

感染番茄花叶病毒及其弱毒系的烟叶 中病毒双链 RNA 的比较

康良仪 杨希才 田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京)

利用 ^3H -尿嘧啶核苷标记技术、抗 RNase 性质和聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 比较了接种番茄花叶病毒 (ToMV) 及其弱毒系 N_{14} 的烟叶中 ds-RNA 含量的变化。接种后第 2 天, N_{14} 的抗 RNase 的 ds-RNA 为 58.4%、ToMV 为 47.8% 随着接种时间延长, ToMV 的 ds-RNA 迅速降低到 10.4—18.5%, 而 N_{14} 的仍保持在 25.5—36.6%, 的较高水平。ds-RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析证实了上述结果。讨论了 ds-RNA 在具有单链 RNA 为基因组的病毒毒力中的可能作用, ds-RNA 含量高可能降低病毒合成能力和/或诱导某种类似干扰素的抗病毒物质的产生。

尽管早已发现了植物病毒株系间的干扰现象, 又提出了利用弱毒株系保护植物免受强毒株侵染的可能性, 但与弱毒保护作用有关的病毒毒力和干扰作用的机理还不清楚。张秀华等^[1]和田波等^[2]用亚硝酸诱变法从番茄花叶病毒 (ToMV) 获得突变弱毒株 N_{11} 和 N_{14} , 并比较了弱毒株和强毒株的生物学和理化性质, 在温室和田间实验均有一定的防病增产效果。

本文比较了感染番茄花叶病毒及其弱毒系 N_{14} 的烟叶中病毒双链核酸 (ds-RNA) 的含量和变化, 试从病毒复制的动态分析中阐明病毒毒力的本质。

材 料 和 方 法

(一) 植物和病毒

生长在防虫温室 6—8 周的普通烟 (*Nicotiana Tabacum*), 用 0.5mg/ml 提纯的番茄花叶病毒 (ToMV) 或其亚硝酸诱变弱毒系 N_{14} 接种。接种后的植物放在 25℃, 人工光照条件下。

(二) ^3H -尿嘧啶核苷标记

在接种后 1、3、5、7、9、11 天收获接种叶, 各称取 5 克, 在室温下稍萎蔫后, 将叶柄插入含有

放线菌素 D (40μg/g 鲜叶) 的 ^3H -尿嘧啶核苷溶液 (0.1 mCi/g 鲜叶) 中, 在 25℃ 的黑暗条件下, 待同位素溶液吸干后 (约 3—4 小时), 加入 0.01M 磷酸盐缓冲液 (pH7.0), 继续培养使标记时间达 24 小时, 取出后放在 -10℃ 下冰冻。

(三) 核酸抽提和纤维素柱分离

按照 Morris 等人^[3]的方法, 取上述冰冻叶组织, 在研钵中捣碎, 加入 10ml GPS 缓冲液 (0.2M 甘氨酸, 0.1M Na_2HPO_4 , 0.6M NaCl, pH9.5) 匀浆, 然后加 1.0ml 10% SDS, 0.1ml α -巯基乙醇, 10ml 水饱和酚 (含 0.1% 8-羟基喹啉) 和 5ml 氯仿-戊醇 (25:1), 继续研磨 20 分钟。匀浆物 5000 转/分离心 20 分钟, 取含有 RNA 的水相, 加几滴 3M 醋酸钠缓冲液 (pH4.0) 和 2 倍体积的乙醇, 置 -10℃ 过夜, 10000 转/分离心 10 分钟, 收集沉淀并悬浮在 10ml GPS 缓冲液中, 用 10μl 测定放射性计数, 其余加 0.1ml α -巯基乙醇, 加无水乙醇至 15%。

在 15% 乙醇/样品溶液中加入 2g 未经处理的 Serva 纤维素, 搅匀, 置 4℃ 过夜。10000 转/分离心 15 分钟, 除去上清, 将纤维素悬在含 15% 乙醇的 STE 缓冲液中 (0.1M NaCl, 0.05M Tris, 0.001M Na_2EDTA , pH7.0), 装柱, 用上述乙醇:

本文于 1981 年 2 月 13 日收到。

STE 缓冲液洗脱,待洗脱液中放射性计数可忽略时为止,再用不含乙醇的 STE 洗脱,分部收集,每管 2ml,测定每管的放射性计数,合并放射性计数峰的洗脱液,加 2 倍体积的乙醇沉淀,10000 转/分离心 15 分钟,收集沉淀,悬浮在 2.0mlE 缓冲液 (0.04M Tris, 0.02M NaAc, 2mM Na₂ EDTA, pH7.8) 中,取 10 μ l 测放射性计数,其余贮存在 -10 $^{\circ}$ C 供分析 ds-RNA 用。

