

放线菌素 D 对烟草花叶病毒 RNA 在离体烟叶中复制的影响

田颖川 王祈楷

(中国科学院微生物研究所,北京)

本文报道放线菌素 D(AMD)在离体烟叶中对烟草花叶病毒(TMV)的增殖及其核酸(TMV-RNA)复制的影响。按每克叶片用 40 μg AMD 处理,能抑制 70% 以上叶组织总 RNA 的合成,在此剂量下 AMD 对病毒增殖及其核酸复制的影响与用药的时间有密切关系。在接种病毒前 5 小时或于接种同时给药对病毒增殖和病毒 RNA 复制都有强烈的抑制作用,可抑制 90% 以上;而接种后 8 小时用药就不再表现抑制作用了;接种后 24 小时用药不但不表现抑制作用,相反对病毒增殖和 TMV-RNA 的复制都有一定的刺激作用。AMD 对 TMV 增殖和对 TMV-RNA 复制的影响完全一致。

放线菌素 D 能够有效地抑制依赖于 DNA 的 RNA 合成,但对 RNA 病毒复制的作用看法还不一致^[1-14]。本文报道了 AMD 对烟草花叶病毒(TMV)及 TMV-RNA 在离体烟叶中合成的影响,并对 RNA 病毒的复制机制进行了讨论。本工作的部分结果已有过简要报道^[15]。

材料和方法

(一) 材料

实验用的病毒为提纯的 TMV 普通株;寄主植物用普通烟黄苗榆品种(*Nicotiana tabacum* L.);枯斑寄主为心叶烟(*N. glutinosa* L.)。

主要试剂:放线菌素 D,上海药物所生产;³H-尿嘧啶核苷(20Ci/mM),上海原子能研究所生产。

(二) 方法

1. 接种病毒、AMD 处理及同位素标记:培养在防虫温室内的普通烟生长到 5—6 片叶时,将充分展开的叶片用水冲洗干净并用滤纸吸干后,用喉头喷粉器在叶面均匀地喷 600 目金钢砂,以 0.5mg/ml TMV 溶液在叶片正反两面磨擦接种。接种后将叶片插入 0.7% 的葡萄糖溶液中,在 24—26°C 的恒温保湿箱内培养。

接种 TMV 后不同时间将需要处理的叶片移放在 45°C 左右的温箱内(或在室内通风处)使其略显萎蔫后,按每克接种叶片插入 0.3ml 含 40 μg AMD 的 0.01M KH_2PO_4 , pH7.0 的溶液中,在黑暗处使叶片通过叶柄断面吸收药液;进行同位素标记处理的叶片,在上述溶液中加入 ³H-尿嘧啶核苷(20Ci/mM)至 100 $\mu\text{Ci}/1\text{g}$ 叶组织。待溶液吸收完毕,将叶片再插入 0.7% 葡萄糖溶液中,如上述条件继续培养 72 小时。

2. 枯斑法测定 TMV: 接种后不同时间用 AMD 处理过的叶片培养 72 小时后取出,用直径 16mm 的打孔器将叶片打成圆片,按每个圆片加 2ml 蒸馏水的比例在研钵中匀浆。然后如前面所述以半叶法将匀浆接种在离体心叶烟上,以不用 AMD 处理而接种了 TMV 的叶圆片匀浆作对照。接种后的心叶烟叶片在 0.7% 葡萄糖溶液中 24—26°C 培养 56 小时左右,计枯斑数并计算处理枯斑数占对照枯斑数的百分比。

3. ³H-RNA 的提取: 参照吴世萱等^[16]的方法将 ³H-尿嘧啶核苷标记的不同处理的叶片去中脉后用液氮速冻,磨碎后按每克叶组织加 4ml 预热到 60°C 的提取缓冲液(10mM EDTA, 1%

本文于 1981 年 1 月 8 日收到。

覃秉益同志协助部分工作,特此致谢。

SDS, 50mM Tris)和 4ml 含 0.1% 8-羟基喹啉的水饱和酚,在 60℃ 水浴中振荡 3 分钟,然后在冰盐浴加液氮中速冷至酚结晶,再融化后以 10000 ×g 离心 5 分钟,所得上相再加入等体积酚振荡 10 分钟,如上离心分相,如此重复三次。在最后的水相中加 2.5 倍体积的冷乙醇,每毫升溶液加一滴 3M NaAc (pH4.7),置冰箱沉淀 3 小时以上。10000 ×g 离心 10 分钟,将沉淀溶于 0.4ml 2mM EDTA (如有不溶物再离心除去),加入等体积的 4M LiCl,置冰箱内沉淀过夜,如上离心,最后得到的沉淀溶于 0.2ml 2mM EDTA,置冰箱保存备用。

