

相关和不相关病毒 mRNA 在兔网织细胞裂解液中的竞争性翻译

马德芳 王小凤 裴美云 田波

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用³⁵S-甲硫氨酸或³H-亮氨酸作标记底物时, ToMV 和 N₁₄ RNAs 的共同翻译产物是 160 K、120K 和 35K 蛋白, 但 ToMV-RNA 翻译产物有 50K 蛋白。用³⁵S-甲硫氨酸作标记底物时, BSMV 总 RNA 基因组的主要翻译产物为 130K、92K 和 88K 蛋白。ToMV 和 N₁₄ RNAs 对³H-亮氨酸和³⁵S-甲硫氨酸参入的促进可达对照的 10—60 倍。当同时加入 ToMV 和 N₁₄ RNAs, 产物种类为二者分别翻译时产物总和, cpm 数低于二者单独翻译时的总和, 50K 蛋白的合成明显减少。不同时加入 ToMV 和 N₁₄ RNAs, 先加入的 mRNA 明显干扰后加 mRNA 的翻译。BSMV 和 N₁₄ RNAs 翻译的干扰情况与此类似。不同 mRNA 翻译的优势取决于它加入体系的先后及其活性。

关键词 番茄花叶病毒; 亚硝酸诱变弱毒株; 大麦条纹花叶病毒; 体外翻译; 干扰

番茄花叶病毒 (ToMV) 的亚硝酸突变体 N₁₄ 是一个在多种植物上无症状的弱株系, 在温室和田间对 ToMV 有明显的干扰, 对番茄等作物有防病增产和促进早熟的作用^[1-4]。为了探讨株系间干扰是否发生在翻译水平上及干扰作用的机理, 研究不同病毒和同种病毒不同株系的 mRNA 在体外翻译中的竞争作用, 我们研究了 ToMV、N₁₄ 和大麦条纹花叶病毒 (BSMV) mRNA 在兔网织细胞裂解液体外翻译中的相互影响。

材料和方法

(一) 试剂

小球菌核酸酶为 Sigma 产品 (200u/mg); 磷酸肌酸、磷酸肌酸激酶为东风试剂厂产品; ³⁵S-甲硫氨酸为 Amersham 产品 (19.9mci/ml); ¹⁴C-甲基化蛋白混合物参照为 Amersham 产品, 总放射强度为 5μci/ml; ATP、GTP 为 Sigma 产品。

(二) 兔网织细胞裂解液无细胞体系制备^[5-6]

肌肉注射 2.5% 盐酸苯胂溶液使家兔贫血,

产生网织红细胞。每天注射一次, 连续注射 6 天, 第 8 天取心脏血, 8000rpm 离心 10 分钟, 取沉淀的血球, 用 2 倍体积的洗血球缓冲液 (1000ml 无菌重蒸水中含 0.13MNaCl, 0.005MKCl, 0.0074M MgCl₂ · 6H₂O) 洗三次。取离心沉淀的血球, 加入等体积冰冷无菌水, 振荡、使裂解 5—10 分钟, 15000rpm 离心 20 分钟, 小心吸出上清液 (兔网织细胞裂解液), 在冰浴迅速分装, 贮于液氮备用。全部操作在 2—3℃ 进行。

(三) mRNA 制备

ToMV-RNA、N₁₄-RNA 及 BSMV-RNAs 用 SDS-酚法提取^[7]。用 Eppendorf 管分装, -70℃ 保存备用。

(四) 依赖于 mRNA 的兔网织细胞裂解液无细胞体系的制备

基本参考 Pelham 等的方法^[8], 略有不同。70μl 标准反应液含下列成份:

兔网织细胞裂解液 40 μl, 磷酸肌酸激酶 (PCK) 2.5μg, 磷酸肌酸 (PC) 8.6mM, 氯化血红素 (Heamin) 25μg, KCl 85.6mM, MgCl₂ 0.7

本文于 1985 年 5 月 6 日收到。

承赵小平同志印制照片, 特此致谢。

—1mM, ATP/GTP 0.86mM/86 μ M, 酵母 tRNA (YrRNA) 4 μ g, mRNA 2—4 μ g, 19 种未标记的氨基酸, 每种 21 μ M, 35 S-甲硫氨酸 10 μ ci (1100 ci/mM)。

