

用电镜放射自显影术研究 TMV-RNA 在烟叶细胞中的复制

徐绍华 田颖川 覃秉益 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京)

在放线菌素 D (AMD) 抑制细胞 RNA 合成时, 用 ^3H -尿嘧啶核苷标记 TMV 侵染的和健康的烟草叶片, 经固定, 包埋, 切片, RNA 酶处理及放射自显影后, 在电镜下观察。结果表明, ^3H -尿嘧啶核苷向病毒基因组或其复制中间体的掺入主要发生在细胞核内, 叶绿体内有少量掺入, 线粒体内未发现有掺入。因此认为 TMV-RNA 的合成主要是在细胞核内进行的。切片如先经蛋白酶和 RNA 酶处理, 再进行放射自显影, 则自显影上的银粒几乎全部消失。从超薄切片后的剩余样品取小样, 用酚-SDS 法和 Serva 纤维素柱层析, 从 TMV 侵染的烟叶中分离到了抗 RNA 酶的 ^3H -ds-RNA。从而推测复制中间体在体内很可能主要是单链的, 其复制过程很可能不经过双链复制型 (RF)。提取到的 ^3H -ds-RNA, 可能是提取过程中的人为产物。

关键词 TMV-RNA; 烟草; 超薄切片放射自显影

不同病毒在细胞中的复制位置不同。例如, 烟草花叶病毒 (TMV), 其复制位置由于各研究者所用的试验方法不同, 得到了不同的结果^[1-6]。对于病毒 RNA 复制过程中是否存在双链复制型 (RF) RNA 仍有两种不同的看法^[7-11]。因此, 用不同方法, 从不同角度去研究病毒 RNA 的体内复制, 将有助于更准确的了解病毒复制机制。电镜超薄切片放射自显影, 避免了一系列提取步骤中可能产生的人为假像, 是一种在原位研究病毒复制的灵敏而准确的方法。Garnier 等人^[11], 已用此方法对 TYMV-RNA 的复制进行了研究。

在用放线菌素 D 抑制寄主 RNA 合成的条件下, 我们用 ^3H -尿嘧啶核苷标记感病的和健康的烟草叶片, 然后用超薄切片放射自显影方法, 对 TMV-RNA 的体内复制进行了探索。并根据用蛋白酶和 RNA 酶 A 处理超薄切片后放射自显影的结果, 对 TMV-RNA 合成中是否存在双链复制

型 (RF) 的问题进行了讨论。本文是国内首次利用电镜放射自显影术在植物病毒中作定位研究的报道。

材料与 方法

(一) 材料

核糖核酸酶 A (RNA 酶 A) 为 Serva 产品, 链霉菌蛋白酶 E 为 Sigma 产品, HW4 核子乳胶为中国科学院原子能研究所生产。其他试剂、病毒及寄主植物按方荣祥等^[12]的方法。

(二) 方法

1. 接种病毒和同位素标记:

接种病毒方法按田颖川等^[13]的方法。接种后一定时间采集叶片, 将叶柄插入一定体积的 0.4mg/ml 的 AMD 溶液中, 在 26°C 暗室内使每克叶组织吸收药量达 $40\mu\text{g}$ 。然后将叶片移至含有 AMD $20\mu\text{g/ml}$ 的 0.7% 的葡萄糖溶液中, 在暗室内继续培养 20 小时。然后将叶片移至 ^3H -尿嘧啶核苷溶液中, 标记量为 $100\mu\text{Ci/g}$ 叶组织。

本文于 1985 年 10 月 18 日收到。

本所曹家鳌同志参加部分工作。

待叶片将同位素溶液吸收完毕后,将叶片移至含 AMD $20\mu\text{g/ml}$ 的 0.7% 葡萄糖溶液中继续保温 6 小时。健康叶片按同法处理。最后将叶片的中脉去除后,用于电镜放射自显影和 ^3H -双链 RNA 的提取。

2. 叶片的固定、包埋和切片:

主要参照徐绍华^[14]方法进行,将标记后的叶片切成 1mm^2 左右小块,经 3% 戊二醛固定 2 小时,再经 2% 醋酸双氧铀固定 $1.5-2$ 小时,乙醇系列脱水,置换剂处理。以上各步均在 4°C 下进行。国产 618 树脂包埋, 40°C 下聚合 $100-120$ 小时, LKB-III 型超薄切片机切片。

3. 超薄切片的酶处理和放射自显影:

参照 Garandier 等人^[11]的方法进行酶处理。将载有切片的铜网漂浮在链霉蛋白酶 $\text{E } 1\text{mg/ml}$ 溶液上, 30°C 保温 20 分钟,然后用 $2\times\text{SSC}$ 缓冲液 $\text{pH } 7.2$ 冲洗 3—5 次,将洗过的铜网移至含 $110\mu\text{g/ml}$ RNA 酶 A 的 $2\times\text{SSC}$ 溶液中含 DNA 酶 10.5mg/ml 的 8mM MgCl_2 , $\text{pH } 6.8$ 溶液中, 30°C 保温 90 分钟。最后用无菌水洗 3—5 次,不用酶处理的切片在同样条件下,用无菌水和 $2\times\text{SSC}$ 处理作为对照。

将以上铜网固定在载玻片的一端,在暗室内将 HW4 核子乳胶按等体积比,用重蒸馏水在 45°C 水浴中融化,经冰浴片刻后使乳胶液温度平衡到 30°C ,用套环法铺胶膜,稍干后将载片放入装有变色硅胶的暗盒中,在 4°C 下曝光一个月。按丁明孝等^[12]的方法显影、定影、再经电镜双染色,在日立 H-500 型电镜下观察。

4. ^3H 标记的双链 RNA(ds-RNA) 的提取及抗 RNA 酶试验:

超薄切片剩余的样品去中脉后称重,在液氮中研成粉状。按每克叶组织加 1ml 提取缓冲液 (0.1M Tris-HCl, $\text{pH } 9.0$, 5mM EDTA, 0.4mM NaCl, 0.5% SDS), 1ml 酚-氯仿 (1 体积氯仿与 1 体积含 0.1% 8-羟基喹啉的酚) 混合液研磨 10 分钟后, $4,000\text{r/min}$ 离心 10 分钟后,取上相。酚抽提重复两次,最后的水相中加 $1/10$ 体积的 3M NaAc, $\text{pH } 4.0$, 2.5 倍体积乙醇沉淀过夜。 $10,000\text{r/min}$ 离心 10 分钟后将沉淀溶于一定体积的 STE 缓冲液^[12]。按方荣祥等^[12]的方法通过两次 Serva 纤维素柱层析分离 ^3H -ds-RNA,并测它对 RNA 酶 A 的抗性。

结果与讨论

(一) TMV-RNA 在细胞内合成的位置

在病毒侵染的早期阶段,不少植物 RNA 病毒的复制受 AMD 的抑制^[13,16,17],但随着接种病毒到用 AMD 处理的间隔时间的延长,这种抑制作用很快减弱,大约 8 小时后就完全消失。AMD 对寄主 DNA 转录的抑制则没有这一时间上的相关性,所以在病毒的侵染后期,AMD 对病毒 RNA 复制往往表现出一定的刺激作用^[13]。我们利用这一特点,在 TMV 侵染烟草叶片后 24 小时或 5 天取样进行超薄切片放射自显影处理,以观察 TMV-RNA 的复制位置,图版 I-3、4 为 TMV 侵染 6 天后的超薄切片放射自显影照片。图版 I-2 中可见在用 AMD 处理的健叶组织中,放射性同位素产生的银粒很少,表明在该试验条件下,寄主 RNA 的合成几乎完全被抑制,这与以前的结果是一致的^[13]。从图版 I-1、4 中可见在病毒侵染的细胞中,银粒主要集中在细胞核部分,叶绿体也有一些,线粒体中则未见银粒。在细胞质中的病毒颗粒有少量银粒(见图版 I-3)。

从表 1 的结果可看出这种银粒分布的趋势,在病叶放射自显影电镜照片上每个细胞核的银粒平均为 22.7 个,在叶绿体只有 4.6 个,而在线粒体则没有发现银粒(见表 1)。

