

## 卫星 RNA 对黄瓜花叶病毒基因组 RNA 体外合成的影响\*

杨海花 康良仪 赵大健\*\* 田波

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

关键词 / 卫星 RNA, 黄瓜花叶病毒, 依赖 RNA 的 RNA 聚合酶, 体外合成

利用卫星 RNA 生防制剂控制田间的番茄、青椒、烟草等由黄瓜花叶病毒(CMV)引起的病毒病取得了显著的防病增产效果<sup>[1,2]</sup>。为了进一步探讨卫星 RNA 防病的机理,更好地利用卫星 RNA 防治病毒病提供理论依据,用含卫星 RNA 的 CMV 弱毒系和不含卫星 RNA 的弱毒 CMV 保护接种后攻强病毒的实验证明,含卫星 RNA 远大于不含卫星 RNA 的弱毒 CMV 的保护效果,二者作用的时间也不同,前者主要表现在保护接种晚期,后者主要在早期。卫星 RNA 保护接种时间越长,防病效果越显著,这说明卫星 RNA 的防病作用主要是在病毒复制水平上起作用<sup>[3,4]</sup>。

本研究目的在于从感染含卫星 RNA CMV 的植物组织中分离纯化 CMV 特异的依赖 RNA 的 RNA 复制酶,并用于研究卫星 RNA 的合成及在卫星 RNA 存在下对病毒基因组 RNA 体外合成的影响。

## 材料与方 法

1 病毒 不含卫星 RNA 的 CMV-B 和含有卫星 RNA-1 的 CMV-B-1 以及含有卫星 RNA-D 引起番茄坏死症状的 CMV-D。三种毒原分别在防虫温室的三生烟(*Nicotiana tabacum* Sansum NN)上繁殖。接种后一星期采收烟叶,洗净。按 2 mL/克鲜叶加入 0.5 mol/L 柠檬酸钠缓冲液, pH 6.5(含 0.1% 巯基乙醇),在高速组织捣碎器中匀浆 15 min,再加入等体积的氯仿,继续匀浆 15 min,匀浆物在 8000 r/min, 4℃,离心 20 min,吸取上清液,加入 10% (W/V) PEG6000, 4℃,搅拌,直至 PEG 完全溶解为止,置 4℃ 过夜, 9000 r/min, 4℃,离心 20 min,按 0.5 mL/克鲜叶将沉淀悬浮在 TE 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1.0 mmol/L EDTA), 13000 r/min, 4℃,离心 15 min,上清液保存在 4℃,用于接种物。

2 病毒纯化 按以前方法<sup>[5]</sup>进行。

3 病毒基因组 RNA 的抽提 按以前方法<sup>[3]</sup>进行。

4 黄瓜子叶中总核酸的抽提 采收播种后未出真叶的黄瓜子叶,在研钵中,加入液氮冷冻、捣碎,按 1:1(W/V)加入 STE 缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 7.0, 0.15 mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA)研磨呈浆状,加入 1.5 倍体积的水饱和酚,再加 1.5 倍体积的氯仿-异戊醇(25:1)继续研磨,研磨物 8000 r/min, 4℃,离心 20 min,水相加 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 及 3 倍体积无水乙醇, -20℃ 过夜, 10000 r/min, 4℃,离心 20 min,沉淀

本文于 1996 年 8 月 19 日收到, 1996 年 9 月 2 日修回

\* 国家自然科学基金资助项目

\*\* 南开大学生物系, 天津 300071

用70%乙醇洗一次,悬浮在TAE缓冲液(40 mmol/L Tris-Ac, pH 8.0, 2 mmol/L EDTA)中,再用无水乙醇沉淀一次,离心后,沉淀用70%乙醇洗一次后,溶于无菌TE(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA)缓冲液中,定核酸浓度,分装,置-20℃保存备用。