(四) 不同盐浓度下对 RNase 的抗性

取适量样品溶液(约 2000cpm),用 10 \times ssc 缓冲液 (0.15M NaCl, 0.015M 柠檬酸钠, pH7.2), 稀释成 0.1 \times ssc 或 2.5 \times ssc, 总体积 400 μ l (用 E 缓冲液补足体积), 等分为二份, 一份加 10 μ l RNase A (50 μ l/ml), 2 单位 RNase T₁ (10 单位/ml); 另一份不加酶, 在 33 $^{\circ}$ C, 保温 30 分钟(不加酶的一份同样保温), 取出放在冰浴中, 加 1.0ml 10% TCA 终止反应, 加 10 μ l 10% 牛血清蛋白作载体, 2 小时后, 收集在微孔滤膜 (0.45 μ) 上, 用 5% TCA 和 95% 乙醇各洗三次, 待微孔滤膜干燥后, 在甲苯闪烁液中测放射性计数。按加酶的和 不加酶处理的放射性计数的百分率计算对 RNase 的抗性。

(五) 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

用 2.0% 聚丙烯酰胺(其中含 0.1% 甲叉双丙烯酰胺)和 0.3% 琼脂糖圆管电泳 (80 \times 5.5mm), 每管中点样量约为 8000cpm, 并以 ToMV-RNA 和 N₁₄-RNA 作参照物。加样前, 3mA/管予电泳 1 小时, 加样后, 先 3mA/管电泳 15 分钟, 再 5mA/管电泳 120 分钟。电泳后, 在 Scan 400 型扫描仪上, 260nm 波长扫描, 以确定参照 RNA 的位置, 再将胶切片(每片胶 2.16mm), 将凝胶切片放在液体闪烁测量瓶中, 加 0.5ml 30% H₂O₂ (其中含 5 μ l 浓氨水), 盖紧瓶盖, 在 60 $^{\circ}$ C 保温 12 小时, 冷至室温后, 加入 5ml 二氧六环闪烁液(含 0.4% ppo, 0.02% popop, 6% 萘, 10% 甲醇), 在 NE₈₃₁₂ 液体闪烁谱仪上测定放射性计数^[4,5]。

(六) 病毒含量测定

将接种后不同天数的烟叶叶片插入 0.01M 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中, 在与标记实验相同条件下培养 24 小时, -10 $^{\circ}$ C 冰冻, 在 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中匀浆, 经 10000 转/分离心 15

分钟,再 105000 \times g 离心 1 小时提取病毒,沉淀悬在上述缓冲液, 10000 转/分离心 10 分钟, 上清液定容到 5ml, 在紫外分光光度计上测定, 按 3.24 A₂₆₀ = 1.0mg 病毒/ml 计算病毒含量。

