

## 某些植物病毒核糖核酸3'末端tRNA样结构\*

蒋 秉 坤

(蚌埠医学院, 蚌埠)

Alex van Belkum, Cornelis W.A. Pleij, and Leendert Bosch

(University of Leiden, The Netherlands)

### 提 要

按照 Peattie (1979) 直接化学定序法测定了某些植物病毒 RAs (KYMV, CYVV, APLV和EMV) 3'末端区域的核苷酸顺序。基于核苷酸顺序资料参照 TYMV-RNA 模型 (Rietveld等, 1982) 提出它们3'末端的可能二级结构, 即 tRNA-样结构。KYMV、CYVV、OYMV、APLV和EMV-RNA 3'末端的 tRNA-样结构完全一致。此种对缬氨酸具有特异性的 tRNA-样结构与真核生物缬氨酸 tRNA 也极为相似。缬氨酸反密码子 (CAC) 位于 tRNA-样结构的适当部位。这些植物病毒 RNA 的核苷酸由于硷基对在氨基酸接受臂内能产生 12 个硷基对的共轴堆砌。3'末端区域具有……(CC)A<sub>OH</sub> 末端。本实验结果支持 Rietveld 等 1982 年提出的 TYMV-RNA 3'末端二级结构模型。最后简要地讨论了 tRNA-样结构的可能作用。

某些植物病毒核糖核酸 3'末端区域能被很多 tRNA 特异酶所认识, 故具有 tRNA 样性质。Pinck 和 Yot (1970) 首先提出芜菁黄花叶病毒 (turnip yellow mosaic virus, TYMV) RNA 3'末端存在 tRNA-样结构 (tRNA-like structure) <sup>[1,2]</sup>。以后又在许多植物病毒和某些动物病毒 RNA 中发现了这种结构, Haenni (1982) 和 Joshi (1983) 等曾作过详细评述 <sup>[3,4]</sup>。人们推测病毒 RNA 的 tRNA 样片段和 tRNA 分子之间的结构必然十分相似。然而, 当 3'末端片段的核苷酸被阐明之后发现两者有很大差异。具有不同的一级和二级结构的两种核酸分子, 例如 tRNA 和某些病毒 RNA 能被同一个酶系统 (tRNA-特异酶) 所认识, 这在遗传信息的传递上必将具有重要的作用。

蝶豆黄脉病毒 (clitoria yellow vein virus, CYVV)、kennedya 黄花叶病毒 (kennedya yellow mosaic virus, KYMV)、安第斯马铃薯隐潜病毒 (andean potato latent virus, APLV)、芒果花黄叶病毒 (ononis yellow mosaic virus, OYMV) 和茄子花叶病毒 (eggplant mosaic virus, EMV) 是植物病毒芜菁黄花叶病毒组 (tymoviruses) 的五个成员。它们为直径 20nm 和呈二十面体的颗粒。病毒基因组 RNA 约含 6000 个核苷酸, 分子量为  $5.6 \times 10^6$  道尔顿。已经查明有 16 种病毒属于这个组, 其典型代表是芜菁黄花叶

本文于 1987 年 5 月 20 日收到

\*此文曾在 1987 年于烟台举行的全国病毒生化研究讨论会议上宣读。



**2. 方法** (1) 病毒核酸的提取 100 $\mu$ l 病毒制剂 (约4mg/ml) 加100 $\mu$ l 以水饱和酚溶液和 1  $\mu$ l 1.5mol/L 乙酸钠在微离心管内混合, 高速台式离心机离心约 2 分钟。移去上层水相, 再同样用100 $\mu$ l 酚抽提一次。合并两次酚相, 加入100 $\mu$ l 0.01mol/L 乙酸钠抽提一次。两次水相合并后加 3 倍体积 (600 $\mu$ l) 冷乙醇, 混匀后置 -20 $^{\circ}$ C 2 小时, 离心弃上清液。如此重复一次, 沉淀物真空干燥, 20 $\mu$ l 双蒸水溶解 RNA ( $\sim 5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 贮于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

