

卫星 RNA 作为黄瓜花叶病毒病生防因子的研究

III. 卫星 RNA 对黄瓜花叶病毒感染的烟叶组织中病毒双链 RNA 含量的影响

杨希才 覃秉益 梁锡娴 田波

(中国科学院微生物研究所,北京)

用 ^3H 尿嘧啶核苷标记、聚丙烯酰胺凝胶电泳分析、放射自显影等技术以及根据抗 RNA 酶和 DNA 酶的性质比较了感染黄瓜花叶病毒 (CMV) 及其带有卫星 RNA 的黄瓜花叶病毒 (CMV-S₁) 的三生烟叶组织中病毒 ds RNA 含量的变化。结果表明,随接种后时间的延长,CMV-S₁ 感染的组织中卫星 RNA 的 ds RNA 含量呈直线增长,第 10 天达最高峰,而病毒基因组 RNA 的 ds RNA 的含量则随时间延长而降低,这一趋势一直延续到最后一次测定。卫星 RNA 的双链 RNA 含量也比病毒基因组 ds RNA 高得多,从接种后的第二天的 2.5 倍到第 10 天的 20 倍及第 14 天的近 40 倍,但不含卫星 RNA 的 CMV 接种后在所测定的 14 天内,各基因组 RNA 的 ds RNA 含量比较恒定。

关键词 黄瓜花叶病毒;带有卫星 RNA 的黄瓜花叶病毒;病毒基因组 RNAs 的双链 RNA;卫星 RNA 的双链 RNA

自从 Kassanis 等^[1]在感染烟坏死病毒 (TNV) 的植株中发现卫星烟坏死病毒 (STNV) 以来, Kaper 等^[2]在感染黄瓜花叶病毒 (CMV) 的基因组中发现了一种伴随的低分子量 RNA——黄瓜花叶病毒伴随 RNA (CARNA-5)——卫星 RNA,很多学者对卫星 RNA 和卫星病毒的性质开展了研究^[3-5],结果表明,它们的复制都依赖于辅助病毒,又都降低辅助病毒的复制。

根据卫星 RNA 和卫星病毒依赖于病毒才能复制,并干扰辅助病毒复制、改变病毒的致病力、以及维持本身遗传性和具有株系特异性的性质,我们认为它们是侵染病毒的病毒^[6]。在试验中用 CMV 甜椒分离物的 RNAs 加入黄瓜花叶病毒伴随 RNA (CARNA-5) 组成了 CMV-S₂^[7],并已表明卫星 RNA 在植物病毒防治上的巨大潜力^[8,9]。

本文比较了 CMV 及 CMV-S₂ 的烟叶组织中各病毒基因组的双链核酸 (ds RNA) 的差别。为从分子水平上阐明卫星 RNA 大大减轻病毒在大部分寄主上引起的症状寻找依据。

材料和方法

(一) 病毒和寄主

所用不含卫星 RNA 的 CMV 为甜椒分离物;含卫星 RNA 的 CMV 是在甜椒分离物的 RNAs 中加入黄瓜花叶病毒伴随 RNA (CARNA-5) 组成的 CMV-S₂。寄主用对烟草花叶病毒有枯斑反应的三生烟 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi nc), 以防 TMV 污染。在防虫温室中幼苗长出 3—4 片真叶时,移到植物培养箱中,控制温度和光照 (20—25℃, 5000 Lux 连续光照),培养 2 天后,摘除植株顶芽,分为二组,用浓度为 1mg/ml 纯

