

丙酰紫草素对病毒的钝化作用^①

李重九^② 费 菁

(基础科学与技术学院)

福士幸治 川端潤 田原哲士 水谷纯也 上田一郎

(日本北海道大学农学部)

摘 要 烟草花叶病毒与丙酰紫草素结合而失活,用萃取法除去化合物后可使病毒粒子恢复侵染力,并且其沉降系数及光谱特性并不改变。

关键词 烟草花叶病毒; 丙酰紫草素; 钝化; 中草药

中图分类号 S432.41

Inactivate Function of the Propionylshikonin for TMV

Li Chongjiu Fei Jing

(College of Fundamental Sciences & Technology)

Yukiharu Fukushi Jun Kawabata Satoshi Tahara Junya Mizutani Ichiro Uyeda

(Hokkaido University, Japan)

Abstract The TMV particles combined with propionylshikonin and were inactivated, which could be recovered by extracting propionylshikonin from virus particles; and the sedimentation coefficient, UV-VIS spectrum of virus were not changed.

Key words TMV; propionylshikonin; inactivating

紫草(*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.)有消炎愈创作用,在我国自古被做为外用药剂。近代从紫草中分离出一系列萘醌类化合物^[1],并发现它们对真菌、病毒有灭活作用。为探讨这类化合物的作用机理,研究了经其处理后,病毒的紫外可见光谱、沉降系数及侵染力的变化。

1 材料及方法

1.1 供试材料

化合物丙酰紫草素,从紫草中分离、纯化,经NMR,IR,MS鉴定分子结构。烟草花叶病毒TMV,日本北海道大学病毒研究室提供。珊西烟(*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi,nc)于温

收稿日期: 1997-02-04

①国家自然科学基金资助(39370473)及日本新事业技术团资助

②李重九,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

室中繁殖。

1.2 仪器

超速离心机 Beckman LM-8。紫外可见分光光度计 HITACHI, U-3210 Spectrophotometer。

1.3 试验方法

用丙酮将丙酰紫草素配成 10% 溶液, 将病毒悬浮液 ($6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 分成两组: ①加入 1/10 体积丙酮溶液, 为对照样本; ②加入 1/10 体积的丙酰紫草素/丙酮溶液, 为处理样本。两组分别混匀后, 经 10%~40% 蔗糖密度梯度离心 ($25\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 2 h) 后; 从离心管底部开始, 将样品分为 34 个组分。测定每一组分的紫外可见吸收光谱 (190~700 nm), 合并相似的组分, 在珊西烟上接种, 检测病毒活性。同时测定丙酰紫草素及其与病毒混合后的光谱变化。

为探讨化合物对病毒侵染活性的影响, 将 TMV 悬浮于磷酸缓冲液中, 分为两组, 分别用 1/10 体积丙酮及 1% 化合物溶于 1/10 体积丙酮处理。再将处理组及对照组平均分为 A, B 两部分, 用处理 A 及对照 A 在珊西烟的左右两半叶上接种, 将处理 B 及对照 B 用乙酸乙酯萃取后在珊西烟左右两半叶上接种, 25°C 处理 3 d 后, 计算枯斑数。

