

北京苜蓿花叶病毒 H-10 分离物的研究

II. 病毒外壳蛋白质及病毒核酸各组分的分离

蔡发兴 彭学贤 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京)

分离纯化了 AMV-H-10 的核酸和外壳蛋白质, 测定了核酸的生物活性和分子量。外壳蛋白质分子量约为 24,500。四种核酸的分子量: $RNA_1-1.3 \times 10^6$ 、 $RNA_2-1.1 \times 10^6$ 、 $RNA_3-0.80 \times 10^6$ 、 $RNA_4-0.48 \times 10^6$ 。这数据与 Hull 所测定的基本相同, 但比实际的分子量偏高, 文中对此进行了讨论。用电泳洗脱法分离纯化了 H-10 的 $RNA_{3,4,5}$; RNA_5 是卫星 RNA 还是病毒基因组在提纯过程中的降解产物, 有待进一步证明。

苜蓿花叶病毒 (AMV) 是个具有多型性颗粒的三分基因组病毒, 其主要的三种颗粒组分称之为 B、M 和 T_b (按沉降常数递减的次序) 各组分所含核酸分别为 RNA_1 、 RNA_2 和 RNA_3 。第四种颗粒组分称 T_s (比 T_b 沉降的稍慢), 并含 RNA_4 ^[1]。 RNA_4 是一亚基因组 RNA (Subgenomic RNA) 该 RNA 只编码外壳蛋白质, 而且是在体外翻译体系中为极有效的外壳蛋白的 mRNA^[2]。B、M 和 T_b 混合有侵染性, 但 RNA_1 、 RNA_2 、 RNA_3 混合无侵染性, 若加少量 RNA_4 或外壳蛋白质则有侵染性^[3,4]。这一特性显然与其它大多数三分基因组病毒不同。AMV 颗粒形态与所有其它三分基因组病毒不同是杆菌状, 就目前所知只有蜜蜂慢性麻痹病, 可可树肿梢病, 可可树叶斑驳病和一种蘑菇病毒有类似的形态。AMV 所有这些特点早已引起病毒学、病毒分子生物学以及生物化学工作者的广泛注意。

我们已从北京苜蓿分离到 AMV-H-10 分离物^[5]。本文报道该分离物外壳蛋白质和核酸的分离及其分子量的测定, 值得注意的是 H-10 除四种 RNA 外, 还看到一种比 RNA_4 更小的 RNA。它是卫星 RNA

还是完整的基因组 RNA 的降解产物有待证明。为了进一步研究四种 RNA 的表达, 本文还报道用电泳洗脱法对 H-10 的 RNA_3 、 RNA_4 、 RNA_5 (?) 三种核酸的分离纯化。

材料和方法

(一) 病毒的提纯如前述^[5]

(二) 核酸的提取

将浓度为 10mg/ml 的病毒溶液 10ml (在 0.1M 磷酸缓冲液中, pH7.0), 与等体积的水饱和的重蒸酚混合, 并将此液调成 0.3% SDS 和 0.3M NaAc 的溶液。4℃ 下强烈振荡 10 分钟, $5000 \times g$ 离心 10 分钟, 取水相, 再用其 1/2 体积的酚抽提, 取水相, 如此反复 3 次。所得水相用重蒸的去过氧化物的乙醚反复洗 6 次去酚, 加入 2.5 倍的冷乙醇, 置 -15℃ 下过夜后, $12000 \times g$ 离心 20 分钟, 所得 RNA 沉淀用 70% 冷乙醇洗两次。RNA 溶在 0.1mM EDTA (pH7.0) 中。分装后置 -15℃ 下保存备用。用豇豆做寄主测定 RNA 的生物活性。

