



病毒卫星 RNA 及其致弱病毒的机理—— 我国病毒学基础研究进展之一例

田 波*

(中国科学院微生物所分子病毒与生物工程研究室, 北京 100080)

1 卫星 RNA 的本质和生物学地位

病毒卫星 RNA 是美国 Kaper 等于 1976 年在黄瓜花叶病毒中首先发现的^[1], 它是伴随病毒复制的一类低分子量 RNA (300~400b); 它不能独立复制完全依赖于特定的辅助病毒; 大多数卫星 RNA 能抑制辅助病毒 RNAs 的复制, 并改变寄主植物的症状表达; 卫星 RNA 有其特异的核苷酸序列, 与辅助病毒 RNA 没有序列同源性^[2]。

在上述国际研究基础上, 我国病毒卫星 RNA 的研究是从应用角度于 1981 年开始的, 当时的想法是: 既然许多卫星 RNA 能抑制病毒复制, 减轻病毒的症状, 那么把致弱病毒的卫星 RNA 加入我国流行的辅助病毒中, 应有防病效果。根据这一构思组建了卫星 RNA 生防制剂 (BCA), 并于 1983 年在国际上首次报道了用卫星 RNA 防治黄瓜花叶病毒取得成功^[3]。此后一系列温室和田间生产性试验得到良好的防病增产效果^[4~9]。致病性强的辅助病毒株系, 当加入有致弱作用的卫星 RNA 后, 可使其症状减轻, 甚至消失; 只能检测到少量病毒。如果把所加入的卫星 RNA 除去, 则病毒又恢复原来的症状和复制特性, 从中分离纯化的卫星 RNA, 又能导致辅助病毒的感染^[10]。完全附合病原物的 Koch 假设。卫星 RNA 能侵染特异的寄主, 且能维持自身的遗传特性。根据上述特性, 我们于 1986 年提出病毒卫星 RNA 是感染病毒的病毒的概念^[11]。根据 Lwoff^[12] 1981 年提出的将病毒分为真病毒 (Euvirus) 和亚病毒 (subvirus) 两大类的分类方

案, 我们进一步将亚病毒的范围, 除类病毒 (Viroid) 和朊病毒 (Prion) 外, 把拟病毒 (virusoid) 和卫星 RNA 作为一个类群归入亚病毒^[13], 近一步的研究证明把拟病毒或类似类病毒的 RNA (viroid like RNA) 和卫星 RNA 归为一个类群是正确的, 实验证明我们与澳大利亚科学家所发现的首蓿暂时性条纹病毒 (LTSV) 中的拟病毒^[14] 实际上是依赖于 LTSV-RNA-1 的卫星 RNA^[15], 此后又证实其他三种拟病毒也是依赖于病毒而复制的卫星 RNA, 我们还通过 α -鹅膏蕈碱对绒毛烟斑驳病毒 (VTMOV) 中拟病毒复制影响的研究, 证明这种拟病毒不受 α -鹅膏蕈碱的抑制, 指出它是用依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶复制的, 而不是像类病毒那样受 α -鹅膏蕈碱的抑制, 用依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶复制^[16], 因此拟病毒像病毒和卫星 RNA 一样, 对 α -鹅膏蕈碱不敏感, 其复制是用依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶。不过拟病毒具有类似类病毒的单链环状 RNA 的结构。可以得出结论所谓拟病毒实际上是卫星 RNA。拟病毒作为亚病毒的一个类群已得到承认^[17], 那么我们关于把病毒卫星 RNA 归入亚病毒的建议^[18] 也就解决了。综上所述病毒卫星 RNA 是感染病毒的一类亚病毒。已知的亚病毒包括类病毒, 朊病毒和病毒卫星 RNA^[18]。

2 抑制病毒及其基因组复制是病毒卫星 RNA

* 中国科学院院士

1996-08-21 收稿

致病病毒机理之一

我们所研究的主要对象是黄瓜花叶病毒(CMV)卫星RNA,具有多面体颗粒的CMV属于三分体RNA基因组病毒,其基因组RNA-1(3900b)、RNA-2(3400b)和RNA-3(2193b)为侵染性所必须,还含有亚基因组RNA-4(1027b),其卫星RNA称RNA-5(335b)。为了研究单独卫星RNA对病毒复制的影响,我们采用了两种设计。

