NN 08201 № 577

Lokalisatie van de RNA-replicatie van cowpea-mozaïekvirus

NN08201.577

Anne Mieke Assink

BIBLIOTHEEK
DER
LANDBOUWHOGESCHOOL
WAGENINGEN

Anne Mieke Assink

Lokalisatie van de RNA-replicatie van cowpea-mozaïekvirus

Proefschrift
ter verkrijging van de graad van
doctor in de landbouwwetenschappen,
op gezag van de rector magnificus, prof. dr. ir. H. A. Leniger,
hoogleraar in de technologie,
in het openbaar te verdedigen
op woensdag 23 januari 1974 des namiddags te vier uur
in de aula van de Landbouwhogeschool te Wageningen

Centrum voor landbouwpublikaties en landbouwdocumentatie

Wageningen – 1973

Abstract

ASSINK, ANNE MIEKE (1973) Lokalisatie van de RNA-replicatie van cowpea-mozaïekvirus (Localization of the RNA replication of cowpea mosaic virus). Doctoral thesis, Wageningen, ISBN 90220 0504 6, (xii) + 70 p., 7 tables, 20 figs, 89 refs, Eng. summary.
Also: Versl. landbouwk. Onderz. (Agric. Res. Rep.) 816.

Cowpea mosaic virus (CPMV) is a spherical, multiparticle virus. The two viral RNAs are single-stranded and replicate by a double-stranded RNA. The virus induces cytopathic structures in cells of *Vigna* leaves upon infection.

Structures from cells were distributed over fractions after centrifugation on discontinuous sucrose gradients. The fractions were studied by electron microscopy. The distribution of replicating RNA of CPMV among the gradient-fractions was investigated by polyacrylamide-gel electrophoresis, by molecular hybridization, by electron microscopy and by pulselabel-experiments. A correlation was shown between the amount of replicating RNA of CPMV and the amount of cytopathic structures in the gradient-fractions.

Autoradiography revealed that the RNA replication of CPMV is associated with the vesicles in this cytopathic structure.

ISBN 90220 0504 6

Dit proefschrift verschijnt tevens als Verslagen van Landbouwkundige Onderzoekingen 816.

© Centrum voor landbouwpublikaties en landbouwdocumentatie, Wageningen, 1973.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotocopie, microfilm of op welke andere wijze ook zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.
No part of this book may be reproduced or published in any form by print, photoprint, microfilm or any other means without written permission from the publishers.

Stellingen

I

De cytopathische structuur die vroeg na infectie met het virus in de plantecel ontstaat, is betrokken bij de RNA-replicatie van het virus.

II

Het virus en niet de waardplant bepaalt de aard van de cytopathische structuur die vroeg na infectie met het virus in de plantecel ontstaat.

III

Het chlorofyl-gehalte van fracties van een bladhomogenaat wordt door Ralph et al. onjuist gebruikt bij het vaststellen van een relatie tussen chloroplasten en de RNA-replicatie van turnip yellow mosaic virus.

R. K. Ralph, S. Bullivant & S. J. Wojcik, 1971. Evidence for the intracellular site of double-stranded turnip yellow mosaic virus RNA. Virology 44: 473–479.

IV

De empirische methoden gebruikt door Kaper en Waterworth voor de bepaling van het molecuulgewicht van virus-RNA, zijn aan ernstige bedenkingen onderhevig.

J. M. Kaper & H. E. Waterworth, 1973. Comparison of the molecular weights of single-stranded viral RNAs by two empirical methods. Virology 51: 183–190.

V

Noch een adsorptie van virussen aan stiletten, noch een regurgitatie van plantesap kan de overdracht van non-persistente virussen door bladluizen afdoende verklaren.

R. G. Garrett, 1973. Non-persistent aphid-borne viruses. In: Viruses and invertebrates (A. J. Gibbs ed.). North Holland Publishing Company, Amsterdam-London/American Elsevier Publishing Company inc., New York. p. 476–492.

VI

Tomato spotted wilt virus kan moeilijk een myxovirus genoemd worden.

R. J. Best, 1968. Tomato spotted wilt virus. Adv. Virus Res. 13: 65–146.

VII

De resultaten van onderzoekingen met niet-natuurlijke cytokininen worden ten onrechte gebruikt voor het opstellen van werkingsmechanismen van cytokininen in biologische processen.

K. V. Thimann & T. Sachs, 1966. The role of cytokinins in the fasciation disease caused by *Corynebacterium fascians*. Am. J. Bot. 53: 731–739.

A. Varga & J. Bruinsma, 1973. Effects of different cytokinins on the senescence of detached oat leaves. Planta 111: 91–93.

VIII

De vergelijking die Ackrell en Jones maken tussen de ademhalingsactiviteit van de bacterie en die van geïsoleerde membraan systemen is onjuist.

B. A. C. Ackrell & C. W. Jones, 1971. The respiratory system of *Azotobacter vinelandii* 1. Properties of phosphorylating respiratory membranes. Eur. J. Biochem. 20: 22–28.

IX

Uit natuurwetenschappelijk en landschappelijk oogpunt is het geleidelijk aftakelen van een door talrijke houtwallen gekenmerkt cultuurlandschap, zoals dit in het oosten des lands voorkomt, minder erg dan dat dit in een periode van enkele jaren plotseling gebeurt in het kader van een ruilverkaveling.

X

Het optimisme, dat het begrip 'efficiency' altijd relevant zou zijn voor de gezondheidszorg, is even naïef als het optimisme, dat geneeskunde altijd relevant is voor ziek zijn.

Proefschrift van Anne Mieke Assink
Wageningen, 23 januari 1974

'I say, I wonder what's going to happen exciting *to-day*?'

(A. A. Milne, Winnie-the-Pooh)

Voorwoord

Aan het tot stand komen van dit proefschrift hebben veel mensen bijgedragen. In de eerste plaats mijn ouders, ze hebben mij al vroeg vrij gelaten in de keuze van mijn opleiding.

Graag wil ik prof. dr. A. van Kammen en prof. dr. ir. J. P. H. van der Want mijn dank betuigen voor hun voortdurende stimulerende begeleiding tijdens het onderzoek en voor hun bemoedigende kritiek bij de verwerking van de gegevens tot dit proefschrift.

Veel dank ben ik verschuldigd aan Hannemarie Weenen-Swaans, die op zo'n enthousiaste en vakkundige wijze assisteerde bij de experimenten, en aan prof. dr. G. A. de Zoeten, die tijdens zijn verblijf in het Laboratorium voor Virologie van augustus '72 tot juli '73 de elektronenmicroscopische experimenten uitvoerde en die tot vele discussies bereid was.

Ook Geertje Rezelman (moleculaire hybridisatie) en J. Groenewegen, prof. dr. E. F. J. van Bruggen en ir. T. S. Ie (elektronenmicroscopie) ben ik dankbaar voor hun hulp en adviezen.

Voor het steeds probleemloos kunnen beschikken over grote hoeveelheden cowpea-planten gaat mijn dank uit naar G. Looijen, H. Speckmann en N. Klarenbeek.

Erg dankbaar ben ik al dié mensen, die hier misschien niet genoemd worden, maar die door hun hartelijkheid het werken in het Laboratorium voor Virologie voor mij zo plezierig hebben gemaakt.

De voorbereiding van de uitgave van dit proefschrift werd verzorgd door Marleen Boerjan en G. A. de Zoeten (foto's), F. J. J. von Planta en K. Boekhorst (tekeningen), Nel van Dijk (typewerk) en R. J. P. Aalpol (Pudoc).

Het onderzoek werd mogelijk gemaakt door financiële steun van de Nederlandse Organisatie voor zuiver-wetenschappelijk Onderzoek (ZWO) en de Stichting Scheikundig Onderzoek in Nederland (SON).

Curriculum vitae

1943	Geboren te Goor (O).
1955 – 1961	Gymnasium-β, Lyceum 'De Grundel' te Hengelo (O).
1961 – 1969	Katholieke Universiteit te Nijmegen. Studierichting biologie, hoofdvak plantenfysiologie, bijvakken chemische cytologie en geobotanie.
1964 – 1967	Assistente bij het practicum Kryptogamen.
1966 – 1969	Lerares biologie aan het 'Twickelcollege' te Hengelo (O).
1969 – 1973	Wetenschappelijk ambtenaar in dienst van ZWO werkzaam aan het onderzoek dat onder auspiciën van de werkgemeenschap Nucleïnezuren van de Stichting Scheikundig Onderzoek in Nederland (SON) werd uitgevoerd in het Laboratorium voor Virologie te Wageningen.
1973	Wetenschappelijk medewerker aan het Physiologisch-chemisches Institut, Philipps-Universität, Marburg/Lahn (W-Dld).

Inhoud

Gebruikte afkortingen en begrippen

1 Inleiding 1
1.1 Doelstelling 1
1.2 Lokalisatie van de RNA-replicatie bij plantevirussen 2
1.2.1 Cytopathische structuren 2
1.2.2 Lokalisatie van de RNA-replicatie met behulp van cel-vrije extracten 4
1.3 Eigenschappen van cowpea-mozaïekvirus 8

2 Materiaal en methoden 10
2.1 Plantemateriaal 10
2.2 Cowpea-mozaïekvirus 10
2.3 Preparatieve bereiding van dubbelstrengig RNA 11
2.4 Bepaling van het DNA-gehalte 16
2.5 Bepaling van nucleïnezuurconcentraties 16
2.6 Bereiding van CPMV-RNA gelabeld met ^{3}H-uridine 16
2.7 Elektroforese in polyacrylamidegels 17
2.7.1 Uitvoering 17
2.7.2 De verdeling van de optische dichtheid 17
2.7.3 De verdeling van de radioactiviteit 18
2.8 Moleculaire hybridisatie 18
2.9 Elektronenmicroscopie van nucleïnezuur 19
2.10 Elektronenmicroscopie van blad en fracties 19
2.10.1 Primair blad 19
2.10.2 Materiaal uit fracties van sucrose-gradiënten 20
2.11 Chemicaliën 20

3 Elektroforese in polyacrylamidegel en karakterisering van het dubbelstrengig RNA van CPMV 22
3.1 Elektroforese in polyacrylamidegel (PAAGE) 22
3.2 Karakterisering van het PAAGE-patroon van het dubbelstrengig RNA met behulp van moleculaire hybridisatie 23
3.3 Incubatie van het dubbelstrengig RNA met RNase en DNase na PAAGE 27
3.4 Discussie 31

4 Fractionering van de fractie verkregen bij 1000 g 33
4.1 De discontinuë sucrose-gradiënt 60/20 33
4.2 Verdeling van het DNA over de fracties 34
4.3 Verdeling van de replicatieve vorm over de fracties bepaald met behulp van moleculaire hybridisatie 35
4.4 Elektronenmicroscopie van het RNA uit de fracties 37
4.5 Pulselabel-experimenten 39
4.6 Discussie 40

5 Fractionering van de chloroplasten-fractie 45
5.1 De discontinuë sucrose-gradiënt 45/37 45
5.2 PAAGE van het nucleïnezuur uit de fracties 46
5.3 Pulselabel-experimenten 48
5.4 Moleculaire hybridisatie van het nucleïnezuur uit de fracties 51
5.5 Discussie 51

6 Elektronenmicroscopie 53
6.1 De geïnfecteerde cel 54
6.2 Chloroplasten-fractie 56
6.3 Fractie I, II en III 57
6.4 Discussie 60

7 Conclusie 64

Summary 66

Literatuur 67

Gebruikte afkortingen en begrippen

A	Adenine
A_{260}	Optische dichtheid bij 260 nm
B	Bodem-component van CPMV
B-RNA	RNA uit de bodem-component van CPMV
C	Cytidine
Ci	Curie
cpm	Counts per minute, tikken per minuut
CPMV	Cowpea mosaic virus, cowpea-mozaïekvirus
CTA	Cetyltrimethylammoniumbromide
DNA	Deoxyribonucleic acid, desoxyribonucleïnezuur
DNase	Desoxyribonuclease
E_{260}	Extinctie bij 260 nm
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
G	Guanine
M	Midden-component van CPMV
mCi	Millicurie
M-RNA	RNA uit de midden-component van CPMV
PAAGE	Polyacrylamide-gel electrophoresis, elektroforese in polyacrylamidegels
PEG	Polyethyleenglycol
RF	Replicative form, replicatieve vorm; een dubbele helix van RNA gevormd door het virus-RNA en het daaraan complementaire RNA
RI	Replicative intermediate, replicatieve intermediair; een grotendeels enkelstrengig RNA complex, gevormd door het aan het virus-RNA complementaire RNA, als matrijs, en verscheidene virus-RNA's die hierop tegelijkertijd gesynthetiseerd worden
RNA	Ribonucleic acid, ribonucleïnezuur
RNase	Ribonuclease
SDS	Sodiumdodecylsulphate, natriumlaurylsulfaat
SSC	Standard saline citrate, 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-citraat, pH 7,2
T	Top-component van CPMV
T_m	Smelttemperatuur van dubbelstrengig nucleïnezuur
TCA	Trichloorazijnzuur
TEMED	N, N, N′, N′-tetramethylethyleendiamine
tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethaan
U	Uridine

1 Inleiding

1.1 Doelstelling

De meeste plantevirussen zijn enkelstrengig-RNA-virussen. De replicatie van het RNA van deze plantevirussen verloopt, evenals bij bacteriële en dierlijke virussen van dit type, via een RNA-RNA replicerend complex. In dit complex dient RNA complementair aan het RNA in het virusdeeltje als matrijs voor de synthese van meer virus-RNA (Bishop & Levintow, 1971).

Voor cowpea-mozaïekvirus (CPMV) werd virus-specifiek dubbelstrengig RNA, dat bestaat uit virus-RNA en daaraan complementair RNA, geïsoleerd uit een fractie van een homogenaat van geïnfecteerd cowpea-blad, die sedimenteerde bij 15.000 *g* (Van Griensven, 1970). Het was niet aannemelijk, dat dit dubbelstrengig RNA bij 15.000 *g* zou sedimenteren, omdat de sedimentatiecoëfficiënten voor het dubbelstrengig RNA van midden-component en voor het dubbelstrengig RNA van bodem-component 15 S respectievelijk 18 – 19S bleken te zijn. Daarom werd verondersteld, dat het dubbelstrengig RNA van CPMV geassocieerd was met een structuur in de geïnfecteerde cel, die sedimenteerde bij 15.000 *g*.

Dit leidde tot de volgende probleemstelling voor het in dit proefschrift beschreven onderzoek: Met welke subcellulaire structuur in de geïnfecteerde cel van cowpea-blad is de replicatie van het RNA van CPMV geassocieerd?

In de loop van het onderzoek werden door Van der Scheer met de elektronenmicroscoop cytopathische structuren in de met CPMV geïnfecteerde cel waargenomen (Van der Scheer & Groenewegen, 1971). Dit betekende, dat het niet alleen celorganellen zoals chloroplasten, kernen en mitochondriën, maar ook deze cytopathische structuren zouden kunnen zijn waarmee de RNA-replicatie van CPMV geassocieerd is (Van Kammen, 1971b). De door CPMV in de cellen van cowpea-blad geïnduceerde cytopathische structuren zijn: vesiculaire membranen, tubuli met virusdeeltjes en aggregaten van virusdeeltjes in het cytoplasma en in de intercellulaire ruimte.

In dit onderzoek werd nu gezocht naar een methode om de verschillende structuren uit de cel van elkaar te scheiden en hiervoor bleken discontinuë sucrose-gradiënten het meest geschikt (hoofdstuk 4 en 5). De verdeling van de structuren over de fracties van de gradiënten werd nagegaan met behulp van de elektronenmicroscoop (hoofdstuk 6). Methoden als moleculaire hybridisatie en elektroforese in polyacrylamidegel werden gebruikt om het nucleïnezuur uit de fracties, speciaal het RNA-RNA replicerend complex van CPMV, te karakteriseren (hoofdstuk 4 en 5). Hoofdstuk 3 beschrijft in het bijzonder het gedrag van het gezuiverde dubbelstrengig RNA van

CPMV bij elektroforese op polyacrylamidegels. Door 'pulselabel'-experimenten kon worden vastgesteld dat het dubbelstrengig RNA van CPMV bij de replicatie van virus-RNA betrokken is (hoofdstuk 4 en 5). Deze experimenten leverden bovendien het materiaal voor autoradiografisch onderzoek aan blad en fracties (hoofdstuk 6).

Uit het onderzoek wordt de conclusie getrokken, dat de RNA-replicatie van cowpea-mozaïekvirus geassocieerd is met de vesiculaire membranen van de door CPMV in de cellen van cowpea-blad geïnduceerde cytopathische structuur.

1.2 Lokalisatie van de RNA-replicatie bij plantevirussen

Onder de plantevirussen komen virussen voor met een enkelstrengig RNA-genoom, zoals cowpea-mozaïekvirus, tabaksmozaïekvirus en turnip yellow mosaic virus, met een dubbelstrengig RNA-genoom, zoals wound tumor virus en rice dwarf virus, en met een dubbelstrengig DNA-genoom zoals bloemkoolmozaïekvirus en dahlia-mozaïekvirus.

Tot de RNA-virussen behoren, naast virussen die bestaan uit nucleoproteïne-deeltjes, ook virussen waarbij het nucleoproteïnegedeelte nog eens omgeven wordt door een membraan, zoals lettuce necrotic yellows virus, sowthistle yellow vein virus en tomato spotted wilt virus. In de mantel van deze virussen komen ook glycoproteïnen en lipiden voor.

In dit overzicht van de lokalisatie van de RNA-replicatie bij plantevirussen worden niet de virussen met een dubbelstrengig RNA-genoom of met een dubbelstrengig DNA-genoom en ook niet de RNA-virussen met een membraan besproken, maar het beperkt zich tot de enkelstrengig-RNA-virussen waarvan de deeltjes uit nucleoproteïnen bestaan.

Voor deze virussen wordt een overzicht gegeven van de elektronenmicroscopie aan structuurveranderingen in de cel die door het virus geïnduceerd worden. Daarna worden de experimenten naar de lokalisatie van de replicatie van virus-RNA in cel-vrije extracten uit geïnfecteerd plantemateriaal besproken. Tenslotte zal uitvoerig worden ingegaan op de situatie bij tabaksmozaïekvirus en bij turnip yellow mosaic virus, omdat de lokalisatie van de replicatie van het virus-RNA hierbij het best onderzocht is.

1.2.1 Cytopathische structuren

Tot de veranderingen die in de cel kunnen optreden als gevolg van virus-infectie, behoren de met de lichtmicroscoop waarneembare insluitsels ('inclusion bodies'). Met behulp van de elektronenmicroscoop worden de insluitsels in vier hoofd-typen onderscheiden (Matthews, 1970):

1. kristallijne insluitsels opgebouwd uit een regelmatige rangschikking van virus-deeltjes, bijvoorbeeld in een visgraat-patroon bij TMV;
2. amorfe massa's waarin virusdeeltjes en componenten afkomstig van de gastheer voorkomen, bijvoorbeeld de amorfe massa van TMV-deeltjes en componenten van de

cel in tabaksblad;

3. insluitsels in de vorm van draden, buizen of platen, bijvoorbeeld de 'pinwheels', veroorzaakt door virussen uit de potato virus Y-groep;

4. insluitsels die blijken te bestaan uit abnormale structuren in de plantecel, bijvoorbeeld vesiculatie in het cytoplasma veroorzaakt door infectie met beet yellows virus.

De insluitsels in groep 1 en 2 worden pas gevormd, wanneer de concentratie van het virus in de plantecel daarvoor hoog genoeg is. Ze ontstaan, evenals de insluitsels in groep 3, betrekkelijk laat in de infectie. Maar tot de insluitsels in groep 4 behoren de veranderingen van structuren in de cel, die vroeg na infectie ontstaan en deze lijken daarom een rol te spelen in de virus-RNA-replicatie.

De rol die de vroeg na virus-infectie optredende veranderingen van structuren in de virusvermenigvuldiging, en speciaal de RNA-replicatie zouden kunnen spelen, werd tot nu toe niet onderkend. Zo wordt de evaluatie van literatuur over cytopathische structuren bemoeilijkt wanneer de auteurs niet vermeldden op welk tijdstip na inoculatie het bladmateriaal verzameld werd; een voorbeeld hiervan is de situatie bij pelargonium leaf curl virus zoals beschreven door Martelli & Castellano (1969). Soms wordt bij accumulatie van virusdeeltjes op een bepaalde plaats in de cel door de auteurs gesuggereerd dat daar de virusvermenigvuldiging zou plaats vinden, zoals Carroll (1970) deed voor de ophoping en associatie van barley stripe mosaic virusdeeltjes aan de buitenkant van de chloroplasten, 10 tot 15 dagen na inoculatie met het virus.

Tot de veranderingen van structuren in de cel veroorzaakt door virusinfectie behoren de vesiculatie van de chloroplasten-buitenmembraan en van de kernmembraan, de vesiculatie in mitochondriën en het optreden van vesiculae in het cytoplasma, waarbij de oorsprong van de vesiculae niet direct vastgesteld kon worden. De aard van de veranderingen wordt door het virus bepaald en niet door de waardplant.

Pea enation mosaic virus veroorzaakte vesiculatie in de perinucleaire ruimte, zoals werd gevonden voor drie verschillende isolaten (De Zoeten et al., 1972). In een later stadium van de infectie door dit virus werden de vesiculae ook in het cytoplasma aangetroffen. Ze werden dan omgeven door een membraan, die mogelijk afkomstig was van de buitenmembraan van de nucleaire envelop. Sommige vesiculae bevatten fibrillen die deden denken aan nucleinezuurfibrillen zoals waargenomen in chloroplasten, mitochondriën en bacteriën.

In sterk degenererende cellen van *Pelargonium* geïnfecteerd met pelargonium leaf curl virus werden soms vesiculae in de kern aangetroffen, ze werden evenwel vaker in het cytoplasma gevonden. Zowel in de kern als in het cytoplasma waren groepjes vesiculae omgeven door een membraan (Martelli & Castellano, 1969).

De vesiculae veroorzaakt door beet yellows virus (Esau & Hoefert, 1971a, b, c) en door beet western yellows virus (Esau & Hoefert, 1972) werden soms omgeven door een membraan die hen afscheidde van het cytoplasma. Bij beet western yellows virus leek de membraan die de geïnduceerde vesiculae omsluit afkomstig van het endoplasmatisch reticulum, ook kwamen vesiculae in de perinucleaire ruimte voor. Sommige

van de vesiculae geïnduceerd door beet yellows virus respectievelijk beet western yellows virus bevatten fibrillen.

Vesiculaire membranen in het cytoplasma, die niet hiervan afgescheiden werden door een membraan, werden waargenomen bij infectie door cowpea-mozaïekvirus (Van der Scheer & Groenewegen, 1971; Van Kammen, 1971b).

Soortgelijke vesiculae werden geïnduceerd door radish mosaic virus (Štefanac & Ljubešić, 1971) en door bean pod mottle virus (Kim & Fulton, 1972), twee andere virussen van de cowpea-mozaïekvirus-groep.

Ook pokeweed mosaic virus (Kim & Fulton, 1969), en cherry leaf roll virus (Jones et al., 1973), twee virussen die niet verwant zijn met CPMV, induceerden de vorming van vesiculaire membranen in het cytoplasma van de geïnfecteerde cel.

Vesiculatie in de chloroplasten-buitenmembraan is beschreven voor turnip yellow mosaic virus (Bové, 1967; Ushiyama & Matthews, 1970; Laflèche et al., 1972; Gerola, 1972), voor het met turnip yellow mosaic virus verwante wild cucumber mosaic virus (Allen, 1972), voor barley stripe mosaic virus (Carroll, 1970) en voor tabaksmozaïekvirus strain U 5 (Betto et al., 1972). De vesiculae veroorzaakt door turnip yellow mosaic virus en wild cucumber mosaic virus bezaten een dubbele membraan. Daarnaast werden bij infectie met wild cucumber mosaic virus vesiculae met een enkele membraan in het cytoplasma aangetroffen. Deze vesiculae bevatten soms fibrillen waarvan weer verondersteld werd dat het nucleïnezuurfibrillen zijn. De vesiculae geïnduceerd door barley stripe mosaic virus in de chloroplasten-buitenmembraan bezaten slechts een enkele membraan. Voor de vesiculae veroorzaakt door tabaksmozaïekvirus strain U 5 was het moeilijk te zien, of deze een enkele dan wel een dubbele membraan hebben.

Vesiculatie van mitochondriën werd beschreven voor cucumber green mottle mosaic virus door Hatta et al. (1971) en voor bean pod mottle virus door Kim & Fulton (1972).

1.2.2 Lokalisatie van de RNA-replicatie met behulp van cel-vrije extracten

Onderzoek aan cel-vrije extracten van geïnfecteerd bladmateriaal wordt in dit overzicht opgenomen, omdat hierbij naar voren komt, dat de replicatie van virus-RNA waarschijnlijk plaats vindt in een complex van replicerend RNA en RNA-polymerase, dat geassocieerd is met een structuur in de cel.

In met brome mosaic virus (BMV) geïnfecteerde gerst werd een activiteit van RNA-replicase gevonden, die geassocieerd was met structuren uit het bladhomogenaat die tussen 1000 *g* en 10.000 *g* sedimenteren (Semal & Hamilton, 1968; Semal & Kummert, 1971a). Welke structuren in deze fractie terecht kwamen, werd niet onderzocht. De RNA-polymerase was niet gevoelig voor actinomycine D (Semal & Kummert, 1970). Bij incorporatie-experimenten in vitro met deze fractie werd gedurende de eerste minuten een nucleïnezuurprodukt gevormd dat de eigenschappen van replicerend RNA van BMV bezat. Er werd dubbelstrengig RNA, de replicatieve vorm, geïsoleerd uit een 2 M LiCl oplosbare fractie. Dit dubbelstrengig RNA was resistent tegen RNase in 2 × SSC; met behulp van moleculaire hybridisatie werd aangetoond dat het

gedeeltelijk bestond uit aan BMV-RNA complementair RNA (Semal, 1970; Semal & Kummert, 1971a, b). Uit de in 2 M LiCl onoplosbare fractie werd een nucleïnezuurprodukt met de eigenschappen van replicatieve intermediair van BMV-RNA geïsoleerd. Bij een langere incorporatietijd bleek het nucleïnezuurprodukt identiek aan de enkelstrengige RNA's van BMV. Zowel de replicatieve vorm als de replicatieve intermediair leken betrokken te zijn bij de synthese van deze RNA's. Dit zou er op wijzen, dat het replicerend RNA van BMV in deze experimenten tot hernieuwde initiatie van RNA-synthese overgaat (Kummert & Semal, 1972). Uit een overeenkomstige fractie, namelijk het sediment verkregen bij 15.000 *g* van een bladhomogenaat, isoleerden Lane & Kaesberg (1971) dubbelstrengig RNA van BMV. Door behandeling met Triton X100 van de fractie verkregen bij 20.000 *g* (respectievelijk bij 1000 *g*) uit met BMV geïnfecteerde gerst werd een polymerase geïsoleerd, die sterk 'template'-afhankelijk was. De polymerase vertoonde een voorkeur voor BMV-RNA als template, maar BMV-RNA als specifiek produkt werd niet aangetoond (Hadidi & Fraenkel-Conrat, 1973; Hariharasubramanian et al., 1973).

In met broadbean mottle virus (BBMV) geïnfecteerde bladeren van tuinboon werd een soortgelijke RNA-polymerase gevonden als bij BMV. De RNA-polymerase sedimenteerde met structuren uit het bladhomogenaat tussen 1000 *g* en 10.000 *g*. De aard van de structuren in deze fractie werd niet onderzocht (Semal, 1970; Romero & Jacquemin, 1971; Jacquemin, 1972).

Uit met komkommermozaïekvirus geïnfecteerde komkommer-cotyledonen werden zowel een 'gebonden' als een met $MgSO_4$ 'oplosbare' RNA-polymerase geïsoleerd. De polymerases sedimenteerden met de fractie verkregen bij 16.000 – 20.000 *g* van het bladhomogenaat. De gebonden polymerase was niet afhankelijk van een RNA-template, de oplosbare polymerase was dit wel maar vertoonde geen voorkeur voor een bepaald template-RNA. Het nucleïnezuur dat gevormd werd in incorporatie-experimenten in vitro met beide RNA-polymerases had de eigenschappen van dubbelstrengig RNA (May et al., 1969, 1970; May & Symons, 1971).

