

病毒学集刊

ACTA VIROLOGICA SINICA

中国科学院武汉病毒研究所编辑

2

科学出版社

病毒学集刊

第 1 卷 第 1 期

1980 年 1 月

1

· · · · ·

病毒学集刊编辑委员会

高尚荫(主编)	王鸣歧	司穉东	田 波	田慕贞
朱既明	吴章琦(常编)	芦文钧	周家炽	庞其方
林放涛	张立人	郭辉玉	谢天恩(副主编)	裘维蕃
蔡宜权	廖延雄			

EDITORIAL BOARD OF ACTA VIROLOGICA SINICA

Gao Shang-yin (Editor-in-Chief) Wang Ming-qi Si Zhi-dong Tian Bo
Tian Mu-zhen Zhu Ji-ming Wu Zhang-qi (Managing Editor) Lu Wen-
jun Zhou Jia-chi Pang Qi-fang Lin Fang-tao Zhang Li-ren Guo Hui-yu
Xie Tian-en (Assistant Editor) Qiu Wei-fan Cai Yi-quan Liao Yan-xiong

病毒学集刊

ACTA VIROLOGICA SINICA
中国科学院武汉病毒研究所编辑

2

*

科学出版社出版

北京朝内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1982年12月第一版 开本: 787×1092 1/16
1982年12月第一次印刷 印张: 9 1/8
印数: 0001—3,000 字数: 199,000

统一书号: 13031·2129

本社书号: 2908·13-9

定价: 1.45 元

科技新书目: 39-38

目 录

专 论

- 对作为人癌中危险因子的病毒的评价..... Rapp Ph. D. (1)
类病毒研究进展和展望..... 田 波 夏远南 (5)

研 究 报 告

- 不同 TMV 株系接种的烟叶组织及其原生质体中病毒的特异的 RNA
..... 吴世宣 姜仲兴 赵淑珍 (17)
用酶标抗体检测植物细胞和原生质体内的烟草花叶病毒.....
..... 邱并生 马德芳 田 波 (25)
TMV 侵染的烟叶中可溶性蛋白质 b₁ 的提纯及其对 TMV-RNA 指导的氨基酸体
外参入的抑制 彭学贤 蔡文启 莽克强 (31)
两种免疫酶法对宫颈癌患者 HSV-2 抗体水平的测定.....
..... 冯玉孙 余 宏 陈 曼 刘汉燕 张江虹 向近敏 (37)
鸭瘟病毒核壳体形态特征的电子显微镜研究..... 丁明孝 翟中和 (43)
棉铃虫核型多角体病毒的超微结构..... 张立人 王学兰 邓海凡 张世敏 (53)
噬菌体 T4 的结构形态..... 何能波 薛汉煌 陈见璋 张云武 苏淑卿 林彩婵 (59)
狂犬病固定毒“北京株”在地鼠肾细胞培养中的适应及其生物学性状的研究.....
..... 林放涛 曾蓉芳 曾繁珍 卢孝曾 戴清赐 李汉阶 梁名奕 褚菊仁 (65)
地鼠肾组织培养灭活狂犬病疫苗试制研究.....
..... 林放涛 曾繁珍 陈迺民 陆隆沫 卢孝曾 戴清赐 朱玉山 (73)
地鼠肾组织培养狂犬病灭活疫苗健康人群接种反应观察和血清抗体测定.....
..... 陆隆沫 曾繁珍 杨启和 林放涛 俞永新 纪元吉 梁名奕 纪少华 (81)
地鼠肾组织培养狂犬病灭活疫苗用于感染后预防接种的效果观察..... 曾繁珍
林放涛 陆隆沫 周傑民 王永璋 阎祥生 宋殿英 梁名奕 纪元吉 (87)
用放射免疫法检测登革病毒抗原的研究..... 张海燕
丘福禧 邵 兰 李桂英 韩春生 刘文雪 罗惠蓉 李雪东 俞永新 (93)
大尺蠖核型多角体病毒的形态及发育.....
..... 谢天恩 兰萍章 王学兰 王录明 刘 军 (101)
用 ELISA 检测菜粉蝶颗粒体病毒 W₁-78 及其在人群血清中的抗体
..... 刘年翠 陆志宇 孙天恩 (109)

简 报

- 流感病毒神经氨酸酶的分离提纯.....
...江西省医学科学研究所生化研究室南昌江西医学院原子能医学教研室南昌 (115)
广州地区斜纹夜蛾颗粒体病的初步观察.....戴冠群 石木标 冼炳才 (119)
噬菌体电子显微镜制片技术的探讨.....
.....何能波 薛汉煌 陈见璋 林彩婢 苏淑卿 余茂效 (125)
小菜蛾球形病毒研究初报.....朱树勋 张立人 赵怀宇 (129)

学 术 交 流

- 水泡性口膜炎病毒的分子生物学及其缺陷型干扰颗粒.....
..... Alice S. Huang Ph. D (131)
斯皮宰曾 (J. Spizizen) 教授关于微生物治虫的报告 吴章琦 梁业楷 (135)
从第五届国际病毒学会议看病毒学发展的某些趋势.....田 波 (139)

ACTA VIROLOGICA SINICA 2nd iss.