(1) 去除卫星RNA: 当用含卫星RNA的致病CMV,作保护实验时,将CMV-RNAs经PAGE和琼脂糖电泳后,电泳脱CMV RNA1-3(以除去RNA-5)接种枯斑寄主,藉助多次单斑分离纯化获得不含卫星RNA的CMV。以含有卫星RNA和不含卫星RNA的CMV为材料,分别测定它们对病毒复制的影响。以烟草和椒为寄主,分别以含有或除去卫星RNA的CMV弱株系预先作保护接种,于接种后第5,7,10,15,20,25和30d,再用CMV强株系攻毒。以只抗CMV强株系的单克隆抗体做PAS-ELISA,检测CMV强株系的病毒浓度,用缓冲液预先接种的对照烟草,其6个间隔天数的A492值为0.77~0.85;用不含卫星RNA CMV保护的为0.38~0.42;用卫星RNA和CMV保护的为0.24~0.27,CMV强株系的浓度分别为对照的49.4%和31.5%^[19]。

(2) 表达卫星RNA的转基因植物: 表达卫星RNA的转基因植物是研究卫星RNA对病毒效应的良好材料。我们用卫星RNA单体基因转化的烟草和番茄植株系统研究了卫星RNA对病毒复制的影响。转卫星基因和未转化(对照)的烟草和番茄幼苗接种不含卫星RNA的CMV-B后15~45d提取病汁液,经稀释后接种定量枯斑寄主——昆诺阿藜,所形成的枯斑数代表汁液中相对的侵染性病毒浓度,烟草三组试验结果表明,表达卫星RNA的斑点数只相当对照的8.5%~23.7%^[20,21]。番茄的两组试验结果说明,表达卫星RNA的斑点数相当对照的3%~16%^[22]。

(3) 上述结果说明卫星RNA的存在,既能抑制有免疫活性的,也能抑制有生物活性的病毒组分的复制。但在植物病毒学上,关于寄主细胞中积累的病毒浓度,与病毒症状的严重程度并不都是成正相关,因此上述结果提供了卫星RNA抑制病毒复制的证据。但不能明确的阐明卫星RNA致病病毒的机理。

(4) 病毒基因组RNAs复制的抑制和卫星dsRNA的大量积累: 在植物培养箱内培养携带有枯斑基因的(防止烟花叶病毒的污染)三生烟草(*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi nc)幼苗分别接种含与不含卫星RNA的CMV,接种后1,3,5,7,9,11和13d用³H尿嘧啶核苷酸进行标记。提取总核酸后用纤维素柱层析分离出³H-dsRNAs,再在聚丙烯酰胺凝胶电泳中分布³H-病毒及卫星dsRNAs,电泳后的凝胶板在10%乙酸中固定后,等距切胶片进行放射自显影测定。一组代表性的结果制图形,用含有卫星RNA的CMV-S52接种的烟草组织,随接种后时间的延长,CMV-S52感染的组织中卫星RNA的dsRNA含量呈直线增长,第10d达最高峰,而病毒基因组RNA的dsRNA的含量则随时间延长而降低,这一趋势一直延续到最后一次测定。卫星RNA的dsRNA含量也比病毒基因组dsRNA高得多,从接种后的第二d的2.5倍到第10d的20倍及第14d的40倍,但用不含卫星RNA的CMV接种后,在所测定的14d内,各病毒基因组RNA的dsRNA含量比较恒定^[23]。

卫星RNA对病毒基因组复制的高度抑制,除了可能降低病毒的致病性外还会抑制病毒的传染性,我们比较了含与不含卫星RNA的CMV侵染的植物,当用天然传毒媒介——蚜虫传染时,含卫星RNA比不含卫星RNA的植物需要增加10倍的蚜虫数目接种才能传染成功^[24]。卫星RNA dsRNA在植物细胞中的超量积累,与我们对番茄花叶病毒无毒分离物感染的植株中比毒性分离物中积累更多的病毒dsRNA的结果是相似的。即致病性低的病毒和卫星RNA致弱的病毒感染的植物中都有

大量 dsRNA 积累。dsRNA 是使生物产生抗病的干扰素或类似干扰素物质的诱导剂。卫星 RNA dsRNA 的大量积累还可能导致辅助病毒 RNAs 合成降低并使病毒致病性降低^[25]。但上述卫星 RNA 致弱病毒的可能机理,都停留在设想阶段,没有得到证明。

