

植物病毒卫星 RNA 及其在病毒病生物防治上的应用

I. 用加入卫星RNA的方法组建成黄瓜花叶病毒的疫苗

邱并生 田波 丘艳 张秀华

(中国科学院微生物研究所, 北京)

1976年 Kaper 和 Tousignant 在黄瓜花叶病毒 (CMV) 的分段基因组中发现伴随有一种可复制的低分子量 RNA, 称谓黄瓜花叶病毒的卫星 RNA^[1]。卫星 RNA 的存在能够改变寄主症状及其严重程度^[2,3]。除番茄外在所有已测定的寄主上, 卫星 RNA 都可使病害严重程度降低, 且不产生厥叶症状。能否利用加入卫星 RNA 的方法来组建黄瓜花叶病毒的用于生物防治的疫苗呢? 作者试将甜椒上 CMV 分离物的侵染性总 RNAs, 用加入卫星 RNA 的方法, 结果获得了可在甜椒等植物上使用的疫苗 CMV-S₁₂。

材料和方法

(一) 病毒提纯

分别将单斑纯化的甜椒 CMV 分离物和美国农业部植物保护所病毒研究室 Kaper, J. M. 博士赠送的含有 CA RNA-5 的 CMV 在防虫温室内接种枯斑三生烟, 20—25℃ 培育 12 天。采收病叶, 每 100g 叶片加 200ml 0.5M 柠檬酸缓冲液 (pH 6.7)。内含 0.1% 巯基乙醇, 经高速匀浆, 纱布过滤去渣, 加 10% 氯仿振荡 20 分钟, 在 K7D 离心机以 4000rpm 离心 30 分钟, 上清液在 VCA601 离心机以 30,000rpm 离心 2 小时, 沉淀用 0.05M 柠檬酸缓冲液悬浮过夜, 8000 rpm 离心 15 分钟去沉淀, 上清再经 30,000 rpm 离心 2 小时, 沉淀用 0.05M 硼酸缓冲液 5mM EDTA-Na₂ pH8.0 悬浮过夜, 8000 rpm 离心 15 分钟, 上清液即病毒悬液, 加万分之一的 NaN₃, 4℃ 保存。

(二) CMV 总核酸的制备

提纯的 CMV, 用 SDS-酚法提取总核酸^[1], 分装成小体积, -20℃ 保存备用。

(三) CMV-RNA, 核酸片段的分离纯化

用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 CMV-RNA, 核酸片段。凝胶浓度为 2.4% 丙烯酰胺-双丙烯酰

胺, 0.5% 琼脂糖, 电泳缓冲液为 TAE (40mM Tris 20mM NaAc 2mM EDTA-Na₂ pH7.8)。电泳后的凝胶用 0.1% 甲苯胺兰水溶液染色, 用无菌水脱色, 将 CMV-RNA, 带切下, 采用电泳洗脱或将胶片捣碎后用酚抽提核酸。

(四) 组建

取 10μg/ml CMV 总 RNA 与 10μg/ml CMV-RNA, (1:1) 混合接种枯斑三生烟。

结 果

(一) CMV-S₁₂ 的组建

由甜椒 CMV 分离物提纯病毒所分离的有侵染性的总 RNA (含量为 10μg/ml), 加入等量经电泳纯化的卫星 RNA-5 (含量为 10μg/ml) 接种带有枯斑基因的三生品种的烟草 5 株, 以接种不加卫星 RNA-5 的甜椒 CMV 分离物总 RNA 作为对照。对照发病后, 加有卫星 RNA-5 的似不发病, 但用抗血清免疫扩散证明病毒已在植株内增殖。

(二) CMV-S₁₂ 中存在卫星 RNA 的证明

将组建成的 CMV-S₁₂ 在带有枯斑基因的三生烟上繁殖, 按上述方法提纯病毒, 分离 RNA, 进行电泳分析。图版 1-7 显示 CMV-S₁₂ 中含有大量的卫星 RNA。

