

## 烟叶中依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶的部分提纯及其合成产物的性质

覃秉益 田颖川 方荣祥

(中国科学院微生物研究所,北京)

从烟叶无细胞匀浆液的  $20,000 \times g$  沉淀中用含  $30mM$  EDTA 无  $Mg^{2+}$  的悬浮液溶解出依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶,再用聚乙二醇-葡聚糖双相分离法除去内源 RNA,从而获得无内源模板的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶。此酶合成 RNA 绝对依赖于外加的 RNA 模板,需要四种核糖核苷三磷酸、酶活性可被焦磷酸盐抑制而不被磷酸盐抑制。酶活性不受放线菌素 D(AMD) 和利福平的抑制。以 TMV-RNA 为模板,该酶催化的合成产物为分子量相当于 16S 的双链 RNA 和分子量相当于 tRNA 的单链 RNA,90% 以上的 RNA 产物是互补于模板的负链。从感染 TMV 的烟叶提取的酶 (IE) 和健康烟叶提取的酶 (HE) 在性质上无明显差别。对此酶在病毒 RNA 复制中的作用也进行了初步探讨。

一般认为,正链 RNA 病毒的复制需要病毒基因组参与编码的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶。这一点,在植物病毒复制的研究中还没有足够的证据。

方荣祥等<sup>[1]</sup>从感染 TMV 的烟叶无细胞匀浆沉淀中 ( $20,000 \times g$ ) 发现有 TMV-RNA 复制酶的活性,能在体外合成出表观分子量相当于 TMV-RNA RI 及 RF 型的双链。进一步的试验表明,该双链产物由不完整的 TMV-RNA 单链片段所组成,经热变性后得到 8—10 个比 TMV-RNA 短得多的片断<sup>[2]</sup>。本文报道将依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶从  $20,000 \times g$  沉淀中抽提出来,进行纯化除去内源 RNA 的方法。比较了从感染 TMV 的烟叶提取的酶 (IE) 和从健康烟叶提取的酶 (HE) 的性质及其合成产物。并将 IE 与  $20,000 \times g$  沉淀部分结合的 TMV-RNA 复制酶<sup>[1]</sup>以及某些高度提纯的病毒 RNA 复制酶<sup>[3-7]</sup>的特性进行了比较。

## 材料和方法

### (一) 试剂

1. 5'-腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP)、5'-鸟嘌呤核苷三磷酸 (GTP)、5'-胞嘧啶核苷三磷酸 (CTP): 中国科学院上海生物化学研究所生产。  
2. (5-<sup>3</sup>H) 5' 尿嘧啶核苷三磷酸: 放射性比度  $10Ci/mM$ , 上海原子核研究所生产。

3. 聚乙二醇 6000: 英国 BDH Chemicals Ltd 产品。

4. 葡聚糖 T500: 瑞典 Pharmacia 公司产品。

5. TMV-RNA: 用常规的酚抽提、乙醇沉淀法制备。

### (二) 实验方法

1. 烟草植株的培养及病毒 (TMV) 接种: 按先前<sup>[1]</sup>的方法进行。

2. 酶的部分提纯: 各提纯步骤均在  $0-4^{\circ}C$  下进行,按先前的方法<sup>[1]</sup>从感染 TMV 的烟叶或

本文于 1980 年 11 月 13 日收到。

王小凤同志曾参加部分工作,特此致谢。

健康中提取到烟叶无细胞提取物  $20,000 \times g$  沉淀 (结合酶), 用无  $Mg^{2+}$  悬浮液 [Tris 50mM,  $MgCl_2$  20mM, KCl 30 mM, 2-巯基乙醇 6mM, 甘油 20% (V/V) 用 HCl 调 pH8.5] 洗涤一次,  $20,000 \times g$  离心 20 分钟 ( $4^\circ C$ ), 收集沉淀, 再用无  $Mg^{2+}$  悬浮液悬浮 (每 10g 鲜重加 1ml 缓冲液), 加入 1M 的 EDTA (pH 7.0) 使悬浮液的 EDTA 浓度为 30mM, 混匀, 于  $4^\circ C$  放置 1 小时,  $20,000 \times g$  离心 30 分钟 ( $4^\circ C$ ) 取上清 (溶解酶)。按每 10ml 上清液加 4.16 ml 30% 的聚乙二醇 6000 (W/W), 1.37ml 20% 的葡聚糖 T500 (W/W) 和 3.63g NaCl 的配比混合,  $4^\circ C$  搅拌 1 小时,  $1000 \times g$  离心 10 分钟分相, 取上相。用透析缓冲液 [Tris 50mM, (pH 8.5), EDTA 10mM, 2-巯基乙醇 6mM] 于  $4^\circ C$  透析过夜,  $20,000 \times g$  离心 10 分钟取上清, 即为除去内源核酸的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶。