先将兔网织细胞裂解液、PCK、PC、Heamin、KCl、MgCl₂、ATP、GTP 和 19 种未标记的氨基酸加入小试管内混匀, 然后加入小球菌核酸酶(使终浓度为 19 μ g/ml), 将小试管放入 20℃ 水浴反应 15 分钟取出, 加 EGTA (终浓度 2mM)、YrRNA、mRNA 和 35 S-甲硫氨酸, 30℃ 水浴反应 60 分钟, 放冰浴终止反应后点样 5 μ l 于新华 1 号滤纸园片上, 投入 10% TCA 液中固定, 用 10% TCA 煮 2 次, 用脱色液 (H₂O₂: 甲酸: 10% TCA = 1:1:2) 脱色 30 分钟, 再用冷 5% TCA 洗两次, 逐次以乙醇、乙醚脱水干燥, 放入 PPO-POPOP 闪烁液于 NE8312 液体闪烁谱仪中计数。

(五) ToMV-RNA、N₁₄-RNA 及 BSMV-RNAs 在翻译体系中的相互影响

实验分如下 6 种处理:

1. ToMV-RNA 和 N₁₄-RNA 同时加入体系, 共同反应 60 分钟。
2. 先加入 N₁₄-RNA 分别反应 2、5、10、20、30 分钟后再加入 ToMV-RNA 反应到 60 分钟。
3. 先加入 ToMV-RNA 分别反应 10、20 分钟后再加入 N₁₄-RNA 反应到 60 分钟。
4. N₁₄-RNA 和 BSMV-RNAs 同时加入体系, 共同反应 60 分钟。
5. 先加入 N₁₄-RNA 反应 2、5、10、20、30 分钟后加入 BSMV-RNAs, 反应到 60 分钟。
6. 先加入 BSMV-RNAs 反应 2、5、10、20、30 分钟后加入 N₁₄-RNA 反应到 60 分钟。

不同浓度 mRNA 对 35 S-甲硫氨酸的参入有显著影响。体系中所加各种 mRNA 总量均未超过 8 μ g, 而 8—10 μ g 是我们实验中 mRNA 的饱和水平^[9]。

(六) 产物分析

用 13% SDS-PAGE 分析翻译产物^[10-11]。反应液点样后立即加入 2 倍体积的样品液 (0.0625 M Tris-HCl (pH6.8)、2% SDS、10% 甘油、5% 2-巯基乙醇)^[12], 再加入等体积 10% TCA, 放冰箱 20 分钟后离心取沉淀^[13], 以 5% TCA 洗沉淀 2 次, 再以乙醚-丙酮 (3:1) 洗 2 次, 待丙酮自然

挥发后, 将沉淀悬浮于原体积的样品液中待电泳。SDS-PAGE 采用 Tris-甘氨酸系统 (120V, 30mA, 平板凝胶电泳, 电泳 6 小时)。电泳后以二甲亚砜 (DMSO)、PPO-DMSO^[14] 或水杨酸钠^[15] 处理凝胶, -70℃ 荧光放射自显影。

结 果

(一) 同一病毒不同株系的 mRNA 在体外翻译中的相互影响

ToMV-RNA 及其无毒突变体 N₁₄-RNA 在兔网织红细胞体外翻译体系中翻译总参入和产物情况如下:

1. 同时翻译的相互影响: 相同浓度的 N₁₄-RNA 和 ToMV-RNA (各 4 μ g) 同时加入体系反应 60 分钟, 35 S-甲硫氨酸的参入为 226.8—282.7 $\times 10^3$ cpm, 比两者单独翻译时参入的总和低。从表 1 可见, 在 4 次实验中, N₁₄-RNA 单独翻译时, 总参入为 149.5—325.1 $\times 10^3$, ToMV-RNA 参入为 89.3—181.9 $\times 10^3$, 有 3 次实验结果倾向于说明两种 RNA 共同翻译的总参入仅与活性较高的 N₁₄-RNA 单独翻译时相似, 尽管 N₁₄-RNA 浓度仅为 2 种 RNA 的一半, mRNA 量也未达饱和水平。产物分析结果表明, 两种 mRNA 同时加入体系中共同翻译时, 产物种类是两者单独翻译时的和 (图版 I-A-3)。