(三) 核酸分子量及沉降常数的测定

参照 Symons, H. 方法^[6], 用 2.4% 聚丙烯酰胺圆管胶电泳, 将 H-10 总核酸中的四个组分

本文于 1981 年 2 月 15 日收到。

分开, 同时以 TMV-RNA (28s)、*E. coli* r-RNA (23s 和 16s) 为参照物测定 H-10 各 RNA 的分子量。电泳前将样品用甲酰胺处理, 样品 (20 μ l 含 AMV-RNA 20 μ g) 抽干后, 加入 20 μ l 甲酰胺 (含 1mM EDTA, pH7.0), 充分溶解后在 80 $^{\circ}$ C 水浴中保温 1 分钟立即投入冰浴, 加入其体积的 10% 溴酚蓝, 凝胶预泳 1 小时、5mA/管, 加样后先以 2.5mA/管电泳, 待样品进胶后升至 5mA/管, 2.5 小时后停止电泳, 扫描或甲苯胺蓝染色。RNA 溶在 0.01M Tris-HCl (含 0.01M HCl、0.0004M $MgCl_2$ 、pH7.4) 中, RNA 浓度为 8mg/ml, 在日立 UCAEA 型分析超离心机上, 5 $^{\circ}$ C、把角 45 $^{\circ}$ 、53000 转/分离心。

(四) H-10 的 RNA₁、RNA₂、RNA₃ 的分离

1. 用平板凝胶电泳 (含 7M 尿素的 Peacock 和 Dingman 系统) 分离 H-10 总核酸。核酸样品溶在 1mM、pH7.0 的 EDTA 中, 加 0.63mg/ml 尿素, 在 60 $^{\circ}$ C 下保温 3 分钟后立即冷却, 加入其 1/10 体积的蔗糖-溴酚蓝 (浓度分别为 50% 和 0.02% 的水溶液)。2.8% 聚丙烯酰胺平板胶, Peacock 和 Dingman 缓冲液 (Tris- Na_2 EDTA-硼酸、pH8.2)。电泳条件: 400V、15 小时。电泳后, 凝胶用 0.01% 甲苯胺蓝溶液染色 2 分钟, 清水漂洗 10 分钟后即可见四个主要核酸带, 分别切下含 RNA 的凝胶带, -12 $^{\circ}$ C 下储存备用。

2. 电洗脱分离平板胶中的各核酸组分: 洗脱装置参考 Symons 方法^[6]。

3. 电泳检测电洗脱回收的各 RNA 组分, 用 Loening^[7] 的 3E 系统管胶检测, 电泳后或紫外扫描或染色。

(五) H-10 外壳蛋白质分子量的测定

H-10 和 TMV 的外壳蛋白质的制备是用解离法。解离液为 2 \times 0.02M Tris、0.001M EDTA、3.2mg/ml 皂土、1% SDS, pH9.0。病毒浓度为 5mg/ml, 与等体积的解离液混合, 在 4 $^{\circ}$ C 下过夜, 电泳前将标准蛋白与解离的病毒溶液配成 1% SDS, 加入其体积 1/5 的巯基乙醇, 混合后在 100 $^{\circ}$ C 水浴中保温 5 分钟, 加溴酚蓝。

用 10% 的聚丙烯酰胺圆管电泳, 含 1% SDS 的磷酸缓冲液系统 (pH7.0), 分析外壳蛋白质, 并以卵蛋白 (M. W. 43,000)、TMV 外壳蛋白质 (17,500)、细胞色素 C (11,700) 为参照物, 测定

H-10 蛋白质的分子量, 电泳条件是 6.25mA/管, 电泳 6.0 小时后用 Coomassie 亮蓝染色并扫描。

结果和讨论

(一) 核酸的提取及生物活性

上述核酸提取方法的回收率一般为理论值的 40%。最高、最低吸收分别在 260nm 和 230nm, 是典型的核酸吸收曲线 (图 1)。用 0.05M Tris- Na_2 HPO₄ 缓冲液 (pH8.5) 稀释总核酸, 并接种豇豆测其生物活性, 20 μ g/ml 的 H-10 总核酸在豇豆叶上产生的枯斑数与 1 μ g/ml 的病毒所产生的相近 [核酸的枯斑数 23—28, 病毒的 20—15 (平均值)], 说明所提核酸的生物活性正常。