在接种 TMV 6 天左右,病毒在大部分感病细胞中已开始大量复制^[18],此时病毒 RNA 合成水平也很高。因此,在用 AMD 抑制寄主 RNA 合成的条件下, ^3H -尿嘧啶核苷主要掺入到细胞核中。这一事实说明 TMV-RNA 的合成很可能是在细胞核中进行的,进一步证实了 Reddi^[2]提出的 TMV-RNA 在细胞核中合成的模

表 1 侵染 TMV 的烟叶超薄切片酶处理

Table 1 Enzyme treatment of ultrathin sections from tobacco leaves infected with TMV

细胞器 Organelles	细 胞 核 Nuclei		叶 绿 体 Chloroplasts		线 粒 体 Mitochondria	
	+RNA 酶	-RNA 酶	+RNA 酶	-RNA 酶	+RNA 酶	-RNA 酶
处 理 Treatment						
细 胞 器 数 Number of organelles	12	39	44	13	38	63
银 粒 数 Number of silver grain clusters	1	204	3	60	0	0
每个细胞器上的平均银粒数 Average number of silver grains per organelle	0.08	22.7	0.07	4.6	0	0

注：表中的数据来自接种 TMV 48 小时，³H-尿嘧啶核苷标记 6 小时的烟叶超薄切片放射自显影结果。
The data used here is obtained from counting on the autoradiograms of ultrathin sections of tobacco leaves 48h after TMV infection having incorporated ³H-uradine for 6 h.

式。

在 TMV 侵染的细胞中，叶绿体往往向细胞核靠近，所以在此胞器上发现的银粒可能反应了它在病毒复制中的一些作用，如病毒的装配有可能在此进行^[9]。在被认为是 TMV-RNA 复制型 (RF) 及 TMV-RNA 复制酶所结合的场所——线粒体上^[4,5] 没有发现任何银粒，所以不能认为病毒 RNA 是在此合成。在胞质中能发现大量病毒颗粒 (图版 I-3)，说明病毒在细胞中的复制是很活跃的，病毒颗粒的银粒反应了在细胞质内有一些新合成的 ³H-TMV-RNA 已装配成完整的病毒颗粒出现。

(二) ³H-尿嘧啶核苷标记物对 RNA 酶 A 的敏感性

参照 Garnnier 等人^[11]的方法，我们用链霉菌蛋白酶 E 处理超薄切片，以水解 RNA 复制复合体中的 RNA 复制酶及有关蛋白因子，然后用 RNA 酶 A 处理，经放射自显影后，在电镜下观察 ³H-尿嘧啶标记物对 RNA 酶 A 的敏感性。同时用 DNA 酶 I 代替 RNA 酶 A 处理，以进一步确定标记物 RNA 性质。图版 II 是用上述酶处理

后的放射自显影结果。因为一般认为病毒侵染叶片 48 小时后，组织内的双链 RNA 合成水平最高，所以这里用作酶处理的切片都是来自 TMV 侵染 48 小时后的叶片。病毒侵染 48 小时后，核酸的复制，与病毒侵染 6 天的情况相同，TMV-RNA 的合成均在细胞核内(图版 I-1 和图版 II-5)。经 DNA 酶处理后(图版 II-7) 核内的银粒没有受到影响，说明该标记物是病毒特异的 RNA。当切片用链霉菌蛋白酶 E 和 RNA 酶处理后，在细胞核内和叶绿体内的银粒几乎全部消失(分别比较图版 II-5 和 II-6 及图版 II-8 和 II-9)。从表 1 的结果更可看出，³H 标记物所形成的银粒对 RNA 酶 A 处理非常敏感。细胞核部分的银粒经 RNA 酶 A 处理的只占未处理的 0.4%，在叶绿体的银粒经 RNA 酶 A 处理的只占未处理的 1.5%。以上结果表明，病毒 RNA 在体内合成过程中，其复制中间体对 RNA 酶 A 敏感，表明 TMV-RNA 复制中间体 (RI) 在体内很可能是以单链形式存在。

