

在离体转录中产生的一些比 TMV-RNA 短的片段

方荣祥 卜明 蔡发兴

(中国科学院微生物研究所, 北京)

体内合成的 TMV 特异的双链型 RNA (RF 和 RI) 在 98°C 加热 45 秒的热变性条件下可拆成完整的 TMV-RNA, 而用感染 TMV 的烟叶无细胞提取物 (20,000 × g 沉淀) 在放线菌素 D 存在下离体合成的病毒特异的双链型 RNA (具有与 RF 和 RI 相同的表观分子量) 在同一条件下只产生 8—10 个比病毒粒子 RNA 短的片段, 其中有几个在大小上与 Beachy 和 Zaitlin (1977)^[1] 在 TMV 制品的短颗粒中发现的 RNA 颇为一致。讨论了这些部分转录产生的 RNA 片段作为 TMV 特异的 mRNA 的可能性。

烟草花叶病毒 (TMV) 的基因组是一条分子量为 2.0×10^6 的单链 RNA, 它本身具有侵染性和信使 RNA (mRNA) 活性, 所以 TMV 同 Q_β 噬菌体、脊髓灰白质炎 (polio) 病毒一样, 也是一种“正链病毒”或“侵染型病毒”。TMV-RNA 的复制和翻译的研究已取得一些进展, 但目前还不能清楚地勾划出其全部过程。关于 TMV-RNA 作为复制的模板和作为翻译的模板二者之间的调节, TMV 的各种 mRNA (也许不止一种) 与病毒粒子 RNA 的关系以及它们是如何产生的, 目前还很不清楚。

从感染 TMV 的烟草组织中除能分离到 TMV-RNA 外, 还能分离到二种具有病毒特异的分子量分别为 5.0×10^6 和 4.0×10^6 的双链型 (ds) RNA: 复制中间体 RI 和复制型 RF^[2-3]。虽然对它们的双链性是否由于提取 RNA 过程中使用的蛋白变性剂造成的尚有争议, 但体内的脉冲-追逐 (pulse-chase) 实验和它们与 TMV-RNA 在合成时间上的关系表明 RI 和 RF 可能是 TMV-RNA 的前身^[4,5]。在 TMV-RNA 的离体合成中也能产生大小同 RI 和 RF 的双链型 RNA, 但无单链 (ss) TMV-RNA 合成^[6,7], 离体的脉冲-追逐实验也未证实 RI

和 RF 与 TMV-RNA 的前身与产物的关系^[8], 说明对离体合成的 TMV 特异的双链型 RNA 的构成情况还不了解。

我们前已报道过, 用感染 TMV 的烟叶无细胞提取物 (20,000 × g 沉淀) 在离体条件下, 除合成与健叶提取物合成的相同的单链小分子量 RNA (分子杂交表明它与 TMV-RNA 无关) 外, 主要产生 TMV-RNA 的 RI 和 RF, 分子杂交实验表明, 其中 60—70% 的新合成的 RNA 链为正链^[7]。本文进一步分析了这些离体产生的双链型 RNA 的内部构成成分, 表明其中新合成的并不含有完整的 TMV-RNA, 而只含有 8—10 个比 TMV-RNA 短的片段。讨论了这些短片段的可能的功能以及它们在 TMV-RNA 复制和翻译中的地位。

材料与方 法

(一) 材料

植株和病毒: 实验中所选用的为普通烟 (*Nicotiana tabacum*) 黄苗榆品种, 温室培养后移至人工控制室培养。用提纯的 TMV 0.3—0.5 毫克/毫升 (在 0.067 M, pH 7.0 磷酸缓冲液中), 加少许金钢砂磨擦接种。

