

## 关于 TMV 外壳蛋白质信使 RNA 的分离及其体外翻译产物分析的初步研究

彭学贤 吴世宣 蔡文启 赵淑珍 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从感染 TMV 普通株的烟叶中提取总 RNA, 并经 Sepharose 6B 层析分部得到 7 个分部。各分部中各种 RNA 的分布情况用凝胶电泳检查, 当在含 [ $^{14}\text{C}$ ]-蛋白质水解液小麦胚无细胞保温液中加入病叶总 RNA 或层析后得到的 IV 分部的 RNA 时, 在凝胶电泳放射自显影图谱上出现放射性相当强的带, 该带之泳动率与 [ $^{14}\text{C}$ ]-标记的天然 TMV 外壳蛋白质相同。加入病毒颗粒的 RNA 或用甲醛处理的病毒颗粒 RNA 就不出现。在同样条件下, 改用 [ $^3\text{H}$ ]-组氨酸代替 [ $^{14}\text{C}$ ]-蛋白质水解液, 在荧光放射自显影图谱上此带也不出现。因此认为此带即是新合成的 TMV 外壳蛋白。凝胶电泳图谱表明, IV 分部是低分子量 RNA 富集的一个分部, 其中 RNA<sub>1</sub> 和 RNA<sub>2</sub> 可能相当前人报道的 LMC。值得注意的是, 用不连续的凝胶电泳 IV 分部, RNA<sub>1</sub> 和 RNA<sub>2</sub> 给出 7 个带, 似乎 LMC 区是个复杂的多分散的区域, 究竟那个带才真正是 TMV 外壳蛋白质的 mRNA, 有待进一步研究。

TMV-RNA 中含有一个为其外壳蛋白质编码的核苷酸序列, 已是不容怀疑的了。将 TMV 长颗粒(300 毫微米)的 RNA 接种植物后, 仍然能增殖出完整的有侵染性的病毒颗粒是人们所熟知的。用 T<sub>1</sub> RNase 降解 TMV-RNA 得到的一个寡核苷酸片段, 经序列分析证明与外壳蛋白质序列是同源的(Richards 等<sup>[1]</sup>, Garfin 等<sup>[2]</sup>)。用 SDS 将 TMV 完整颗粒做部分剥离, 用 RNase 处理, 然后将剩下的颗粒中的 RNA 提出在体外做翻译, 已证明有外壳蛋白质生成(Skotnicki 等<sup>[3]</sup>), 这些都是很有力的证据。但用完整的 TMV-RNA 在大肠杆菌无细胞体系<sup>[4,5]</sup>和小麦胚无细胞体系<sup>[6,7]</sup>中, 都未能充分证明 TMV-RNA 能在体外体系中翻译出外壳蛋白质。

1972 年 Jackson 等人<sup>[8]</sup>从感染 TMV 的烟叶中发现一种健叶所没有的分子量约为 350,000 的单链 RNA (简称 LMC), Siegel

等<sup>[9]</sup>并且证明 LMC 是不含 TMV-RNA 5' 端的片段, 而且在体外和体内都不能与 TMV 外壳蛋白质重新组合。Knowland 等人(1975 年)<sup>[10]</sup>认为感染 TMV 植物中大量合成 TMV 外壳蛋白质, 必然有一个高效的外壳蛋白质信使, 他们成功地纯化了 LMC 并在体外麦胚无细胞体系中翻译, 证明它是 TMV 外壳蛋白质信使。Siegel<sup>[11]</sup>也同时得出结论, 认为在 TMV 感病烟叶的组织中至少已发现一种特有的顺反子的 mRNA, 能在体外有效地翻译 TMV 外壳蛋白质。