3. 酶活性的测定: 标准反应混合物体积为 0.1 ml, 其中酶液 50  $\mu l$ , AMD 20  $\mu g/ml$ , TMV-RNA 20  $\mu g$ , Tris 50mM, (pH 8.5),  $MgCl_2$  20mM, KCl 30mM, 2-巯基乙醇 6mM, EDTA- $Na_2$  1mM, ATP、GTP、CTP 各 0.5mM,  $^3H$ -UTP 1  $\mu Ci$ 。将酶和 AMD 先在冰浴中混合 3 分钟, 然后加入其它组分, 在  $33^\circ C$  水浴中保温 1 小时, 取 50  $\mu l$  反应液点在 Whatman 3mm 圆滤纸片上 (直径 2.5cm) 按先前所述方法<sup>[1]</sup>于液体闪烁谱仪 NE 8312 测酸不溶物质的放射性计数。

4. 离体合成产物的分离和提纯: 将上述测定复制酶活性的标准反应混合物体积扩大到 10—20ml, 并将  $^3H$ -UTP 的放射性浓度增加一倍, 于  $33^\circ C$  保温 4 小时, 用酚-SDS 法提取合成产物, 然后按先前所述方法<sup>[1]</sup>经 Serva 纤维素层析, 将合成的  $^3H$ -RNA 单链、双链分开。

5. 合成产物的分析: 按先前所述方法<sup>[1]</sup>进行。

## 实验结果

(一) 不同浓度 EDTA 对依赖于 RNA 的 RNA 复制酶从结合状态变为溶解状态的影响

已知无  $Mg^{2+}$  缓冲液能促使 TMV-

RNA 复制酶从结合状态变为溶解状态<sup>[4]</sup>。我们还发现, 在无  $Mg^{2+}$  缓冲液中加入一定浓度的 EDTA 可得到更好的溶解效果。为了找到最适的 EDTA 浓度, 分别把等量的结合酶 (每 10g 鲜重组织匀浆的  $20,000 \times g$  沉淀加 1 ml 悬浮液) 悬浮在含有不同浓度 EDTA 的无  $Mg^{2+}$  悬浮液中, 于  $4^\circ C$  静置 1 小时,  $20,000 \times g$  离心 20 分钟, 上清即为可溶性酶。为了检定不同浓度 EDTA 的增溶效果, 将沉淀重悬浮在与上清相同体积的无  $Mg^{2+}$  悬浮液中, 分别测定不同浓度 EDTA 处理的上清和相应沉淀中依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶活性。结果如图 1 所示。在无  $Mg^{2+}$  的缓冲液中, 30—50mM EDTA,  $4^\circ C$  下处理 1 小时能使 80% 左右的聚合酶从结合状态变为溶解状态。我们常规的提取试验采用 30mM 的 EDTA。

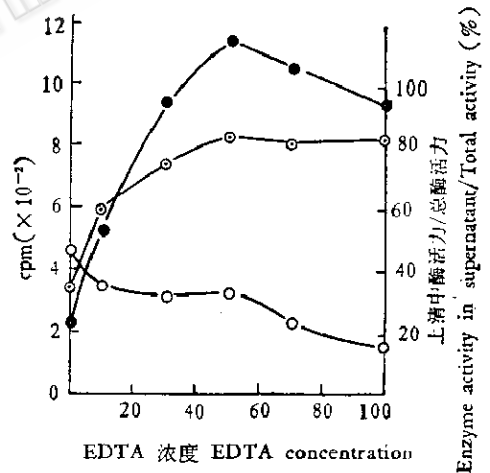


图 1 不同浓度 EDTA 对酶从结合状态变为溶解状态的影响

Fig. 1 Effect of different EDTA concentration on the solubilization of RNA-dependent RNA Polymerase from its bound state

- 上清部分酶活性 Enzyme activity in the supernatant
- 沉淀部分酶活性 Enzyme activity in the pellet
- 上清中酶活/总酶活 Enzyme activity in supernatant/total enzyme activity (%)

(二) IE 及 HE 的一些性质

1. 酶的模板依赖性: 相分离后得到的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶比相分离前溶解酶的比活约提高了 40 倍。各提取步骤得到的 IE 及 HE 的酶活对样板 (TMV-RNA) 的依赖性结果如表 1。由表 1 可见经部分提纯后该酶已除去内源模板, 具有对 RNA 的依赖性。在健康的烟叶中也有此酶, 其活性约为 IE 酶活性的 1/3。由于此聚合酶还没有进一步纯化, 故不能用比活来表示酶的活性。