实验结果

(一) 抗 RNase 的 ds-RNA 含量的比较

表 1 列出了在不同盐浓度下接种

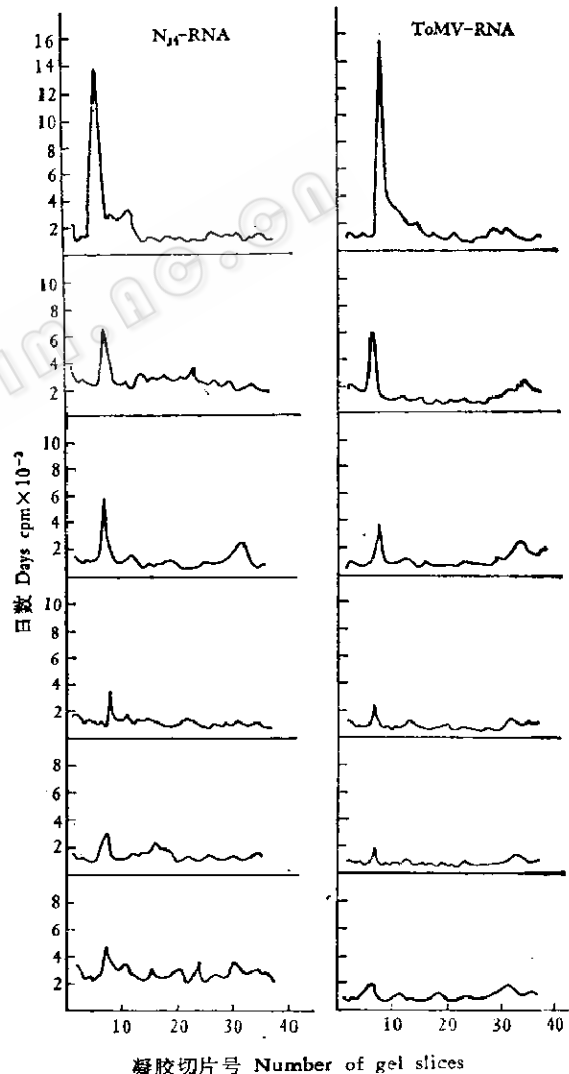


图1 接种 N₁₄ 和 ToMV 后不同天数的样品中 ds-RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of dsRNA in the samples at different days after inoculation
纵坐标自上至下分别为 2、4、6、8、10、12 天

表 1 在不同盐浓度下对 RNase 的抗性

Table 1 Resistance to RNase in different salt concentrations

盐浓度 Salt concn.	接种后天数 Days after inoculation	感染 N ₁₄ 的烟叶 N ₁₄ -infected tobacco leaves			感染 ToMV 的烟叶 ToMV-infected tobacco leaves		
		+RNase (cpm)	-RNase (cpm)	$\frac{+RNase}{-RNase}(\%)$	+RNase (cpm)	-RNase (cpm)	$\frac{+RNase}{-RNase}(\%)$
0.1×SSC	2	27	1381	2.0	62	1300	4.8
	4	37	1454	2.5	39	1124	3.5
	6	31	575	5.4	36	663	5.4
	8	24	846	2.8	38	1195	3.2
	10	29	785	3.7	64	1355	4.7
	12	59	1013	5.8	69	850	8.1
2.5×SSC	2	633	1083	58.4	477	1115	42.8
	4	345	1352	25.5	251	1358	18.5
	6	273	872	31.3	132	792	16.7
	8	337	921	36.6	118	1132	10.4
	10	292	1024	28.5	112	1077	10.4
	12	425	1175	36.2	144	1167	12.3

1. RNase A: 50μg/ml; RNase T₁ 10 单位/ml; 反应总体积 200μl, 33℃, 保温 30 分钟。
2. 表中数据均为四次重复实验的平均值。
1. RNase A: 50μg/ml, RNase T₁: 10 units/ml, Total volume of reaction 200μl, incubation at 33℃ for 30 min.
2. Average of four repeated experiments.

ToMV 和 N₁₄ 的样品对 RNase 抗性的结果。在 0.1 × ssc 盐浓度下,两样品对 RNase 都是敏感的。在 2.5 × ssc 盐浓度下,两样品对 RNase 都有不同程度的抗性。无论接种 ToMV 还是接种 N₁₄ 的叶组织中,均在接种后 2 天抗 RNase 的百分率最高,分别为 42.8 % 和 58.4 %,随着接种时间的延长,抗 RNase 百分率逐渐降低,接种 ToMV 的降低到 10.4—18.5 %,而接种 N₁₄ 的则降低到 25.5—36.6 %,即接种弱毒株 N₁₄ 的样品中抗 RNase 的 ds-RNA 百分率比接种强毒株 ToMV 的要高。

(二) 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

从电泳后³H-放射性分布图可看到(图 1),接种 N₁₄ 和 ToMV 的烟叶样品中都有一迁移率比病毒 RNA 慢的大分子 RNA 放射性计数峰,根据其迁移率推算,分子量约为 4 × 10⁶,为病毒 RNA 的复制型

(RF)^[5]。在接种后 2 天这种 ds-RNA 含量最高,随着接种时间的延长,含量逐渐降低,与抗 RNase 试验结果(表 1)是一致的。

(三) 抗 RNase 放射性计数占总放射性计数百分率比较

表 2 列出了接种 N₁₄ 和 ToMV 的样品抗 RNase 放射性计数占³H-尿嘧啶核苷参入到酸不溶物总放射性计数的百分率。接种 ToMV 后,³H-尿嘧啶核苷参入到酸不溶物的量比接种 N₁₄ 的高得多。然而,抗 RNase 放射性计数占总参入的放射性计数百分率却是接种 N₁₄ 的比接种 ToMV 的要高,前者 0.55—1.96 %,后者 0.2—0.86 %,表明 ds-RNA 占所合成的 RNA 的比例前者比后者高,且在接种后不同时间内,其变化趋势与表 1 中抗 RNase 实验结果也相符。

表 2 感染 N_{14} 或 ToMV 的烟叶中参入到抗 RNase 的 RNA、总 RNA 的放射性
Table 2 The Radioactivity incorporated into RNase-resistant and into total RNA in tobacco leaves infected with either N_{14} or ToMV

