

## $\alpha$ -鹅膏蕈碱对绒毛烟斑驳病毒及其拟病毒复制的影响

吴建国 卢文筠

(武汉大学病毒研究所, 武汉)

田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京)

在接种了绒毛烟斑驳病毒 (VTMoV) 的原生质体培养物中加入  $50\mu\text{g/ml}$  的  $\alpha$ -鹅膏蕈碱和  $10\mu\text{Ci/ml}$  的  $^3\text{H}$ -尿嘧啶核苷, 培养 72 小时后, 从感病的原生质体内提取核酸, 然后对核酸进行凝胶电泳分析并测定  $^3\text{H}$ -放射性, 以此探讨  $\alpha$ -鹅膏蕈碱对绒毛烟斑驳病毒壳内拟病毒 RNA 复制的作用。结果表明, 拟病毒 RNA 的复制不受该抑制剂的影响。用酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 测定从感病的原生质体内提取的病毒颗粒, 表明  $\alpha$ -鹅膏蕈碱对绒毛烟斑驳病毒的复制无影响。本文还对拟病毒 RNA 的复制机制进行了探讨。

**关键词** 拟病毒; 绒毛烟斑驳病毒; 复制

在真核细胞中, 低浓度和高浓度的  $\alpha$ -鹅膏蕈碱能分别选择性地抑制依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶 II 和酶 III 的作用, 对聚合酶 I 的作用无影响<sup>[1-3]</sup>, 抑制剂与酶结合影响 RNA 链的延伸<sup>[4,5]</sup>。类病毒如黄瓜白果类病毒 (CPFV) 的复制受低浓度 ( $50\mu\text{g/ml}$ ) 的  $\alpha$ -鹅膏蕈碱的抑制, 但在同样条件下, 普通植物病毒如烟草花叶病毒 (TMV) RNA 的复制不受影响<sup>[6]</sup>。

绒毛烟斑驳病毒 (VTMoV) 的基因组是由两种 RNA 分子组成。一种是分子量为  $1.5 \times 10^6$  的线性单链 RNA, 称 RNA<sub>1</sub>; 另一种是分子量为  $0.12 \times 10^6$  的环状单链 RNA, 称 RNA<sub>2</sub> 或称拟病毒 (Virusoid)<sup>[7]</sup>。拟病毒与类病毒二级结构相似, 也是一种单链闭环 RNA 通过自身折叠形成分子内部高度碱基配对区与单链环区相间的棒状结构<sup>[8]</sup>。除了环状结构外, 拟病毒还可形成一种线性单链结构, 这种线性分子, 称 RNA<sub>3</sub><sup>[7]</sup>。令人费解的是拟病毒和类病毒虽然结构及某些理化性质相似, 但生物学功

能却不相同<sup>[9]</sup>。

我们在建立了克里夫兰烟 (*Nicotiana clevelandii* A. Gray) 叶肉原生质体细胞体系及探讨了 VTMoV 在该细胞体系中增殖的特征后<sup>[10]</sup>, 进一步研究  $\alpha$ -鹅膏蕈碱对 VTMoV 及其拟病毒 RNA 在原生质体内复制的影响, 试图鉴别拟病毒与类病毒复制的酶机制的异同, 以进一步探讨拟病毒的本质。

### 材料和方法

#### (一) 病毒及其核酸的分离提纯

VTMoV 由澳大利亚 Francki 博士赠送。按前法<sup>[10]</sup>分离提纯病毒。

取 2ml, 经过蔗糖密度梯度超离心进一步提纯的病毒悬液加入 0.8 ml 10% SDS, 6 ml 含 0.1% 8-羟基喹啉的水饱和酚, 5ml 缓冲液 ( $40\text{mmol/L}$  tris-HCl, pH8.5,  $5.2\text{mmol/L}$  EDTA,  $200\text{mmol/L}$  NaCl) 处理后,  $8,000\text{ r/min}$  离心 10 分钟, 上清液用乙醚洗三次, 再用乙醇沉淀, 核

