

## 比较类病毒和卫星 RNA 的复制及其某些性质

陈 炜 田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京)

### 一、类病毒、拟病毒和卫星 RNA

1967—1971 年, 美国的 Diener 发现马铃薯纺锤块茎病是由分子量仅为  $1.2 \times 10^4$  的 RNA 引起的, 称作类病毒<sup>[1]</sup>。类病毒的发现是生物学史上的一个重要事件, 揭示了一类比病毒更小的病原的本质。这样小的核酸引入到适当的寄主后, 能独立复制和致病, 开拓了研究生命物质的新的领域。后经 Sanger 等人用电镜观察和采用末端标记等方法, 证明类病毒为单链共价闭合的环状分子<sup>[2]</sup>。对类病毒的一级结构和二级结构的分析表明, 类病毒在天然状态下为具有高度碱基配对的类似于棒状的结构, 由一系列的双链区和不配对的单链区排列而成, 没有三级结构的折迭<sup>[3,4]</sup>。已报道了十几种类病毒<sup>[5]</sup>, 研究得最详尽的是马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTV)。

在澳大利亚又发现类似类病毒的环状 RNA 还能与线状大 RNA (约  $1.5 \times 10^6$  道尔顿) 共同包被于外壳蛋白中<sup>[6]</sup>, 称这种类似类病毒的 RNA 为拟病毒 (Virusoid)。拟病毒也是单链共价闭合的环状 RNA 分子, 大小与类病毒相近, 但与类病毒不同, 不能独立进行侵染和复制。已发现的四种病毒中的拟病毒 RNA 的功能是不同的。绒毛烟斑驳病毒 (VTMoV) 和莴苣斑驳病毒 (SNMV) 中的拟病毒 RNA 是致侵染所必需的<sup>[7]</sup>, 而苜蓿暂时性条斑病毒 (LTSV)<sup>[8]</sup> 的拟病毒的作用类似卫星 RNA, 即病毒的大线状 RNA 可以单独复制, 而环状的拟病毒 RNA 的复制必须依赖于线状大 RNA<sup>[9]</sup>。更有趣的是,

SNMV 和 LTSV 血清学上无关, 但 SNMV 的拟病毒 RNA 与 LTSV 的大线状 RNA 一起接种时, 能够复制, 改变 LTSV 引起的症状, 包被于 LTSV 中<sup>[10]</sup>。即在 SNMV 中作为基因组部分的拟病毒 RNA, 在 LTSV 中则起卫星 RNA 的作用。

卫星 RNA (Satellite RNA) 是依赖于辅助病毒的小的线状 RNA, 与病毒 RNA 无序列的同源性, 其复制依赖于辅助病毒, 干扰辅助病毒的复制, 改变病毒症状的表现<sup>[11,12]</sup>。至今在病毒颗粒内发现的卫星 RNA 都是线状分子——除了归入拟病毒的苜蓿暂时性条斑病毒的拟病毒 RNA 外。有的卫星 RNA, 如烟草环斑病毒的卫星 RNA 能折迭成类似棒状的结构, 在含有卫星 RNA 的 TobRV 侵染的组织内发现了环状的卫星 RNA 分子<sup>[13]</sup>, 最近我们又在含有卫星 RNA 的黄瓜花叶病毒 (CMV) 侵染的组织内发现环状 RNA 分子。

类病毒、拟病毒和卫星 RNA 三者不仅分子大小相近, 在序列上亦有某些同源性。VTMoV, SNMV 和地下三叶草斑驳病毒 (SCMoV) 的拟病毒 RNA 的中心区与 PSTV, 菊花矮化类病毒 (CSV) 柑桔裂皮类病毒 (CEV) 和椰子死亡类病毒 (CCCV) 等的中心保守区是同源的<sup>[7]</sup>。烟草环斑卫星 RNA 的中心区的 50—60 个核苷酸与 VTMoV 和 SNMV 的拟病毒中心区有 80% 以上的同源性<sup>[7]</sup>。花生矮化病毒 (PSV) 的卫星 RNA (PARNA5) 有几个区域与几种类病毒有 90% 的同源性, 同源区包括大多数类病毒

