈正相关; 抗性接种的病毒浓度有关, 接种高浓度病毒能克服 CP 基因介导的抗性; 抗性只对病毒粒子起作用, 一般不抗裸露的病毒 RNA 的攻击。到 1999 年, Beachy 等^[30] 研究发现, CP 介导的抗性 (coat protein-mediated resistance, CP-MR) 可导致 TMV CP 组装受阻, 并预测 CP-MR 可导致 TMV CP 亚基因组的基因发生改变, 从而使部分功能蛋白发生改变。他使用模拟电镜的方法给出了该结构的剖面图 (图 5)。

近年来, 随着人们对靶标 CP 与寄主烟草微观分子机理研究的逐步深入, 有关 TMV CP 融合表达的研究也取得了一些新进展, 使对靶标 CP 与寄主烟草的分子作用机理有了新的认识。2006 年, Borovsky 等^[31] 通过通读蛋白策略 (using a read-through strategy) 将昆虫的十肽激素 TMOF 基因融

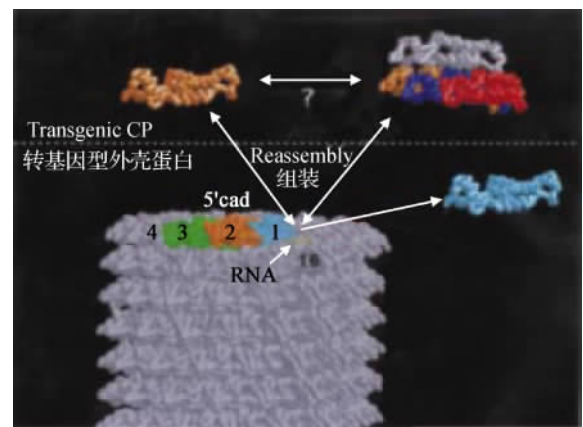


图5 计算机辅助设计模型表明转基因 TMV 的外壳蛋白 (橙色, 上) 和感病病毒之间的相互作用 (灰色, 下) 与外壳蛋白介导的抗性有关^[30]

Fig. 5 Computer-assisted graphic representation of a model that shows the predicted interactions between transgenic TMV CP (orange, upper) and challenge virus (grey, lower) that were involved in coat protein-mediated resistance^[30]

合到 TMV CP 的 C 终端基因上, 诱导 CP 的表达和 CP-TMOF 的嵌入 (图 6), 并将此病毒颗粒感染烟草, 发现植物内 RNA 积累的 TMOF 可溶性蛋白达到总蛋白的 1.3%。用感染后的烟草叶片喂食烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*, 发现其可抑制虫体内胰蛋白酶的活性, 诱导幼虫发育不良, 甚至导致幼虫生长停止, 最后死亡。由于 TMV 具有广泛的寄主范围, 在植物中表达融合 TMOF 的 TMV CP, 可使植物产生介导抗性来抵御农业害虫和控制蚊虫媒介。

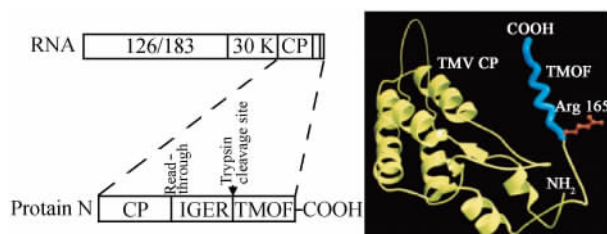


图 6 在烟草花叶病毒的病毒粒子中表达 *Aedes* trypsin-modulating oostatic 因子^[31]

Fig. 6 Expression of *Aedes* trypsin-modulating oostatic factor on the virion of TMV^[31]

注: (A) TMV-TMOF 的基因组包含一个通读阅读序列, TMV-U1 开放性阅读框体现了 126 和 183 kDa 的复制酶, 30 kDa 运动蛋白和病毒 CP 被融合为通读序列, 胰蛋白酶裂解位点和 *A. aegypti* (埃及伊蚊) TMOF 序列构建在 5' 端末尾、T7 启动子后。TMV-TMOF RNA 用 T7 RNA 聚合酶启动, 在心叶烟中组装。(B) 丝带图表示 TMV CP 与 *A. aegypti* TMOF 融合。融合蛋白的 C 端在 TMOF 的羧基端, TMV CP 用黄色表示, N 端是 NH₂。蓝色部分 TMOF 的 165 位红色的精氨酸胰蛋白酶阻止了左端螺旋的形成。

Note: (A) Genome organization of TMV-TMOF containing a read-through sequence. TMV-U1 ORF representing the replicase of 126 and 183 kDa (126K/183K), the cell-to-cell movement protein 30 kDa (30K), and the viral coat protein (CP) was fused to a read-through sequence (5-TAGCAATTA-3), a trypsin cleavage site (IEGR), and an *A. aegypti* TMOF (YDPAPPPPP) sequence behind a T7 promoter at the 5' end of the construct. The TMV-TMOF RNA was transcribed by using T7 RNA polymerase, and the transcribed RNA was mechanically inoculated onto *Ni. tabacum* (L) cv. *xanthu*. (B) Ribbon drawing by means of MOLSCRIPT of TMV CP fused to *A. aegypti* TMOF. The TMV CP is shown in yellow, and the N terminus is shown as NH₂. TMOF exhibiting a left-handed helix is shown in blue with a trypsin cleavage site at Arg165 in red. The C terminus of the fusion protein is at the carboxyl end of TMOF (COOH).