本文报道用 Sepharose 6B 层析分部分离的办法, 提取感病烟叶中的 TMV 外壳蛋白质 mRNA, 并在麦胚无细胞体系中验证了它的功能。

### 材料和方法

#### (一) TMV-RNA 的提取和小麦胚无细胞体

系的制备及放射性标记氨基酸的参入方法, 见参考文献[12]。

## (二) [ $^{14}\text{C}$ ]-TMV 外壳蛋白质的制备

取长有 4—5 个叶片、高 15—20 厘米的普通烟(品种: 三生烟)移栽至含有 [ $^{14}\text{C}$ ]-蛋白质水解液(约 100 微居里)和氯霉素的蒸馏水中, 接种 TMV 后, 于室温(28—30℃)培养。四天后采集叶片, 在 -25℃ 冷冻。冻结后加磷酸缓冲液(0.5M pH7.2)研磨, 滤液加 1/8 体积的正丁醇, 静置, 见到叶绿体成絮状沉淀时开始振荡, 15 分钟后低速离心取水相, 再 10,000 × g 离心 30 分钟, 去沉淀, 上清液加聚乙二醇和氯化钠, 使最终浓度都达到 4%, 沉淀的病毒溶在水中反复三次聚乙二醇氯化钠沉淀, 将最后获得的沉淀溶解于 0.01M pH7.2 的磷酸缓冲液中, 用常规醋酸法提取 TMV 外壳蛋白质<sup>[13]</sup>。产物的 280 毫微米/260 毫微米光密度比值为 2.05, 浓度 6 毫克/毫升, 经凝胶电泳鉴定分子量为 17500 (鉴定方法见材料方法之六)。

## (三) 从感染 TMV 的烟叶中提取 LMC

1. 病叶总 RNA 的提取: 黄苗榆烟接种 TMV 普通株 7 天后, 当大部分病株刚刚出现明脉时, 即行采集刚展开的系统感病的叶子, 去叶脉, 称取 120 克加液氮冷冻研磨成粉状, 立即加 360 毫升预热至 65℃ 的提取缓冲液(EDTA 10mM, SDS 1%, Tris 50mM) 和 360 毫升水饱和酚(含 0.1% 8-羟基喹啉), 在 65℃ 水浴中振荡 5 分钟, 然后立即在冰食盐浴中(加液氮降温)快速冷却至出现白色酚结晶, 10,000 × g 离心 2 分钟, 吸取水相, 再加水饱和酚 300 毫升振荡 15 分钟, 10,000 × g 离心取水相, 反复 4—5 次酚振荡去蛋白质, (饱和酚量可适当减少) 直至两相界面基本不出现白色沉淀为止。最后, 将水相加两倍体积的预冷乙醇和 3M 醋酸钠(每毫升加 1 滴), 放置 -20℃ 低温冰箱 3 小时, 10,000 × g 离心 5 分钟, 沉淀用 10 毫升左右的 1mM 的 EDTA 溶解, 再离心, 去不溶物。加  $\text{AlCl}_3$  使成 2M, 冰箱过夜, 离心去上清液。用 1mM EDTA 溶解沉淀, 离心去不溶物, 终体积 5 毫升。产物 260 毫微米/280 毫微米的光密度比值为 1.86, 一般浓度在 15 毫克/毫升左右。

2. 病叶总 RNA 在 Sepharose 6B 上的分部(以下操作在 7—9℃ 下进行。): Sepharose 6B (Pharmacia 公司出品) 柱床体积 3.0 × 100 厘米。柱先用

10mM Tris-10mM MgAc, 缓冲液(pH7.6)平衡, 加样 2 毫升左右, 并用同一缓冲液洗脱, 流出液用 LKB 紫外监测仪(uvicord II)监测, 绘出分部峰形, 分管收集, 根据不同峰形将流出液分成若干分部。将各分部的收集液分别合并, 加 2.5 倍体积冷乙醇和 3M 醋酸钠(每毫升加入一滴)于 4℃ 冰箱内静置 4 小时, 10,000 × g 离心 5 分钟, 沉淀溶于水, 即得各分部核酸。用凝胶电泳鉴定各分部主要组份, 并在麦胚无细胞体系中鉴定其翻译产物。