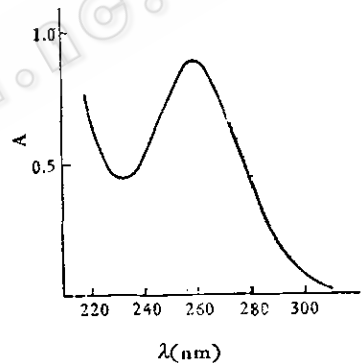


图 1 H-10 总核酸的紫外吸收曲线

Fig. 1 UV absorption profile of the total nucleic acids of H-10

Max = 260nm, Min = 230nm, $A_{230nm}/A_{260nm} = 2.3$, $A_{260nm}/A_{280nm} = 2.4$

(二) H-10 四种核酸的分子量及沉降常数

H-10 总核酸经 2.4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 并以参照物比较, 测得 RNA_{1,2,3,4} 的分子量分别为 1.3×10^6 、 1.1×10^6 、 0.8×10^6 、 0.48×10^6 (图 2,3)。

由于 AMV 是一个具有多型性颗粒的病毒, 因此在不同批的 H-10 核酸中, 经凝胶电泳分析, 有时可检出其它一些分子量

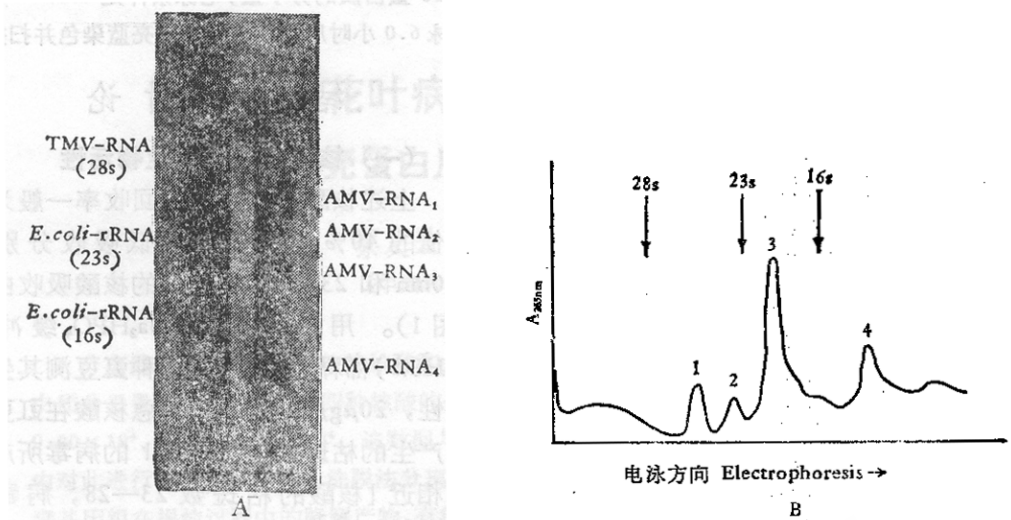


图2 H-10 总核酸经 2.4% 凝胶电泳后染色图谱(A) 和扫描图谱(B)

Fig. 2 Staining pattern (A) and scanning profile (B) of isolate H-10 after gel electrophoresis in 2.4% gel.

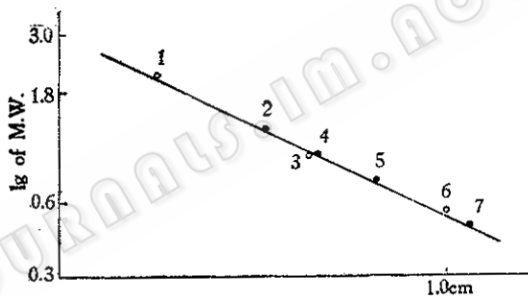


图3 H-10 核酸分子量的测定(以 *E. coli* 16s r-RNA 的泳动距离为 1)

Fig. 3 Determination of molecular weight of H-10 RNA. The migration distance of *E. coli* 16s rRNA was taken as 1.

