

## 酵母校正 tRNA 的提取及其对番茄花叶病毒增殖的抑制作用

王小凤 李丰知 田波

(中国科学院微生物研究所, 北京)

从酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* SUP-6-1 温度突变株, 含 SUP tRNA<sup>Trp</sup>, SUP tRNA<sup>Leu</sup>, SUP tRNA<sup>His</sup>) 和菠菜提取了总 tRNA, 经过 BD-纤维素柱层析, 得到部份纯化的 amber 终止密码校正 tRNA, 它们在兔网织细胞裂解液翻译体系中能促进番茄花叶病毒 (ToMV) RNA 183k 抄读蛋白的合成。

研究了酵母 SUP6-1 校正 tRNA 对 ToMV 在烟草中增殖的影响。在用酵母 SUP6-1 校正 tRNA 处理的植株顶部新生叶中病毒滴度接种 3、5、11、15 和 20 天后, 分别是对照的 3%、12%、38%、42% 和 67%。用校正 tRNA 处理的烟草植株中层叶片, 在接种后 11—20 天明显低于对照。下层接种叶中的病毒滴度无显著差异。讨论了校正 tRNA 对 ToMV 增殖抑制的机理。

**关键词** 校正 tRNA; 体外翻译体系; 番茄花叶病毒 RNA; 抄读产物

原核和真核生物的蛋白质合成有三个终止密码 (UAG, UGA, UAA), 它们位于每个顺反子的末尾。在许多 mRNA 中“抄读翻译” (readthrough) 现象较为普遍, 而“错误终止密码”是“抄读翻译”的一种发生机制, 大多由一种特殊 tRNA——校正 tRNA 完成, 它能识别终止密码, 在终止密码处插入适当的氨基酸, 这时产生的延长蛋白叫做“抄读产物”<sup>[1,2]</sup>。已发现在一些病毒侵染过程中产生的抄读蛋白有重要生物学功能, 如 Q $\beta$  噬菌体感染的 *E. coli* 中的 A1 蛋白及鼠白血病毒 (MuLV) 的依赖于 RNA 的 DNA 聚合酶的合成等<sup>[2]</sup>。Pelham<sup>[3]</sup> 首次报导了一个植物病毒的抄读体系, 即酵母 amber 校正 tRNA 在体外蛋白质翻译体系中能识别 TMV RNA 5' 端第一个顺反子的 UAG 终止密码, 证实大的 183k 蛋白是 126k 蛋白的抄读产物。曾在感染 TMV 的烟叶中或烟原生质体中发现这两种非结构蛋白<sup>[4-6]</sup>,

推测可能是 TMV 复制酶的亚基。之后, 在苜蓿花叶病毒 (AMV)<sup>[7]</sup>、烟脆裂病毒 (TRV)<sup>[8]</sup>、芜菁黄花叶病毒 (TYMV)<sup>[9]</sup> 和马铃薯 X 病毒 (PVX)<sup>[10]</sup> 等中发现基因组的一种 RNA 在体外翻译中产生  $\geq 2$  个蛋白, 其合成量可被有关的校正 tRNA 调节。但是“抄读翻译”在植物病毒体内复制的意义还不很清楚。

冯亚雄等<sup>[11]</sup> 用从蓖麻蚕后丝腺提取的 amber 终止密码校正 tRNA 处理心叶烟, 发现 TMV 在其上形成的枯斑数明显减少。我们从酵母菌株 (*Saccharomyces cerevisiae* SUP6-1) 和菠菜中提取到 amber 终止密码校正 tRNA, 并在烟草 (*Nicotiana tabacum*) 试验该酵母 amber 校正 tRNA 对 ToMV 增殖的作用。

本文于 1988 年 6 月 8 日收到。

蔡金科教授惠赠酵母菌株 (*Saccharomyces cerevisiae* SUP6-1), 王一心和刘向东同志参加部分工作, 特此致谢。

## 材料和方法

### (一) 氨酰 tRNA 合成酶的提取

从酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 提取混合氨酰 tRNA 合成酶及酶反应的方法参考文献 [12, 13]。用  $^3\text{H}$ -亮氨酸 (55Ci/mM, 上海原子核研究所生产) 测定 tRNA 接受氨基酸的活性。