## (四) RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳

2.4% 圆管凝胶制备: 取 2 毫升丙烯酰胺储存液(15% 的丙烯酰胺和 0.75% 的双丙烯酰胺)加 6.135 毫升水和 4.165 毫升 3E 缓冲液(0.12M Tris-0.06M NaAc-0.003M EDTA pH7.4), 0.1 毫升 10% TEMED、0.1 毫升 10% 过硫酸铵混合后, 分别装入内径为 6 毫米的圆管中, 用 1E 缓冲液(3 倍稀释的 3E 缓冲液)做电极缓冲液, 加样前在 4℃ 冰箱中预冰 1 小时, 加样 10—100 微克, 体积不超过 100 微升为宜, 加 1/10 样品体积的指示剂(0.2% 溴酚蓝溶于 50% 蔗糖中)电泳 2—3 小时, 电流 5 毫安/管, 电压 80—100 伏, 凝胶取出后在 1N 醋酸中固定 20 分钟, 用甲苯胺蓝(0.05% 甲苯胺蓝溶于 15% 乙醇中)染色 30 分钟, 水脱色或不染色, 直接在紫外扫描仪(Joyce, Loebel, U. V Scanner)扫描。

## (五) TMV-RNA 的甲醛处理

将总体积为 0.5 毫升含有下列组分: 9mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、0.1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、0.2M NaCl、0.33M 甲醛和光密度 260 毫微米 = 5.0 的 TMV-RNA 的溶液, 于 37℃ 保温 2 分钟后, 立即冷却, 加两倍体积 -20℃ 乙醇, 置于冰箱 20 分钟, 10,000 × g 离心 15 分钟, 取沉淀溶于 0.5 毫升 0.2 M NaCl 中, 再用上述冷乙醇洗沉淀一次, 沉淀用乙醇洗涤两次, 再用乙醚洗涤一次后, 将沉淀溶于水备用。

## (六) SDS 平板聚丙烯酰胺凝胶电泳分析小麦胚无细胞体系的翻译产物

按 Maizel<sup>[14]</sup>的方法制备 13% 的分离凝胶和 3% 浓缩凝胶(30% 的丙烯酰胺和 0.8% 的双丙烯酰胺), 凝胶厚 0.2 厘米, 稳定电流 2 毫安/0.2 平方厘米胶, 电泳 7 小时。电泳后若染色, 则先在 50% TCA 中固定过夜, 用 0.1% Coomassie

亮蓝 R<sub>250</sub> (溶于 50% TCA 中) 在 37℃ 下染色 1 小时, 用 7% 醋酸扩散脱色。

作标准蛋白质凝胶电泳相对泳动率的标准曲线: 选用标准蛋白质为牛血清白蛋白(分子量为 68,000), 卵白蛋白(分子量为 45,000), 糜蛋白酶原(分子量为 25,000), 烟草花叶病毒外壳蛋白(分子量为 17,000), 细胞色素 C (分子量为 12,000) 在上述条件下电泳, 以其分子量的对数对相对泳动率 ( $R_f$ ) 做图。以此鉴定小麦胚无细胞体系中翻译合成的蛋白质产物的分子量。

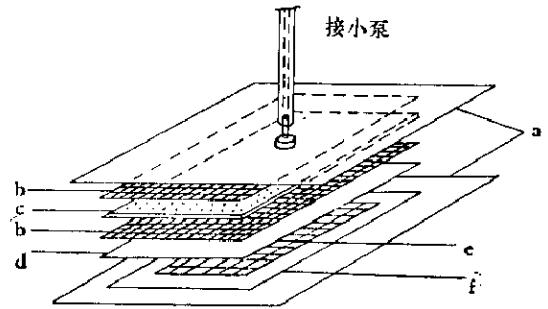


图 2 平板聚丙烯酰胺凝胶干燥装置。

a. 0.2 厘米厚的硅橡胶; b. 金属纱网, 孔洞为 1 毫米<sup>2</sup>; c. 0.2 厘米厚的胶合板; 上面布有均匀孔洞, 孔洞间有槽相通; d. Watman 1 号滤纸; e. 平板凝胶; f. 玻璃纸。

小麦胚无细胞体系反应混合物保温后, 按下列两种方法之一处理:

1. 丙酮终止反应: 200 微升麦胚无细胞反应液加 5 毫升冷丙酮终止反应。沉淀用 3 毫升冷丙酮洗两次, 加 200 微升水、15 微升 1N NaOH 使溶解, 溶液加 3 毫克 SDS、10 微升巯基乙醇, 在 100℃ 水浴中煮 5 分钟, 置透析袋中对 1% SDS 搅拌透析 24 小时, 取出透析袋内溶液加 1/10 体积的甘油-溴酚蓝溶液 (0.4 毫克溴酚蓝/1 毫升 50% 甘油)、10 微升巯基乙醇, 在 100℃ 水浴中解离 3 分钟。样品用上述 SDS 平板聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

2. EDTA-RNase 终止反应: 200 微升麦胚无细胞反应液加 35 微升 RNase 溶液 (125 mM EDTA、3% 酪蛋白水解液、0.2 毫克/毫升胰 RNase) 37℃ 20 分钟终止反应, 加 5 毫升 5% 冷 TCA, 冰冻过夜, 沉淀用冷 TCA 洗两次, 冷丙酮洗四次, 用 200 微升水、30 微升 1N NaOH 使溶解, 加 1/10 体积的甘油-溴酚蓝溶液、1% SDS、10 微升巯基乙醇 100℃ 煮 5 分钟, 样品用 SDS 平板聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

## 实验结果

(一) TMV 颗粒中的 RNA 或经甲醛处理的 TMV-RNA 都不能在体外作为 TMV 外壳蛋白质的 mRNA

1) 2,5-二苯基噻唑。

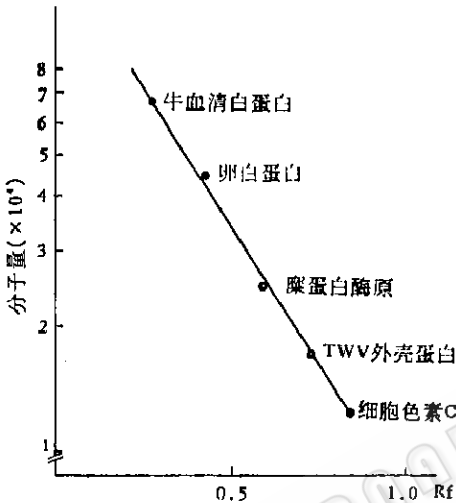


图 1 标准蛋白质凝胶电泳分子量和相对泳动率的标准曲线

### (七) 平板凝胶电泳后的放射自显影

电泳后将平板凝胶取出, 按图 2 所示的装置接好水泵, 使两块硅橡胶密合, 将整个干燥装置放在 45℃ 水浴中加热, 同时继续抽气约 4 小时, 8×9×0.2 厘米的凝胶即可干燥。若在未干燥前中断抽气或抽气弱, 冷凝回水都会使胶板龟裂。

若进行荧光放射自显影, 凝胶取出后直接放入 20 倍凝胶体积的二甲亚砷中脱水, 每次 30 分钟共两次。然后泡入 4 倍凝胶体积的 PPO<sup>1)</sup>-二甲亚砷溶液 (22.2% W/V) 3 小时, 再用水浸泡 1 小时。复原后将凝胶板按图 2 装置放好, 抽干<sup>(1)</sup>。干燥后的凝胶板与上海牌医用 X 光片重合, 在液氮中或包埋在干冰中曝光, 根据样品的放射性剂量适时显影。

(八) 小麦胚无细胞体系体外合成蛋白质的分析

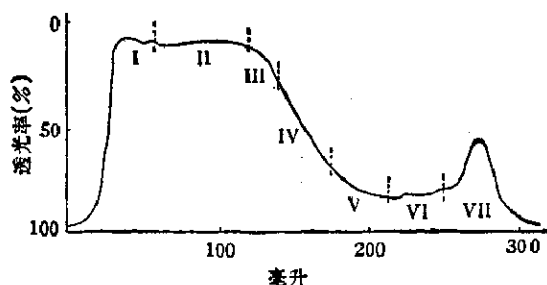


图3 病叶总 RNA 经 Sepharose 6B 柱分离后的图形

柱大小: 直径 3 厘米, 高 100 厘米。洗脱缓冲液: 10mM Tris, 10mM MgAc<sub>2</sub>, pH7.6, 流速 0.35 毫升/分, 上柱量 2 毫升 (16 毫克/毫升)。