本文于 1985 年 2 月 28 日收到。

CMV 及 CMV-S₂, 接种后,用水轻轻冲洗,放入植物培养箱中继续培养。

(二) 核酸的 ³H 尿嘧啶核苷标记

按前法^[11] 在接种后 1、3、5、7、9、11 和 13 天进行标记,继续培养,使标记的时间达 24 小时,每一标记样品为 3 g 接种叶片。

(三) 总核酸的提取

按前法^[11] 提取标记样品中的总核酸,测定其放射性计数,计算出粗核酸的总放射性。

(四) ³H-ds RNA_s 的纤维素柱层析分离

在粗核酸悬浮液中加入 0.1 ml 2-巯基乙醇,加无水乙醇至 15%,与 2g 微晶型纤维素 (E. Merck 公司) 混匀,4℃ 放置过夜,装柱后,先用含 15% 乙醇的 STE 缓冲液 (0.1M NaCl, 0.05 M Na₂ EDTA, pH7.0) 洗脱,待洗脱液中放射性计数可忽略不计时,再用 STE 缓冲液洗脱,分部收集,每管 2 ml,测定各管的放射性计数。合并含有放射性的洗脱液,加入 1/39 体积的 4M NaAc 和 3 倍体积的冷乙醇,-10℃ 放置过夜。10,000 r/min 离心 15 分钟,收集沉淀,干燥后悬浮在 1 ml E 缓冲液 (0.04 M Tris, 0.02 M 乙酸钠, 0.002 M Na₂EDTA, pH 7.8) 中。取 10 μl 测放射性计数,其余贮存于 -10℃,供分析 ds RNA 用。

(五) 病毒-³H ds RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳

按前法进行^[11],每一样品的放射性计数约在 15,000 cpm。

(六) ³H-ds RNA 的核酸酶处理

1. 在不同盐浓度下总 ds RNA 对 RNA 酶的抗性: 按前法^[11] 测定总 ds RNA 对 RNA 酶的抗性。在该反应体系中,含 10 μg RNA 酶 A 和 3 单位 RNA 酶 T1。

2. 总 ds RNA 的 DNA 酶和 RNA 酶处理: 分别用感染 CMV-S₂, 及 CMV 10 天的叶组织分离提取的 ³H ds RNA 各 3 份 (110 μl/份, 含 1/3 g 鲜叶的 ds RNA)。一份用 DNA 酶处理: 加 14 μl 80 mM MgCl₂, pH 6.8 (最终浓度为 8 mM), 16 μl DNA 酶 I (70 μg, 最终浓度为 0.5 mg/ml)。1 份用 RNA 酶处理: 加 40 μl E 缓冲液、40 μl 10×SSC (最终浓度为 2.5×SSC)、10 μl RNA 酶 (最终浓度为: 50 μg/ml RNA 酶 A+15 单位/ml RNA 酶 T1)。另一份作为对照,加 50 μl E

缓冲液、40 μl 10×SSC (最终浓度为 2.5×SSC), 混匀,在 33℃ 水浴中保温(对照和用 RNA 酶处理的样品均保温 30 分钟,用 DNA 酶处理的保温 90 分钟),立即加等体积的水饱和酚(含 0.1% 的 8-羟基喹啉),抽提 3 分钟,离心 (14,000r/min) 3 分钟。用上述酚液重复抽提上清液,再用重蒸乙醚洗 2 次 (1 ml/次),加 10 μl 4 M NaAc 和 450 μl 冷乙醇,在 -80℃ 放置 1h。然后离心 (10,000r/min) 20 分钟,用 70% 乙醇洗核酸沉淀物两次,真空抽干,悬浮在 15 μl E 缓冲液中,加 10 μl 指示剂 (0.05% 溴酚兰, 10% 蔗糖) 然后进行平板凝胶电泳 (2.2% 聚丙烯酰胺, 0.11% 甲叉双丙烯酰胺, 0.4% 琼脂糖)。胶板通过放射自显影,得到用 DNA 酶和 RNA 酶处理总 ds RNA 的结果。

(七) CMV 及 CMV-S₂ 中各组分的 ³H-ds RNA 的放射性测定

根据 ³H-ds RNA 放射自显影图谱,标出胶板中各 ds RNA 组份的相应位置,切割后,分别放入液体闪烁测量瓶中,空白胶集中在一瓶中,每瓶加 1—2 ml 30% 的 H₂O₂ (含 10 μl 浓氨水),在 55℃ 保温 24—36 小时,待胶溶化后,加 10 ml 二氧六环闪烁液,测其放射性计数,用单一样品的放射性计数除总样品放射性计数,得到 ds RNA 不同组份的百分率。