2. 酶的模板特异性: 在全反应体系中, 以不同的核酸代替 TMV-RNA 作样板, 测定 IE 和 HE 合成产物中酸不溶部分 <sup>3</sup>H-UMP 的掺入活性, 结果见表 2。表 2 表明该酶对样板有依赖性但无特异性。同时还表明该酶是依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶, 因为只有在加入 RNA 样板时才有酸不溶的 RNA 产物的合成, 以 DNA 作样板则不合成。

3. 对底物的要求: IE 及 HE 进行 RNA 的合成需要 4 种核糖核苷三磷酸的

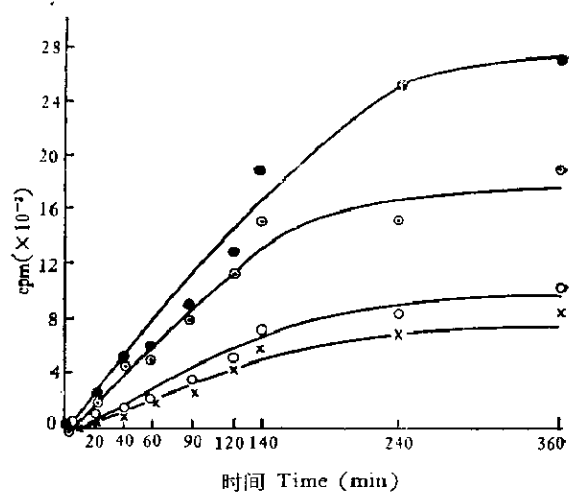


图 2 IE 及 HE 合成 RNA 的时间曲线  
Fig. 2 Time course of RNA Synthesis by IE and HE respectively

从放大的反应混合物中, 间隔一定时间取样 50  $\mu$ l, 如试验方法 3 在 Whatman 3mm 滤纸片上测定酸不溶物质的脉冲数/分  
50  $\mu$ l reaction mixture were removed from the enlarged reaction mixture at intervals and spotted on whatman 3mm filter paper disk to determine cpm of acid insoluble substances as described in method 3.

- : IE 完全体系 -AMD IE complete system -AMD
- : IE 完全体系 +AMD IE complete system +AMD
- : HE 完全体系 -AMD HE complete system -AMD
- ×—×: HE 完全体系 +AMD HE complete system -AMD

表 1 不同提取步骤的 IE 及 HE 的活性与 TMV-RNA 样板的关系

Table 1 Relation Between Activity of Enzyme from Infected and Healthy Tobacco Leaves in Different Steps of Purification and the Template TMV-RNA

实 验 Expt.		活 性 Activity	<sup>3</sup> H-UMP 掺入到酸不溶物质的脉冲数/分 Incorporation of <sup>3</sup> H-UTP into Acid insoluble substances (cpm)			
			20,000×g 上清 20,000×g supernatant		聚乙二醇-葡萄糖双相分离上相 PEG-dextron two phase partition	
			健康烟叶 Healthy leaves	感染 TMV 的烟叶 Leaves infected with TMV	健康烟叶 Healthy leaves	感染 TMV 的烟叶 Leaves infected with TMV
实验一 Expt. 1	-TMV-RNA	597	868	31	67	
	+TMV-RNA	781	1,085	446	1,323	
实验二 Expt. 2	-TMV-RNA	472	1169	0	52	
	+TMV-RNA	622	1,546	416	1,220	

表 2 IE 及 HE 的模板特异性

Table 2 Template Specificity of Enzymes from Infected and Healthy Tobacco Leaves

模板种类 Templates	<sup>3</sup> H-UMP 掺入到酸不溶物质的脉冲数/分 Incorporation of <sup>3</sup> H-UMP into acid insoluble substances (cpm)			
	实验一 Expt. 1		实验二 Expt. 2	
	健酶 HE	病酶 IE	健酶 HE	病酶 IE
TMV-RNA	366	1,295	268	892
YMV <sub>15</sub> -RNA	268	969	208	612
烟叶-RNA Tobacco leaf-RNA	69	174	60	105
酵母-RNA Yeast-RNA	257	832	113	506
<i>E. coli</i> -RNA	144	600	83	208
r-RNA	53	204	80	157
Poly A	38	109	144	271
小牛胸腺 DNA Calf thymus DNA	37	128	95	83
鸡血红蛋白 DNA Chicken haemoglobin DNA	72	106	94	102
不加模板(对照) Without template (control)	31	67	0	52

\*: 烟草花叶病毒油菜株 Youcai mosaic virus 15—a TMV strain from rape  
HE: Enzyme from healthy tobacco leaves  
IE: Enzyme from TMV-infected tobacco leaves

存在(表 3)。由图 2 可见, 在反应的前两小时合成 RNA 的量迅速增加, 然后则渐趋于水平。在短时间反应中, 酶活基本上不受 AMD 和利福平的影响, 焦磷酸 (PPi) 对酶活有明显抑制作用而无机磷 (Pi) 则无显著影响(表 3)。图 2 还表明, 随着反应时间的延长, AMD 对 IE 和 HE 的掺入活性均有一定的抑制作用。反应 2 小时