(5) 卫星 RNA 及其对病毒基因组 RNAs 体外复制的影响:为了在体外合成体系中验证上述体内卫星 RNA 对病毒基因组 RNAs 复制的抑制作用,我们由接种 CMV 的黄瓜子叶中提取病毒特异的依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RdRP)。试验证明所提取的 RdRP 具有模板特异性,能合成全长的 CMV dsRNA。

(A) 比较了 RdRP 利用含卫星 RNA 的 CMV RNAs 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 α -³²P-UTP 或 α -³²P-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,结果说明 RdRP 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,其产物为 dsRNA。但用黄瓜子叶总 RNA 为模板则没有任何产物合成,故此酶具模板特异性,既能用 CMV 基因组 RNAs 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^[26]。

(B) 从总的放射性掺入来看,不含卫星 RNA 的 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,几乎有一半的放射性掺入到卫星 RNA 中,RNA1、RNA2 和 RNA4 的量比 CMV-B 大为降低,而 RNA3 掺入量变化不大;当以 CMV-B RNAs 为模板时,放射性掺入到 RNA1、RNA2 和 RNA4 中的最多。掺入 RNA3 中的变化不大;当以 CMV-D RNA 为模板时,约一半放射性

掺入到 RNA4 中,掺入 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 RNAs 合成;引起症状致弱的 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。由此可以推测:卫星 RNA 通过某种机制抑制或增强 CMV RNA4 的合成,以影响外壳蛋白的合成,因为 RNA-4 是编码外壳蛋白的,从而改变 CMV 引起的症状。上述结果证明在体外病毒合成体系中验证了卫星 RNA 在体内抑制病毒及其基因组复制的结果^[26]。

3 卫星RNA致弱病毒的新机制——抑制外壳蛋白进入叶绿体

(1) 病毒外壳蛋白(CP)的致病毒作用:在病毒中尚未发现纯粹的致病基因,研究表明在病毒与寄主相互作用过程中,并不是所有的病毒基因都与症状有直接关系。已知病毒编码的几类功能蛋白如外壳蛋白(CP),移动蛋白(MP)和病毒复制酶甚至病毒核酸本身等都可以是致病因子。我们的结果表明,在受 CMV-M 侵染的烟草叶绿体中有大量的 CP 积累,其浓度与症状程度成正比,体外试验表明在病、健叶绿体及经各种处理的叶绿体总蛋白组份没有多大区别,但在病叶的叶绿体中多出一条迁移率与 CMV 外壳蛋白质相同的带。同时叶绿体中 CP 量与症状严重度成正相关,接种后随着症状严重度的递增,叶绿体中 CMV 外壳蛋白抗原反应也递增。CMV-CP 基因的转基因烟是研究 CP 基因在产生花叶症状中的作用的理想材料。CMV 的花叶症状与叶绿体中 CP 的存在及数量有关。根据这个结果推测,在表达 CMV-CP 的转基因烟草如果 CP 进入叶绿体中,则也应该产生花叶症状,但事实上,这些转基因烟草没有任何症状。实验表明,虽然其叶片细胞质中含有大量的 CMV-CP,

但在转基因烟草叶绿体中不存在 CMV-CP。在细胞质中大量表达的 CP 并没有进入叶绿体中,产生病症。这说明叶绿体是 CMV-CP 致病的作用位点^[27]。

(2) CMV-CP 向离体叶绿体的跨膜运输:从健康三生烟烟草叶片中分离完整的游离叶绿体,将 CMV-CP 加入叶绿体悬浮液中,进行体外跨膜运输试验。1 至 30min 之后加入胰蛋白酶消化未进入叶绿体内的 CP 亚基。结果表明,完整的游离叶绿体悬浮液加入 CMV-CP 亚基后,能够保护 CMV-CP。表明 CMV-CP 能进入完整的叶绿体内。另外一些试验表明,在 CMV-CP 跨膜运输体系中加入 ATP 并未促进运输效率,但是光照能明显增加运输效率^[28]。