(2) 病毒 RNA 3' 末端标记和纯化 5  $\mu$ l 病毒 RNA 溶液和 10 $\mu$ l ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )-ATP (10 微居里) 加于 1.5ml 微离心管内, 离心和真空干燥。加 10 $\mu$ l 2 倍浓度 tRNA-核苷酰转移酶缓冲液 (50mmol/L 甘氨酸/氢氧化钠, pH9.3/12.5mmol/L 氯化镁) 和 5  $\mu$ l tRNA-核苷酰转移酶溶液, 混合。4 $^{\circ}$ C 过夜 (约16小时)。加 15 $\mu$ l 样品缓冲液, 混匀, 50 $^{\circ}$ C 水浴保温 5 分钟。

10% 聚丙烯酰胺凝胶 (40 $\times$ 20 $\times$ 0.03cm) 27.5W 预电泳 2 小时。上述标记 RNA 样品点样后 27.5W 电泳 2 小时, 当溴酚兰染料移到凝胶板底部时切断电源。放射自显影后用清洁手术刀切下所需的放射性凝胶区带。以适量 0.3mol/L 乙酸钠溶液洗脱, 3 倍体积冷乙醇沉淀 RNA, 真空干燥后溶于适量双蒸馏水中, 贮于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱供顺序分析用。

(3) 化学修饰直接定序 根据 Peattie<sup>[10]</sup> 介绍的化学修饰直接定序 RNA 的方法把样品分装在 4 支微离心管内分别进行四种不同硷基特异性化学修饰反应。DMS 修饰鸟苷 (G), DEP 主要攻击腺苷 (A)。胍攻击尿苷 (U) 和胞苷 (C), 但 3 mol 氯化钠抑制与 U 的反应, 在此情况下 C 反应占优势。经上述四种修饰反应后用苯胺对 RNA 进行链切反应。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳, 3' 末端标记的长短不同的 RNA 片段便可分离, 经放射自显影后即可直接读出它的核苷酸顺序。

为了测定病毒 RNA 3' 末端 tRNA-样片段的核苷酸顺序, 一般可选用 3' 末端标记的 100~200 个核苷酸长度的片段较好。较大的片段在处理上有困难, 而较小的片段可能会有宿主 tRNA 的污染。

## 结果与讨论

1. 病毒 RNA 3' 末端标记反应产物经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影的结果如图 2。112 是含有 112 个核苷酸的 TYMV RNA 片段作为核苷酸片段长度的标志。I、II、III 和 IV 为长度在 100~200 个核苷酸的长短不同片段, 洗脱和纯化后供顺序分析用。病毒基因组 RNA 约含 6000 个核苷酸, 因其自发性降解反应产生一系列长短不同的片段, 可选用适当长度的片段而不必再用核糖核酸酶处理。

茺菁黄花叶病毒 RNA 具有... CC<sub>OH</sub> 3' 末端, 这样无需作任何处理便可直接在 tRNA-核苷酰转移酶的催化下用 ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )-ATP 进行 3' 末端的标记, 获得含有 3' 末端标记的 RNA, 反应如图 3。应用 5' 末端标记 RNA 作化学修饰定序反应时还存在某些问题, 即嘧啶反应的带谱模糊不清难以定位。

2. 顺序分析 CYVV RNA 的直接化学定序的放射自显影图谱作为我们一系列研究的一个例子 (图 4)。由四种化学修饰反应 (C 反应、A 反应、C>U 反应和 U 反应)



图2 病毒RNA用( $\alpha$ - $^{32}$ P)-ATP和tRNA-核苷酰转移酶进行标记。在含有8M尿素的10%聚丙烯酰胺垂直板胶上进行电泳。含有3'末端的病毒RNA降解产物用放射自显影检查。“112”是作为标志物的TYMV RNA片段。

Fig. 2 The RNAs were labelled with ( $\alpha$ - $^{32}$ P)-ATP and tRNA-nucleotidyltransferase and electrophoresed on a 10% polyacrylamide, 8 M urea slab gel. Degradation products of the viral RNAs, which contain 3' terminus, were detected by autoradiography. The position of TYMV RNA fragment containing 112 nucleotides as marker is indicated.