具有的中心保守区<sup>[14]</sup>。此外,从对三者复制中间产物的分析,都提出了滚环复制的机制,对类病毒<sup>[15]</sup>和卫星 RNA<sup>[11]</sup>都提出了寄主的起源。三者既有区别又有联系。本文主要是比较类病毒和卫星 RNA 的复制和某些性质。

二、类病毒和卫星 RNA 侵染的组织内存在正链,负链的多聚体和环状分子

若干实验表明,类病毒在体内和体外都不编码蛋白质,因此它可能利用寄主的酶系进行复制。精确的分子杂交试验表明,在类病毒侵染的植物中不存在类病毒特有的 DNA,但在 PSTV, CEV 等类病毒侵染的植物中存在多聚体负链<sup>[16,17]</sup>,其中多数在 2—3 个单位长度。亦检测出了多聚体正链,但含量较低。用 CF-11 纤维素柱层析表明,在双链富集的部分亦是多聚体的正链富集的。此外在用 PSTV 的试验中没有检测出单位长度的负链,只有在使单链核酸酶降解的条件下用核糖核酸酶处理后,才能检测出与单位长度的正链在一起的单位长度的负链,即在高盐浓度下用核糖核酸酶处理后出现的双链的核心区<sup>[18]</sup>。这些实验表明,正链和负链的多聚体是复制的中间产物。以正链的多聚体到成熟的类病毒需要切割和环化。在酵母转移 RNA 系统中, RNA 的拼接的中间产物具有特征的回环磷酸末端(2',3')。PSTV 侵染的植物中线状 PSTV 分子亦有 2',3' 环化磷酸

末端,这是从大的分子前体切割的分子的特征。从麦胚中分离的 RNA 连接酶能够通过 2'-磷酸单酯键和 3', 5'-磷酸二酯键的形成把线状的类病毒分子连接成环状分子<sup>[18,19]</sup>。

根据这些研究提出了类病毒的滚环复制模型<sup>[16,18,20]</sup>。图 1, a 和 b 为 Branch 等人提出的两种模型<sup>[18]</sup>。(a),以侵染的正链 RNA 开始,用滚环机制拷贝成负链多聚体,再以负链多聚体为模板产生正链多聚体。从多聚体的正链切割成具有特征末端的单位长度的正链,并环化为子代的类病毒;(b)从侵染性的正链开始,经滚环机制拷贝成负链多聚体,然后切割成单位长度的负链并环化,以此环状负链为模板,在第二次滚环中拷贝成正链多聚体,切割和环化。

根据对烟草环斑病毒卫星 RNA 的复制研究提出了相似的滚环复制理论<sup>[21]</sup>。TobrV 的单位长度的卫星 RNA 称为卫星 RNAS,分析表明,在壳内包被至少 10 个具有 RNAS 序列的 RNA,电泳上每个区带的分子量的增加相当于单位 RNAS。这样在电泳上迁移慢的区带看来是 RNAS 的共价结合的多聚体。在侵染的组织中,相应的双链 RNA 在变性后给出了相应的 12 个区带的系列,它们含有 RNAS 的序列,以及同 RNAS 杂交的序列,即含有 RNAS 多聚体以及与 RNAS 互补的多聚体两者。