(3) CMV-CP 对离体叶绿体光系统 II 的抑制作用:在完整的健康叶绿体悬浮液中加入 CMV-CP 亚基,同时在另一相同叶绿体悬浮液中加入相同缓冲液作为对照。暗适应 30min 后,适时强光照,测定其室温动力学荧光光谱曲线的差异。结果表明,加入 CMV-CP 的叶绿体的 F_m/F_o 比值为 1.9,比不加 CP 的健康叶绿体的 F_m/F_o (为 2.1) 低。而从 CMV 侵染的叶片中提取的叶绿体的 F_m/F_o 比值为 1.4,比健康的更低,为了避免叶绿体提取过程中光合作用活性的变化,以上比值为多次重复结果的平均值。由于 F_m/F_o 比值与叶绿体光系统 II 的活性成正比,所以结果表明 CMV-CP 进入离体叶绿体后抑制了光系统 II 的活性,且与整体植物体内受侵染叶片的结果一致。光系统 II 活性的降低会导致叶绿体的许多病理性变化,与花叶症状表达直接相关。为了减少 CMV-CP 亚基缓冲液 pH 值对跨膜运输及光系统 II 的影响。我们直接在运输体系中加入 CMV 病毒粒子,并设置对照,即在体系中仅加入 RNase A。从以上结果可得出结论:CMV 致病可能是病毒外壳蛋白进入叶绿体,直接作用于叶绿体光合系统 II 的结果^[28]。

(4) 卫星 RNA 干扰 CMV-CP 进入叶绿体:烟草在不同 CMV 株系侵染 10d 后,呈现不

同程度的花叶症状,其中 CMV-B 引起严重的花叶症状,含卫星 RNA 881 的呈现轻微的褪条斑,含卫星 RNAS-52, 1 和 S 都无可见症状。分离叶片叶绿体,分析其中的 CP 含量,结果表明在 CMV-B 侵染的烟草叶片叶绿体内均含有大量的 CP;而在含致弱卫星 RNA CMV 侵染的叶片细胞质中虽然仍有大量的 CP,但在其叶绿体内,只有少量 CP 甚至检测不到 CP 的存在,加大点校量,叶体中也没有检测到 CMV-CP;其中 S52 侵染的叶绿体内检测不到 CP 的存在,而含卫星 RNA R1 和 881 CMV 侵染的烟草叶绿体内则有少量的 CP 积累。进一步的结果说明叶绿体内 CP 浓度与花叶症状严重程度呈正相关。实验结果表明致弱卫星 RNA 可能以某种方式干扰了 CMV-CP 进入叶绿体。曾企图在体外叶绿体系统中进行卫星 RNA 干扰 CP 进入叶绿体的直接试验,但由于卫星 RNA 极不稳定,多次尝试都未成功。尚需设计新的试验方案^[28]。

(5) 卫星 RNA 干扰 TAV-CP 进入叶绿体是 TAV 症状减轻的原因:Harrison 等^[28]曾指出不能简单地将致弱卫星 RNA 的作用机制归结为复制酶竞争和病毒复制的抑制。他们的研究表明致弱卫星 RNA 并未降低其辅助病毒番茄不孕病毒(TAV)在烟草中的核酸和 CP 浓度,但烟草症状却明显减轻。

为了解释这一现象我们分析了含与不含卫星 RNA 的 TAV 感染的烟草中叶绿体和细胞质中 TAV-CP 含量。将不含卫星 RNA 的 TAV 株系接种表达卫星 RNA 转基因烟草 G140 品种,10d 左右后提取病毒 dsRNA,然后在 4%PAGE 电泳分析病毒的 RNA 组分,证实 TAV 分离物已带上卫星 RNA。分别接种不含和含有致弱卫星 RNA-1 的 TAV 分离物于三生烟上,结果表明与不含卫星 RNA 的 TAV 相比,含有致弱卫星 RNA 的 TAV 在三生烟上的症状极轻^[28]。