所引起的链切结果在同一个凝胶的放射自显影图谱上很容易读出它的核苷酸排列顺序。在图4的10%胶电泳的放射自显影图谱中可以读出从3'末端第43~74共32个核苷酸的顺序<sup>(11)</sup>。其中最引人注意的是反密码环的CACACAC顺序的带谱。如果改变凝胶的浓度可以较方便地辨认40个核苷酸以内的核苷酸顺序(20%)，用较低浓度的胶(5~8%)和延长电泳分离的时间可对长度在100~150个核苷酸的顺序进行鉴定。因为RNA顺序

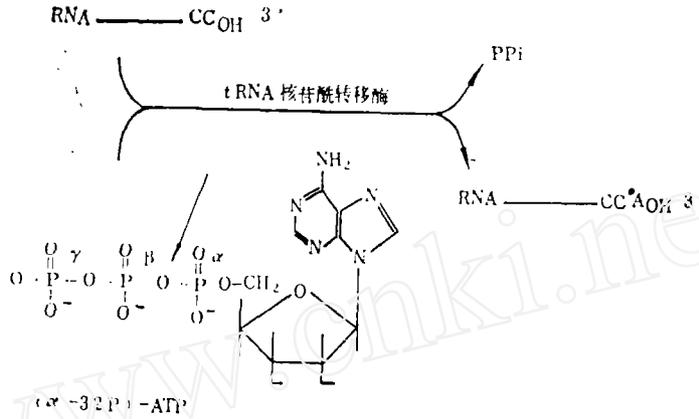


图3 用 $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{-ATP}$ 和tRNA-核苷酰转移酶标记病毒RNA。

箭头指示酶作用部位。星号代表 $(^{32}\text{P})\text{-AMP}$ 。

Fig.3 The viral RNA was labelled with  $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{-ATP}$  and tRNA-nucleotidyltransferase. The position of enzymatic action is indicated by an arrow. The star represents  $(^{32}\text{P})\text{-AMP}$ .

表1 某些芜菁黄花叶病毒RNA 3'末端片段\*

Tab 1 Fragments of 3' terminus of some tymovirus RNAs

		90	80	70	60
TYMV	RNA	5' AUCGUUAGCU	CGCCAGUUAG	CGAGGUCUGU	CCCCACACGA
KYMV	RNA	5' UUUU	GUUCCCAGUC	CGACACCGGU	UCCCACACCA
CYVY	RNA	5' UCU	CACG? ? AGUG	CGAGGCCCAU	UCACACACAA
OYMV	RNA	5' UAAA	UUUGACCGGU	GUCAUAGGCU	UUAGCACACA
APLV	RNA	5' AAU	GAAGGCAGUC	CUUCUCCCUU	UAGCACACAA
EMV	RNA	5'	GGAACUACAG	UUCGCUCCU	CUAGCACACA

(续表1)

	50	40	30	20	10
	CAGAUAUUG	GGUGCAACUC	CGGCCCUUU	UCCGAGGGUC	AUCGGAACCA
	CGGGCAUGG	UGCAACUCC	CGGUCCACU	CUGGACGGUC	ACCAGGAGGA
	UGGCUAUUG	GUGCAACCC	CCCGUCCAUC	UCGAACGGUC	AUCGAGACCA
	GAGGUCGCG	GGGUUCAACU	CCCCCCUUU	UCCGAGGGUA	UCGGAACCA
	AGGUCAAUG	GGUGCGACUC	CCCCCCUUU	CCGAGGGUAC	UCGGAACCA
	GAGGUCAAU	GGGUGCGACC	CCCCCUCUC	CCGUGGGUCA	ACGCGAACCA

\*TYMV RNA和EMV RNA的一部分先前已经发表<sup>[6,12]</sup>。未鉴定碱基用“?”表示。

\*The 3' terminal sequences of TYMV-RNA and part of EMV-RNA were published previously<sup>[6,12]</sup>. Unidentified bases are marked by “?”.