本文于 1979 年 1 月 26 日收到。

(二) 方法

1. 离体合成的³H 标记的 ds-TMV-RNA 的制备

从接种后继续在人工控制室(25—27℃)内每天以 30,000 勒克斯的连续光照培养三天的感染 TMV 的烟叶中分离含有 TMV-RNA 复制酶的无细胞提取物(20,000×g 沉淀)。提取物与四种三磷酸核苷(ATP、GTP、CTP、³H-UTP 30 微居/毫升),在放线菌素 D 的存在下,于 33℃ 水浴中保温 60 分钟离体合成 RNA。经酚-SDS 提取, Serva 纤维素柱二次层析获得不含单链 RNA 的³H 标记 ds-TMV-RNA (包括 RF 和少量的 RI),经乙醇沉淀浓缩后溶于 TE 缓冲液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH7.0)^[7]。

2. 体内合成的³²P 标记的 ds-TMV-RNA 的制备^[3]

切取接种后五天的感病植株的地上部分,除去老叶后,放在 37℃ 恒温箱内使稍萎蔫,分别插入盛有 NaH₂PO₄ (pH 7.0) 的烧杯中,然后以缺磷的 Hoagland 营养液保湿,在 24℃ 下光照(400 勒克斯)16 小时,黑暗 8 小时。从感染 TMV 的烟叶组织中提取³²P 标记的总 RNA,同样用 Serva 纤维素柱二次层析分离得到³²P 标记的 ds-TMV-RNA (包括 RF 和少量的 RI),溶于 TE 缓冲液中。

3. ds-TMV-RNA 的热变性拆链

ds-TMV-RNA 样品置于封闭管中,于一定温度的水浴中加热,然后立即放入冰水浴中冷却,低速离心使管壁沾附的样品沉下来。用 2.0% 聚丙烯酰胺(其中含有 0.1% 甲叉双丙烯酰胺)-0.3% 琼脂糖的圆管凝胶(80×6 毫米)电泳测定所拆得的 ss-RNA 的分子量。以 TMV-RNA 的 RF 型、TMV-RNA 和 *E. coli*-RNA 为参照物^[7]。凝胶及电泳槽中的缓冲液均为 0.04 M Tris, 0.02 M NaAc, 2mM EDTA, pH7.8。加样前预电泳 1 小时,加样后以 2.5 毫安/管电泳 15 分钟,然后加大电流以 5 毫安/管电泳 105 分钟。电泳结束后在紫外光扫描仪上确定各参照 RNA 的位置,然后迅速将凝胶横向切片(2.16 毫米/片)。

³H 标记的样品: 将每片凝胶放入液体闪烁瓶中,加入 0.5 毫升 30% H₂O₂ 和 5 微升浓氨水,盖紧瓶盖后,于 55—60℃ 中保温 12 小时,冷至室

温后,加入 5 毫升二氧六环闪烁液(含 0.4% PPO, 0.002% POPOP, 6% 萘, 10% 甲醇),在 NE 8312 液体闪烁谱仪上测定放射性计数。

³²P 标记的样品: 将凝胶片置于圆滤纸片上, 65℃ 烘干,放入装有 5 毫升甲苯闪烁液(含 0.4% PPO, 0.002% POPOP)的测定瓶内,在 NE 8312 液体闪烁谱仪上测定放射性计数。

4. 离体合成的³H 标记的 ds-TMV-RNA 的解链温度(T_m值)测定

26 微升³H 标记的 ds-TMV-RNA 加入 50 微升 TE 缓冲液,置于封闭管中,分别在不同温度水浴中加热 5 分钟,立即用冰水浴冷却,然后在 2.0×SSC(1.0×SSC、0.15 M NaCl、0.015 M 柠檬酸钠, pH 7.0)中测定对 RNase 水解的抗性^[7]。

实验结果

(一) 体内合成的³²P 标记的 ds-TMV-RNA 的拆链条件

用³²P 标记的 ds-TMV-RNA 分别在 85℃、2 分钟, 90℃、1 分钟, 90℃、2 分钟, 94℃、1 分钟, 98℃、45 秒及 100℃、1 分钟的条件下进行热变性破坏氢链,使双链不同程度地拆为单链。从凝胶电泳分析(图 1)中可以清楚地看到拆链的结果,以 98℃、45 秒即较高温度,较短时间为最好,在此条件下,几乎全部的 ds-TMV-RNA 拆开成为单链的 TMV-RNA,而且不使单链的 TMV-RNA 进一步断裂。结果表明体内合成的³²P 标记的 ds-TMV-RNA 确由完整的单链 TMV-RNA 组成,少量比 TMV-RNA 短的片段可能来自于原来 ds-TMV-RNA 中 RI 的单链尾巴。我们选用 98℃、45 秒为³H 标记的 ds-TMV-RNA 的拆链条件。