(6) Rubisco ssu 引导肽与黄瓜花叶病毒融合蛋白在烟草中表达:上述研究证明外壳蛋白进入叶绿体是引起花叶症状导致叶绿体光系

统 II 受抑制,是引起花叶症状的分子机理。为了验证这一理论,我们设计了 Rubisco ssu 引导肽与黄瓜花叶病毒融合蛋白在烟草中表达的研究,即将 CMV-CP 导入叶绿体,观察其能否引起类似花叶的症状。1.5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(Rubisco)是光合碳代谢中至为重要的一个关键酶,高等植物 Rubisco 由八个大亚基和八个小亚基组成。其中小亚基(SSU)是由核基因编码且在细胞质中翻译的蛋白前体经跨膜运输进入叶绿体内的。SSU 前体蛋白 N'端含有一段前导肽。翻译后的前体蛋白先与叶绿体外膜结合,在 ATP 等作用下,穿过外膜和内膜。由于转 CP 基因的烟草叶绿体中并无 CP 亚基积累,为了使 CP 能在叶绿体中表达,我们构建了 Rubisco SSU 前导肽与 CMV-CP 融合蛋白的表达载体,并用之转化烟草植株,研究 CMV-CP 在叶绿体中的表达是否导致转基因烟草产生类似于 CMV 引起的症状。我构建了 Rubisco 小亚基引导肽与黄瓜花叶病毒外壳蛋白融合蛋白的表达载体,为了用一个类似分子量的其他病毒外壳蛋白作为对照,同时构建了 Rubisco 小亚基引导肽与乙型肝炎病毒表面抗原 HBSAg 融合蛋白表达载体,通过农杆菌转化烟草,以 Western blotting 检测转化的烟草幼苗,结果表明工程植株中外源基因得到表达。Western blotting 结果表明, Rubisco SSU 前导肽与 CMV-CP 的融合基因在细胞质中得到表达,其长度与 CMV-CP 亚基相当,并未见到全长融合蛋白的蛋白带,由于含有引导肽的融合蛋白表达后可跨膜运输进入叶绿体,转化 TP-CP 融合蛋白的烟草幼苗大部分呈现黄化症状,且根系不能发育,最终导致转基因苗死亡,与之相比,转空载体的烟草幼苗则长势正常,说明 TP-CP 基因的表达对幼苗有毒害作用。转化 TP-HBSAg 基因的烟草甚至在愈伤组织就表现出异常生长情况,部分愈伤组织呈绿色疙瘩状,难以分化,而一些分化出来的幼苗同样出现黄化和根系不能发育的情况,最终死亡,只有少数生长较好,这说明 TP-CP 和 TP-HBSAg 的表达对细胞都有毒

害作用。CMV 侵染的烟草植株一般出现花叶、褪绿等症状,而转 TP-CP 基因的转基因烟草却出现了黄化、根系不分化,甚至死亡等症状,这说明植物病毒基因与寄主之间相互作用的复杂性。实际上,人们很早就发现,烟草不同苗期对 CMV 侵染表现的症状有所不同,若 CMV 在烟草苗龄很小时侵染,植株除出现花叶等症状外,生长严重受阻,这是由于寄主产生症状的过程也是植株个体发育的过程,病毒同一基因产物对寄主不同生长阶段的影响效果可能有所不同,所以利用转基因手段并不一定能完全得到病毒侵染所致的症状^[28]。

4 卫星 RNA 对其他病原物的生物学效应

上面详细讨论了卫星 RNA 对病毒的作用。我们的研究结果指出,卫星 RNA 生防制剂对病毒的防病作用,起主要抑病作用的是卫星 RNA,但被致弱的病毒也对野生病毒产生株系间的常规保护作用^[19]。

(1) 卫星 RNA 对类病毒的抑制作用: Monstasser 等^[29]曾发现接种了含卫星 RNA-S CMV 的番茄,使马铃薯纺锤形块茎类病毒(PSTVd)引起症状减轻。我们对这一现象进行了系统的研究,为了确定抗 PSTVd 的作用是由 CMV 的感染,还是由于卫星 RNA 的存在引起的,将番茄幼苗预先接种 CMV 和 CMV-S52(含卫星 RNA),以及表达卫星 RNA 的转基因烟草和未转基因的对照幼苗, PSTVd 攻毒后 30~35d 观察。结果表达卫星 RNA 和预先接种 CMV-S52 只产生很轻微 PSTVd 症状,有 75%植株不表现任何症状,其病情指数分别只有 2.5~3.3 和 3.3~4.2。而不表达卫星 RNA,只预先接种 CMV 和未接种的植株表现严重的 PSTVd 症状,其病情指数分别达到 90.5~94.2, 87.5~90 和 95.0~96.7,这一结果证明,卫星 RNA 的存在而不是 CMV 的存在是引起抗 PSTVd 的原因^[30]。