(八) ³H-ds RNA_s 的放射自显影

从感染 CMV-S₂, 或 CMV 2—14 天三生烟叶组织中分离到的 ds RNA 中,分别取出 56 μl (相当于 1/6g 鲜叶),加入 24 μl 指示剂,进行电泳,采用 E 缓冲液,先预电泳 1 小时,待样品进胶后继续电泳 (75 mA/150 V) 3 小时。将胶板浸在 10% 乙酸中固定 30 分钟,用蒸馏水洗 2 次,再将板胶浸在 1 M 水杨酸钠溶液 (pH 7.0) 中^[12], 40 分钟后,用新华 3 号滤纸贴在板胶的一面,80℃ 真空干燥 2 小时,在暗室中将干板胶压上 X 光软片和增感纸,装入暗盒,于 -70℃ 冰箱中放置 3—4 天,得到显示 ds RNA 不同组份分布的放射自显影图谱。

实验结果

(一) 卫星 RNA 对 CMV 侵染组织中 ³H-ds RNA 含量的影响

表 1 卫星 RNA 对 CMV 感染的组织中总 RNA、病毒 RNA 含量的影响

Table 1 Effect of satellite RNA on the content of total RNA and double-stranded viral RNA in CMV-infected tissues

接种后天数 Day after inoculation	RNA 总放射性/g 鲜叶 Radioactivity of total RNAs/g fresh leaf (cpm × 10 ⁻⁴)		STE 洗脱的 ds RNA 分部/g 鲜叶 ds RNA fraction by STE/g fresh leaf (cpm × 10 ⁻⁷)		抗 RNase 的 ds RNA 放射性/g 鲜叶 Radioactivity of RNase resistant RNAs/g fresh leaf (cpm × 10 ⁻⁷)		抗 RNA 酶的 ds RNA 放射性 (%) Radioactivity of RNase resistant dsRNA/radioactivity of total RNAs	
	CMV		CMV		CMV-S ₂₂		CMV	
	CMV-S ₂₂	CMV	CMV-S ₂₂	CMV	CMV-S ₂₂	CMV	CMV-S ₂₂	CMV
2	4.4	9.4	0.61	1.13	0.44	0.79	1.00	0.84
4	5.0	14.4	3.02	1.96	2.49	1.10	4.98	0.76
6	3.6	9.9	2.78	1.26	2.52	1.07	7.00	1.08
8	3.3	5.9	3.41	0.84	3.31	0.69	10.03	1.17
10	3.9	3.7	5.91	0.90	5.78	0.60	14.82	1.62
12	4.4	4.5	5.79	0.83	5.03	0.60	11.43	1.32
14	1.3	1.0	1.88	0.14	1.86	0.12	14.88	1.20

表 2 不同盐浓度下感染 CMV 和 CMV-S₂₂ 的叶组织中病毒的 ³H-ds RNA 对 RNA 酶的抗性

Table 2 Resistance of viral ³H-ds RNA in tobacco leaf tissues infected with either CMV or CMV-S₂₂ to RNase at different concentration of salt

盐浓度 Salt concn.	接种后天数 Day after inoculation	CMV-S ₂₂						CMV					
		+RNase (cpm)		-RNase (cpm)		+RNase (%)		+RNase (cpm)		-RNase (cpm)		+RNase (%)	
		CMV-S ₂₂	CMV	CMV-S ₂₂	CMV	CMV-S ₂₂	CMV	CMV-S ₂₂	CMV	CMV-S ₂₂	CMV	CMV-S ₂₂	CMV
0.1 × SSC	2	139	454	3.2	49	2587	1.9						
	4	36	4319	0.8	40	4477	0.9						
	6	33	4281	0.8	56	5193	1.1						
	8	22	6212	0.4	35	2713	1.3						
	10	9	4703	0.2	18	2322	0.8						
	12	18	8118	0.2	60	4707	1.3						
2.5 × SSC	2	30	5498	0.5	43	3077	1.4						
	4	2756	3081	72.9	1407	2114	66.6						
	6	5623	6817	82.5	2369	4219	56.1						
	8	7532	8322	90.5	5313	6273	84.7						
	10	6977	7186	97.1	2428	2957	82.1						
	12	11098	12174	97.8	1641	2451	66.9						
14	7734	8905	86.9	3035	4211	72.1							
		11011	11141	98.8	2064	2497	82.7						

1. RNase A: 50 μg/ml, RNase T1: 150 μ/ml; 反应总体积 200 μl, 33°C 保温 30 分钟 Total volume of reaction 200 μl, incubation at 33°C for 30 min.