为了研究 TMV CP 截短型和突变型融合表达介导的抗性, 2006 年马铮等^[32]对野生型 TMV CP 的羧基端序列进行了一系列的缺失突变, 观察到 TMV-U1 株系在其 CP 羧基端序列缺失 6 个氨基酸 (保留 152 个氨基酸) 的情况下, 仍能较强地系统感染烟草并高水平表达 CP, 表明 CP 羧基端 6 个氨基酸序列并非 TMV 感染和复制所必需的。该研究结果还对利用 CP 羧基端缺失型病毒载体表达外源多肽有一定的启示性。2007 年, Bendahmane 等^[33]利用限制病毒组装和运动蛋白积累的方法, 突变 CP 亚基接口处的氨基酸残基上的 Glu50 和 Asp77, 并用突变后的 CP 分别转染心叶烟和 By-2 细胞, 使其在心叶烟和 BY-2 细胞中表达。结果发现, 突变的 CP 高度地干扰了病毒或 CP 相关复制酶的积累 (图 7)。从晶体结构可以明显地看出, TMV CP 上的氨

基酸残基 Glu50 和 Asp77 能影响 TMV CP 在心叶烟上的组装和复制, 这为创制新的农药化合物提供了有利的作用靶标。

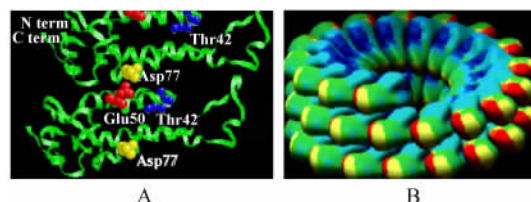


图 7 在 TMV 感染心叶烟中发生突变的 CP 的多种氨基酸可产生 CP 介导的抗性^[33]

Fig. 7 Coat protein-mediated resistance to TMV infection of *Nicotiana tabacum* involves multiple modes of interference by CP^[33]

注: (A) 丝带图代表 CP 亚基上的属于病毒转角的双重螺旋 α -carbon 骨架, N 端和 C 端位于环外, N 端的残基 Glu50、Asp77 和 Thr42 已在图上标出; (B) 电脑设计图代表 5/2 个 TMV CP 亚基的病毒螺旋, TMV CP 的 N 端和 C 端排列在亚基基因组的外表面。

Note: (A) Ribbon representation of the α -carbon backbone of two CP subunits belonging to two superimposed helical turns of TMV virion, the N and C termini located at the outer radius of the virus were indicated. The position of the interacting carboxylate residues Glu50 and Asp77 and of the Thr42 residue is shown. (B) Computer graphic representation of two and half virion helical turns of CP subunits. The N-terminus and the C-terminus of the CP molecules lie on the external surface of the assembled subunits.

为了研究 TMV CP 双基因融合表达介导的抗性, 2009 年刘丹等^[34]找到了 TMV CP 和 PVY CP 基因的部分保守序列, 将该保守序列进行双基因融合, 此双基因即为 RNAi 的靶序列。用限制性内切酶将此双基因从 pMD18-T 载体上切下, 正反向连接到 pUCCRNAi 载体上, 经酶切鉴定后, 定向连接到含超强启动子的 pC2300-35S-OCS 表达载体上, 利用冻融法将此表达载体导入只含辅助质粒的根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 中, 构建含靶序列反向重复结构的 RNAi 二元载体系统。提取转化质粒, 经酶切验证鉴定表明 TMV CP 和 PVY CP 基因植物表达二元载体构建成功。用其转化烟草, 获得了 3 株对 TMV 和 PVY 抗性显著提高的转基因烟草。

4 靶标 CP 与药剂的结构生物学研究

与通过植物病毒 CP 基因介导的抗性来增强植物的抗病能力相比, 利用药剂分子直接作用于靶标 CP 来抵御 TMV 对植物的侵染的结构生物学研究相对较少。病毒对植物产生危害的过程分为侵染寄主、体内复制和症状表现 3 个阶段, 而病毒 CP 的作

用即是在核酸注入寄主后进行体内复制。药剂分子发挥作用包括两部分: 一是当病毒 CP 在寄主体内形成但尚未表达前抑制病毒的组装; 二是在寄主表现出症状时, 通过寄主破坏病毒的 CP, 促使病毒的核酸物质被 RNA 酶降解。以下分别从植物源活性物质作用于 TMV CP 和高活性化合物作用于 TMV CP 两方面进行论述。