### (二) 酵母菌株 (*Saccharomyces cerevisiae* SUP6-1) 的培养

该菌株系温度突变株, 含 SUP tRNA<sup>Trp</sup>, SUP tRNA<sup>Leu</sup>, SUP tRNA<sup>His</sup> (以下简称 SUP6-1), 由蔡金科教授惠赠。将牛肉汁斜面上的 SUP6-1 接种在 YEPD 液体培养基中 (2% 蛋白胨, 1% 酵母浸粉, 2% 葡萄糖) 23°C 震荡培养 5 天。离心收集菌体, 以蒸馏水洗数次。

### (三) 酵母及菠菜 tRNA 的提取

参照文献 [14, 15] 的方法。

### (四) tRNA 的 BD-纤维素 (BD-cellulose) 柱层析<sup>[16]</sup>

### (五) tRNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析<sup>[17]</sup>

### (六) 病毒及其核酸的提取<sup>[18]</sup>

### (七) 体外蛋白质翻译体系

兔网织细胞裂解液蛋白质翻译体系根据文献 [18, 19]。在 35  $\mu\text{l}$  反应体系中加入 ToMV RNA 2  $\mu\text{g}$  及经 BD-cellulose 柱层析分离的 tRNA 各分部 2  $\mu\text{g}$ , 不加任何其它 tRNA, 用  $^3\text{H}$ -亮氨酸作标记氨基酸。通过产物分析确定出有 amber 终止密码校正 tRNA 活性的分部<sup>[6, 20]</sup>, 合并后用乙醇沉淀浓缩。

### (八) SUP6-1 amber 校正 tRNA 对 ToMV 增殖的作用

用 ToMV 的系统感染寄主烟 (*Nicotiana tabacum*) 作为试验植物。选择高 10cm 左右的植株, 在叶片上喷洒 400 目金

刚砂。tRNA 处理及病毒接种方式如图 1。在植株下部三片叶涂抹 SUP 6-1 amber 校正 tRNA (即合并的 No.16-19 分部, 见图 3-a), 每片用量 5  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ , 用无校正 tRNA 活性的部分 (即合并的 No.8-11, 见图 3-a) 作一般 tRNA 对照, 用量同上。同时以蒸馏水 (每片叶 20  $\mu\text{l}$ ) 涂抹作对照。此三片叶的下部两片 (图 1 的 1, 2) 接种 ToMV 15  $\mu\text{l}$  (浓度 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。每组试验处理 6 株。接种后第 3、5、11、15 和 20 天采样, 每次从每株的上 (即未用校正 tRNA 涂抹, 也未接种病毒的顶叶)、中 (图 1 的叶 3)、下 (图 1 的叶 2) 部位的叶片各采一圆片 ( $\phi 0.4\text{cm}$ ) 加入 0.5ml PBST 研磨, 离心取上清液, 用 A 蛋白双夹心-酶联免疫吸附试验测定各处理叶片中病毒的浓度<sup>[21]</sup>。

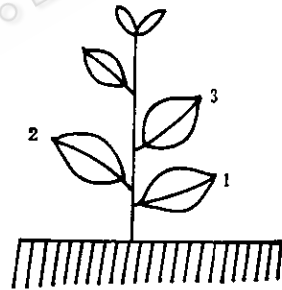


图 1 烟 (*Nicotiana tabacum*) 以酵母 (*Saccharomyces Cerevisiae* SUP6-1) 的校正 tRNA 处理和接种病毒的方式示意图  
第 1、2、3 片叶均用校正 tRNA 处理, 其中仅第 1、2 片叶接种病毒。

Fig. 1 Scheme of yeast (*Saccharomyces cerevisiae* SUP6-1) suppressor tRNA treatment and inoculation with ToMV on tobacco (*Nicotiana tabacum*)

No. 1, 2, 3 leaves were treated with SUP tRNA, and only No. 1 and 2 leaves were inoculated with ToMV.

