

烟草花叶病毒 RNA 双链复制型的分离和鉴定

中国科学院微生物研究所病毒复制组

(北京)

用 ^{32}P 标记感染了 TMV* 的普通烟草, 从叶组织中提取总 RNA, 并用纤维素柱层析分离, 得到了 TMV-RNA 的复制型。它在高离子强度下抗 RNase, 在低离子强度下对 RNase 敏感, 并具有能自我退火和能与 TMV-RNA 杂交等性质。用聚丙烯酰胺凝胶电泳法测得其分子量为 3.8×10^4 。根据以上性质可以确认它是对 TMV-RNA 有专一性的双链 RNA。

关于病毒 RNA 的复制, 在大肠杆菌噬菌体 (Q β 及 MS $_2$) 和脊髓灰白质炎病毒中研究得比较详细^[1]。在这些工作中发现了病毒 RNA 复制的中间体, 即复制型和复制中间型。其中 RF 由病毒 RNA 正链和与其互补的负链组成。RI 除了具有双链的主体结构外, 尚有部分单链 RNA 的“尾巴”联结其上。由此提出了种种关于病毒 RNA 复制的假设模型。

1964 年就曾有人在感染烟草花叶病毒的植物细胞中分离到 RF^[1]。近几年有人进一步从感染 TMV 的烟叶中分离提纯了 RF 和 RI, 并对双链 RNA 的“正”“负”链进行了研究^[2-7]。此外, 从许多其它受到病毒感染的植物中也分离到双链 RNA, 如芜菁黄化花叶病毒感染的白菜, 苜蓿花叶病毒感染的烟草, 豇豆花叶病毒感染的豇豆, 雀麦花叶病毒感染的大麦等^[8]。这些事实表明, 在植物病毒 RNA 复制过程中可能也有与噬菌体或动物病毒类似的情况, 即 RF 及 RI 起着必不可少的中间体作用。

我们参照 A. O. Jackson 等人的方法^[2], 用 ^{32}P 标记感染了 TMV 的普通烟, 从叶组织中提取总 RNA, 用纤维素柱层析法分离到 TMV-RNA 的复制型, 并鉴定了它的性质。

材料与 方法

植物和病毒: 普通烟 (*Nicotiana tabacum*) 黄苗接种, 在防虫温室中培养, 长到 4—5 片叶时, 用提纯的 TMV 0.3 毫克/毫升 (在 0.067M pH7.0 磷酸缓冲液中), 加少许金钢砂磨擦接种全部展开的叶片, 接种后叶片用水淋洗, 继续在温室培养。

^{32}P 标记核酸: 接种第五天后选择五棵略见明脉的感病植株, 切取地上部份, 除去老叶后, 放在 37℃ 恒温箱内使之稍萎蔫, 分别插入盛有 0.5 毫升 pH7.0 $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$ (约 2—2.5 毫居里) 的 2 毫升烧杯中, 再把它们放在 50 毫升烧杯中, 最后一齐放入 3000 毫升烧杯中。当 $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$ 被吸干后, 向 50 毫升烧杯内加入缺磷的 Hoagland 营养液约 30 毫升, 同时向 3000 毫升烧杯内加少量水, 加盖保湿。在 24℃ 下光照 (400 勒克斯) 16 小时, 黑暗 8 小时, 共处理 24 小时。

缓冲液:

1. TNE 缓冲液: 0.1M 三羟甲基氨基甲烷; 0.1M 氯化钠; 0.01M 乙二胺四乙酸二钠盐; pH 7.0。

2. STE 缓冲液: 0.1M 氯化钠; 0.05M 三羟

本文于 1976 年 4 月 6 日收到。

* 本文采用的英文缩写: DNA——脱氧核糖核酸; ds-RNA——双链核糖核酸; RF——复制型; RI——复制中间型; RNase——核糖核酸酶; r-RNA——核糖体核糖核酸; ss-RNA——单链核糖核酸; TCA——三氯醋酸; TMV——烟草花叶病毒。