2 结果与讨论

丙酰紫草素在磷酸缓冲液中的特征吸收峰为 302, 490, 523, 576 nm, 由于含有芳环, 它在 200~260 nm 之间吸收值很强。当它与病毒混合后, 于 420 nm 产生一个低矮的吸收峰, 说明病毒粒子与化合物之间发生了关系。将处理组及对照组病毒悬浮液进行蔗糖密度梯度离心后, 分析各部分光谱吸收值的特征。病毒由蛋白质及核酸组成, 其蛋白质的特征吸收峰为 280 nm, 核酸特征吸收峰为 260 nm。TMV 含 5% 核酸, 其 260 nm 与 280 nm 的吸收值之比为 1.19。用 260 nm 代表病毒的特征吸收峰, 用 523 nm 代表化合物的特征吸收峰, 离心后化合物及病毒在离心管中所处的位置图见表 1, 图 1。图 1(a, b, c) 为离心管中不同部分的溶液在 260 nm 处的吸收值, 正常 TMV 病毒粒子的沉降系数为 198, 它处于离心管的中部 (a 线空白组对照)。TMV 粒子在丙酮作用下在离心管的上部及中部各产生了一条谱带 (b 线, 对照样本); 病毒粒子在化合物/丙酮共同作用下产生了三条谱带, 离心管底部有少量沉淀物 (c 线, 处理样本)。由于化合物含芳环, 在 260 nm 也有很强的吸收值, 所以 c 线为病毒粒子与化合物共同作用产生的。为说明化合物的位置, 用 523 nm 特征吸收波长作图 (图 1 d 线) 为化合物在离心管中的位置, c 线与 d 线重合, 这表明化合物与病毒粒子结

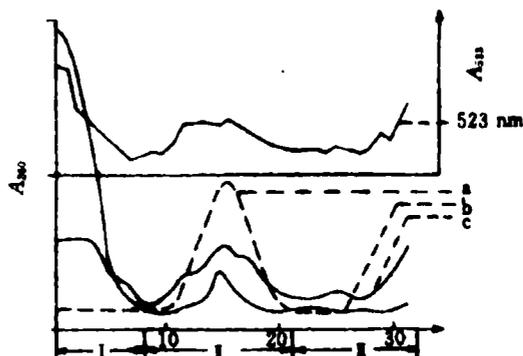


图 1 病毒及化合物在离心管中的位置

合,形成了病毒-化合物复合体。按光谱吸收峰的位置,可将离心管中的液体及沉淀从上至下分为四个部分(图 2):(I),0~8 mL;(II),9~22 mL;(III)23~34 mL;(N)沉淀。

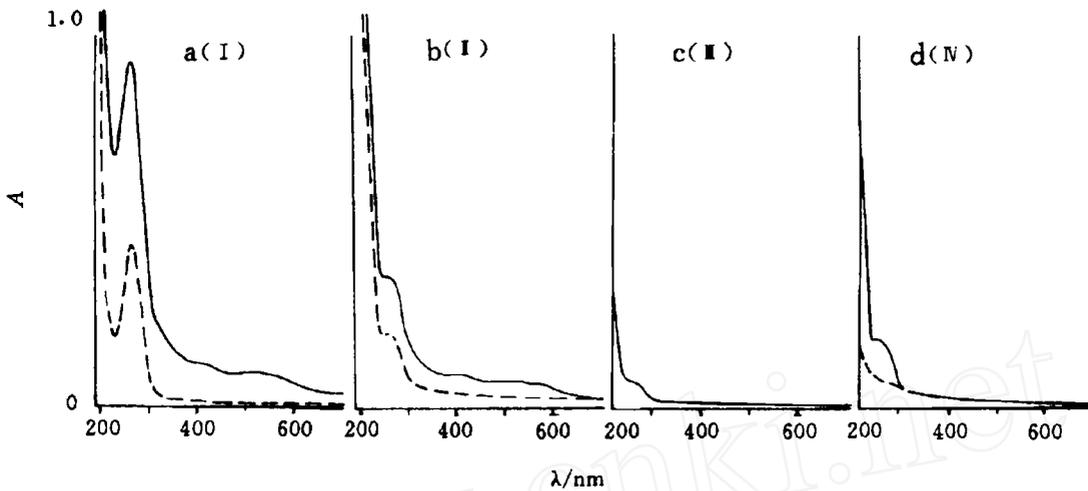


图 2 各部分的光谱图

—处理样本;对照样本.

