

绒毛烟斑驳病毒卫星 RNA 的一种突变体的初步研究

叶 寅* 卢文筠

(武汉大学病毒系, 武汉 430072)

康良仪 田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

用电泳检测 VTMoV88 感染绒毛烟后病毒持异性核酸组份, 发现核酸的小分子 RNA (卫星 RNA) 组成发生变化。提纯的病毒通过电镜观察及血清学鉴定并与 VTMoV 加以比较, 证明两者在颗粒形态、大小及血清学关系上一致。以克隆的 VTMoV-RNA3 cDNA 片断为探针检测 VTMoV 与 VTMoV88 卫星 RNA 分子之间的核苷酸序列同源性, 结果显示出两种毒源的卫星 RNA 具有高度同源性。据此, 推测 VTMoV88 可能是卫星 RNA 发生变异的突变体, 并对 VTMoV88 卫星 RNA 突变体形成机制进行了初步探讨。

关键词 绒毛烟斑驳病毒; 卫星 RNA; 突变体

绒毛烟斑驳病毒 (VTMoV) 是一种球状 RNA 病毒, 其粒子大小为 28nm。病毒粒子除包含单链 RNA 基因组 (RNA1) 及亚基因组 (RNA1a, RNA1b) 外, 还包含两种与 RNA1 无同源性的小分子 RNA (RNA2 及 RNA3), RNA2 与 RNA3 为同一分子的不同形式, RNA2 为环状, RNA3 为线状^[1]。当非变性 PAGE 时, RNA2 与 RNA3 的泳动位置一致; 而当变性 PAGE (8mol/L urea) 时, 则它们的泳动位置不一致^[2]。实验表明, VTMoV 小分子 RNAs 在二级结构及理化性质等方面与类病毒 RNAs 分子相似, 不同的是它与 RNA1 一起包被在病毒颗粒中, 故称为类病毒 RNA (Viroid like RNAs)^[3] 或拟病毒 (Virusoids)^[4]。后来证明其生物学活性又表现出与卫星 RNA 的相似性, 目前将其划归卫星 RNA 一类, 或称象类病毒的卫星 RNA (Viroid-like satellite RNAs)。

我们在实验过程中, 发现一种来源的 VTMoV (VTMoV88) 之核酸电泳行为异常, 本文报道了 VTMoV88 在寄主植物上

的症状表现、血清学性质、卫星 RNA 的序列同源性方面与 VTMoV 相比较的实验结果。

材 料 和 方 法

(一) 病毒及病毒的纯化

绒毛烟斑驳病毒 (VTMoV) 毒源是由澳大利亚学者 Francki 分别于 1981 年和 1988 年惠赠 (分别为 VTMoV 与 VTMoV88)。病毒的繁殖与纯化参照 Randles 等人的方法^[5]。

(二) 核酸的提取与纯化

病毒核酸的提纯采用 SDS-酚法^[6]。

为提取病毒感染叶片总核酸, 将叶片放入研钵, 加入 GPS 缓冲液 (200mmol/L Gly, 100mmol/L Na_2HPO_4 ; 600mmol/L NaCl, pH9.5) 及 SDS (1%), 进行研磨, 加酚及氯仿抽提, 离心取上清液, 用酚及氯仿再抽提几次后, 酒精沉淀。

本文于 1990 年 7 月 11 日收到。

* 现在工作单位: 中国科学院微生物研究所。

(三) RNA 凝胶电泳

RNA 在 4% 的聚丙烯酰胺凝胶上(以 TBE 为电泳缓冲液)进行非变性电泳或在 8mol/L 尿素存在下进行变性电泳^[5]。

(四) 血清学试验

VTMoV 抗血清由植检所张成良先生提供,免疫双扩散反应在 0.8% 的琼脂糖胶(50mmol/L 磷酸缓冲液, pH 7.0) 上进行^[6]。

(五) RNA3 特异性 cDNA 探针的制备

RNA3 特异性的 cDNA 克隆于质粒 pUC19 上。大量制备重组质粒以内切酶切下插入片断并以低熔点胶回收。采用 Random-Primer 法标记 DNA 片断。