(三) CMV-S₁₂ 的寄主反应

曾将组建的 CMV-S₁₂ 和野生的 CMV 甜椒株分别接种甜椒 (*Capiscum frutescens*)、心叶烟 (*Nicotiana glauca*) 和含有枯斑基因的三生烟幼苗各 10 株, 结果 CMV-S₁₂ 在这三种植物上几乎不引起症状, 而 CMV 甜椒株都引起典型的 CMV 症状。如图版 1-1—6。

(四) CMV-S₁₂ 的干扰作用

本文于 1983 年 11 月 8 日收到。

表 1 在甜椒上疫苗 CMV-S₂ 对 CMV 甜椒株的保护作用

Table 1 Protection of pepper by vaccination of CMV-S₂ against wild CMV

接种 CMV-S ₂ 日期	接种 CMV 甜椒株日期	保护天数	发病率 (%)	病情指数	平均植株高度 (cm)
—	19/9	0	100	100	12.0
9/9	19/9	10	25	25.3	17.4
4/9	19/9	15	25	6.3	20.5
30/9	19/9	20	25	6.3	18.8
30/9	—	—	0	0	19.2
—	—	—	0	0	19.0

为了测定 CMV-S₂ 对 CMV 甜椒株的干扰作用,取接种 CMV-S₂ 后 10 天、15 天和 20 天的甜椒幼苗分别接种 CMV 甜椒株,然后记录发病率、病情指数和株高。从表 1 结果可以看出,免疫接种后 15—20 天可使 75% 的植株受到保护,其余 25% 的病情指数也低于对照组。

讨 论

在人和动物病毒研究中,已提出用伴随的缺陷病毒干扰病毒感染的设想^[1]。植物病毒的卫星 RNA 也具有伴随的缺陷病毒的性质,因此试验它对病毒的干扰作用具有意义。

本文试验结果证明,加有卫星 RNA 的 CMV 不但症状极轻微,而且对野生型病毒仍有轻强的保护作用,在田间使用也有防病增产效果^[4]。用

加入卫星 RNA 方法组建成的 CMV 还具有以下特点:

(1) 对原来的野生型病毒未进行诱变处理,因此其遗传性是稳定的。

(2) 可为各种 CMV 引起的病害用其自身的病毒组建生物防治疫苗。由于病毒亲缘关系愈近,其保护作用愈强,这样组建的生物防治疫苗,有较好的保护效果。

(3) 根据最近的研究结果,卫星 RNA 的一级结构与寄主遍文结构的 DNA 具有很高的序列同源性。因此,认为卫星 RNA 可能起源于寄主,是一种与免疫有关的低分子量 RNA。如加入卫星 RNA,可能诱导寄主的免疫性^[4]。

参 考 文 献

- [1] Kaper, J. M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72: 1237—1243, 1976.
- [2] Kaper, J. M. and H. E. Waterworth: *Science* 196: 429—431, 1977.
- [3] Kaper, J. M. and M. E. Tousignant: *Virology* 80: 186—195, 1977.
- [4] 张秀华等: *植物病理学报*, 15(1): 1985.
- [5] Hung, A. S. and Baltimore.: in "Comprehensive Virology" (Fraenkel-Conrat, H., and Wagne, R. R., eds.) 10: 73—116. Plenum Press, New York, 1977.
- [6] Kaper, J. M. and H. E. Waterworth.: in "Handbook of Plant Viruses Infection and Comparative Diagnosis" (Kurstak, E., ed) p. 316—321, Elsevier North-Holland Biomedical Press. 1981.

图 版 说 明

CMV-S₂ 和 CMV 甜椒强毒分离物在植株上的症状 RNA 的电泳图谱(2.4% 聚丙烯酰胺, 0.5% 琼脂糖)和免疫扩散图

CMV 甜椒强毒分离物在心叶烟 (1)三生烟 (2)和甜椒 (3)上的症状 CMV-S₂ 在心叶烟 (4)三生烟 (5)和甜椒 (6)上的表现

CMV 甜椒强毒分离物 (7a) CMV-S₂ (7b) RNA 和卫星 RNA (7c) 的电泳图谱

CMV-S₂ 和 CMV-感染的三生烟汁液与 CMV 抗体的免疫扩散图