卫星 RNA 的存在导致对 PSTVd 的抗性的同时还抑制了 PSTVd 的复制和积累。表达卫星 RNA 和预先接种 CMV-S52 的番茄接种 PSTVd 30~35d 后,抽提总 RNA,并以 Return

PAGE 电泳和银染色检测 PSTVd 的环状 RNA 分子,其数量只有不表达卫星 RNA 和预先接种 CMV 的 30~50 分之一,可见症状的减轻是与 PSTVd 复制受抑制是平行的。为什么卫星 RNA 的存在会抑制 PSTVd 在番茄中的复制呢?有两种可能的解释,其一是 PSTVd 的感染,像辅助病毒一样会增加卫星 RNA dsRNA 的合成,从而使其提高了对 PSTVd 的抗性;其二是卫星 RNA 直接作用于 PSTVd 的复制过程,而产生对 PSTVd 复制的抑制。我们进行了下列试验来验证以上两种可能的解释:4%PAGE 电泳分析了上述试验材料中卫星 dsRNA 的含量。预先接种 CMV-S52 后用 PSTVd 攻毒的番茄中卫星 dsRNA 的量与 CMV-S52 接种后不攻 PSTVd 的组织中卫星 dsRNA 的含量没有差别。在表达卫星 RNA 的转基因番茄用 PSTVd 攻毒后,组织中没有卫星 dsRNA。而在表达卫星 RNA 的番茄预先接种 CMV 后,再攻 PSTVd 的组织中有大量卫星 dsRNA 存在。上述试验说明 PSTVd 的感染并不增加卫星 dsRNA 的积累^[30]。

为了探索有病毒卫星 RNA 的植物抵抗 PSTVd 的机理,我们比较了 CMV Sat-RNA 和 PSTVd 核苷酸序列相关性。首先由 BBC Micro-computer 读出序列通过 Kermit 23 程序将所读序列输入主计算机,得到 RNA 序列 BBC,进一步利用 UWGCF 软件处理所得计算机运行过程中所识别的 RNA 序列的 EMBL。利用 UWGCG 软件包对卫星 RNA 和 PSTVd RNA 序列同源性和碱基配对进行分析。列出碱基对的 G:C 比,计算了 ΔG 。结果显示:卫星 RNA 与 PSTVd(+)RNA 间同源性在不同区域分别为 47.8%~66.7%。卫星 RNA 与 PSTVd(-)RNA 间的同源性在不同区域分别为 48.1%~63.4%。卫星 RNA 与 PSTVd 间 6 个区域具有相似性,而且在 6 个配对区域中都有较高的 G:C 比,其 KJ/mol 值甚高,分别为-872.4 至-975.9。说明其双链需要较高的热量才能打开。在所分析的卫星 RNA 与 PSTVd 间有相当的同源性和碱基配

对。可以设想当它们共同在细胞中复制时卫星 RNA 正链或负链分子可能对 PSTVd 复制时产生反义或错配的作用,从而抑制了 PSTVd 的复制,导致症状的减轻^[31]。

(2) 卫星 RNA 致弱的 CMV 诱导植物产生对真菌病害的抗性:在应用 BCA 防治 CMV 病害时发现它能诱导植物对真菌病害的抗性。1986~1988 年在三个地点大面积预先接种 BCA 的黄瓜田中,黄瓜霜霉病 (*Pseudoperonospora cubensis*) 的发病率和病情指数相当不处理的对照的 28.8% 和 20.9%。果实产量增加 10.4%~50.7%。为了验证上述田间观察结果,在温室中做了试验,得到类似结果,发病率和病情指数只相当对照的 5.4% 和 6.0%,产量增加 11.3%~30.9%。为了区分对真菌抗性是由卫星 RNA,还是由 CMV 引起的,用表达卫星 RNA 的转基因番茄,和预先接种含与不含卫星 RNA 的 CMV 的番茄植株,人工接种番茄黑霉病菌 (*Cladosporium fulrum*),结果说明表达卫星 RNA 的番茄不抗黑霉病,预先接种含与不含卫星 RNA 的 CMV 表现相同的抗病能力。这说明是病毒,而不是卫星 RNA 负责对真菌病害的抗性^[32]。