甲基氨基甲烷; 0.001M 乙二胺四乙酸二钠盐; pH6.85。

3. SSC 缓冲液: 0.15M 氯化钠; 0.015M 柠檬酸钠; pH7.2。

4. E 缓冲液: 0.04M 三羟甲基氨基甲烷; 0.02M 醋酸钠; 2mM 乙二胺四乙酸二钠盐; pH7.8。

³²P 标记 ds-RNA 的制备: 采集 ³²P 标记的叶片, 去中脉称重, 用液氮冻结, 在研钵中研成粉末, 每 10 克叶加入 20 毫升 TNE 缓冲液和 20 毫升 TNE 平衡过的酚。使混合的浆液充分融化后, 离心 10 分钟, ($\times 5000g$), 收集水相, 再在此水相中加入其体积一半的酚, 振荡 10 分钟, 再离心收集水相。在得到的水相中加入 2.5 倍体积的冷乙醇, 几滴 3M pH4.0 的醋酸钠, 置于 4°C 过夜。离心 20 分钟, ($\times 6000g$), 收集沉淀, 溶解在 15 毫升 STE 缓冲液中, 离心除去不溶物质, 将上清液制成含 35% 乙醇溶液, 作为上柱液。

用按照 Franklin (1966)^[1] 方法制备的 Serva 纤维素柱进行层析。

第一次柱层析: 柱直径 1.5 厘米, 长 28 厘米。样品上柱后先用含 35% 乙醇的 STE 缓冲液洗脱, 再用含 15% 乙醇的 STE 缓冲液洗脱, 最后用单一的 STE 缓冲液洗脱。收集最后一次出现洗脱峰的数管, 即为含 ds-RNA 的部份。为了进一步纯化, 把它配成含 35% 乙醇的溶液, 进行第二次柱层析。

第二次柱层析: 柱直径 1 厘米, 长 18 厘米。样品上柱后先用含 15% 乙醇的 STE 缓冲液, 再用单一 STE 缓冲液洗脱。收集最后出现洗脱峰的数管, 作为分析 ds-RNA 的样品。

ds-RNA 性质的鉴定:

1. 不同盐浓度下对 RNase 的抗性: 120 微升 ds-RNA 样品用 10 倍浓度的 SSC 缓冲液分别配成浓度为 0.1、0.5 及 2.5 倍的 SSC 缓冲液, 加入 50 微克/毫升 RNase A 及 6 单位/毫升 *RNase T₁, 在 33°C 水浴保温 25 分钟 (以下核糖核酸酶的试验均按此条件)。

2. 热变性及自退火: 120 微升 ds-RNA 样品置于封闭管中, 沸水浴加热 10 分钟。热变性的一组立即放入 0°C 冰浴冷却; 自退火的一组放在 85°C 水浴退火 6 小时之后, 室温冷却。两组样品均在含有 2.5 倍浓度的 SSC 缓冲液条件下试验对

RNase 的抗性。

3. 溶解温度 (T_m 值) 的测定: ds-RNA 在一定温度梯度下的水浴中加热 5 分钟后, 立即在 0°C 水浴冷却。将所有样品均在 2.5 倍浓度的 SSC 缓冲液条件下测定对 RNase 的抗性。

4. 杂交试验: 120 微升 ds-RNA 在封闭管中, 沸水浴加热 10 分钟, 在冰浴中迅速冷却, 低速离心 2 分钟, 以使粘在管壁上的样品离心下来, 分别加入 50 微升 10 \times SSC, 15、50、100 微克/毫升 TMV-RNA 或 50、100 微克/毫升酵母 r-RNA 及适量的水, 使体积达 190 微升。混匀的样品在 85°C 水浴中退火。冷却至室温后, 加入 10 微升 RNase 溶液, 其总体积为 200 微升, 试验对 RNase 的抗性。