## 试验结果

### (一) 总 tRNA 凝胶电泳和氨基酸接受活性的测定

10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(图 2-2)表明, SUP6-1 tRNA 样品基本不含 DNA, 但含 5Sr-RNA。用  $^3\text{H}$ -亮氨酸标记的氨酰 tRNA 合成酶反应体系测定表明, SUP 6-1 tRNA 与不加 tRNA 的对照相比可刺激掺入 248 倍。

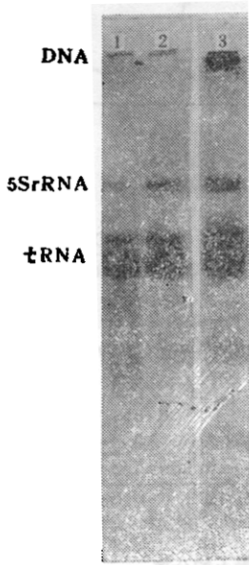


图2 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* SUP6-1) 和菠菜总 tRNA 的 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳  
1. 酵母 tRNA (BDH 产品); 2. 酵母 SUP6-1 tRNA; 3. 菠菜 tRNA。

Fig. 2 10% Polyacrylamide gel electrophoresis of total tRNAs of yeast (*Saccharomyces cerevisiae* SUP6-1) and spinach  
1. yeast tRNA produced by BDH; 2. yeast (*Saccharomyces cerevisiae* SUP6-1) tRNA; 3. spinach tRNA

从图 2-3 看到菠菜 tRNA 样品含有较多的 DNA 和 5Sr-RNA。未测定其氨基酸接受活性。

### (二) BD-cellulose 柱层析及 tRNA 各分部在体外蛋白质翻译体系中校正活性的鉴定

酵母 SUP6-1 tRNA 和菠菜 tRNA BD-cellulose 柱层析洗脱曲线见图 3。图中的峰 I 为 DNA, 峰 II 和峰 III 均为 tRNA。5Sr-RNA 在本试验条件下不被洗

脱。为便于分析, 峰 II 的每两管合并为一个分部, 在体外翻译体系中测定校正 tRNA 的活性。产物分析表明, 酵母 SUP 6-1 tRNA N'-16-19 (图 3-a) 和菠菜 tRNA 的 No. 14-21 (图 3-b) 分部均可促进 ToMV RNA 翻译产物 183k 抄读蛋白的合成(图 4, 5), 其中酵母校正 tRNA 的抄读作用较强, 从图 4 可以看到当 183k 蛋白合成量增加时, 126k 蛋白量明显减少, 从而证实以上两种来源的 tRNA BD-cellulose 柱层析的氯化钠梯度洗脱峰中的相应分部含有 amber (UAG) 终止密码校正 tRNA。

### (三) 酵母 SUP6-1 校正 tRNA 对 ToMV 增殖的作用

用 A 蛋白双夹心-酶联免疫吸附法测定了 ToMV 感染后烟植株的各层叶片中病毒浓度。结果表明, 各层叶片中病毒增殖情况有所不同。在 SUP6-1 校正 tRNA 处理的植株顶部新生叶中 ToMV 含量一直低于一般 tRNA 和水处理的对照(图 6), 接种后 3、5、11、15 和 20 天分别是一般 tRNA 处理的 3%、12%、38%、42% 和 67%, 这表明, 校正 tRNA 处理后植株顶部新生叶中的病毒增殖受到抑制, 特别是接种后 3 和 5 天的抑制效果更明显。

中部叶片(只用 tRNA 处理)的 ToMV 增殖曲线(图 7-a)表明, 接种后 3-5 天在所有处理中病毒含量都很低, 几乎测不出病毒, 并且在整个测定期间, 病毒含量明显低于其它叶片。接种后 15 和 20 天校正 tRNA 处理的叶片中病毒含量相当于一一般 tRNA 对照的 11% 和 20%, 从而说明病毒增殖也受到明显抑制。

下部叶片(tRNA 处理+病毒接种)的病毒增殖曲线(图 7-b)显示各种处理互有高低, 差异不明显。酵母 SUP6-1 校正 tRNA 和一般 tRNA 处理的下部叶片病