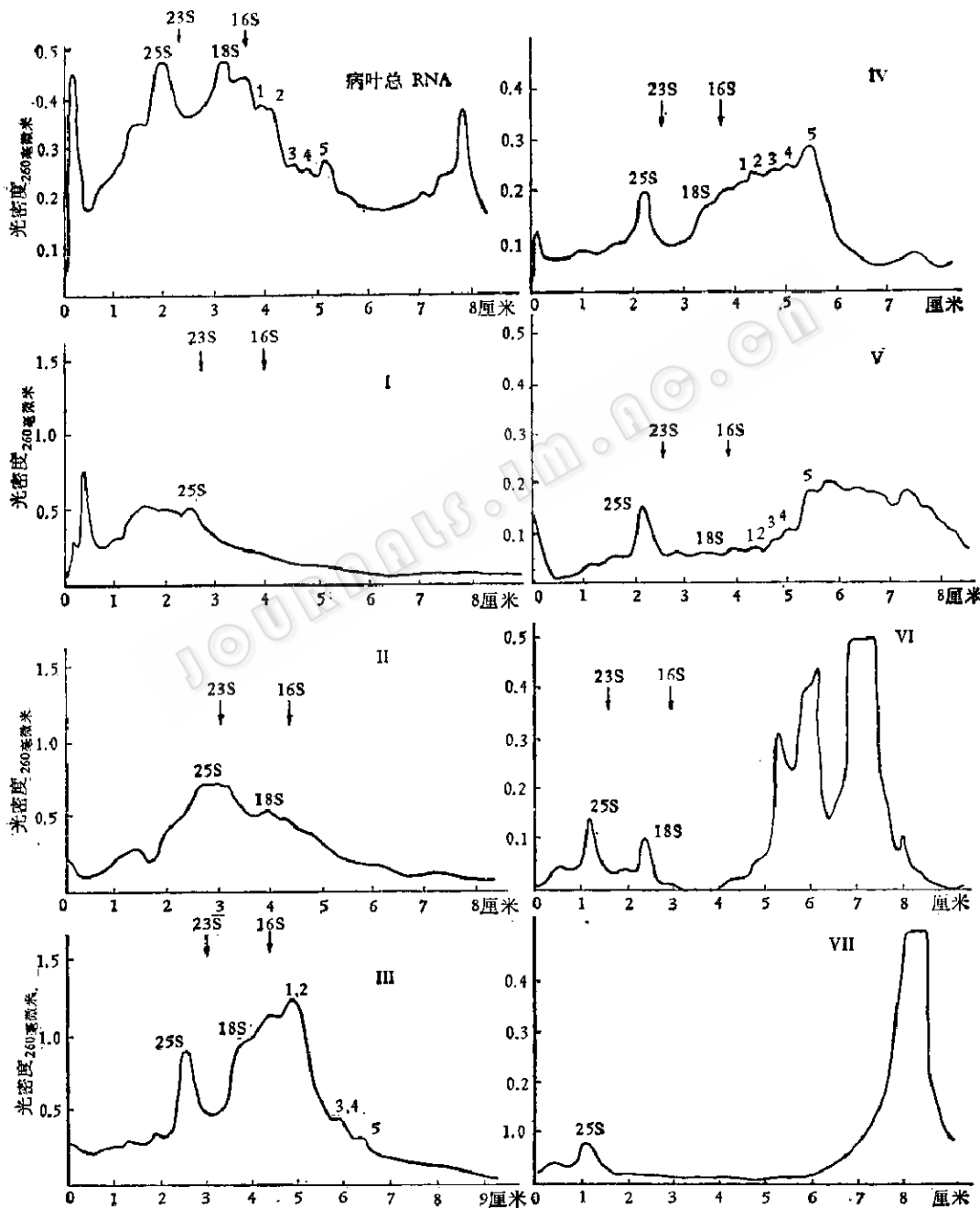


图4 病叶总核酸以及经 Sepharose 6B 分部后相应于图 3 的 7 个分部的核酸, 经凝胶电泳后的紫外扫描图谱

标号 1、2、3、4、5 为染色后可见到的分子量在  $2.5 \times 10^5$ — $4.5 \times 10^5$  道尔顿的 RNA。图中箭头表示大肠杆菌 23S 和 16S rRNA 的泳动位置。