在成熟的卫星 RNA 即 STobrV 中,其 5,

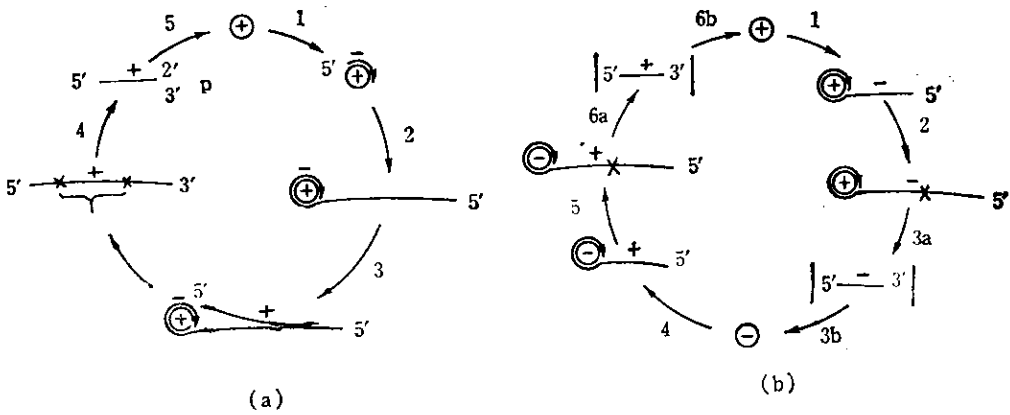


图 1 马铃薯纺锤块茎类病毒的滚环复制模式。(a) 环状侵染性正链拷贝成负链多聚体(步骤 1 和 2),以负链多聚体为模板拷贝成正链多聚体,然后切割和环化。箭头表示在切割(步骤 4)以后出现的 2',3' 磷酸部分。(b) 包括两次滚环的 PSTV 滚环复制模式,由环状正链拷贝成的负链多聚体可能被编接,产生环状的负链 RNA (步骤 3),再经滚环机制拷贝成正链多聚体,切割和环化。

端为羟基, 3' 端为磷酸基, 而不是像最初转录所预料的那样的 5' 端的三磷酸和 3' 端的羟基, 这表明在复制的过程中涉及由多聚体的前体切割成单位长度。STobRV 的末端与基因组的不同, 在 3' 端无多聚(A), 在 5' 端无共价结合的蛋白 Vpg。小核糖核酸病毒群的研究表明, Vpg 由病毒基因组编码, 共价结合到病毒基因组的 5' 端。Vpg 同复制中间产物的新生链连接在一起, 进一步试验表明, Vpg 包括在 RNA 合成的启动中<sup>[22]</sup>。TobRV 的基因组有共价结合的 Vpg, 而 STobRV 没有, 这就对 STobRV 的复制依赖于 TobRV 的复制提出了问题。曾推测, 如果 STobRV 的复制是用 TobRV 的复制系统的话, Vpg 可能引导 STobRV 的合成, 但在 STobRV 中未检测出 Vpg, 说明 STobRV 的合成可能并不依赖于 TobRV 的复制系统, 可能是多聚体的正负链代表了 RNAs 的前体和前体的模板。根据这些研究提出了卫星 RNA 滚环复制的模式。卫星 RNA 的环化形式可能做为模板被拷贝成互补链的多聚体, 然后再转录成正链多聚体, 在包壳前或包壳后被切割成单位长度。

用含有花生矮化病毒 (PSV) 卫星 RNA (PARNA5) 的花生矮化病毒接种豇豆原生质体, 在侵染的原生质体中发现双链 PARNA5 的寡聚体; 从侵染的原生质体中提纯病毒颗粒, 在提纯的病毒颗粒中发现单链的 PSVRNA5 的寡聚体, 其中 7 聚体在病毒颗粒中的量相对丰富, 这可能是因为其大小与基因组 RNA 相近, 因此容易被包壳<sup>[14]</sup>。

含有卫星 RNA 的病毒, 像黄瓜花叶病毒 (CMV), 花生矮化病毒, 烟草环斑病毒等在包壳内尚未发现环状的卫星 RNA, 但在侵染的组织内发现了环状 RNA 分子。Sogo 等用电镜观察到 STobRV 侵染的组织内的双链部分有环状分子<sup>[23]</sup>。基于在变性条件下, 环状分子的电泳迁移率明显落后于相近大小的线状分子的特点而发展起来的双向电泳方法鉴定分子是否具有环状结构, 是灵敏可靠的方法<sup>[24, 25]</sup>。Linthorst 和 Kaper 用双向电泳法在 STobRV 侵染的组

织内鉴定出了环状卫星 RNA 分子<sup>[13]</sup>。最近我们又又在含有卫星 RNA 的黄瓜花叶病毒株系 S<sub>22</sub> 侵染的烟组织内发现双链 CARNAs (dsCARNAs) 为环状 RNA 分子。