Uit met tobacco ringspot virus geïnfecteerde cotyledonen van komkommer werd op gelijke wijze als bij komkommermozaïekvirus een oplosbare RNA-polymerase geïsoleerd. Deze onderscheidde zich van die van komkommermozaïekvirus in enzymactiviteit op verschillende tijdstippen na inoculatie. De gebonden RNA-polymerase bij tobacco ringspot virus was niet in dezelfde mate met $MgSO_4$ oplosbaar als de gebonden RNA-polymerase bij komkommermozaïekvirus. Uit de verschillen tussen de RNA-polymerases werd de conclusie getrokken, dat de enzymfuncties, ten dele, door het virusgenoom bepaald worden (Peden et al., 1972).

Bij autoradiografische experimenten aan met tabaksmozaïekvirus (TMV) geïnfecteerde tabak werd gevonden, dat in aanwezigheid van actinomycine D een aanzienlijke incorporatie van ^{3}H-uridine in de nucleolus had plaats gevonden (Smith & Schlegel, 1965). Hieruit werd geconcludeerd dat de RNA-replicatie van TMV in de nucleolus gelokaliseerd zou zijn. De aard van het gelabelde nucleïnezuur werd evenwel niet onderzocht.

Dubbelstrengig RNA van TMV werd geïsoleerd uit een fractie die structuren sedi-

menterend tussen 1000 en 12.000 *g* bevatte (Ralph & Wojcik, 1969). Kernen en chloroplasten sedimenteerden niet met deze fractie of waren door filtratie hieruit verwijderd. Bij verdere fractionering van de fractie verkregen bij 1000 – 12.000 *g* en uit elektronenmicroscopie van deze fracties bleek het dubbelstrengig RNA geassocieerd te zijn met membraanfragmenten. Abnormale structuren werden hierbij niet gevonden (Ralph et al., 1971a). Uit een soortgelijke fractie van geïnfecteerde tabaksbladeren extraheerden Jackson et al. (1971) dubbelstrengig RNA van TMV met de eigenschappen van replicatieve vorm en replicatieve intermediair.

Bij elektronenmicroscopisch onderzoek aan met TMV geïnfecteerde protoplasten werden evenmin abnormale structuren gevonden (Hibi & Yora, 1972).

De gewone stam van TMV lijkt in de cellen van tabak geen veranderingen in structuren te induceren, daarentegen veroorzaakte TMV strain U 5 een vesiculatie in de chloroplasten-buitenmembraan. De vesiculae werden reeds vier dagen na inoculatie, maar ook later wanneer al grote virusaggregaten gevormd waren, waargenomen (Betto et al., 1972).

In incorporatie-experimenten in vitro werd een voor infectie met TMV specifieke activiteit van RNA-polymerase aangetoond in fracties die structuren bevatten die sedimenteren tussen 1000 *g* en 20.000 – 30.000 *g* (Ralph & Wojcik, 1969; Bradley & Zaitlin, 1971). Als produkten van deze incorporaties werden replicatieve vorm en replicatieve intermediair van TMV-RNA aangetroffen, echter geen enkelstrengig RNA van TMV (Bradley & Zaitlin, 1971). Door behandeling van de fractie met het detergens Nonidet P-40 kon een aan de structuren gebonden RNA-polymerase opgelost worden, specificiteit van deze polymerase voor het RNA van TMV werd echter niet aangetoond (Zaitlin et al., 1973).

Bij infectie van Chinese kool met turnip yellow mosaic virus (TYMV) trad een rangschikking van chloroplasten in rijtjes op. De chloroplasten in de rijtjes, zg. polyplasten, waren onderling verbonden door pseudo-fibrillen. Tussen twee chloroplasten werden soms holtes (pockets) gevonden waarin vaak virusdeeltjes werden aangetroffen. In de buitenmembranen van de abnormale chloroplasten vormden zich vooral in de nabijheid van de 'pockets' vesiculae met een dubbele membraan (Bové, 1967). Deze vesiculatie van de chloroplasten-buitenmembraan is de eerst waarneembare verandering in de cel na virusinfectie (Ushiyama & Matthews, 1970). De structuur van de vesiculae werd met behulp van de vries-ets techniek onderzocht (Hatta et al., 1973). De vorming van vesiculae met een dubbele membraan in de buitenmembraan van chloroplasten lijkt specifiek voor virussen uit de TYMV-groep (Ushiyama & Matthews, 1970; Gerola, 1972; Allen, 1972).

Elektronenmicroscopisch en autoradiografisch onderzoek van de geïnfecteerde cel na een korte periode van incorporatie in vivo van met ^{32}P of ^{3}H-uridine gelabelde precursors liet zien, dat bij een labelperiode van 3 uur en langer, de zwarting veroorzaakt door de β-straling van het in nucleïnezuur ingebouwde ^{32}P respectievelijk ^{3}H-uridine, gelokaliseerd was boven de nucleoli en de chloroplasten. Bij een kortere labelperiode, 1 uur, werd zwarting voornamelijk aangetroffen bij de buitenmembranen van chloroplasten (Laflèche et al., 1972).

Bij verdeling over fracties van structuren van cellen van geïnfecteerd blad werd in overeenstemming hiermee dubbelstrengig RNA van TYMV geïsoleerd uit de fractie die vooral chloroplasten bevatte, en werd op grond van de verdeling van het DNA over de fracties een associatie van het dubbelstrengig RNA met de kernen uitgesloten (Ralph et al., 1971b; Laflèche et al., 1972).

Incorporatie-experimenten in vitro met deze chloroplasten-fractie lieten zien, dat in deze fractie een RNA-replicase aanwezig was met de eigenschappen van een RNA-polymerase (Bové & Laflèche, 1972; Laflèche et al., 1972). De ingebouwde radioactiviteit was vóór extractie van het incorporatiemengsel met fenol-SDS grotendeels ongevoelig voor RNase en 41 % van de ingebouwde ^{3}H-uridine sedimenteerde bij centrifugeren van het incorporatiemengsel bij 10.000 *g*. Dit duidt erop dat het gevormde produkt aanwezig is in een aan membranen gebonden complex. Het met fenol-SDS geëxtraheerde, gelabelde nucleïnezuur heeft de eigenschappen van dubbelstrengig RNA van TYMV (Ralph & Wojcik, 1966). Het geëxtraheerde RNA was voor RNase ongevoelig in 1,5 × SSC maar gevoelig in 0,1 × SSC. Het elektroforeerde op polyacrylamidegels als dubbelstrengig RNA. Bij centrifugering in Cs_2SO_4 had het een dichtheid ρ = 1,61, karakteristiek voor dubbelstrengig RNA. Het molecuulgewicht van het dubbelstrengig RNA was twee keer zo groot als dat van enkelstrengig RNA van TYMV en in overeenstemming hiermee werd bij elektronenmicroscopie volgens Kleinschmidt voor de moleculen een gemiddelde lengte van 1,95 μm gevonden. Uitsmelten van het gelabelde RNA bij 120 °C gevolgd door incubatie bij 85 °C veroorzaakte eerst het uit elkaar gaan van de ketens die evenwel weer een dubbelstreng vormden mits de incubatieperiode bij 85 °C ongeveer een uur bedroeg. Ook de basesamenstelling, waarbij G = C en A = U was, was karakteristiek voor dubbelstrengig RNA (Laflèche et al., 1972).

Elektronenmicroscopie en autoradiografie aan het sediment verkregen van zo'n incorporatiemengsel van een in vitro uitgevoerd experiment lieten zien dat zwarting veroorzaakt door β-straling van het ingebouwde ^{3}H-uridine vooral boven de buitenmembranen van de chloroplasten voorkwam (Laflèche et al., 1972).

Het totaal van argumenten maakt het aannemelijk te veronderstellen, dat de replicatie van TYMV-RNA in Chinese kool geassocieerd is met de buitenmembraan van de chloroplasten, speciaal met de door het virus geïnduceerde vesiculae.

Alleen bij TYMV werd dus tot nu toe een associatie tussen de replicatie van virus-RNA en een structuur in de geïnfecteerde cel aangetoond. Het onderzoek bij BMV en BBMV maakt wel aannemelijk dat ook hier de RNA-replicatie plaats vindt aan een structuur in de cel, maar met welke structuur werd niet onderzocht. Ook voor TMV kan een relatie tussen RNA-replicatie en door het virus geïnduceerde structuurveranderingen niet worden aangetoond, omdat de veranderingen die in de cel plaats vinden pas laat na infectie optreden.

1.3 Eigenschappen van cowpea-mozaïekvirus

De beschrijving van het cowpea-mozaïekvirus beperkt zich in dit hoofdstuk voornamelijk tot die eigenschappen, waarvan bij het onderzoek veelvuldig gebruik gemaakt werd. Voor recente overzichtsartikelen betreffende CPMV wordt verwezen naar Van Kammen (1972) en Jaspars & Van Kammen (1972). De fysische en chemische eigenschappen van CPMV zullen besproken worden in het proefschrift van Geelen (1973).

Het cowpea-mozaïekvirus behoort tot de cowpea-mozaïekvirusgroep. Het zijn bolvormige virussen met twee nucleoproteïnecomponenten. De diameter van de gezuiverde virusdeeltjes bedraagt 20 nm (Crowther et al., in druk). Bij elektroforese worden twee componenten onderscheiden (Niblett & Semancik, 1969; Wu & Bruening, 1971; Geelen et al., 1972).

Van het gezuiverde virus kunnen naar hun sedimentatiegedrag in dichtheidsgradiënten drie fracties worden onderscheiden: de top-component (T) met een sedimentatiecoëfficiënt van 58 S, de midden-component (M) met een sedimentatiecoëfficiënt van 95 S en de bodem-component (B) met een sedimentatiecoëfficiënt van 115 S.

Het verschil in sedimentatiesnelheid wordt niet bepaald door de eiwitmantel, deze is voor de drie groepen identiek, maar door het nucleïnezuurgehalte van de componenten. T bevat geen nucleïnezuur, M en B bevatten ieder een enkelstrengig RNA met molecuulgewichten van $1{,}37 \times 10^6$ dalton respectievelijk $2{,}02 \times 10^6$ dalton (Geelen, 1973; Reijnders et al., 1973).

De componenten afzonderlijk zijn niet infectieus, een mengsel van M en B, of van M-RNA en B-RNA, is wel infectieus. De informatie nodig voor de vermenigvuldiging van het virus is dus verdeeld over de twee componenten M en B (Bruening & Agrawal, 1967; Van Kammen, 1967, 1968, 1971a; Van Kammen & Van Griensven, 1970).

Door mutanten van het virus te isoleren en deze vervolgens te 'kruisen' met het wildtype werd vastgesteld, dat zowel in B als in M eigenschappen gelokaliseerd zijn (Bruening, 1969; De Jager & Van Kammen, 1970; De Jager, 1971).

De verdeling van eigenschappen over de twee stukken RNA van CPMV en de wederzijdse complementering van informatie bij de virusvermenigvuldiging maakten het interessant vast te stellen of de basevolgorde van het M-RNA volledig anders is dan die van B-RNA of dat er een gedeeltelijke overeenkomst in basevolgorde tussen de beide RNA's bestaat. Dit werd mogelijk toen voor het M-RNA en het B-RNA het replicerend RNA in de vorm van dubbelstrengig RNA van CPMV geïsoleerd was (Van Griensven & Van Kammen, 1969; Van Griensven, 1970). Bij moleculaire hybridisatie van het dubbelstrengig RNA met gelabeld M- en B-RNA is er geen competitie tussen B-RNA en M-RNA tijdens de hybridisatie: er is dus geen aantoonbare homologie tussen het M-RNA en het B-RNA van CPMV (Van Kammen, 1971b; Van Kammen & Rezelman, 1972).

Het gezuiverde dubbelstrengig RNA van CPMV wordt geïsoleerd uit een 15.000 *g*-sediment, aangeduid als de chloroplasten-nucleoli-fractie, van een homogenaat van geïnfecteerde cowpea-bladeren. Het gezuiverde dubbelstrengig RNA is bij hoge

zoutconcentratie, namelijk 1 × SSC, niet gevoelig voor RNase in een concentratie van 100 μg RNase A plus 150 Units RNase T_1 per 3 ml 1 × SSC. Wordt, eveneens bij 1 × SSC, het smeltgedrag van het dubbelstrengig RNA nagegaan dan wordt een T_m = 94 °C gevonden. Ook bij centrifugeren in Cs_2SO_4 sedimenteert het bij een voor dubbelstrengig RNA karakteristieke dichtheid, namelijk ρ = 1,60. Elektronenmicroscopie volgens Kleinschmidt laat zien dat twee groepen van moleculen voorkomen met gemiddelde lengtes van 1,3 μm en 2,4 μm. Dit maakt aannemelijk dat er zowel een dubbelstrengig RNA van M als een dubbelstrengig RNA van B is (Van Griensven et al., 1973).

2 Materiaal en methoden

2.1 Plantemateriaal

Zaad van *Vigna unguiculata* (L.) Walp. var. Blackeye Early Ramshorn werd betrokken van Burpee Seed Company, Philadelphia, Pa., U.S.A. Het werd gezaaid in Trio-potgrond Speciaal, een potgrond samengesteld op basis van doorgevroren zwartveen met toevoeging van een extra hoeveelheid kleigrond.

De planten werden gekweekt in de kas bij een temperatuur van 20 – 22 °C en een relatieve luchtvochtigheid van 65 tot 80 %.

Gedurende de zomer, van april tot september, bestond de belichting uitsluitend uit daglicht met een gemiddelde intensiteit van 3×10^{-3} J cm^{-2} sec^{-1}, gedurende de wintermaanden, van september tot april, werd in de 16-urige daglichtperiode bijbelicht met 80 W Ecko TL buizen (daglichttype 4300 K).

2.2 Cowpea-mozaïekvirus

Het cowpea-mozaïekvirus (CPMV) dat gebruikt werd in de experimenten behoort tot het isolaat dat aangeduid wordt met Sb en oorspronkelijk afkomstig is uit Suriname (Agrawal, 1964).

Cowpea-planten werden geïnfecteerd met CPMV door de primaire bladeren te inoculeren met perssap uit zieke cowpea-bladeren. Dit perssap werd verkregen door bladeren fijn te wrijven in 0,1 M Na-fosfaat-buffer pH 7,0 in een mortier en het homogenaat door kaasdoek te persen.

Vlak voor de inoculatie werden de secundaire bladeren uit de planten verwijderd om de virusvermenigvuldiging vooral in de primaire bladeren te laten plaatsvinden.

De geïnoculeerde planten werden overgebracht naar een Sherer groeikast, model 255-6. Gedurende vijf dagen vond virusvermenigvuldiging plaats bij een temperatuur van 30 °C, een relatieve luchtvochtigheid van 80 tot 90 % en werd continu belicht met een intensiteit van 10^{-2} J cm^{-2} sec^{-1}.

Na homogeniseren van de bladeren en centrifugeren van het homogenaat bij 15.000 *g*, werd uit de bovenstaande vloeistof het virus gezuiverd door precipitatie met PEG-NaCl en door differentiëel centrifugeren volgens de methode beschreven door Van Kammen (1967).

Uit het gezuiverde virus werd het RNA geïsoleerd door extractie met fenol-SDS in een Na-fosfaat-buffer of in een glycine-NaOH-buffer (Van Griensven, 1970).

2.3 Preparatieve bereiding van dubbelstrengig RNA

Primaire cowpea-bladeren werden vijf dagen na inoculatie met CPMV geoogst (zie 2.2 voor kweekomstandigheden). De gewichtshoeveelheid blad per oogst varieerde van 150 tot 500 g. De bereiding van dubbelstrengig RNA uit dit bladmateriaal werd uitgevoerd volgens de methode ontwikkeld door Van Griensven (1970).

De bladeren werden gespoeld met gedesioniseerd water en fijngeknipt. Daarna werd gehomogeniseerd in een Waring blendor in 0,1 M Na-fosfaat-buffer pH 7,0 (1,5 ml/g blad) gedurende 1 minuut. Het homogenaat werd door kaasdoek geperst om de grove plantenresten te verwijderen. Het perssap werd 10 minuten gecentrifugeerd bij 15.000 *g*. Uit de vloeistof werd het cowpea-mozaïekvirus geïsoleerd.

Het sediment werd gesuspendeerd in 10 ml glycine-NaOH-buffer (0,1 M glycine-NaOH pH 9,5, 0,1 M NaCl, 0,005 M EDTA, 1 % natriumlaurylsulfaat, 3 % diethylpyrocarbonaat) met behulp van een met een watje omwikkeld glazen staafje.

De suspensie werd eenmaal geëxtraheerd met een gelijk volume vers bereide, met water verzadigde fenol door gedurende 5 minuten krachtig te schudden met behulp van een Vortex-mixer. De fenolfase en de waterfase werden van elkaar gescheiden door centrifugeren bij 18.000 *g* gedurende 10 minuten en de waterfase werd afgepipeteerd. De waterfase werd opnieuw geëxtraheerd met een gelijk volume verse, met water verzadigde fenol. Het mengsel werd weer 10 minuten gecentrifugeerd bij 18.000 *g*. De waterfase werd gescheiden van de fenolfase en driemaal uitgeschud met ether om fenolresten te verwijderen. De residu-ether werd uit de waterfase verwijderd door stikstofgas door te leiden.

Het nucleïnezuurextract werd vervolgens 16 uur gedialyseerd tegen 2 liter 0,01 M tris-HCl pH 7,2, 0,15 M NaCl. Na dialyse werd het nucleïnezuurextract 10 minuten gecentrifugeerd bij 18.000 *g* om fijne deeltjes of stoffes te verwijderen.

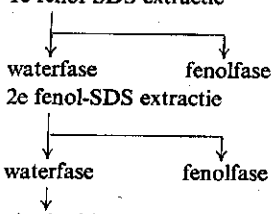
Aan de bovenstaande vloeistof werd één volume 2,5 M KH_2PO_4 pH 8,1, en één volume 2-methoxyethanol toegevoegd om in het extract aanwezige polysacchariden te verwijderen (Ralph & Bellamy, 1964). Na goed mengen werd de oplossing 5 minuten gecentrifugeerd bij 18.000 *g* en vervolgens werd de bovenfase afgepipeteerd. Hieraan werd één volume 0,2 M Na-acetaat toegevoegd. Vast cetyltrimethylammoniumbromide (CTA) werd opgelost in dit mengsel tot een eindconcentratie van 0,33 % (w/v). Het nucleïnezuur precipiteert als quaternair ammoniumzout. Het precipitaat werd driemaal gewassen met 0,1 M Na-acetaat-70 % ethanol. Daarna werd het 30 minuten onder vacuüm gedroogd en vervolgens opgelost in 0,01 M tris-HCl-buffer pH 7,2. De nucleïnezuuroplossing werd 16 uur gedialyseerd tegen 2 liter 0,01 M tris-HCl pH 7,2, 0,15 M NaCl. Na de dialyse werd het nucleïnezuurextracti ngevroren bij −20 °C; het kon onder deze omstandigheden gedurende lange tijd bewaard blijven. Op deze manier, die overigens niet gevolgd werd door Van Griensven (1970), werden nucleïnezuurextracten verzameld afkomstig van totaal 1000 tot 1500 g blad. De extracten werden na ontdooien gecombineerd en verder samen opgewerkt.

De verzamelde extracten werden eerst gecentrifugeerd bij 18.000 *g* gedurende 10 minuten om niet-opgelost materiaal te verwijderen. De bovenstaande vloeistof werd

Tabel 1. Schema voor de zuivering van het dubbelstrengig RNA van CPMV.

Fase

A Primair cowpea-blad, geïnfecteerd met CPMV, homogeniseren en centrifugeren.
Suspenderen van het 15.000 *g*-sediment
1e fenol-SDS extractie



uitschudden met ether; doorleiden van N_2; precipitatie met ethanol.

B Fase-scheiding met KH_2PO_4 / methoxyethanol
precipitatie met cetyltrimethylammoniumbromide / Na-acetaat
sediment wassen met ethanol / Na-acetaat
sediment suspenderen, suspensie dialyseren.

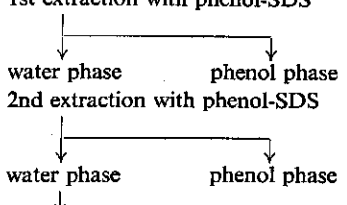
C Incubatie met DNase I gevolgd door precipitatie met ethanol
precipitaat drogen onder vacuüm, vervolgens oplossen in 1 × SSC
suspensie dialyseren
precipitatie met 4 M NaCl van enkelstrengig RNA
dialyse bovenstaande vloeistof.

D Filtratie over Sephadex G200
dialyse.

E Evenwichtscentrifugering in Cs_2SO_4
verzamelen en dialyseren van het materiaal bij de dichtheid $\rho = 1{,}60$: het dubbelstrengig RNA. Meten van de concentratie en invriezen.

Phase

A Primary leaves of cowpea, infected with CPMV, homogenization and centrifugation.
Resuspend the 15,000 *g* pellet
1st extraction with phenol-SDS



Remove phenol with ether; bubble through N_2-gas; precipitation with ethanol.

B Phase-separation with KH_2PO_4 / methoxyethanol; precipitation with cetyltrimethylammonium bromide / Na-acetate; wash the sediment with ethanol / Na-acetate; resuspend sediment; dialyse the suspension.

C Incubation with DNase I followed by precipitation with ethanol; dry the precipitate under vacuum conditions; resuspend the dry precipitate in 1 × SSC; dialyse the suspension; precipitate single-stranded RNA by adjusting the suspension to 4 M NaCl; dialyse the supernatant.

D Filtration on a Sephadex G200 column, dialyse the double-stranded RNA containing eluate.

E Equilibrium density gradient centrifugation in Cs_2SO_4; collect and dialyse the material at $\rho = 1.60$: the double-stranded RNA; estimate the concentration of the double-stranded RNA and store by freezing at −20 °C.

Table 1. Scheme for the purification of double-stranded RNA of CPMV.

geïncubeerd met DNase I. Het nucleïnezuurpreparaat werd voor deze incubatie op een concentratie van 1 mg/ml gebracht om steeds een gelijke verhouding DNase I: nucleïnezuur te hebben. Vervolgens werd gedurende 30 minuten bij 30 °C geïncubeerd met 10 μg/ml pancreas-DNase I in 0,01 M tris-HCl pH 7,2, 0,15 M NaCl, 0,005 M $MgCl_2$. Aan het einde van de incubatie werd het RNA geprecipiteerd met 2 volumina 96 % ethanol van −20 °C. Het mengsel werd 16 uur bij −20 °C weggezet om een volledige precipitatie van het RNA te bereiken. Het geprecipiteerde RNA werd verzameld door 10 minuten te centrifugeren bij 27.000 *g*. Het sediment werd gedroogd onder vacuüm en vervolgens opgelost in 1 × SSC (0,015 M Na-citraat, 0,15 M NaCl, pH 7,2).

Aan het RNA-extract werd vast NaCl toegevoegd en hierin opgelost tot een concentratie van 4 M. De oplossing werd ingevroren bij −20 °C, daarna weer ontdooid en het met 4 M NaCl geprecipiteerde RNA werd gesedimenteerd door 10 minuten te centrifugeren bij 27.000 *g*. De bovenstaande vloeistof, die het dubbelstrengig RNA en laagmoleculair RNA bevatte, werd gedurende 16 uur gedialyseerd tegen 2 liter 1 × SSC.

De concentratie van het RNA werd na dialyse gemeten bij 260 nm en gebracht op een concentratie van 1,5 tot 2 mg/ml. Indien nodig gebeurde dit door de oplossing in te dampen met behulp van een filmverdamper (Büchi Rotavapor 'R'), hetgeen dan weer werd gevolgd door een nieuwe dialyse.

Vervolgens werd het RNA, in porties van 20 – 25 mg, gebracht op een Sephadex G200 kolom (lang 72 cm, ∅ 3,9 cm, maximaal op te brengen hoeveelheid RNA: 40 mg) en geëlueerd met 1 × SSC. De fracties die onmiddellijk na het 'void volume'

Tabel 2. Hoeveelheden[1] nucleïnezuur (mg) in de verschillende fasen bij zuivering van dubbelstrengig RNA.

Fase / Phase	Experiment		
	I	II	III
B (fenol-SDS / CTA)	65,0	63,5	117,0
C (na DNase / 4 M NaCl)	10,1	12,6	15,8
D (na Sephadex G200)	0,54	0,61	0,93
E (na Cs_2SO_4)	0,32 (0,5)[2]	0,43 (0,7)	0,60 (0,5)

[1] De hoeveelheden nucleïnezuur zijn berekend uitgaande van 1000 g blad per experiment. De symbolen B, C, D en E corresponderen met die uit tabel 1, waar ze de verschillende fasen in de zuivering van het dubbelstrengig RNA aangeven. / The amounts of double-stranded RNA are calculated starting from 1,000 g of leaves per experiment. The symbols B, C, D and E correspond to those in table 1, where they indicate the different phases in the purification of double-stranded RNA.
[2] Opbrengst in % van B. / Yield as % of B.

Table 2. Yield[1] of nucleic acid (mg) in the different phases of the purification of double-stranded RNA.

opgevangen werden, bevatten het dubbelstrengig RNA. Het aantal fracties, dat dubbelstrengig RNA bevatte en de concentratie van het RNA werd bepaald door de fracties te meten bij 260 nm. Vervolgens werden ze verzameld en geconcentreerd. Het RNA werd daarna 16 uur gedialyseerd tegen 2 liter 1 × SSC.

Vast Cs_2SO_4 werd tot een concentratie van 48 % (w/w) en een gemiddelde dichtheid ρ = 1,60 in het RNA-mengsel opgelost. De oplossing met een concentratie van 125 – 150 μg RNA per centrifugebuis werd 90 uur gecentrifugeerd in een Spinco SW 39 rotor bij 35.000 rpm. De buizen werden verdeeld in fracties van 4 druppels, door hiervoor dezelfde set reageerbuizen te gebruiken, werden overeenkomstige fracties uit drie centrifugebuizen gecombineerd. Het materiaal dat zich in de vloeistof met een dichtheid ρ = 1,60 bevond was het dubbelstrengig RNA. Dit RNA werd verzameld en verdund met 1 × SSC. Het werd 3 × 24 uur gedialyseerd tegen 2 liter 1 × SSC. De concentratie van het dubbelstrengig RNA werd bepaald bij 260 nm, het dubbelstrengig RNA werd in porties van 1 ml verdeeld, in een concentratie variërend van 25 tot 50 μg/ml, en vervolgens ingevroren bij –20 °C.

Tabel 1 geeft de zuivering van het dubbelstrengig RNA in een schema weer. De opbrengst aan nucleïnezuur na de verschillende, in tabel 1 genoemde fasen, wordt in tabel 2 weergegeven aan de hand van een drietal experimenten. Uit de tabel blijkt, dat na centrifugeren van het nucleïnezuur in Cs_2SO_4, 0,5 to 0,7 % van het nucleïnezuur verkregen uit de fractie verkregen bij 15.000 *g* dubbelstrengig RNA is. Het nucleïnezuur uit de fractie verkregen bij 15.000 *g* vormt ongeveer 10 % van het totale

Fig. 1. Elutie met 1 × SSC van dubbelstrengig RNA bij filtratie op Sephadex G200 (lengte van de kolom: 38 cm, doorsnede: 2,7 cm). De piek aangeduid met een pijl geeft het dubbelstrengig RNA van CPMV aan. De later verschijnende zeer brede piek is laagmoleculair RNA. Er werd 5,0 mg RNA opgebracht, de opbrengst aan dubbelstrengig RNA na indampen en dialyseren bedroeg 137 μg.

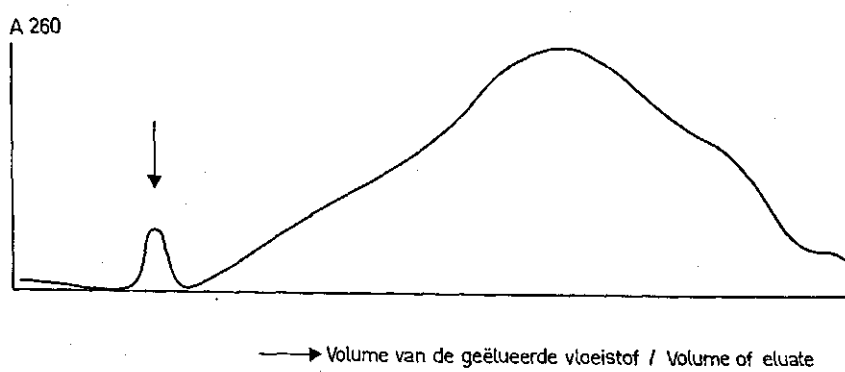


Fig. 1. Elution of double-stranded RNA with 1 × SSC upon Sephadex G200 (length of the column: 38 cm, diameter: 2.7 cm). The peak indicated with an arrow represents double-stranded RNA of CPMV. The broad major peak represents RNA of low molecular weight. A portion of 5.0 mg of RNA was filtrated on the column, the yield of double-stranded RNA after concentrating and dialysing the material in the first peak was 137 μg.