1. TMV-RNA 28s; 2. AMV-RNA₁; 3. *E. coli*-RNA 23s; 4. AMV-RNA₂; 5. AMV-RNA₃; 6. *E. coli*-RNA 16s; 7. AMV-RNA₄.

的 RNA, 其中有一个小 RNA (图 4), 分子量约为 0.3×10^6 , 经常出现。这个分子量较小的 RNA, 是由于温室接种培养温度的变化而表现为时有时无的一种卫星 RNA, 还是提纯过程中病毒基因组核酸的降解产物, 有待进一步研究。

H-10 核酸经分析超离心后, 最初可见 4 个峰, 随着各峰向下移动, 最小的峰逐渐扩散变得极不明显, 计算三个峰的沉降常数分别为 25s、21s 和 17s (图 5)。

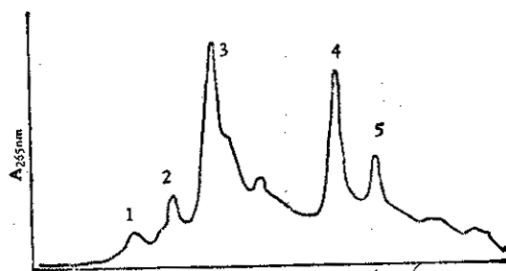
(三) H-10 RNA_{3,4,5} 的分离

H-10 总核酸先经平板电泳分离而后经电泳洗脱回收各 RNA 组分是成功的。H-10 先经平板电泳分离后, 将各 RNA 带切下, 用电泳洗脱回收, 再用 Loening 系统圆管电泳检测 (图 6)。

(四) H-10 的外壳蛋白质分子量测定

利用 10% SDS 凝胶电泳测得的 H-10 外壳蛋白分子量为 24,500 (图 7)。

若查阅 1972 年以前有关 AMV-RNA



电泳方向 Electrophoresis →

图4 H-10 核酸中经常出现第5个小峰

左: 电泳后染色, 右: 电泳后扫描

Fig. 4 The fifth small peak frequently appeared in different batches of H-10 nucleic acid

left: staining pattern after electrophoresis

right: scanning pattern after electrophoresis

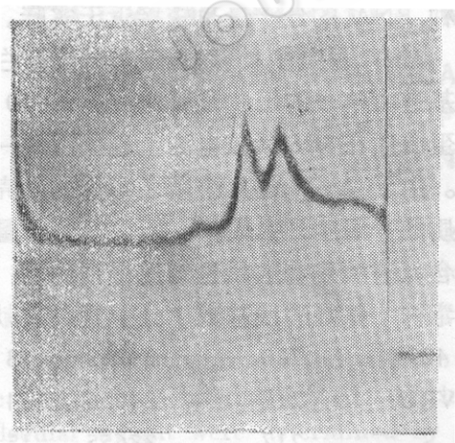


图5 H-10 核酸的分析超离心图谱

Fig. 5 Analytical ultracentrifugation pattern of H-10 Nucleic Acid

分子量的文献, 不难发现他们所报道的分子量都偏高。RNA_{1,2,3,4} 的分子量分别为 1.32, 1.07, 0.87 和 0.33×10^6 左右^[8,9,10]。

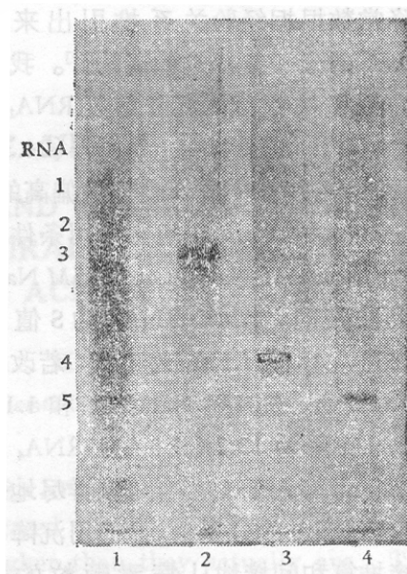


图6 H-10 RNA 的电泳图谱

Fig. 6 Electrophoretic pattern of H-10 RNAs
1. H-10 RNA 2. RNA₁ 3. RNA₂ 4. RNA₃ (?)