4.1 作用于 TMV CP 的植物源活性物质

自 1914 年报道商陆 *Phytolaccaceae acinosa* 汁液中存在抑制 TMV 活性的物质^[33]以来, 1925 年, Duggar 等^[34]首次报道了商陆抗病毒蛋白 (pokeweed antiviral protein, PAP) 具有抑制 TMV 侵染的作用, 并于随后发现美洲商陆中还含有另外 3 种具有生物活性蛋白的相似物, 它们都具有核糖体失活蛋白的活性, 能够抑制病毒 CP 的合成。黄酮 (flavonoids) 是一类具有多种生物活性的物质, 在植物中分布广泛, 许多种类的黄酮都具有抗植物病毒活性。1991 年, French 等^[37]研究表明, 黄酮类物质对 TMV 的抑制作用主要是通过减弱病毒 CP 亚基间的相互作用, 使病毒 RNA 暴露, 导致其对寄主 RNA 酶的敏感性增强而实现的。从杠板归 *Polygonum perfoliatum* 与假槟榔 *Archontophoenix alexandrae* 种子中提取的总单宁对 TMV 也具有明显的抑制作用^[38]。2003 年刘国坤等^[39]发现, TMV CP 与单宁混合后, 在蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳中表现为结合现象, 单宁对 TMV 体内复制的抑制效果不明显, 在接种 TMV 前后施用单宁并未降低 TMV 的侵染力, 表明这 2 种植物单宁对 TMV 的抑制作用可能是由于其与 TMV CP 结合而引起病毒侵染力下降或是影响了病毒 CP 对侵染位点的识别。2006 年, Ko 等^[40]进行了马蓝 *Strobilanthes cusia* 活性成分分离鉴定和抗病毒活性测定, 发现其活性成分双裂孕烷甾体 (seco-pregnane steroid glucogenin) 化合物对 TMV CP 具有较强的抑制作用 (图 8)。

为了明确双裂孕烷甾体化合物抑制 TMV 的活性, Li 等^[41]以烟草原生质体 BY-2 细胞为研究对象, 通过 Western 印迹杂交 (western blot) 技术, 发现双裂孕烷甾体化合物 1 (图 8) 在 50 nmol/L 下能完全抑制 TMV CP 的表达。同时为了验证该化合物对烟草活体内 TMV CP 表达的抑制作用, Li 等^[41]通过 GFP (green fluorescent protein) 方法标记 TMV, 并用该病毒侵染普通烟叶 K326, 发现经双裂孕烷甾体化合物作用后, 感染 TMV 的烟草在长波

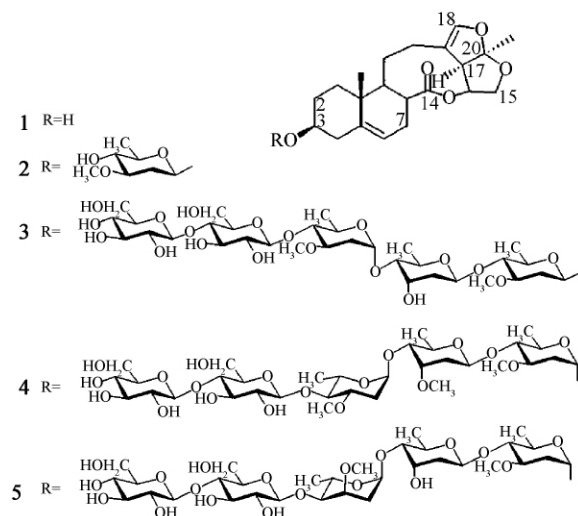


图 8 从马蓝 (1, 2) 和板蓝根 (3 ~ 5) 中分离出的抗病毒化合物双裂孕烷甾体结构^[40]

Fig. 8 Structures of the antiviral *seco*-pregnane steroid and its glycosides isolated from *S. cusia* (1 and 2) and *C. paniculatum* (3 ~ 5)^[40]

长紫外光下产生的绿色荧光点较少, 且局限在被侵染的叶片上, 而未经双裂孕烷甾体化合物作用的烟草, 其病毒侵染叶和上位叶均出现绿色荧光点, 表明双裂孕烷甾体化合物能通过抑制 CP 的表达来抑制依赖于 CP 的病毒的长距离移动, 以降低 TMV 的复制率, 减少病毒的系统性感染。为了明确双裂孕烷甾体化合物抗 TMV 作用的机理, Li 等^[41]还通过 TMV 侵染 BY-2 原生质体细胞, 采用 Northern 印迹杂交 (northern blot) 技术研究了双裂孕烷甾体化合物芫花叶白前皂甙元 (*C. glaucogenin*) 和瑶山竹皂甙元 (*C. paniculatoside*) 对 CP 亚基因组 (subgenomic RNA, sgRNA)、I₂ sgRNA 和 genomic RNA 表达的影响, 发现随着双裂孕烷甾体化合物浓度增加至 50 nmol/L, 在 TMV 侵染 BY-2 原生质体细胞 4 h 后, 双裂孕烷甾体化合物能完全抑制 CP 亚基因组 RNA 的表达, 而对基因组 RNA 不产生影响。对该结果通过普通烟 K326 活体试验进行验证, 发现双裂孕烷甾体化合物也能抑制 CP 亚基因组 RNA 的表达。因此, Li 等认为双裂孕烷甾体化合物的作用靶标为 TMV CP 亚基因组 RNA (图 9)。

娃儿藤碱 (tylophorine) 是发现于沙漠植物萝藦科鹅绒藤属牛心朴子草 *Cynanchum komarovii* 中的有效成分。2002 年, 姚宇澄等^[42]进行了牛心朴子草活性成分分离、鉴定及农药生物活性测定, 结果表明, 7-脱甲氧基娃儿藤碱 (antofine) 对 TMV、马铃薯 Y 病毒 (potato virus Y, PVY) 和芜菁花叶病毒 (tunip