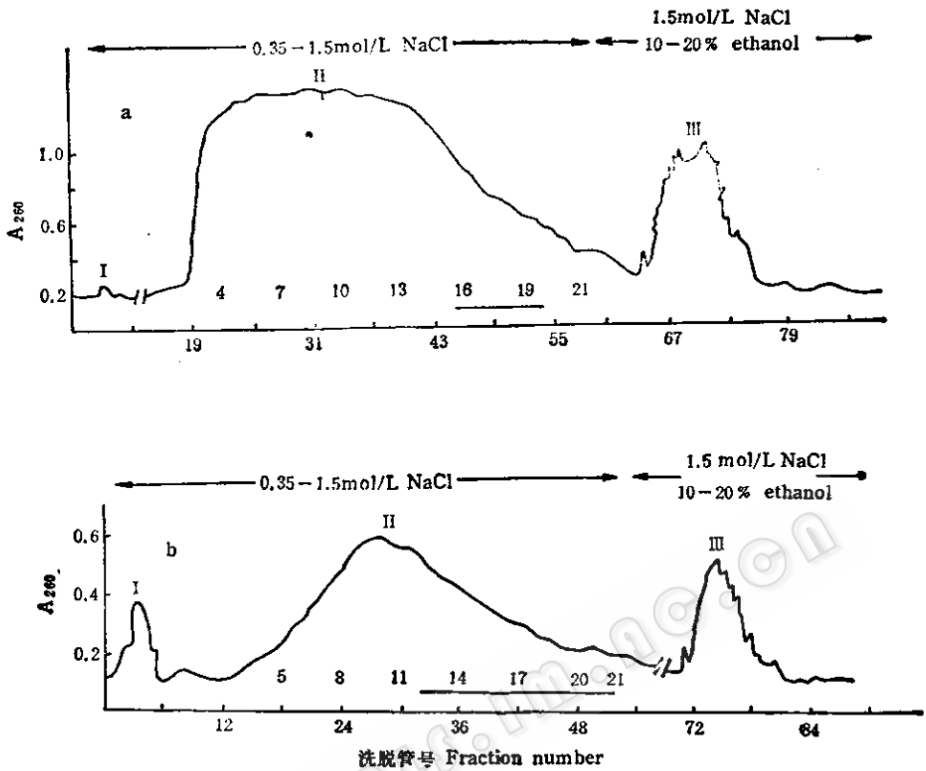


图3 酵母 SUP6-1 和菠菜 tRNA 在 BD-纤维素上的分离  
65mg 酵母 SUP6-1(a) 和 30mg 菠菜 tRNA (b) 溶解在 0.05mol/L NaAc 缓冲液 pH4.5 中上柱 (2×40cm)。横座标上的数字表示洗脱管数 (6ml/管)。峰 II 的每两管合并成一个分部(以横座标上方的数字表示), 在体外蛋白质翻译体系中测校正 tRNA 活性。有校正 tRNA 活性的分部以直线——表示。

Fig. 3 Fractionation of SUP6-1 and spinach total tRNAs on BD-cellulose column  
65mg of SUP6-1 (a) and 30mg of spinach tRNAs (b) in 0.05 mol/L NaAc buffer were applied to column (2×40cm). Eluant was 6ml/fraction collected. Every two fractions of peak II are pooled and precipitated with ethanol, tested for suppressor activity. The bar indicates tRNA fractions with suppressor activity.

毒浓度在第 20 天分别为 40mg/ml 和 47 mg/ml, 而水处理的为 19mg/ml, 这似乎说明 tRNA 处理的接种叶中病毒增殖受到一定程度的刺激。

从烟上症状来看, 酵母 SUP6-1 校正 tRNA 处理的植株症状比一般 tRNA 和水处理的对照轻。接种后 15 天统计的病情指数: 酵母 SUP6-1 校正 tRNA 处理的是 70.8, 一般 tRNA 和水处理的对照均是 100。

## 讨 论

70 年代以来, 已从酵母<sup>[1,3,14]</sup>、果蝇<sup>[21]</sup>、蓖麻蚕<sup>[22]</sup> 和动物肝脏<sup>[23]</sup> 等提取到校正 tRNA。在植物方面, Beier 等<sup>[24]</sup> 首次从健康烟和小麦叶提取到 tRNAs<sup>Tyr</sup>, 证实在 TMV RNA 的体外翻译中可促进 183k “抄读蛋白”的合成, 并推测在感染 TMV 的烟中它们起同样的作用。我们从菠菜中首次提取到对 ToMV RNA 体外翻译产物有

