

与 TMV-RNA 装配起始位点互补的 cDNA 片段对 TMV 体外装配的抑制

彭海 沈学仁 吴建华 龚祖坝

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

摘要

合成了与 TMV-RNA 病毒装配起始位点互补的、长度为二十个核苷酸的 DNA 片段。该片段用 ^{32}P 标记后, 代替反义 RNA (antisense RNA) 与 TMV-RNA 进行硝基纤维素膜点杂交和溶液杂交。结果表明, 该 cDNA 片段在两种条件下均能与 TMV-RNA 进行杂交。将溶液杂交的 RNA-cDNA 复合体经酒精沉淀, 再与 TMV 衣壳蛋白的 20S 聚合体制剂进行体外装配, 用测定 310nm 吸收光谱变化和电子显微镜观察的方法鉴定装配结果。实验证明, 该 cDNA 片段与 TMV-RNA 杂交后抑制了装配起始位点的活力, 从而使 TMV 病毒颗粒的装配不能完成。这一结果提示, TMV 基因装配起始位点顺序的 cDNA 和反义 RNA 能够在体外抑制 TMV 病毒颗粒的装配。

关键词: 烟草花叶病毒 cDNA 片段 杂交 体外装配

自1981年 Tomizawa 等^[1]首次报道了反义 RNA (antisense RNA) 在质粒 Col EI DNA 复制中的调控作用以来, 已有很多关于反义 RNA 方面的研究报道。反义 RNA 对基因的调控是通过 RNA-RNA 相互作用来实现的, 有高度的专一性。根据靶 RNA 的功能, 调控可发生于复制、转录和翻译等不同水平。反义 RNA 能够抑制基因表达这一发现, 使得利用反义 RNA 来人为地调控基因成为可能。用这种反义 RNA 系统来控制有害基因的表达已有报道。例如, 1987年美国已有人用反义 RNA 抑制了劳氏肉瘤病毒 (Rous sarcoma virus) 的复制^[2]。烟草花叶病毒 (TMV) 是一种植物正链 RNA 病毒, 其基因结构已经阐明, 在 TMV-RNA 近 3' 端有一个装配起始位点, TMV 的装配就是由一个衣壳蛋白的 20S 聚合体与该区域结合开始的^[3]。如果以此装配起始点顺序为靶 RNA, 应用反义 RNA 作为一种调控手段, 将有可能达到抑制 TMV 病毒颗粒装配的目的。为此, 我们合成了一个与靶 RNA 顺序互补的 cDNA 片段代替反义 RNA 在体外试验它对 TMV 装配的抑制作用。

材料和方法

一、TMV 的制备 TMV 普通株感染的烟叶 (由浙江省农业科学院病毒室提供) 经 8.5% 正丁醇处理, 两次 PEG 沉淀, 两次差速离心和一次氯化铯梯度离心, 最终获得纯 TMV 制剂。

本文于1989年1月9日收到

浙江省农科院病毒室林瑞芳、金登迪等同志为本实验接种、培育了烟草材料, 特此致谢。

本研究由中国 863 高技术基金资助。

二、TMV-RNA 的制备 纯 TMV 制剂经酚抽提, 酒精沉淀, 得 TMV-RNA。RNA 纯度经紫外测定和电泳鉴定。

三、cDNA 的合成 用 ABI 公司 381A 型 DNA 合成仪合成了一个长度为廿核苷酸的 cDNA 片段。

四、DNA 5' 末端 ^{32}P 标记 参照 Maxam 和 Gilbert 的方法^[1]。

五、硝基纤维素膜点杂交 参照 Kafatos 等的方法^[2], 将 TMV-RNA 固定在硝基纤维素膜上, 与 ^{32}P 标记的 cDNA 片段进行杂交。

六、溶液杂交及杂交率测定

1. TMV-RNA 预处理 TMV-RNA 于沸水浴中煮 1 分钟, 立即置冰浴冷却。

2. 微量溶液杂交 0.83 pmol/ μl TMV-RNA (经预处理或未经预处理) 5 μl ; 1.59 pmol/ μl ^{32}P 标记 cDNA 2 μl ; 10 倍 Denhardt 杂交缓冲液 (0.2% Ficoll-400, 0.2% 聚乙烯吡咯烷, 0.2% 牛血清白蛋白, 0.1% SDS, 溶于 3 倍 SSC, pH7.0) 5 μl , 混合后于 68°C 保温 19 小时。取 10 μl 进行 7.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (50 伏, 18 小时), 然后压片曝光 12 小时。