5. TCA 不溶的 ³²P 标记的大分子核酸放射性测定: 标准的 RNase 反应体积均为 200 微升, 反应后立即放入 0°C 冰浴冷却, 取 70 微升点在 Whatman No. 3MM 滤纸圆片 ($\phi 2.4$ 厘米) 上^[10]。湿润的纸片投入 5% 冷 TCA (含 1% 焦磷酸钠及 0.02% 尿素), 固定 20 分钟。再用 5% TCA 洗两次。用乙醇和乙醚各半的溶液洗两次。最后用乙醚洗二次。干燥的纸片放入测定瓶, 加入 5 毫升甲苯闪烁液, 在 NE8312 液体闪烁谱仪上测定放射性计数。

6. 凝胶电泳: 用 2.4% 聚丙烯酰胺 (其中含 0.12% 双丙烯酰胺) 圆管凝胶电泳测定 ds-RNA 的分子量^[11, 12]。电泳槽上下均用 E 缓冲液, 加样前电泳一小时。以 TMV-RNA 和 *E. Coli* r-RNA 为参照物在相同条件下与 ds-RNA 一起电泳。将 10—30 微克 RNA (体积小于 30 微升); 50—100 微升 ³²P 标记的 ds-RNA (均含 5% 蔗糖), 分别置于凝胶柱上, 以 5 毫安/管的电流在 4°C 下电泳 3 小时。TMV-RNA 和 *E. Coli* r-RNA 用 Scan 400 型核酸蛋白质测定仪在 260 毫微米波长扫描。ds-RNA 凝胶柱用液氮冻结之后, 每隔 2 毫米切一片, 置于圆滤纸片上, 65°C 烘干。放入装有 5 毫升甲苯闪烁液的测定瓶内, 在 NE8312 液体闪烁谱仪上测定放射性计数。

7. 参照 RNA 的提取和沉降常数的测定: TMV-RNA 按 Fraenkel-Conrat 等 (1961) 酚皂土

* RNase T₁ 由生物物理所 824 组提供。

法制备^[13]。把 TMV-RNA 溶在 0.15 M 氯化钠中, 浓度为 3%, 在 UCAEA 型分析超速离心机上, (40,000转/分) 4℃, 离心一小时, 测出沉降常数为 $S_{w,25^{\circ}}$ 为 28S (校正值)。

E. Coli r-RNA 的提取: 湿菌体用 0.15 M 醋酸钠溶液洗二次, 加研磨粉调成糊状, 在 4℃ 下用细菌磨磨碎, 用酚-间甲酚-八羟基喹啉提取, 以下步骤按 R. A. Cox (1962) 的方法^[14]。得到的 *E. Coli* r-RNA 按上述方法测出二组份的沉降常数分别为 23S 和 16S。

实验结果

一、ds-RNA 的提纯

第一次和第二次纤维素柱层析的结果见图 1 和 2。可以看出, 在纤维素柱层析时, 用含不同比例乙醇的缓冲液分步洗脱, 可以使 ds-RNA 与单链 RNA 和 DNA 分开。ds-RNA 只有在用单一 STE 缓冲液洗脱时才被洗下来。我们用第二次层析后对不含乙醇的 STE 缓冲液洗脱的 ds-RNA 进行分析鉴定。在有的试验中, 用二次柱层析后 15% 乙醇的缓冲液洗脱峰, 即 SS-