本文所报道的数据也与上述分子量基本一致, 都是偏高的。现已知凡是用凝胶电泳对比已知分子量的参照物所计算出的, 或是

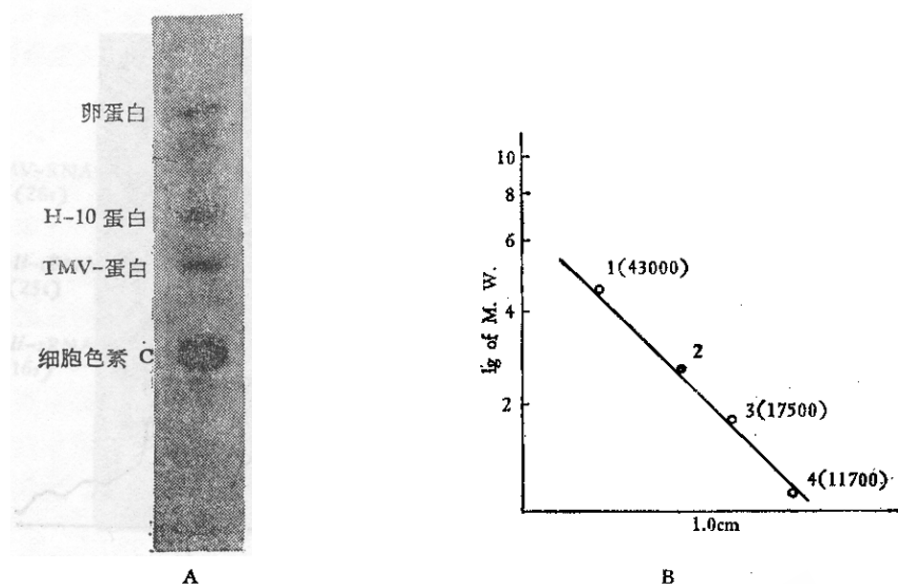


图7 H-10 外壳蛋白质分子量的测定: A. 10% SDS 凝胶电泳,
B. H-10 外壳蛋白分子量的确定

1. 卵蛋白, 2. H-10 外壳蛋白, 3. TMV 外壳蛋白, 4. 细胞色素 C

Fig. 7 Determination of molecular weight of H-10 coat protein: A. 10% SDS gel electrophoretic pattern; B. Molecular weight determination of H-10 coat protein

1. Albumin, 2. H-10 coat protein, 3. TMV coat protein, 4. Cytochrome C.

从其沉降常数根据经验关系推引出来的 AMV-RNA 的分子量都是偏高的^[11]。我们所测得的各 RNA 组分的沉降常数(RNA_{1,2,3} 分别为 25s, 21s 和 17s)与 Hull 所得(24.3s, 20s 和 17.3s)^[9] 基本一致, 也都是偏高的。测 AMV-RNA 的 $S_{20,w}$ (s) 可因所用条件不同而异, 如用 0.01M NaH₂PO₄, 0.15M NaCl pH7.0 缓冲液时, AMV-RNA₁ 的 S 值为 25.8(±0.5), AMV-RNA₄ 为 12.7, 若改用 0.09M Na₂HPO₄, 0.01M NaH₂PO₄ 和 1.1M 甲醛则 RNA₁ 降为 13.2(±0.4), RNA₄ 为 7.8^[11]。Heijntink 等人于 1977 年, 较详尽地研究了 AMV-RNA 的分子量, 他们用沉降平衡法直接推算和间接地从病毒颗粒的重量, 蛋白质和 RNA 含量测得, 直接法和间接法所得的平均值认为, AMV-RNA_{1,2,3,4} 的分子量分别为 1.04, 0.73, 0.62, 和 0.25 × 10⁶, 并据此推算出所含核苷酸残基的数目。RNA₄ 应含 800 个核苷酸。1980 年,

AMV-RNA₄ 全序列已被搞清^[12], 已知共含 881 个核苷酸, 其分子量可确切地计算为 0.28 × 10⁶ 由此可证明 Heijntink 所测其它三种 RNA 的分子量也较接近于实际。