2. 不同时加入两种 mRNA 时翻译的相互影响: 先加入 N₁₄-RNA 开始翻译, 间隔 2、5、10、20 和 30 分钟后再加入 ToMV-RNA 共同翻译至 60 分钟, 在多数情况下, 总参入量都略高于两种 mRNA 同时共同翻译的参入量 (表 1), ToMV-RNA 特有的翻译产物 50K 蛋白, 随着 N₁₄-RNA 先加入时间延长至 20—30 分钟时, 其放射自显影带的强度显著减弱 (图版 I-A-4—6; 图版 I-B-4-6)。如反应开始不加 N₁₄-RNA, 2、5、10 分钟后加入 ToMV-RNA

表1 ToMV-RNA 与 N₁₄-RNA 体外翻译的相互影响Table 1 The competence of ToMV-RNA and N₁₄-RNA for translation *in vitro*

先加 mRNA mRNA added firstly	后加 mRNA mRNA added secondly	³⁵ S-甲硫氨酸参入($\times 10^3$) Incorporation of ³⁵ S-methionine			
		实验 1 Exp. 1 cpm($\times 10^3$)	相当于 N ₁₄ -RNA 单 独参入 Percentage of incorporation to N ₁₄ -RNA alone(%)	实验 2 Exp. 2 cpm($\times 10^3$)	相当于 N ₁₄ -RNA 单 独参入 Percentage of incorporation to N ₁₄ -RNA alone(%)
N ₁₄ -RNA	—	164.6	100	149.5	100
ToMV-RNA	—	89.3	54	163.1	109
N ₁₄ -RNA + ToMV-RNA	—	148.1	89	226.8	151
N ₁₄ -RNA	2 分钟后 After 2 min ToMV-RNA	155.5	94	250.6	167
N ₁₄ -RNA	5 分钟后 After 5 min ToMV-RNA	201.1	122	179.3	119
N ₁₄ -RNA	10 分钟后 After 10 min ToMV-RNA	188.7	114	152.5	102
ToMV-RNA	2 分钟后 After 2 min N ₁₄ -RNA	77.9	47	142.2	95
ToMV-RNA	5 分钟后 After 5 min N ₁₄ -RNA	117.5	71	25.6	17
ToMV-RNA	10 分钟后 After 10 min N ₁₄ -RNA	116.9	71	23.7	15
—mRNA	—mRNA	3.8	2	6.2	4
		实验 3 Exp. 3 cpm($\times 10^3$)		实验 4 Exp. 4 cpm($\times 10^3$)	
N ₁₄ -RNA	—	325.1	100	258.3	100
ToMV-RNA	—	153.5	47	181.9	70
N ₁₄ -RNA + ToMV-RNA	—	301.7	92	282.7	109
N ₁₄ -RNA	10 分钟后 After 10 min ToMV-RNA	364.4	112	301.8	116
N ₁₄ -RNA	20 分钟后 After 20 min ToMV-RNA	486.7	149	402.9	155
N ₁₄ -RNA	30 分钟后 After 30 min ToMV-RNA	375.4	115	388.0	150
ToMV-RNA	10 分钟后 After 10 min N ₁₄ -RNA	335.0	103	267.2	103
ToMV-RNA	20 分钟后 After 20 min	243.3	74	221.1	85
ToMV-RNA	30 分钟后 After 30 min	234.9	72	211.3	81
—mRNA	—mRNA	8.4	2	7.3	2

表 2 N_{14} -RNA 与 BSMV-RNAs 体外翻译的相互影响*Table 2 The competence of N_{14} -RNA and BSMV-RNAs for translation *in vitro*