2. 表中数据为二次试验平均值 Average of two experiments.

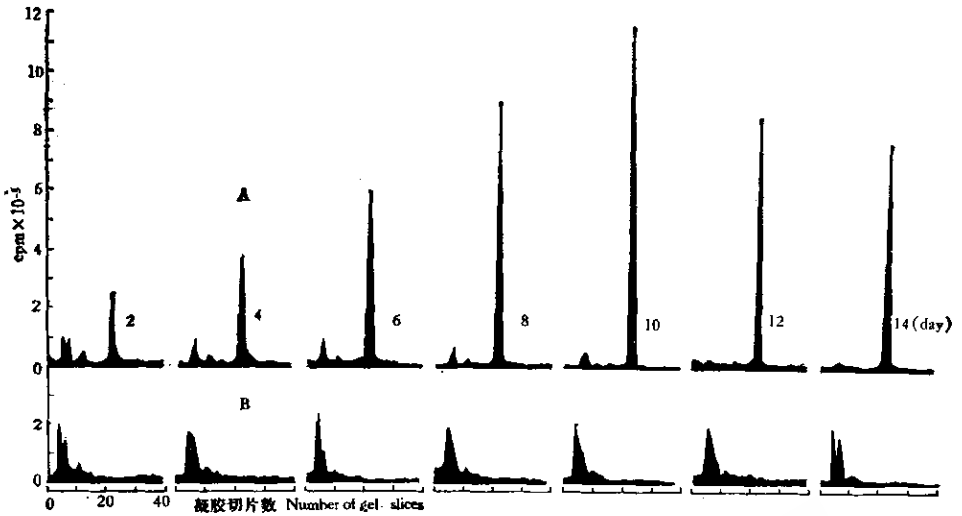


图1 接种 CMV-S₂₂ 和 CMV 样品中病毒 ³H-ds RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳
Fig.1 Polyacrylamide gel electrophoresis of viral ³H-ds RNA in the samples infected with CMV-S₂₂ and CMV A. CMV-S₂₂ ds RNA; B. CMV ds RNA

接种 CMV-S₂₂ 和 CMV 的植株,病症有明显不同,感染 CMV-S₂₂ 的植株不表现明显症状,生长正常;感染 CMV 的植株 6 天后出现系统花叶症状。表 1 列出总 RNA、病毒 ds RNA 和对 RNA 酶抗性分析结果。可以看出 CMV 侵染的组织中总 RNA 含量在接种后 2—8 天高于 CMV-S₂₂ 侵染的量,这反映了病毒的合成和积累。但 STE 洗脱的 ds RNA 含量和抗 RNA 酶的 ds RNA、CMV-S₂₂ 侵染的,在接种后 4—14 天都高于 CMV 侵染的,只是在接种后第 2 天 CMV 侵染的稍高,这也反映了病毒侵染初期的迅速合成。CMV-S₂₂ 病毒抗 RNA 酶的 ds RNA 对总 RNA 放射性始终高于 CMV 的百分率。

表 2 为在不同盐浓度下 CMV-S₂₂ 和 CMV 的 ds RNA 样品对 RNA 酶抗性的结果。在低盐浓度 (0.1×SSC) 时,ds RNA 均被 RNA 酶降解。在高盐浓度 (2.5×SSC) 下,ds RNA 具有较高的抗性。