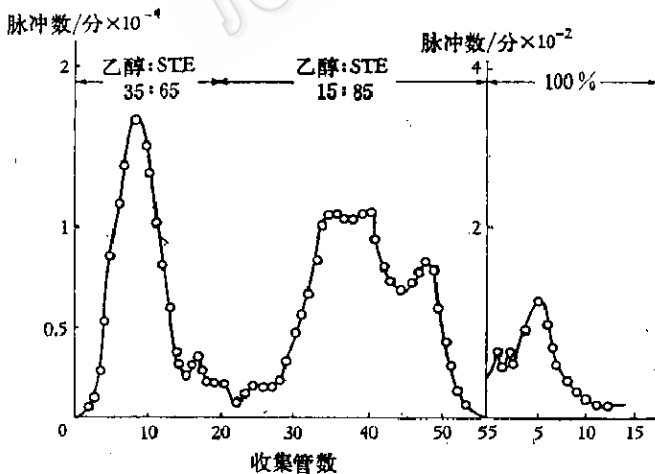


图 1 第一次纤维素柱层析洗脱曲线

柱直径×长度=1.5×28 厘米, 样品上柱流速 2 毫升/5 分钟, 洗脱流速 4.5 毫升/5 分钟。每 5 分钟收一管, 每管取 0.02 毫升点在 Whatman No. 3MM 滤纸片上(φ2.2 厘米), 干燥后在 α 、 β 、 γ 三用闪烁探头(FJ328G₁), 在 FH-408 自动定标器上计数。纵座标为样品脉冲数/分钟, 横座标为收集管数。

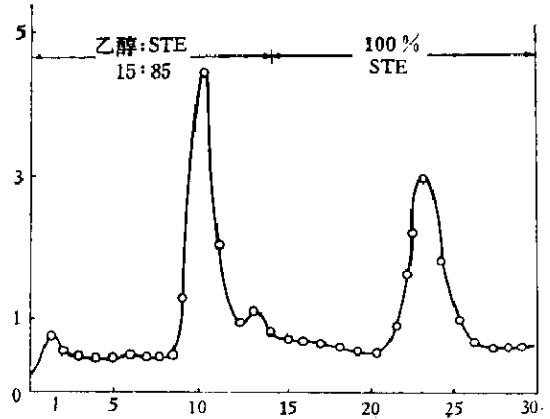


图 2 第二次纤维素柱层析洗脱曲线

柱直径×长度=1×18 厘米, 样品上柱流速 1.5 毫升/5 分钟。洗脱流速 2 毫升/5 分钟。测定方法见图 1。纵座标为样品脉冲数/分钟 × 10⁻², 横座标为收集管数。

RNA, 作为对照。

二、ds-RNA 的性质

(一) 不同盐浓度下 ds-RNA 对 RNase 的抗性: ds-RNA 在高盐浓度下(如氯化钠、氯化钾、氯化锂)是稳定的, 因为减少了两条链之间磷酸二酯键的排斥力, 从而间接增强了碱基对之间的氢键。

ds-RNA 在不同盐浓度下表现出不同的抗 RNase 性质(见表 1)。

从表 1 可以看出, 在 2.5SSC 时 ds-RNA 几乎完全抗 RNase, 在 0.1SSC 时 ds-RNA 则被降解, 按对照计数只剩 1.2%。同时 ³²P 标记的 ss-RNA 无论在 2.5 或 0.1SSC 条件下均被 RNase 降解, 分别剩下的计数占对照的 5% 和 0.7%。

(二) 热变性和自退火: ds-RNA 的两条链在沸水浴中加热 10 分钟后, 迅速冷却, 即被解开成为两条单链, 由原来的抗 RNase 变成对 RNase 敏感。从表 2 可以看到变性的 ds-RNA 样品在

表 1 ds-RNA 在不同盐浓度下对 RNase 的抗性

试验样品	处理条件		试 验 一		试 验 二	
			酸不溶部分的放射性 脉冲数/分	相当于对照 %	酸不溶部分的放射性 脉冲数/分	相当于对照 %
ds-RNA	2.5SSC	+RNase	853	94	1226	84.4
		对 照	904	100	1451	100
	0.5SSC	+RNase	399	43	423	29.3
		对 照	920	100	1441	100
	0.1SSC	+RNase	11	1.2	25	1.7
		对 照	914	100	1408	100
ss-RNA	2.5SSC	+RNase	—	—	112	5
		对 照	—	—	2229	100
	0.1SSC	+RNase	—	—	15	0.7
		对 照	—	—	1999	100