(六) Northern blot

按前面介绍的方法进行 RNA 变性电泳。电泳完毕,将胶浸泡于 10% 甲醛溶液中于 65℃ 处理 30 分钟,用无菌水洗胶 2 次后,用电转移槽转移 RNA 到 Zeta-probe 膜上。转移缓冲液为 10mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.0),然后将膜在真空状态下于 80℃ 烘烤 2 小时固定^[7]。将固定好的膜置入杂交袋中,加入预杂交液[50% (v/v) 去离子甲酰胺, 5 × SSC, 50mmol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5), 250 μg/ml 热变性小牛胸腺 DNA, 5 × Denhardt 溶液, 5mmol/L EDTA, 0.2% SDS]。42℃ 预杂交 8—12 小时。杂交溶液包含 4 份体积的预杂交液, 1 份体积的 50% 硫酸葡聚糖溶液。DNA 探针加入前于 100℃ 处理 5 分钟,杂交反应于 42℃ 保温 16—20 小时。杂交完毕按以下步骤洗膜: 2 × SSC-0.2% SDS, 室温下 2 次, 各为 20 分钟; 2 × SSC-0.2% SDS, 65℃ 2 次, 各为 30 分钟。0.1 × SSC-0.1% SDS, 室温下 2 次, 各为 20 分钟,将膜晾干,放射自显影^[8]。

结 果

(一) 核酸的电泳分析

图 1 为 VTMoV88 病毒核酸电泳图谱。在变性电泳图谱上,相当于 RNA2 的位置有距离很近的两条带(称 RNA2a 与 RNA2b); 在相当于 RNA3 的位置,也有距离很近的二条带(RNA3a 与 RNA3b)。RNA3 的大小在 RNA3a 与 RNA3b 之间。从感病叶片中提取总核酸并变性电泳时,病毒特异性 RNA 的电泳图谱与上面的结果一致(结果未显示)。对照 VTMoV 核酸电泳图谱,则在 VTMoV88 中,卫星 RNA 的组成与 VTMoV 不一致。采用 T4 多核苷酸激酶标记病毒核酸并电泳检测以初步分析 RNA 分子是环状或是线状。结果(图片没有显示)表明, RNA2a、RNA2b 不被标记,而 RNA3a、RNA3b 能够标记上,这说明 RNA2a、RNA2b 为环状, RNA3a、RNA3b 为线状。据此推测,与 VTMoV 卫星 RNA 相似, RNA2a 与 RNA3a (或 RNA2b 与 RNA3b) 为同一分子的不同形式,前者为环状,后者为线状。

(二) 血清学分析

从免疫双扩散的结果(见图 2)看出, VTMoV 与抗血清反应的沉淀线和 VTMoV88 与抗血清反应的沉淀线相愈合,说明两个毒源的抗病性一致。

(三) VTMoV 88 在绒毛烟上的症状表现

VTMoV88 感染绒毛烟后的症状完全是典型的 VTMoV 感病症状。烟苗之新生叶出现皱缩,随着症状的加深,接种过的叶片出现斑驳状的黄化斑驳。

提纯病毒并进行电镜观测,则病毒粒子为均一球状,大小在 28nm 左右,与 VTMoV 一致。

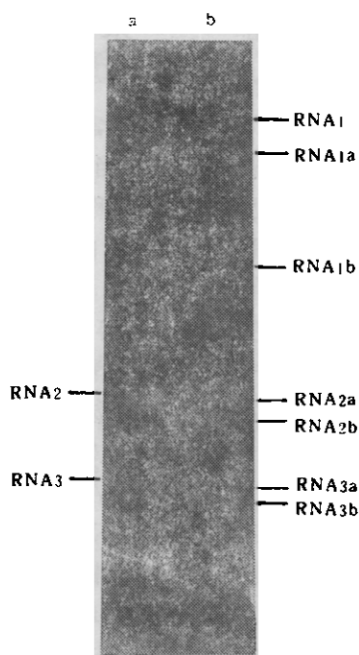


图1 VTMoV88 和 VTMoV 病毒核酸的电泳图谱

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoretic analysis of RNA from purified virus preparation under denaturing conditions