(二) 病毒 ³H-ds RNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

为了解 CMV 和 CMV-S₂₂ 侵染组织中 CMV 基因组各组分 (RNA 1—4) 的 ds RNA 1—4 和卫星 ds RNA (ds RNA-5) 含量的变化,将感染病毒后不同天数、并经 STE 洗脱下来的 ³H-ds RNA 的样品 (取放射计数相同的样品) 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。从 ³H-ds RNA 放射性分布图谱 (图 1) 可见,二者 ds RNA 不同组分的放射性含量有明显不同。接种 CMV-S₂₂ 的样品随着接种后天数的延长,卫星 RNA 的 ds RNA 含量直线增长,第 10 天达到最高峰;而病毒基因组 RNA 的 ds RNA 1—4 的含量则随接种后时间的延长而降低,这一趋势一直延续到所测定的第 14 天。接种 CMV 的样品中,ds RNA 1—4 组分的放射性含量变化不大。

(三) CMV 和 CMV-S₂₂ 的 ³H-ds RNA 的放射自显影分析

使用水杨酸钠溶液处理凝胶可提高凝胶中 ³H 标记 ds RNA 的放射自显影能力。从放射自显影图谱 (图 2A、2B) 可看出,在接种 CMV-S₂₂ 和 CMV 的样品之间 ³H-ds

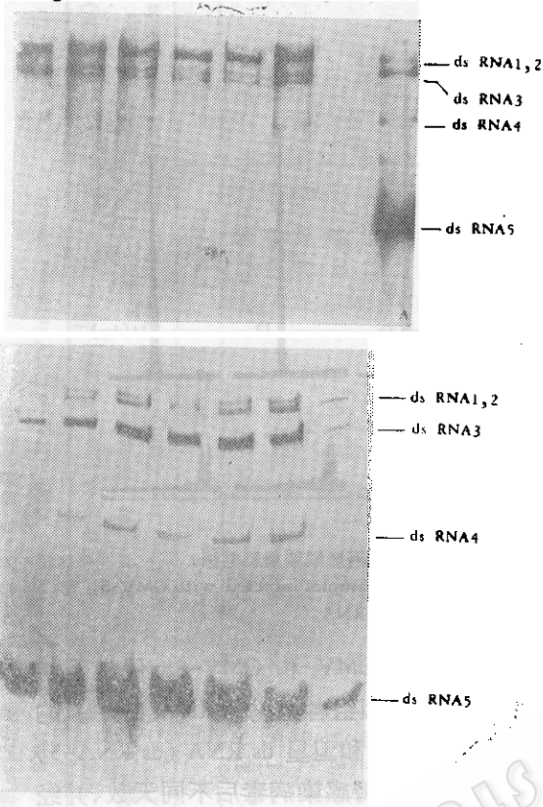


图 2 病毒 ³H-ds RNA 的放射自显影图谱
 A. 从左至右分别为接种 CMV 第 2、4、6……14 天及 CMV-S₂₂ 第 10 天的图谱
 B. 从左至右分别为接种 CMV-S₂₂ 等 14、12、10……2 天的图谱

Fig. 2 Radioautograph of viral ³H-dsRNA
 A. From left to right were infected with CMV on 2, 4, 6, ... 14th and CMV-S₂₂ 10th day B. From left to right were infected with CMV-S₂₂ on 14, 12, 10, ... 2th day

RNA 的组分及其放射性强度都有差异, CMV-S₂₂ 样品中含有较高放射性强度的 ds RNA₅, 随着接种后天数的延长, 不同组分的 ³H-ds RNA 的含量(即放射性强度)有明显的变化。在 ds RNA 4—5 之间出现一种少量的低分子量的 ds RNA, 可能是 ds RNA-5 的二聚物, 这与 Kaper^[43] 在研究含有卫星 RNA 的花生矮化病毒 (PSV) 及烟草坏死病毒 (TNV) 的 ds RNA 组分时得到的结果一致。CMV 样品中不同