注: 对照均不加 RNase。

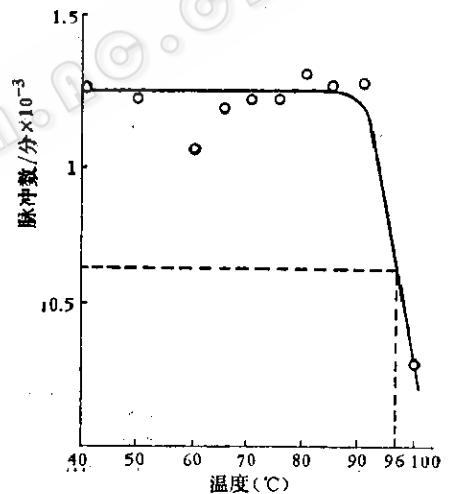
RNase 反应后, 只占对照的 22%。

表 2 ds-RNA 的热变性试验

试验	酸不溶部分的放射性 (脉冲数/分)		+RNase/ 对照%
	+RNase	对 照	
1	193	869	22
2	287	1208	23.7

注: 对照管与试验管同样进行热变性, 但最后反应时不加 RNase。

用逐渐提高温度的方法, 可以测定 ds-RNA 的熔解温度(T_m 值)。所谓熔解温度, 就是使 ds-RNA 的放射性计数降低到 1/2 时的温度。在此温度附近, ds-RNA 的放射性计数急剧下降 (见图 3)。我们测出 ds-RNA (在含 $0.1MNa^+$ 的 STE 缓冲液中) 的 T_m 值约 $96^\circ C$ 。Kjelland-Brandt (1973) 等人^[3] 在 0.1、1、2.5 SSC 下测出的 TMV ds-RNA 的 T_m 值分别为 $86^\circ C$ 、 $99^\circ C$ 和 $101^\circ C$ 。与我们的结果比较接近。Jackson^[2] 在低离子强度的 PE 缓冲液 ($0.001MK^+$) 中测出 TMV ds-RNA T_m 值是 $68^\circ C$, 可见温度处理时的离子强度对 T_m 值有一定影响。

图 3 熔解温度 (T_m 值) 测定

注: 纵座标: 与 RNase 反应之后酸不溶部分的脉冲数/分钟。横座标: 加热温度。

把加热变性的 ds-RNA 放在一定温度和离子强度下退火, 则分开的两条链又重新结合成双链。从表 3 看到退火程度与离子强度有密切关系。在 2.5 SSC 下退火, 可恢复到对照计数的 79%。若使 ds-RNA 原液变性后退火, 只恢复到对照计数的 50%。

(三) 杂交: 为鉴定 ds-RNA 是否包含 TMV-RNA 和与其互补的链, 将它变性

表 3 变性 ds-RNA 的退火

退火时的 盐浓度	试 验 一			试 验 二		
	+RNase 脉冲数/分	对 照 脉冲数/分	+RNase/ 对照%	+RNase 脉冲数/分	对 照 脉冲数/分	+RNase/ 对照%
0.1M Na ⁺ **	789	1280	62	651	1282	50.7
2.5SSC	—	—	—	1100	1388	79.2

* 1. TMV ds-RNA 样品原液的盐浓度;

2. 对照管与试验管同样进行热变性和退火处理,但最后反应时不加 RNase。

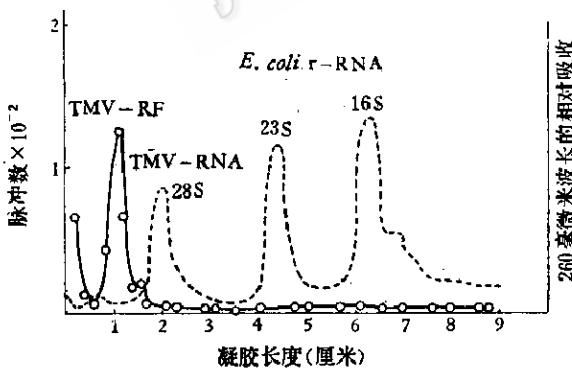
表 4 杂交竞争试验

盐 浓 度	“冷” RNA 微克/毫升	试 验 一*			试 验 二		
		+RNase 脉冲数/分	对 照** 脉冲数/分	+RNase/ 对照%	+RNase 脉冲数/分	对 照** 脉冲数/分	+RNase/ 对照%
2.5SSC	TMV RNA:						
	15	—	—	—	540	1382	39.1
	50	228	591	39	446	1382	32.2
	100	—	—	—	477	1382	34.5
	酵母 RNA:						
	50	475	591	80	1281	1382	92.6
100	—	—	—	1129	1382	81.6	