a. VTMoV RNAs; b. VTMoV88 RNAs

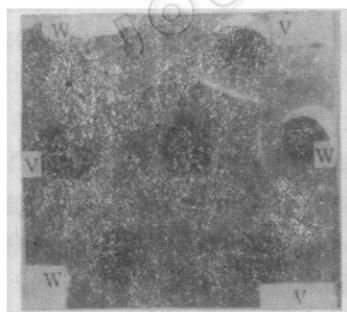


图2 VTMoV88 病毒、VTMoV 病毒与 VTMoV 病毒抗血清之间的免疫双扩散实验结果

Fig. 2 Serological reactions in gel diffusion tests between antisera against VTMoV and purified preparations of VTMoV and VTMoV88 W: VTMoV; V: VTMoV88

(四) Northern blot 分析

杂交结果见图3。VTMoV RNA 中, RNA2 及 RNA3 的位置上有清楚的杂交带。VTMoV88 核酸分子中, RNA2a,

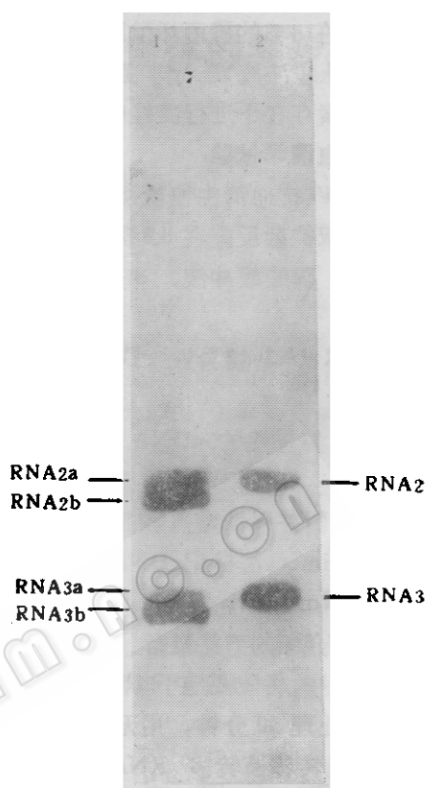


图3 Northern blot 杂交结果

Fig. 3 Northern blot analysis

1. VTMoV88 RNAs; 2 VTMoV RNAs

RNA2b、RNA3a、RNA3b 位置上均有清楚的杂交带。其它实验中, 用健康叶片总核酸作对照, 并用 VTMoV88 感染叶片总核酸作实验, 结果表明健叶上无任何杂交带, 而 VTMoV88 总核酸中, RNA2a、RNA2b、RNA3a、RNA3b 位置上均有杂交带(结果未显示)。这一杂交结果表明, VTMoV 卫星 RNA 与 VTMoV88 小分子 RNA 具有很高的序列同源性, 同时也证明 VTMoV88 小分子 RNA 不是寄主内源性的。

讨 论

根据初步研究结果, 有关 VTMoV 与 VTMoV88 的性质的比较如下:

1. 电镜观察及血清学研究证明 VTMo-

V88 在病毒颗粒之形态、大小及血清学关系上与 VTMoV 具有一致性。

2. VTMoV88 基因组及亚基因组的组成与 VTMoV 一致, 但卫星 RNA 的组成发生变异。

3. VTMoV88 与 VTMoV 卫星 RNA 具有很高的序列同源性。

显然, 在 VTMoV88 中, 存在着两种大小不同的卫星 RNA, 而每种卫星 RNA 有二种形式, 一种为环状 (RNA2a 及 RNA2b), 一种为线状 (RNA3a 及 RNA3b)。这一存在形式与 VTMoV 之卫星 RNA 相对应。同时, 从核酸电泳图谱看, VTMoV RNA3 介于 RNA3a 与 RNA3b 之间。联系分子杂交结果, RNA3a、RNA3b 与 RNA3 有着高度的序列同源性, 它们可能来源于同一种分子 RNA3, 也即是由于 RNA3 发生突变而形成的。基于实验结果推测 VTMoV88 可能是卫星 RNA 发生变异的突变体。