TMV 含有外壳蛋白质的信息,但体外翻译工作表明,完整的 TMV-RNA 却不表现 TMV 外壳蛋白信使活性,有证据认为可能是 RNA 的二级结构妨碍了某一信使的超始区和核糖体进行反应。噬菌体  $\phi_2$  的 RNA 在 65°C 和甲醛反应使其信使活性造成 90% 以上的不可逆反应,若在温和条件下,37°C 则使  $\phi_2$ -RNA 的某些信使活性增加几倍甚至几十倍<sup>[16]</sup>。我们用甲醛处理 TMV-RNA 也试图改变 TMV-RNA 的构象,使外壳蛋白质信使区上的蛋白质合成起始点裸露出来。将 37°C 下处理 2 分钟的 TMV-RNA 和未处理的 TMV-RNA,分别加入小麦胚无细胞体系中做为外加信使模板,体外翻译产物用平板聚丙烯酰胺凝胶电泳分离分析,同时用天然的 TMV 外壳蛋白质做参照物,放射自显影的结果表明(图版 I-1),无论甲醛处理的还是未处理的 TMV-RNA 都不能在体外作为外壳蛋白质的 mRNA。

## (二) 用 Sepharose 6B 分部病叶总 RNA, 所得各分部在体外蛋白质合成体系中测定其外壳蛋白质信使活性

将病叶总 RNA 2 毫升(16 毫克/毫升)上 Sepharose 6B 柱,流速 0.35 毫升/分,则总 RNA 被分部成两个主峰(图 3),根据图 3 的峰形,将流出液分成 7 个分部,合并各分部收集液回收核酸,用凝胶电泳检查核酸被分部的情况,以本实验室制备的大肠杆菌的 16S 和 23S 核糖体 RNA 为参照物<sup>[17]</sup>,如图 4。从图 4 可见 I 分部中主要是 >25S 的 RNA, II 分部主要是 25S—18S 的 RNA, III 分部中是  $4 \times 10^5$  道尔顿以上的 RNA,其中包括富集的 RNA<sub>1,2</sub>, 16S RNA 和部分 18S, 25S 的 RNA, IV 分部是分子量在  $2.3 \times 10^5$ — $4.5 \times 10^5$  道尔顿富集的 RNA<sub>1,2,3,4,5</sub> 部分, V, VI, VII 分部所含的 RNA 的分子量依次减少。

将总核酸以及 I、IV 分部核酸分别加

入小麦胚无细胞体系做为外加 mRNA, 用 [<sup>3</sup>H]-赖氨酸或 [<sup>14</sup>C]-蛋白水解液做标记氨基酸,保温后用 SDS 平板聚丙烯酰胺凝胶电泳和荧光放射自显影分析新合成的蛋白质,确定有无 TMV 外壳蛋白质的合成。结果 I 分部没有外壳蛋白质合成,病叶总 RNA 和 IV 分部的 RNA 有外壳蛋白质合成(见图版 I-2、3)。

TMV 普通株的外壳蛋白质中不含组氨酸,若以病叶总 RNA 或 IV 分部的 RNA 为小麦胚无细胞体系的外加 mRNA,以 [<sup>3</sup>H]-组氨酸做该体系的标记氨基酸,则在 [<sup>14</sup>C]-标记的天然外壳蛋白质的位置不再出现 [<sup>3</sup>H]-标记的外壳蛋白质(见图版 I-4)。这样就初步从反面证明:图版 I-2E 和图版 I-3E 中与天然 TMV 外壳蛋白质位置相等的 [<sup>14</sup>C] 和 [<sup>3</sup>H] 标记的新合成的蛋白质不仅分子量为 17,500 道尔顿,而且是不含组氨酸残基的 TMV 外壳蛋白质。