第 I 部分的吸收光谱为图 2a,由于化合物的存在,使处理样本的吸收值大于对照样本。用乙酸乙酯萃取,除去化合物后,无论是对照样本还是处理样本, $A_{260}/A_{280}=1.3$,说明蛋白质的比例下降。如将它们不经萃取直接进行透析,则二者在 260 nm 的吸收值均下降。这说明核酸的量在减少。同时,由于这一部分的沉降系数小于正常 TMV 粒子,处于离心管的上部。由此可知,这一部分为破碎的病毒粒子。病毒粒子在化学试剂的作用下分解,部分蛋白质凝集沉淀,断裂的核酸碎片可通过透析袋的孔径。这些碎片沉降系数大大低于正常 TMV 粒子。如将其置于 10%蔗糖垫上,经 $35\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 h,它并不沉降。

第 II 部分在离心管中的位置与 TMV 相同,其光谱图见图 2(b)。与第 I 部分相同,由于处理样品中化合物的影响,其吸收值高于对照样本。用乙酸乙酯除去化合物后进行光谱测定。无论对照样本还是处理样本, A_{260}/A_{280} 值均接近 1.19^[2]。将它们离心沉淀降去蔗糖后,沉淀物悬浮于磷酸缓冲液中,在珊西烟叶片上接种,可产生病斑反应。由此可见,第 II 部分为完整的 TMV 粒子。第 III 部分的吸收光谱见图 2(c)。对照样本吸收值极低。处理样本用乙酸乙酯萃取,分别将处理样本及对照样本在珊西烟上接种,都不产生枯斑。这一部分是在丙酮或化合物作用下失活的 TMV 碎片凝集的产物。处理样本在离心管底部产生沉淀,其图谱为图 2(d)。将沉淀物萃取后经光谱测定,其 A_{260}/A_{280} 为 1.2,它可在珊西烟叶片上产生枯斑。由此可见,在化合物作用下,使部分 TMV 粒子凝聚而加大了沉降系数,经萃取除去化合物后,病毒又恢复了侵染力。表 1 总结了上述试验结果。并根据 $E_{260}=3$ ^[3] 计算完整 TMV 粒子的含量。

由表 1 可见处理组与对照组中完整 TMV 总量无差别, TMV 粒子的破碎是丙酮所致。经化合物处理后,部分碎片及完整的 TMV 粒子凝集,加大了沉降系数。由此说明,化合物对

病毒粒子的完整性未产生影响,用化合物处理病毒后,在烟草枯斑寄主上接种,不产生病斑;当用乙酸乙酯萃取除去化合物后再接种,其病斑数与对照组相比,无显著差异(表2)。

表1 病毒粒子在离心管中的分布

项 目	样 品				完整 TMV 总量 /mg
	I (TMV 碎片)	II (完整 TMV)	III (凝集的碎片)	IV (凝集的 TMV)	
对照	A_{260}	2.550	1.206	0.052	
	TMV/mg		0.402		0.402
处理	A_{260}	2.390	1.071	0.165	0.139
	TMV/mg		0.357	0.046	0.403

表2 化合物对病毒的钝化作用(病斑数/半叶)

处 理	重复 1	重复 2	重复 3
用正丁醇萃取前			
处理 A	0	0	0
对照 A	119	82	105
用正丁醇萃取后			
处理 B	439	94	33
对照 B	441	102	39

用化合物处理后,病毒失去了侵染力,在叶片上不产生病斑。但化合物并没有杀死病毒,萃取除去化合物后,在珊西烟上接种,两半叶上的病斑数相近。综上所述,被测化合物的抗病毒作用之一是与病毒粒子相结合,形成病毒-化合物复合体,从而抑制了病毒侵染,但这种抑制可以通过除去化合物来解除。

参 考 文 献

- 1 Shuji Hisamichi, Fumihiko Yoshizaki, et al. Studies on the Shikon (I). Shoyakugaku Zasshi, 1982, 36 (2): 154~159
- 2 Ralfe Matthews. Plant Virology (second edition). New York: Academic Press, 1981
- 3 平井笃造, 四方英四郎等. 植物ウイルス学. 日本东京养贤堂出版. 1988