Fig. 2. Evenwichtscentrifugering van het dubbelstrengig RNA van CPMV in Cs_2SO_4. Honderdentien μg RNA van een Sephadex G200 eluaat per SW 39 buis werd gedurende 90 uur gecentrifugeerd in Cs_2SO_4 met een gemiddelde dichtheid $\rho = 1{,}60$. De opbrengst aan dubbelstrengig RNA na indampen en dialyseren bedroeg 70 μg.

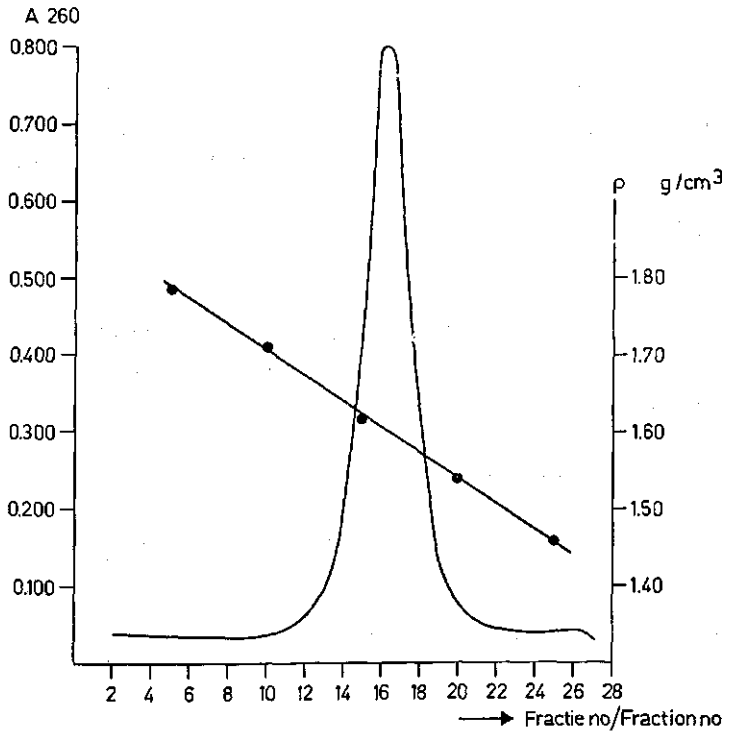


Fig. 2. Density-gradient centrifugation in Cs_2SO_4 of double-stranded RNA of CPMV. One hundred and ten μg of RNA of a Sephadex G200-eluate per SW 39 centrifuge tube was centrifuged for 90h in Cs_2SO_4 with an average density, $\rho = 1.60$. The yield of double-stranded RNA after concentration and dialysis was 70 μg.

nucleïnezuur uit de bladeren. Dit betekent, dat het gezuiverde dubbelstrengig RNA 0,06 % van de totale hoeveelheid geïsoleerd nucleïnezuur in het blad vormt. Ten opzichte van de resultaten van Van Griensven (1970) betekent dit een verbetering van de opbrengst met een factor 6.

De verklaring voor deze hogere opbrengst moet gezocht worden in het verzamelen van het nucleïnezuur van een aantal fenol-SDS-extracties, waardoor bij verdere zuivering werd uitgegaan van nucleïnezuur afkomstig van een 10 tot 15 maal grotere hoeveelheid blad als gebruikt door Van Griensven. Tevens werd tijdens de extractie afbraak van het nucleïnezuur, veroorzaakt door RNase, vermeden door het gebruik van diethylpyrocarbonaat bij de extractie met fenol-SDS en ook door het hoogmoleculair enkelstrengig RNA te precipiteren met 4 M NaCl om dit te scheiden van het

dubbelstrengig RNA in plaats van het te verwijderen met RNase.

Werd de precipitatie met NaCl stapsgewijs uitgevoerd, nl. met 1 M, 2 M, 3 M en 4 M, dan werd een zeer goede scheiding tussen enkelstrengig en dubbelstrengig RNA verkregen. De scheiding tussen dubbelstrengig RNA en het laagmoleculaire RNA bij filtratie op een Sephadex G200 kolom verliep daarna ook zeer goed, zoals blijkt uit het teruglopen van de lijn, die de dubbelstrengig RNA-piek in het elutiepatroon weergeeft, naar de basis (fig. 1).

Werd het dubbelstrengig RNA bevattende nucleïnezuur uit een dergelijk Sephadex G200 filtraat gecentrifugeerd op Cs_2SO_4-gradiënten, dan wees de symmetrische verdeling van het materiaal rond een dichtheid $\rho = 1{,}60$ (fig. 2), eveneens op een slechts geringe verontreiniging van het dubbelstrengig RNA met enkelstrengig RNA.

2.4 Bepaling van het DNA-gehalte

De bepaling van de hoeveelheid DNA aanwezig in nucleïnezuurpreparaten werd uitgevoerd met de difenylamine-reactie volgens Burton (1956). DNA uit kalfsthymus werd als standaard gebruikt.

2.5 Bepaling van nucleïnezuurconcentraties

De concentratie van het nucleïnezuur in de preparaten werd spectrofotometrisch bepaald. Als extinctiecoëfficient werd genomen E_{260} (1 mg/ml; 1 cm) = 24.

2.6 Bereiding van CPMV-RNA gelabeld met ^{3}H-uridine

Primaire cowpea-bladeren werden 24 uur na inoculatie geoogst. De middennerf werd uit de bladeren verwijderd en de bladeren werden kamvormig ingesneden, beginnend op enkele millimeters van de bladrand en loodrecht op de middennerf; de onderlinge afstand tussen de sneden bedroeg ongeveer 2 mm. De bladhelften werden in petrischalen gelegd. Elke schaal (∅ 15 cm) bevatte 10 g blad in 10 ml 0,01 M NaH_2PO_4 pH 7,2. Per schaal werd druppelsgewijs met behulp van een injectiespuit 0,3 mCi ^{3}H-uridine (specifieke activiteit 30 Ci/mmol) toegevoegd. De schalen werden 65 uur bij 30 °C en in continu licht gezet. Daarna werden de bladeren gewassen met gedesioniseerd water.

Het virus werd uit de bladeren geïsoleerd en uit het gezuiverde virus werd het RNA geëxtraheerd met fenol-SDS (zie 2.1).

Het met ^{3}H-uridine gelabelde CPMV-RNA had een specifieke activiteit van 7.500 cpm/μg zoals werd bepaald met een tel-efficiëntie van 30 % in een scintillatiemengsel volgens Bruno & Christian (1961) in een Packard Liquid Scintillation Spectrometer model 3375.

CPMV-RNA met een veel hogere specifieke activiteit, nl. van 65.000 cpm/μg, werd verkregen door cowpea-bladeren 16 uur na inoculatie te oogsten en 7 g blad per petrischaal gedurende 72 uur te labelen met 1,25 mCi ^{3}H-uridine (specifieke activiteit

43,3 Ci/mmol) in 15 ml 0,01 M KH_2PO_4 pH 7,0, waaraan 15 mg thymidine was toegevoegd.

2.7 Elektroforese in polyacrylamidegels

2.7.1 Uitvoering

Elektroforese van nucleïnezuur werd uitgevoerd volgens de methode van Loening & Ingle (1967) in 2 % polyacrylamidegels versterkt met 0,5 % agarose. In 24 ml gedesioniseerd water werd 0,15 g agarose opgenomen en verhit tot 100 °C tot de agarose gesmolten was. Daarna werd het volume van de oplossing op 24,0 ml gebracht en de oplossing bij een temperatuur van 30 – 40 °C gehouden om voortijdig stollen van de agarose tegen te gaan. Vervolgens werd 3,0 ml van een 20 % acrylamide-oplossing (acryl : bisacryl = 19 : 1; beide waren herkristalliseerd) toegevoegd. Daarna werd 3,0 ml 0,36 M tris-H_3PO_4, 0,3 M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 0,01 M EDTA pH 7,7 en vervolgens 0,024 ml TEMED (N, N, N′, N′ tetramethylethyleendiamine) toegevoegd. Voortdurend werd goed gemengd. Daarna werd 0,09 ml van een versbereide 10 % ammoniumpersulfaat-oplossing toegevoegd. Na nogmaals goed mengen werd de oplossing in perspex buisjes (0,6 × 6,5 cm) gepipeteerd. De hoeveelheid oplossing was voldoende voor het bereiden van 16 gels. De buisjes werden tenminste 5 uur bij kamertemperatuur gezet om het acrylamide te laten polymeriseren. Tijdens deze periode werden de buisjes afgedekt met vochtige Kleenex om uitdrogen van de gels te voorkomen. Na polymerisatie werd eerst de top van de gels onder het in de agarose zichtbare polymerisatievlak van de acrylamide met een scheermesje afgesneden en vervolgens ook de onderkant van de gels, zodanig dat de lengte van de gels 5 cm bedroeg. Bovendien werd aldus een vlakke top en bodem van de gel verkregen. De buisjes werden aan de onderzijde voorzien van een stukje nylon-kous om te verhinderen, dat de gels tijdens de elektroforese uit de buisjes zouden glijden.

De elektroforese werd uitgevoerd in een Acrylophor (Pleuger). Eerst werden de gels gepreëlektroforeerd met 5 mA/gel in 0,036 M tris-H_3PO_4, 0,03 M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 0,001 M EDTA, pH 7,7, 0,2 % natriumlaurylsulfaat elektroforese-buffer bij 4 °C gedurende 1 uur. Beide compartimenten van de Acrylophor waren tot de rand met buffer gevuld. Daarna werd de elektroforese-buffer ververst en het nucleïnezuur werd op de top van de gels gebracht. Aan het nucleïnezuur waren eerst enkele korrels sucrose toegevoegd om het opbrengen op de gels van het monster onder de elektroforese-buffer te vergemakkelijken. De elektroforese werd eveneens bij 4 °C met 5 mA/gel uitgevoerd.

2.7.2 De verdeling van de optische dichtheid

De verdeling van het nucleïnezuur over de gels werd bepaald als de verdeling van de optische dichtheid bij 260 nm gemeten met behulp van een Beckman DU spectrofotometer model G 2400 uitgerust met een Gilford 2410 Linear Transport, een ERA

Attachment en een Beckman-recorder. Vóór het doormeten werden de gels 2 uur gespoeld met gedesioniseerd water.

2.7.3 De verdeling van de radioactiviteit

Voor het bepalen van de verdeling van de radioactiviteit over de gel na elektroforese van gelabeld nucleïnezuur, werd de gel met vast CO_2 bevroren, waarna er plakjes van 1 mm met een Mickle Gel Slicer van werden gesneden. Elk plakje werd in een telpotje (Amphabel) gedaan en er werd 1 ml Solueen (Packard) bijgepipeteerd. De potjes werden 16 uur bij 26 tot 30 °C gezet en daarna werden ze gevuld met 10 ml scintillatievloeistof (5,0 g 2,5-difenyloxazol (PPO) en 0,5 g p-bis-(O-methylstyryl)-benzeen (bis-MSB) in 1000 ml tolueen). De radioactiviteit per potje werd gemeten in een Packard Liquid Scintillation Spectrometer model 3375. De tel-efficiëntie, die met behulp van een ijkkromme bepaald werd, bedroeg bij deze metingen 39 tot 40 %.

2.8 Moleculaire hybridisatie

Bepalingen door middel van moleculaire hybridisatie werden uitgevoerd volgens de methode beschreven door Van Kammen (1971b).

Monsters van nucleïnezuur met dubbelstrengig RNA werden gemengd met variërende hoeveelheden (1 – 15 μg) CPMV-RNA gelabeld met ^{3}H-uridine in een glazen ampul in 2 × SSC, 0,005 M EDTA pH 7,2; het totaalvolume bedroeg 0,5 ml. De ampullen waren zorgvuldig gespoeld met verdunde KOH en verdund HCl om elk spoor van eventuele RNase-verontreiniging te verwijderen.

De ampullen werden dichtgesmolten, vervolgens verhit in een glycolbad bij 105 °C gedurende 20 minuten en daarna 100 minuten bij 70 °C geïncubeerd. De ampullen werden vervolgens overgebracht in ijs bij 0 °C en geopend. Aan elke ampul werd 0,5 ml van een mengsel van 100 μg RNase A en 150 Units RNase T_1 toegevoegd en na goed mengen werden de ampullen 20 minuten geïncubeerd bij 37 °C. Daarna werd nogmaals een mengsel van 100 μg RNase A en 150 Units RNase T_1 in 0,5 ml toegevoegd en de incubatie werd gedurende 20 minuten voortgezet.

Het voor RNase ongevoelige nucleïnezuur werd neergeslagen door toevoegen van een gelijk volume koud 10 % trichloorazijnzuur (TCA) en op een Milliporefilter (HAWP 304 FO) verzameld. De filter werd 2 à 3 maal gewassen met koud 5 % TCA en daarna aan de lucht gedroogd. De radioactiviteit op de filter werd bepaald in 10 ml scintillatievloeistof volgens Bruno & Christian (1961) (1700 ml dioxaan, 320 ml 2-methoxyethanol, 96 g naftaleen, 10 g 2,5-difenyloxazol (PPO), 1 g p-bis-(O-methylstyryl)-benzeen (bis-MSB)) per telpotje (Amphabel), in een Packard Liquid Scintillation Spectrometer model 3375 met een tel-efficiëntie, die bij elke meting met behulp van een ijkkromme gecontroleerd werd, van ongeveer 30 %. De resistentie tegen RNase van het met ^{3}H-uridine gelabelde CPMV-RNA was ongeveer 0,1 %; de bepalingen werden hiervoor gecorrigeerd.

2.9 Electronenmicroscopie van nucleïnezuur

Nucleïnezuurpreparaten met dubbelstrengig RNA van CPMV werden elektronenmicroscopisch onderzocht met de eiwit-monolayer techniek van Dunnebacke & Kleinschmidt (1967) met enkele wijzigingen.

De spreidingsexperimenten werden als volgt uitgevoerd: 0,2 ml van een nucleïnezuuroplossing (50 μg/ml) werd gemengd met 0,4 ml van een formamideammoniumacetaatoplossing (7,5 ml 100 % formamide plus 2,5 ml 3,6 M ammoniumacetaat). Na enkele minuten werd hieraan 0,4 ml van een cytochroom C-ammoniumacetaatoplossing (0,05 % cytochroom C in 1,2 M ammoniumacetaat) toegevoegd waardoor de eindconcentratie van het formamide in het mengsel 30 % werd. De cytochroom C oplossing werd voor gebruik gefiltreerd door een Millipore filter (HAWP 304 FO) om verontreinigingen te verwijderen.

Via een stukje versgespleten mica werd 0,1 ml van het mengsel gespreid op een hypofase van dubbelgedestilleerd water. De gevormde monolayer werd opgepikt door de grids met behulp van een pincet kort in aanraking te brengen met de monolayer.

De grids waren van koper, 400 mesh, en voorzien van een formvar-vlies, waar koolstof opgedampt was. Na het aanbrengen van de monolayer werden de grids gewassen in ethanol en vervolgens in het snel verdampende isopentanol. Daarna werden ze geschaduwd met 3,5 mg Platina-Iridium (legering 90/10) op een roterende tafel bij 1500 omw./min onder een hoek van 7 °. De Pt-Ir werd opgedampt vanaf een 0,75 mm wolframdraad bij een druk van 5×10^{-4} Torr op een gemiddelde afstand van 5 cm van de grids.

Elektronenmicroscopische opnamen van de preparaten werden gemaakt met een Siemens Elmiskop 101 elektronenmicroscoop bij een vergroting van 20.000 × en 80 kV. Lengtemetingen aan moleculen werden uitgevoerd bij een eindvergroting van 100.000 ×.

2.10 Elektronenmicroscopie van blad en fracties

2.10.1 Primair blad

Primair blad van cowpea werd vier dagen na inoculatie met CPMV geoogst. Stukjes blad met een oppervlak van 1 cm^2 werden gedurende twee uur bij 0 °C onder vacuüm geïnfiltreerd met 5 % glutaaraldehyde in 0,08 M cacodylaat-buffer pH 7,4 (De Zoeten & Gaard, 1969) en vervolgens werden de bladstukjes nog $4^1/_2$ uur gespoeld in cacodylaat-buffer. De oorspronkelijke wondvlakken van de bladstukjes werden verwijderd door van elk van de vier zijden een strookje van 1 mm breed af te snijden, het overblijvende bladstukje werd in reepjes van 8 mm lang en 1 mm breed verdeeld.

Deze reepjes werden 16 uur gefixeerd in Palade's fixatief (met 1 % OsO_4) (Pallade, 1952) en daarna gedehydrateerd in respectievelijk 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100 en nog-

maals 100 % aceton, telkens gedurende 30 minuten. Vóór het inbedden werd 16 uur gekleurd met een verzadigde oplossing van uranyl-acetaat in 70 % aceton.

De bladreepjes werden ingebed in een Epon-araldite-mengsel en daarna gekleurd met loodcitraat volgens Reynolds (1963).

De coupes werden vervaardigd met een LKB-ultramicrotoom. Elektronenmicroscopische opnamen van de coupes werden gemaakt met een Siemens Elmiskop 101 elektronenmicroscoop bij 80 kV.

2.10.2 Materiaal uit fracties van sucrose-gradiënten

Materiaal uit fracties van sucrose-gradiënten werd op twee verschillende manieren behandeld. In het eerste geval werden monsters uit de fracties gewassen door 7 volumina 1 × SSC toe te voegen en te centrifugeren bij laag toerental. Het sediment werd gefixeerd in 1 % osmium-tetroxide in 0,2 M fosfaat-buffer, pH 7,3, gedurende 1 uur bij kamertemperatuur. Vervolgens werd het sediment gewassen met fosfaatbuffer en daarna gedehydrateerd door het stapsgewijs te behandelen met 50, 70, respectievelijk 96 % ethanol, telkens gedurende vijf minuten. Na twee behandelingen van 10 respectievelijk 20 minuten met 100 % ethanol werd het sediment ingebed in geprepolymeriseerd methacrylaat (butyl/methyl-ester verhouding 4 : 1).

De coupes werden vervaardigd op een LKB-ultramicrotoom en gekleurd met 5 % uranylacetaat en met loodcitraat volgens Reynolds (1963).

Elektronenmicroscopische opnamen van de coupes werden gemaakt met een Siemens Elmiskop I elektronenmicroscoop bij 80 kV.

In het tweede geval werden monsters uit de fracties verdund met 7 volumina 1 × SSC en 0,5 ml hiervan werd 10 minuten gecentrifugeerd in plastic centrifugebuizen bij 12.000 *g*. De sedimenten werden gefixeerd, gekleurd, ingebed en gesneden zoals beschreven voor het primaire blad (2.10.1). Na de fixatie met glutaaraldehyde werd de bodem uit de plastic centrifugebuizen gesneden om de manipulaties met de sedimenten te vergemakkelijken en deze zo voorzichtig mogelijk uit te voeren om de sedimenten zo min mogelijk te verstoren.

Elektronenmicroscopische opnamen van de coupes werden vervaardigd met een Siemens Elmiskop 101 elektronenmicroscoop bij 80 kV.

2.11 Chemicaliën

Acrylamide, Koch-Light, Labs. Ltd.
Actinomycine D, Merck, Sharp & Dohme, Haarlem
bis-MSB, p-bis-(O-methylstyryl)-benzeen, Packard, Brussel
Bis, N, N-methyleenbisacrylamide, Koch-Light, Labs. Ltd.
Cytochroom C, Calbiochem, Los Angeles
Dextran T40, Pharmacia, Uppsala
Diethylpyrocarbonaat, K & K rare chemicals
DNA, Sigma, type I, from calf thymus

DNase I, Sigma, DN-EP, from bovine pancreas
Ficoll, Pharmacia, Uppsala
Polyethyleenglycol, Carbowax 2000, Heybroek, Amsterdam
PPO, 2,5-difenyloxazol, Packard, Brussel
RNase A, Sigma, type I-A, 5 × crystallized, from bovine pancreas
RNase T_1, Sigma, grade III, from *Aspergillus oryzae*
Sephadex G200, Pharmacia, Uppsala
Solueen, Packard, Brussel
TEMED, N, N, N', N'-tetramethylethyleendiamine, Koch-Light, Labs. Ltd.

^{3}H-uridine was afkomstig van The Radiochemical Centre, Amersham, Engeland. Alle andere gebruikte chemicaliën waren afkomstig van Merck, Darmstadt of van BDH, Chemicals Ltd.

Dialysehuls Visking type 8/32, 18/32 en 36/32 van Höfelt, 's-Gravenhage, werd voor gebruik uitgekookt in 10^{-4} M Na_3EDTA.

3 Elektroforese in polyacrylamidegel en karakterisering van het dubbelstrengig RNA van CPMV

Bij extractie van nucleïnezuur uit geïnfecteerde bladeren is de geïsoleerde hoeveelheid dubbelstrengig RNA van CPMV klein ten opzichte van de hoeveelheden virus-RNA, enkelstrengig RNA en DNA van de plant. Voor het aantonen van het dubbelstrengig RNA was het daarom van belang een methode te vinden waarmee het dubbelstrengig RNA van het enkelstrengig RNA en het DNA kon worden onderscheiden. Daartoe werd het gedrag van het dubbelstrengig RNA op polyacrylamidegel onderzocht. Het PAAGE-patroon werd gekarakteriseerd met behulp van moleculaire hybridisatie.

Door gels waarin dubbelstrengig RNA respectievelijk enkelstrengig RNA en DNA geëlektroforeerd waren te incuberen met pancreas DNase of met een mengsel van RNase A en RNase T_1, werd onderzocht of het verschil in gevoeligheid voor deze enzymen gebruikt kon worden om deze nucleïnezuren van elkaar te onderscheiden.

3.1 Elektroforese in polyacrylamidegel (PAAGE)

Het gedrag van het dubbelstrengig RNA van CPMV bij elektroforese werd onderzocht op 2 % polyacrylamidegels versterkt met 0,5 % agarose in 0,036 M tris-H_3PO_4, 0,030 M $NaH_2PO_4 . 2H_2O$, 0,001 M EDTA, pH 7,7, 0,2 % natriumlaurylsulfaat elektroforese-buffer (TPES-buffer).

Er werd 10 μg dubbelstrengig RNA per gel opgebracht. Na twee uur werd de elektroforese beëindigd en de verdeling van de optische dichtheid over de gel bij 260 nm bepaald. Het patroon werd gekenmerkt door twee pieken, de een op 1,12 cm, de ander op 1,20 cm afstand van de opbrengplaats (fig. 3). De pieken waren zeer scherp wanneer het dubbelstrengig RNA zeer zuiver en intact was.

Zeer zuivere preparaten waren niet verontreinigd met enkelstrengig RNA of met DNA. Zo'n zuiver preparaat was tijdens de bereiding van het dubbelstrengig RNA al herkenbaar aan het gedrag van het dubbelstrengig RNA bij de Sephadex G200 gelfiltratie en bij de evenwichtscentrifugering in Cs_2SO_4. Het dubbelstrengig RNA elueerde dan van de Sephadex G200 kolom in een scherpe piek, die helemaal naar de basislijn terugliep, en bij het centrifugeren in Cs_2SO_4 werd een symmetrische piek bij $\rho = 1{,}60$ van dubbelstrengig RNA gevonden (zie 2.3, fig. 1 en fig. 2).

Preparaten van gezuiverd dubbelstrengig RNA, die herhaaldelijk ontdooid en weer ingevroren werden, gaven een patroon waarbij de het snelst bewegende piek breed uitliep naar de zijde van de pluspool, wat duidt op een toename van klein, sneller bewegend dubbelstrengig RNA, mogelijk ontstaan door breuken in oorspronkelijk intacte moleculen.

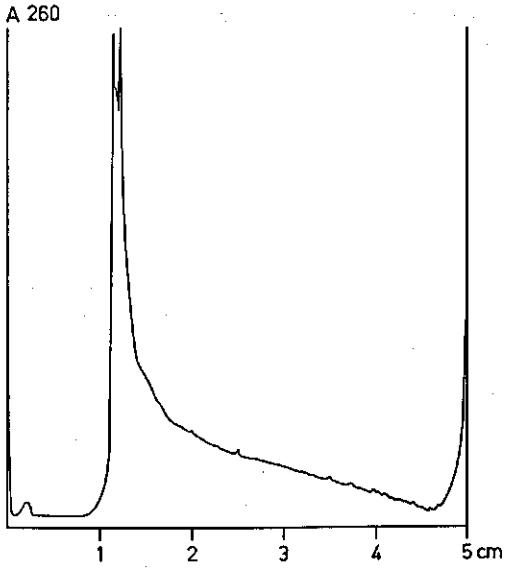


Fig. 3. Verdeling van de optische dichtheid over de gel na elektroforese van 10 μg dubbelstrengig RNA van CPMV op 0,5% agarose- 2% polyacrylamidegel in TPES-buffer gedurende 2½ uur. In dit en in de volgende patronen is de elektroforese-richting van links naar rechts.

Fig. 3. Optical density pattern after electrophoresis of 10 μg of double-stranded RNA of CPMV on 0.5% agarose- 2% polyacrylamidegel in TPES-buffer for 2½h. In this and following patterns the direction of electrophoresis is from the left to the right.

3.2 Karakterisering van het PAAGE-patroon van dubbelstrengig RNA met behulp van moleculaire hybridisatie

Het voorkomen van twee scherpe pieken in het PAAGE-patroon van het dubbelstrengig RNA suggereert de mogelijkheid dat elk van de pieken overeenkomt met dubbelstrengig RNA van één van de beide RNA's van CPMV. De langzaam bewegende piek zou dubbelstrengig B-RNA kunnen zijn, de snel bewegende piek dubbelstrengig M-RNA. Dit werd nagegaan door middel van moleculaire hybridisatieproeven met nucleïnezuur uit elk van de pieken uit het PAAGE-patroon.

De proeven werden gedaan met twee verschillende porties dubbelstrengig RNA. Van elk van de porties werd met behulp van moleculaire hybridisatie de verhouding dubbelstrengig RNA van M tot dubbelstrengig RNA van B bepaald vóór elektroforese. De verhouding dubbelstrengig RNA van M tot dubbelstrengig RNA van B in het nucleïnezuur, geëxtraheerd uit de gel na elektroforese, zou, wanneer de elektroforese en de extractie uit de gel geen complicaties geven, daarmee overeen moeten komen.

Van beide porties werd 1 μg dubbelstrengig RNA gehybridiseerd met 1 μg van een mengsel van met ^{3}H-uridine gelabeld M-RNA + B-RNA (specifieke activiteit: 7.685 cpm/μg RNA). Na hybridisatie bleek portie 1 1488 cpm en portie 2 1812 cpm, aan voor RNase ongevoelig materiaal te bevatten (tabel 3). De getallen geven de totale hoeveelheid dubbelstrengig RNA weer, dus de hoeveelheid dubbelstrengig RNA van M plus de hoeveelheid dubbelstrengig RNA van B.

De hybridisatie werd ook uitgevoerd in aanwezigheid van hetzij een grote overmaat van ongelabeld M-RNA, hetzij een grote overmaat van ongelabeld B-RNA. Is tijdens de hybridisatie een grote hoeveelheid ongelabeld M-RNA aanwezig, dan zal dit het gelabeld M-RNA verdringen bij de hybridisatie-reactie. De voor RNase ongevoelige

Tabel 3. Verhouding tussen de hoeveelheden dubbelstrengig RNA van M en dubbelstrengig RNA van B bepaald door middel van moleculaire hybridisatie.

Hybridisatiemengsel / Hybridization mixture			
dubbelstrengig RNA / double-stranded RNA (μg)	1	1	1
gelabeld M + B RNA / labeled M + B RNA (μg)	1	1	1
ongelabeld RNA / unlabeled RNA (μg)	0	20 (M-RNA)	20 (B-RNA)
Dubbelstrengig RNA van portie / Double-stranded RNA of portion			
1	1488[1]	901	581
2	1812	1099	738

[1] De getallen geven het voor RNase ongevoelige materiaal in cpm na hybridisatie / Numbers given represent the RNase resistant material in cpm after molecular hybridization.