当用酚-SDS 法提取 RNA 后，经 Serva 纤维素柱层析^[12]分离纯化双链 RNA。图 1 可见，从用于超薄切片的同一组病叶组

表 2 TMV 感染的烟叶中 ³H-ds-RNA 对 RNA 酶的抗性

Table 2 RNase resistance of ³H-ds-RNA extracted from TMV-infected tobacco leaves

试 验 Expt.	+RNA 酶 +RNase (cpm)	-RNA 酶 -RNase (cpm)	$\frac{+RNA 酶}{-RNA 酶} \%$	$\frac{+RNase}{-RNase} \%$
I	1652	2214		74.6
II	606	763		79.4

注：试验 I 用的 ³H-ds-RNA 为接种 6 天的烟叶提取物。试验 II 的样品为接种 48 小时的烟叶提取物。酶反应总体积为 50μl，包括 5μl³H-ds-RNA。

RNase resistance of ³H-ds-RNA was determined under high ionic strength (2×SSC) as described in Materials and Methods. ³H-ds-RNA in Expt. I was extracted from tobacco leaves 6 days after TMV inoculation and that of Expt. II was 48 h after TMV inoculation. The total volume of reaction mixture was 50 μl including 5 μl of ³H-ds-RNA.

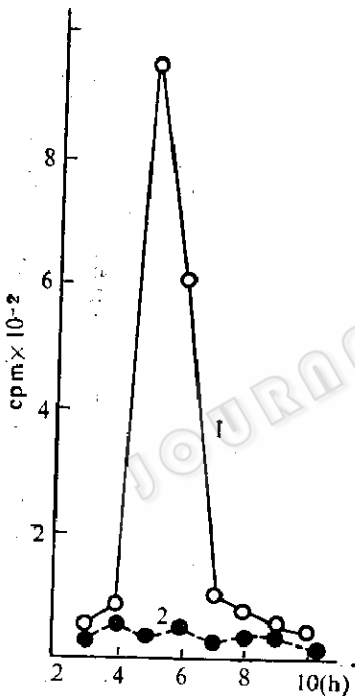


图 1 分离 ³H-ds-RNA 的第二次 Serva 纤维素柱层析图(图中只绘出用 STE 缓冲液洗脱峰)

Fig. 1 Profile of second Serva cellulose chromatograph (only the elution peak of STE buffer wash was shown)

1. 感染 6 天后的烟叶中 ds-RNA 的洗脱峰。
³H-ds-RNA from tobacco leaves 6 days after TMV infection.
2. 健康烟叶中 ³H-RNA 的洗脱峰。
³H-RNA from healthy tobacco leaves.

强度下,此 ds-RNA 75% 以上是抗 RNA 酶的(表 2)。在健叶中未分离到 ³H-ds-RNA,进一步说明在接种 TMV 的烟叶中 ³H-尿嘧啶的掺入是病毒特异的。

在寄主体内病毒 RNA 复制中间体对 RNA 酶敏感,而提取到的 ds-RNA 则抗 RNA 酶,这反映了后者很可能是提取过程中的人为产物,它可能是由单链形式的复制中间体的两条互补链在提取条件下结合在一起而形成的,这与 Garnnier 等人^[1]的结果是一致的。

用超薄切片放射自显影方法研究病毒复制无需经过提取步骤,能在细胞原位观察,从而避免了提取过程中产生人为假象的可能。在病毒体内复制研究工作中,它是一种灵敏度很高的方法,但由于能观察的细胞数目有限,该法也还存在一定的局限性。如能增加病毒的侵染率,使用原生质体系,以及尽可能多的观察细胞切片,将会提高该法的准确度,这有待于进一步研究。总之,超薄切片放射自显影与细胞生化方法相结合,对研究病毒复制是一个很有希望的方法。

参 考 文 献

[1] Bald, J. G.: *Virology*, 22: 377—387, 1964.