表 3 不同抑制剂和非标记底物对酶活性的影响  
Table 3 Effect of Inhibitors and Non-labelled Substrates on the Activity of the Enzymes

处 理 Treatment	<sup>3</sup> H-UMP 掺入到酸不溶物质的脉冲数/分 Incorporation of <sup>3</sup> H-UMP into acid insoluble substance (cpm)			
	实验一 Expt. 1		实验二 Expt. 2	
	健酶 HE	病酶 IE	健酶 HE	病酶 IE
(不加抑制物)** (-Inhibitor)	557	1,220	657	1,620
(-ATP, GTP, CTP)	24	8	18	86
(+AMD)	463	1,099	586	1,351
(+利福平) (+Rifampicin)	458	1,042	520	1,305
(+PPi)	75	206	42	215
(+Pi)	406	955	319	1201

\*: 完全体系参见方法 3

Complete system as described in method 3.

\*\*\*: 在 100 $\mu$ l 反应体积中不同抑制剂的量及浓度分别为: AMD 20 $\mu$ g、利福平 20 $\mu$ g, PPi 及 Pi 10mM  
20 $\mu$ g/100 $\mu$ l of AMD or rifampicin, 10mM PPi or Pi

以后 AMD 似乎对 IE 的掺入活性有更大的抑制作用。可能反映了此酶不够纯, 还杂有依赖于 DNA 的 RNA 多聚酶。

4. 酶反应的最适条件: IE 活性的最适 pH 为 8.5—9.0 之间, 见图 3; 需要加镁离子, Mg<sup>2+</sup> 浓度以 20—30mM 为最佳; 锰离子能部分代替镁离子的作用; Tris 浓度为 50mM, 2-巯基乙醇浓度为 6mM, 酶反应的合适温度为 25—40°C。

### (三) IE 及 HE 离体合成产物的提纯和分析

#### 1. <sup>3</sup>H-双链 RNA 的分析

(1) 在高、低离子强度下对 RNase 水解的抗性: 在高离子强度 (2 $\times$ SSC) 中 IE

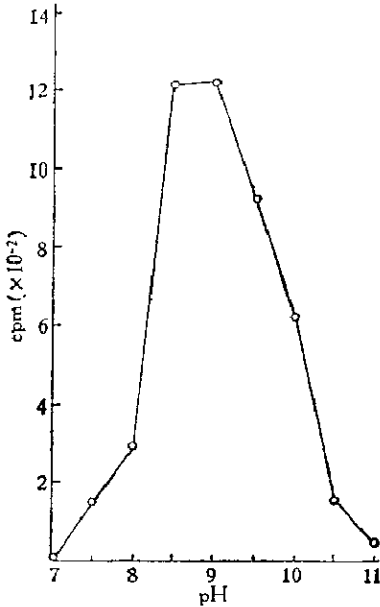


图3 不同 pH 对 IE 活性的影响

Fig. 3 Effect of pH on enzyme activity

将 50mM 的 Tris 缓冲液调至不同 pH, 并将酶液用不同 pH 的透析缓冲液透析至相应的 pH 后, 按试验方法 3 测定酶活

The reaction buffer (50mM Tris-HCl) was adjusted to the designed pH and the enzyme was dialyzed against the buffer of different pH. Enzyme activity was determined at different pH as described in method 3.

及 HE 合成的 <sup>3</sup>H-双链 RNA 对 RNase 水解的抗性分别为 80% 及 65—70%; 在低离子强度 (0.1 × SSC) 中对 RNase 水解敏感, 结果见表 4。

(2) 热变性、自退火和分子竞争杂交: IE 合成的 <sup>3</sup>H-双链 RNA 经热变性后, 对 RNase 水解敏感; 在自退火后对 RNase 水解的抗性能恢复 90% 左右; 在自退火前加入过量的 TMV-RNA 则对 RNase 水解的抗性比自退火者略高, 表明合成的 <sup>3</sup>H-双链 RNA 中主要是与样板 TMV-RNA 互补的负链。HE 合成的 <sup>3</sup>H-双链 RNA 经热变性自退火后对 RNase 水解的抗性能恢复 70%, 在退火前加入过量的 TMV-RNA 使对 RNase 水解的抗性比自退火的略有减少, 看来合成的产物主要也是与样板 TMV-RNA 互补的负链, 见表 5。

(3) 圆管凝胶电泳: 电泳在 2.0% 丙烯酰胺-0.1% 甲叉双丙烯酰胺-0.3% 琼脂糖进行, 分析 IE 及 HE 离体合成的 <sup>3</sup>H-双链 RNA。同时以 TMV-RNA RF 型、