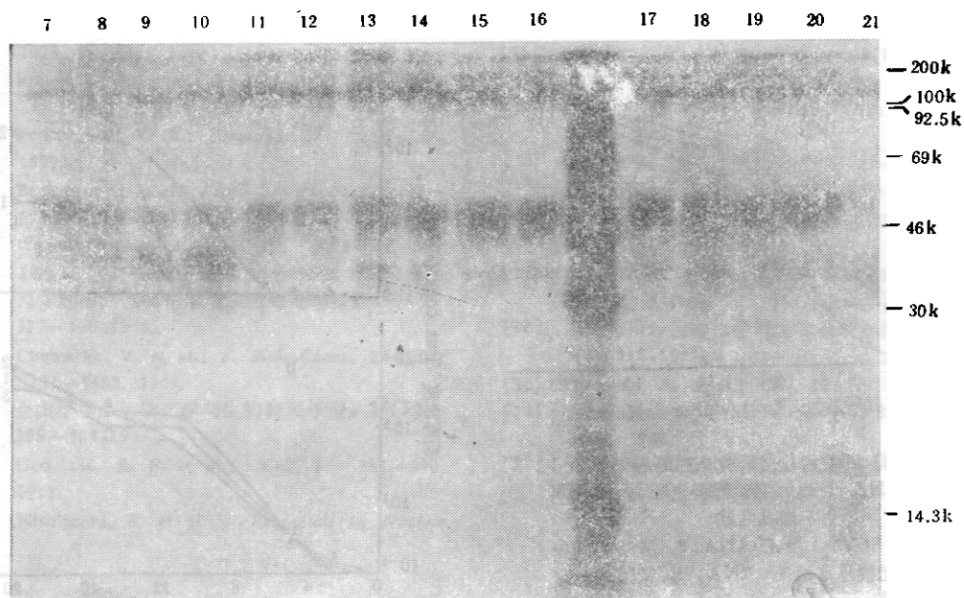


图4 ToMV RNA  $^3\text{H}$ -亮氨酸标记的体外蛋白翻译产物的 13%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳荧光显影 每反应加入  $60\mu\text{g/ml}$  BD-纤维素柱层析相应分部的酵母 SUP6-1 tRNA。图谱顶部的数字表示 tRNA 分部的顺序数。

Fig. 4 Fluorogram of a 13% SDS-polyacrylamide gel of  $^3\text{H}$ -Leucine labeled protein after in vitro translation of ToMV RNA in the presence of  $60\mu\text{g/ml}$  tRNA from corresponding fractions of SUP6-1 tRNA

The numbers on top of the lanes indicate the tRNA fractions added in the in vitro translation system

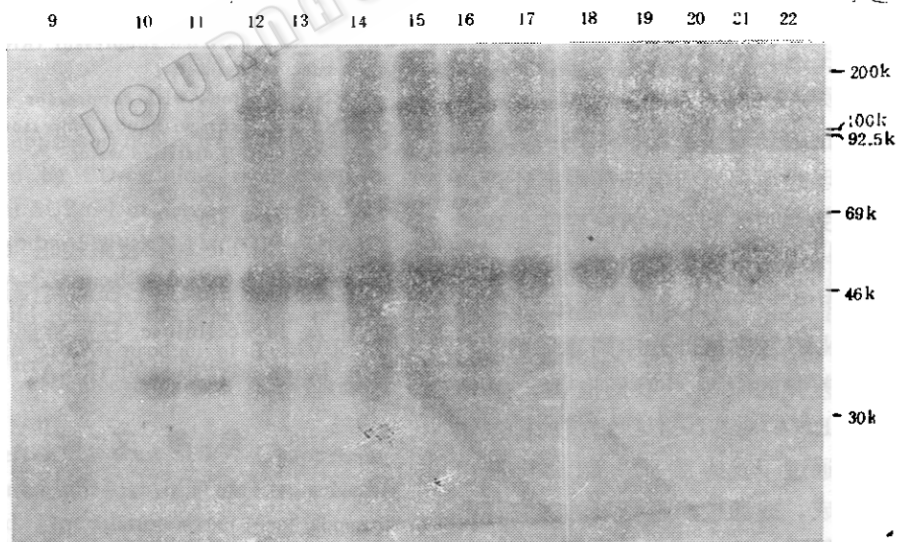


图5 ToMV RNA  $^3\text{H}$ -亮氨酸标记的体外蛋白翻译产物的 13%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳荧光显影 每反应加  $60\mu\text{g/ml}$  BD-纤维素柱层析的相应分部的菠菜 tRNA。图谱顶部的数字表示 tRNA 各分部的顺序数。

Fig. 5 Fluorogram of a 13% SDS-polyacrylamide gel of  $^3\text{H}$ -Leucine labeled protein after in vitro translation of ToMV RNA in the presence of  $60\mu\text{g/ml}$  tRNA from corresponding fractions of spinach tRNA

The numbers on top of the lanes indicate the tRNA fractions added in the in vitro translation system.