织中,确实提取到 ³H-ds-RNA。在高离子

- [2] Reddi, K. K.: *Adv Virus Res.*, **17**: 51—94, 1972.
- [3] Smith, S. H. and D. E. Schlegel: *Virology*, **26**: 180—189, 1965.
- [4] Jackson, A. O. et al.: *Virology*, **45**: 182, 1971.
- [5] Bradly, D. W. and M. Zaitlin: *Virology*, **45**: 192—199, 1971.
- [6] Ralph, R. K. et al.: *Virology*, **43**: 713—716, 1971.
- [7] Ralph, R. K. and M. F. Clark: *BBA*, **119**: 29—36, 1966.
- [8] Derrick, K. S.: *Science*, **199**: 538—539, 1978.
- [9] Kell, T. V. and P. M. Hofhneider: *BBA*, **312**: 297—310, 1973.
- [10] Thach, S. S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**: 2549—2553, 1974.
- [11] Garnier, M. et al.: *Virology*, **104**: 357—374, 1980.
- [12] 方荣祥等: *中国科学*, **10**: 1005—1016, 1979.
- [13] 田颖川, 王圻楷: *微生物学报*, **22**(4): 316—320, 1982.
- [14] 徐绍华: *植物病理学报*, **13**(2): 5—8, 1983.
- [15] 丁明孝, 翟中和: *电子显微学报*, **1**: 62, 1982.
- [16] Rottier, P. J. M. et al.: *Virology*, **92**: 299—303, 1979.
- [17] Dawson, W. O.: *Intervirology*, **9**: 304, 1978.
- [18] Murakishi, H. H. et al.: *Virology*, **43**: 62—68, 1971.
- [19] Zaitlin, M.: *Virology*, **58**: 743—757, 1958.

STUDY OF TMV-RNA REPLICATION IN TOBACCO LEAF CELLS BY AUTORADIOGRAPHY OF ULTRATHIN SECTIONS

Xu Shaohua Tian Yingchuan Qin Bingyi Mang Keqiang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The incorporation of ^3H -uridine into TMV-infected or healthy tobacco leaves was carried out for 6 h under the conditions when the cellular RNA synthesis was inhibited by actinomycin D (AMD). After fixing, embedding, sectioning of the leaves, the sections were treated with enzymes prior to autoradiography and observed in electron microscope. The results showed that the incorporation of ^3H -uridine into viral genome or its replicative intermediate occurred mainly in nuclei. Incorporation of a small amount of the isotope into chloroplasts was also observed, but not in mitochondria. Thus, it is suggested that the site of TMV-RNA synthesis in cells might be mainly in the nuclei. The silver grain clusters on the autoradiograms almost completely disappeared if the sections were treated with

pronase E and RNase A prior to autoradiography. In the contrast, ^3H -ds-RNA resistant to RNase A was isolated by phenol-SDS extraction and Serva cellulose chromatography from the remaining leave tissues used in autoradiography of ultrathin sections. It was, therefore, deduced that the replicative intermediate of TMV-RNA most likely to be mainly single-stranded in vivo and the replicative form RNA (RF) may not be involved in viral RNA replication and thus the extracted ^3H -ds-RNA would probably be an artifact of extraction.

Key words

In viro replication of TMV-RNA; Tobacco; Autoradiography of ultrathin sections

图 版 说 明

Explanation of plates

图 版 I

健康的和接种 6 天后的烟叶超薄切片放射自显影图。1、3、4. TMV 侵染的叶片；2. 健康叶片。N: 细胞核；V: 病毒颗粒；M: 线粒体；CL: 叶绿体。

图 版 II

超薄切片经酶处理后的放射自显影图。接种 TMV 48 小时后烟叶的超薄切片；5、8. 未经酶处理；6、9. 经 RNA 酶 A 处理；7. 经 DNA 酶处理。NU: 核仁。

Plate I

Autoradiograms of ultrathin sections of healthy tobacco leaves and tobacco leaves 6 days after TMV infection. 1, 3, 4. TMV infected cells; 2. Healthy tobacco leave cells. N: Nucleus; V: Virus particles; M: Mitochondrium; CL: Chloroplast.

Plate II

Autoradiograms of ultrathin sections after enzyme treatment. Ultrathin sections from tobacco leaves 48 h after TMV infection. 5, 8. Without enzyme treatment; 6, 9. Treated with RNase A; 7. Treated with DNase I. NU: Nuclolus.