4. ³H-RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳: 不同处理的 ³H-RNA 在 2.0% 丙烯酰胺-0.1% 甲叉双丙烯酰胺-0.3% 琼脂糖圆管凝胶上进行电泳。电泳缓冲液用 E 缓冲液 (40mM Tris, 20mM NaAc, 2mM EDTA, pH7.8)。加样后先以 2.5mA/管电泳 15 分钟,然后以 5mA/管电泳 115 分钟。以提纯的 TMV-RNA, E. Coli rRNA 作为分子量参照物与样品进行平行电泳。电泳后在紫外扫描仪 (Joyce Loebel UV Scanner) 上扫描以确定参照物 RNA 的位置。然后将样品胶横切成 2.16mm 厚的圆片,按方荣祥等^[17]所述方法测放射性计数。

实验结果

(一) AMD 对 TMV 增殖的影响

接种 TMV 后立即用 AMD 处理烟草叶片, TMV 的增殖受到强烈抑制,处理的枯斑数占对照的 6%, TMV 的增殖被抑制了 90% 以上(图 1)。这种抑制作用随着接种 TMV 到 AMD 处理间隔时间的延长而很快下降。接种后 8 小时用 AMD 处理, TMV 的增殖就基本上不受抑制了,抑制率仅 9%。超过 8 小时后 AMD 处理不但不抑制 TMV 增殖,反而有一定的刺激作用。接种后 12 小时用 AMD 处理叶片,处理枯斑数相当于对照枯斑数的比为 138%, 24 小时处理的相应值为 155%。这表明 TMV 的增殖水平因侵染后期施用 AMD 而增高了。接种病毒后不同时间用 AMD 处理其

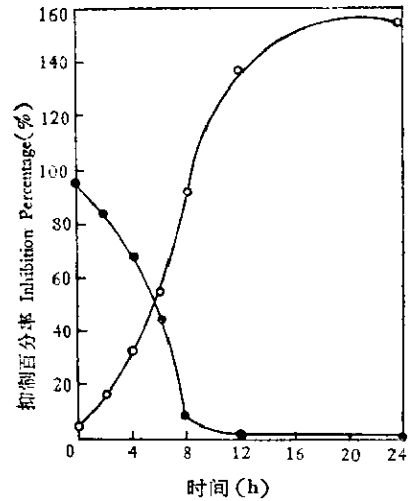


图 1 接种后不同时间用 AMD 处理对 TMV 在离体烟草叶片中增殖的影响

Fig. 1 Time effect of AMD administration on the multiplication of TMV in detached tobacco leaves

○—○处理/对照 × 100%
Treatment / control × 100%
●—●抑制百分率
Inhibition percentage

抑制百分率是以对照(不用 AMD 处理)的枯斑数为 100% 来计算的。每个处理的枯斑数为 6—8 片心叶烟半叶上的枯斑数的平均值。对照的平均枯斑数为 37.6。

The inhibition percentage was calculated with the lesion number of the control (without AMD treatment) as 100%. The lesion number of each treatment is an average of lesions produced on 6—8 half leaves of *N. glutinosa*. The average lesion number for the control is 37.6.

效果差别非常明显。这一结果与 Dawson (1978)^[6] 用 TMV 做的试验结果以及 Rottier 等 (1979)^[14] 用豇豆花叶病毒所得到的结果都是一致的。

(二) AMD 对 TMV-RNA 复制的影响

如材料和方法中所述,在接种 TMV 后不同时间用 AMD 处理叶片,处理同时喂 ³H-尿嘧啶核苷 (100 μCi/1g 叶组织),在 24—26℃ 培养 72 小时后提取烟叶 RNA。表 1 是从各处理叶片中提取的总 RNA 的

放射性计数,从表 1 看出接种前或接种同时用 AMD 处理,烟叶总 RNA 合成受到显著抑制,抑制率达 70% 以上。接种 24 小时后用 AMD 处理则比零时处理抑制作用小或不表现出抑制。

为了检查 AMD 对 TMV-RNA 复制的抑制情况,将各处理的 ^3H -RNA 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后测各种 ^3H -RNA 在

胶中的分布,并比较不同处理的 TMV-RNA 的放射性计数。不同 RNA 组分在凝胶中分布情况见前报^[45],表 2 为三次实验的 RNA 提取物经凝胶电泳后 TMV-RNA 泳动位置的放射性计数的比较结果。结果表明零时处理的 TMV-RNA 放射性计数仅为对照的 10% 左右,抑制率也近 90% 左右,所以接种前 5 小时或接种同时(零时)