**5 感病组织中依赖RNA的RNA聚合酶的分离和纯化** 播种在防虫温室,自然光照条件下的黄瓜出苗后,用粗提的CMV-B-1制备物在黄瓜子叶的正反面都接种,4 d后,采收黄瓜子叶,用于分离纯化依赖RNA的RNA聚合酶。

以下所有操作都在4℃下进行,所有的溶液都用DEPC处理过的无菌水配制,所用器皿都洗净、烘干、灭菌。

具体操作如下:50 g黄瓜子叶,加100 mL缓冲液A(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L KCl, 20% (V/V)甘油, 0.1%巯基乙醇, 1 μmol/L leupeptin, 1 μmol/L aprotinin 1 μmol/L pepstatin, 50 μmol/L aprotinin)及少量金钢砂研磨,研磨物3000×g, 4℃,离心10 min,上清于30000×g, 4℃,超速离心30 min,沉淀溶于6 mL缓冲液B[50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.2, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L DTT, 5% (V/V)甘油, 1 μmol/L leupeptin, 1 μmol/L pepstatin, 50 μmol/L aprotinin]。加10% (V/V) NP-40和750 mmol/L KCl至终体积10 mL,搅拌30 min,于100000×g, 4℃,超速离心30 min,上清液补加5 mL缓冲液B,混匀后,样品液于15~30%甘油线型梯度(用含0.5% NP-40和100 mmol/L KCl的缓冲液B配制), 80000×g, 2℃离心20 h,分部收集,每管1.4 mL,测每管的酶活,收集含酶活的峰,装在透析袋中。对DEPC处理的无菌水透析48 h,中间更换一次水。透析物经浓缩后,置-70℃冷冻2~4 d,使酶液呈干粉状,将其溶于30%甘油溶液中,于-20℃保存备用。在此条件下,数月内酶活不丧失。

**6 依赖RNA的RNA聚合酶活性测定** 依照文献<sup>[6,7]</sup>报道的方法,稍加修改。25 μL反应混合物[10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.2, 10% (V/V)甘油, 10 mmol/L KCl, 25 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 4 mmol/L DTT, 各1 mmol/L ATP, CTP, GTP, 2.0 u Ci<sup>3</sup>H-UTP, 200 μg/mL模板RNA, 酶液15 μL],在反应管中,30℃,保温1.5 h,加入25 μL 20%三氯乙酸,置冰浴中30 min后,全部点在衬有DE-81滤纸园片的抽滤器中,用10%三氯醋酸洗6次,用无水乙醇洗两次,每次各用10 mL,待滤纸干后,置含有闪烁液的瓶中,在液闪仪上测定放射性计数。

**7 体外合成产物分析** 500 μL反应混合物[10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.2, 10 mmol/L KCl, 0.42 μg/mL放线菌素D, 25 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mmol/L EDTA, 4 mmol/L DTT, 20 uCi α-<sup>32</sup>P-UTP或α-<sup>32</sup>P-GTP, 200 μg/mL模板RNA, 350 μL酶液,各1 mmol/L ATP, CTP和GTP],在反应管中,30℃,保温1 h后,转移到冰浴中,加入等体积的水饱和酚-氯仿(1:1 V/V),抽提10 min, 12000 r/min, 4℃离心,沉淀真空干燥后,溶于含双指示剂的变性缓冲液(90%甲酰胺, 10% DEPC处理过的水, 0.5×TBE, 0.25%溴酚兰, 0.25%二甲苯兰)中,在含7 mol/L尿素的5%聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离。电泳完毕后,将胶浸泡在10%甲醇, 10%乙醇溶液中固定30 min,取出在干胶器中将胶干燥后,放在暗盒中,置-70℃ 2~15 d进行放射性自显影。

## 结果与讨论

### 1 依赖RNA的RNA聚合酶的纯化及酶活

按照材料和方法中所述,经100000×g超速离心的样品溶液在15~30%等密度甘油线型梯度离心后,分部收集,每管1.4 mL,测定各分部的酶活性,在20%和25%甘油浓度处各出现一个酶活性峰,称为峰I(P1)和峰II(P2)(见图1),分别收集两峰的各管,浓缩后,得到各自的干粉,溶于30%甘油中保存在-20℃备用。在此条件下保存半年酶活性不丧失。进一步分析用此两峰的酶制品在体外合成的产物证明,P2的酶活性有模板特异性,能合成全长的CMV

dsRNA 产物,而 P1 酶合成的产物主要是小分子片段。因此,本实验中所用的是 P2 酶。

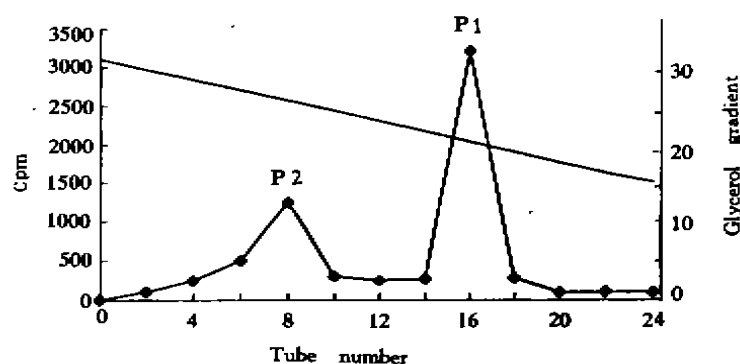


图1 甘油梯度离心后酶活性分布

Fig. 1 Distribution of RNA-dependent RNA polymerase activities after centrifugation in glycerol gradient