CMVS<sub>22</sub> 为由 CMV 的辣椒株和 CMV 的卫星 RNA (CARNAs) 组建而成<sup>[26]</sup>, 温室和田间试验均表明对 CMV 强株的侵染有保护作用<sup>[27]</sup>, 从 S<sub>22</sub> 株侵染的烟草组织中提取总核酸, 然后进行垂直双向电泳, 染色后有一明显的落后于寄主核酸形成的对角线的核酸带 (图 2), 表明为环状分子。从侵染的烟组织中按通常的方法提纯 dsCARNAs, 用反向双向电泳检测, 亦表明为环状分子 (图 3)。此环状 RNA 分子较通常的类病毒如 PSTV 的变性温度为高, 表明有更多的碱基配对。在接种 CMVS<sub>22</sub> 株系 10 天, 一个月和半年的烟组织中都检出了环状 dsCARNAs。环状 dsCARNAs 在接种后半年仍能检测出, 且含量很高。这时用接种敏感寄主的方法和用血清学的酶联免疫吸附分析方法均已检测不出病毒, 但接种 S<sub>22</sub> 10 天后用两种方法都能检测出病毒。这些结果暗示 dsCARNAs 与病毒核酸可能以不同的机制复制, 至少在侵染的后期, dsCARNAs 的复制可能实际上并不依赖于辅助病毒, 以及含有卫星 RNA 的弱株系的保护机制可能并不是卫星 RNA 与病毒基因组 RNA 竞争由病毒诱导的复制酶。



图 2 从含卫星 RNA 的黄瓜花叶病毒 S<sub>22</sub> 株系的烟组织中提取的核酸的垂直双向电泳  
从右至左为第一次电泳方向, 从下至上为第二次电泳方向

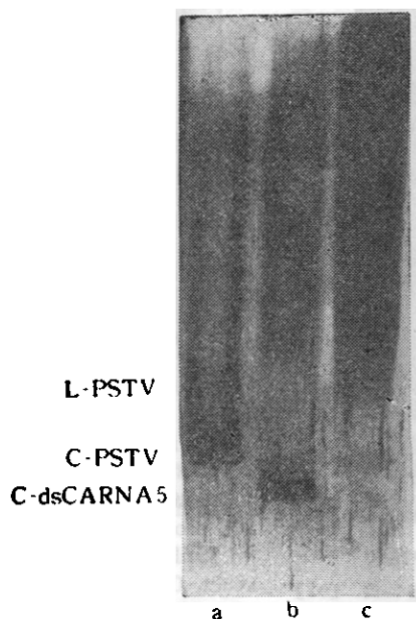


图3 PSTV和提纯的 dsCARN 5 的反向双向电泳(a)和(c)为从 PSTV 侵染的蕃茄中提取,(b)为提纯的 dsCARN 5。第一次电泳自上而下,第二次电泳(变性电泳)自下而上。图中标出两次电泳后环状 PSTV (C-PSTV) 线状 PSTV (L-PSTV) 和环状 dsCARN 5 (C-dsCARN 5) 的位置

dsCARN 5 有环状的分子结构并不意味着代表假设的滚环复制的模板,亦有可能这种环状的双链以及侵染的组织中存在的双链的多聚体是在复制的后期形成的。序列分析表明,在 dsPARNA 5 和 dsCARN 5 的负链的 3' 端,有一个未配对的鸟嘌呤。这个不配对的鸟嘌呤对了解这些 RNA 的复制可能提供重要的线索。已经知道,增加的单个的鸟嘌呤包括在内含子 RNA 的拼接环化中<sup>[29]</sup>,和组氨酸 tRNA 的成熟过程中<sup>[29]</sup>,是否 dsPARNA 5 和 dsCARN 5 中的不配对的鸟嘌呤有相似的功能是值得研究的。有可能这种环状的双链 RNA 是在复制的后期由某种机制环化而来。

如果卫星 RNA 以滚环机制复制,像类病毒那样,或者以另外的机制复制,但至少在侵染的后期并不依赖于辅助病毒,就提出了这样的问题,是否卫星 RNA 的复制也会像类病毒那