3. 杂交率测定 取保温后的样品 2 μl , 点于滤纸片上, 除对照外均用 10% TCA 洗 6 次及 95% 乙醇洗 3 次, 去除游离的同位素及同位素标记物, 然后测其 cpm, 再计算杂交率。

七、TMV 衣壳蛋白的 20S 聚合体制备 参照 Fraenkel-Conrat 的醋酸法^[3], 由纯 TMV 制剂得衣壳蛋白, 再对 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 于室温下透析 48 小时, 得 20S 聚合体。其浓度为 2.1 mg/ml。

八、TMV-RNA 与 cDNA 的杂交体 (RNA-cDNA) 的制备 100 μl 杂交溶液 (2.48 pmol/ μl TMV-RNA 17.5 μl , 45.5 pmol/ μl cDNA 20 μl , 10 倍 Denhardt 杂交缓冲液 25 μl , 消毒重蒸水 37.5 μl) 于 68°C 保温 19 小时后, 经酒精沉淀, 得 RNA-cDNA。其浓度为 1.09 mg/ml。

九、TMV 的体外装配及测定 参照 Butler 和 Klug 的方法^[7]。装配反应在 0.1 mol/L 焦磷酸缓冲液 (pH7.0) 中进行。TMV-RNA (或 RNA-cDNA) 与 20S 聚合体的重量比约为 26:1。在室温下样品混合后立即用 310 nm 波长每隔 1 分钟一次光吸收, 共测 10 分钟。然后取一滴样品置于铜网上, 用 1% 磷钨酸染色, H-300 电镜下观察。

结果与讨论

一、与 TMV-RNA 装配起始顺序互补的 cDNA 合成

在 TMV-RNA 近 3' 端处存在有 TMV 装配起始的顺序, 约 90 个核苷酸左右。TMV 衣壳蛋白的 20S 聚合体首先和这一起始位点结合, 然后开始整个病毒的装配过程。据文献报道^[3], 该顺序有三个基本特征: 1. 有一个发夹结构; 2. 在发夹结构的顶部有一个七核苷酸的靶顺序; 3. 在靶附近的顺序中每第三个碱基都是嘌呤 (图 1)。这些特征与衣壳蛋白 20S 聚合体的识别和结合有密切的关系。我们所合成的 cDNA 片段就是与这一顺序中包括靶顺序在内的长度为二十个核苷酸的顺序互补的 (图 2)。

二、TMV-RNA 与 cDNA 杂交

硝基纤维素膜点杂交的结果表明, 我们所合成的 cDNA 可以与 TMV-RNA 进行互补杂交。为了获得在 TMV 体外装配试验中所必需的 RNA-cDNA 复合体, 我们进行了微量溶液杂交。实验结果表明, 在溶液中合成的 cDNA 也可与 TMV-RNA 进行杂交 (图 3)。由于合成的 cDNA 仅为 20 个核苷酸, 其分子量远小于 TMV-RNA 的分子量, 因此

图1. TMV 普通株基因 RNA 装配起始顺序的可能二级结构。
核苷酸计数由 3' 末端开始。方框显示靶顺序。

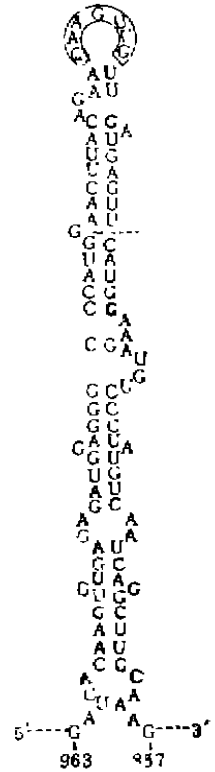


Fig.1 A possible secondary structure folded in the assembly origin of TMV common strain. The numbering of nucleotides begins with 3'-terminal end of genomic RNA. The box indicates the target sequence.

a. 5'-----CCCCCAUGGAACUACAGAAAGAAGUUGUUGAUGAGUUCAUGGAAGAUGUCC-----3'
b. 3' TGTCTTCTTCAACA ACTACT 5'

图2. 合成 cDNA 片段 (b) 和部分 TMV 装配起始位点 (a) 的核苷酸顺序。横线显示靶顺序。

Fig 2 Nucleotide sequences of synthesized cDNA fragment (b) and partial assembly origin of TMV-RNA (a). The line indicates the target sequence.