的研究在极微量的水平上进行和操作步骤繁杂等缘故一般需要反复多次实验,即使这样有时对某些区域的碱基顺序仍不能最后确定。因此,有时尚需要应用酶消化定序方法来协助明确某些碱基的顺序。例如KYMV RNA的 $G_{43}G_{43}G_{44}$ 三个碱基的带谱在化学方法中很模糊,但当用对鸟苷有特异性的RNase T1消化时 $G_{42}G_{43}G_{44}$ 部位的带谱十条清晰(结果在本文中未指出)。六种病毒RNA 3'末端片段的核苷酸顺序资料汇集于表1。

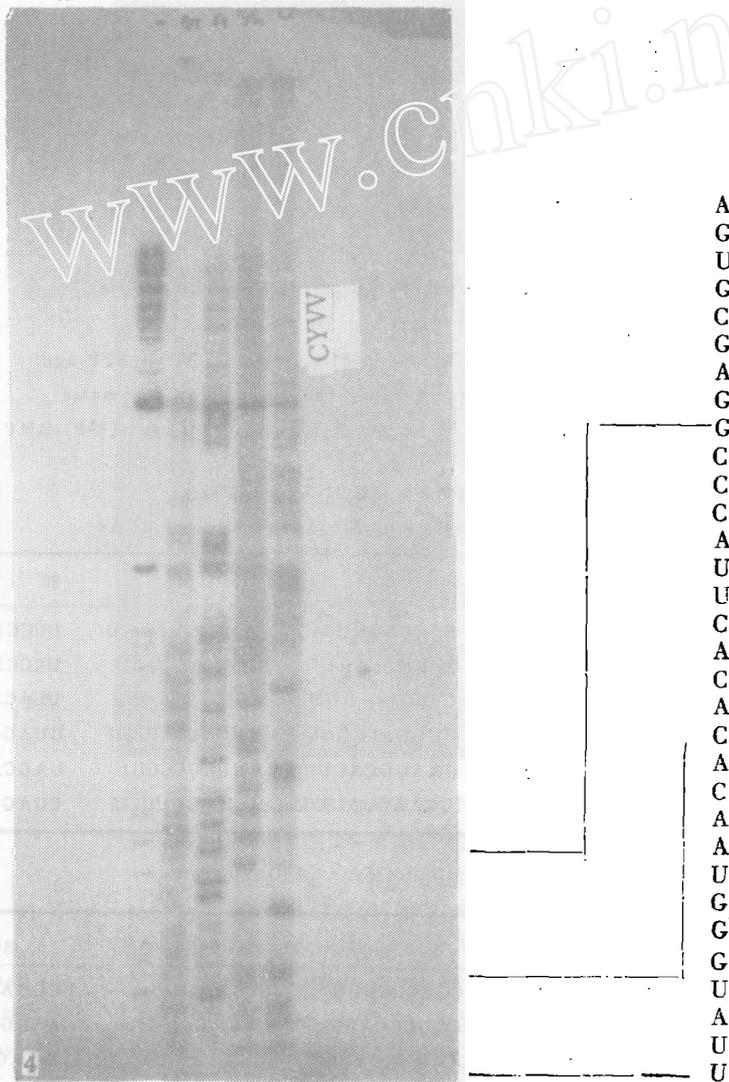


图4 CYVV RNA 3'末端顺序分析。应用对G、A、C和U残基特异性化学反应。

Fig.4 Sequence analysis of a 3' terminal of CYVV RNA. The chemical reactions specific for G, A, C, and U residues were used.

根据顺序分析所获得的资料按照碱基配对的原则可以折迭成二级结构,即tRNA-样结构,作为一个例子图5是参照Rietveld(1982)的模型进行折迭的CYVV RNA 3'末端tRNA-样结构。

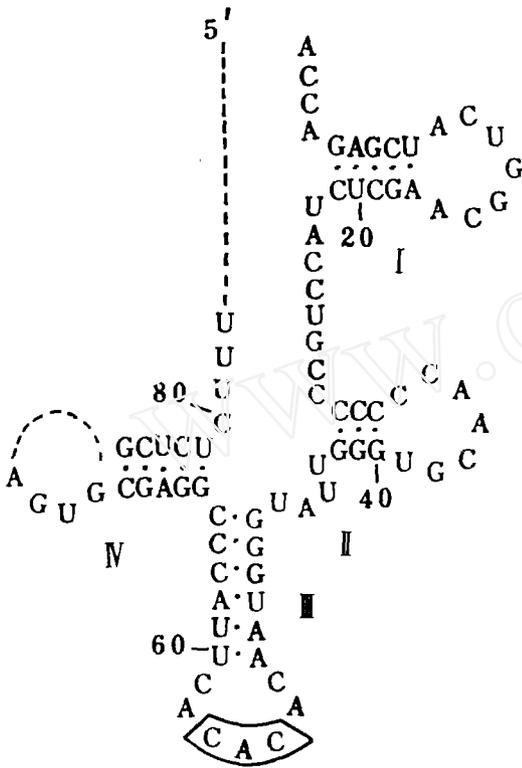


图5 CYVV RNA 3' 末端tRNA-样结构。  
I、II、III和IV代表四个发夹样结构。编号  
从3' 末端开始。方框区域为反密码子。  
Fig5 The tRNA-like structure of  
the 3' end of CYVV RNA. I, II, III  
and IV represent the structure of  
hairpin. Numbering is from the 3'  
end. The boxed region indicates  
the anticodon.