样,利用寄主的酶系。

### 三、类病毒和卫星 RNA 复制、结构和起源的相关性

苹果锈果病的病原长期不明,小金沢硕城在感病的组织中发现低分子量 RNA,提出类病毒病原的可能性,但未证实类病毒特有的环状结构<sup>[20]</sup>。我们从 1982 年起研究锈果病类病毒病原的可能性,在成熟的病果中发现比健果中多出一条与一般类病毒大小相近的核酸带,后用双向电泳方法表明具有环状分子结构,并具有类病毒的一些性质<sup>[25,31]</sup>,称此类病毒核酸为 ASSRNA-1。后来在病树的一年生及多年生的枝条混合提取的核酸中还发现了另一环状 RNA, 称谓 ASSRNA-2<sup>[31]</sup>, ASSRNA-2 比 ASSRNA-1 及 PSTV 的分子量大(图 4,图 5),变性温度高,表明有更多的碱基配对。即初步试验结果表明,ASSRNA-2 与 dsCARN 5 有某

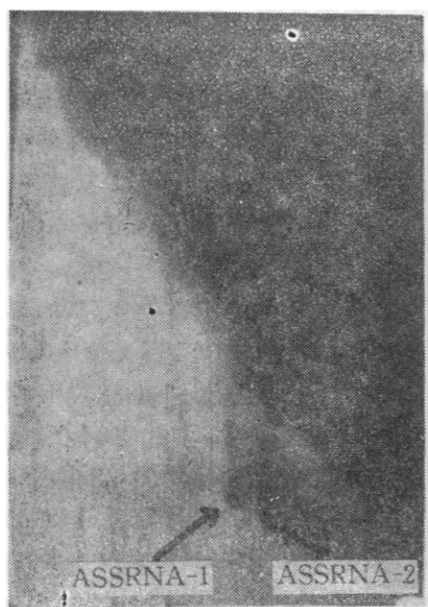


图4 从感染苹果锈果病的枝条中提取的核酸的垂直双向电泳

从下向上为第二次电泳方向,从右向左为第一次电泳方向

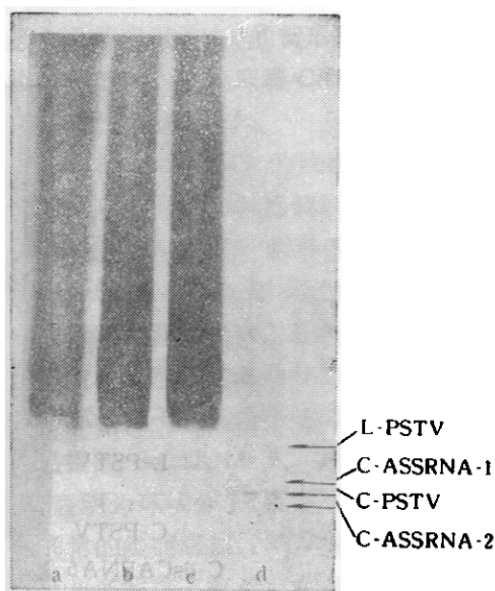


图5 从感染苹果锈果病的枝条中提取的核酸的反向双向电泳图以及与 PSTV 比较

(a) 来自健康的果树枝; (b) 来自感病的品种“国光”的树枝; (c) 来自感病的品种“白龙”的树枝; (d) PSTV 样品。图中标出各核酸带的位置。L-PSTV 代表线状 PSTV; C-PSTV 代表环状 PSTV; C-ASSRNA-1 和 C-ASSRNA-2 分别代表环状的 ASSRNA-1 和 ASSRNA-2。

些相似之处,都具有环状结构,其所要求的变性温度均较一般类病毒为高,分子量较一般的类病毒为大。ASSRNA-1 和 ASSRNA-2 之间的关系,是否有同源性尚不清楚,如果两者确有同源性,则可作为研究类病毒和卫星 RNA 的复制的相关性的桥梁。

花生矮化病毒卫星 RNA 的序列与几种类病毒的序列经比较表明,有几个区域有 90% 的同源性。这些同源区包括大多数类病毒具有的中心保守区域。例如菊花矮化类病毒中有 9 个区域中每 10 个核苷酸有 9 个与 PARNA 5 同源,其中 PARNA 5 有两个区域可以与大多数类病毒的中心保守区的上部分和下部分配对;此外,PARNA 5 的 5' 端的 22 个核苷酸同环状 CSV 分子的第 343 到第 10 位的核苷酸显示了 77% 的同源性,而这个与 PARNA 5 同源的 CSV 的范围恰好相当于 PSTV 的一种天然线