AMV 虽是多种颗粒, 但其外壳蛋白质亚基是由单一的蛋白质所构成。H-10 外壳蛋白质在 SDS 凝胶电泳上也呈现单一的带。由于 AMV 的几个著名毒株的外壳蛋白质的一级序列已搞清, 所以其分子量及所含氨基酸残基数目也知道得很确切:

毒株	氨基酸残基数	分子量	文献
425	220	24252	13
VRU	219	24056	14
S	217	33655	15

H-10 的外壳蛋白质用 SDS 凝胶电泳测知为 24,500, 相信这是比较接近实际情况的。

近年来, 愈来愈多的植物病毒被发现其病毒粒子中的 RNA 除基因组 RNA 外,

还含有一些小的 RNA。这种小 RNA 与基因组 RNA 几乎没有什么序列同源性,称之为卫星 RNA,如 CMV^[16]番茄黑环^[17]病毒,芜菁皱缩病毒等^[18]。其生物学功能如何颇引人注意。H-10 病毒粒子 RNA 中除主要的四种 RNA 外,往往出现第 5 种分子量为 0.3×10^6 的小 RNA,有待进一步用分子杂交方法探索。

参 考 文 献

- [1] Jaspers, E. J. et al.: Alfalfa Mosaic Virus CMI/AAB Description of Plant Viruses No: 229 (No: 46 revised), 1980
- [2] Koper-Zwa: Thoff, et al.: PNAS, 74: 5504, 1977
- [3] Bol, J. F. et al.: Virology, 51: 102, 1973.
- [4] Bol, J. F. et al.: Virology, 46: 73, 1971.
- [5] 蔡发兴、莽克强: 微生物学报, 22(3): 233—240, 1982.
- [6] Symoas, H.: Australian J. Biol. Sci., 31: 25—37, 1978.
- [7] Loening, N. E.: Biochem. J., 102: 251, 1957.
- [8] Bol, J. F.: PhD There Univ. of Leiden, 1969.
- [9] Hull, R. et al.: Virology, 37: 404, 1969.
- [10] Pink and Hirth.: Virology, 49: 413, 1972.
- [11] Feijtink R. A. et al.: Biochemistry, 16 (21): 4684, 1977.
- [12] Brederode, F. Th. et al.: Nucleic Acid Res., 8(10): 2213, 1980.
- [13] Van Beynum, G. H. A. et al.: Eur. J. Biochem., 72: 63—78, 1977.
- [14] Ad Castel et al.: Eur. J. Biochem., 102: 125—138, 1979.
- [15] Collot, D. et al.: Biochem. Biophys. Acta, 492: 267, 1977.
- [16] Mossop, D. W. et al.: Virology, 86(2): 532, 1978.
- [17] Mavo, M. A. et al.: Abstracts of Fifth International Congress of Virology p. 226, 1981.
- [18] Altenbach, S. B.: Abstracts of Fifth International Congress of Virology, p. 228, 1981.

STUDY OF ALFALFA MOSAIC VIRUS ISOLATE H-10

II. ISOLATION, PURIFICATION AND MOLECULAR WEIGHT DETERMINATION OF THE VIRAL COAT-PROTEIN AND NUCLEIC ACIDS

Cai Faxing Peng Xuexian Mang Keqiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The viral coat protein and virion nucleic acid were isolated, purified and their molecular weight were determined by gel electrophoresis and analytical ultracentrifugation. The total viral nucleic acid is biologically active. The M. W. of the viral coat protein is about 24,500 dalton, and that of the four kinds of viral nucleic acid were RNA₁, 1.3×10^6 , RNA₂, 1.1×10^6 , RNA₃,

0.8×10^6 , and RNA₄, 0.48×10^6 dalton which agreed with Hull's (1969) data, but much higher than they actually are. This controversy was discussed. The RNA₁, RNA₂, and RNA₃ were purified individually by electrophoresis elution. It remains to be cleared whether RNA₄ is a satellite RNA or just a degradation product of viral genome during the purification process.