Table 3. Ratio of the amounts of double-stranded RNA of M and double-stranded RNA of B estimated by molecular hybridization.

activiteit die na hybridisatie gevonden wordt, is dan alleen afkomstig van gehybridiseerd gelabeld B-RNA. Uit tabel 3 blijkt, dat dit voor portie 1 901 cpm en voor portie 2 1099 cpm was. Omgekeerd was bij aanwezigheid van een grote hoeveelheid ongelabeld B-RNA de voor RNase ongevoelige activiteit in het hybridisatieprodukt afkomstig van het gelabelde M-RNA, voor portie 1 was dit 581 cpm en voor portie 2 738 cpm. Uit de getallen blijkt, dat de verhouding dubbelstrengig RNA van M tot dubbelstrengig RNA van B voor beide porties dubbelstrengig RNA 2:3 was.

Er werden twee elektroforese-experimenten uitgevoerd. Veertien μg dubbelstrengig RNA werd per gel opgebracht en gedurende zeven uur geëlektroforeerd. Na $3^1/_2$ uur werd de elektroforese-buffer een keer ververst. Aan het eind van de elektroforese werd de verdeling van het nucleïnezuur over de gels bepaald bij 260 nm. Figuur 4 geeft het patroon van een gel met dubbelstrengig RNA van portie 2. Het dubbelstrengig RNA van piek II, dat zich het langzaamst bewoog, bevond zich op 2,6 cm, terwijl het snellere dubbelstrengig RNA van piek I zich op 3,3 cm afstand van het begin van de gel bevond.

Door te elektroforeren met 14 μg dubbelstrengig RNA per gel bevatte elke piek zoveel nucleïnezuur, dat extractie hiervan uit de gel voldoende materiaal opleverde voor moleculaire hybridisatie-proeven.

De plaats van de pieken I en II in de gel werd met behulp van de scan-apparatuur zorgvuldig bepaald. Het geltransport werd zó ingesteld, dat het piek-maximum zich voor het spleetdiafragma in het fotohuis bevond. In deze stand gaf de pen van de recorder namelijk de maximale uitslag. Er werd een plak uit de gel gesneden overeenkomend met de aan het PAAGE-patroon gemeten breedte van de piek, symmetrisch ten opzichte van het spleetdiafragma.

Fig. 4. Verdeling van de optische dichtheid over de gel na elektroforese van 14 μg dubbelstrengig RNA van CPMV op polyacrylamide-agarose gel gedurende 7 uur. Het dubbelstrengig RNA werd vervolgens uit de gel geëxtraheerd en de extracten werden gebruikt voor hybridisatie-experimenten.

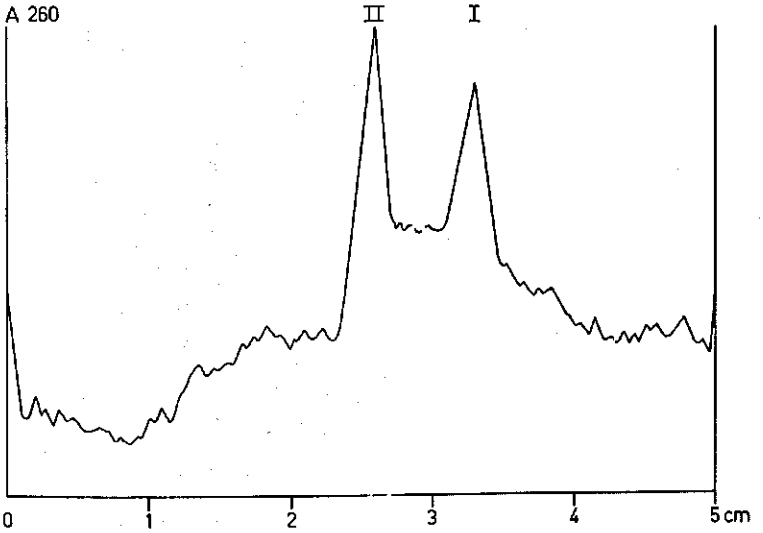


Fig. 4. Optical density pattern after electrophoresis of 14 μg of double-stranded RNA of CPMV on polyacrylamide-agarose gel for 7 h. The double-stranded RNA was extracted from the gel and the extracts were used for hybridization-experiments.

Elke gelplak afzonderlijk werd met een scheermesje fijngehakt, het haksel werd overgebracht in een glazen buisje (∅ 4 mm). Met een hierin passend glazen staafje werd het haksel fijngewreven en gedurende 10 minuten geëxtraheerd met 0,5 ml 1 × SSC. Daarna werd het buisje 15 minuten bij laag toerental gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd afgepipeteerd. De gelresten werden opnieuw 10 minuten geëxtraheerd met 0,5 ml 1 × SSC, waarna het homogenaat 16 uur bij kamertemperatuur bleef staan. Het werd vervolgens 15 minuten gecentrifugeerd bij laag toerental en de bovenstaande vloeistof werd bij die uit de eerste extractie gevoegd. De nucleïnezuurextracten van elk van de pieken I en II werden voor hybridisatie met 1 × SSC aangevuld tot 1,5 ml.

Voordat hybridisatie-experimenten met geëxtraheerd nucleïnezuur werden uitgevoerd, werd een blanco gel geëxtraheerd om na te gaan of in de gel stoffen voorkwamen die de hybridisatie beïnvloedden. Het bleek, dat extract afkomstig van een blanco gel, toegevoegd aan een hybridisatiemengsel, de resultaten van de hybridisatie niet beïnvloedde.

Vervolgens werd van elk extract de totale hoeveelheid dubbelstrengig RNA van M plus dubbelstrengig RNA van B (Tabel 4, kolom a), de hoeveelheid dubbelstrengig RNA van B (Tabel 4, kolom b) en de hoeveelheid dubbelstrengig RNA van M (Tabel 4, kolom c) door moleculaire hybridisatie bepaald. In de tabel wordt dit weergegeven in cpm, de voor RNase ongevoelige activiteit na hybridisatie. Vergelijking van de getallen

Tabel 4. Radioactiviteit, gemeten na moleculaire hybridisatie van dubbelstrengig RNA geëxtraheerd uit polyacrylamidegels met met ^{3}H-uridine gelabeld CPMV-RNA

	Piek II (hybridisatiemengsel)			Piek I (hybridisatiemengsel)		
	a	b	c	a	b	c
Extract (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Gelabeld M + B-RNA / labeled M + B-RNA (μg)	1	1	1	1	1	1
Ongelabeld RNA / unlabeled RNA (μg)	0	20 (M-RNA)	20 (B-RNA)	0	20 (M-RNA)	20 (B-RNA)
Dubbelstrengig RNA van portie / Double-stranded RNA of portion						
1	·	·	·	201	105	95
1	105	110	9	282	139	197
2	·	·	·	957	419	435
2	213	222	22	·	321	366
	a	b	c	a	b	c
	Peak II (hybridization mixture)			Peak I (hybridization mixture)		

Van twee porties dubbelstrengig RNA werd twee maal 14 μg geëlektroforeerd op polyacrylamide-agarose gels. Uit elk der vier gels werden de pieken I en II uitgesneden en het RNA hieruit geëxtraheerd en gehybridiseerd. Als piek I en piek II van dezelfde gel afkomstig waren, dan staan de getallen op één horizontale lijn weergegeven. De getallen zijn de voor RNase ongevoelige activiteiten in cpm na hybridisatie. De specifieke activiteit van het met ^{3}H-uridine gelabelde M + B-RNA bedroeg 7.685 cpm per μg; ·: het extract ging tijdens het experiment verloren.
Two times 14 μg of double-stranded RNA of CPMV from two portions was electrophoresed on polyacrylamide-agarose gels. From each of the four gels peaks I and II were excised, the double-stranded RNA was extracted from the slices and the extracts were hybridized. If slices for peak I and for peak II were obtained from one gel, then the results are depicted on one horizontal line. The numbers given represent the RNase resistant radioactivity in cpm after hybridization; ·: the extract was lost during the experiment. Specific activity of M + B-RNA 7.685 cpm/μg.

Table 4. Radioactivity estimated after molecular hybridization of double-stranded RNA extracted from polyacrylamide gels with ^{3}H-uridine labeled RNA of CPMV.

in kolom c van piek I met die in kolom c van piek II laat zien, dat piek I wél, maar piek II géén dubbelstrengig RNA van M bevat. Uit vergelijking van de getallen in de kolommen b van piek I en piek II blijkt, dat beide pieken dubbelstrengig RNA van B bevatten. Piek II bevat dus uitsluitend dubbelstrengig RNA van B, piek I daarentegen bevat dubbelstrengig RNA van M én dubbelstrengig RNA van B.

Tabel 4 laat ook zien, dat in de experimenten met het dubbelstrengig RNA van portie 2 de voor RNase ongevoelige activiteit per hybridisatie van 0,5 ml extract aanzienlijk hoger is dan in de experimenten met het dubbelstrengig RNA van portie 1. Waarschijnlijk is de extractie van het dubbelstrengig RNA uit de gelplakken in de eerstgenoemde experimenten beter geslaagd.

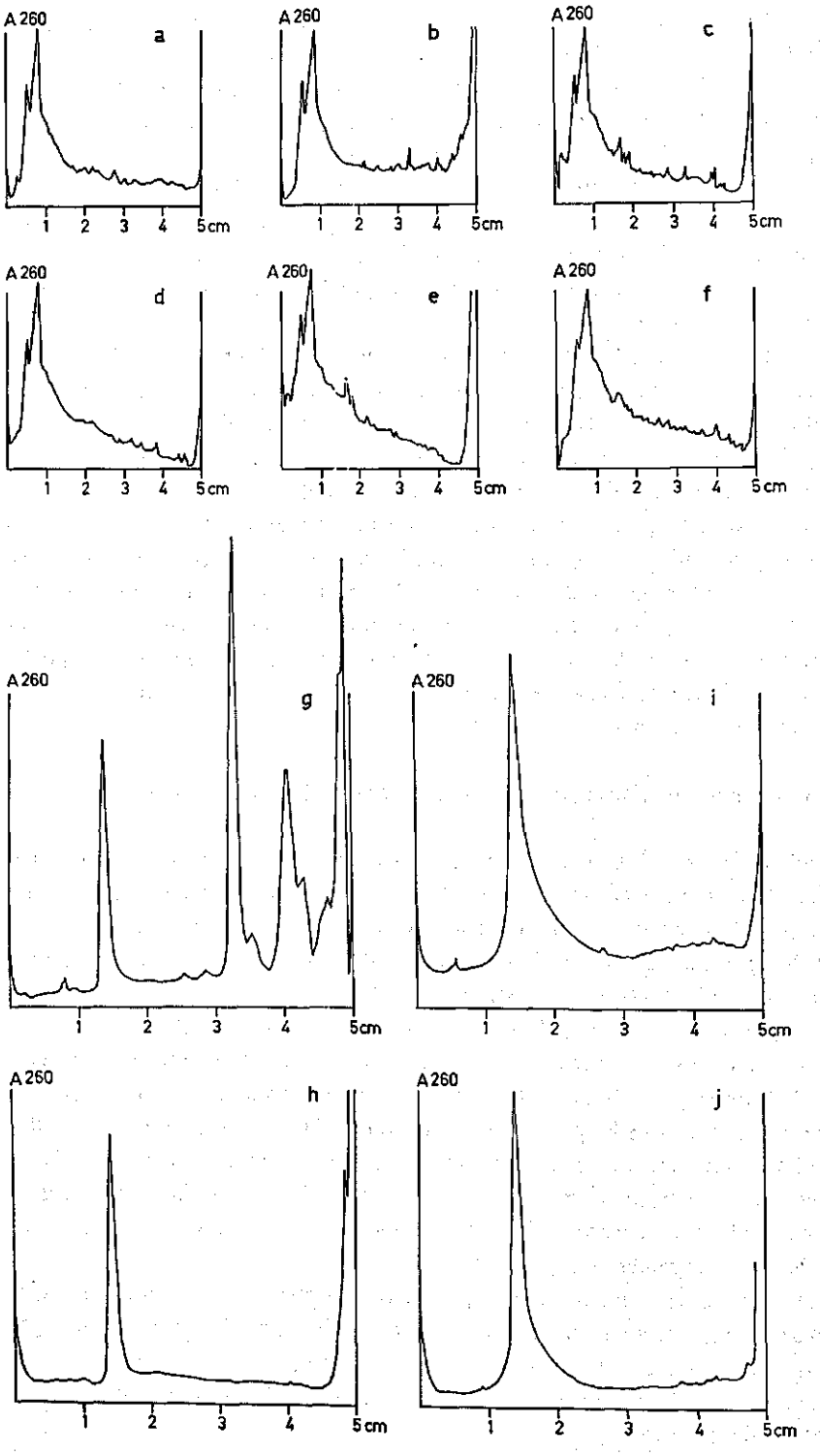
Bij de extractie van het dubbelstrengig RNA uit de gel werd het materiaal dat bij de elektroforese in het gebied tussen piek I en piek II terecht kwam niet geëxtraheerd. De verhouding van het dubbelstrengig RNA van M tot het dubbelstrengig RNA van B in het wél geëxtraheerde materiaal werd berekend uit de getallen voor piek I én piek II, afkomstig van één gel. Bijvoorbeeld: voor het dubbelstrengig RNA van portie 2 geeft de voor RNase ongevoelige activiteit in de kolommen c (nl. 22 + 366 = 388 cpm) de hoeveelheid dubbelstrengig RNA van M weer, en de voor RNase ongevoelige activiteit in de kolommen b (nl. 222 + 321 = 543 cpm) geeft de hoeveelheid dubbelstrengig RNA van B weer. De verhouding van het dubbelstrengig RNA van M tot dat van B is ongeveer 2:3 en komt overeen met de vóór de elektroforese voor deze portie bepaalde verhouding (zie tabel 3). Het dubbelstrengig RNA van M en van B werd dus in gelijke mate geëxtraheerd.

3.3 Incubatie van het dubbelstrengig RNA met RNase en DNase na PAAGE

Het dubbelstrengig RNA beweegt zich bij elektroforese op polyacrylamidegels met ongeveer dezelfde snelheid als DNA, maar langzamer dan enkelstrengig RNA. Het dubbelstrengig RNA werd nu na elektroforese onderzocht op gevoeligheid voor RNase en DNase om na te gaan of dubbelstrengig RNA op deze wijze onderscheiden zou kunnen worden van DNA en enkelstrengig RNA.

Dubbelstrengig RNA, 5 μg per gel, werd gedurende $2^1/_4$ uur geëlektroforeerd en na afloop van de elektroforese werd de verdeling van het nucleïnezuur over de gels bepaald bij 260 nm (fig. 5a, b en c). De gels werden vervolgens 20 uur gewassen bij kamertemperatuur in 2 × SSC pH 7,2. Daarna werden de gels in 25 ml verse buffer eveneens bij kamertemperatuur geïncubeerd met een mengsel van RNase A + RNase T_1, respectievelijk in concentraties van 0 μg + 0 Units, 5 μg + 5 Units en 50 μg + 50 Units per ml. Na 24 uur werd de incubatie afgebroken en werd de optische dichtheid in de gels opnieuw gemeten (fig. 5d, e en f).

De incubatieduur werd bepaald op 24 uur omdat enkelstrengig RNA uit een nucleïnezuurpreparaat afkomstig van *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, dat op dezelfde wijze werd geëlektroforeerd en geïncubeerd als het dubbelstrengig RNA, na deze incubatieperiode volledig uit de gel verdwenen was (fig. 5g en h). Het DNA werd door RNase niet afgebroken (fig. 5h, i en j).


A 260
a
b
c
d
e
f
g
i
h
j
1
2
3
4
5cm

Vergelijking van de patronen d, e en f met respectievelijk a, b en c van figuur 5 toont aan, dat het dubbelstrengig RNA na de incubatie met RNase nog steeds in de gel aanwezig was. Alleen bij de zeer hoge RNase-concentraties 50 μg RNase A + 50 Units RNase T_1 per ml (fig. 5f) was er een geringe afname van de hoogte van de twee pieken, wat duidt op een lichte afbraak van het dubbelstrengig RNA.

Om gevoeligheid van het dubbelstrengig RNA voor DNase na PAAGE na te gaan, werd een elektroforese uitgevoerd met 4 μg dubbelstrengig RNA per gel gedurende $2^1/_2$ uur. Na afloop van de elektroforese werd de verdeling van het nucleïnezuur over de gel bepaald bij 260 nm (fig. 6a). De gel werd 20 uur gewassen in 2 × SSC pH 7,2, 0,005 M $MgCl_2$ bij kamertemperatuur. Daarna werd de gel geïncubeerd met 5 μg per ml DNase I in 25 ml verse buffer eveneens bij kamertemperatuur. Na 72 uur werd de incubatie beëindigd en werd de verdeling van de optische dichtheid over de gel opnieuw gemeten (fig. 6b). De incubatie duurde 72 uur, omdat DNA op gelijke wijze geëlektroforeerd en geïncubeerd als het dubbelstrengig RNA, na 72 uur incubatie met DNase I volledig uit de gel verdwenen was (fig. 6, vergelijk e met f). Vergelijking van

Fig. 5. Verdeling van de optische dichtheid over de gels na elektroforese van dubbelstrengig RNA van CPMV, van nucleïnezuur van *Nicotiana tabacum* en van DNA op polyacrylamide-agarose gels, bepaald vóór en ná incubatie van de gels met RNase.
a, b en c: patronen van 3 gels, waarin 5 μg dubbelstrengig RNA geëlektroforeerd was, bepaald onmiddellijk na elektroforese.
d: patroon na incubatie van gel a in 2 × SSC zonder RNase's gedurende 24 uur.
e: patroon na incubatie van gel b in 2 × SSC met 5 μg RNase A + 5 Units RNase T_1/ml gedurende 24 uur.
f: patroon na incubatie van gel c in 2 × SSC met 50 μg RNase A + 50 Units RNase T_1/ml gedurende 24 uur.
g: patroon voor nucleïnezuur van *N. tabacum*, bepaald onmiddellijk na elektroforese.
h: patroon na incubatie van gel g in 2 × SSC met 5 μg RNase A + 5 Units RNase T_1/ml gedurende 24 uur.
i: patroon voor DNA uit kalfsthymus bepaald onmiddellijk na elektroforese.
j: patroon na incubatie van gel i in 2 × SSC met 5 μg RNase A + 5 Units RNase T_1/ml gedurende 24 uur.

Fig. 5. Optical density patterns after electrophoresis of double-stranded RNA of CPMV, of nucleic acid from *Nicotiana tabacum* and of DNA respectively, on polyacrylamide-agarose gels, estimated before and after incubation of the gels with RNase.
a, b and c: patterns for three different gels on which 5 μg of double-stranded RNA of CPMV was electrophoresed, estimated immediately after electrophoresis.
d: pattern after incubation of gel a in 2 × SSC without RNAses for 24 h.
e: pattern after incubation of gel b in 2 × SSC with 5 μg RNase A + 5 Units RNase T_1/ml for 24 h.
f: pattern after incubation of gel c in 2 × SSC with 50 μg RNase A + 50 Units RNase T_1/ml for 24 h.
g: pattern for nucleic acid from *N. tabacum* estimated immediately after electrophoresis.
h: pattern after incubation of gel g in 2 × SSC with 5 μg RNase A + 5 Units RNase T_1/ml for 24 h.
i: pattern for DNA from calf thymus estimated immediately after electrophoresis.
j: pattern after incubation of gel i in 2 × SSC with 5 μg RNase A + 5 Units RNase T_1/ml for 24 h.

Fig. 6. Verdeling van de optische dichtheid over de gels na elektroforese van dubbelstrengig RNA van CPMV, van nucleïnezuur uit *N. tabacum* en van DNA op polyacrylamide-agarose-gels, bepaald vóór en ná incubatie van de gels met DNase.
a: patroon voor dubbelstrengig RNA bepaald onmiddellijk na elektroforese.
b: patroon na incubatie van gel a in 2 × SSC, 0,005 M $MgCl_2$ met 5 μg DNase I/ml gedurende 72 uur.
c: patroon voor nucleïnezuur uit *N. tabacum* bepaald onmiddellijk na elektroforese.
d: patroon na incubatie van gel c in 2 × SSC, 0,005 M $MgCl_2$ met 5 μg DNase I/ml gedurende 72 uur.
e: patroon voor DNA uit kalfsthymus bepaald onmiddellijk na elektroforese.
f: patroon na incubatie van gel e in 2 × SSC, 0,005 M $MgCl_2$ met 5 μg DNase I/ml gedurende 72 uur.

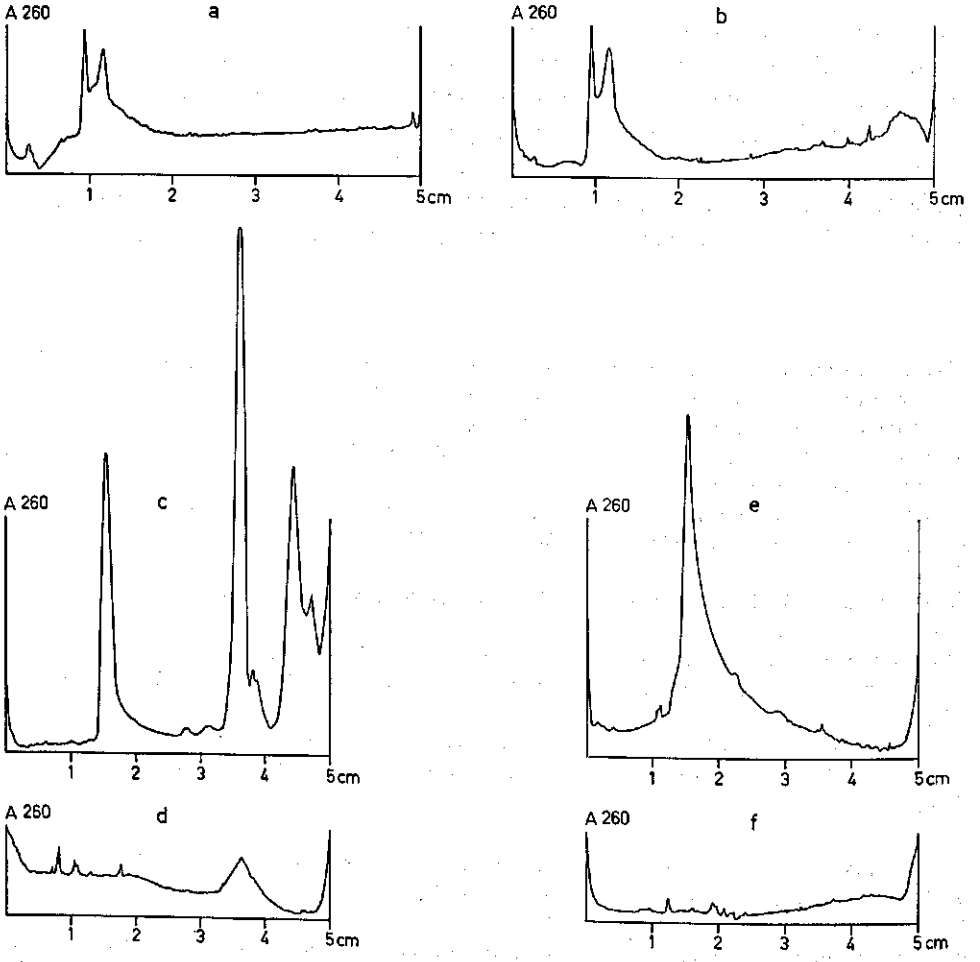


Fig. 6. Optical density patterns after electrophoresis of double-stranded RNA of CPMV, of nucleic acid from *N. tabacum* and of DNA from calf thymus respectively on polyacrylamide-agarose gels, estimated before and after incubation of the gels with DNase.
a: pattern for double-stranded RNA immediately after electrophoresis.
b: pattern after incubation of gel a in 2 × SSC, 0,005 M $MgCl_2$ with 5 μg DNase I/ml for 72 h.
c: pattern for nucleic acid from *N. tabacum* immediately after electrophoresis.
d: pattern after incubation of gel c in 2 × SSC, 0,005 M $MgCl_2$ with 5 μg DNase I/ml for 72 h.
e: pattern for DNA from calf thymus immediately after electrophoresis.
f: pattern after incubation of gel e in 2 × SSC, 0,005 M $MgCl_2$ with 5 μg DNase I/ml for 72 h.

patroon a met patroon b in figuur 6 laat zien, dat bij deze incubatieduur het dubbelstrengig RNA niet afgebroken wordt door het DNase I. Vergelijking van de patronen c en d van figuur 6, de patronen voor nucleïnezuur uit *Nicotiana tabacum* cv. Samsun vóór respectievelijk ná incubatie laat zien, dat ook hier het DNA afgebroken is, maar ook dat het enkelstrengig RNA uit de gel verdwenen is. Waarschijnlijk wordt dit veroorzaakt door verontreiniging van het DNase I met RNase.

3.4 Discussie

Het gezuiverde dubbelstrengig RNA van CPMV verdeelt zich bij elektroforese op polyacrylamidegels in twee banden, het nucleïnezuur-patroon laat twee scherpe pieken zien.

De twee pieken uit het PAAGE-patroon werden met behulp van moleculaire hybridisatie van het uit de gelbanden geëxtraheerde dubbelstrengig RNA als volgt gekarakteriseerd: de langzaam bewegende piek bevatte uitsluitend dubbelstrengig RNA van B, de sneller bewegende piek bevatte dubbelstrengig RNA van zowel B als M. De aanwezigheid van dubbelstrengig RNA van B in het sneller bewegende materiaal zou verklaard kunnen worden door aan te nemen dat er bij de zuivering breuken zijn ontstaan in het dubbelstrengig RNA van B.

Vergelijking van de voor RNase ongevoelige activiteit in kolom b met die in kolom a voor de nucleïnezuurextracten van piek II (tabel 4) laat zien, dat deze per extract gelijk zijn. Dit betekent, dat het ongelabelde M-RNA niet in staat was bij de hybridisatie het gelabelde B-RNA te verdringen. Er is dus geen overeenkomst in basevolgorde tussen het M-RNA en het B-RNA van CPMV. Het bevestigt de resultaten van de hybridisatie-experimenten met mengsels van dubbelstrengig RNA van M en B (Van Kammen, 1971b).

Het dubbelstrengig RNA werd geïsoleerd uit een in 4 M NaCl oplosbare fractie, waarin geen enkelstrengig RNA of 'dubbelstrengig' RNA met enkelstrengige RNA-stukken voorkomt. Uit de concentratie in twee scherpe banden bij PAAGE en uit de RNase-resistentie van het dubbelstrengig RNA na PAAGE werd geconcludeerd dat het gezuiverde dubbelstrengig RNA de replicatieve vorm van CPMV-RNA is.

Elektroforese in polyacrylamidegels van voor plantevirus specifiek dubbelstrengig RNA werd reeds eerder beschreven. Het PAAGE-patroon van dubbelstrengig RNA van tabaksnecrosevirus (TNV) en satelliet-tabaksnecrosevirus (STNV) (Klein & Reichmann, 1970) wordt gekenmerkt door twee pieken, dat van alfalfa-mozaïekvirus (AMV) (Pinck & Hirth, 1972) door vier pieken. De auteurs karakteriseren het dubbelstrengig RNA door de ketens open te smelten en vervolgens met PAAGE aan te tonen, dat hierbij RNA is vrijgekomen met dezelfde elektroforetische mobiliteit als de enkelstrengige RNA's respectievelijk van TNV en STNV en van AMV. Ook voor barley stripe mosaic virus (BSMV) strain ND18 (Pring, 1972) waar het genoom uit twee stukken enkelstrengig RNA bestaat, en voor brome mosaic virus (Lane & Kaesberg, 1971) waar het genoom uit vier stukken enkelstrengig RNA bestaat, komt in het PAAGE-patroon van de replicatieve vorm het aantal pieken overeen met het

aantal enkelstrengig RNA's van het virus-genoom. Het replicerend RNA van de normale stam van BSMV, waarvan het virus-genoom uit één enkelstrengig RNA bestaat, geeft bij PAAGE een patroon dat één piek bevat.

In het PAAGE-patroon van het replicerend RNA van tabaksmozaïekvirus (TMV), dat een genoom bestaande uit één enkelstrengig RNA heeft, worden echter twee pieken aangetroffen (Jackson et al., 1971, 1972). De auteurs karakteriseerden de ene piek als corresponderend met replicatieve vorm (RF) en de andere piek als corresponderend met replicatieve intermediair (RI) van het RNA van TMV. De RF werd gezuiverd uit een in 2 M LiCl oplosbare nucleïnezuurfractie, de RI uit een in 2 M LiCl onoplosbare fractie en alleen dan, wanneer bij de bereiding voorzorgen tegen RNase-activiteit genomen waren.