本文于 1986 年 4 月 16 日收到。

酸干燥后溶于 500 $\mu$ l 含 0.1mmol/L EDTA 的无菌水中,置 -10 $^{\circ}$ C 保存,作为标准核酸样品用。

## (二) 原生质体的接种、同位素标记和 $\alpha$ -鹅膏蕈碱处理

选择克里夫兰烟的叶肉作为原生质体的来源。按前法<sup>[10]</sup>进行原生质体的制备、接种和培养。

参照 Muhlbach 等<sup>[4]</sup>的方法,在接种后的 8ml 原生质体悬液中 ( $4 \times 10^5$  原生质体/ml) 加入 10  $\mu$ Ci/ml 的  $^3$ H-尿嘧啶核苷(中国科学院上海原子核研究所,比活 21 Ci/ $\mu$ mol, 浓度 1mCi/ml) 和 50 $\mu$ g/ml 的  $\alpha$ -鹅膏蕈碱 ( $C_8H_{10}N_4O_6S$ , MW 919) 对照样品中不加抑制剂。在 28 $^{\circ}$ C, 1,000 Lux 连续人工光照条件下培养。

## (三) 从感染的原生质体内提取核酸

取上述培养 72 小时(病毒指数生长末期)的原生质体,经 -80 $^{\circ}$ C 冷冻过夜后,用 0.8ml 10% SDS、60 $\mu$ l  $\alpha$ -巯基乙醇、6 $\mu$ l 含 0.1% 8-羟基喹啉的水饱和酚、4ml 氯仿和戊醇混合液 (25:1) 处理。然后按常规方法提取核酸。

## (四) 核酸复制产物的分析

参照康良仪等<sup>[11]</sup>的方法,用 2% 聚丙烯酰胺和 0.3% 琼脂糖凝胶电泳对上述提取的核酸样品进行分析。每管上样量为 15,000cpm,以从纯化的病毒中提取的核酸作为参照物。电泳后,标准核酸的凝胶用甲苯胺蓝液染色定位,将标记核酸的凝胶切成约 2mm 厚的薄片,然后在 EN 8312 液体闪烁仪上测定各样品的  $^3$ H-放射活性。根据计数绘制出  $^3$ H-放射活性分布图。

## (五) 病毒颗粒的提取和定量测定

按照实验需要,在不同时间内,取经抑制剂处理的或未经处理的感病原生质体,再按前法<sup>[10]</sup>从感染的原生质体内提取病毒颗粒并且对病毒进行 ELISA 定量测定。然后绘制出病毒在原生质体内的增殖曲线。