表 1 AMD 对 ^3H -尿嘧啶核苷向 TMV 侵染的烟叶 RNA 掺入的影响

Table 1 Effect of AMD on the incorporation of ^3H -uridine into RNAs of TMV-infected tobacco leaves

Expt.	^3H -RNA 的 cpm/g 叶组织($\times 10^{-3}$)* cpm of ^3H -RNAs/g of leaf tissue ($\times 10^{-3}$)*				
	对照 (-AMD) Control (-AMD)	接种前 5 小时 +AMD 5h prior to inoculation (+AMD)	0 时 +AMD At zero time (+AMD)	接种后 24 小时 +AMD 24h post- inoculation (+AMD)	0 时/对照 $\times 100\%$ 0time Control $\times 100\%$
I	839.0	275.5	—	803.3	32.8**
II	821.3	329.9	101.3	—	12.3
III	2053.9	—	511.0	1156.6	24.9

* 按材料和方法所述,各处理的 RNA 最后溶于 0.2ml 2mM EDTA (每 g 叶组织),取 5 μl 测 cpm 后,计算每克叶组织中 ^3H -RNA 的总 cpm 数。

As described in material and methods, RNAs of each treatment were resolved in 0.2ml of 2mM EDTA for 1 g of leaf tissue. Five μl of each sample was taken for radioactivity counting and from which the total ^3H -RNA cpm of 1 g of leaf tissue was calculated.

** 以接种前 5 小时处理的 cpm 计。

It was calculated on the basis of the treatment of 5h prior to inoculation.

表 2 不同时间 AMD 处理对 TMV-RNA 合成的影响*

Table 2 Time effect of AMD treatment on the synthesis of TMV-RNA*

Expt.	^3H -TMV-RNA 峰的 cpm cpm of ^3H -TMV-RNA peak in the gel				
	对照 (-AMD) Control (-AMD)	接种前 5 小时 +AMD 5h prior to inoculation (+AMD)	0 时 +AMD At zero time (+AMD)	接种后 24 小时 +AMD 24h post- inoculation (+AMD)	0 时/对照 $\times 100\%$ 0time Control $\times 100\%$
I	2882	109	—	10499	3.8**
II	10533	903	434	—	4.1
III	8160	—	960	9663	11.9

* 表中所列数值为 20 μl ^3H -RNA 样品电泳后 ^3H -TMV-RNA 峰的 cpm。

* The number in the table here represents the cpm value of ^3H -TMV-RNA from 20 μl of RNA sample (about 0.6 OD_{260nm}) in the gel after electrophoresis.

** 见表 1 的注解。

** Refer to the legend of Table 1.

用 AMD 处理叶片,对 TMV RNA 复制的抑制情况是一致的。接种后 24 小时处理只对细胞 RNA 的合成有显著的抑制作用,而对 TMV-RNA 合成则不表现抑制甚至有刺激作用(表 1,表 2)。这与图 1 的结果是一致的,说明 AMD 在病毒侵染的早期对病毒增殖的抑制作用主要是通过抑制其 RNA 的复制来实现的。

讨 论

Sanger 等 (1963)^[17] 在接种 TMV 后 24 小时用 AMD 处理烟草叶片,发现 TMV-RNA 的合成不受 AMD 的抑制。从此得出 TMV-RNA 合成与寄主 DNA 的模板功能无关的一般性结论。Dawson (1978)^[6] 则根据在侵染的早期, TMV 复制受 AMD 抑制的结果提出 TMV 复制的早期阶段似乎也需要寄主 DNA 的转录过程。Rottier 等 (1979)^[14] 用 AMD 抑制豇豆花叶病毒增殖的实验证明, AMD 并不抑制病毒特异的蛋白质合成,认为 AMD 对病毒复制的抑制作用是由于抑制了病毒 RNA 合成所致。

我们的实验证明 TMV-RNA 合成在侵染的早期确实是受 AMD 抑制的。TMV 侵染初期 AMD 强烈抑制 TMV 的增殖正是通过抑制其核酸复制来实现的。这种抑制作用随着侵染与 AMD 处理相间隔时间的延长而很快减弱,到侵染后 8 小时病毒的增殖就不再受 AMD 的抑制了。可见在 TMV 侵染的早期阶段病毒 RNA 的转录很可能需要寄主的依赖于 DNA 的 RNA 合成过程,因而这个阶段对 AMD 是敏感的。在这一阶段结束之前用 AMD 处理可以显著抑制 TMV-RNA 的合成,从而抑制了 TMV 的增殖。经过这一阶段之后病毒 RNA 的合成就不再被 AMD 抑制,而细胞 RNA 的合成仍然被抑制,所以合成 RNA