(二) 离体合成的³H 标记的 ds-TMV-RNA 的 T_m 值测定

用逐渐提高温度的方法测定 ds-TMV-RNA 的解链温度(T_m值),即 ds-TMV-RNA 有 1/2 变为 ss-RNA 的温度。若使用

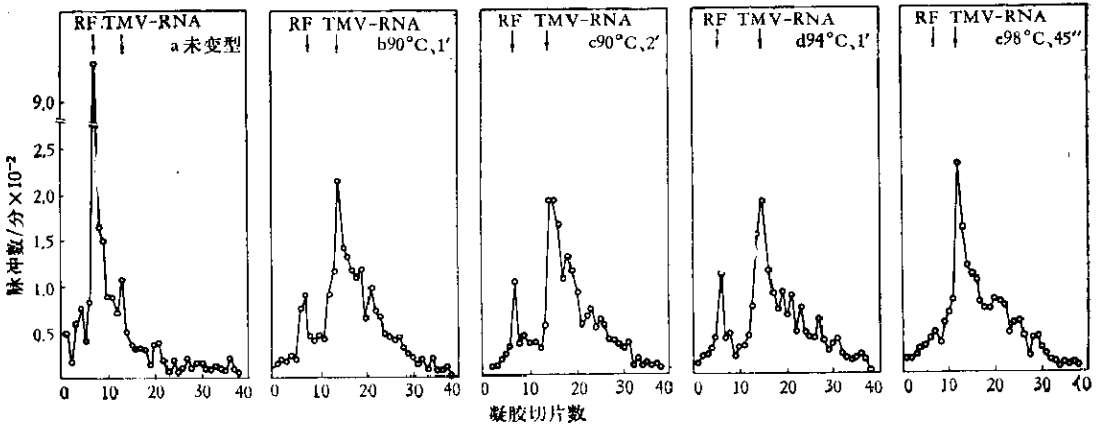


图1 体内合成的 ^{32}P 标记的 ds-TMV-RNA 的热变性拆链的电泳分析

^{32}P 标记的 ds-TMV-RNA 溶液 (1,500 脉冲数/分) 于封闭的薄壁安瓿管中, 在不同条件下进行热变性拆链, 用 2.0% 聚丙烯酰胺-0.3% 琼脂糖凝胶电泳检查拆链的结果。电泳时加入“冷”的 TMV-RNA 的 RF 型和 TMV-RNA 作参照物, 用紫外光扫描确定各参照物的位置。然后将凝胶切片, 用液体闪烁法测定放射性计数 (已扣除本底 30 脉冲数/分)。

热变性条件: a——未经热变性, b——90°C 加热 1 分钟, c——90°C 加热 2 分钟, d——94°C 加热 1 分钟, e——98°C 加热 45 秒。

放射性同位素标记的 ds-RNA, 则可以测定在热变性后抗 RNase 水解的放射性计数。放射性计数处于稳定的最高值 (ds-RNA 未变性) 和最低值 (ds-RNA 完全拆开为 ss-RNA) 中点的温度为 T_m 值。在此温度附近, ds-RNA 的放射性计数急剧下降。我们测出离体合成的 ^3H 标记的 ds-TMV-RNA 在 TE 缓冲液中解链温度约为 81°C (图 2), 与 Kielland-Brand 等人^[9]在离子强度比 TE 缓冲液稍大的 $0.1 \times \text{SSC}$ 溶液中测得的体内合成 ds-TMV-RNA 的解链温度 (86°C) 比较接近, 但离体合成的 ds-TMV-RNA 表现出较宽的变性温度范围, 可能同它的内部结构有关。