根据 Chu 等^[9]的研究, VTMoV 卫星 RNA 依据滚环复制机制而复制, 并形成正链 RNA3 的多聚体。在其复制后期, 正链 RNA3 多聚体经过加工过程而被切割成单体。最近研究进展表明, 具有感染性的小分子 RNA (类病毒 RNA, 卫星 RNA 等) 具有自我切割的功能^[9-13]。据此, 我们推测, VTMoV88 的形成机制, 可能是由于卫星 RNA 分子核苷酸序列——很可能是切割位点附近 5' 或 3' 末端——发生突变, 引起卫星 RNA 切割位点的改变。这一改变引起加工异常, 形成的单位长度发生差异, 或者长于一个单位 (RNA3a) 或

者短于一个单位 (RNA3b)。有人认为 RNA3b 是一种缺失突变分子 (Francki, 私人通讯)。我们认为, 进一步分离出 RNA3a 与 RNA3b, 并对其定序, 可以确定这两种 RNA 分子大小发生差异的原因所在, 并弄清卫星 RNA 变异的机制。但 VTMoV88 作为一种卫星 RNA 发生变异的突变体被发现, 可以其作为研究材料, 通过研究其形成的机制, 找出卫星 RNA 的变异影响加工过程的内在关系, 有助于揭示具有感染性小分子 RNAs (类病毒 RNA, 卫星 RNA 等) 的复制机制, 特别是长期以来广为关注的加工过程以及近来当作热点研究的自我切割的机制。

参 考 文 献

- [1] Randles, J. W. et al.: *Virology*, **108**: 111—122, 1981.
- [2] Gould, A. R.: *Virology*, **108**: 123—133, 1981.
- [3] Francki, R. I. B. et al.: *Annu. Rev. Microbiol.*, **39**: 151, 1985.
- [4] Haseloff, J. et al.: *Nucl. Acids Res.*, **10**: 3681—3691, 1982.
- [5] Chu, P. W. G. et al.: *Virology*, **126**: 480—492, 1983.
- [6] 田 波等: 植物病毒研究方法(上册), 第 264—265 页, 科学出版社, 北京, 1987.
- [7] Khanadjian, E. W. et al.: *Mol. Biol. Reports*, **11**: 107—115, 1986.
- [8] Semancik, J. S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **81**: 4429, 1984.
- [9] Hutchins, C. J. et al.: *Nucl. Acids Res.*, **14**: 3627—3640, 1986.
- [10] Gelach, W. L. et al.: *Virology*, **151**: 172—185, 1986.
- [11] Forster, A. C. et al.: *Cell*, **49**: 211—220, 1987.
- [12] Forster, A. C. et al.: *Cell*, **50**: 9—16, 1987.
- [13] Forster, A. C. et al.: *Nature*, **334**: 265—267, 1988.

STUDIES ON ONE PROBABLE SATELLITE RNA MUTANT OF VALVET TOBACCO MOTTLE VIRUS

Ye Yin Lu Wenjun

(Department of Virology and Molecular Biology, Wuhan University, Wuhan 430072)

Kang Liangyi Tian Po

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

It was found that the composition of the low-molecular-weight RNAs of VTMoV from different two origin VTMoV and VT-MoV88 varied by PAGE analysis. A comparison of purified VTMoV88 with VTMoV by electron microscope and by serological reactions shows that VTMoV and VTMoV88 are identical in the size and shape of both viral particals and in serology. Using cloned cDNA

3 as probe for detection of the satellite RNAs of VTMoV88 and VTMoV were closely homologous. The results above indicated VTMoV could be a mutant with only satellite RNAs variation. It was suggested that processing in replication of RNAs might be the cause of VTMoV RNAs variation.

Key words

VTMoV; Satellite RNA; Mutant