3. tRNA-样结构 Pinck 和 Yot (1970) 第一次证明 TYMV 的基因组 RNA 在缬氨酸 tRNA-合成酶的催化下与缬氨酸结合。以后烟草花叶病毒(TMV)和雀麦花叶病毒(BMV) RNA的3'末端也能特异地接受氨基酸, Haenni (1982) 和 Joshi (1983) 已有详细评述<sup>[3,4]</sup>。一般说来属于同一组病毒RNA接受相同的氨基酸。病毒RNA除与氨基酸-tRNA合成酶有关外, 还和其它一些 tRNA 特异酶有关系。如 tRNA-核苷酰转移酶, tRNA-甲基转移酶, 延长因子EF-1和EF-Tu以及肽基-tRNA水解酶等<sup>[3]</sup>, 这些资料表明病毒RNA末端存在着tRNA的性质和结构特点, 这也正是称它们为tRNA-样结构的原因。

Briand和Silberklang (1977)<sup>[6,7]</sup>对TYMV RNA 3'末端一级结构研究发现这些核苷酸的顺序并不折迭成已知典型tRNA“三叶草”结构, 而且还缺乏构成tRNA特征的稀有碱基。Rietveld (1982)<sup>[8]</sup>根据化学修饰和酶消化的方法提出TYMV RNA 3'末端tRNA-样结构模型(图1)。我们研究的五种病毒RNA参照Rietveld的模型折迭, 其结果它们均呈十分相似的tRNA-样结构(图6)。从此二级结构模型可以看到它们有如下共同特征。(1)和典型的tRNA“三叶草”结构不同的是它们有发夹I区域, 5'末端不参与tRNA-样结构的组成;(2)病毒RNA 3'末端片段碱基顺序彼此差别很大并有许多碱基取代;(3)tRNA-样结构与tRNA<sup>val</sup>结构的共同特点是它们无例外地有……CC(A)<sub>OH</sub> 3'末端的碱基顺序, 氨基酸化作用发生在其末端;(4)病毒RNA 3'末端片段的发夹II、III和IV相当于典型tRNA的T $\psi$ C, 反密码子和双氢尿嘧啶环和干。在所研究的芜