# 结 果

## (一) $\alpha$ -鹅膏蕈碱对拟病毒 RNA 复制的影响

在接种了 VTMoV 的克里夫兰烟原生质体培养物中加入 50 $\mu$ g/ml 的  $\alpha$ -鹅膏蕈

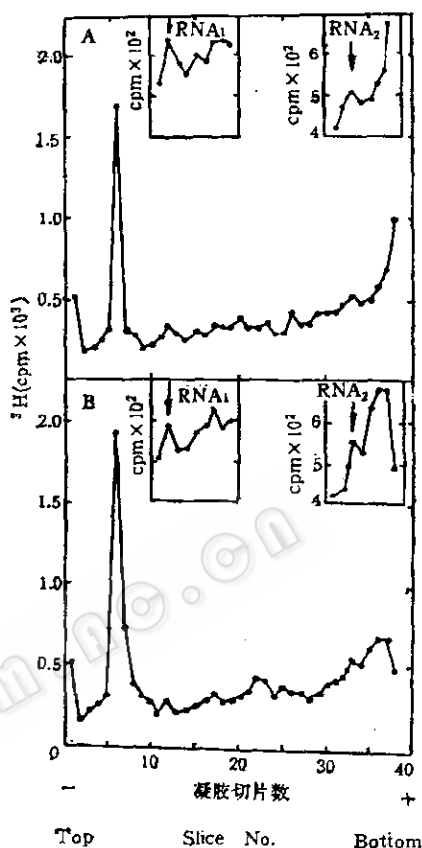


图1 感染 VTMoV 的克里夫兰烟原生质体内可溶性 RNA 的凝胶电泳分析

- A. 不加  $\alpha$ -鹅膏蕈碱  
B. 加 50 $\mu$ g/ml 的  $\alpha$ -鹅膏蕈碱

Fig. 1 Analysis of the soluble RNAs from VTMoV-infected *N. clelandii* protoplasts on gel electrophoresis

- A. No  $\alpha$ -amanitin was added  
B. 50 $\mu$ g/ml  $\alpha$ -amanitin was added

碱和 10 $\mu$ Ci/ml 的  $^3$ H-尿嘧啶核苷,对照试验不加抑制剂而加等体积的培养液。培养 72 小时后,对从原生质体内提取的核酸进行电泳分析并测定其  $^3$ H-放射活性,绘制出  $^3$ H-放射活性分布图(图 1)。参照标准核酸的电泳位置(图 2),可见在不加抑制剂的样品分布图中,在 RNA<sub>1</sub> 和 RNA<sub>2</sub> 的相应位置上分别有两个峰,在加有抑制剂的样品分布图上,也同样出现两个峰。说

表 1  $\alpha$ -鹅膏蕈碱对 VTMoV RNAs 在原生质体内复制的影响

Table 1 Effect of  $\alpha$ -amanitin on replication of VTMoV RNAs in protoplasts

$\alpha$ -鹅膏蕈碱 $\alpha$ -amanitin ( $\mu\text{g/ml}$ )	总 RNA Total RNA		类似病毒 RNA Virus-like RNA		拟病毒 RNA Virusoid RNA	
	cpm	抑制率 Inhibition (%)	cpm	抑制率 Inhibition (%)	cpm	抑制率 Inhibition (%)
0	18621	—	323	—	510	—
50	16029	14.0	290	11.0	538	0

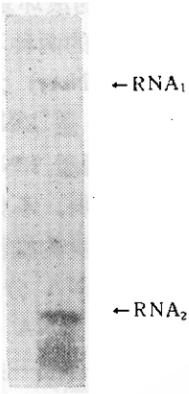


图 2 VTMoV RNA 制备物的聚丙烯酰胺凝胶电泳  
RNA<sub>1</sub>: 类似病毒 RNA; RNA<sub>2</sub>: 拟病毒 RNA  
Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of  
VTMoV RNAs  
RNA<sub>1</sub>: Virus-like RNA; RNA<sub>2</sub>: Virusoid RNA

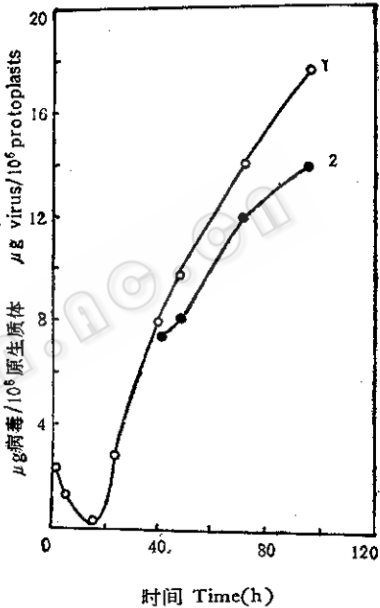


图 3 VTMoV 在原生质体内的增殖曲线  
1. 不加  $\alpha$ -鹅膏蕈碱  
2. 加 50  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -鹅膏蕈碱  
Fig. 3 The multiplication curves of VTMoV in  
protoplasts  
1. Without  $\alpha$ -amanitin  
2. 50  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha$ -amanitin was added