TMV-RNA 和该 cDNA 的杂交体在聚丙烯酰胺凝胶电泳上的迁移率与 TMV-RNA 基本相同。经预处理的 TMV-RNA 与 cDNA 的杂交体在电泳上迁移较慢是 RNA 的二级结构被加热预处理破坏从而导致 RNA 分子伸展的缘故。

三、杂交率的测定

由各样品所测得的 cpm (表 1), 按下式计算:

表 1 杂交率测定试验

Table 1 Results of hybridization ratio assay

Samples	Washed by 10% TCA 6 times	Washed by 95% ethanol 3 times	cpm
1. TMV-RNA Control	—	—	64723
2. TMV-RNA Control	+	+	5409
3. TMV-RNA + ³² P-cDNA	+	+	29326
4. Heat-shocked TMV-RNA + ³² P-cDNA	+	+	53784

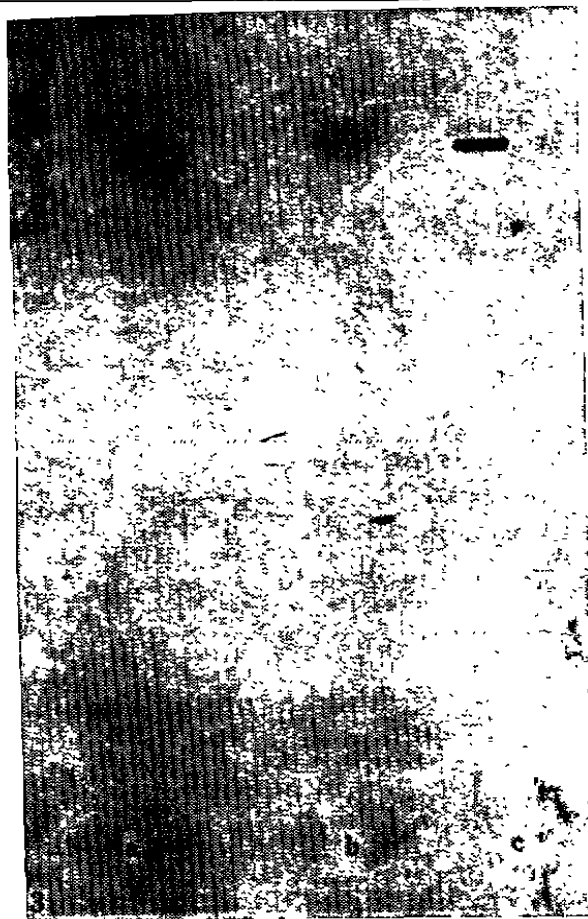


图 3. TMV-RNA 与 cDNA 杂交体的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。 a. TMV-RNA 未经预处理；
b. TMV-RNA 经预处理； c. TMV-RNA 标准。

Fig. 3 PAGE of complexes of TMV-RNA and cDNA fragment a. Complex of untreated TMV-RNA and cDNA fragment; b. complex of heat-shocked TMV-RNA and cDNA fragment; c. TMV-RNA as marker.

$$\text{杂交率} = \frac{\text{杂交样品的 cpm} - \text{经洗涤对照的 cpm}}{\text{未经洗涤对照的 cpm} - \text{经洗涤对照的 cpm}}$$

未经预处理的 TMV-RNA 的杂交率为 40.0%，经预处理的 TMV-RNA 的杂交率为 81.5%。说明 RNA 链伸展开后杂交率有显著的提高。

四、体外装配的抑制

据文献报道^[7,8]，TMV 体外装配时 310nm 处光吸收的增加与装配的程度大致成正比。从体外装配的 310nm 吸收光谱变化的时间曲线（图 4）可看出，仅 TMA-RNA 加 20S 聚合体的样品之曲线呈上升趋势。而 TMV-RNA 与 cDNA 的复合体加 20S 聚合体的样品和仅有 20S 聚合体的样品，其 310nm 光吸收则不随时间延长而增加。上述各样品再经电镜检查，仅在 TMV-RNA 加 20S 聚合体的样品中看到已装配的 TMV 病毒颗粒（图 5）。说明 TMV-RNA 和 cDNA 的复合体不能使 TMV 的体外装配完成。

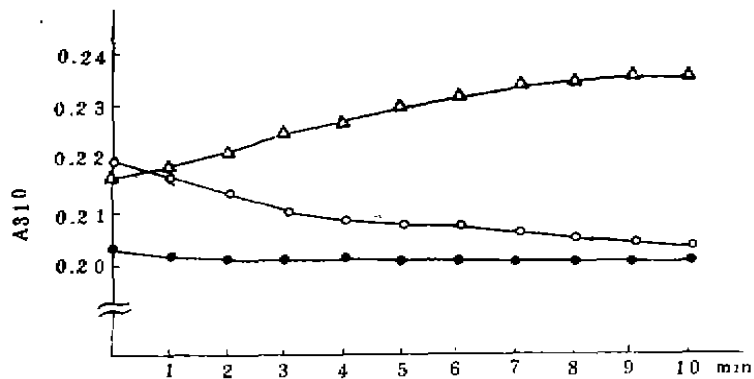


图4 TMV 体外装配试验。310nm 光吸收随时间的变化

Fig.4 Time course of TMV in vitro assembly monitored by absorption at 310nm.