总结卫星 RNA 对不同病原物的抗病性,得到表 1 结果。

表 1 卫星 RNA 生防制剂对病毒、类病毒和真菌病害的生物效应

病原物	卫星 RNA	致弱的病毒
病毒	+++*	+
类病毒	+++	-
真菌菌	-	++

* 起作用的程度,“+”、“++”、“+++”代表作用弱、中、强;“-”代表无作用。

5 关于卫星 RNA 分子生物学的某些基础研究

配合上述主题研究,先后开展了下列基础研究:

(1) 新卫星 RNA 及其核酶的一、二级结构和生物特性:从香蕉 CMV 中分离到一株新的卫星 RNA (CMV-Bas),对其 cDNA 的序

列分析证明它含有 390b, 比一般卫星 RNA (335b) 大, 其 3'-和 5'-端各有一段与一般卫星 RNA 有很高同源性的区域, 但其中间区域具有特殊的序列。其二级结构具有 6 个发夹环结构。生物学分析证明它具有致弱病毒的特性^[33]。

南芥菜花叶病毒 (ArMV) 卫星 RNA 及其核酶的结构: 对 ArMV 卫星 cDNA 的序列分析证明含有 300b, 其序列中有 -54b 组成的核酶, 具有完整的锤头状结构, 具有自我切割 GUC 的酶活性^[34]。

(2) CMV 卫星 RNA 单体 cDNA 和双体 cDNA 合成: 单体合成时用两个引物与卫星 (+)RNA 和 (-)RNA 3'-端互补合成并克隆了卫星 RNA-1 的 cDNA 单体, 序列分析与其 RNA 序列完全一致^[35]。以限制性内切酶 BamHI 和 SmaI 切割克隆于 pUC12 上的 CMV 卫星 RNA-1 的 cDNA 片断 (pUI) 并补齐、回收, 将此片断重组于 pUI (SmaI 酶切暴露出 Sat3'末端) 上构建成卫星双体前体克隆 (pUI-I)。双体前体片断亚克隆于 M13mp19 上。以合成的点突变引物, 采用 Kunkel 等的方法定点突变除去双体前体中两单体之间多出的 7 个碱基, 从而得到卫星 RNA 双体基因^[36]。

(3) 卫星 dsRNA 的温度梯度电泳——一种极灵敏的卫星 RNA 诊断方法: 由于卫星 RNA 存在致弱加重病毒症状的株系。因此急需一种灵敏的诊断方法来区分不同的株系。提取不同株系感染的烟草组织中的卫星 dsRNA 进行。温度梯度 (30~70℃), 电泳测定 dsRNA 的变性温度线及转变温度。结果表明不同株系都具有自己特异的变性图谱和转变温度。特别是致弱性的和产生坏死的株系的变性图谱有明显差别。株系的核苷酸序列有 1~2 个核苷的突变也可在变性图谱和转变温度上反应出来^[37]。德国的 Diagen 公司已为这种方法设计温度梯度电泳仪。其中一个用途就是用来诊断卫星 dsRNA 的。我们还与德国同行研究了负责产生变性曲线的卫星 dsRNA 中的序

列。结果说明 dsRNA 变性起始于分子两头的末端, 具有纸的协同性, 直至高协同性温度转变。变性曲线终止于另一高协同性的温度转变, 直至 dsRNA 解链成 ssRNA^[38]。