* 试验一总反应体积 160 微升,其中含 ds-RNA 100 微升。与 RNase 反应后,点样量 60 微升。其余试验条件同试验二。见材料与与方法;

** 对照: 不加外源 RNA, 退火后不加 RNase, 而加适量水, 与试验管同样在 33°C 保温 25 分钟。

后,加入 TMV-RNA 或酵母核糖体 RNA 一同保温退火。并测定其对 RNase 的抗性。



○—○ 脉冲数

----- 在 260 毫微米波长的相对吸收

图 4 2.4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳
凝胶柱长 9 厘米, 内径 0.6 厘米,
电流: 5 毫安/管, 电泳 3 小时。

----- TMV-RNA 10 微克与 *E. Coli* r-RNA 30 微克混合, 电泳后用 SCAN 400 扫描器扫描。

· · · · · TMV-ds-RNA 在同一条件下电泳后切成厚度为 2 毫米薄片, 测定放射性计数。

由表 4 看到 ds-RNA 在 2.5 倍浓度的 SSC 下退火时, 分别加入 15、50、100 微克/毫升 TMV-RNA, 退火后恢复到对照计数的 32—39%, 而在同样离子条件下进行的 ds-RNA 自退火 (在与 RNase 反应后), 可恢复到对照计数的 79.2% (见表 3)。这是由于非标记的或“冷”的 TMV-RNA 与 ds-RNA 杂交, 取代了一部分 ³²P 标记的 TMV-RNA, 而使 ds-RNA 放射性计数下降。如加入 50、100 微克/毫升酵母 r-RNA, 可使退火率达到 80—92%, 说明异源的酵母 r-RNA 由于不能与 ds-RNA 杂交, 而不影响其退火过程。因此证明我们分离到的 ds-RNA 对 TMV-RNA 是特异的, 它包含有 TMV-RNA 及其互补链。这与别人的一些试验结果是一致的^[2,4]。

(四) 聚丙烯酰胺凝胶电泳: ds-

RNA在凝胶电泳后切成2毫米薄片,测定放射性计数。TMV-RNA与*E. Coli* r-RNA电泳后扫描结果见图4。以*E. Coli* r-RNA 16S组分的移动距离为1, TMV-RNA和ds-RNA的组份之一的迁移率分别是0.40和0.18。因此ds-RNA的迁移率约为TMV-RNA的1/2。已知在一定分子量范围内RNA样品在聚丙烯酰胺凝胶电泳中电泳迁移率和RNA的分子量对数之间有线性关系。用已知分子量的*E. Coli* r-RNA、TMV-RNA为参照物作一直线,用外推法就可算出ds-RNA的近似分子量。从图5推算出ds-RNA的分子量约为 3.8×10^6 。这与TMV-RNA的RF分子量理论值 4×10^6 比较一致。因而进一步从分子量上证明了我们分离到的TMV ds-RNA的组份之一是RF。它的两条链是由TMV-RNA及其互补的链组成。

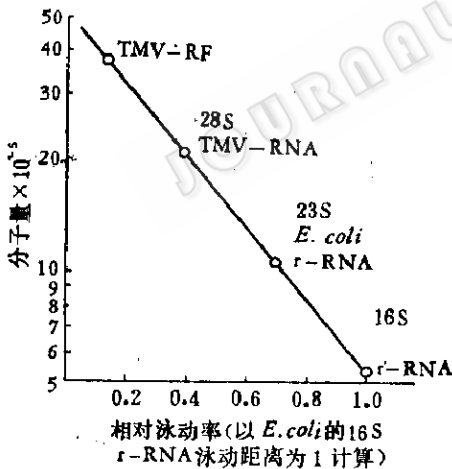


图5 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定TMV-RF的近似分子量

应当指出,单链和双链RNA分子构型不同,其分子量和泳动率之间的关系也不相同。因此利用几个单链RNA为参照物作出的标准曲线,测定双链RNA的分子量,只能得到近似的结果。