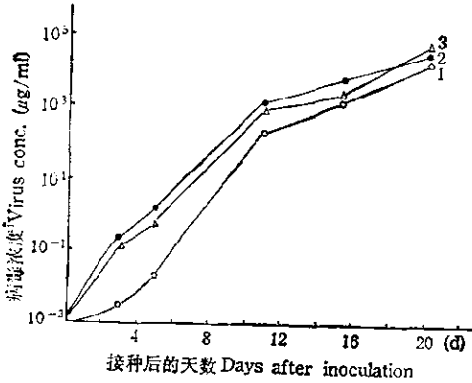


图 6 BD-纤维素柱层析纯化的酵母 SUP6-1 校正 tRNA 处理的烟顶部新生叶中 ToMV 增殖曲线

1. 酵母 SUP6-1 校正 tRNA; 2. 酵母 SUP6-1 无校正活性的 tRNA; 3. 蒸馏水  
Fig. 6 Diagram of ToMV multiplication in upper leaves of tobacco treated with partially purified suppressor tRNA of SUP 6-1

1. tRNA fractions with suppressor activity; 2. tRNA fractions without suppressor activity; 3. distilled water

校正活性的 tRNA, 文献中尚未见报导。校正 tRNA 在植物中很可能是广泛存在的, 它们与寄主生长代谢及病毒在体内复制的关系值得深入研究。

初步试验表明, 酵母 SUP6-1 校正 tRNA 处理的烟顶部新生叶和中部叶片中病毒增殖受到明显抑制, 病株症状也有减轻。用整株植物试验涉及病毒侵染后在植物中的运转规律<sup>[25]</sup>, 这或许是酵母 SUP6-1 校正 tRNA 对各层叶片中病毒增殖的影响表现出差异的原因。我们推测, 酵母 SUP6-1 tRNA 对 ToMV 增殖的抑制作用有可能通过干扰病毒 126k 和 183k 蛋白的正常合成, 或通过病毒复制的其它环节以及植物细胞的代谢调节起作用。

为了探索植物病毒翻译过程中“抄读”的意义, 及利用这一调节机制达到抑制病毒增殖的可能性, 需要用原生质体体系进一步试验。

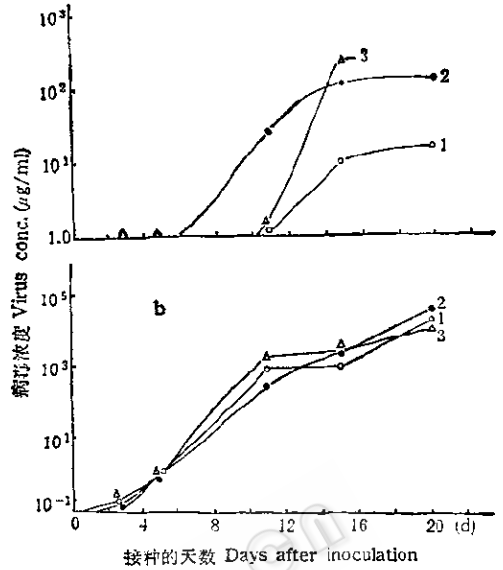


图 7 BD-纤维素柱层析纯化的酵母 SUP6-1 校正 tRNA 处理的烟中部叶 (a) 和下部叶 (b) 中 ToMV 的增殖曲线

1. 酵母 SUP6-1 校正 tRNA; 2. 酵母 SUP6-1 无校正活性的 tRNA; 3. 蒸馏水。

Fig. 7 Diagram of ToMV multiplication in middle (a) and lower (b) leaves of tobacco treated with partially purified suppressor tRNA of SUP 6-1