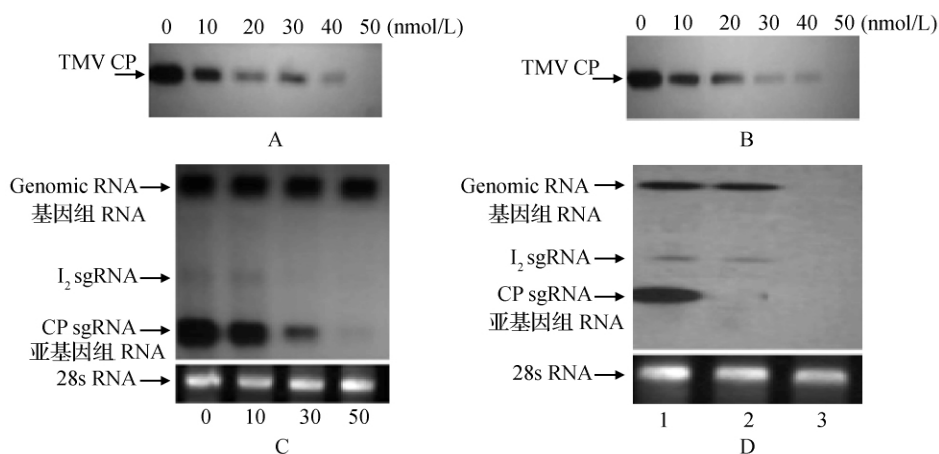


图 9 双裂孕烷甾体化合物抗 TMV 的分子作用机理^[4]

Fig. 9 The anti-TMV molecular mechanisms of seco-pregnane steroid^[4]

注: (A 和 B) 采用 Western 印迹杂交技术研究双裂孕烷甾体化合物芫花叶白前皂甙元 (*C. glaucogenin*) 和瑶山竹皂甙元 (*C. paniculatoside*) 对感染 TMV 的原生质体细胞的 TMV CP 的抑制作用; (C) 采用 Northern 印迹杂交技术, 观察双裂孕烷甾体化合物抑制 BY-2 原生质体细胞中 CP sgRNA、I₂ sgRNA 和 genomic RNA 表达的影响; (D) 采用 Northern 印迹杂交技术, 观察双裂孕烷甾体化合物抑制普通烟 K326 的 CP sgRNA、I₂ sgRNA 和 genomic RNA 表达的影响。

Note: (A and B) Effects of *C. glaucogenin* and *C. paniculatoside* on accumulation of TMV CP in protoplasts. (C) Northern blot analysis of viral RNAs with the CP gene sequence as a probe. (D) Northern blot analysis of the effect of *C. paniculatoside* on expression of TMV RNAs in *N. tabacum* cv. K326 plants.

mosaic virus, TuMV) 均有不同程度的抑制活性。2005-2009 年, 南开大学席真等^[43-46]研究确定了牛心朴子草主要活性成分为 7-脱甲基娃儿藤碱, 即安托芬 (antofine), 并通过荧光测定、电镜等手段研究了安托芬与 TMV RNA 及起始位点 RNA (oriRNA) 的相互作用, 发现安托芬可高效抑制 TMV 病毒组装。随后, 席真等对安托芬作用靶点的分子对接研究发现: 安托芬结合于 TMV 病毒组装起始位点 RNA Loop 中, 与 G1 和 A3 碱基形成“三明治”型复合物, 占据 TMV 正常组装的 CP 结合位点, 阻碍病毒颗粒的组装, 从而抑制其侵染。2009 年, 何灿兵^[47]以间接法测定六角仙 *Rostellularia procumbens* 提取物对 TMV CP 抗原位点的影响, 发现其对 CP 抗原位点作用显著, 阳性对照 OD₄₀₅ 值与处理以及阴性对照 OD₄₀₅ 值的比值均大于 2, 表明六角仙提取物对 CP 的抗原决定簇可能具有某种影响, 阻碍了抗体与 CP 抗原位点之间的结合, 影响了 TMV CP 在寄主体内的合成, 使病毒颗粒发生钝化或降低病毒颗粒与寄主侵染位点的识别能力, 导致病毒侵染力下降。

4.2 作用于 TMV CP 的高活性化合物

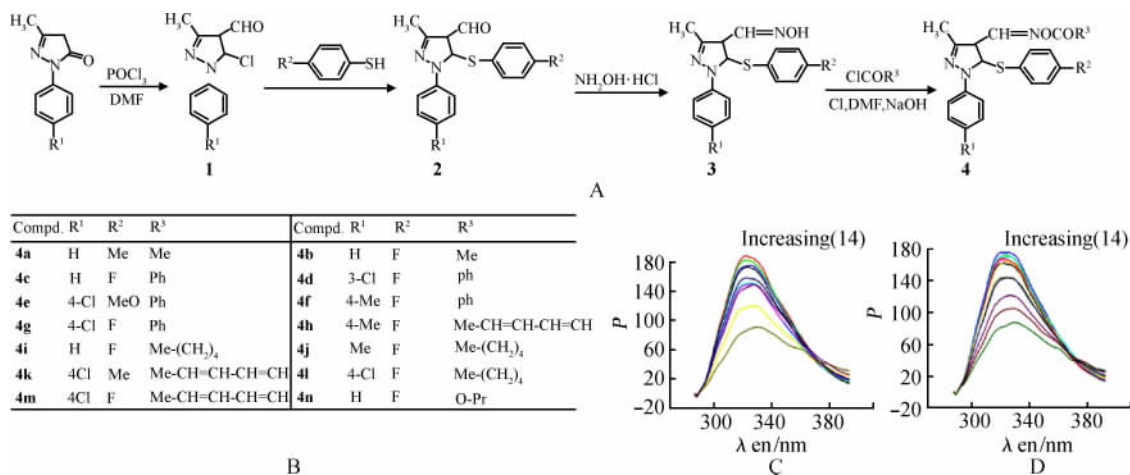
为了探讨药剂如何作用于 CP, 干扰病毒粒子的装配过程, 1996 年江山等^[48]研究了多种植物病毒防治药剂对 TMV CP 聚合过程的影响, 发现 C9-16 烷基单磺酸 (E30) 对其的抑制作用最强, 其次是 3 种碱基类似物: 2, 4-二氧代六氢-1, 3, 5-三嗪