Voor tabaksratelvirus (TRV) werd door moleculaire hybridisatie-experimenten de aanwezigheid van aan het RNA uit de lange én uit de korte virus-deeltjes complementair RNA in gezuiverd dubbelstrengig RNA van TRV aangetoond (Minson & Darby, 1973).

Het dubbelstrengig RNA van CPMV is door elektroforese in polyacrylamidegels gevolgd door identificatie van de pieken in het PAAGE-patroon met behulp van moleculaire hybridisatie gekarakteriseerd. Het dubbelstrengig RNA is na PAAGE ongevoelig voor DNase en RNase onder omstandigheden waarbij DNA respectievelijk RNA afgebroken worden. Deze eigenschappen maken het mogelijk het dubbelstrengig RNA, het replicerend RNA van CPMV, te onderscheiden van DNA en enkelstrengig RNA wanneer het daarmee in een mengsel voorkomt.

4 Fractionering van de fractie verkregen bij 1000 g

Zoals in hoofdstuk 1 werd vermeld is de replicatieve vorm van het RNA van CPMV geassocieerd met de chloroplasten-nucleoli-fractie van het homogenaat van geïnfecteerde bladeren. Dit hoofdstuk beschrijft de verdeling van de in deze fractie voorkomende structuren na centrifugering in een dichtheidsgradiënt in relatie tot de replicatie van het CPMV-RNA.

Een fractie verkregen bij 1000 *g* werd gecentrifugeerd op een discontinuë sucrosegradiënt en deze gradiënt werd verdeeld in drie fracties. De fracties werden gekarakteriseerd door de aanwezigheid en de verdeling van het DNA. Het voorkomen en de verdeling van de replicatieve vorm van CPMV-RNA in de fracties werd nagegaan door middel van moleculaire hybridisatie. De aard van de replicatieve vorm werd bepaald met behulp van pulselabel-experimenten, in combinatie met elektroforese in polyacrylamidegels en incubatie met DNase, en met de elektronenmicroscoop.

4.1 De discontinuë sucrose-gradiënt 60/20

Er werd uitgegaan van de fractie verkregen bij 1000 *g*, omdat zich hierin de structuren bevinden die geassocieerd zijn met de replicatieve vorm van CPMV-RNA. Voor het bereiden van deze fractie werden meerdere porties van 45 g primaire cowpeabladeren, gezond respectievelijk geïnfecteerd en dan vier dagen na inoculatie, genomen. De bladeren werden gewassen in gedesioniseerd water en vervolgens ontdaan van de middennerf. Elke portie werd door hakken met een scheermesje voorzichtig gehomogeniseerd in 45 ml Honda-buffer (0,25 M sucrose, 2,5 % Ficoll, 5 % Dextran T40 in 0,025 M tris-HCl pH 7,8, 0,001 M Mg-acetaat, 0,004 M 2-mercaptoethanol) (Spencer & Wildman, 1964) in een petrischaal die geplaatst werd op smeltend ijs. Zodra het homogenaat er donker glanzend uitzag, werd het gefilterd door twee lagen Miracloth en het gefilterde homogenaat werd 15 min bij 1000 *g* gecentrifugeerd. Het sediment vormde de fractie verkregen bij 1000 *g*.

Het sediment werd voorzichtig gesuspendeerd in 5 – 6 ml Honda-buffer met behulp van een glazen staafje dat aan een uiteinde omwikkeld was met een watje. De suspensie werd in porties van 1,5 – 2 ml opgebracht op de discontinuë sucrose-gradiënt 60/20, samengesteld uit 10 ml 60 %, 10 ml 45 % en 5 ml 20 % w/w sucrose in 0,01 M tris-HCl, 0,001 M $MgCl_2$, pH 8,2 gradiëntbuffer.

De gradiënten werden twee uur gecentrifugeerd bij 22.000 omw./min in een Spinco SW 25.1 rotor bij 4 °C. Bij het uitlopen werd geen gebruik van de rem gemaakt.

De fractie verkregen bij 1000 *g* verdeelde zich bij centrifugeren als volgt over de

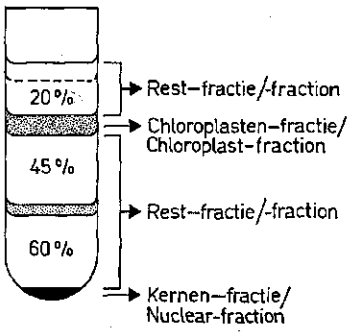


Fig. 7. Verdeling van het materiaal uit de fractie verkregen bij 1000 *g* van een homogenaat van primaire cowpea-bladeren over de discontinuë sucrose-gradiënt 60/20 na 2 uur centrifugeren bij 22.000 omw./min in een SW 25.1 rotor. De gradiënt werd verdeeld in drie fracties: chloroplasten-, kernen- en rest-fractie zoals aangegeven.

Fig. 7. Distribution of the 1000 *g* fraction obtained from a homogenate of primary leaves of cowpea after centrifuging on the discontinuous sucrose gradient 60/20 for 2 h at 22.000 rpm in a Spinco SW 25.1. The gradient was divided in three fractions: the chloroplast-, the nuclear- and the rest-fraction.

gradiënt: er ontstonden twee groene banden, één op het scheidingsvlak van 20 % en 45 % sucrose en één op het scheidingsvlak van 45 % en 60 % sucrose, op de bodem van de buis vormde zich een groen sediment; de tussenliggende zones werden helder en aan de meniscus bleef geen materiaal achter.

De gradiënt werd in drie fracties verdeeld (fig. 7). Eén fractie werd gevormd door de brede groene band op het scheidingsvlak van 20 % en 45 % sucrose en werd vanwege het vele chloroplastenmateriaal in deze band chloroplasten-fractie genoemd. Het sediment op de bodem van de centrifugebuis, waarin vermoedelijk zeer veel kernen en kernmateriaal terechtkomen, vormde een tweede fractie, die kernen-fractie genoemd werd. De dunnere, groene band op het scheidingsvlak van 45 % en 60 % sucrose plús alle tussenliggende zones uit de gradiënt werden verzameld in één fractie die daarom rest-fractie genoemd werd.

De indeling in deze drie fracties was willekeurig gekozen, zij had in eerste instantie het doel na te gaan of de replicatieve vorm van CPMV-RNA in alle fracties in gelijke mate, of voornamelijk in één fractie voorkwam.

Verscheidene gradiënten werden op deze wijze bereid en in drie fracties verdeeld. De afzonderlijke chloroplasten-fracties, de afzonderlijke kernen-fracties en de afzonderlijke rest-fracties werden samengevoegd. De zo verkregen chloroplasten-, kernen- en respectievelijk rest-fractie werden elk gewassen door toevoegen van 7 volumina 1 × SSC gevolgd door 30 min centrifugeren bij 18.000 *g* om langzaam sedimenterend materiaal te verwijderen. De aldus verkregen sedimenten werden gebruikt voor nucleïnezuurextracties.

4.2 Verdeling van het DNA over de fracties

Uit de chloroplasten-, de kernen- en de rest-fractie afkomstig van 2 × 45 g blad werd met fenol-SDS het nucleïnezuur geëxtraheerd. Vervolgens werd het DNA-gehalte van de nucleïnezuurpreparaten en de verdeling van het DNA over de drie fracties vastgesteld.

Tabel 5 geeft van drie bepalingen de verdeling van het DNA over de fracties in percentages. Twee bepalingen zijn afkomstig van experimenten met geïnfecteerde bladeren, één bepaling is afkomstig van een experiment met gezonde bladeren. Uit de

Tabel 5. Verdeling van het DNA over de fracties van gradiënt 60/20, in percentages van het totale DNA der fracties.

	Geïnfecteerde planten		Gezonde planten
Chloroplasten-fractie / Chloroplast-fraction	11	24	19
Kernen-fractie / Nuclear-fraction	54	40	34
Rest-fractie / Rest-fraction	35	36	47
	Infected plants		Healthy plants

Table 5. Distribution of DNA among the gradient-fractions, expressed in percentages of the total DNA of the fractions.

tabel blijkt, dat de chloroplasten-fractie het laagste percentage DNA bevatte, de meerderheid van het DNA kwam in de kernen- en rest-fractie terecht. De ongelijke verdeling van het DNA over kernen- en rest-fractie in de verschillende experimenten zou verklaard kunnen worden uit verschillen in beschadiging van de kernen bij het homogeniseren, die bepalen hoe de verdeling van het kernen-materiaal over het sediment en de band op het scheidingsvlak van 45 % en 60 % sucrose is.

4.3 Verdeling van de replicatieve vorm over de fracties bepaald met behulp van moleculaire hybridisatie

Het nucleïnezuur van de chloroplasten-, de kernen- en de rest-fractie werd onderzocht op de aanwezigheid van intermediairen van de virus-RNA-replicatie door middel van moleculaire hybridisatie met RNA van CPMV, dat met ^{3}H-uridine was gelabeld.

Daartoe werd het nucleïnezuur, verkregen uit identieke gradiënt-fracties, samengevoegd: in experiment 1 waren de fracties verkregen uit 450 g geïnfecteerde bladeren, in experiment 2 uit 900 g geïnfecteerde bladeren die steeds vier dagen na inoculatie opgewerkt werden.

Het DNA in de nucleïnezuurpreparaten van de drie fracties werd afgebroken door incubatie met DNase I.

Hoogmoleculair enkelstrengig RNA, waaronder eventueel aanwezig ongelabeld RNA van CPMV, werd verwijderd uit de preparaten door precipitatie met 4 M NaCl. Vervolgens werden de preparaten gedialyseerd tegen 1 × SSC en werd de verdeling van het RNA over de chloroplasten-, de kernen- en de rest-fractie vastgesteld. Tabel 6 geeft de verdeling van het RNA over de fracties (kolom I en kolom II). De chloroplasten-fractie bevat het meeste RNA, nl. 57 tot 82 %, de kernen-fractie het minste, nl. 10 tot 11 %. De hoeveelheid in de rest-fractie varieert van 8 tot 32 %, dit is kennelijk afhankelijk van de verdeling van het materiaal over chloroplasten- en rest-fractie.

Tien respectievelijk 15 μg (kolom III) van het RNA uit de fractie werd gehybridiseerd met 2 μg gelabeld RNA van CPMV (specifieke activiteit 7.185 cpm per μg). Uit

Tabel 6. Radioactiviteit gemeten na moleculaire hybridisatie van RNA uit de drie fracties van gradiënt 60/20 met CPMV-RNA gelabeld met ^{3}H-uridine.

Fractie / Fraction	I RNA per fractie (μg)	II RNA per fractie (%)	III RNA gehybridiseerd met 2 μg gelabeld CPMV-RNA (μg)	IV Voor RNase ongevoelige activiteit na hybridisatie (cpm)	V Verdeling van het voor RNase ongevoelige materiaal over de fracties (%)
Experiment 1					
chloroplasten / chloroplast	1224	57	10	1390	72
kernen / nuclear	231	11	10	300	3
rest / rest	711	32	10	828	25
Experiment 2					
chloroplasten / chloroplast	4900	82	15	2152	93
kernen / nuclear	576	10	15	169	1
rest / rest	510	8	15	1367	6
	RNA per fraction (μg)	RNA per fraction (%)	RNA hybridized with 2 μg of labeled CPMV-RNA (μg)	RNase resistant activity after hybridization (cpm)	Distribution of the RNase resistant material among the fractions (%)

De fracties corresponderen met die uit figuur 7. / Fractions correspond to those in figure 7.

Table 6. Radioactivity estimated after molecular hybridization of RNA of the three fractions of gradient 60/20 with RNA of CPMV labeled with ^{3}H-uridine.

de verdeling over de fracties van de voor RNase ongevoelige activiteit na hybridisatie (in cpm weergegeven in kolom IV) blijkt, dat in elke fractie inbouw van gelabeld RNA van CPMV heeft plaats gevonden. Per 10 respectievelijk 15 μg RNA is de voor RNase ongevoelige activiteit in de chloroplasten-fractie het hoogst.

De verdeling van het tegen RNase resistente materiaal na hybridisatie over de drie fracties wordt in percentages weergegeven in kolom V. De percentages werden berekend uit de verdeling van de totale hoeveelheid van de voor RNase ongevoelige activiteit over de fracties per experiment.

Bijvoorbeeld voor experiment 1:

Totale cpm in de chloroplasten-fractie: $1390/10 \times 1224 = 170.136$

Totale cpm in de kernen-fractie: $300/10 \times 231 = 6.930$

Totale cpm in de rest-fractie: $828/10 \times 711 = 58.871$

Het totale aantal cpm in de drie fracties tezamen bedraagt:

$170.136 + 6.930 + 58.871 = 235.937$

De verdeling van de voor RNase ongevoelige activiteit over de drie fracties in percentages is:

Chloroplasten-fractie: $170.136/235.937 \times 100 = 72\,\%$

Kernen-fractie: $6.930/235.937 \times 100 = 3\,\%$

Rest-fractie: $58.871/235.937 \times 100 = 25\,\%$.

Uit de verdeling blijkt, dat de chloroplasten-fractie de grootste hoeveelheid hybridiseerbaar materiaal bevat, nl. 72 tot 93 %. In de kernen-fractie wordt bijna geen hybridiseerbaar materiaal gevonden, nl. slechts 1 tot 3%. De hoeveelheid hybridiseerbaar materiaal in de rest-fractie varieert van 6 tot 25% en hangt blijkbaar samen met de hoeveelheid RNA in de fractie.

Vergelijking van de verdeling van het DNA en van het hybridiseerbare materiaal over de drie fracties laat zien, dat de rest-fractie een overgangs-fractie tussen chloroplasten- en kernen-fractie is, afhankelijk van de verdeling van het materiaal uit de fractie verkregen bij 1000 *g* over de gradiënt.

4.4 Elektronenmicroscopie van het RNA uit de fracties

Het RNA uit de chloroplasten-, de kernen- en de rest-fractie dat in de moleculaire hybridisatie-experimenten gebruikt was, werd elektronenmicroscopisch met behulp van de methode van Kleinschmidt onderzocht.

Het RNA uit de drie fracties van experiment 2 werd gespreid op een hypofase van dubbelgedestilleerd water met 30% formamide in het te spreiden nucleïnezuurmengsel.

Het RNA uit de chloroplasten- en uit de rest-fractie bevatte materiaal met de kenmerken van gezuiverd dubbelstrengig RNA van CPMV, dat ter vergelijking op dezelfde wijze voor elektronenmicroscopisch onderzoek werd geprepareerd. Daarnaast werd materiaal aangetroffen dat zich voordeed als laagmoleculair enkelstrengig RNA (fig. 8).

In de kernen-fractie was de hoeveelheid replicatieve vorm ten opzichte van het

Fig. 8. Elektronenmicroscopische opname van RNA dat werd gebruikt in de moleculaire hybridisatie-experimenten. De opname toont een aantal moleculen met de kenmerken van de replicatieve vorm van het CPMV-RNA. Het korrelige materiaal in de achtergrond is laagmoleculair RNA. Het RNA werd zichtbaar gemaakt volgens de Kleinschmidt-methode met 30 % formamide in het te spreiden mengsel (70.000 ×).

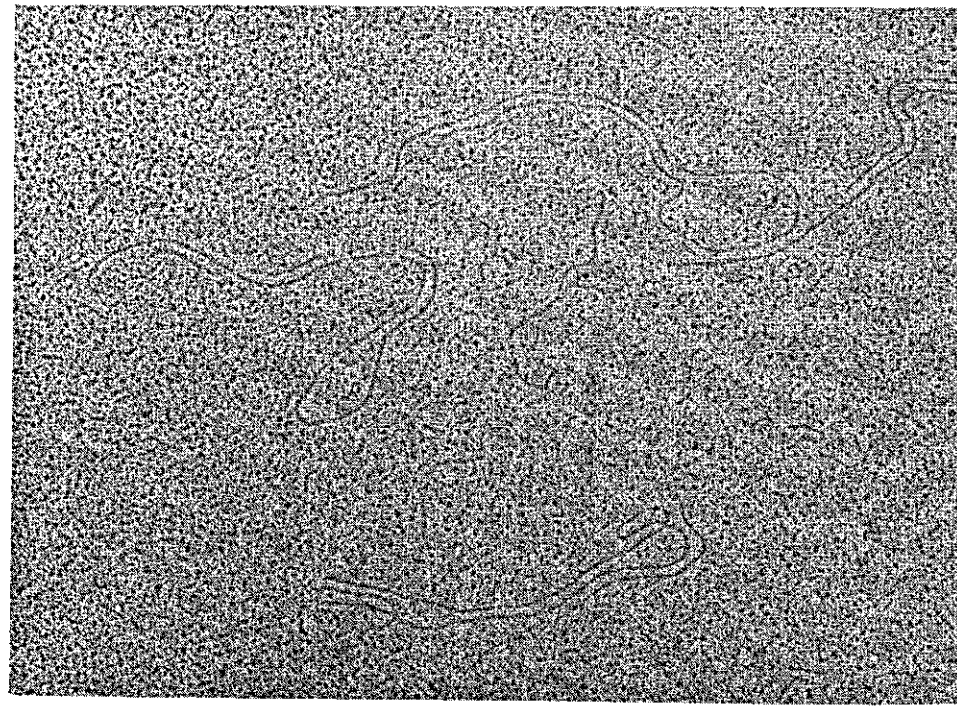


Fig. 8. Electron micrograph of the RNA used in the molecular hybridization experiments. The large molecules shown have the characteristics of replicative form of RNA of CPMV. The grains in the background represent RNA of low molecular weight. The experiment was performed according to Kleinschmidt with 30 % formamide in the nucleic acid sample (× 70,000).

enkelstrengig RNA zo gering, dat er geen elektronenmicroscopische opnamen van konden worden gemaakt.

Het aantal dubbelstrengig RNA-moleculen was het grootst in de chloroplasten-fractie, de rest-fractie bevatte minder dubbelstrengig RNA, maar de aard van de moleculen verschilde niet van die uit de chloroplasten-fractie. Van de moleculen uit de chloroplasten-fractie werd de lengte gemeten. Figuur 9 toont de verdeling van de lengtes over de lengteklassen in aantal moleculen per klasse. In de verdeling vormen de moleculen van omstreeks 1,8 μm een duidelijk te onderscheiden groep. Een tweede groep van lange moleculen manifesteert zich bij een lengte van ongeveer 1,1 μm, deze groep gaat gedeeltelijk schuil onder de grote aantallen moleculen in de lengteklassen van moleculen met kleinere afmetingen. Uit de lengteverdeling blijkt, dat er ook moleculen voorkomen met afmetingen groter dan aangenomen wordt voor de replica-

Fig. 9. Lengteverdeling van het dubbelstrengig RNA uit de chloroplasten-fractie. De metingen werden verricht aan elektronenmicroscopische opnamen bij een vergroting van 100.000 ×.

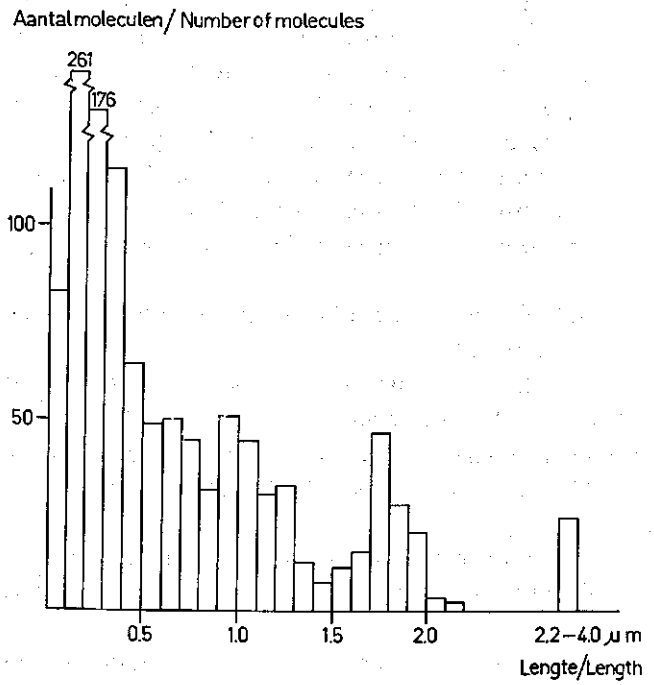


Fig. 9. Length distribution of the double-stranded RNA of the chloroplast-fraction. The molecules were measured from electron micrographs at a magnification of × 100,000.

tieve vorm van het B-RNA, nl. met lengten variërend van 2,0 tot 4,0 μm. Incubatie van het nucleïnezuurpreparaat met een mengsel van 10 μg RNase A plus 15 Units RNase T_1 per ml in 1 × SSC, of met 10 μg DNase I per ml in 1 × SSC, 0,005 M $MgCl_2$, bij 30 °C gedurende 30 min had geen effect op deze lange moleculen.

4.5 Pulselabel-experimenten

Twaalf gram geïnfecteerd primair cowpea-blad werd vier dagen na inoculatie geoogst. De middennerf werd verwijderd en de bladhelften werden ingesneden met een onderlinge afstand tussen de sneden van ongeveer 2 mm, beginnend op enkele millimeters van de bladrand in de richting loodrecht op de middennerf.

De bladhelften werden verdeeld over twee petrischalen; elke schaal (∅ 15 cm) bevatte 15 ml medium: 15 mg thymidine plus 300 μg actinomycine D in 15 ml gedesioniseerd water. Dertig minuten na het snijden van de bladeren werd 2 mCi ^{3}H-uridine (specifieke activiteit 24 Ci/mmol) in 2 ml dubbel gedestilleerd water met behulp van een injectiespuit druppelsgewijs over het blad in de schaal verdeeld. De

schalen werden twee uur bij 30 °C in continu licht geplaatst.

Na afloop van de labelperiode werden de bladeren gewassen met gedesioniseerd water en gehomogeniseerd in Honda-buffer. De fractie verkregen bij 1000 *g* uit het bladhomogenaat werd gecentrifugeerd op de discontinuë sucrose-gradiënt 60/20. Met fenol-SDS werd het nucleïnezuur uit de chloroplasten-, de kernen- en de rest-fractie geëxtraheerd en geëlectroforeerd op polyacrylamidegels. Van iedere fractie werd een gelijke hoeveelheid, nl. corresponderend met 15.000 cpm, gebracht op de gels. De specifieke activiteiten van het nucleïnezuur uit de drie fracties verschilden als volgt: 15.000 cpm kwamen voor de chloroplasten-fractie overeen met 40 μg nucleïnezuur, voor de kernen-fractie met 22 μg nucleïnezuur en voor de rest-fractie met 30 μg nucleïnezuur.

Na afloop van de $2^1/_2$ uur durende elektroforese werd de verdeling van de optische dichtheid in de gels bij 260 nm bepaald (fig. 10).

Vergelijking van het patroon voor de chloroplasten-fractie (fig. 10a) met dat voor de kernen-fractie (fig. 10b) laat zien dat, de opgebrachte hoeveelheid nucleïnezuur per fractie in aanmerking genomen, de hoeveelheid nucleïnezuur in het hoogmoleculaire gebied waar het replicerend RNA van CPMV en het DNA terecht komen, in de kernen-fractie het grootst is.

De gels werden vervolgens geïncubeerd met 10 μg DNase I per ml gedurende 64 uur (zie 3.3), waarna opnieuw bij 260 nm de verdeling van het nucleïnezuur over de gels bepaald werd (fig. 10).

Vergelijking van de patronen voor de chloroplasten-fractie en voor de kernen-fractie laat zien, dat door de incubatie met DNase I zeer veel materiaal, vooral in het hoogmoleculaire gebied, uit beide gels verdwenen is.

Daarna werd de verdeling van het tegen DNase I resistente, gelabelde nucleïnezuur over de gels vastgesteld (fig. 10). Uit de patronen van chloroplasten- en kernen-fractie blijkt, dat het meeste gelabelde, tegen DNase I resistente nucleïnezuur in de chloroplasten-fractie aanwezig is. In het hoogmoleculaire gebied beweegt dit nucleïnezuur zich in twee banden, hetgeen in figuur 10a tot uitdrukking komt in een piek met een duidelijke schouder. Deze banden leggen een gelijke afstand af als gezuiverd dubbelstrengig RNA van CPMV (zie fig. 3). De kernen-fractie bevat echter geen gelabeld nucleïnezuur dat resistent is tegen DNase I met de kenmerken van het replicerend RNA van CPMV. De rest-fractie, niet afgebeeld in figuur 10, bevatte wel tegen DNase I resistent gelabeld nucleïnezuur met de kenmerken van replicerend RNA van CPMV, maar veel minder dan de chloroplasten-fractie. Ook wat de hoeveelheid DNA in het hoogmoleculaire gebied betrof, vormde de rest-fractie als het ware een tussen-fractie tussen chloroplasten- en kernen-fractie.

4.6 Discussie

De in dit hoofdstuk beschreven experimenten gingen uit van de gedachte om de structuren uit de cel waarmee het dubbelstrengig RNA van CPMV geassocieerd zou zijn zoveel mogelijk intact te isoleren en van elkaar te scheiden.

Fig. 10. PAAGE van het nucleïnezuur uit de fracties verkregen in pulselabel-experimenten. Het nucleïnezuur werd gedurende 2½ uur geëlektroforeerd op polyacrylamide-agarosegels. a: de chloroplasten-fractie, b: de kernen-fractie. —: verdeling van de optische dichtheid onmiddellijk na elektroforese, ...: verdeling van de optische dichtheid na incubatie van de gels in 2 × SSC, 0,005 M $MgCl_2$ met 10 μg DNase I/ml gedurende 64 uur, o: verdeling van het tegen DNase I resistente ^3H-gelabelde nucleïnezuur gemeten naar de verdeling van de radioactiviteit over de gels. De door dubbelstrengig RNA van CPMV afgelegde afstand bij gelijktijdige elektroforese op afzonderlijke gels wordt met pijlen aangegeven.

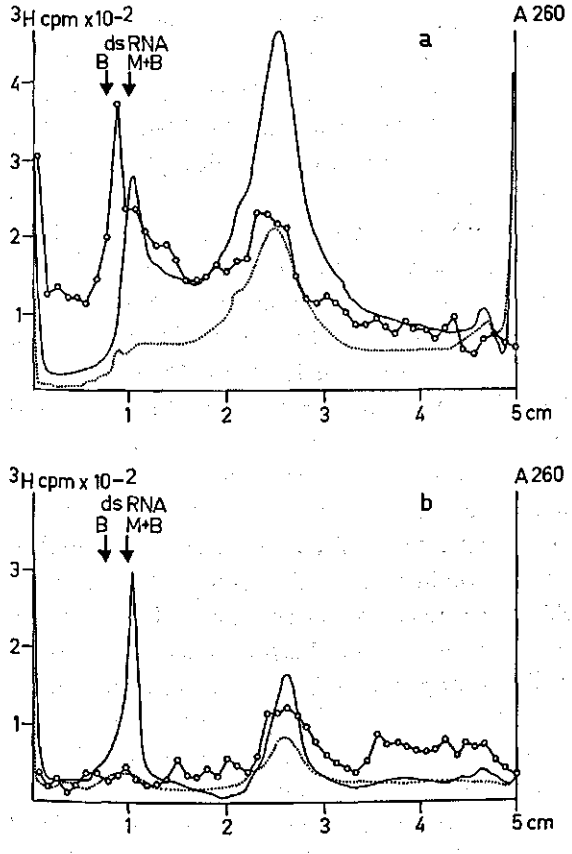


Fig. 10. PAAGE of the nucleic acid from the fractions obtained in pulselabel-experiments. Electrophoresis was for 2½ h on polyacrylamide-agarose gels. a: the chloroplast-fraction. b: the nuclear-fraction. —: optical density pattern immediately after electrophoresis, ...: optical density pattern after incubation of the gels in 2 × SSC, 0,005 M $MgCl_2$, with 10 μg DNase I/ml for 64 h, o: distribution of the DNase I resistant, ^3H labeled nucleic acid, estimated from the distribution of the radioactivity over the gel. The distance migrated in a separate gel by double-stranded RNA of CPMV is indicated by the arrows.

Dit werd bereikt door het blad voorzichtig met een scheermesje te homogeniseren en door als homogenisatiemedium de Honda-buffer te kiezen. Deze buffer heeft wegens de aanwezigheid van Dextran T 40 en Ficoll, naast sucrose, een lagere osmotische waarde dan wanneer de buffer uitsluitend sucrose zou bevatten.