1. tRNA fractions with suppressor activity; 2. tRNA fractions without suppressor activity; 3. distilled water

酵母 SUP6-1 和菘菜校正 tRNA 的接受氨基酸种类及其它性质有待进一步分析, 但从 BD-cellulose 柱层析部位看, 它们与 Beier 等<sup>[24]</sup>报导的 tRNA<sup>Tyr</sup> 相似。

参 考 文 献

[1] Capechi, M. R. et al.: *Cell*, 6: 269-277, 1975.  
[2] Ryoji, M. et al.: *TIBS*, March, 88-90, 1983.  
[3] Pelham, H. R. B.: *Nature*, 272: 469-471, 1978.  
[4] Sakai, F. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 118: 93-96, 1972.  
[5] Bruening, G., et al.: *Virology*, 71: 498-517, 1976.

- [6] Zaitlin, M. et al.: *Virology*, 53: 300—311, 1973
- [7] Round, G. L. et al.: *FEBS Lett.*, 118(1): 67—71, 1980.
- [8] Pelham, H. R. B.: *Virology*, 97: 256—265, 1979.
- [9] Benicourt, C. et al.: *FEBS Letters*, 86(2): 268—272, 1978.
- [10] Wodnar-Filipowicz, A. et al.: *FEBS Letters*, 109(1): 151—155, 1980.
- [11] 冯亚雄等: 生物化学与生物物理学报, 18(4): 377—380, 1986。
- [12] Chumicka, V. et al.: *J. Biol. Chem.*, 244(20): 5481—5488, 1969.
- [13] 金由辛等: 生物化学与生物物理学报, 15(5): 399—404, 1983。
- [14] Gesteland, R. F. et al.: *Cell*, 7: 381—390, 1977.
- [15] Nishimura, S. et al.: *Procedure in Nucleic Acid Research* 2: 542—564, 1971.
- [16] Gillam, I. et al.: *Biochemistry*, 6(12): 3043—3056, 1967.
- [17] Loening, U. E.: *Biochem. J.*, 102: 251—257, 1967.
- [18] 马德芳等: 微生物学报, 26(1): 35—40, 1986。
- [19] 王小凤等: 病毒学报, 1(2): 187—189, 1985。
- [20] Dudler, R. et al.: *Chromosoma (Berl)*, 84: 49—60, 1981.
- [21] Edward, M. L. et al.: *Virological Methods*, 11: 309—319, 1985.
- [22] 冯亚雄等: 生物化学与生物物理学报, 17(4): 514—519, 1985。
- [23] Diamond, A. et al.: *Cell*, 25: 497—506, 1981.
- [24] Beier, H. et al.: *EMBO journal*, 3(5): 1091—1096, 1984.
- [25] 鲍登 F. C.: 植物病毒和病毒病害, 科学出版社, 北京, p.270—271, 1958。

## EFFECT OF SUPPRESSOR tRNA ON THE TRANSLATION OF TOMATO MOSAIC VIRUS (TomV) RNA AND ITS INHIBITION ON VIRUS MULTIPLICATION IN TOBACCO

Wang Xiaofeng Li Fengzhi Tian Po

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The suppressor tRNA were isolated and fractionated by BD-cellulose from temperature mutant SUP 6-1 of *Saccharomyces cerevisiae* (containing SUP-tRNA<sup>Trp</sup>, SUP-tRNA<sup>Leu</sup>, SUP-tRNA<sup>His</sup>) and spinach plant. Both tRNAs could promote the production of 183k readthrough protein product of ToMV-RNA in rabbit reticulocyte lysate translational system.

The effect of yeast SUP 6-1 suppressor tRNA on multiplication of ToMV in tobacco was studied. Inoculation experiment showed that virus titers tested at 3, 5, 11, 15 and 20 days after inoculation in top leaves of tobacco treated with suppressor tRNA was 3%,

12%, 38%, 42% and 67% as compared to that of control respectively.

Virus titers in middle leaves treated with suppressor tRNA is apparently lower in 11—20 days than control. Virus titers in lower inoculated leaves have no significant difference between suppressor tRNA treatment and control. The possible mechanism of this inhibition effect has been discussed.

### Key words

Suppressor tRNA; *In vitro* translational system; Tomato mosaic virus RNA; Readthrough product.