## 2 卫星 RNA 和黄瓜花叶病毒基因组 RNA 的体外合成

比较了 P2 酶利用含卫星 RNA 的 CMV RNA 和不含卫星 RNA 的 CMV RNA 为模板的 RNA 合成效率。反应混合物中除四种底物外,以  $\alpha$ - $^{32}$ P-UTP 或  $\alpha$ - $^{32}$ P-GTP 作产物标记。反应产物经酚-氯仿抽提,5% 变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,胶干燥后,放射性自显影,结果见图 2。

图 2 结果说明,P2 酶能利用含卫星 RNA 的 CMV-RNA 和不含卫星 RNA 的 CMV-RNA 为模板,合成全长的卫星 RNA 和 CMV 基因组 RNA,产物为 dsRNA。但用黄瓜子叶总 RNA 为模板则没有任何产物合成,因此酶具模板特异性,既能用 CMV 基因组 RNA 为模板,又能以卫星 RNA 为模板合成相应的产物。这说明卫星 RNA 和 CMV 基因组 RNAs 是利用同一酶系来合成的。

从总的放射性掺入来看,CMV-B 基因组 RNAs 合成最强,而 CMV-B-1 和 CMV-D 基因组 RNAs 合成较弱。从掺入到卫星 RNA 及 CMV 基因组 RNAs 各组份中的放射性看,其强弱程度不同,以 CMV-B-1 RNA 为模板时,几乎有 50% 的放射性掺入到卫星 RNA 中,RNA1、RNA2 和 RNA4 有等量的掺入,而 RNA3 掺入量变化不大;当以 CMV-B RNA 为模板时,约有 60% 放射性掺入到 RNA1、RNA2 和约 20% 掺入到 RNA4 中,掺入 RNA3 变化不大;当以 CMV-D RNA 为模板时,约 40% 放射性掺入到 RNA4 中,20% 掺入到 RNA1 和 RNA2 比 CMV-B 大为降低,RNA3 变化不大。

上述结果说明,不含卫星 RNA 的 CMV-B 基因组 RNA 的合成要高于含卫星 RNA 的 CMV-B-1 和 CMV-D 基因组 RNA 合成;引起病状致弱的 CMV-B-1 中的卫星 RNA 合成略高于引起坏死的 CMV-D 中的卫星 RNA 合成,且前者明显抑制 CMV 亚基因组 RNA4 合成,后者则明显抑制 CMV 基因组 RNA1 和 RNA2 的合成,而增强 RNA4 的合成。

有关感染 CMV 的组织中病毒特异的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶的研究已有几个报道。Hayes 等<sup>[8]</sup>成功地分离和纯化到均一的黄瓜花叶病毒复制酶,证明此酶由 CMV 编码的两个组