实 验 Exp.	先加 mRNA mRNA added firstly	后加 mRNA mRNA added secondly	^{35}S -甲硫氨酸参入($\times 10^3$) Incorporation of ^{35}S -methionine	
			cpm ($\times 10^3$)	相当于 N_{14} -RNA 单独 参入 Percentage of incorporation to N_{14} - RNA alone (%)
1	N_{14} -RNA	—	159.7	100
	BSMV-RNAs	—	103.6	64
	N_{14} -RNA + BSMV-RNAs	—	84.3	52
	N_{14} -RNA	2 分钟后 After 2 min BSMV-RNAs	93.6	58
	N_{14} -RNA	5 分钟后 After 5 min BSMV-RNAs	98.4	61
	N_{14} -RNA	10 分钟后 After 10 min BSMV-RNAs	108.2	67
	BSMV-RNAs	2 分钟后 After 2 min N_{14} -RNA	86.9	54
	BSMV-RNAs	5 分钟后 After 5 min N_{14} -RNA	59.7	37
	BSMV-RNAs	10 分钟后 After 10 min N_{14} -RNA	96.2	60
	—mRNA	—	3.9	2
2	N_{14} -RNA	—	339.3	100
	BSMV-RNAs	—	165.3	48
	N_{14} -RNA + BSMV-RNAs	—	226.1	66
	N_{14} -RNA	10 分钟后 After 10 min BSMV-RNAs	245.8	72
	N_{14} -RNA	20 分钟后 After 20 min BSMV-RNAs	220.3	64
	N_{14} -RNA	30 分钟后 After 30 min	395.5	116
	BSMV-RNAs	10 分钟后 After 10 min	142.6	42
	BSMV-RNAs	20 分钟后 After 20 min	160.2	47
	BSMV-RNAs	30 分钟后 After 30 min	147.2	43
	—mRNA	—	9.8	2

* N_{14} -RNA 4 μg , BSMV-RNAs 2 μg

单独反应至 60 分钟, 50K 蛋白的合成不受影响(图版 I-A-8—10)。如先加 ToMV-RNA 开始翻译, 间隔 2、5、10、20 和 30 分钟后再加入 N_{14} -RNA 共同翻译至 60 分钟, 其总参入量在多数情况下都显著低于两者同时加入共同翻译的参入量(表 1), 50K 蛋白的合成不受影响(图版 I-C-10—11)。由于后加的 N_{14} -RNA 无特殊翻译产物, 因此无法断定先加 ToMV-RNA 对它翻译的影响。

(二) 不同种病毒 mRNA 在体外翻译中的相互影响

1. 同时翻译的相互影响: N_{14} -RNA 和 BSMV-RNAs 同时在体系中翻译时, ^{35}S -甲硫氨酸的总参入比两者单独翻译时参入量的和低得多(表 2)。产物种类是两者单独翻译时产物的和。

2. 先后加入两种 mRNA 时翻译的相互影响: 先加入 BSMV-RNAs 开始翻译, 间隔 2、5、10、20 和 30 分钟后再加入 N_{14} -RNA 共同翻译至 60 分钟, 其总参入量低于两者同时共同翻译时的参入量(表 2)。 N_{14} -RNA 的 35K 产物随着 BSMV-RNAs 先加入延长至 10—30 分钟时, 其放射自显影强度显著减弱(图版 I-C, II-D、E-4—6) 先加入 N_{14} -RNA 开始翻译, 间隔 2、5、10、20、30 分钟后, 再加入 BSMV-RNAs 共同翻译至 60 分钟, 其总参入量等于或高于二者共同翻译时的参入量(表 2)。后加入的 BSMV-RNAs 的 86K、68K 产物合成随着 N_{14} -RNA 先加入时间的延长而逐渐减弱。

讨 论

Salamen 等^[6]曾报导不同 TMV 株系的 RNA 即野生型 (TMV_w) 和鸭梨分离物 (TMV_A) 的 RNAs 在兔网织细胞裂解液、麦胚无细胞体系中的翻译有竞争作用,

但和不同种类的苜蓿花叶病毒 (AMV) RNAs 没有竞争、互不影响。因此, Salamen 等认为可能是 AMV-RNAs 赖以翻译的核糖体和起始因子与 TMV-RNA 所需要的不同, 而 TMV 各株系 RNA 之间则存在竞争核糖体和起始因子的矛盾。我们的实验结果表明, ToMV 和 N_{14} -RNAs 之间或 ToMV-RNA 和 BSMV-RNAs 之间在兔网织细胞裂解液中的翻译均存在竞争, 互相影响。mRNA 翻译的优势取决于它加入体系的先后及其活性。先加的 mRNA 翻译占优势, 它干扰后加的 mRNA 主要翻译产物的合成。由此推想, 这种干扰可能基于核糖体的占领问题, 而不是核糖体的类型问题。