(DHT)、二乙酰均三嗪-2, 4-二酮 (DADHT) 和病毒唑。这些药剂与病毒的相互作用阻碍了 TMV CP 与 RNA 的组装, 从而起到防治病毒的作用。2008 年, 笔者等^[49]合成了 14 个 1-取代-5-取代苯硫基-4-吡啶醛肟酯衍生物, 室内心叶烟半叶枯斑法试验表明, 其中吡啶衍生物 4i 对 TMV 具有较高的钝化活性。同年, 笔者等^[49]进一步分离纯化了 TMV RNA 和 CP 组分, 通过荧光光谱和紫外波谱研究发现, 4i 与 TMV CP 作用后, 在波谱上引起了荧光淬灭和红移, 而与 TMV RNA 和花菁类染料作用后却没有明显的波谱特征改变, 提示吡啶衍生物 4i 抗 TMV 的作用靶标位于 CP 上, 可能产生和 CP 的特异亲合, 从而抑制病毒的增殖和转移 (图 10)。

5 分子靶标导向的抗植物病毒药剂研究新技术

目前, 农药创制正在充分借鉴医药创制研究的成功模式, 如分子靶标导向的药剂合理设计、定量结构-活性关系 (QSAR) 的计算机辅助农药分子设计、蛋白的空间结构模拟、药剂与靶标的分子对接, 以及化学生物学结合结构生物学进行药剂与分子靶标相互作用模式的研究等都已先后在新农药的创制中得到应用。

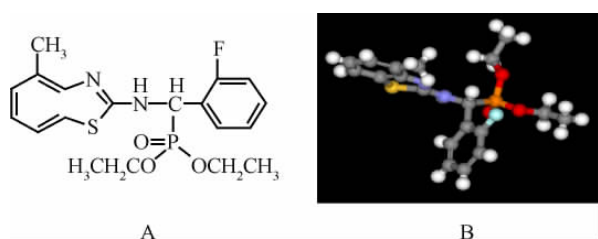
2002 年, 笔者等^[50-52]创制出高效的抗 TMV 药剂毒氟磷 (dufulin), 该药剂属 α -氨基烷基膦酸酯类

图 10 吡唑衍生物合成路线及作用机制^[49]Fig. 10 Synthesis path and the mechanism of pyrazole derivatives^[49]

注: (A 和 B) 吡唑衍生物的合成路线图; (C 和 D) 吡唑衍生物 4i 与 TMV CP 4S 和 20S 亚基作用的荧光滴定实验。

Note: (A and B) Synthetic path of pyrazole derivatives. (C and D) Interaction of pyrazole derivatives 4i and TMV CP 4S and 20S subunits by fluorescence titration.

化合物,已获农业部农药临时登记证,成为了我国第一个具有自主知识产权的、仿生合成的抗病毒药剂品种(图 11)。相关文献资料^[53-55]表明:该药剂作用靶点可能在 TMV CP 上,且药剂毒性低,对环境生物友好;毒氟磷在黑土中的吸附常数为 45.8,按照国内《化学农药环境安全评价试验准则》对农药在土壤中吸附性的等级划分标准,其在黑土中的吸附性为Ⅲ级(中等吸附),毒氟磷抗 TMV 的活性优于 20% 盐酸吗啉胍·铜(moroxydine hydrochloride copper acetate)等多种市售的抗植物病毒药剂。

图 11 毒氟磷分子结构^[51]Fig. 11 Molecular structure of dufulin^[51]

注: (A) 毒氟磷的化学结构式; (B) 毒氟磷的晶体结构式。

Note: (A) The chemical structure of dufulin. (B) The crystal structure of dufulin.