明  $\alpha$ -鹅膏蕈碱对 RNA<sub>1</sub> 和 RNA<sub>2</sub> 的复制无抑制作用。从放射性计数(表 1)上,也可以计算出拟病毒 RNA 的复制不受  $\alpha$ -鹅膏蕈碱的抑制。

(二)  $\alpha$ -鹅膏蕈碱对 VTMoV 病毒颗粒增殖的影响

用 50  $\mu\text{g/ml}$  的  $\alpha$ -鹅膏蕈碱处理感染 VTMoV 的原生质体, 分别在培养后的第 40、48 和 72 小时取样。对照试验不加抑制剂, 分别在培养后的第 0、6、16、24、40、

48 和 72 小时取样。用 ELISA 测定从原生质体培养物中提取的病毒颗粒, 作出病毒增殖图(图 3)。图中两条增殖曲线之间差异不大。从测定的病毒量(表 2)也可以计算出两者仅相差 5—16%。表明  $\alpha$ -鹅膏蕈碱对 VTMoV 病毒颗粒的增殖无抑制作用。

表 2  $\alpha$ -鹅膏蕈碱对 VTMoV 在原生质体内增殖的影响Table 2 Effect of  $\alpha$ -amanitin on multiplication of VTMoV in protoplasts

培养时间 Incubation time (h)	对照* Control*	$\alpha$ -鹅膏蕈碱* $\alpha$ -amanitin* (50 $\mu$ g/ml)	抑制率 Inhibition (%)
40	0.78	0.74	5.2
48	0.96	0.80	16.7
72	1.40	1.19	15.0

\* 数字表示用 ELISA 测定的感病原生质体内的病毒量 ( $\mu$ g 病毒/ $10^6$  原生质体)。

\* All figures are expressed as the amount of virus in infected protoplasts analysed by ELISA ( $\mu$ g virus/ $10^6$  protoplasts).

## 讨 论

在高等植物体细胞中存在两类 RNA 合成酶系统,一类是依赖于 RNA 的 RNA 复制酶<sup>[12,13]</sup>,另一类是依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶<sup>[14]</sup>。后者又有三种功能不同的酶,分别称为 RNA 聚合酶 I、酶 II 和酶 III。类病毒的复制是借助寄主细胞中依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶 II 进行<sup>[6,15]</sup>。我们的试验结果表明  $\alpha$ -鹅膏蕈碱对 VTMoV 及其拟病毒 RNA 在原生质体内的复制均无抑制作用,而在相同浓度下,抑制剂对黄瓜白果类病毒 (CPFV) 在原生质体内复制的抑制达 76%<sup>[6]</sup>。说明拟病毒与类病毒在复制机制上存在某种差异。由于  $\alpha$ -鹅膏蕈碱能抑制 RNA 聚合酶的作用,所以推测拟病毒的复制不是借助寄主细胞中依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶而是借助依赖于 RNA 的 RNA 复制酶进行的。Chu 等<sup>[16]</sup>也推测 RNA 复制酶参与了拟病毒的合成。另外 Rohozinski 等证实感染 VTMoV 的植株中的 RNA 复制酶能够合成具有拟病毒 RNA 复制中间体性质的双链 RNA。

比较严格的分子杂交实验已证实,拟病毒复制的模板,不是寄主细胞的 DNA 或 RNA,而是拟病毒 RNA 本身<sup>[17]</sup>。另外,人们还推测拟病毒 RNA 复制方式类

似于 Q $\beta$  噬菌体的滚环复制方式<sup>[16,18,19]</sup>。关于拟病毒 RNA 的两种不同的物理结构分子 (RNA<sub>2</sub> 和 RNA<sub>3</sub>) 之间的关系,也有证据表明 RNA<sub>3</sub> 是 RNA<sub>2</sub> 的前体,也就是说 RNA<sub>2</sub> 是通过 RNA<sub>3</sub> 环化而成<sup>[16]</sup>。