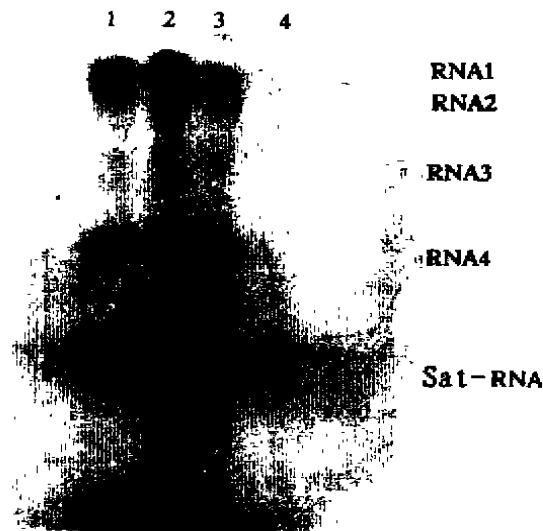


图 2 卫星 RNA 对 CMV 基因组 dsRNAs 合成的影响

Fig 2 Effect of CMV-dsRNA synthesis by satellite RNA

1: CMV-B-1 RNAs + satellite RNA1

2: CMV-B RNAs

3: CMV-D RNAs + satellite RNA-D

4: Total RNAs from healthy cucumber cotyledons

份和寄主编码的一个 50 kD 蛋白共同构成。Wu 等<sup>[9]</sup>从感染 CMV 的烟叶中分离纯化到 CMV 特异的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶, 证明此酶在体外能合成卫星 RNA CARNA 5-L 和 -S, 但不能合成同一病毒组的花生矮化病毒的卫星 RNA PARNAS, 且以同等的合成效率合成 CMV 基因组 RNAs 及其卫星 RNA。本研究实验结果证明, 从感染含卫星 RNA CMV 的黄瓜子叶中分离纯化到的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶, 在体外能以 CMV 基因组 RNAs 及其卫星 RNA 为模板合成全长的相应 dsRNA, 这与 Wu<sup>[9]</sup>的结果一致。然而实验结果还说明, 致弱卫星 RNA (CMV-B-1) 存在时, CMV 基因组 RNA 合成受到抑制, 尤其明显抑制 RNA4 的合成, 而引起植物坏死的卫星 RNA (CMV-D) 存在时则增强 RNA4 的合成, 因此推测, 卫星 RNA 可能是通过某种机制调节病毒亚基因组 RNA4 的合成, RNA4 含有外壳蛋白基因, 它的抑制或增强影响到外壳蛋白合成, 从而改变 CMV 引起的植物病状。

### 参 考 文 献

- 1 田波, 张秀华, 邱并生等. 一种新的病毒病防治方法——用卫星核糖核酸生物防治黄瓜花叶病毒病. 科学通报, 1986, 6: 479
- 2 Po Tien, Gusui Wu. Satellite RNA for the biocontrol of plant disease. Advance in Viurs Research, 1991, 39: 321-339
- 3 康良仪, 毋谷穗, 徐水蝉等. 带卫星 RNA 黄瓜花叶病毒保护接种的植物病毒积累与基因组 RNA 合成及病状表达. 病毒学报, 1988, 4(1): 45-52
- 4 毋谷穗, 康良仪, 田波. 黄瓜花叶病毒株系间交叉保护作用与卫星 RNA 干扰作用的比较研究. 微生物学报, 1989, 29(5):

371-377

- 5 母谷都, 康良仪, 田波. 用 A 蛋白夹层联免疫吸附法对黄瓜花叶病毒的血清学鉴定. 微生物学报, 1988, 28(3): 211-215
- 6 Mouches C, Candresse T, Bore J M. Turnip yellow mosaic virus RNA - replicase contains host and virus - encoded subunit. Virology, 1984, 134: 78-90
- 7 Lambert D, Pim Zabel, Jos Van Der Meer *et al.* Purification of a host - encoded RNA - dependent RNA polymerase from cowpea mosaic virus - infected cowpea leaves. Virology, 1982, 116: 236-249
- 8 Hayes R J, Kenneth W Buck. Complete replication of eukaryotic virus RNA *in vitro* by a purified RNA - dependent RNA polymerase. Cell, 1990, 63: 363-368
- 9 Gusui Wu, J M Kaper, E M J Janspats. Replication of cucumber mosaic virus satellite RNA *in vitro* by an RNA - dependent RNA polymerase from virus - infected tobacco. FEBS, 1991, 292(1): 213-216

## The Effect of Satellite RNAs on Replication of Cucumber Mosaic Virus Genomic RNAs *in vitro*

Yang Haihua    Kang Liangyi    Zhao Dajin    Tien Po

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

RNA - dependent RNA polymerase extracted from the cucumber cotyledons four days after inoculation by CMV - B - 1 containing attenuation satellite RNA was used to initiate synthesis of ( - ) sense RNA from ( + ) sense RNA, using both CMV genomic or satellite RNAs as templates. In presence of satellite RNA, the synthesis of CMV genomic RNA1, RNA2 and RNA4 was inhibited. However, different satellite RNAs showed different effects on the synthesis of viral RNAs. A disease - attenuated satellite RNA - 1 decreased the synthesis of CMV RNA4, but the tomato necrosis - induced satellite RNA - D increased the synthesis of CMV RNA4. The result indicated that the satellite RNAs could interfere with synthesis of CMV coat protein in the CMV - infected tissues and modulate plant symptoms by regulating the synthesis of CMV RNA1, RNA2 and RNA4.

**Key words** Cucumber mosaic virus, Satellite RNA, RNA - dependent RNA polymerase, Replication *in vitro*