Ziemiński 和 Wood 指出^[7], 在植物体内由病毒诱导的多肽可能改变核糖体的特异性, 使其优先和病毒 mRNA 结合, 即增加了 mRNA 和核糖体在翻译起始水平上的亲和性。先进入体系的 mRNA 可能已占领了大多数核糖体, 直接影响后进入的 mRNA 的翻译。体外翻译体系是否存在这种多肽值得讨论。Herson 等^[8]指出, 在竞争条件下, 两种 mRNA 体外翻译速度的区别取决于它们对体系的亲和性。竞争性翻译速度的限制条件可能既在起始水平上, 也在延长水平上。在延长水平上的竞争, 也需要一种特殊的 mRNA-核糖体复合物的形成, 翻译占优势的 mRNA 这种复合物的形成及其对氨酰 tRNA 或延长因子的亲和性大于另一种 mRNA。而氨酰 tRNA 是翻译的限速因子。我们的实验中, 先进入体系的 mRNA 在形成 mRNA-核糖体复合物方面也许优于后加的 mRNA。应该指出, 我们所用的病毒 mRNA 种类有限, 不同类型病毒 mRNA 体外翻译的竞争情况有待进一步研究。

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(2): 109—112, 1980。
- [3] 谭增亮等: 植物病理学报, 10(2): 59—61, 1982。
- [4] Tien, P. et al.: Seed Sci and Technol 11, 969—972, 1983.
- [5] Gilbert, J. M. et al.: Methods in Enzymology, Part C, 20: 542—549, 1971.
- [6] Lingrel, J. B. et al.: Biochem., 2: 309—314, 1963.
- [7] Morris-Krisinich, B. A. M et al.: Virology, 124: 349—356, 1983.
- [8] Pe'ham, H. R. B. et al.: Eur. J. Biochem., 67: 247—256, 1976.
- [9] 王小凤等: 病毒学报, 1(2): 187—189, 1985。
- [10] Maizel J. V.: Methods in Virology, Academic press, 5: 182—246, 1971.
- [11] Studier, F. W.: J. Mol. Biol., 79: 237—248, 1973.
- [12] Schleif R. F. et al.: Practical Methods in molecular Biology, Springer-Verlag, New York Inc., p. 82, 1981.
- [13] Schwinghamer, M. W. et al.: Virology, 79: 88—108, 1977.
- [14] Lasey, R. A.: Methods in Enzymology, Nucleic Acids Part, 65: 363, 1980.
- [15] Chamberlain J. P.: Anal. Biochem., 98: 132—135, 1979.
- [16] Salomen, R. et al.: J. Gen. Virol., 62: 343—347, 1982.
- [17] Ziemięcki, A. et al.: J. Gen. Virol., 31: 373—381, 1976.
- [18] Hersen, D. et al.: J. Biochem., 254: 8245—8249, 1979.

COMPETITION OF TRANSLATION BETWEEN RNA SPECIES FROM RELATED AND UNRELATED VIRUSES IN RABBIT RETICULOCYTE LYSATE

Ma Defang Wang Xiaofeng Pei Meiyun Tien Po

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The RNAs of tomato mosaic virus (ToMV) and its avirulent mutant N_{14} and barley stripe mosaic virus (BSMV) were translated in nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate. The principal products of 160K, 120K, 50K and 35K for ToMV-RNA; 160K, 120K, and 35K for N_{14} -RNA; and 130K, 92K and 88K for BSMV-RNAs were synthesized, respectively.

In our experiment conditions, it gave 60 times stimulation in the incorporation of ^{35}S -methionine and ^3H -leucine over the background. When ToMV-RNA + N_{14} -RNA or BSMV-RNAs + N_{14} -RNA were added into the reaction system at the same time, the species of translation products was

the total of those translated by the two mRNAs alone. When ToMV-FNA and N_{14} -RNA or BSMV-RNAs and N_{14} -RNA added into the reaction system at an interval of 2, 5, 10, 20, 30 min., the mRNA added firstly interfered the translation of the second one. The translation superiority of mRNAs depended on the order of addition of mRNA into reaction system and their translation activity.