接种后天数 Days after inoculation	总 RNA 放射性/g 鲜叶 Radioactivity of total RNAs/g fresh leaf (cpm $\times 10^{-3}$)		抗 RNase 的 RNA 放射性/g 鲜叶* Radioactivity of RNase-resistant RNAs/g fresh leaf (cpm $\times 10^{-3}$)		抗 RNase 放射性总放射性(%) RNase-resistant radioactivity/total radioactivity (%)	
	N_{14}	ToMV	N_{14}	ToMV	N_{14}	ToMV
2	32.0	58.1	0.63	0.50	1.96	0.86
4	21.6	53.4	0.12	0.24	0.55	0.45
6	18.5	54.6	0.17	0.21	0.91	0.38
8	9.9	68.8	0.14	0.14	1.41	0.20
10	5.0	24.6	0.04	0.19	0.80	0.77
12	5.3	49.3	0.03	0.23	0.56	0.46

* 每 g 鲜叶抗 RNase 的 RNA 放射性由表 1 中在 $2.5\times SSC$ 中抗 RNase 的百分比计算得到。
The radioactivity of RNase-resistant RNA per gram fresh leaf was calculated from the percentage of resistance to RNase in $2.5\times SSC$ in Table 1.

(四) ds-RNA 与病毒含量变化的关系

高得多, 分别为后者的 1.62—5.75 倍。表明 ToMV 的合成速率比 N_{14} 合成速率快, 且合成量大得多。

从表 3 可见, 除接种后第 6 天外, 接种 ToMV 的叶组织中病毒含量比接种 N_{14} 的接种 N_{14} 和 ToMV 的叶组织中 ds-

表 3 接种后不同时间病毒含量比较
Table 3 Comparison of content of viruses after inoculation

接种后天数 Days after inoculation	mg 病毒/g 鲜叶 mg virus/g fresh leaf		ToMV/ N_{14}
	N_{14}	ToMV	
2	0.2315	0.3742	1.62
4	0.6173	1.0494	1.70
6	1.8326	1.1458	0.63
8	0.9877	1.9097	1.93
10	0.8565	2.5656	3.00
12	0.4598	2.6427	5.75

RNA 含量的变化随病毒含量的增加而降低。二者均在接种后第二天 ds-RNA 含量最高, 病毒含量最低(图 2)。随着接种时间的延长, 在接种 ToMV 的叶组织中, 病毒含量呈直线增加, 直到第 10—12 天, 病毒含量保持恒定。ds-RNA 含量则随着病毒合成量增加, 在接种后第 2—4 天急速降低, 此后缓慢降低到第 8 天, 继而保持恒定到第 12 天。而接种弱毒株 N_{14} 的叶组织中, 病毒含量也呈直线增加, 到接种后第 6 天达最大值, 此后相继降低直到第 12 天。ds-RNA 含量则随着病毒合成量的变化, 在接种后第 2—4 天急速降低, 此后稍有升高, 并且维持在较高百分比含量。接种第 2 天以后, 二者的 ds-RNA 含量随着各自病毒合成的增加而急速降低, 表明在病毒合成早期阶段合成和积累的 ds-RNA 用于合成病毒单链 RNA, 进而装配成完整的病毒