2006-2010 年,笔者等^[56-57]为探明毒氟磷的分子作用机理,以普通烟 K326-TMV 为研究模型,通过 Real-time PCR 和半定量 PCR 方法,发现毒氟磷可诱导烟草病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins, PRs)基因 PR-1a 和 PRs 蛋白表达上调;通过酶生物化学试验发现,毒氟磷可在一定时间内诱

导烟草防御酶活性增强,表明其可激活烟草产生系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR);笔者等采用高灵敏度和高重复性的荧光标记二维凝胶电泳(two dimensional-difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)-质谱联用技术及生物信息学方法和专业软件来寻找毒氟磷诱导普通烟 K326 的差异靶标蛋白,发现其可激活水杨酸(salicylic acid, SA)信号通路,使下游的 PR-1a 蛋白表达增加。这一系列分子作用机理研究结果表明,毒氟磷属于一种新型抗植物病毒免疫激活剂。随着对 TMV CP 结构的深入了解,笔者根据 PDB 数据库中已报道 TMV CP 的晶体结构(PDB 登录号: 2TMV),利用 Discovery Studio 分子对接软件进行了分子的模拟对接,令人兴奋地发现毒氟磷苯并噻唑环上的 N 与 TMV CP 的 Thr 89 侧链部分 O-H 上的氢原子形成了较强的氢键,且毒氟磷磷酸酯部分乙氧基上的 O 与 TMV CP 的 Arg 113 侧链残基上的 N 和 H 形成了氢键作用(未发表)(图 12)。为探明毒氟磷分子与 TMV CP 这一交联现象是否会影响到 TMV CP 的结构、占据 TMV 正常组装 RNA 的结合位点,笔者进行了 TMV CP 的体外克隆、表达与纯化(未发表),正在尝试进行 TMV CP 晶体和 TMV CP 与药剂毒氟磷复合物的晶体培养,以期更进一步研究 CP 与毒氟磷之间的相互作用关系。

6 结语

综上所述,目前抗 TMV 药剂分子靶标的结构生物学研究主要集中在靶标 CP 与寄主烟草之间的

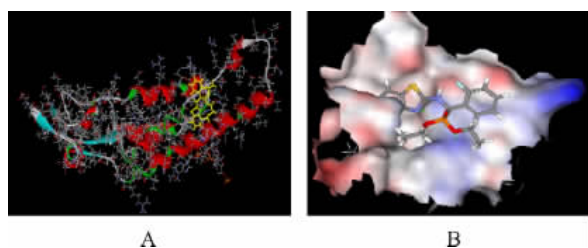


图 12 抗病毒药剂毒氟磷与靶标 TMV CP 的对接结果^[56-57]

Fig. 12 The binding of anti-TMV agent dufulin with the protein target TMV CP^[56-57]

注: (A) 毒氟磷与靶标 TMV CP 对接的丝带模型图; (B) 毒氟磷与靶标 TMV CP 对接的表面模型图。

Note: (A) The ribbon model diagram of anti-viral agents dufulin binding the molecular target TMV CP. (B) The surface model diagram of anti-viral agents dufulin binding the molecular target TMV CP.

相互关系上。如靶标 CP 介导的抗病性研究,包括靶标 CP 插入外源基因融合表达介导的抗病性研究、靶标 CP 截断型和交叉型外源基因融合表达介导的抗病性研究等,这些研究成果对诱导烟草产生抗病性具有重要作用。同时, TMV 作为一种模式病毒,其 CP 结构、RNA 结构、CP 与 RNA 之间的相互作用关系以及 CP 在基因工程领域的应用等也是目前研究比较深入的。以晶体结构 CP 为抗 TMV 药剂的分子靶标,建立基于 CP 分子靶标的结构生物学模型,获得高活性的、广谱抗病毒的药剂,对指导农业生产中该病害的防治具有重要意义。

谨以此文敬贺李正名院士八十华诞!

参考文献:

- [1] FRESER R. Mechanisms of Resistance to Plant Disease [M] // Special Aspects of Resistance to Viruses, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000: 480.
- [2] WU Yun-feng(吴云峰), CAO Rang(曹让), WEI Ning-sheng(魏宁生), et al. 生物病毒农药筛选及应用 [J]. *World Agriculture*(世界农业), 1995(5): 35-36.
- [3] MATTHEWS R. Plant Virology [M]. San Diego: Academic Press Inc, 1991: 340.
- [4] FRANTZ S. Drug discovery: playing dirty [J]. *Nature*, 2005, 437: 942-943.
- [5] MOORE N A, CALLIGARO D O, WANG D T, et al. The pharmacology of olanzapine and other new antipsychotic agents [J]. *Curr Opin Invest Drugs*, 1993, 2(4): 281-293.
- [6] STUBBS G J. The effect of disorientation on the intensity distribution of noncrystalline fibres [J]. *Acta Cryst*, 1974, 30(5): 639-645.
- [7] CHAMPNESS J N, BLOOMER A C, BRICOGNE G, et al. The structure of the protein disk of tobacco mosaic virus to 5 Å resolution [J]. *Nature*, 1976, 259: 20-24.
- [8] SACHSE C, CHEN J Z, COUREUX P D, et al. High-resolution electron microscopy of helical specimens: a fresh look at tobacco mosaic virus [J]. *J Mol Biol*, 2007, 371: 812-835.
- [9] NAMBA K, PATTANAYEK R, STUBBS G. Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus; refinement of intact tobacco mosaic virus [J]. *J Mol Biol*, 1989: 208-307.
- [10] PATTANAYEK R, STUBBS G. Structure of the U2 strain of tobacco mosaic virus refined at 3.5 Å resolution using X-ray fiber diffraction [J]. *J Mol Biol*, 1992, 228: 516-528.
- [11] STUBBS G. Tobacco mosaic virus particle structure and the initiation of disassembly [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1999, 354(1383): 551-557.
- [12] WILLEM K, PAUL V. Physical regulation of the self-assembly of tobacco mosaic virus coat protein [J]. *J Biophysical*, 2006, 91(4): 1501-1512.
- [13] DEDEO M, DUDERSTADT K, BERGER J, et al. Nanoscale protein assemblies from a circular permutant of the tobacco mosaic virus [J]. *Nano Lett*, 2010, 10(1): 181-186.
- [14] YUAN L, ELIZABETH B, ANDREW L. Self-assembly of rodlike bio-nanoparticles in capillary tubes [J]. *Angew Chem*, 2010, 49: 868-872.
- [15] GAGANDEEP K, MANI T, JAY D, et al. Regulation of osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells on 2D nanorod substrates [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 1732-1741.
- [16] NIU H J, LIU J, ANDREW L, et al. Biological templated synthesis of water-soluble conductive polymeric nanowires [J]. *Nano Lett*, 2007, 7(12): 3729-3733.
- [17] ONACA O, ENEA R, HUGHES D W, et al. Stimuli-responsive polymersomes as nanocarriers for drug and gene delivery [J]. *Macromol Biosci*, 2009, 9(2): 129-139.
- [18] MENG F H, ZHONG Z Y, FEIJEN J. Stimuli-responsive polymersomes for programmed drug delivery [J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10(2): 197-209.
- [19] MITRAGOTRI S, LAHANN J. Physical approaches to biomaterial design [J]. *Nat Mater*, 2009, 8(1): 15-23.
- [20] YAN E Y, DING Y, CHEN C J, et al. Polymer/silica hybrid hollow nanospheres with pH sensitive drug release in physiological and intracellular environments [J]. *Chem Commun*, 2009, 19: 2718-2720.
- [21] GOELET P, LOMONOSOFF G P, BUTLER P J G, et al. Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79: 5818-5822.
- [22] FU Ming-jia(付鸣佳), GAO Qiao-wan(高乔婉), FAN Huai-zhong(范怀忠). 烟草花叶病毒株鉴定研究进展 [J]. *J South China Agric Univ*(华南农业大学学报), 1997, 18(1): 113-117.
- [23] ZHOU Xue-ping(周雪平), ZHANG Long-cun(张龙存), CHEN Ji-shuang(陈集双), et al. 侵染蚕豆的烟草花叶病毒研究 [J]. *Virologica Sinica*(中国病毒学), 1995, 10(1): 81-85.
- [24] MCKINNEY H M. Strain identification and cross-protection of potato virus Y affecting tobacco in Chile [J]. *Plant Disease*, 1929, 69: 930-932.
- [25] PEI Mei-yun(裴美云), TIAN bo(田波), CUI wen-hua(崔文华). 油菜花叶病毒 15 号和菸花叶病毒间干扰作用的研究 [J]. *Acta Biochimica Sinica*(植物病理学报), 1964, 2(7): 160-164.
- [26] SANFORD J C, JOHNSTON S A. Successful strategies based on