(三) 离体合成的 ^3H 标记的 ds-TMV-RNA 的拆链

用热变性拆链的方法探索用含有 TMV-RNA 复制酶的感染 TMV 的烟叶无细胞提取物 ($20,000 \times g$ 沉淀) 离体合成的 ^3H 标记的 ds-TMV-RNA 的内部构成成分, 企图从此获得对 TMV-RNA 的复制过程的进一步了解。结果, 已表明 98°C、45

秒的热变性条件可使体内合成的 ^{32}P 标记的 ds-TMV-RNA 拆成完整的 ss-TMV-

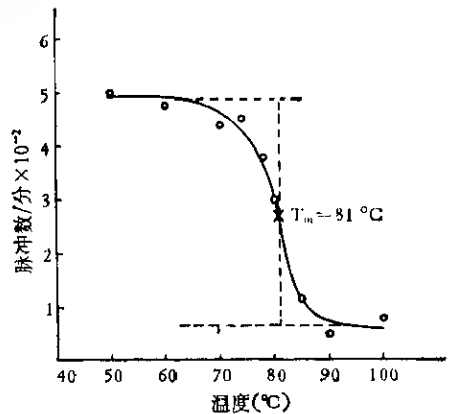


图2 离体合成的 ^3H 标记 ds-TMV-RNA 的解链温度的测定

26 微升 ^3H 标记的 ds-TMV-RNA (650 脉冲数/分) 加入 50 微升 TE 缓冲液, 于封闭的薄壁安瓿管中在不同温度下加热 5 分钟, 立即用冰水冷却, 加入 20 微升 $10 \times \text{SSC}$ 溶液 (最终浓度 $2 \times \text{SSC}$) 和 10 微升 RNase A + RNase T₁ 溶液 (最终浓度 RNase A 50 微克/毫升, RNase T₁ 9 单位/毫升), 33°C 水浴保温 20 分钟, 取 70 微升于 Whatman 3 毫米纸片上, 用甲苯闪烁液测定三氯乙酸不溶的放射性计数 (已扣除本底 35 脉冲数/分)。

RNA 而不使之进一步断裂, 从图 2 也可看到 98°C 处于能使离体合成的 ^3H 标记的

ds-TMV-RNA 完全拆开的温度范围(超过曲线转变区几度),所以采用同样的条件处理离体合成的³H 标记的 ds-TMV-RNA。多次实验结果反复表明,离体保温 60 分钟合成的³H 标记的 ds-TMV-RNA 中几乎不含有新合成的完整的 TMV-RNA,而只含有 8—10 个具有固定长度的比 TMV-RNA 短的片段(图3)。这说明离体合成的 ds-TMV-RNA 虽然具有与体内合成的 ds-TMV-RNA 一样的表观分子量^[3,7],但其内部构

成成分并不一样,这也表明我们使用的复制 TMV-RNA 的离体体系还不完善。

以 TMV-RNA、*E. coli* 16S 和 23 S rRNA 为参照物测定了各 RNA 片段的近似分子量(图 4)。表 1 列出各片段的分子量与 Beachy 和 Zaitlin^[10]在 TMV 三个株系的比完整 TMV 短的核蛋白棒中发现的 RNA 的分子量,可见它们之间十分近似。