De structuren werden verzameld in de fractie verkregen bij 1000 *g*, welke te vergelijken is met de fractie verkregen bij 15.000 *g* die Van Griensven (1969, 1970), na het blad in een Waring-blendor te hebben gehomogeniseerd, gebruikte.

Bij centrifugeren van de fractie verkregen bij 1000 *g* op de discontinuë sucrose-gradiënt 60/20 verdeelden de structuren zich over de gradiënt in twee groene banden en een groen sediment.

Uit de verdeling van het DNA over de drie fracties, waarin de gradiënten verdeeld werden, bleek dat de celstructuren zich niet willekeurig verdeeld hadden. Het DNA werd vooral aangetroffen in de kernen- en de rest-fractie; de chloroplasten-fractie bevatte slechts 11 tot 24% DNA. Hoewel met de lichtmicroscoop in deze fractie geen kernen of kern-fragmenten werden waargenomen, moet een gedeelte van het DNA toch van de kernen afkomstig zijn, mogelijk via adsorptie aan membranen, daar het DNA van de chloroplasten maar 3 tot 5% van het totale cellulaire DNA vormt en een gedeelte van de chloroplasten bovendien in de andere twee fracties terecht kwam.

Uit de moleculaire hybridisatie-experimenten bleek, dat 72 tot 93% van het hybridiseerbare RNA zich in de chloroplasten-fractie bevond en dat vrijwel geen hybridisatie met de kernen-fractie werd verkregen.

Ook de pulselabel-experimenten lieten zien, dat het replicerend RNA van CPMV voornamelijk in de chloroplasten-fractie werd aangetroffen.

Uit al deze experimenten bleek duidelijk, dat de rest-fractie, waarvan het materiaal voornamelijk afkomstig was van de groene band op het scheidingsvlak van 45 en 60% sucrose, wat de aard van de verzamelde structuren en de aard en hoeveelheden van het nucleïnezuur betreft, een tussen-fractie vormde tussen de chloroplasten- en de kernen-fractie en dat de variatie in deze rest-fractie bepaald werd door de verdeling van de verschillende structuren over de gradiënt.

De discontinuë sucrose-gradiënt 60/20 leverde dus een goede eerste fractionering op: het hybridiseerbare, replicerende RNA van CPMV kwam hoofdzakelijk in de chloroplasten-fractie terecht en was blijkens de verdeling van het DNA niet geassocieerd met de kernen. De chloroplasten-fractie kan daarom gebruikt worden voor de verdere isolering van de bij de replicatie betrokken structuren.

Het hybridiseerbare en replicerende RNA had de kenmerken van de replicatieve vorm van het CPMV-RNA. 'Dubbelstrengig' RNA met de eigenschappen van replicatieve intermediair werd niet gevonden. In de pulselabel-experimenten beweegt in de elektroforese het hoogmoleculaire, tegen DNase I resistente, gelabelde nucleïnezuur zich in twee banden en wel volkomen identiek aan de gezuiverde replicatieve vorm van het CPMV-RNA.

De rol die de replicatieve vorm van het CPMV-RNA vier dagen na inoculatie in het replicatieproces lijkt te spelen, wordt gesteund door de experimenten van Pring (1972), die voor BSMV een maximale ^{32}P incorporatie in de replicatieve vorm op het tijdstip

72 tot 96 uur na inoculatie aantoonde.

Ook de elektronenmicroscopische opnamen van het RNA uit de fracties zichtbaar gemaakt volgens de methode van Kleinschmidt gaven uitsluitend moleculen te zien die de kenmerken van de replicatieve vorm hadden.

Uit de lengteverdeling van de moleculen afkomstig uit de chloroplasten-fractie blijkt een grote overeenkomst met het PAAGE-patroon van het gezuiverde dubbelstrengig RNA van CPMV (zie 3.1 en 3.2). Er worden twee groepen met de grootste lengten aangetroffen, nl. bij omstreeks 1,8 μm en 1,1 μm. De lengtes zijn kleiner dan die gevonden werden door Van Griensven (Van Griensven, 1970; Van Griensven et al., 1973); hij vond waarden van respectievelijk 2,4 μm en 1,3 μm. In de hier gepresenteerde metingen bedroeg het interval tussen de lengteklassen 0,1 μm tegen 0,3 μm in de metingen van Van Griensven. De waarden 1,8 μm en 1,1 μm zijn derhalve nauwkeuriger bepaald. Ook kunnen verschillen die optreden in de vergroting van het elektronenmicroscoop een rol gespeeld hebben bij het bepalen van de lengtes.

Voor de internucleotide afstand in het dubbelstrengig RNA van reovirus werd door Arnott et al. (1967) met röntgen-diffractie een waarde van 0,273 nm gevonden. In overeenstemming hiermee berekenden Nicolaieff et al. (1970) een waarde van 0,275 nm voor het dubbelstrengig RNA van tabaksmozaïekvirus uit de met het elektronenmicroscoop bepaalde lengte van het dubbelstrengig RNA-molecuul van 1,75 μm en het door Klug & Caspar (1960) met röntgen-diffractie aan tabaksmozaïekvirus bepaalde aantal van 6400 nucleotiden in het virus-RNA.

Voor CPMV wordt, uitgaande van een internucleotide afstand van 0,273 – 0,275 nm, uit een lengte van 1,8 μm voor de RF van het B-RNA een molecuulgewicht van $2{,}16 \times 10^6$ dalton voor het enkelstrengig RNA van B-component en uit een lengte van 1,1 μm voor de RF van M-RNA een molecuulgewicht van $1{,}33 \times 10^6$ dalton voor het enkelstrengig RNA van M-component berekend.

Deze waarden voor de molecuulgewichten van M-RNA en B-RNA stemmen goed overeen met de waarden $1{,}37 \times 10^6$ dalton en $2{,}02 \times 10^6$ dalton, zoals die recentelijk bepaald zijn met behulp van elektroforese in polyacrylamidegels onder denaturerende omstandigheden in 8 M ureum bij 60 °C (Reijnders et al., 1973).

De moleculen met een gemiddelde lengte van 1,8 μm vormden een goed te onderscheiden groep, dit gold niet voor de groep met een gemiddelde lengte van 1,1 μm. Deze werd overlapt door lengteklassen van kleinere moleculen (vergelijk piek I uit het PAAGE-patroon van gezuiverd dubbelstrengig RNA van CPMV, welke piek het dubbelstrengig RNA van M plus dubbelstrengig RNA van B bevatte en die uitliep naar de kant van de pluspool). Deze kleinere moleculen kunnen ontstaan zijn door breuken in de intacte RF's, of het zijn moleculen afkomstig van replicerend RNA waarvan de replicatie niet voltooid is en waarvan bij de zuivering slechts het dubbelstrengig gedeelte geïsoleerd wordt. Immers, het gebruik van met RNase verontreinigd DNase I en het toepassen van een precipitatie met 4 M NaCl tijdens de zuivering verwijdert het eventueel aanwezige enkelstrengig RNA uit de replicerende moleculen.

In de chloroplasten- en de rest-fractie werden ook moleculen aangetroffen met lengten groter dan die van de RF van het B-RNA. Deze moleculen waren resistent

tegen RNase A + T_1 en tegen DNase I. De aanwezigheid van deze moleculen zou een gevolg van aggregatie kunnen zijn, zoals ook verondersteld wordt voor het dubbelstrengig RNA van AMV (Nicolaieff et al., 1970) en van TMV en TYMV (Wolstenholme & Bockstahler, 1967).

5 Fractionering van de chloroplasten-fractie

De chloroplasten-fractie, die zoals in het voorgaande hoofdstuk werd vermeld 72 tot 93 % van het dubbelstrengig RNA van CPMV bevat, werd gecentrifugeerd op een tweede discontinuë sucrose-gradiënt. Het nucleïnezuur uit de fracties van deze gradiënt werd onderzocht op de aanwezigheid van replicerend RNA van CPMV door middel van moleculaire hybridisatie en elektroforese in polyacrylamidegels en in pulselabel-experimenten.

5.1 De discontinuë sucrose-gradiënt 45/37

De chloroplasten-fractie van 90 g blad uit gradiënt 60/20 werd door toevoegen van 7 volumina 0,01 M tris-HCl pH 8,2, 0,001 M $MgCl_2$ gradiënt-buffer en door centrifugeren gedurende 30 minuten bij 18.000 *g* gewassen. Het sediment werd gesuspendeerd in 5 – 6 ml Honda-buffer en in porties van 1,5 – 2 ml gebracht op een discontinuë sucrose-gradiënt die was samengesteld uit vijf lagen van 5 ml respectievelijk 45, 43, 41, 39 en 37 % w/w sucrose in tris-$MgCl_2$ gradiënt-buffer. De gradiënten werden 15 min gecentrifugeerd bij 4 °C en 22.000 omw./min in een Spinco SW 25.1 rotor. Bij het uitlopen van de centrifuge werd nu wel gebruik gemaakt van de rem.

Het materiaal van de chloroplasten-fractie was als volgt over de gradiënt verdeeld: een smalle groene band op het scheidingsvlak 37/39, een brede groene band bij 39/41, een brede groene band bij 41/43 en een smalle groene band bij 43/45. De tussenliggende zones waren helder en aan de meniscus was geen materiaal achtergebleven. Deze verdeling werd alleen gevonden indien de cowpea-planten bij de inoculatie 12 tot 15 dagen oud waren. Wanneer oudere planten gebruikt werden gaf dit aanleiding tot een afwijkende, niet constante verdeling: meestal waren dan de banden bij 37/39 en 39/41 breder, die bij 41/43 en 43/45 daarentegen smaller.

De gradiënt werd verdeeld in drie fracties: I, II en III (fig. 11). Fractie I bevatte het materiaal van de top van de gradiënt tot halverwege de sucrose-laag van 39 %, dus voornamelijk het materiaal van de band op het scheidingsvlak 37/39; fractie II bevatte het materiaal van halverwege de sucrose-laag van 39 % tot halverwege de sucrose-laag van 41 %, dus voornamelijk het materiaal uit de band bij 39/41; fractie III bevatte het materiaal van halverwege de sucrose-laag van 41 % tot de bodem van de centrifugebuis, dus het materiaal uit de banden bij 41/43 en 43/45.

De fracties werden gewassen door 7 volumina 1 × SSC toe te voegen en daarna te centrifugeren bij 18.000 *g* gedurende 30 min. De sedimenten werden gebruikt voor nucleïnezuurextracties met fenol-SDS.

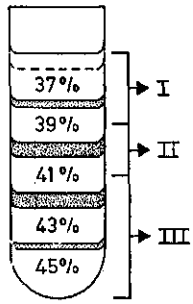


Fig. 11. Verdeling van het materiaal uit de chloroplasten-fractie over de discontinuë sucrose-gradiënt 45/37 na 15 min centrifugeren in een SW 25.1 rotor bij 22.000 omw./min. De gradiënt werd verdeeld in drie fracties: I, II en III.

Fig. 11. Distribution of the material from the chloroplast-fraction after centrifuging on the discontinuous sucrose gradient 45/37 for 15 min at 22,000 rpm in a Spinco SW 25.1. The gradient was divided in three fractions: I, II and III as shown.

5.2 PAAGE van het nucleïnezuur uit de fracties

Uit een chloroplasten-fractie afkomstig van 90 g geïnfecteerde primaire cowpea-bladeren, die bij de inoculatie 12 dagen oud waren, werden de fracties I, II en III bereid. Hieruit werd het nucleïnezuur geëxtraheerd. De hoeveelheden nucleïnezuur per fractie waren bij fractie I 240 μg, fractie II 104 μg en fractie III 50 μg.

De helft van het nucleïnezuur uit iedere fractie, respectievelijk 120, 52 en 25 μg werd geëlektroforeerd op polyacrylamidegels gedurende $2^1/_2$ uur. De verdeling van de optische dichtheid over de gels werd daarna bij 260 nm bepaald. Figuur 12 geeft de patronen voor fractie I en fractie III. (Fractie II wordt niet weergegeven, omdat deze een overgang tussen fractie I en III vormde.)

In deze figuren geven a en b de patronen voor fractie I respectievelijk fractie III, die bepaald zijn onmiddellijk na de elektroforese. In patroon a komt het hoogmoleculaire materiaal in twee pieken voor, dit materiaal beweegt zich elektroforetisch met dezelfde snelheid als het dubbelstrengig RNA van CPMV. Uit patroon b blijkt dat fractie III veel meer materiaal in het hoogmoleculaire gebied bevat dan fractie I, hoewel van fractie I vier maal zoveel nucleïnezuur werd opgebracht dan van fractie III. Het materiaal bewoog zich niet naar de plaats van het dubbelstrengig-RNA-B van CPMV, maar wel naar de plaats van het DNA en naar de plaats waar het dubbelstrengig-RNA-M + B van CPMV terecht was gekomen.

De gels werden vervolgens 72 uur geïncubeerd bij kamertemperatuur met DNase I in 2 × SSC-$MgCl_2$ op de in 3.3 beschreven wijze. Na het beëindigen van de incubatie werden de gels opnieuw doorgemeten bij 260 nm, hetgeen de patronen c (fractie I) en d (fractie III) in figuur 12 opleverde.

Vergelijking van deze patronen laat zien, dat van het hoogmoleculaire materiaal in fractie III zeer veel verdwenen is, dit is waarschijnlijk DNA geweest. In fractie I blijft na incubatie met DNase I meer hoogmoleculair materiaal over, hetgeen de elektroforetische kenmerken van de replicatieve vorm van het CPMV-RNA heeft.

De patronen c en d laten ook zien dat in het laagmoleculaire gebied, waar het enkelstrengig RNA terecht is gekomen, na incubatie met DNase I een afname van het daar aanwezige materiaal is opgetreden, hetgeen wordt veroorzaakt door de verontreiniging van het DNase I met RNase.

Fig. 12. Verdeling van de optische dichtheid over de gels na elektroforese van het nucleïnezuur uit de fracties I en III gemeten vóór en ná incubatie van de gels met DNase. a: het patroon van fractie I onmiddellijk na elektroforese, b: het patroon van fractie III onmiddellijk na elektroforese, c: het patroon na incubatie van gel a in 2 × SSC, 0,005 M $MgCl_2$ met 5 μg/ml DNase I gedurende 72 uur, d: het patroon na incubatie van gel b in 2 × SSC, 0,005 M $MgCl_2$ met 5 μg DNase I/ml gedurende 72 uur. De door respectievelijk DNA en dubbelstrengig RNA van CPMV afgelegde afstand bij gelijktijdige elektroforese op afzonderlijke gels wordt in de figuur met pijlen aangegeven.

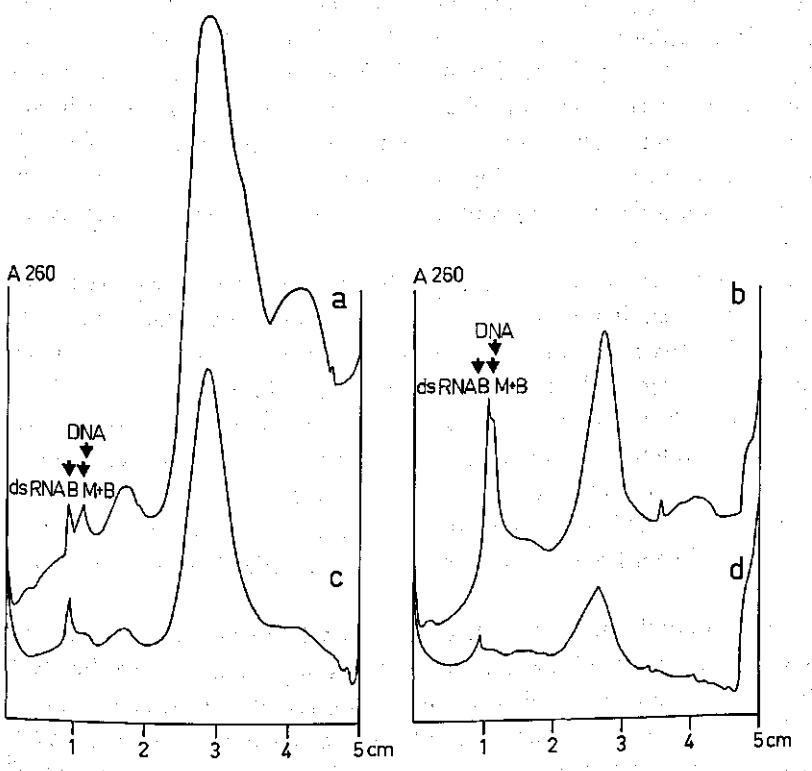


Fig. 12. Optical density pattern after electrophoresis of the nucleic acid from fractions I and III on polyacrylamide-agarose gels estimated before and after incubation of the gels with DNase. a: pattern for fraction I immediately after electrophoresis, b: pattern for fraction III immediately after electrophoresis, c: pattern after incubation of gel a in 2 × SSC, 0,005 M $MgCl_2$ with 5 μg/ml DNase I for 72 h, d: pattern after incubation of gel b in 2 × SSC, 0,005 M $MgCl_2$ with 5 μg/ml DNase I for 72 h. The distance migrated in separate gels during the same run by DNA and double-stranded RNA of CPMV respectively is indicated in the figure by the arrows.

5.3 Pulselabel-experimenten

Gezonde en geïnfecteerde cowpea-bladeren werden gelabeld met ^{3}H-uridine (zie 4.5): 20 g primair blad, verdeeld over drie petrischalen, werd gedurende 2 uur gelabeld met 1,6 mCi ^{3}H-uridine in 16,6 ml medium (300 μg actinomycine D en 15 mg thymidine in 16,6 ml gedesioniseerd water) per schaal (∅ 15 cm). De specifieke activiteit van het ^{3}H-uridine bedroeg in het experiment met gezond blad 43,3 Ci/mmol en in het experiment met geïnfecteerd blad 51 Ci/mmol. Onmiddellijk na de labelperiode werd de fractie verkregen bij 1000 *g* uit het blad bereid en hieruit door centrifugeren op de gradiënt 60/20 de chloroplasten-fractie geïsoleerd. Vervolgens werd de chloroplasten-fractie gecentrifugeerd op de gradiënt 45/37. Deze werd verdeeld in de fracties I, II en III en uit de drie fracties werd met fenol-SDS het nucleïnezuur geëxtraheerd.

Het nucleïnezuur uit elke fractie werd $2^1/_2$ uur geëlektroforeerd op polyacrylamidegels. De gels werden doorgemeten bij 260 nm en daarna in plakjes van 1 mm gesneden. Vervolgens werd de verdeling van het gelabelde nucleïnezuur over de gel bepaald (fig. 13).

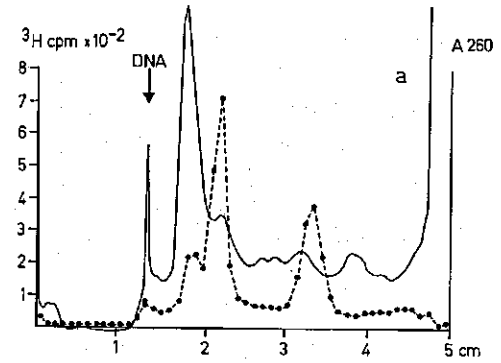
Figuur 13a geeft de verdeling van de optische dichtheid en van de radioactiviteit over de gel voor fractie I, en figuur 13b voor fractie III van gezonde bladeren.

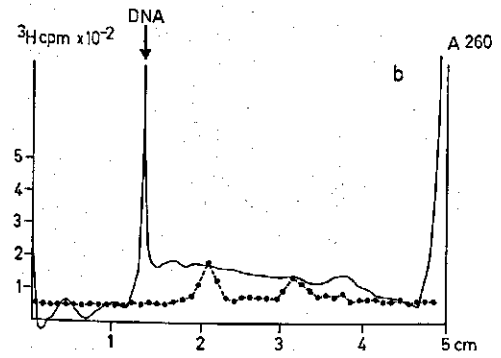
Vergelijking van de optische dichtheidspatronen in a en b laat zien, dat het hoogmoleculaire nucleïnezuur van beide fracties in één scherpe piek, met dezelfde snelheid als DNA, elektroforetisch beweegt; de verdeling van de radioactiviteit over de gels laat zien, dat zowel in fractie I als in fractie III van gezonde bladeren geen hoogmoleculair nucleïnezuur gelabeld met ^{3}H-uridine aanwezig is.

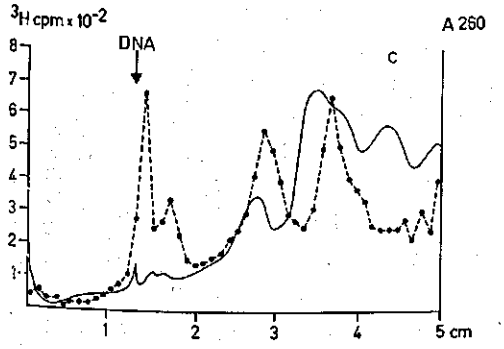
Figuur 13c geeft de verdeling van de optische dichtheid en van het gelabelde nucleïnezuur over de gel voor fractie I en figuur 13d voor fractie III van geïnfecteerde bladeren.

Vergelijking van de optische dichtheidspatronen in c en d laat zien, dat in fractie III het meeste hoogmoleculaire nucleïnezuur, dat zich even snel als DNA beweegt, aanwezig is. Vergelijking van de verdeling van de radioactiviteit over de gels laat zien, dat alleen in fractie I hoogmoleculair ^{3}H-gelabeld nucleïnezuur gevonden wordt, elektroforetisch bewegend met twee banden, hetgeen kenmerkend is voor dubbelstrengig RNA van CPMV. In fractie I van gezonde bladeren werd dit gelabelde hoogmoleculaire nucleïnezuur niet aangetroffen, hetgeen steun geeft aan de opvatting dat de twee pieken corresponderen met het dubbelstrengig RNA van CPMV.

Figuur 13a en c laat zien dat in fractie I, zowel van gezonde als van geïnfecteerde bladeren, een aanzienlijke hoeveelheid laagmoleculair gelabeld nucleïnezuur voorkomt. Waarschijnlijk zijn dit RNA's uit de ribosomen van de chloroplasten en een precursor van deze RNA's. Dit nucleïnezuur werd evenwel niet nader onderzocht en gekarakteriseerd.







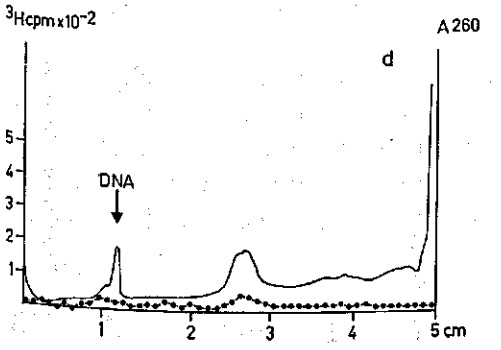


Fig. 13. Verdeling van de optische dichtheid (—) en van de radioactiviteit (●) over de gels na elektroforese van het nucleïnezuur uit fracties I en III uit pulselabel-experimenten. a: fractie I van gezonde bladeren, b: fractie III van gezonde bladeren, c: fractie I van geïnfecteerde bladeren, d: fractie III van geïnfecteerde bladeren. De door DNA (uit kalfsthymus) afgelegde afstand bij gelijktijdige elektroforese op een afzonderlijke gel wordt in de figuur door de pijl aangegeven.

Fig. 13. Optical density (—) and radioactivity pattern (●) after electrophoresis on polyacrylamide-agarose gels of the nucleic acid of fractions I and III from pulselabel-experiments. a: pattern for fraction I from healthy leaves, b: pattern for fraction III from healthy leaves, c: pattern for fraction I from infected leaves, d: pattern for fraction III from infected leaves. The distance migrated in a separate gel during the same run by DNA (from calf thymus) is indicated in the figure by the arrow.

Tabel 7. Radioactiviteit gemeten na moleculaire hybridisatie van nucleïnezuur uit de fracties I, II en III van gradiënt 45/37 respectievelijk afkomstig van gezond en geïnfecteerd blad, met CPMV-RNA gelabeld met ^{3}H-uridine.

Fractie / Fraction	A Nucleïnezuur per fractie (μg)	B Nucleïnezuur per fractie (%)	C Voor RNase ongevoelige activiteit na hybridisatie van 20 μg nucleïnezuur per fractie (cpm)	D Verdeling van het voor RNase ongevoelige materiaal over de fracties (%)
Gezonde bladeren / healthy leaves				
Experiment 1				
I	390	65	0	0
II	90	15	0	0
III	120	20	0	0
Geïnfecteerde bladeren / infected leaves				
Experiment 2				
I	255	63	1444	70
II	90	23	1090	19
III	54	14	1024	11
Experiment 3				
I	360	46	1162	61
II	270	35	641	25
III	150	19	624	14
	Nucleic acid per fraction (μg)	Nucleic acid per fraction (%)	RNase resistant activity after hybridization of 20 μg of nucleic acid per fraction (cpm)	Distribution of the RNase resistant material among the fractions (%)

De fracties corresponderen met die uit figuur 11. / Fractions correspond to those in figure 11.

Table 7. Radioactivity estimated after molecular hybridization of nucleic acid from fractions I, II and III of gradient 45/37, obtained from healthy (experiment 1) and infected (experiments 2 and 3) cowpea leaves respectively, with CPMV-RNA labeled with ^{3}H-uridine.

5.4 Moleculaire hybridisatie van het nucleïnezuur uit de fracties

Het nucleïnezuur uit de fracties I, II en III van gradiënt 45/37 werd gebruikt voor moleculaire-hybridisatie-experimenten met CPMV-RNA gelabeld met ^{3}H-uridine: experiment 1 met nucleïnezuur van 73 g gezond bladmateriaal, experiment 2 met nucleïnezuur van 90 g en experiment 3 met nucleïnezuur van 73 g geïnfecteerd bladmateriaal. De geïnfecteerde planten waren 12 dagen oud geïnoculeerd.

In tabel 7 staan de resultaten van de drie experimenten weergegeven. Kolom A geeft de hoeveelheden nucleïnezuur in de drie fracties en kolom B de verdeling in percentages. Kolom C geeft de voor RNase ongevoelige activiteiten in cpm na hybridisatie van 20 μg nucleïnezuur uit elke fractie met 16 μg CPMV-RNA gelabeld met ^{3}H-uridine (specifieke activiteit 7.185 cpm per μg).

Uit de getallen in kolom C werd de totale hoeveelheid tegen RNase resistent materiaal per fractie berekend (zie 4.3). De verdeling van het tegen RNase resistente materiaal per experiment over de fracties staat in percentages weergegeven in kolom D.

Tabel 7 laat zien dat de hoeveelheid nucleïnezuur per fractie van fractie I naar fractie III afneemt. Alleen in experiment 1 wordt een enigszins afwijkende verdeling gevonden, mogelijk veroorzaakt door een andere verdeling van de structuren uit de chloroplasten-fractie afkomstig van gezonde bladeren over de gradiënt 45/37 dan die afkomstig van geïnfecteerde bladeren. Dit zou, evenals opgemerkt werd in 4.2, bij de verdeling van het DNA over chloroplasten-, kernen- en rest-fractie, terug te voeren zijn op een verschil in beschadiging van de structuren bij homogenisatie van gezond respectievelijk geïnfecteerd blad.

Uit experiment 1 blijkt, dat in geen van de fracties afkomstig van gezonde bladeren hybridiseerbaar materiaal aanwezig is.

Na hybridisatie van het nucleïnezuur uit de drie fracties van geïnfecteerde bladeren (experiment 2 en 3) wordt in elke fractie voor RNase ongevoelige activiteit gevonden, per hoeveelheid gehybridiseerd nucleïnezuur is het aantal cpm het hoogst in fractie I, de aantallen in fractie II en III zijn gelijk.

De verdeling van het hybridiseerbare materiaal over de drie fracties laat zien, dat 61 tot 70 % aanwezig is in fractie I, 19 tot 25 % in fractie II en 11 tot 14% in fractie III. Fractie I bevat dus het meeste replicerend virus-RNA.

5.5 Discussie

De verdeling van de chloroplasten-fractie over de vier scheidingsvlakken van de sucrose-lagen van gradiënt 45/37 was zeer afhankelijk van de leeftijd van de cowpea-planten. Alleen planten die bij de inoculatie 12 tot 15 dagen oud waren, gaven een goede reproduceerbare verdeling over de gradiënt. Werden oudere planten gebruikt, dan varieerde de verdeling van de structuren en van het nucleïnezuur van experiment tot experiment.