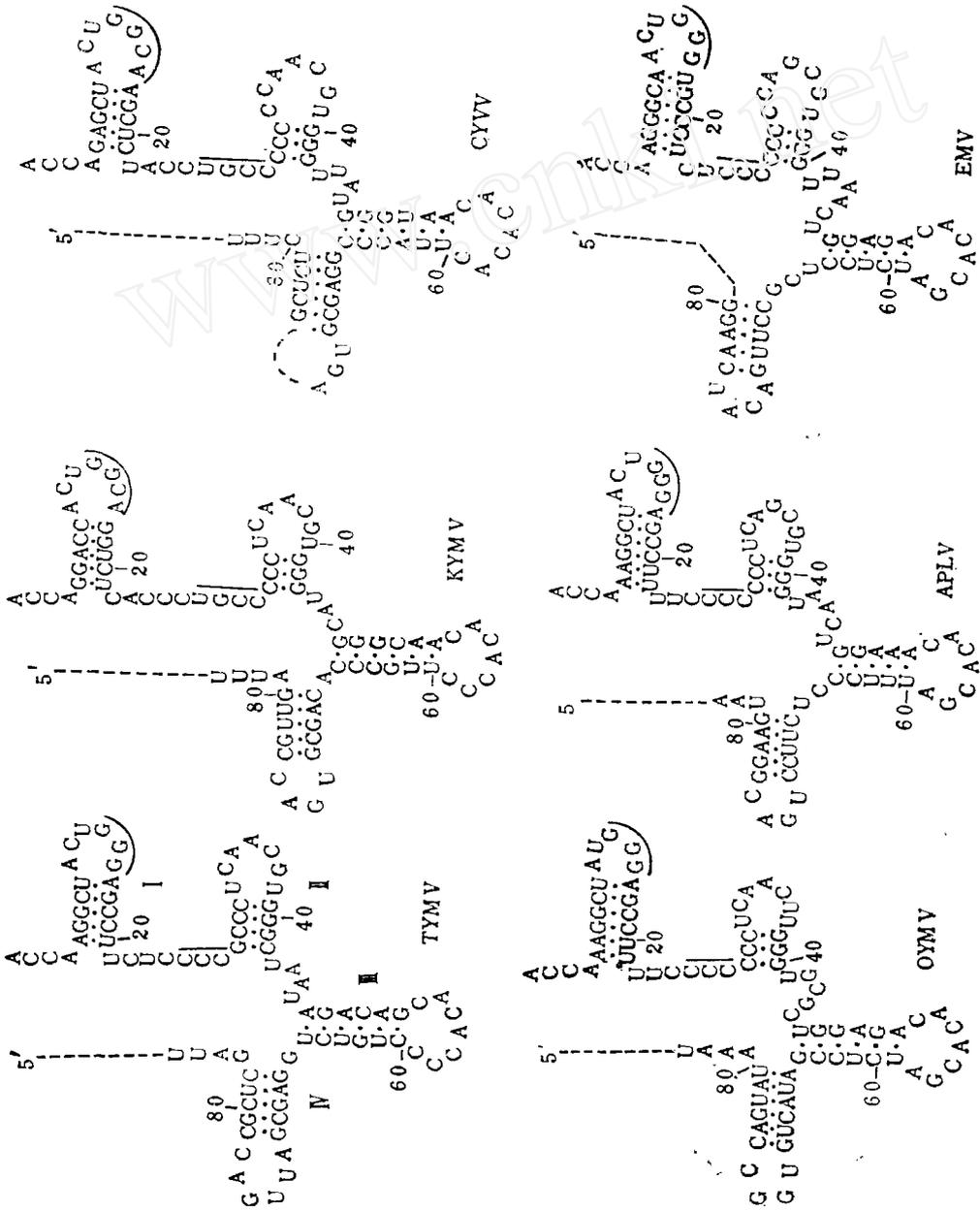


图6 六种芜菁黄花叶病毒RNA 3'末端tRNA-样结构。本研究所测定的核苷酸顺序按照 Rietveld (1982) TYMV RNA 3'末端tRNA-样区域的二级结构模型折迭。核苷酸顺序编号从3'末端开始。病毒的缩写符号见正文。划线的部分为碱基互补区域。

Fig. 6 The tRNA-like structure at the 3' terminus of six tymoviral RNAs. The sequences determined in this study are folded according to the model of the secondary structure of the tRNA-like region of TYMV RNA (Rietveld et al, 1982). Numbering is from the 3' end. The abbreviations of the viruses are the same as those in the text. Overlined regions indicate complements.

菁黄花叶病毒RNA 3'末端片段的tRNA-样结构中,反密码子CAC均位于CACAC残基顺序内。CAC正好是缬氨酸的反密码子;(5)图6所有tRNA-样结构中的干I、干II和环I的GGG(或ACGG)与单链区域的CCC(或UGCC)的碱基配对所组成的12个碱基对的连续堆砌成氨基酸接受臂与tRNA的氨基酸接受臂碱基对的数目相同。