- 20S aggregates+TMV-RNA+cDNA
 —△—△— 20S aggregates+TMV-RNA
 —●—●— 20S aggregates

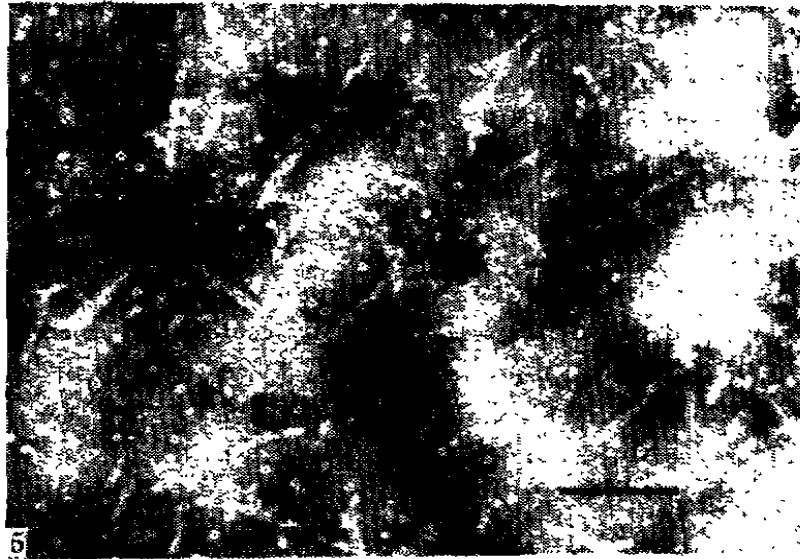


图5 体外装配的 TMV 电镜照片。箭头所指为 20S 聚合体。标尺为 200nm

Fig.5 Electron micrograph of in vitro assembled TMV. The arrow shows 20S aggregates. The bar represents 200nm.

上述结果证明, TMV 基因装配起始位点顺序的 cDNA 能够在体外抑制 TMV 病毒颗粒的装配。同时表明, 该顺序的反义 RNA 也可能起到同样的抑制作用。我们目前正在进一步试验, 观察装配起始位点的反义 RNA 或 cDNA 能否在寄主细胞体内抑制 TMV 病毒颗粒的装配。

参 考 文 献

- [1] Tomisawa, J.—I. et al., 1981, *Proc.Hall.Acad.Sci.U.S.A.* 78 : 1421.
[2] Chang, L.—J. and Stoltzfus, C.H., 1987, *J.Virol.* 61 : 921.
[3] Okada, Y., 1986, *Adv.Biophys.* 22 : 95.
[4] Maxam, A.M. and Gilbert, W., 1980, *Methods Ehzymol.* 65 : 499.
[5] Kafatos, E.C. et al., 1972, *Nucleic Acids Res.* 7 : 1541.
[6] Fraenkel-Conrat, H., 1957, *Virology* 38 : 497.
[7] Butler, P.J.C. and Klug, A., 1971, *Nature New Biology* 289 : 47.
[8] Smith, C.E. and Lauffer, M.A., 1967, *Biochemistry* 6 : 2457.

The cDNA of Assembly Origin Sequence in TMV Genome Inhibiting TMV Assembly in Vitro

Peng Hai, Shen Xue-ren, Wu Jian-hua, Gong Zu-xun
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)

A 20 nucleotides DNA fragment which is complementary with the assembly origin of TMV-RNA was synthesized. Instead of antisense RNA, the DNA fragment could hybridize with TMV-RNA in nitrocellulose dot hybridization and in mini-volume solution hybridization assays. Using RNA-cDNA complex and 20S aggregates of TMV coat protein, the TMV in vitro assembly reaction experiment, which was monitored by 310nm absorption spectrum and electron microscopy, showed that TMV in vitro assembly could not proceed in results of inhibition of the activity of assembly origin by the cDNA.

Key words, Tobacco mosaic virus (TMV) cDNA fragment
Hybridization In vitro assembly