此外, 还对卫星 RNA 在田间释放的安全性进行了分析^[39, 40]并提出了提高安全性的措施^[41, 42]。

应当指出病毒卫星 RNA 主要存在于植物病毒中, 但人乙肝病毒中的 δ 因子也证明具有卫星 RNA 性质。

参 考 文 献

- [1] Kaper J M, Tousignant M E, Lot H. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1976, 72: 1237~1243.
- [2] Francki R I B. *Annual Review of Microbiology*, 1985, 39: 151~174.
- [3] Tien P, Zhang X. *Seed Sci & Technol*, 1983, 11: 969~972.
- [4] 田波. *生物防治通报*, 1985, 1(2): 41~45.
- [5] 田波. 一种新的植物病毒防治方法: 用卫星 RNA 防治黄瓜花叶病毒病, *科学通报*, 1986, 31(6): 479.
- [6] Tien P, Zhang X, Qiu B, Wu G. *Ann Appl Biol*, 1987, 111: 143~152.
- [7] Tien P, Wu G S. *Advance in virus Research*, 1991, 39: 321~339.
- [8] 仲崇仁, 张秀华, 田波. *植物病理学报*, 1987, 27: 251~253.
- [9] 郭林瑞, 张秀华, 覃秉益, 田波. *植物病理学报*, 1986, 16(4): 235~237.
- [10] 邱并生, 田波, 张秀华. *微生物学报*, 1985, 25(1): 38~44.
- [11] 田波. *病毒与农业*, 1984, 197~205.
- [12] Lwoff A. *Ann Virol*, 1981, 132E: 121.
- [13] 田波. *病毒学报*, 1985, 1(2): 190~195.
- [14] Tien P, C Davies, Hatta T, Francki R I B. *FEBS Letters* 1981, 132(2): 353~356.
- [15] Jones A T, Mayo M A. *J Gen Virol*, 1983, 64: 1771.
- [16] Wu J Q, Lu W J, Tien P. *J Gen Virol*, 1986, 67: 2757~2767.
- [17] 田波. *病毒学集刊*, 1985, 4: 221~225.
- [18] 田波. *病毒学报*, 1985, 1(2): 190~197.
- [19] Wu G S, Kang L Y, Tien P. *Ann appl Biol*, 1989, 114: 489~496.
- [20] Wu S X, Zhao S Z, Wang G J, Yang X C, Zhang C X, Wang X, Tian B. *Science in China (Series B)*, 1992, 35(6): 677~687.
- [21] 吴世宣, 赵淑珍, 王革娇, 杨希才, 张春霞, 田波. 1989, *中国科学*, 9(B): 948~956.
- [22] 赵淑珍, 王革娇, 张秀华, 张春霞, 杨希才, 许雷新, 刘义之, 田波. *中国科学*, 1990, 7(B): 708~713.

- [23] 杨希才,覃秉益,田波. 微生物学报,1986,26(2):120~126.
- [24] 田文会,曹寿先,张书苯,张秀华,田波. 植物病理学报,1985,15(3):225~229.
- [25] Kang L Y, Yang X C, Tien P. Virology, 1982, 118: 324~328.
- [26] 杨海花,康良仪,赵大健,田波. 中国病毒学,1996(已接受).
- [27] 朱水芳,叶寅,赵丰,田波等. 植物病理学报,1992,22(3):230~233.
- [28] Delin Liang, Shuifang Zhu, Yin Ye, Dingji Shi, Po Tien. Molecular Plant-Microbe Interactions (Accepted).
- [29] Montasser M S, Kaper J M, Owens R A. Plant Disease, 1991, 75: 319.
- [30] Yang X C, Kang L Y, Tien P. Ann Appl Biol, 1996 (accepted).
- [31] 田波. 中国病毒学,1996(已接受).
- [32] Qin B Y, Zhang X H, Wu G X, Tien P. Ann appl Biol, 1992, 120: 361~366.
- [33] Ye Yin, Tian Bo. Progress in Natural Science, 1994, 4(1): 53~59.
- [34] 杨希才, Kaper J M, Hadidi A, Tousignant M B, 田波. 微生物学报, 1993, 33(4): 239~247.
- [35] 张春霞, 吴世宣, 王革娇, 田波. 科学通报, 1989, 7: 540~543.
- [36] 叶寅, 田波. 自然科学进展——国家重点实验室通讯, 1993, 3(5): 451~456.
- [37] Tien P, Gerhard Steger, Volker Rosenbaum, Jaap Kaper, Detlev Riesner. Nucleic Acids Research, 1987, 15: 5069~5083.
- [38] Gerhard S, Tien P, Kaper J, Riesner D. Nucleic Acids Research, 1987, 15(13): 5085~5103.
- [39] Tien Po. Risk Assessment in Agricultural Biotechnology: Proceedings of the International Conference, University of California, 1988, 29~37.
- [40] 田波. 中国科学院院刊, 1990, 2: 142~145.
- [41] 田波. 植物基因工程. 济南: 山东科技出版社, 1996.
- [42] Tien P. Changing Nature's Course—The Ethical Challenge of Biotechnology, Edited by G. K. Becker and J. P. Buchanan, Hong Kong University Press, 1996, 17~26.