此外,从图 3 还可看出,随着电泳泳动率的增加,代表各片段相对质量的峰面积

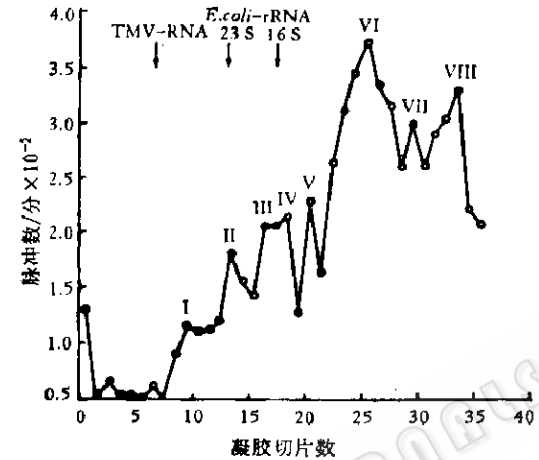


图 3 离体保温 60 分钟合成的³H 标记的 ds-TMV-RNA 的热变性拆链的电泳分析

离体合成的³H 标记 ds-TMV-RNA 溶液(7,800 脉冲数/分,于二氧六环闪烁液中测定)于封闭的薄壁安瓿管中 98℃ 加热 45 秒进行热变性拆链,用 2.0% 聚丙烯酰胺-0.3% 琼脂糖凝胶电泳检查拆链的结果。电泳时加入“冷”的 TMV-RNA、*E. coli* 16S RNA 和 23 S RNA 作参照物,用紫外光扫描确定各参照物的位置,然后将凝胶切片,用 H₂O 溶解后加入二氧六环闪烁液测定放射性计数(已扣除本底 38 脉冲数/分)。

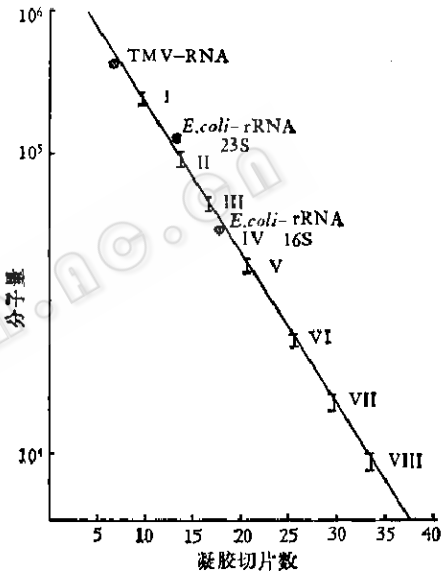


图 4 离体合成的³H 标记的 ds-TMV-RNA 经热变性拆链后得到的各 RNA 片段的分子量标定曲线根据图 3 的凝胶电泳图作成。各参照 RNA 的分子量为: TMV-RNA 2.0×10^6 , *E. coli* 23 S RNA 1.13×10^6 , *E. coli* 16S RNA 5.6×10^5 。根据各 RNA 片段所处的凝胶切片确定了各 RNA 片段的分子量范围。

表 1 热变性拆链离体合成的各 RNA 片段与 TMV-RNA 的分子量比较

RNA 片段的来源		各 RNA 片段的分子量 ($\times 10^5$)							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
离体合成 60 分钟		16.0—14.5	10.1—9.0	7.1—6.4	5.6—5.0	4.5—4.0	2.5—2.25	1.6—1.4	1.0—0.88
TMV 各株系中的短棒	豇豆株	17	13—11	6.9—6.8	5.1		2.8		
	小麦株	15—14	13—9	6.9—6.8	5.1				
	普通株	16—15.5	13—9	6.9—6.8					

并不随着这些片段的分子量的减少而呈现同样幅度的减少, 因此推算各片段不以等克分子存在, 其中尤以分子量与现已确认的 TMV 外壳蛋白 mRNA (LMC 或 s-RNA, 分子量 $2.5-3.5 \times 10^5$) 相当的片段 VI 的相对克分子数为高 (图 3)。

还分析了离体保温 10 分钟产生的 ^3H 标记的 ds-TMV-RNA 在 98°C 、45 秒热变性后得到的各 RNA 片段的大小, 发现也几乎没有完整的 TMV-RNA 合成。但各片段的大小和相对克分子数与保温 60 分钟合成的产物稍有不同, 确切的结果还有待于进一步重复实验。