状分子的 5' 端部分。

类病毒和卫星 RNA 的序列的同源性,类病毒和卫星 RNA 都具有环形和线形两种形式(包括在侵染的组织中)等提出了两者可能有共同的起源。Diener 等根据类病毒同真核生物中小核 RNA 的序列以及内含子的序列的比较等,提出类病毒可能起源于逃脱了的内含子<sup>[15]</sup>。在酵母的线粒体中发现了由内含子衍生出来的环状 RNA,在四膜虫的核中发现了与类病毒大小相近的环化的内含子。可以想像,如果这样的内含子含有广泛的碱基配对和环状结构,可以稳定化并逃脱降解,且含有适当的识别序列的话,就可以为寄主的酶识别及转录。PARNA 5 含有几种内含子的保守区域的序列,而这个内含子的保守区对 RNA 的拼接是必需的,从序列的比较提出了卫星 RNA 起源于内含子的可能性<sup>[15]</sup>。

随着对类病毒和卫星 RNA 了解和研究的深入,将进一步揭示两者的相关性。

### 参 考 文 献

- [1] Diener, T. O.: *Virology*, 45: 411, 1971.
- [2] Sanger, H. L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 3852—3856, 1976.
- [3] Gross, H. J. et al.: *Nature*, 272: 203—208, 1978.
- [4] Riesner, D. et al.: *J. Mol. Biol.*, 133: 85—115, 1979.
- [5] Sanger, H. L.: Minimal Infectious Agents: the Viroids. Reprinted from *The Microbe*, 1984: Part I Viruses, ed. B. W. J. Mahy and J. R. Pattison. Cambridge University Press, 282, 1984.
- [6] Randles, J. W. et al.: *Virology*, 108: 111, 1981.
- [7] Haseloff, J. et al.: in *Plant Infectious Agents: Viruses, Viroids, Virusoids and stellites*, by Cold Spring Harbor Laboratory, 181—184, 1983.
- [8] Tien Po, et al.: *FEBS Lett.*, 132: 353, 1982.
- [9] Franks, R. I. B. et al.: in *Plant Infectious Agent: Viruses, Viroids, Virusoids and satellites*, by Cold Spring Harbor Laboratory, 175—180, 1983.
- [10] Jones, A. T. and Mayo, M. A.: *J. gen. Virol.*, 64: 1771—1774, 1983.
- [11] Kaper, J. M.: in *Control of Virus Disease*, by Marcer Dekker, Inc: 317—342, 1984.
- [12] Waterworth, H. E. et al.: *Science*, 204: 845—847, 1979.
- [13] Linthorst, H. J. M. and Kaper, J. M.: *Virology*, 137: 206—210, 1984.
- [14] Collmer, C. W. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3310—3314, 1985.
- [15] Diener, T. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 5014—5015, 1981.
- [16] Branch, A. D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 6381, 1981.
- [17] Grill, L. K. and Semancik, J. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 896, 1978.
- [18] Branch, A. D. and Robertson, H. D.: *Science*, 223: 450—455, 1984.
- [19] Kikuchi, Y. et al.: *Nucleic Acids Research*, 10 (23): 7521—7529, 1982.
- [20] Owens, A. and Diener, T. O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 113—117, 1982.
- [21] Kiefer, M. C. et al.: *Virology*, 121: 262—273, 1982.
- [22] Pallansch, M. A. et al.: *Journal of Virology*, 35: 414—419, 1980.
- [23] Sogo, J. M. and Schneider, I. R.: *Virology*, 117: 401—415, 1982.
- [24] Schumacher, J. et al.: *Analytical Biochemistry*, 135: 288—295, 1983.
- [25] 陈炜,田波: 微生物学通报, 12(3): 133—136, 1985.
- [26] 邱并生等: 微生物学报, 25(1): 87—88, 1985.
- [27] Tien P. and Chiang, X. H.: *Seed Sci. and Technol.*, 11: 969—972, 1983.
- [28] Kruger, K. et al.: *Cell*, 31: 147, 1982.
- [29] Cooley, L. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 6745, 1982.
- [30] 小金沢碩城: 果树试报 C, 10: 49—60, 1983.
- [31] 陈炜,田波: 科学通报, 30(17: 1360,) 1985.