Key Words

Tomato mosaic virus; Nitrous acid mutagenized avirulent strain; Translation *in vitro*; Interference

图 版 说 明

Explanation of plates

不同条件下的翻译产物

Translation products in different conditions

I-A:

1. 加 ToMV-RNA 的翻译产物; 2. 加 N_{14} -RNA; 3. N_{14} 和 ToMV-RNAs 同时加入;
 4,5,6. 分别为先加 N_{14} -RNA, 2、5、10 分钟后再加 ToMV-RNA; 7. ^{14}C -标准蛋白;
 8,9,10. 反应开始不加 N_{14} -RNA, 分别在 2、5、10 分钟后加 ToMV-RNA; 11. -mRNA
1. Translation products of ToMV-RNA; 2. N_{14} -RNA; 3. ToMV-RNA and N_{14} -RNA;
 4,5,6. N_{14} -RNA (firstly added) and ToMV-RNA (after 2',5',10' added); 7. ^{14}C -markers;
 8,9,10. no N_{14} -RNA; after 2',5', 10', ToMV-RNA was added; 11. -mRNA

B:

- 1,2,3. 同图版 A-1,2,3; 4,5,6. 分别为先加 N_{14} -RNA 10、20、30 分钟后加 ToMV-RNA;
 7. ^{14}C -标准蛋白; 8,9,10. 分别为加先 ToMV-RNA, 10、20、30 分钟后再加 N_{14} -RNA;
 11. -mRNA
- 1,2,3. cf. plate A-1,2,3; 4,5,6. N_{14} -RNA (firstly added) and ToMV-RNA (after 2',5',
 10' added); 7. ^{14}C -markers; 8,9,10. ToMV-RNA (firstly added) and N_{14} -RNA (after
 10', 20' 30' added); 11. -mRNA

C:

- 1,2. 同 A-1,2; 3. 加 BSMV-RNAs; 4. N_{14} 和 ToMV-RNAs 同时加入; 5. N_{14} 和 BSMV-RNAs 同时加入;
 6,8,9. 先加 N_{14} -RNA, 10、20、30 分钟后加 ToMV-RNA; 7. ^{14}C -标准蛋白;
 10,11. 先加 ToMV-RNA, 10、20 分钟后加 N_{14} -RNA; 12. -mRNA
- 1,2. cf. plate A-1,2; 3. BSMV-RNAs; 4. N_{14} and ToMV-RNAs; 5. N_{14} and BSMV-RNAs;
 6,8,9. N_{14} -RNA (firstly added) and ToMV-RNA (after 10',20',30' added);
 7. ^{14}C -markers; 10,11. ToMV-RNA (firstly added) and N_{14} -RNA (after 10', 20' added);
 12. -mRNA

II-D:

1. 加 BSMV-RNAs 的翻译产物; 2. 同图版 A-2; 3. BSMV 和 N_{14} -RNAs 同时加入;
 4,5,6. 分别为先加 BSMV-RNAs, 2、5、10 分钟后加 N_{14} -RNA; 7,8,9. 分别为先加 N_{14} -RNA,
 2、5、10 分钟后加 BSMV-RNAs; 10. -mRNA
1. Translation products of BSMV-RNAs; 2. cf. plate A-2; 3. BSMV and N_{14} -RNAs;
 4,5,6. BSMV-RNAs (firstly added) and N_{14} -RNA (after 2',5',10' added); 7,8,9. N_{14} -RNA (firstly added) and BSMV-RNAs (after 2',5',10' added); 10. -mRNA

E:

1. BSMV-RNAs 的翻译产物; 2. 同图版 A-2; 3. BSMV 和 N_{14} -RNAs 同时加入;
 4,5,6. 先加 BSMV-RNAs, 10、20、30 分钟后加 N_{14} -RNA; 7. ^{14}C -标准蛋白; 8,9,10. 先加
 N_{14} -RNA, 10、20、30 分钟后加 BSMV-RNAs; 11. -mRNA
1. Translation products of BSMV-RNAs; 2. cf. plate A-2; 3. BSMV and N_{14} -RNAs;
 4,5,6. BSMV-RNAs (firstly added) and N_{14} -RNA (after 10',20',30' added); 7. ^{14}C -markers;
 8,9,10. N_{14} -RNA (firstly added) and BSMV-RNAs (after 10',20', 30' added);
 11. -mRNA