讨 论

在感染 TMV 的烟叶组织中已发现几个病毒特异的比病毒粒子 RNA 短的游离 RNA 片段。Jackson 等人^[4]和 Seigel 等人^[11]在感染 TMV 的烟叶细胞培养物和叶条组织中发现分子量为 3.5×10^5 的低分子量组分 RNA (简称 LMC), 证实它是 TMV-RNA 的其中一段; 最近还明确了它相当于 TMV-RNA 3' 末端的 750 个核苷酸^[12]。Siegel 等人^[13]在感病的烟叶组织中除了 LMC 外还发现了其它几种病毒特异的 RNA, 其中之一的分子量为 1.1×10^6 。

Beachy 和 Zaitlin^[14]在感染 TMV 的烟叶的多核糖体中也发现了一些比病毒粒子 RNA 短的大小不同的 RNA, 其中主要的是大小同 LMC 相同的 RNA 片段; 通过分子杂交试验表明它们都与 TMV-RNA 具有序列的同源性。

另外在 TMV 的病毒制品中除了长度为 300 毫微米的完整的棒状病毒颗粒外, 还有一些短的核蛋白棒存在。Whitfield 和 Higgins^[15]及 Bruening 和 Zaitlin^[16]分别发现 TMV 豇豆株的主要的一种短棒为 30 毫微米长, 其中的 RNA 分子量为 3.0×10^5 , 此

外还有一些中等长度的棒。最近 Beachy 和 Zaitlin^[10]分析了 TMV 三个株系 (豇豆株、普通株、小麦株) 的短棒中的 RNA, 发现它们都是含有 TMV-RNA 3' 末端的病毒 RNA 片段, 其中豇豆株的短棒中的 RNA (s-RNA) 相当于普通株的不能包上外壳蛋白的 LMC (表 1)。

与此同时, 研究了这些以不同形式存在的病毒特异的短 RNA 在体外蛋白质合成体系中的信使功能。Hunter 等人^[17]、Siegel 等人^[17]、彭学贤等人^[18]在麦胚体系中证实 LMC 是 TMV 外壳蛋白的 mRNA; Higgins 等人^[19]和 Bruening 等人^[16]也分别证实了 TMV 豇豆株的 s-RNA 是 TMV 外壳蛋白的 mRNA; Beachy 和 Zaitlin^[10]对 TMV 三个株系的各种短棒中的 RNA 的翻译功能进行了较全面的分析, 发现分子量为 6.8×10^5 的 RNA 在麦胚体系中都编码分子量约为 30,000 的多肽, 并证实该多肽是不同于 TMV 外壳蛋白的一种蛋白, 但其功能尚不详。Zaitlin 等人^[20]用分子杂交试验表明 TMV 豇豆株的病毒粒子 RNA 和 6.8×10^5 的 RNA 中都含有外壳蛋白基因, 但在蛋白质体外合成体系中并不表达。

从以上事实可以推想, 与 TMV 有关的 mRNA 有好几种, 除长度同病毒粒子 RNA 一样的一种外, 其余的都比它短, 它们可能采取单顺反子的翻译方式, 即一种 mRNA 只表达生成一种多肽, 即使它含有不止一个基因; 大多数生成的产物不再经过大的加工而成为最终的功能性蛋白。但对这些大小不同的 mRNA 的产生机制 (是病毒 RNA 在翻译前的断裂形成的还是在病毒互补 RNA 上部分的或选择性的转录生成的) 还不清楚。这样, TMV 的翻译方式与同是正链病毒但寄主范围大相迳庭的 Q_β 噬菌体和 polio 病毒都有很大的不同, 前者

是以多顺反子 RNA 作模板翻译,产物是三个功能性的蛋白,后者是一个单顺反子 RNA (但含有多个基因) 翻译成一个相当于全基因组长的大肽前体,然后再切断成各个功能性蛋白。事实上,这三个不同的正链病毒在病毒 RNA 结构上也很不一样,它们的 RNA 复制机制也必然会有差异。