表 4 IE 及 HE 合成的 <sup>3</sup>H-双链 RNA 在高、低离子强度下对 RNase 水解的抗性Table 4 RNase-resistance of IE and HE <sup>3</sup>H-dsRNA Products in High or Low Ionic Strength\*

<sup>3</sup> H-双链 RNA <sup>3</sup> H-dsRNA		高离子强度 (2×SSC) High Ionic Strength (2×SSC)			低离子强度 (0.1×SSC) Low Ionic Strength (0.1×SSC)		
		对照 Control (-RNase)	处理 Treatment (+RNase)		对照 Control (+RNase)	处理 Treatment (+RNase)	
		脉冲数/分 cpm	脉冲数/分 cpm	处理/对照 Treatment/control (%)	脉冲数/分 cpm	脉冲数/分 cpm	处理/对照 Treatment/control (%)
病酶合成 By IE	实验一 Expt. 1	813	625	80.2	865	15	1.7
	实验二 Expt. 2	1,594	1,255	78.7	1,754	80	4.6
健酶合成 By HE	实验一 Expt. 1	1,779	1,168	65.7	856	13	1.5
	实验二 Expt. 2	1,717	1,188	69	1,701	40	2.4

\* 1×SSC: 是 0.15M NaCl, 0.015M 柠檬酸钠, pH7.0。测定方法见前报<sup>[1]</sup>。1×SSC: 0.15M NaCl, 0.015M Sodium citrate, pH7.0. The determination procedure was reported before<sup>[1]</sup>。

表 5 IE 及 HE 合成的  $^3\text{H}$ -双链 RNA 的热变性、自退火和分子杂交Table 5 Heat Denaturation Self Annealing and Molecular Hybridization of IE and HE  $^3\text{H}$ -ds RNA Products

$^3\text{H}$ -双链 RNA $^3\text{H}$ -ds RNA	热变性 Heat denaturation		自退火 Self annealing		分子杂交 Molecular hybridization	
	对照 Control	处理 Treatment	对照 Control	处理 Treatment	对照(自退火处理) Control (Treatment in self annealing column)	处理 Treatment (+TMV-RNA 20 $\mu\text{g}$ , +RNase)
	脉冲数/分 cpm	处理/对照 Treatment/control (%)	脉冲数/分 cpm	处理/对照 Treatment/control (%)	脉冲数/分 cpm	处理/对照 Treatment/control (%)
病酶合成 By IE	实验一 Expt. 1	2.3	514	87.5	450	109.3
	实验二 Expt. 2	2.4	518	90.7	470	106.8
健酶合成 By HE	实验一 Expt. 1	2.6	368	72.3	266	88.0
	实验二 Expt. 2	2.5	348	69.3	266	88.7

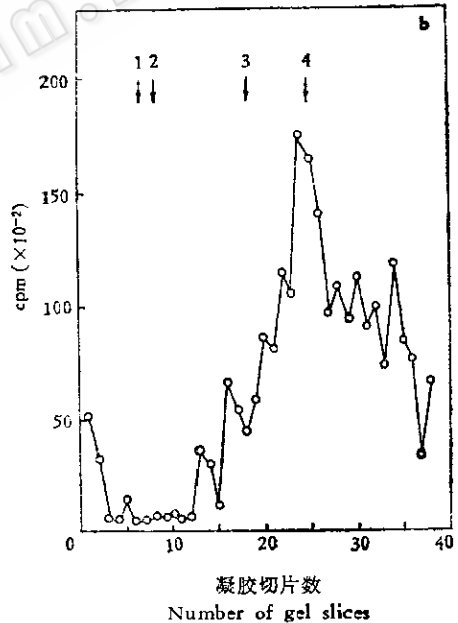
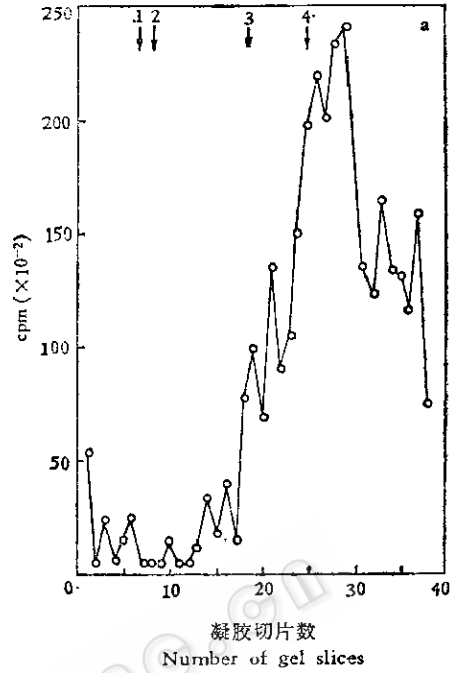
图 4  $^3\text{H}$ -双链 RNA 圆管凝胶电泳图谱

Fig. 4 Gel electrophoresis of  $^3\text{H}$ -dsRNA products (a) IE 合成的  $^3\text{H}$ -双链 RNA  $^3\text{H}$ -dsRNA by IE (b) HE 合成的  $^3\text{H}$ -双链 RNA  $^3\text{H}$ -dsRNA by HE 箭头表示出作为分子量参照物的各种 RNA 的泳动距离 Arrows indicate the positions of RNA markers.