Verschillen in de verdeling van de structuren over de gradiënt traden ook op tussen gezonde en geïnfecteerde bladeren, zoals bleek uit de verdeling van het nucleïnezuur

over de fracties in de hybridisatie-experimenten. Dit zou verklaard kunnen worden uit verschillen in beschadiging van de structuren bij het homogeniseren van gezonde en geïnfecteerde bladeren.

Het elektroforese-experiment waarin ongelabeld nucleïnezuur uit de fracties werd geëlektroforeerd op polyacrylamidegels laat zien, dat in fractie III het meeste DNA aanwezig was. Dit DNA werd bij incubatie van de gels met DNase I volledig afgebroken. Fractie III was ook de fractie die het minste materiaal met de kenmerken van dubbelstrengig RNA bevatte en hieruit blijkt, dat door gradiënt 45/37 een verdere scheiding tussen kern-materiaal en de bij de replicatie van virus-RNA betrokken structuren bereikt was.

Uit de PAAGE-, de pulselabel- en de hybridisatie-experimenten blijkt, dat het replicerend RNA van CPMV hoofdzakelijk in fractie I aanwezig was.

De verdeling van de optische dichtheid over de gels laat zien, dat het replicerend RNA afkomstig van nucleïnezuur-preparaten, die niét met het met RNase verontreinigde DNase I en met 4 M NaCl behandeld werden, de kenmerken van de replicatieve vorm van het CPMV-RNA had.

De verdeling van de radioactiviteit over de gels, die niet geïncubeerd waren met DNase I (vergelijk 4.5), in de pulselabel-experimenten laat ook uitsluitend replicerend RNA met de kenmerken van de replicatieve vorm van het CPMV-RNA zien; materiaal met de kenmerken van replicatieve intermediair was niet aanwezig. Hoewel de aanwezigheid van een replicatieve intermediair niet uitgesloten wordt geacht, domineerde vier dagen na inoculatie de replicatieve vorm.

De replicatieve vorm van CPMV-RNA werd uitsluitend aangetroffen in fracties afkomstig van geïnfecteerde bladeren, de pulselabel- en hybridisatie-experimenten tonen aan, dat in gezonde planten geen RNA voorkwam dat verward zou kunnen worden met het replicerend RNA van CPMV.

6 Elektronenmicroscopie[1]

De chloroplasten-fractie van gradiënt 60/20 en fractie I van gradiënt 45/37, waarin het replicerend RNA van CPMV voornamelijk voorkomt (hoofdstuk 4 en 5), werden elektronenmicroscopisch onderzocht en vergeleken met het elektronenmicroscopische beeld van de geïnfecteerde cel en van de fracties II en III.

1. Elektronenmicroscopie aan blad en fracties werd uitgevoerd door prof. dr. G. A. de Zoeten. Over de resultaten hiervan en van autoradiografische experimenten wordt uitvoerig bericht door De Zoeten, Assink en Van Kammen (De Zoeten et al., 1974).

6.1 De geïnfecteerde cel

In met CPMV geïnfecteerde cellen van cowpea-planten worden cytopathische structuren waargenomen die in gezonde cellen niet voorkomen. Figuur 14 laat een elektronenmicroscopische opname zien van een gedeelte van een geïnfecteerde mesofyl-cel uit een primair blad van een 18 dagen oude cowpea-plant, 4 dagen na inoculatie. Op dit tijdstip verloopt de virusvermenigvuldiging met maximale snelheid en worden in vrijwel alle bladcellen de cytopathische structuren aangetroffen. In cellen van deze leeftijd is de vacuole zeer groot en de kern en de chloroplasten bevinden zich in het cytoplasma langs de celwand.

Zoals in figuur 14 te zien is, bevindt de cytopathische structuur (C) zich in het cytoplasma in de onmiddellijke nabijheid van de kern (N). De cytopathische structuur heeft de volgende kenmerken: vesiculaire membranen (Ve) lopen als banen door de cytopathische structuur en vormen waarschijnlijk een netwerk van membraanzakjes of vesiculae. Sommige vesiculae bevatten fibrillen (F), die een gelijkenis vertonen met de fibrillen die worden aangetroffen in de vesiculaire membranen in cellen geïnfecteerd met pea enation mosaic virus (De Zoeten et al., 1972), met beet yellows virus, met beet western yellows virus (Esau & Hoefert, 1971a, 1972) en met pelargonium leaf curl virus (Martelli & Castellano, 1969). Op grond van de overeenkomst met nucleïnezuurfibrillen, waargenomen in mitochondriën, chloroplasten en bacteriën, wordt verondersteld dat de fibrillen in de vesiculaire membranen eveneens nucleïnezuurfibrillen zijn (De Zoeten et al., 1972).

De matrix van de cytopathische structuur wordt gevormd door amorf elektronendicht materiaal (A), waarin soms virusdeeltjes worden aangetroffen. Opvallend is ook het grote aantal osmiofiele globuli (O) in de cytopathische structuur. Aan de rand van de structuur worden vaak mitochondriën (M), soms in groepen gerangschikt, aangetroffen. De cytopathische structuur wordt niet begrensd door een membraan maar ligt vrij in het cytoplasma. Een relatie van de cytopathische structuur met het kernmembraan of het endoplasmatisch reticulum werd niet gevonden.

Fig. 14. Electron micrograph of a mesophyll cell of a primary leaf of cowpea infected with CPMV, 18 days old and 4 days after inoculation. The cytopathic structure (C) is found adjacent to the nucleus (N). Rays of vesicles (Ve) are seen in the amorphous electron-dense matrix (A) of the cytopathic structure. Some of these vesicles contain fibrils (F). Furthermore osmiophilic globuli (O), a mitochondrion (M) and part of the vacuole (Va) can be seen (× 30,000).

Fig. 14. Elektronenmicroscopische opname van een gedeelte van een met CPMV geïnfecteerde mesofylcel uit een primair cowpea-blad, 18 dagen oud en 4 dagen na inoculatie. De cytopathische structuur (C) bevindt zich in de onmiddellijke nabijheid van de kern (N). Door de cytopathische structuur lopen banen van vesiculae (Ve). Sommige hiervan bevatten fibrillen (F). De matrix van de structuur wordt gevormd door amorf elektronen-dicht materiaal (A). Verder zijn osmiofiele globuli (O), een mitochondrion (M) en een gedeelte van de vacuole (Va) te onderscheiden (30.000 ×).

6.2 Chloroplasten-fractie

De chloroplasten-fractie van geïnfecteerd blad uit gradiënt 60/20 bevatte 72 tot 93% van het totale hybridiseerbare materiaal (4.3) in de drie fracties van deze gradiënt, en, zoals bleek uit de pulselabel-experimenten, ook de grootste hoeveelheid replicerend RNA (4.5). Daarom werd de chloroplasten-fractie elektronenmicroscopisch onderzocht om vast te stellen welke structuren hierin voorkwamen.

Figuur 15 geeft een voor de chloroplasten-fractie representatief beeld. De opname laat zien, dat de naam chloroplasten-fractie niet ten onrechte gekozen was: de chloroplasten (Ch) vormen de meerderheid. De chloroplasten waren niet meer in het bezit van een buitenmembraan.

Opmerkelijk was het voorkomen van kleine en grote brokstukken van cytopathische structuren in deze fractie. Tijdens het homogeniseren blijft kennelijk de cytopathische structuur zijn samenhang behouden. Figuur 15 laat zien, dat in zo'n brokstuk van een

Fig. 15. Elektronenmicroscopische opname van de chloroplasten-fractie van gradiënt 60/20 afkomstig van geïnfecteerd cowpea-blad. In de fractie worden vesiculae (Ve), stukken cytopathische structuur, amorf elektronen-dicht materiaal (A), osmiofiele globuli (O) en chloroplasten (Ch) aangetroffen (20.000 ×).

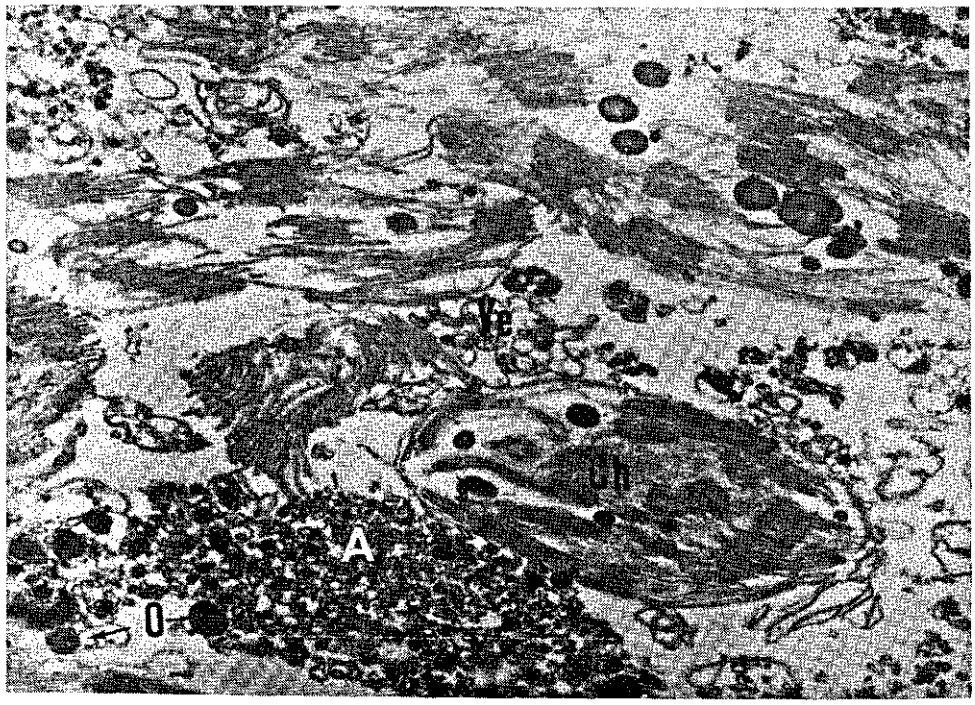


Fig. 15. Electron micrograph of the chloroplast-fraction of gradient 60/20 from infected leaves of cowpea. In the fraction parts of cytopathic structures with vesicles (Ve), amorphous electron-dense material (A), osmiophilic globuli (O) and chloroplasts (Ch) are found (× 20,000).

cytopathische structuur vesiculae (Ve), amorf elektronen-dicht materiaal (A) en osmiofiele globuli (O) aanwezig zijn. Dit geeft steun aan de veronderstelling dat de vesiculaire membranen als een netwerk door de structuur lopen. In de vesiculae zijn in dit geval geen fibrillen waarneembaar, omdat deze preparaten niet gedurende 16 uur gekleurd waren met uranylacetaat (2.10.2 eerste methode).

Nooit werden kernen of kernfragmenten in deze fractie aangetroffen.

6.3 Fractie I, II en III

De structuren uit de chloroplasten-fractie worden na centrifugeren op de gradiënt 45/37 verdeeld over drie fracties: I, II en III. Analyse van het nucleïnezuur in de drie fracties toonde aan, dat fractie I van geïnfecteerd blad het hoogste percentage hybridiseerbaar materiaal (5.4) en de grootste hoeveelheid replicerend virus-RNA (5.2 en 5.3) bevatte. De fracties I, II en III werden ook elektronenmicroscopisch onderzocht en vergeleken.

De coupes werden gemaakt van sedimenten van kleine monsters uit de fracties (2.10.2 tweede methode) en gaven dus een representatief beeld van de samenstelling van de fracties.

Figuur 16 laat een overzichtsopname zien uit het midden van een coupe van fractie I. Onmiddellijk valt op, dat er veel membraanfragmenten en maar weinig intacte celorganellen in voorkomen. Tussen de membranen zijn kleine en grote brokstukken van cytopathische structuren (C) herkenbaar. Figuur 18 geeft zo'n stuk cytopathische structuur sterker vergroot weer. In de cytopathische structuur zijn vesiculae (Ve), amorf elektronen-dicht materiaal (A) en osmiofiele globuli (O) zichtbaar. De cytopathische structuren in de fractie hebben dus alle kenmerken van de cytopathische structuur in de intacte geïnfecteerde cel. Fractie I bevat naast cytopathische structuren en membraanfragmenten slechts enkele mitochondriën (fig. 16 en fig. 18: M) en chloroplasten (fig. 16: Ch).

In tegenstelling tot fractie I bevatten fractie II en III weinig cytopathische structuren, wél zijn de brokstukken gemiddeld groter dan die in fractie I. Daarentegen wordt de meerderheid van de chloroplasten in fractie II en vooral in fractie III aangetroffen, zoals in figuur 17 een elektronenmicroscopische opname uit het midden van een doorsnede van fractie III, goed te zien is.

De verdeling van de structuren over de fracties werd door tellen bepaald. Van de totale hoeveelheid cytopathische structuren wordt ongeveer 70 % in fractie I, 20 % in fractie II en 10 % in fractie III aangetroffen, terwijl van het totaal aantal chloroplasten ongeveer 8 % in fractie I, 12 % in fractie II en 80 % in fractie III terecht komt.

Ook elektronenmicroscopisch bezien vormde fractie II (niet afgebeeld) een overgang van fractie I naar fractie III. Dit komt overeen met het beeld wat verkregen werd voor fractie II op grond van de verdeling van het replicerend virus-RNA over de fracties (hoofdstuk 5).

In geen van de drie fracties werden kernen of kernfragmenten waargenomen.

Elektronenmicroscopisch onderzoek van fractie I, II en III afkomstig van gezonde

Fig. 16. Elektronenmicroscopische opname van fractie I van gradiënt 45/37 afkomstig van geïnfecteerd cowpea-blad. De overzichtsopname laat stukken cytopathische structuur (C), mitochondriën (M) en een enkel fragment van een chloroplast (Ch) zien (2.100 ×).

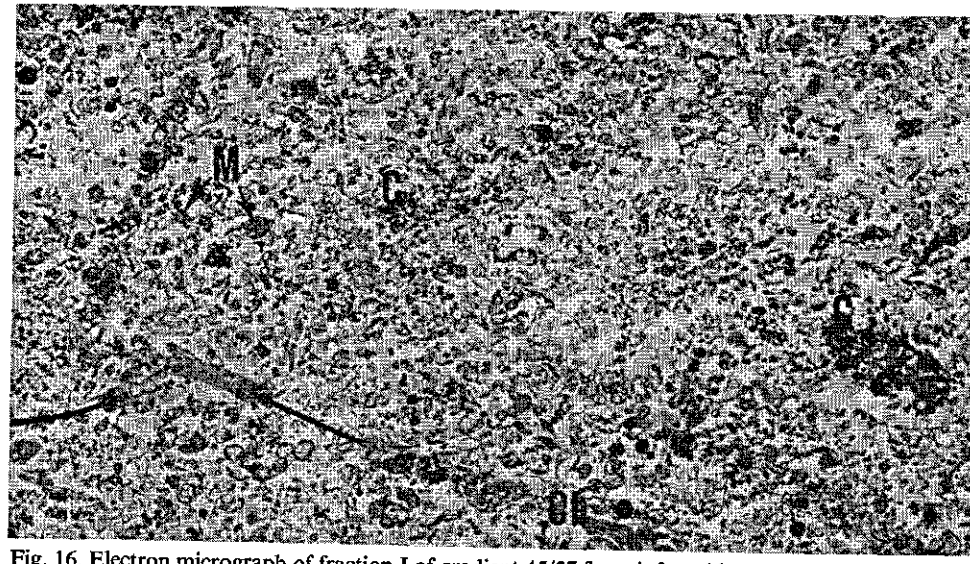


Fig. 16. Electron micrograph of fraction I of gradient 45/37 from infected leaves of cowpea. The low magnification micrograph shows the presence of parts of cytopathic structures (C) together with mitochondria (M) and fragments of chloroplasts (Ch) (× 2,100).

Fig. 17. Elektronenmicroscopische opname van fractie III van gradiënt 45/37 afkomstig van geïnfecteerd cowpea-blad. De opname laat zien, dat de fractie voornamelijk chloroplasten (Ch) bevat (2.600 ×).

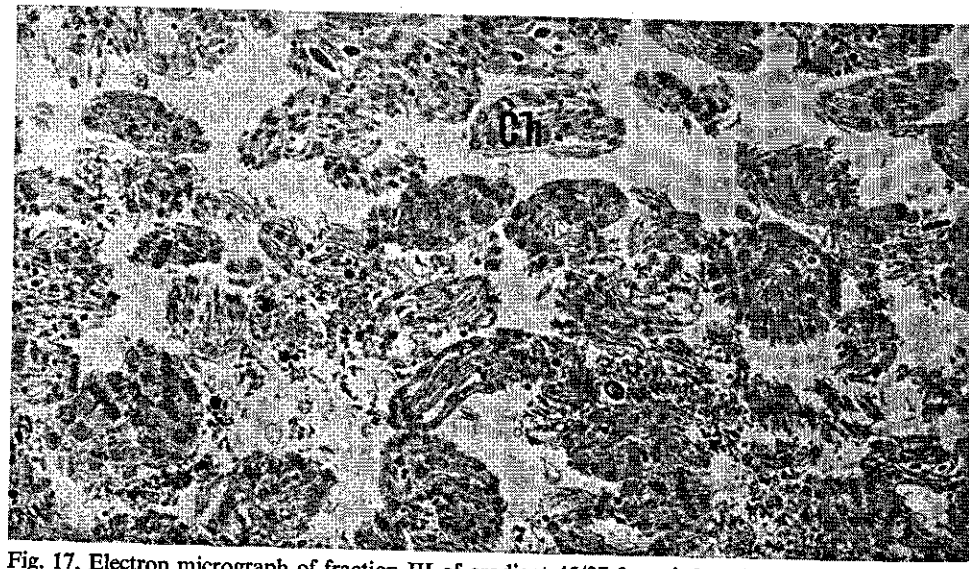


Fig. 17. Electron micrograph of fraction III of gradient 45/37 from infected leaves of cowpea. The micrograph shows that this fraction mainly contains chloroplasts (Ch) (× 2,600).

Fig. 18. Elektronenmicroscopische opname van een gedeelte van een cytopathische structuur uit fractie I. Amorf elektronen-dicht materiaal (A), vesiculae (Ve), osmiofiele globuli (O) en een enkel mitochondrion (M) zijn duidelijk te onderscheiden (50.000 ×).

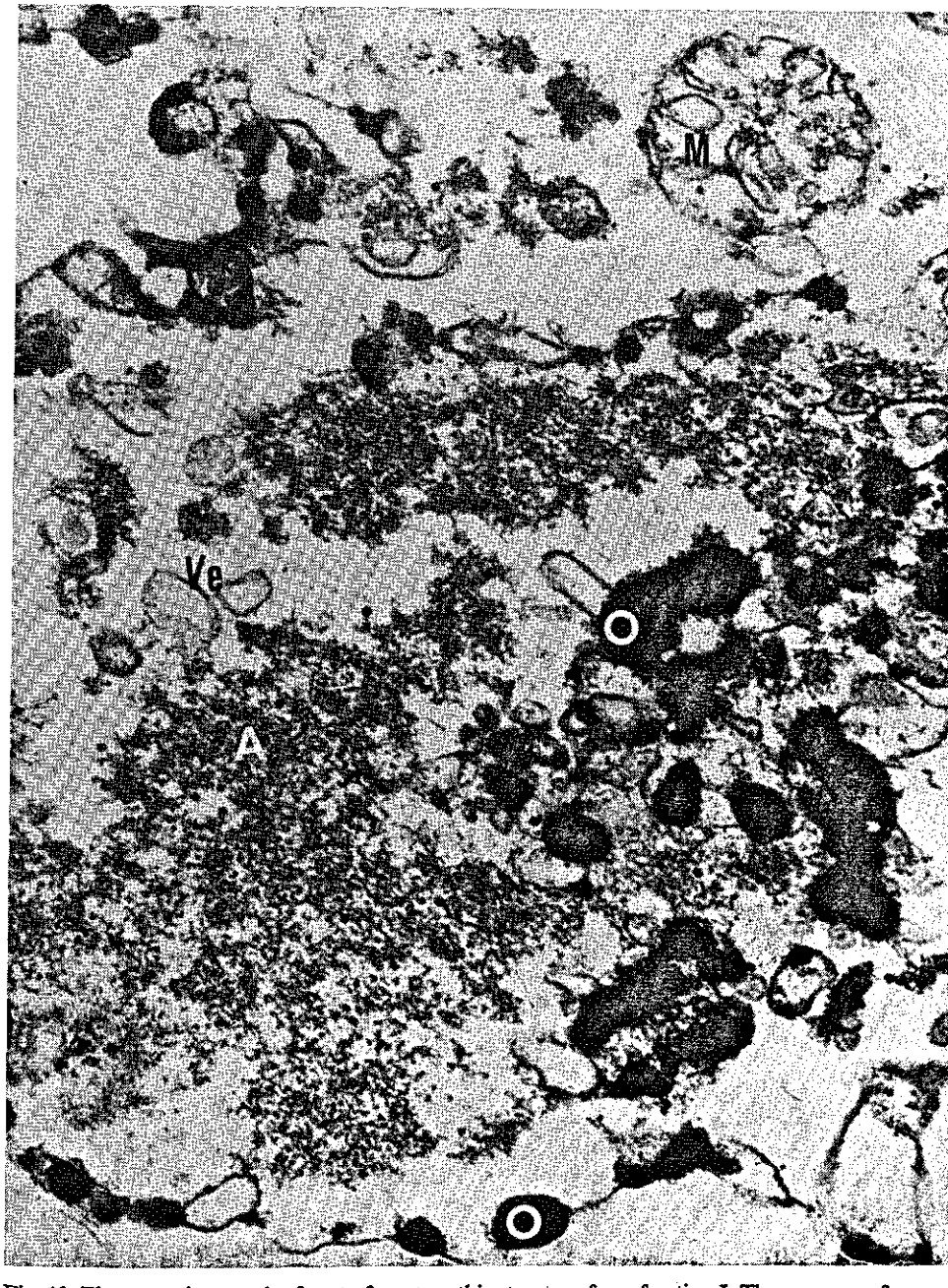


Fig. 18. Electron micrograph of part of a cytopathic structure from fraction I. The presence of amorphous electron-dense material (A), of vesicles (Ve), of osmiophilic globuli (O) and of a mitochondrion (M) is clearly distinguished (× 50,000).

cowpea-bladeren leerde, dat het beeld vooral wat betreft fractie I verschilde met dat van het geïnfecteerde materiaal. Fractie I van gezond blad bevatte veel kleine membraanfragmenten, maar cytopathische structuren waren niet aanwezig. Ook in fractie II en III werden ze niet gevonden.

6.4 Discussie

Elektronenmicroscopie aan primair blad van cowpea liet zien, dat er een groot onderscheid was tussen met CPMV geïnfecteerde en gezonde cellen. Alleen in geïnfecteerde cellen kwamen cytopathische structuren voor. Deze cytopathische structuren bevonden zich in de onmiddellijke nabijheid van de kern in het cytoplasma en werden niet begrensd door een membraan en daardoor afgescheiden van het cytoplasma. Ze werden gekarakteriseerd door vesiculaire membranen (soms met fibrillaire inhoud), die als een netwerk liggen in een matrix van amorf elektronen-dicht materiaal, en door het aantal osmiofiele globuli.

Onderzoek van de chloroplasten-fractie van gradiënt 60/20 leerde, dat in deze fractie chloroplasten, mitochondriën, membranen en bij geïnfecteerd bladmateriaal ook cytopathische structuren aanwezig waren. Alleen de kernen, en ook fragmenten hiervan, ontbraken in de chloroplasten-fractie.

Electronenmicroscopie aan de fracties I, II en III afkomstig van geïnfecteerd blad liet zien, dat de cytopathische structuren voornamelijk in fractie I, de chloroplasten daarentegen in fractie III terecht waren gekomen.

De gradiënt 60/20 bracht dus een scheiding aan tussen kernen en overige structuren, terwijl gradiënt 45/37 een scheiding tussen de chloroplasten en andere structuren, met name de cytopathische structuren, bewerkte.

Met methoden als moleculaire hybridisatie, PAAGE en pulselabel-experimenten was in hoofdstuk 5 al vastgesteld, dat het replicerend RNA van CPMV voornamelijk in fractie I van gradiënt 45/37 terecht kwam. In dit hoofdstuk werd vastgesteld, dat fractie I de fractie was, waarin 70% van de cytopathische structuren gevonden werd. Hieruit wordt de conclusie getrokken, dat het de cytopathische structuren zijn, waarmee het replicerend RNA van CPMV geassocieerd is.

Elektronenmicroscopie en celfractionering alleen waren evenwel niet toereikend om binnen de cytopathische structuur een onderscheid te maken tussen de vesiculae en het amorf elektronen-dicht materiaal wat betreft hun rol in de replicatie van het virus-RNA. Samen vormden deze structuren een complex dat eerder verdeeld werd in kleinere brokstukken, dan dat een scheiding van vesiculaire membranen en amorf elektronen-dicht materiaal tot stand kwam.

Inmiddels werd dit probleem opgelost door autoradiografie-experimenten (De Zoeten et al., 1974). De experimenten werden uitgevoerd met cowpea-blad en met de drie fracties van gradiënt 45/37 afkomstig van de pulselabel-experimenten (5.3). Figuur 19 toont de cytopathische structuur uit een geïnfecteerde cel van een gedurende 2 uur met ^{3}H-uridine gelabeld blad. Duidelijk is te zien, dat de sporen (pijlen) veroorzaakt door de β-straling steeds geassocieerd zijn met de in banen door de cyto-

Fig. 19. Elektronenmicroscopische opname van een met CPMV geïnfecteerde mesofylcel van cowpea-blad uit pulselabel-experimenten na autoradiografie. De zwarting veroorzaakt door β-straling (pijlen) van het ingebouwde ^{3}H-uridine is geassocieerd met de vesiculaire membranen (Ve) in de cytopathische structuur. Ch: chloroplast, O: osmiofiel globulus (12.000 ×).