4. tRNA-样结构的可能作用 大部分植物病毒RNA 3'末端缺乏poly(A)碱基串,代之以200个左右不被翻译的核苷酸残基顺序,tRNA-样结构便位于这个区域内。它们和tRNA一样具有相同的酶促氨酰化作用。尽管它们的一级和二级结构十分不同,却能为同一个酶系统所认识,说明在遗传信息的传递上具有重要意义。Pinck和Yot<sup>[1,2]</sup>首先报告TYMV RNA,具有tRNA样性质,能与缬氨酸进行氨酰化反应。其后陆续发现另外14种病毒RNA亦能接受氨基酸,因而人们可能会想像病毒RNA的tRNA-样结构具有tRNA运送氨基酸那样的功能。事实情况不是这样。许多病毒RNA并不具有这种酯化作用,蚕豆斑纹病毒(broad bean mottle virus, BBMV)和黄瓜花叶病毒(cucumber mosaic virus, CMV)的tRNA-样结构没有适当的反密码环和干,也没有相应的反密码子。另外,在形成氨基酸-tRNA、延长因子和GTP复合物时,GTP的结合力太弱,不可能有效地占据核糖体上的A位<sup>[4]</sup>。所有这些表明tRNA-样结构不大可能在翻译水平上有重要意义。氨酰化作用仅是暂时的现象或只有一部分病毒RNA分子参与此过程。不能排除一部分病毒基因组产生可以进行氨酰化作用的3'末端片段。

Florentz等<sup>[13]</sup>提出一种新的结构模型,在感染的细胞内TYMV RNA有线形和环式两种构型处于动态平衡。缬氨酰-tRNA合成酶和tRNA-样结构结合,使靠近5'末端侧的起始密码AUG在线形构型中游离,而在环式构型中AUG被结合在比较复杂的结构内不能发挥起始密码子的作用。除TYMV RNA外, TMV, CMV和BMV-RNA等的3'和5'末端也存在类似的可能碱基配对关系。因而他们认为tRNA-样结构是基因表达的一种调节信号。近来确定了某些病毒RNA 3'末端片段的tRNA-样结构在理解分子构型方面取得某些进展<sup>[14,15]</sup>,但是3'末端tRNA-样结构在病毒的生活周期中的功能仍然有待进一步阐明。

## 参 考 文 献

- [1] Pinck M et al., 1970. *Nature*, 226: 945.
- [2] Yot P et al., 1970. *Proc Natl Acad Sci USA*. 67: 1345.
- [3] Haenni A L, 1982. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 27: 85
- [4] Joshi S et al., 1983. *TIBS*. 402.
- [5] Koenig R et al., 1981. *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis* (Editor: E. Kurstak) P.33, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- [6] Briand J P et al., 1977. *Eur J Biochem*. 72: 453.
- [7] Silberklang M, 1977. *Eur J Biochem*. 72: 465.
- [8] Rietveld K et al., 1982. *Nucleic Acids Res*. 10: 1929.
- [9] Rether B et al., 1974. *Eur J Biochem*. 40: 231.
- [10] Peattie D, 1979. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76: 1760.
- [11] 蒋秉坤, 1987. 蚌埠医学院学报 12: 19.
- [12] Brisnd I P et al., 1976. *Proc Natl Acad Sci USA*. 73: 737.
- [13] Florentz C et al., 1984. *FEBS Letters* 176: 295.
- [14] Florentz C et al., 1982. *EMBO Journal* 1: 268.
- [15] Rietveld K et al., 1984. Rietvled K., Ph.D.Theses p.121, University of Leiden, The Netherlands.

## The tRNA-like Structure of the 3' End of Some Plant Viral RNAs

Jiang Bing-kun

(Bengbu Medical College, Bengbu)

Alex van Belkum, Cornelis W.A. Pleij, and Leendert Bosch

(University of Leiden, The Netherlands)

The nucleotide sequences of 3' end region of some plant viral RNAs (KYMV, CYVV, OYMV, APLV, and EMV) are determined with direct chemical method by Peattie (1970). The possible secondary structures at 3' end of the RNAs have been presented on the basis of nucleotide sequences, which are folded according to the model of TYMV RNA (Rietveld et al, 1982). The tRNA-like structures at of the 3' terminus of RNA of KYMV, CYVV, OYMV, APLV and EMV are all in perfect agreement. The secondary structures for valine-specific tRNA-like structure generally display striking similarity to those of eukaryotic tRNA<sup>val</sup>. An anticodon (CAC) for valine at corresponding position was found in the tRNA-like structure. Coaxial stacking of 12 base pairs in aminoacyl arm can be obtained by base pairing of nucleotides for the six plant viral RNAs. There is a .....CC(A)<sub>OH</sub> end at 3' terminal region. The experimental results support the model of secondary structure at 3' end of the TYMV RNA (Rietveld, 1982).

The possible functional role of viral tRNA-like structures is discussed briefly.