1. TMV-RNA RF 2. TMV-RNA 3. *E. coli* rRNA (23S) 4. *E. coli* rRNA (16S)

TMV-RNA、*E. coli* rRNA (23S、16S) 作为参照物与样品共电泳, 结果如图 4。表明 IE 及 HE 都只能合成分子量较小的一些产物, 与加入的参照 RNA 相比和 16S RNA 的大小相似, 与 White<sup>[4]</sup> (1977) 等初步提纯的结果类似。

### 2. <sup>3</sup>H-单链 RNA 的分析

(1) 在高、低离子强度下对 RNase 水解的抗性: 由 IE 合成的 <sup>3</sup>H-单链 RNA 在高离子强度(2 × SSC)下具有 60% 左右对 RNase 水解的抗性, 由 HE 合成的 <sup>3</sup>H-单链 RNA 则接近 60% 抗 RNase 水解, 表明合成的单链 RNA 也有一定的二级结构。在低离子强度 (0.1 × SSC) 下均对 RNase 水解敏感, 见表 6。

(2) 热变性、自退火和分子杂交: IE 及 HE 合成的 <sup>3</sup>H-单链 RNA 经热变性后皆对 RNase 敏感, 自退火只能部分恢复对 RNase 水解的抗性, 在退火前加入 TMV-RNA 对 RNase 水解的抗性比自退火者略高, 表明合成的 <sup>3</sup>H-单链 RNA 中主要是与

样板 TMV-RNA 互补的负链, 见表 7。

(3) 圆管凝胶电泳: 在 3.0% 丙烯酰胺-0.15% 甲叉双丙烯酰胺的圆管凝胶上进行电泳, 分析 IE 及 HE 离体合成的 <sup>3</sup>H 单链 RNA。同时以 TMV-RNA RF 型、TMV-RNA、*E. coli* rRNA (23S、16S) 作为参照物与样品共电泳。结果表明 IE 及 HE 都只能合成小分子量的 RNA 产物, 其中一个主要成分的泳动位置与酵母 tRNA 相近, 见图 5a、b, 这与结合酶的情况一致<sup>[1]</sup>。

## 讨 论

已经证明, TMV 感染烟叶的无细胞匀浆 20,000 × g 沉淀中有 TMV-RNA 复制酶活性<sup>[1]</sup>。用含 30mM EDTA 的无 Mg<sup>2+</sup> 悬浮液, 能将此酶活的 80% 从结合状态变为溶解状态。它比较稳定, 4°C 保存一周酶活无明显下降, 经聚乙二醇-葡聚糖双相分离后的酶制剂中已除去内源核酸。它有模板依赖性, 但无模板特异性, 在体外合成

表 6 IE 及 HE 合成的 <sup>3</sup>H-单链 RNA 在高、低离子强度下对 RNase 水解的抗性

Table 6 RNase-resistance of IE and HE <sup>3</sup>H-ssRNA Products in High or Low Ionic Strength\*

<sup>3</sup> H-单链 RNA <sup>3</sup> H-ssRNA		高离子强度 (2×SSC) High ionic strength (2×SSC)			低离子强度 (0.1×SSC) Low ionic strength (0.1×SSC)		
		对照 Control (-RNase)	处 理 Treatment (+RNase)		对照 Control (-RNase)	处 理 Treatment (+RNase)	
		脉冲数/分 cpm	脉冲数/分 cpm	处理/对照 Treatment/control (%)	脉冲数/分 cpm	脉冲数/分 cpm	处理/对照 Treatment/control (%)
病酶合成 By IE	实验一 Expt. 1	694	432	62.0	6,116	298	4.9
	实验二 Expt. 2	624	376	60.3	586	34	5.8
健酶合成 By HE	实验一 Expt. 1	2,039	1,186	58.2	873	10	1.1
	实验二 Expt. 2	2,402	1,422	58.8	2,371	55	2.3

\* As described in the legend of table 4.