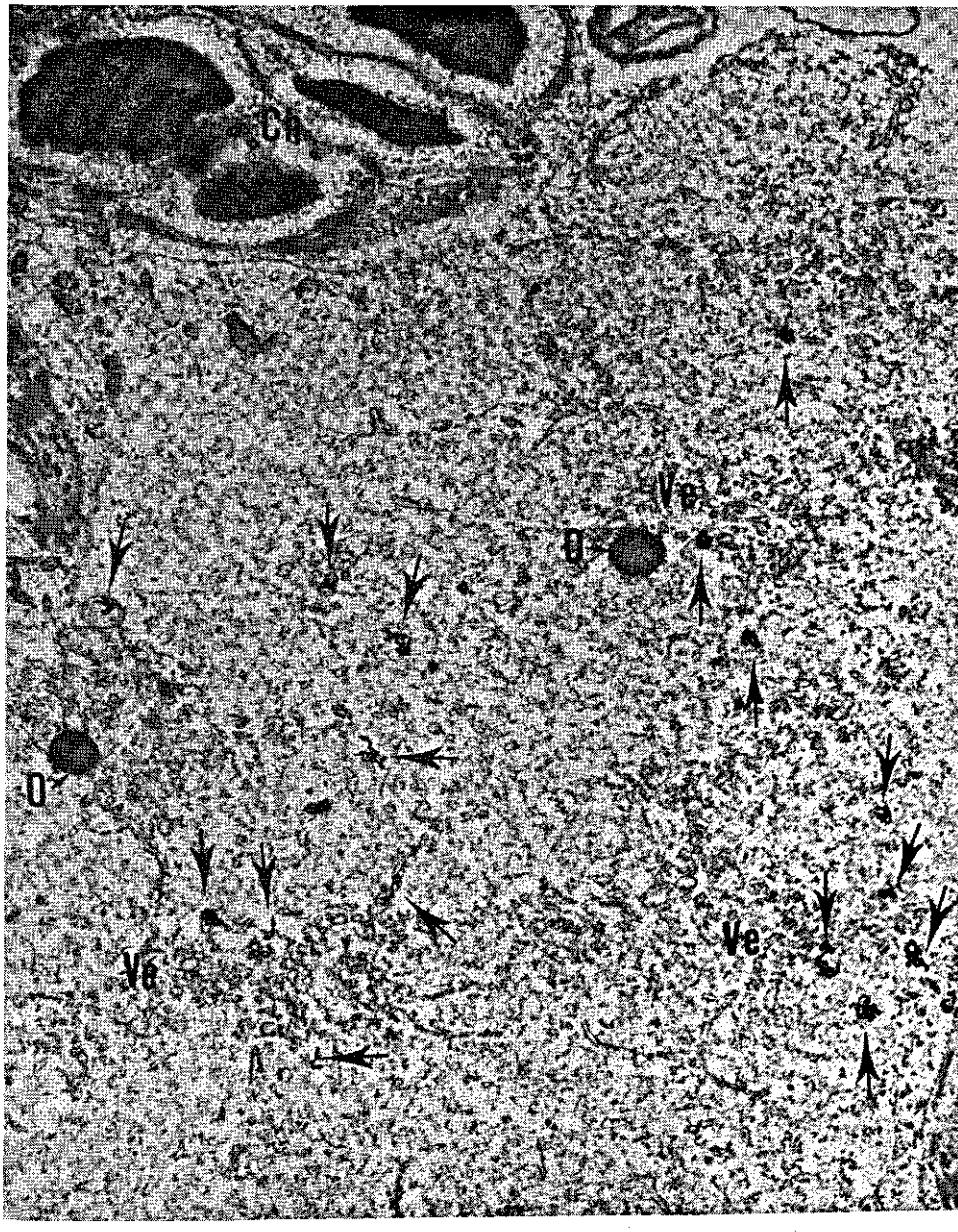
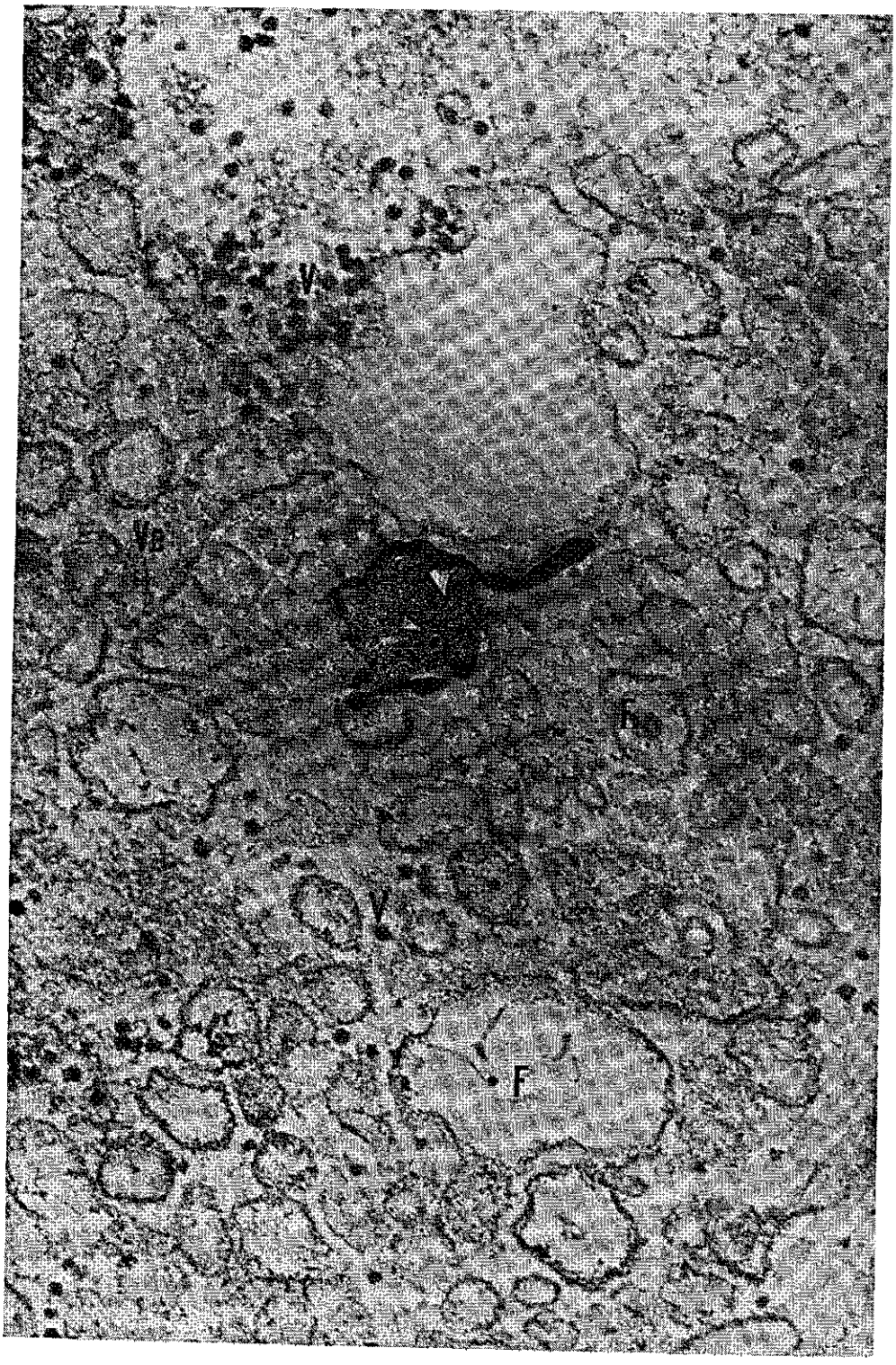


Fig. 19. Electron micrograph of a mesophyll cell of a primary leaf of cowpea infected with CPMV from pulselabel-experiments after autoradiography. The tracks caused by β emission (arrows) of the ^{3}H-uridine incorporated, is associated with the vesicular membranes (Ve) in the cytopathic structure. Ch: chloroplast, O: osmiophilic globule (× 12,000).


V
VB
F
V
F

pathische structuur lopende vesiculaire membranen (Ve). Figuur 20 is een detailopname van enkele vesiculae (Ve) uit fractie I. Sommige vesiculae bevatten fibrillen (F) en ook zijn virusdeeltjes (V) te onderscheiden. De sporen bevinden zich bij een vesicula.

Het zijn dus de vesiculaire membranen in de cytopathische structuur die betrokken zijn bij de RNA-replicatie van CPMV.

Fig. 20. Elektronenmicroscopische opname van enkele vesiculae uit fractie I uit een pulselabel-experiment na autoradiografie. De zwarting veroorzaakt door β-straling van ingebouwd ^{3}H-uridine is geassocieerd met de vesicula. In sommige vesiculae (Ve) zijn fibrillen (F) te onderscheiden. Ook zijn enkele virusdeeltjes (V) zichtbaar (120.000 ×).

Fig. 20. Electron micrograph of some vesicles from fraction I from a pulselabel-experiment after autoradiography. The tracks caused by β-emission of the ^{3}H-uridine incorporated are associated with a vesicle. Some of the other vesicles (Ve) show fibrils (F). Virusparticles (V) are also visible (× 120,000).

7 Conclusie

De replicatie van CPMV-RNA is geassocieerd met de vesiculaire membranen van een cytopathische structuur in het cytoplasma van geïnfecteerde cellen van cowpea-blad.

Deze cytopathische structuur werd als een van de eerste veranderingen tengevolge van virus-infectie in de cel waargenomen. Op het tijdstip waarop de cowpea-bladeren verzameld werden, nl. vier dagen na inoculatie, was in vrijwel alle mesofyl-cellen deze cytopathische structuur aanwezig.

De kenmerken van de cytopathische structuur zijn: membranen die als een netwerk van vesiculae door een matrix van amorf elektronen-dicht materiaal lopen, de aanwezigheid van fibrillen in sommige vesiculae en het grote aantal osmiofiele globuli. De cytopathische structuur bevindt zich in het cytoplasma in de nabijheid van de kern en wordt niet omgeven door een membraan.

Met behulp van discontinuë sucrose-gradiënten was het mogelijk de cytopathische structuren grotendeels te scheiden van andere structuren uit de cel. De structuren verdeelden zich over de scheidingsvlakken van de sucrose-lagen, terwijl de tussenliggende zones helder werden. Eenzelfde effect kon met continuë sucrose-gradiënten niet bereikt worden, omdat het materiaal bij centrifugeren over de gradiënt uitgesmeerd werd.

Voor het aantonen van het nucleïnezuur werden verschillende technieken toegepast. Met behulp van moleculaire hybridisatie was het mogelijk de aanwezigheid van de aan het CPMV-RNA complementaire RNA-keten aan te tonen. Elektroforese op polyacrylamidegels bracht een scheiding aan tussen het RNA met kenmerken van dubbelstrengig RNA van CPMV en het overige nucleïnezuur. Uit de pulselabel-experimenten, met een korte labelperiode van twee uur, bleek dat dit dubbelstrengig RNA inderdaad replicerend RNA van CPMV is.

Elektronenmicroscopisch onderzoek naar de structuren in de fracties toonde de relatief goede zuivering van de cytopathische structuren aan. Het bleek, dat de samenhang tussen vesiculaire membranen en amorf elektronen-dicht materiaal niet verloren ging en ook in brokstukken van cytopathische structuren gehandhaafd bleef. Autoradiografie aan het gedurende 2 uur gelabelde materiaal maakte aannemelijk, dat het de vesiculaire membranen zijn, waarmee het replicerend RNA van CPMV geassocieerd is. Over de samenstelling en de functie van het amorf elektronen-dicht materiaal is niets bekend. Het ligt nu evenwel voor de hand speciaal dit materiaal te onderzoeken op de aanwezigheid van virus-specifieke eiwitten, die naast de RNA-replicase in de cytopathische structuur zouden kunnen voorkomen.

De cytopathische structuur betrokken bij de RNA-replicatie van CPMV wordt aangetroffen in het cytoplasma en onderscheidt zich daarmee van die bij TYMV, waar de virus RNA-replicatie zich afspeelt aan een celorganel, namelijk de gevesiculeerde buitenmembraan van de chloroplast.

De ontwikkeling van vesiculaire membranen en amorf elektronen-dicht materiaal treedt vroeg na infectie met CPMV op; de cytopathische structuur verschilt daarmee van later in de cel optredende veranderingen als de vorming van tubuli met virusdeeltjes en van kristallijne aggregaten van het virus.

Het inductie-proces en de biogenese van de cytopathische structuur werden niet onderzocht. Mogelijk zal dit bestudeerd kunnen worden in een protoplasten-systeem door gelijktijdig een groot aantal cellen te infecteren en dan de ontwikkeling van de cytopathische structuur elektronen-microscopisch te vervolgen.

Summary

Localization of the RNA replication of cowpea mosaic virus

Chapter 1 describes the aim of this investigation: the localization of the RNA replication of cowpea mosaic virus (CPMV) in the infected cell of the primary leaves of cowpea. Literature on localization of RNA replication of plant viruses is reviewed and properties of CPMV are described.

The material and methods commonly used in this work are described in chapter 2. Methods developed during this study are dealt with in appropriate sections of the other chapters.

The behaviour of purified double-stranded RNA of CPMV by electrophoresis on polyacrylamide gels (PAAGE) is described in chapter 3. The electrophoresis pattern has two peaks (fig. 3). It was shown by molecular hybridization that the slow moving peak contained only double-stranded RNA of B component, while the faster moving peak consisted of double-stranded RNA of B ànd M component (fig. 4 and table 4). The double-stranded RNA after PAAGE was RNase and DNase resistant (fig. 5 and 6 respectively).

Chapters 4 and 5 describe how cell structures from a leaf homogenate are centrifuged on discontinuous sucrose gradients (figs 7 and 11). The distribution of DNA (table 5) among gradient fractions was compared with that of double-stranded RNA (tables 6 and 7). From this it was concluded that nuclei were not involved in the viral RNA replication. Replicating RNA of CPMV was detected in gradient fractions by pulselabel-experiments and PAAGE (figs 10, 12 and 13) (using the properties of the double-stranded RNA as described in chapter 3). Only one special fraction, fraction I of gradient 45/37, contained the majority of this replicating, hybridizable RNA.

Characterization of the double-stranded RNA in gradient fractions by electron microscopy revealed two main lengths, one for M-double-stranded RNA and one for B-double-stranded RNA, of 1.1 μm and 1.8 μm respectively (figs 8 and 9).

Electron microscopy of the infected cell (fig. 14) and of gradient fractions (figs 15, 16 and 17) is dealt with in chapter 6. The infected cell has a cytopathic structure in the cytoplasm near the nucleus. This cytopathic structure is mainly characterized by vesicular membranes embedded in amorphous electron-dense material. The cytopathic structures were not distributed at random among gradient fractions. They were found mainly in fraction I of gradient 45/37, in which no nuclei and only a small amount of the chloroplasts were present (figs 16 and 18). It was this fraction in which most of the replicating RNA of CPMV was shown to be present.

Autoradiography (figs 19 and 20), revealed that the RNA replication of CPMV is associated with the vesicular membranes in the cytopathic structure.

Literatuur

Agrawal, H. O., 1964. Identification of cowpea mosaic virus isolates. Meded. Landb. Hogesch. Wageningen 64(5): 1 – 53.

Allen, T. C., 1972. Subcellular responses of mesophyll cells to wild cucumber mosaic virus. Virology 47: 467 – 474.

Arnott, S., M. H. F. Wilkins, W. Fuller & R. Langridge, 1967. Molecular and crystal structures of double-helical RNA. III. An 11-fold molecular model and comparison of the agreement between the observed and calculated three-dimensional diffraction data for 10- and 11-fold models. J. molec. Biol. 27: 535 – 548.

Betto, E., M. Bassi, M. A. Favali & G. G. Conti, 1972. An electron microscopic and autoradiographic study of tobacco leaves infected with the U 5 strain of tobacco mosaic virus. Phytopath. Z. 75: 193 – 201.

Bishop, J. M. & L. Levintow, 1971. Replicative forms of viral RNA. Structure and function. Prog. med. Virol. 13: 1 – 82 (Karger, Basel).

Bové, J. M., 1966. Forme replicative du RNA du virus de la mosaïque jaune du navet: synthèse asymétrique in vitro. Bull. Soc. fr. Physiol. vég. 12: 307–324.

Bové, J. M., 1967. Thèse de doctorat d'état ès sciences naturelles, présentée à la Faculté des Sciences de Paris, No. d'enregistrement au CNRS AO 1289.

Bové, J. M. & D. Laflèche, 1972. The plastidial outer-membrane as the site of turnip yellow mosaic virus RNA replication. In: Proc. 2nd int. Congr. Virol., Budapest 1971. Ed. J. L. Melnick (Karger, Basel). 223 – 225.

Bradley, D. W. & M. Zaitlin, 1971. Replication of tobacco mosaic virus. II. The in vitro synthesis of high molecular weight virus-specific RNAs. Virology 45: 192 – 199.

Bruening, G., 1969. The inheritance of top component formation in cowpea mosaic virus. Virology 37: 577 – 584.

Bruening, G. & H. O. Agrawal, 1967. Infectivity of a mixture of cowpea mosaic virus nucleoprotein components. Virology 32: 306 – 320.

Bruno, G. A. & J. E. Christian, 1961. Determination of Carbon-14 in aqueous bicarbonate solutions by liquid scintillation counting techniques. Application to biological fluids. Analyt. Chem. 33: 1216 – 1217.

Burton, K., 1956. A study of the conditions and mechanism of the diphenyl amine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62: 315 – 323.

Carroll, T. W., 1970. Relation of barley stripe mosaic virus to plastids. Virology 42: 1015 – 1022.

Crowther, R. A., J. L. M. C. Geelen & J. E. Mellema, 1973. A three-dimensional image reconstruction of cowpea mosaic virus. Virology, in druk.

Dunnebacke, T. H. & A. K. Kleinschmidt, 1967. Ribonucleic acid from Reovirus as seen in protein monolayers by electron microscopy. Z. Naturf. 22b: 159 – 164.

Esau, K. & L. L. Hoefert, 1971a. Cytology of beet yellows virus infection in *Tetragonia*. I. Parenchyma cells in infected leaf. Protoplasma 72: 255 – 273.

Esau, K. & L. L. Hoefert, 1971b. Cytology of beet yellows virus infection in *Tetragonia*. II. Vascular elements in infected leaf. Protoplasma 72: 459 – 476.

Esau, K. & L. L. Hoefert, 1971c. Cytology of beet yellows virus infection in *Tetragonia*. III. Conformations of virus in infected cells. Protoplasma 73: 51 – 65.

Esau, K. & L. L. Hoefert, 1972. Development of infection with beet western yellows virus in the sugarbeet. Virology 48: 724 – 738.

Geelen, J. L. M. C., 1973. Structuur en eigenschappen van cowpea-mozaïek virus. Proefschrift, Wageningen.

Geelen, J. L. M. C., A. van Kammen & B. J. M. Verduin, 1972. Structure of the capsid of cowpea mosaic virus. The chemical subunit: molecular weight and number of subunits per particle. Virology 49: 205 – 213.

Gerola, F. M., M. Bassi & M. A. Favali, 1972. Observations on the sites of virus synthesis in plant cells. In: Proc. 2nd int. Congr. Virol., Budapest 1971. Ed. J. L. Melnick (Karger, Basel). 225 – 226.

Griensven, L. J. L. D. van, 1970. De zuivering en de eigenschappen van de replicatieve vorm van het RNA van cowpea-mozaïekvirus. Proefschrift Wageningen.

Griensven, L. J. L. D. van & A. van Kammen, 1969. The isolation of ribonuclease-resistant RNA induced by cowpea mosaic virus: Evidence for two double-stranded RNA components. J. gen. Virol. 4: 423 – 428.

Griensven, L. J. L. D. van, A. van Kammen & G. Rezelman, 1973. Characterization of the double-stranded RNA isolated from cowpea mosaic virus-infected *Vigna* leaves. J. gen. Virol. 18: 359 – 367.

Hadidi, A. & H. Fraenkel-Conrat, 1973. Characterization and specificity of soluble RNA polymerase of brome mosaic virus. Virology 52: 363 – 372.

Hariharasubramanian, V., A. Hadidi, B. Singer & H. Fraenkel-Conrat, 1973. Possible identification of a protein in brome mosaic virus infected barley as a component of viral RNA polymerase. Virology 54: 190 – 198.

Hatta, T., S. Bullivant & R. E. F. Matthews, 1973. Fine structure of vesicles induced in chloroplasts of chinese cabbage leaves by infection with turnip yellow mosaic virus. J. gen. Virol. 20: 37 – 50.

Hatta, T., T. Nakamoto, Y. Takagi & R. Ushiyama, 1971. Cytological abnormalities of mitochondria induced by infection with cucumber green mottle mosaic virus. Virology 45: 292 – 297.

Hibi, T. & K. Yora, 1972. Electron microscopy of tobacco mosaic virus infection in tobacco mesophyll protoplasts. Ann. phytopath. Soc. Japan 38: 350 – 356.

Jackson, A. O., D. M. Mitchell & A. Siegel, 1971. Replication of tobacco mosaic virus. I. Isolation and characterization of double-stranded forms of ribonucleic acid. Virology 45: 182 – 191.

Jackson, A. O., M. Zaitlin, A. Siegel & R. I. B. Francki, 1972. Replication of tobacco mosaic virus. III. Viral RNA metabolism in separated leaf cells. Virology 48: 655 - 665.

Jacquemin, J. M., 1972. In vitro product of an RNA polymerase induced in broadbean by infection with broadbean mottle virus. Virology 49: 379 – 384.

Jager, C. P. de, 1971. Genetical investigations on a multi-component virus. Proc. 7th Conf. Czechoslovak Plant Virol. High-Tatras.

Jager, C. P. de & A. van Kammen, 1970. The relationship between the components of cowpea mosaic virus. III. Location of genetic information for two biological functions in the middle component of CPMV. Virology 41: 281 – 287.

Jaspars, E. M. J. & A. van Kammen, 1972. Analysis of the genome constitution of cowpea mosaic and alfalfa mosaic viruses. FEBS proceedings of the eighth meeting, Amsterdam, August 1972. Volume 27: 121 – 141. (North Holland Publishing Company, Amsterdam-London).

Jones, A. T., A. M. Kinninmonth & I. M. Roberts, 1973. Ultrastructural changes in differentiated leaf cells infected with cherry leaf roll virus. J. gen. Virol. 18: 61 – 64.

Kammen, A. van, 1967. Purification and properties of the components of cowpea mosaic virus. Virology 31: 633 – 642.

Kammen, A. van, 1968. The relationship between the components of cowpea mosaic virus. I. Two ribonucleoprotein particles necessary for the infectivity of CPMV. Virology 34: 312 – 318.

Kammen, A. van, 1971a. Cowpea mosaic virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No 47.

Kammen, A. van, 1971b. Cowpea mosaic virus, un virus au génome divisé. Physiol. vég. 9(4): 479 – 485.

Kammen, A. van, 1972. Plant viruses with a divided genome. A. Rev. Phytopathol. 10: 125 – 150.

Kammen, A. van & L. J. L. D. van Griensven, 1970. The relationship between the components of cowpea mosaic virus. II. Further characterization of the nucleoproteincomponents of CPMV. Virology 41: 274 – 280.

Kammen, A. van & G. Rezelman, 1972. Comparison of the ribonucleotide sequences of nucleic acids of cowpea mosaic virus. In: Proc. 2nd int. Congr. Virol., Budapest 1971. Ed. J. L. Melnick (Karger, Basel). 235 – 236.

Kim, K. S. & J. P. Fulton, 1969. Electron microscopy of pokeweed leaf cells infected with pokeweed mosaic virus. Virology 37: 297 – 308.

Kim, K. S. & J. P. Fulton, 1972. Fine structure of plant cells infected with bean pod mottle virus. Virology 49: 112 – 121.

Klein, A. & M. E. Reichmann, 1970. Isolation and characterization of two species of double-stranded RNA from tobacco leaves infected with tobacco necrosis and satellite tobacco necrosis viruses. Virology 42: 269 – 272.

Klug, A. & D. L. D. Caspar, 1960. The structure of small viruses. Adv. Virus Res. 7: 225 – 325.

Kummert, J. & J. Semal, 1972. Properties of single-stranded RNA synthesized by a crude RNA polymerase fraction from barley leaves infected with brome mosaic virus. J. gen. Virol. 16: 11 – 20.

Laflèche, D., C. Bové, G. Dupont, C. Mouches, T. Astier, M. Garnier & J. M. Bové, 1972. Site of viral RNA replication in the cells of higher plants: TYMV-RNA synthesis on the chloroplast outer-membrane system. FEBS proceedings of the eighth meeting. Amsterdam, August 1972. Volume 27: 43 – 71. (North Holland Publishing Company, Amsterdam-London).

Lane, L. C. & P. Kaesberg, 1971. Multiple genetic components in bromegrass mosaic virus. Nature New Biology 232: 40 – 43.

Loening, U. E. & J. Ingle, 1967. Diversity of RNA components in green plant tissues. Nature (London) 215: 363 – 367.

Martelli, G. P. & M. A. Castellano, 1969. The relation of pelargonium leaf curl virus to the nuclei of host cells. Virology 39: 610 – 613.

Matthews, R. E. F., 1970. Disease symptoms. In: Plant Virology (R. E. F. Matthews, ed.), New York. 256 – 302.

May, J. T. & R. H. Symons, 1971. Specificity of the cucumber mosaic virus-induced RNA polymerase for RNA and polynucleotide templates. Virology 44: 517 – 526.

May, J. T., J. M. Gilliland & R. H. Symons, 1969. Plant virus-induced RNA polymerase: properties of the enzyme partly purified from cucumber cotyledones infected with cucumber mosaic virus. Virology 39: 54 – 65.

May, J. T., J. M. Gilliland & R. H. Symons, 1970. Properties of a plant virus-induced RNA polymerase in particulate fractions of cucumbers infected with cucumber mosaic virus. Virology 41: 653 – 664.

Minson, A. C. & G. Darby, 1973. A study of sequence homology between tobacco rattle virus ribonucleic acids. J. gen. Virol. 19: 253 – 262.

Niblett, C. L. & J. S. Semancik, 1969. Conversion of the electrophoretic forms of cowpea mosaic virus in vivo and in vitro. Virology 38: 685 – 693.

Nicolaieff, A., A. M. Koenig-Nikes, L. Pinck & L. Hirth, 1970. Electron microscopy of the replicative RNA from tobacco mosaic virus and alfalfa mosaic virus: morphology and association of the double-stranded RNA. Virology 41: 688 – 700.

Palade, G. E., 1952. A study of fixation for electron microscopy. J. exptl. Med. 95: 285 – 298.

Peden, K. W. C., J. T. May & R. H. Symons, 1972. A comparison of two plant virus-induced RNA polymerases. Virology 47: 498 – 501.

Pinck, L. & L. Hirth, 1972. The replicative RNA and the viral RNA synthesis rate in tobacco infected with alfalfa mosaic virus. Virology 49: 413 – 425.

Pring, D. R., 1972. Barley stripe mosaic virus replicative form RNA: preparation and characterization. Virology 48: 22 – 29.

Ralph, R. K. & A. R. Bellamy, 1964. Isolation and purification of undegraded ribonucleic acids.

Biochim. biophys. Acta 87: 9 – 16.
Ralph, R. K. & S. J. Wojcik, 1966. Synthesis of double-stranded viral RNA by cell-free extracts from turnip yellow mosaic virus infected leaves. Biochim. biophys. Acta 119: 347 – 361.
Ralph, R. K. & S. J. Wojcik, 1969. Double-stranded tobacco mosaic virus RNA. Virology 37: 276 – 282.
Ralph, R. K., S. Bullivant & S. J. Wojcik, 1971a. Cytoplasmic membranes, a possible site of tobacco mosaic virus RNA replication. Virology 43: 713 – 716.
Ralph, R. K., S. Bullivant & S. J. Wojcik, 1971b. Evidence for the intracellular site of double-stranded turnip yellow mosaic virus RNA. Virology 44: 473 – 479.
Reijnders, L., P. Sloof, J. Sival & P. Borst, 1973. Gel electrophoresis of RNA under denaturing conditions. Biochim. biophys. Acta, in druk.
Reynolds, E. S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208 – 212.
Romero, J. & J. M. Jacquemin, 1971. Relation between virus-induced RNA polymerase activity and the synthesis of broadbean mottle virus in broadbean. Virology 45: 813 – 815.
Scheer, C. van der & J. Groenewegen, 1971. Structure in cells of *Vigna unguiculata* infected with cowpea mosaic virus. Virology 46: 493 – 497.
Semal, J., 1970. Properties of the product of UTP incorporation by cell-free extracts of leaves infected with bromegrass mosaic virus or with broadbean mottle virus. Virology 40: 244 – 250.
Semal, J. & R. I. Hamilton, 1968. RNA synthesis in cell-free extracts of barley leaves infected with bromegrass mosaic virus. Virology 36: 293 – 302.
Semal, J. & J. Kummert, 1970. Virus-induced RNA polymerase and synthesis of bromegrass mosaic virus in barley. J. gen. Virol. 7: 173 – 176.
Semal, J. & J. Kummert, 1971a. Sequential synthesis of double-stranded RNA by cell-free extracts of barley leaves infected with brome mosaic virus. J. gen. Virol. 10: 79–89.
Semal, J. & J. Kummert, 1971b. In vitro synthesis of a segment of bromegrass mosaic virus ribonucleic acid. J. gen. Virol. 11: 189 – 192.
Smith, S. H. & D. E. Schlegel, 1965. The incorporation of ribonucleic acid precursors in healthy and virus-infected plant cells. Virology 26: 180 – 189.
Spencer, D. & S. G. Wildman, 1964. The incorporation of amino acids into protein by cellfree extracts from tobacco leaves. Biochemistry 3: 954 – 959.
Štefanac, Z. & N. Ljubešić, 1971. Inclusion bodies in cells infected with radish mosaic virus. J. gen. Virol. 13: 51 – 57.
Ushiyama, R. & R. E. F. Matthews, 1970. The significance of chloroplast abnormalities associated with infection by turnip yellow mosaic virus. Virology 42: 293 – 303.
Wolstenholme, D. R. & L. E. Bockstahler, 1967. Electron microscopy of double-stranded RNA induced by turnip yellow mosaic virus and tobacco mosaic virus. Molec. gen. Genetics 100: 349 – 357.
Wu, G. & G. Bruening, 1971. Two proteins from cowpea mosaic virus. Virology 46: 596 – 612.
Zaitlin, M., C. T. Duda & M. A. Petti, 1973. Replication of tobacco mosaic virus. V. Properties of the bound and solubilized replicase. Virology 53: 300 – 311.
Zoeten, G. A. de & G. Gaard, 1969. Distribution and appearance of alfalfa mosaic virus in infected plant cells. Virology 39: 768 – 774.
Zoeten, G. A. de, A.-M. Assink & A. van Kammen, 1974. Association of cowpea mosaic virus induced double-stranded RNA with cytopathic structures in infected cells. Virology, in druk.
Zoeten, G. A. de, G. Gaard & F. B. Diez, 1972. Nuclear vesiculation associated with pea enation mosaic virus-infected plant tissue. Virology 48: 638 – 647.