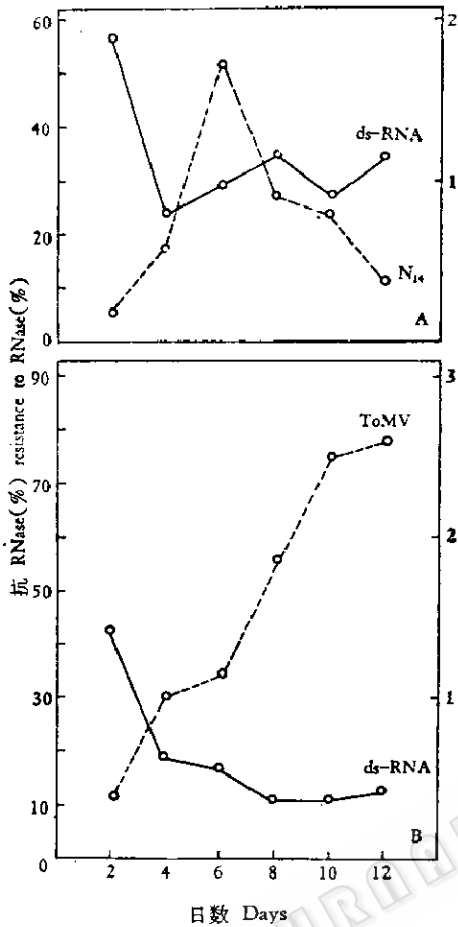


图2 ds-RNA 与病毒含量的变化

Fig. 2 Changes of the contents of ds-RNA and virus after inoculation

A. 感染 N₁₄ N₁₄-infected tobacco leaves

B. 感染 ToMV ToMV-infected tobacco leaves

颗粒。

讨 论

病毒毒力的机理不能只从病毒结构的静态分析来寻找,还必须从病毒复制的动态来研究。Zaitlin^[6]指出了从病毒复制的各个环节探索病毒致病性的必要性。本文所获得的结果表明,接种 N₁₄ 的烟叶组织中 ds-RNA 合成比例比接种强毒系 ToMV 的高,而弱毒系 N₁₄ 的病毒合成量较低。我们设想,以单链 RNA 为基因组的病毒复

制过程中, ds-RNA 含量可能是与病毒毒力有关的因素之一。弱毒系接种的组织中较高的 ds-RNA 含量可能直接影响病毒 RNA 的合成和装配,降低细胞中病毒浓度。也可能 ds-RNA 诱导某种类似于干扰素的抗病毒物质产生,使细胞能抵抗病毒。至于弱毒系接种的组织中 ds-RNA 含量高的原因可能与 ds-RNA 的结构,模板效能和复制酶功能有关。

Dawson 等^[7,8]从温度对病毒复制的作用出发,也提出了 ds-RNA 与 ss-RNA 之间的关系, TMV 的温度敏感突变体 ts1V-35, 在 25℃ 下,病毒 RNA 能正常合成, 35℃ 下病毒 RNA 不能正常合成,进一步分析证明,在高温下病毒单链 RNA (ss-RNA) 的合成停止,但 ds-RNA (RF 和 RI) 继续合成。Wu 等^[9]证明,感染南方菜豆花叶病毒 (SBMV) 的大豆细胞培养物,在 6℃ 时保温 4 天没测出有侵染性的病毒和有侵染性的 RNA 合成,但保温 84—96 小时测出有 ds-RNA (RF) 的合成。似乎 ds-RNA 在高温和低温下均能正常合成。

必须指出,本文还没有直接的证据表明,在接种强毒系 ToMV 或弱毒系 N₁₄ 的叶组织中 ds-RNA 含量与病毒毒力有关,上述假设需要用更多的强毒株和弱毒株的对比分析来证实。

参 考 文 献

- [1] 张秀华等: 植物病理学报, 10(1): 49—54, 1980.
- [2] 田波等: 植物病理学报, 10, 109—112, 1981.
- [3] Morris, T. J. and Dodds, J. A.: *Phytopathology*, 69(8): 854—858, 1979.
- [4] 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.
- [5] 方荣祥等: 中国科学, 第10期, 第1005—1016页, 1979.
- [6] Zaitlin, M.: In "Plant Disease", ed. by Academic Press New York San Francisco, London, Vol IV, p. 257, 1979.

- [7] Dawson, W. O. and J. L. White: *Virology*,
90: 209—213, 1978.
[8] Dawson, W. O. and J. L. White: *Virology*,

93: 104—110, 1979.

- [9] Wu, F. S. and H. H. Murakishi: *J. Gen. Virol.*, 45: 149—160, 1979.

COMPARISON OF CONTENTS OF VIRAL DOUBLE STRANDED RNA IN TOBACCO LEAVES INFECTED WITH ToMV AND ITS AVIRULENT MUTANT N₁₄

Kang Liangyi Yang Xicai Tian Bo

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The changes in contents of double stranded-RNA in tobacco leaves inoculated with Tomato mosaic virus (ToMV) and its avirulent mutant N₁₄ were compared with ³H-uridine incorporation, resistance to RNase and polyacrylamide gel electrophoresis. It was found that the content of dsRNA in leaves inoculated with N₁₄ was higher than that with ToMV. In the second day after inoculation, the percentage of dsRNA resistant to RNase in leaves inoculated with N₁₄ was 58.4%, whereas in those with ToMV was 42.8%. After that

the ToMV-dsRNA rapidly declined to 10.4—18.5%, but N₁₄-dsRNA was still remained in higher level from 25.5 to 36.6%. These results were demonstrated by polyacrylamide gel electrophoresis of dsRNA. The possible roles of higher content of dsRNA played in virulence of single stranded RNA viruses were discussed. The higher content of dsRNA might decrease viral synthesis and/or induce production of viral resistant material similar to interferon.