本文的结果表明,用感染 TMV 的烟叶无细胞提取物 ($20,000 \times g$ 沉淀) 进行离体 RNA 合成时,没有完整的 TMV-RNA 合成,而是产生了 8—10 个具有固定长度的、能重复出现的比 TMV-RNA 短的片段(前已证实^[7]它们大部分是正链 RNA),其中有几个与 Beachy 和 Zaitlin^[10]在 TMV 短棒中发现的 RNA 在大小上颇为一致(表 1)。因此推测我们现在所使用的 TMV-RNA 离体合成体系并未完成 TMV-RNA 的复制,可能是缺少了某些因子,倒像是反映了 TMV 整个复制过程中的其中一步,即从负链 RNA 模板上部分转录生成了 TMV 的各种 mRNA (大小同 TMV-RNA 的那种 mRNA 除外),这些 mRNA 也可能被外壳蛋白包被形成人们所发现的较短的核蛋白棒。粗略的推算表明各 RNA 片段不以等克分子存在,特别是大小同 LMC 的那个片段克分子数尤其多,这同一个病毒粒子需要大量的(约 2,200 个)相同的外壳蛋白亚单位相符,并且似乎表明在转录生成该 mRNA 时存在一种选择性转录的机制,同时这些比 TMV-RNA 短的片段可能在转录及翻译中具有重要的功能,但要充分

证明这些结论,还需做大量的工作。

参 考 文 献

- [1] Jackson, A. O. et al.: *Virology*, **45**: 182—191, 1971.
- [2] Nillson-Tillgran, T.: *Mol. Gen. Gent.*, **109**: 246—259, 1970.
- [3] 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。
- [4] Jackson, A. O. et al.: *Virology*, **48**: 655—665, 1972.
- [5] Aoki, S. and I. Takebe: *Virology*, **65**: 343—354, 1975.
- [6] Bradley, D. W. and M. Zaitlin: *Virology*, **45**: 192—199, 1971.
- [7] 方荣祥、王小凤、覃荣益、蔡发兴、卜明: 中国科学, **10**: 1005—1015, 1979。
- [8] Zaitlin, M. et al.: *Virology*, **53**: 300—311, 1973.
- [9] Kielland-Brand, M. C. et al.: *Mol. Gen. Gent.*, **121**: 219—228, 1973.
- [10] Beachy, R. N. and M. Zaitlin: *Virology*, **81**: 160—169, 1977.
- [11] Siegel, A. et al.: *Virology*, **53**: 75—83, 1973.
- [12] Hunter, T. R. et al.: *Nature*, **260**: 759—764, 1976.
- [13] Siegel, A. et al.: *Ann. Microbiol.*, **127A**: 35, 1976.
- [14] Beachy, R. N. and M. Zaitlin: *Virology*, **63**: 84—97, 1975.
- [15] Whitfield, P. R. and T. J. V. Higgins: *Virology*, **71**: 471—485, 1976.
- [16] Bruening, G. et al.: *Virology*, **71**: 498—517, 1976.
- [17] Siegel, A. et al.: *Virology*, **73**: 363—371, 1976.
- [18] 彭学贤、吴世宣、蔡文启、赵淑珍、莽克强: 微生物学报, **19**(1): 34—40, 1979。
- [19] Higgins, T. J. V. et al.: *Virology*, **71**: 486—497, 1976.
- [20] Zaitlin, M. et al.: *Ann. Microbiol.*, **127A**: 37—38, 1976.

SEGMENTS SHORTER THAN VIRION RNA PRODUCED DURING IN VITRO TRANSCRIPTION OF TOBACCO MOSAIC VIRUS RNA

Fang Rong-xiang Po Ming Cai Fa-xing

(*Virus Laboratory, Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

TMV-specific double-stranded RNAs (RF and RI) synthesized *in vivo* can be separated into intact TMV-RNA at the selected thermal denaturation conditions of 98°C, 45 seconds, whereas at the same conditions, the viral double-stranded RNAs (showing the same apparent molecular weights as RF and RI) synthesized *in vitro* only can produce 8 to 10 RNA

segments shorter than the virion RNA. The sizes of several of these segments are just like those of the RNAs isolated by Beachy and Zaitlin (1977)⁽¹⁰⁾ from short particles in TMV preparations. The hypothesis that these RNA segments synthesized in partial transcription might be used as TMV-specific mRNAs is discussed.