所需的前体、能量和机构就能更充分地供给病毒 RNA 的复制,从而提高了 TMV-RNA 的复制水平。

AMD 对 TMV 及 TMV-RNA 复制的这种抑制作用不是药物对病毒直接作用的结果^[2]。我们使 AMD 通过叶柄吸入而不接触叶片表面,排除了 Semal (1967)^[1]认为是 AMD 对磨擦接种的微伤处影响的可能。这种抑制作用也显然不是寄主受到一般的生理毒害,即所谓药害所致。因为不能设想在接种病毒的前 5 小时、接种同时或接种后不到 8 小时的期间叶片吸入 AMD 对寄主细胞的毒害达到不能有效支持病毒增殖的程度,而在接种病毒 8 小时之后吸入同一剂量的 AMD 不但不妨害病毒的增殖及病毒 RNA 的复制,反而能显著提高病毒增殖及病毒 RNA 的复制水平。这表明 TMV 侵染烟草 8 小时前后在病毒增殖过程中存在着本质上不同的复制阶段。可能是在 TMV 侵入寄主细胞从外壳蛋白中裸露出 RNA 之后(完成这一过程的时间要比接种后 8 小时早得多,约在接种后 2—4 小时左右^[18]),发生了与 TMV-RNA 复制有关的 DNA 信息转录过程,而这一过程对病毒 RNA 的复制起着关键作用。

从 AMD 对病毒 RNA 体内复制的这种抑制作用可以推测仅靠寄主原有的依赖于 RNA 的 RNA 多聚酶是不可能完成病毒 RNA 的复制过程的。病毒与寄主的关系是复杂的,病毒 RNA 的复制可能是一个涉及到不止一种酶和因子的复杂过程。

参 考 文 献

- [1] Smith, S. H. and D. E. Schlegel: *Virology*, 26: 180, 1965.
- [2] 田波, 彭学贤: 微生物学报, 11(4): 520, 1965.
- [3] Semal, J.: *Phytopathol. Z.*, 59: 55, 1967.
- [4] Lockhart, B. E. L. and J. S. Semancik:

- Virology*, **39**: 362, 1969.
- [5] Dawson, W. O. and D. E. Schlegel: *Phytopathology*, **66**: 117, 1976.
- [6] Dawson, W. O.: *Intervirology*, **9**: 304, 1978.
- [7] Takebe, I. and Y. Otsuki: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**: 843, 1969.
- [8] Aoki, S. and I. Takebe: *Virology*, **39**: 439, 1969.
- [9] Bancroft, J. B. et al.: in "Modification of the Information Content of Plant Cells" (Markham, R. et al., eds), North-Holland. Amsterdam, 1975, pp 133—160.
- [10] Otsuki, Y. and I. Takebe: *Virology*, **52**: 433, 1973.
- [11] Otsuki, Y. et al.: *J. Gen. Virol.*, **22**: 375, 1974.
- [12] Alblas, F. and J. F. Bol: *J. Gen. Virol.*, **36**: 175, 1977.
- [13] Renaudin, J. and J. M. Bové: *C. R. Acad. Sc. Paris*, **284**: 783, 1977.
- [14] Rottier, P. J. M. et al.: *Virology*, **92**: 299, 1979.
- [15] 田颖川等: 科学通报, **26**(8): 497, 1981.
- [16] 吴世菴等: 病毒学集刊 II.
- [17] Sanger, H. L. and C. A. Knight: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **13**: 455, 1963.
- [18] Siegel, A. and S. G. Wildman: *Virology*, **2**: 69, 1956.

EFFECTS OF ACTINOMYCIN D ON THE REPLICATION OF TMV-RNA IN DETACHED TOBACCO LEAVES

Tian Yingchuan Wang Qikai

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

The effect of actinomycin D (AMD) on the multiplication of tobacco mosaic virus (TMV) and viral RNA replication in detached tobacco leaves were studied. Treating the leaves with a dosage of 40 μ g of AMD for 1 g of leave tissue, the total RNA synthesis in the inoculated leaves was reduced by about 70%, while the effect of AMD on virus multiplication and viral RNA replication depended closely upon the time of administration of the antibiotics. If the drug is given 5h prior to or simultaneously with virus inoculation, both

TMV multiplication and TMV-RNA synthesis can be strongly inhibited over 90%; however, there is no more inhibition exhibited if the drug is given 8 h post-inoculation. When the drug is given at 24 h post inoculation, no inhibition can be observed at all, in the contrast, there is certain stimulation to virus multiplication and viral RNA replication occurred. The effect of AMD on TMV multiplication is consonant with that on TMV-RNA replication.