## 讨 论

1. 完整的 TMV 颗粒中的 RNA 在小麦胚无细胞体系中不能有效地翻译出外壳蛋白质,即使经甲醛做温和处理,使其变构后,也仍然不能翻译出来。最近 Schwinghammer<sup>[18]</sup> 在四种不同体外体系中研究黄瓜花叶病毒 RNA 的翻译,发现其翻译产物不同,甚至互相矛盾。说明体外体系是有其局限性的。因此为进一步研究 TMV-RNA 的翻译,有必要考虑病毒寄主同源体外体系,同时要体内外互相验证。

2. 感染 TMV 的烟叶总核酸经 Sepharose 6B 分部后的第 IV 分部,从小麦胚无细胞体系的翻译产物分析是含有 TMV 外壳蛋白质 mRNA 的。但要确证产物是 TMV 外壳蛋白质,更充分的证据是检查体外合成的 TMV 外壳蛋白质与天然 TMV-RNA 重新组合的能力及其对 TMV 抗血清的免

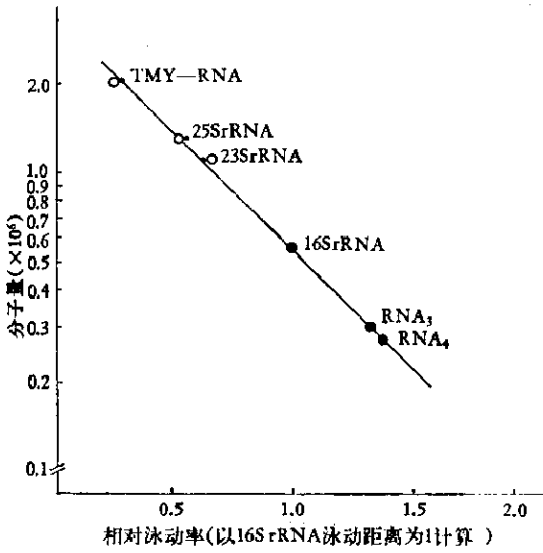


图5 病叶总核酸经 Sepharose 6B 分部后 IV 分部中  $RNA_3$ 、 $RNA_4$  的分子量。

以 TMV-RNA、烟叶 25 S、大肠杆菌 23S、16S rRNA 分子量的对数及其相对泳动率做标准曲线计算  $RNA_3$ 、 $RNA_4$  的分子量

疫特性。

第 IV 分部从凝胶电泳扫描图上看是多组份的，究竟那一条带是否就是 Knowland<sup>[10]</sup>、Seigel<sup>[11]</sup> 等人报道的 LMC 呢？根据分子量分析第 IV 分部中的  $RNA_3$ 、 $RNA_4$  带正是位于  $0.25 \times 10^6$ — $0.3 \times 10^6$  范围（图 5）似乎应该是做为 TMV 外壳蛋白信使的 LMC。问题是我们初步对比病叶和健叶总 RNA 的凝胶电泳图谱，发现健叶总核酸在  $0.25 \times 10^6$ — $0.3 \times 10^6$  范围内也有

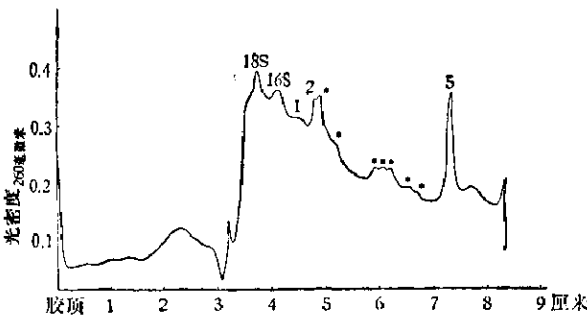


图6 IV 分部核酸在不连续浓度梯度凝胶中电泳后的扫描图谱

(\*为在原来  $RNA_3$ 、 $RNA_4$  区域出现 7 个染色后明显可见的着色带)

这些小分子 RNA，似乎和 Knowland<sup>[10]</sup> 的图谱并不一致。同时，将病叶总 RNA 经不连续梯度凝胶电泳（顶部 3 厘米为 3% 凝胶，底部 5 厘米为 4.5% 凝胶）结果，发现  $RNA_{3,4}$  带的区域出现 7 个着色带（图 6）。可见这一小分子 RNA 区域是相当复杂的。究竟那一条是 TMV 外壳蛋白质的 mRNA，有待进一步深入分析。