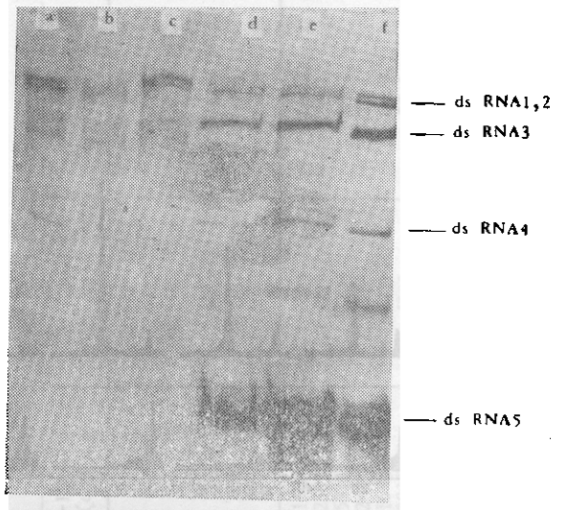


图 3 病毒的 ³H-ds RNA 经 DNA 酶或 RNA 酶处理后放射自显影图谱

Fig. 3 Radioautograph of viral ³H-ds RNA after treatment by DNase or RNase

a—c. 来自 CMV 的 ³H-dsRNA; d—f. 来自 CMV-S₂₂ 的 ³H-ds RNA; a, f. 用 DNA 酶处理; b, e. 用 RNA 酶处理; c, d. 未经酶处理

a—c. ³H-ds RNA from CMV; d—f. ³H-ds RNA from CMV-S₂₂ a, f. Treated with DNase; b, e. Treated with RNase c, d. Untreated

组分³H-ds RNA 的含量(即放射性强度)没有明显的变化, 在 ds RNA-3 的位置出现了两条放射自显影区带(暂标 ds RNA 3a 和 3 b)。

为了定量分析上述 ds RNA 组分和含量的关系, 测定了各³H-ds RNA 组分总³H-ds RNA 放射性强度的百分率(表 3), 可以看出, 接种 CMV-S₂₂ 样品中 ³H-dsRNA 1、2、3、4 的放射性强度呈现逐渐下降的趋势, 而 ³H ds RNA-5 的放射性强度逐渐提高。第 10 天的含量最高, 占总 ³H-ds RNA 放射性的 80.2%。接种 CMV 的样品中, ³H-ds RNA 1--4 各组分的放射性强度仍然处于近似的水平, 与图 1 的结果一致。

(四) CMV 和 CMV-S₂₂ 的 ³H-ds RNA 经 DNA 酶和 RNA 酶处理后放

表 3 感染 CMV 和 CMV-S₂₂ 的烟叶组织中各 ³H-dsRNA 组份占总 ³H-dsRNA 放射性强度的百分率
Table 3 Radioactivity percentage of viral ³H-ds RNA of the total dsRNA in tobacco leaf tissues infected with CMV or CMV-S₂₂

接种后 天数 Day after inoculation	凝胶中 ³ H-ds RNA 不同组份的放射性百分率 Radioactivity percentage of different component of ³ H-dsRNA on gel								
	CMV-S ₂₂					CMV			
	1+2	3	4	5	其它 another	1+2	3(a + b)	4	其它 another
2	19.7	20.0	11.1	32.1	17.1	32.7	39.5	17.6	10.1
4	13.4	27.3	8.3	44.0	7.1	40.1	41.8	15.0	3.0
6	7.2	14.3	5.3	66.2	7.0	47.1	36.1	11.5	5.3
8	7.9	10.9	4.6	69.2	7.4	51.7	29.5	13.0	5.8
10	6.3	8.5	2.8	80.2	2.3	52.3	31.4	12.7	3.6
12	9.0	5.1	2.4	76.1	7.5	43.1	37.4	15.2	4.3
14	7.0	3.0	3.5	65.0	21.5	48.1	29.1	17.3	5.5

射自显影

从感染 CMV 和 CMV-S₂₂ 叶组织中分离的 ³H-ds RNA 样品, 分别用 DNA 酶或 RNA 酶处理, 以不处理的作为对照, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后进行放射自显影(图 3), 进一步证实了 ds RNA 的存在。经 DNA 酶或 RNA 酶处理(分别为图 3-a, f 和 b, e) 与对照(图 3-c, d) 的放射自显影图谱基本相同, 图 3 还显示出二种样品的 ³H-ds RNA 含不同组分。