讨 论

试验结果表明,感染了TMV的烟叶中含有双链RNA。它在高离子浓度下抗RNase,在低离子浓度下对RNase敏感。在热变性后对RNase也敏感。此外,从自退火及能与TMV-RNA杂交等性质上看,均可确认它是对TMV-RNA有专一性的ds-RNA。

用2.4%聚丙烯酰胺凝胶电泳测出ds-RNA组份之一的分子量约为 3.8×10^6 。Jackson等(1970)^[2]用2N LiCl处理ds-RNA分离出RF和RI,用1.6%聚丙烯酰胺(内含0.5%琼脂糖)凝胶电泳测出它们的分子量分别是 4×10^6 和 5×10^6 。从现有的资料可以确定,我们分离出的ds-RNA的组份是TMV-RNA的复制型。

目前我们尚未对ds-RNA样品中的RI进行分离鉴定。但在几次凝胶电泳分析中,我们发现除已描述过的TMV-RNA复制型外,从凝胶柱的顶端到2毫米处有一较高放射性计数(图4),可能是RI。最近Aoki等人^[5]从感染TMV的原生质球中分离出病毒特异的核酸。他们用2.4%聚丙烯酰胺凝胶电泳作的分析表明:RI在凝胶柱1—7毫米处,RF在10—12毫米处。其RI与RF电泳时所处部位与我们的结果比较一致。

在分离TMV ds-RNA的试验过程中,我们曾用过CF-11纤维素等数种材料。其中只有用Serva纤维素得到了较好的结果。因此,不同种类和不同批号的纤维素对ds-RNA可能具有不同的吸附性能。

参 考 资 料

- [1] Ralph, R. K.: *Advan. Virus Res.* 15: 61—158, 1969.
- [2] Jackson, D. M. et al.: *Virology*, 45: 182—191, 1971.

- [3] Kielland-Brand, M. C. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 121: 219—228, 1973.
- [4] Kielland-Brand, M. C. et al.: *ibid*, 121: 229—238, 1973.
- [5] Kielland-Brand, M. C. et al.: *J. Mol. Biol.*, 87: 489—503, 1974.
- [6] Nilsson-Tillgran, T.: *Mol. Gen. Genet.*, 105: 191—202, 1969.
- [7] Nilsson-Tillgran, T.: *ibid*, 109: 246—256, 1970.
- [8] Hamilton, R. M.: *Ann. Rev. of Phytopathology*, 12: 223—245, 1974.
- [9] Franklin, R. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 55: 1504—1511, 1966.
- [10] Bollum, F. J. et al.: *Procedures in Nucleic Acid Research*, 1: 296—300, 1966.
- [11] Bishop, D. H. L. et al.: *J. Mol. Biol.*, 26: 373—387, 1967.
- [12] Loening, U. E.: *Biochem. J.*, 113: 131—138, 1969.
- [13] Fraenkel-Conrat, H. et al.: *Virology*, 14: 54—58, 1961.
- [14] Cox, R. A. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 61: 197—208, 1962.
- [15] Aoki, S. et al.: *Virology*, 65: 343—354, 1975.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE REPLICATIVE FORM OF TMV-RNA

RESEARCH GROUP OF VIRUS REPLICATION, INSTITUTE
OF MICROBIOLOGY, ACADEMIA SINICA
(Beijing)

The double stranded RNA specific to TMV-RNA had been isolated by cellulose (Serva) Column chromatography of the total RNA extracted from ³²P-labeled TMV-infected (*Nicotiana tabacum*) tobacco leaves. It is resistant to RNase treatment under a condition of high

ionic strength. It has also been characterized by denaturation, annealing and hybridization tests. Its mol. wt. is 3.8×10^6 as determined by polyacrylamide gel electrophoresis. Judging by the properties mentioned above, the RNA in question is definitely the replicative form of TMV-RNA.