见表 4 注解

表 7 IE 及 HE 合成的  $^3\text{H}$ -单链 RNA 的热变性、自退火和分子杂交

Table 7 Heat Denaturation Self Annealing and Molecular Hybridization of IE and HE  $^3\text{H}$ -ss RNA Products

$^3\text{H}$ -单链 RNA $^3\text{H}$ -ssRNA	热变性 Heat denaturation				自退火 Self annealing				分子杂交 Molecular hybridization			
	对照 Control (-RNase)		处理 Treatment (+RNase)		对照 Control (-RNase)		处理 Treatment (+RNase)		对照 Control (自退火处理) (Treatment in self annealing column)		处理 Treatment (+TMV-RNA 20 $\mu\text{g}$ , +RNase)	
	脉冲数/分 cpm	处理/对照 Treatment/control (%)	脉冲数/分 cpm	处理/对照 Treatment/control (%)	脉冲数/分 cpm	处理/对照 Treatment/control (%)	脉冲数/分 cpm	处理/对照 Treatment/control (%)	脉冲数/分 cpm	处理/对照 Treatment/control (%)	脉冲数/分 cpm	处理/对照 Treatment/control (%)
病毒合成 By IE	实验一 Expt. 1	2,357	1.1	26	1,934	540	27.9	540	540	890	164.8	
	实验二 Expt. 2	2,113	1.9	41	1,788	552	31.0	552	552	1,050	190.2	
健酶合成 By HE	实验一 Expt. 1	913	2.0	18	656	206	31.4	206	206	240	116.5	
	实验二 Expt. 2	871	2.1	18	650	236	36.3	236	236	244	103.4	

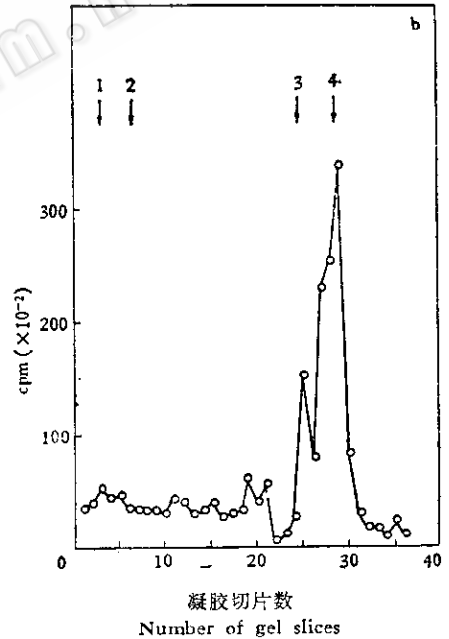
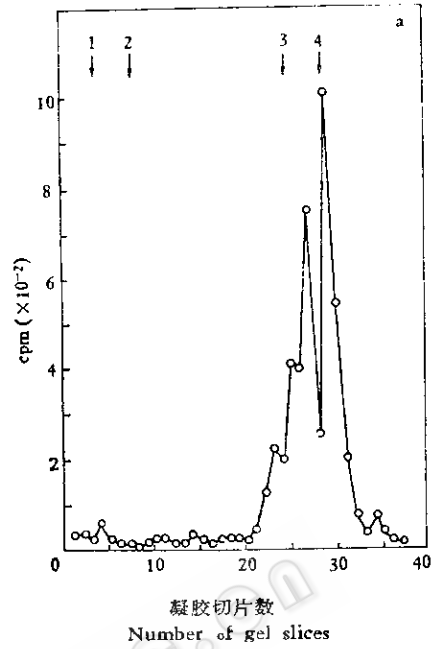


图 5  $^3\text{H}$ -单链 RNA 圆管凝胶电泳图谱

Fig. 5 Gel electrophoresis of  $^3\text{H}$ -ssRNA products  
 (a) IE 合成的  $^3\text{H}$ -单链 RNA H-dsRNA by IE  
 (b) HE 合成的  $^3\text{H}$ -单链 RNA H-dsRNA by HE  
 箭头表示出作为分子量参照物的各种 RNA 的泳动距离  
 Arrows indicate the positions of RNA markers  
 1. *E. coli* rRNA (23S) 2. *E. coli* rRNA (16S)  
 3. Bromophenol blue 4. tRNA



性质上与处于膜结合状态的酶有所不同。结合酶能合成表现分子量相当于 TMV-RNA RF 和 RI 不完整的双链 RNA 和小分子的单链 RNA<sup>[1,4]</sup>, 双链 RNA 产物主要为 TMV-RNA 正链片段<sup>[1,2]</sup>。而溶解酶的合成产物中, 双链 RNA 的分子量较小, 约 16S 左右, 单链产物只相当于 tRNA 的大小, 产物的 90% 为与 TMV-RNA 互补的负链片段。这与 Zaitlin<sup>[8]</sup> 等 (1973) 的结果相近。可能在结合状态下酶结合有与 TMV-RNA 互补的负链模板<sup>[6]</sup>, 所以能合成出正链 RNA 片段。而除去内源模板的溶解酶, 在体外合成体系中由于模板是正链 RNA, 所以合成产物主要是负链。