讨 论

卫星 RNA 能大大减轻病毒在大部分寄主上引起的症状。Kaper 和 Waterworth^[2] 曾证明在 CMV 和 CARNA-5 共同侵染的植物中, 病毒核蛋白的产量只有 CMV 单独侵染的 10—50%, 并伴随病毒基因组 RNA-5 含量对总 RNA 含量比例的大幅度下降, 并认为基因组 RNA 产量和比例的降低共同造成低病毒含量。我们得到了卫星 RNA 侵染的植株中 CMV 病毒颗粒的浓度只有 CMV 单独侵染时的 $\frac{1}{3} - \frac{1}{4}$ 或更低的结果。Kaper^[3]、Waterworth^[4] 和 Waterworth^[5] 还证明, CA RNA-5 的存在显著降低病毒中基因组 RNA 的相对比例,

导致病毒基因组 RNA 的含量比例的大大降低。本试验证明, 卫星 RNA 的侵染还降低寄主细胞中病毒基因组 RNA 的 ds RNA 含量, 而卫星 RNA 的 ds RNA 含量则比病毒基因组 RNA 的 ds RNA 含量高得多, 从接种后的第二天的 2.5 倍到第 14 天近 40 倍; 但不含卫星 RNA 的 CMV 接种后, 在所测定的 14 天内, 各基因组 RNA 的 ds RNA 含量比较恒定。

值得指出, 康良仪等^[11] 在研究感染具有单一基因组的番茄花叶病毒 (ToMV) 及其弱毒株 N₁₄ 的双链 RNA 一直较前者高的结论, 本文结果与此有相似之处。

本文只指出了感染 CMV 及带有卫星 RNA 的 CMV-S₂₂ 的叶组织中 ds RNA 含量有明显差异。要揭示作为病毒分子寄生生物的卫星 RNA 对病毒的“致病性”, 还须进行多方面研究。

参 考 文 献

- [1] Kassanis, B. and H. L. Nixon: *Nature*, 187: 713—714, 1960.
- [2] Kaper, J. M. et al.: *Prep. Biochem.*, 2: 251—267, 1972.
- [3] Kaper, J. M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72: 1237—1343, 1976.
- [4] Waterworth, H. E. et al.: *Science*, 204: 845—847, 1979.

- [5] Kaper, J. M. and H. F. Waterworth: Handbook of plant virus infections, Comparative Diagnosis, p. 257—332, 1981.
- [6] 田波等: 病毒学报, 1(2): 190—197, 1985.
- [7] 邱井生等: 微生物学报, 25(1): 87, 1985.
- [8] Tien Po and X. H. Chang: *Seed Sci. and Technol.*, 11: 969—972, 1983.
- [9] 田文会等: 植物病理学报, 15(3): 145—149, 1985.
- [10] Morris, T. J. and J. A. Dodds: *Phytopathology*, 68(8): 854—858, 1979.
- [11] 康良仪等: 微生物学报, 22(4): 327—332, 1982.
- [12] Chaberlain, J. P.: *Anal. Biochem.*, 98: 132—135, 1979.
- [13] Kaper, J. M.: *Virology*, 127: 230, 1983.

SATELLITE RNA AS A BIOLOGICAL CONTROL AGENT OF DISEASES CAUSED BY CUCUMBER MOSAIC VIRUS

III. EFFECT OF SATELLITE RNA ON THE CONTENT OF DOUBLE STRANDED VIRAL RNA IN CMV-INFECTED TISSUES

Yang Xicai Qin Bingyi Liang Xixian Tien Po

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

The changes in contents of double stranded RNA (ds RNA) in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi nc) leaves inoculated with cucumber mosaic virus (CMV) and its satellite RNA containing isolate CMV-S₃₂ were compared by analysis of ³H-uridine incorporation, resistance to RNase or DNase, polyacrylamide gel electrophoresis and radioautography. It was found that the content of satellite ds RNA in leaves tissues at 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14th day after inoculation with CMV-S₃₂ increased, whereas the contents of

viral genome ds RNA decreased. The satellite ds RNA content was much higher than the total viral genome ds RNA from 2.5 times at the second day, 20 times at 10th day and 40 times at 14th day after inoculation with CMV-S₃₂. There was no such large change in content of viral genome ds RNA in leaves tissues inoculated with CMV.

Key words

CMV; CMV-S₃₂; Viral genome ds RNA; Satellite ds RNA