3. 无论是 TMV 颗粒中的 RNA 或是病叶总 RNA 或经 Sepharose 6B 分部后的 I 分部，在小麦胚无细胞体系中都能翻译出分子量 30,000 左右的蛋白质带，这是否就是 Beachy 等人<sup>[19]</sup> 最近报道普通株病毒颗粒中较大的中间型颗粒  $I_{1-A}$  的 RNA 翻译产物，有待进一步证实。

## 参 考 文 献

- [1] Richards, K. E. et al.: *FEBS. Lett.*, 43: 31, 1974.
- [2] Garfin, D. E. et al.: *Virology*, 61:388, 1975.
- [3] Skotnicki, et al.: *Intervirology*, 7:(4—5), 272, 1976.
- [4] Aach, H. G. et al.: *Biochemistry*, 9:1362, 1964.
- [5] Schwartz, J. H.: *J. Mol. Biol.*, 30:309, 1967.
- [6] Efron, D. et al.: *Virology*, 57:343, 1973.
- [7] Roberts, B. E. et al.: *J. Mol. Biol.*, 80: 733, 1973.
- [8] Jackson, A. O. et al.: *Virology*, 48:655, 1972.
- [9] Siegel, A. et al.: *Virology*, 53:75, 1973.
- [10] Knowland, T. et al.: *Nature*, 260: No. 5554, 759, 1976.
- [11] Siegel, A. et al.: *Virology*, 73, 363, 1976.
- [12] 中国科学院微生物研究所病毒复制组：生物化学与生物物理学报，8(2)，179 页，1976 年。
- [13] Fraenkel-Conrat, H.: *Virology*, 4:1, 1957.
- [14] Maizel, J. V. Jr.: "Method in virology" vol. 5, 334, Academic Press 1971.
- [15] Bonner, N. M. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 46:83, 1974.
- [16] Lodish, H. F.: *J. Mol. Biol.*, 50:689, 1970.
- [17] 中国科学院微生物研究所病毒复制组：微生物学报，16(3):249—255, 1976 年。

[18] Schwinghamer, M. W.: *Virology*, 79(1): 88, 1977.

[19] Beachy, R. N. et al.: *Virology*, 81:160, 1977.

## PRELIMINARY STUDIES ON THE ISOLATION OF THE mRNA FOR TMV-COAT PROTEIN AND THE ANALYSIS OF ITS IN VITRO TRANSLATION PRODUCTS

Peng Xue-xien, Wu Shi-xuan, Cai Wen-qi,  
Zhao Shu-zhen and Mang Ke-qiang\*

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Total RNA had been extracted from tobacco leaves infected by TMV common strain and fractionated into seven fractions by Sepharose 6B gel chromatography. The distribution of various kinds of RNAs was examined by gel electrophoresis. A quite strong radioactive band with the same electrophoretic mobility as ( $^{14}\text{C}$ )-authentic coat protein was synthesized in the wheat embryo cell-free incubations provided with ( $^{14}\text{C}$ )-protein hydrolysate and programmed with the total RNA from TMV-infected leaves or the RNA of fraction IV obtained after chromatography, but not in the incubations programmed with virion RNA or formaldehyde treated virion RNA. This radioactive band was not seen in flurogram under the same conditions when the ( $^{14}\text{C}$ )-protein hydrolysate was substituted by ( $^3\text{H}$ )-his. Thus

we concluded that such radioactive band is the newly synthesized TMV-coat protein.

The gel electrophoretic patterns have showed that fraction IV contains the enriched low molecular weight RNAs in which RNA<sub>3</sub> and RNA<sub>4</sub> probably correspond to the LMC reported previously. It is note worthy that the two bands RNA<sub>3</sub> and RNA<sub>4</sub> became seven bands as the RNAs of the fraction IV from infected leaves were separated by gel electrophoresis with a discontinuous concentration gradient (3% and 4.5%). So the LMC region might be a complex multidispersive one. As to which band is the real mRNA for TMV-coat protein remains to be studied.

\* i.e. Mang Kei-chiang.