在健康的寄主植物中, 一些研究者发现有依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶活性<sup>[3,4,9-14]</sup>, 并进行了分离提纯。我们的试验表明, 该酶与感病植物中的“病毒 RNA 复制酶”在性质上无明显差别, 只是 IE 比 HE 的酶活略高。表明病毒侵染只刺激酶活性的增加, 而未产生病毒特异的酶。除与膜结合的酶活外, 在 20,000×g 的上清中也有依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶活性。有的作者<sup>[7,14]</sup> 认为结合酶和溶解酶没有本质的区别, 只是所处的状态不同而已。Remaine 等<sup>[13]</sup> (1978) 认为病毒 RNA 复制酶可能是由寄主编码的“核心酶”和病毒 RNA 复制酶亚基组成的, 但在提纯的 RNA 复制酶制剂中未发现不同于健康植物的病毒特异的肽。Ikegami 和 Fraenkel-Conrat<sup>[7,14,15]</sup> 则认为植物的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶是负责病毒 RNA 复制的, 它没有病毒特异性但有寄主特异性, 能在不同的病毒 RNA 复制中发挥作用。体外没有合成出完整的病毒 RNA 是由于 RNase 污染所致。

从 RNA 病毒复制在侵染早期受 AMD

抑制<sup>[6,17]</sup>的现象看, 在病毒 RNA 复制中可能还涉及到其它与寄主基因组有关的酶或因子, 而这些酶或因子在病毒 RNA 复制中又起着很关键的作用。因而可以设想, 病毒 RNA 的复制可能是分几步, 涉及到几个酶或因子的复杂过程, 所以研究该 RNA 聚合酶的生理功能及其与病毒 RNA 复制的关系, 设法建立一个完全的病毒 RNA 体外复制体系作为研究的起点, 看来是研究病毒复制的中心问题。

### 参 考 文 献

- [1] 方荣祥等: 中国科学, 10: 1005—1016, 1979.
- [2] 方荣祥等: 微生物学报, 20 (2): 137—143, 1980.
- [3] Kumarasamy, R. and R. H. Symons: *Virology*, 96: 622—632, 1979.
- [4] White, J. L. and H. H. Murakishi: *J. Virol.*, 21: 484—492, 1977.
- [5] Duda, C. T. et al.: *Virology*, 92: 180—189, 1979.
- [6] Chiffot, S. et al.: *Virology*, 100: 91—100, 1980.
- [7] Fraenkel-Conrat, H.: *TIBS*, 4: 184—186, 1979.
- [8] Zaitlin, M. et al.: *Virology*, 53: 300—311, 1973.
- [9] Sela, I. and A. Hauschner: *Virology*, 64: 284—288, 1975.
- [10] Astier-Manificier, S. and P. Cornuet: *Biochim. Biophys. Acta*, 232: 484—493, 1971.
- [11] Duda, C. T. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 319: 62—71, 1973.
- [12] Fraenkel-Conrat, H.: *Virology*, 72: 23—32, 1976.
- [13] Romaine, C. P. and M. Zaitlin: *Virology*, 86: 241—253, 1978.
- [14] Ikegami, M. and H. Fraenkel-Conrat: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75: 2122—2124, 1978.
- [15] Ikegami, M. and H. Fraenkel-Conrat: *Virology*, 100: 185—188, 1980.
- [16] Dawson, W. O.: *Intervirology*, 9: 304—309, 1978.
- [17] Rottier, P. J. M. et al.: *Virology*, 92: 299—309, 1979.

## PARTIAL PURIFICATION OF RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE FROM TOBACCO LEAVES AND THE CHARACTER OF ITS PRODUCTS SYNTHESIZED IN VITRO

Qin Bingyi Tian Yingchuan Fang Rongxiang

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

From 20,000 × g pellet of a cell-free homogenate containing RNA-dependent RNA polymerase activity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves, the enzyme was solubilized with  $Mg^{2+}$ -free suspension buffer containing 30mM EDTA. By PEG-dextran two phase separation an endo-plate-free, RNA-dependent RNA polymerase was prepared. The enzyme absolutely required exoribonucleic acid as template, four ribonucleoside triphosphates for RNA synthesis. The activity of the enzyme was inhibited by pyrophosphate, but not by orthophosphate. Neither actinomycin D nor rifampicin was able to inhibit the

activity of enzyme. Using TMV-RNA as template, the products synthesized in vitro were double-stranded and single-stranded RNA corresponding to 16S RNA and tRNA in size respectively. Ninety percent of the RNA product was minus strand as complementary segments of TMV-RNA. There was no remarkable differences between the enzymes prepared from healthy and virus-infected tobacco leaves. The possible function of this RNA-dependent RNA replicase which is host-inherent and merely stimulated by virus infection is discussed briefly.