- pathogen-derived resistance [J]. *J Theor Biol*, 1985, 113: 395–405.
- [27] SANFORD J C, JOHNSTON S A. Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants [J]. *J Gen Virol*, 1985, 80: 1339–1346.
- [28] BEACHY R N, POWELL A, NELSON R S, *et al.* In *Molecular Strategies for Crop Improvement* [M]. New York: A R Liss Press, 1986: 205–213.
- [29] REGISTER J C, BEACHY R N. Resistance to TMV in transgenic plants results from interference with an early event in infection [J]. *Virology*, 1988, 166: 524–532.
- [30] BEACHY R N, ZAITLIN M. Transgenic plants that produce TMV CP are resistant to TMV infection [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1999, 54(1383): 659–664.
- [31] BOROVSKY D, RABINDRAN S, DAWSON W O, *et al.* Expression of *Aedes* trypsin-modulating oostatic factor on the virion of TMV: a potential larvicide [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(50): 18963–18968.
- [32] MA Zheng(马铮), LI Qiao-li(李巧丽), SONG Ren-tao(宋任涛), *et al.* 外壳蛋白羧端序列缺失对烟草花叶病毒侵染性的影响 [J]. *Chin J Virology*(病毒学报), 2005, 21(4): 298–302.
- [33] BENDAHDANE M, CHEN L. Coat protein-mediated resistance to TMV infection of *Nicotiana tabacum* involves multiple modes of interference by coat protein [J]. *Virology*, 2007, 366: 107–116.
- [34] LIU Dan(刘丹), GUO Zhao-kui(郭兆奎), WAN Xiu-qing(万秀清), *et al.* TMV 和 PVY 外壳蛋白双基因融合干涉烟草转化 [J]. *Genomics and Applied Biol*(基因组学与应用生物学), 2009, 28(3): 450–454.
- [35] 裘维蕃(QIU Wei-fan). *Phytovirology*(植物病毒学) [M]. Beijing(北京): China Agricultural Press(中国农业出版社), 1984: 237–350.
- [36] DUGGAR B M, ARMSTRONG J K. The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juice of various plants [J]. *Ann Missouri Bot Gard*, 1925, 12: 359–366.
- [37] FRENCH C, ELDER M, LEGGETT F, *et al.* Flavonoids inhibit infectivity of tobacco mosaic virus [J]. *Can J Plant Pathol*, 1991, 13: 1–6.
- [38] LIN Qi-tao(林启寿). *Chinese Herbs Chemical*(中草药成分化学) [M]. Beijing(北京): Science and Technology Press(科学技术出版社), 1977: 167–168.
- [39] LIU Guo-kun(刘国坤), XIE Lian-hui(谢联辉), LIN Qi-yin(林奇英), *et al.* 15 种植物的单宁提取物对烟草花叶病毒(TMV) 的抑制作用 [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*(植物病理学报), 2003, 33(3): 279–283.
- [40] KO H C, WEI B L, CHIOU W F. The effect of medicinal plants used in Chinese folk medicine on RANTES secretion by virus-infected human epithelial cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 107(2): 205–210.
- [41] LI Y M, WANG L H, LI S L, *et al.* Seco-pregnane steroids target the subgenomic RNA of alphavirus-like RNA viruses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(19): 8083–8088.
- [42] YAO Yu-cheng(姚宇澄), YANG Zhao(杨召), GAO Jun(高俊). 牛心朴子草抗植物病毒组分的生物活性研究 [J]. *J Inner Mongolia Polytechnic Univ*(内蒙古工业大学学报), 2002, 21(1): 1–4.
- [43] XI Z, ZHANG R Y, YU Z H, *et al.* Selective interaction between tylophorine B and bulged DNA [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15(10): 2673–2677.
- [44] ZHANG Ruo-yu(张蓓瑜), YU Zhi-hong(余志红), XI Zhen(席真). 娃儿藤碱 B 抑制烟草花叶病毒的组装 [C] // The seventh national academic exchange meetings of new chemicals research(第七届全国新农药创制学术交流会会议论文集). Zhejiang(浙江), 2007: 94–96.
- [45] ZHANG Ruo-yu(张蓓瑜). Studies on inhibition of tobacco mosaic virus and its interaction with antofine(安托芬与核酸相互作用及抑制烟草花叶病毒机理的研究) [D]. Tianjin(天津): Nankai University(南开大学), 2008.
- [46] GAO Shuang(高爽), WEN Xin(文欣), XI Zhen(席真), *et al.* Crosslinking of the capsid protein and its effect on infectivity and stability of tobacco mosaic virus(烟草花叶病毒外壳蛋白的交联作用及其对烟草花叶病毒的传染性和稳定性影响) [C] // The Sixth National Conference on Chemical Biology(第六届化学生物学年会), Xiamen(厦门), 2009: 278–279.
- [47] HE Can-bing(何灿兵). Antiviral activity and mechanism of anti-viral constituents against TMV from *Rostellularia*(六角仙抗烟草花叶病毒生物活性及作用机制的研究) [D]. Fujian(福建): Fujian Agriculture and Forestry University(福建农林大学), 2009.
- [48] JIANG Shan(江山), HAN Xi-lai(韩熹莱). 植物病毒病化学防治的研究进展 [J]. *Virologica Sinica*(中国病毒学), 1995, 10(1): 1–7.
- [49] SONG Bao-an(宋宝安), YANG Song(杨松), JIN Lin-hong(金林红), *et al.* Environment-friendly Antiviral Agents for Plants(环境友好抗植物病毒剂) [M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2009: 234.
- [50] SONG Bao-an(宋宝安), WU Yang-lan(吴扬兰), HUANG Rong-mao(黄荣茂). 具有农用抗植物病毒活性的含氟 α -氨基膦酸酯及其合成: ZL 02113252.6 [J]. 2003-07-30
- [51] ZHANG G P, SONG B A, XUE W, *et al.* Synthesis and biological activities of novel dialkyl-4-(4-trifluoromethylphenylamino)-1-(4-(4-trifluoro-methyl or 3-fluorophenyl) methyl-phosphonate [J]. *J Fluorine Chem*, 2006, 127(1): 48–53.
- [52] ZHANG Guo-ping(张国平), ZI Yan-qin(訾言勤), WANG Yong-qiu(王永秋), *et al.* α -氨基膦酸酯的合成方法研究进展 [J]. *Chin J Synthetic Chemistry*(合成化学), 2008, 16(3): 247–251.
- [53] SONG Bao-an(宋宝安), YANG Song(杨松), HU De-yue(胡德禹), *et al.* 新型抗病毒剂病毒星的创制研究 [J]. *J Huazhong Normal Univ*(华中师范大学学报), 2007, 41(2): 218–222.
- [54] CHEN Zhuo(陈卓), YANG Song(杨松). 自主创制抗植物病毒新农药: 毒氟磷 [J]. *World Pesticides*(世界农药), 2009, 31(2): 52–54.
- [55] CCIEPA. Effluent standard of pollutants for organic phosphate pesticides industry [GB/OL]. [2008-07-13]. <http://www.cciepa.org.cn/>
- [56] CHEN Zhuo(陈卓), SONG Bao-an(宋宝安), HU De-yu(胡德禹), *et al.* 抗植物病毒农药的化学生物学研究进展 [C] // National seminar PhD technology of the first pesticide science in 2009(2009 年首届农药科学全国博士生研讨会论文集), Guiyang(贵阳), 2009: 15–29.
- [57] CHEN Zhuo(陈卓), SONG Bao-an(宋宝安), YANG Song(杨松), *et al.* 抗植物病毒农药的化学生物学和作用机制新研究进展 [C] // China congress of plant protection in 2010(中国植物保护学会 2010 年学术年会论文集), Hebi(鹤壁), 2010: 585–596.

(责任编辑: 唐 静)