根据现有资料,不妨对拟病毒 RNA 的复制机制作初步的推测:拟病毒的复制以自身侵染性 RNA 分子为模板,借助寄主细胞内依赖于 RNA 的 RNA 复制酶,以滚环复制方式合成一条高分子量多拷贝的负链 RNA。再以负链为模板合成一系列大小不等的正链 RNA 分子,形成双链复制中间体。然后从复制中间体上产生线性单链 RNA<sub>3</sub> 分子,在 RNA 连接酶的作用下,RNA<sub>3</sub> 环化成 RNA<sub>2</sub> 分子。

必须指出,这种推测尽管有根据,但并不是最后定论。要想进一步确定拟病毒的复制机制,就必需要用适当的酶(最好是用寄主细胞来源的依赖于 RNA 的 RNA 复制酶)对拟病毒进行体外复制研究。但这无妨于我们认为拟病毒与类病毒尽管结构类似,但在本质上、生物学功能上和复制机制上却存在差异。关于这种结构相似而功能不同的生物学问题有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Lindell, T. J. et al.: *Science*, **170**: 447, 1970.
- [2] Weinman, R. et al.: *Proc. Natl Acad. Sci. USA*.

- 71: 1790—1794, 1974.
- [3] Zylber, E. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2861—2865, 1971.
- [4] Kadinger, C. et al.: *Biochem. Bioph. Res. Commun.*, 38(1): 165—171, 1970.
- [5] Rott, R. et al.: *Nature*, 223: 56, 1970.
- [6] Randles, J. W. et al.: *Virology*, 108: 111—122, 1981.
- [8] Haseloff, J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, 10(12): 3681—3691, 1982.
- [9] Gould, A. R. et al.: *Virology*, 110: 420—426, 1981.
- [10] 吴建国等: *微生物学报*, 25(3): 221—226, 1985。
- [11] 康良仪等: *微生物学报*, 22(4): 372—378, 1982。
- [12] Ikegami, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 2122—2124, 1978.
- [13] Romaine, C. P. et al.: *Virology*, 86: 241—253, 1978.
- [14] Duda, C. T.: *Ann. Rev. Pl. Physiol.*, 27: 119—132, 1976.
- [15] Rackmitz, H. R. et al.: *Nature*, 291: 297—301, 1981.
- [16] Chu, P. W. G. et al.: *Virology*, 126: 480—492, 1983.
- [17] Gould, A. R. et al.: *Virology*, 109: 137—147, 1981.
- [18] Kiefer, M. C. et al.: *Virology*, 121: 262—266, 1982.
- [19] Branch, A. D. et al.: *Science*, 223: 450—455, 1982.

## THE EFFECT OF $\alpha$ -AMANITIN ON REPLICATION OF VTMOV AND ITS VIRUSOID

Wu Jianguo Lu Wenjun

(Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan)

Tien Po

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The protoplast suspension which infected with velvet tobacco mottle virus (VTMOV) was treated with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\alpha$ -amanitin and 10  $\mu\text{Ci}/\text{Ml}$   $^3\text{H}$ -Uridine. In control, protoplast suspension was mixed with an equal volume of culture medium without  $\alpha$ -amanitin. Nucleic acids were isolated from infected protoplast at 72 h after incubation, thereafter, analysed by electrophoresis and counted for  $^3\text{H}$ -radioactivity. The effect of  $\alpha$ -amanitin on replication of virusoid RNA encapsidated in VTMOV was studied. The result showed that the inhibitor did not inhibit replication of

virusoid RNA. The VTMOV virions which isolated from infected protoplasts at different culture times were determined with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The result revealed that  $\alpha$ -amanitin has no effect on replication of VTMOV virions. The replication mechanism of the virusoid RNA is discussed in this paper.

### Key words

Virusoid; Velvet tobacco mottle virus; Replication