CONTENTS

The Assessment of Virus as Risk Factors in Human Cancer.....	Fred Rapp Ph. D. (1)
Advances and Prospects of Viroid Research	Tian Po, Xia Yuan-nan (15)

RESEARCH PAPERS

A Specific Low Molecular Weight RNA in Different TMV Strains-Infected Tobacco Leaves and Its Mesophyll Protoplasts	Wu Shi-xuan, Xi Zhong-xing, Zhao Shu-zhen (23)
The Detection of Tobacco Mosaic Virus in Plant Cell and Protoplast with Enzyme-Labelled Antibodies	Qiu Bing-sheng Ma De-fang, Tian Po (30)
The Purification of the Soluble Protein b ₁ from Virus-Infected Tobacco Plants and Its Inhibition on Amino Acid Incorporation Directed by TMV-RNA in Vitro	Peng Xue-xien, Cai Wen-qi, Mang Ke-qiang (36)
Detecting HSV-2 Antibody Level of Cervical Cancer Patients by Two Methods of Enzyme-Immuno-Assay	Feng Jue-sun, Yu Hung, Chen Man, Liu Han-yan, Zhang Jiang-hong, Xiang Jin-min (42)
Electron Microscopic Studies on Morphological Characteristics of Nucleocapsids of Duck Plague Virus	Ding Ming-xiao, Zhai Zhong-he (51)
The Ultrastructure of Nuclear Polyhedrosis Virus of <i>Heliothis armigera</i>	Zhang Li-ren, Wang Xue-lan, Deng Hai-fan, Zhang Shi-min (57)
The Structure of Phage T4	He Neng-bo, Xue Han-huang, Chen Jian-zhang, Zhang Yun-wu, Su Shu-qing, Lin Cai-chan (64)
A Study on the Adaptation of Beijing Strain of Fixed Rabies Virus to Multiplication in Primary Hamster Kidney Cell (PHKC) and Biological Characteristics of the Adapted Virus	Lin Fang-tao, Zeng Rong-fan, Zeng Fan-zhen, Lu Xiao-zeng, Dai Qing-ci, Li Hang-jie Liang Ming-yi, Chu Ju-ren, (72)
Study on the Production of Inactivated Hamster Kidney Tissue Cultures Rabies Vaccine for Human Use	Lin Fang-tao, Zen Fan-zhen, Chen Nai-min, Lu Long-mu, Lu Xiao-zeng Dai Qing-ci, Zhu Yu-shan (80)
Clinical Reaction and Antibody Response of Human Beings Vaccinated with Inactivated Hamster Kidney Cell Rabies Vaccine	Lu Long-mu, Zeng Fan-zhen, Yang Chi-huo, Lin Fang-tao, Yu Yong-xin, Ji Yuan-ji Liang Ming-yi, Ji Shao-hua (85)
Observation on the Postexposure Use of Inactivated Hamster Kidney Cell Rabies	

- Vaccine
 Zeng Fan-zhen, Lin Fang-tao, Lu Long-mu, Zhou Jie-min, Wang
 Yong-zhang, Yan Xiang-sheng Song Dian-ying, Liang Ming-yi, Ji Yuan-ji (92)
 Studies on the Rapid Detection of Dengue Virus Antigen by Radioimmunoassay
 ...Zhang Hao-yan, Qiu Fu-xi, (Ch'iu Fu-hsi), Shao Lan, Li Gui-ying, Han
 Chun-sheng, Liu Wen-xue, Luo Hui-rong, Li Xue-dong, Yu Yong-xin (98)
 Morphologic Appearance and Development of *Buzura suppressaria* Nuclear Polyhe-
 drosis Virus
 ... Xie Tia-nen, Lan Pin-zhang, Wang Xue-lan, Wang Lu-ming, Liu Jun (108)
 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Detection of *Pieris rapae*
 granulosus virus Specific Antibodies in Human Sera
 Liu Nien-cui, Lu Zhi-yu, Sun Tian-en (114)

SHORT COMMUNICATIONS

- Separation and Purification of Neuraminidase of Influenza Virus
 Section of Biochemistry of Jiangxi Institute of Medical Sciences and
 Department of Atomic Medicine of Jiangxi Medical College, Nanchang (115)
 Preliminary Observation on the Granulosis Virus of the Noctuid Moth *Prodenia*
litura F. in Guangzhou Region
 Dai Guan-qun, Shi Mu-biao, Xian Bing-cai (119)
 Studies on the Preparation of Specimen of Bacteriophages for Electron Microscopic
 Observation He Neng-bo,
 Xue Han-huang, Chen Jian-zhang, Lin Cai-chan, Su Shu-qing, Yu Mao-xiao (125)
 Preliminary Observation on the Spherical Virus of *Plutella xylostella*
 Zhu Su-xun, Zhang Li-ren, Zhao Huaiyu (129)

ACADEMIC EXCHANGE

- The Molecular Biology of Vesicular Stomatitis Virus and Its Defective Interfering
 Particles Alice S. Huang, Ph. D. (131)
 A Lecture about the Microbial Control of Insects by Professor J. Spizizen
 Wu Zhang-qi LiangYe-Kai (135)
 Some Trends in Virology—A short Introduction of the Fifth International
 Congress of Virology Tien po (138)

对作为人癌中危险因子的病毒的评价

Fred. Rapp. Ph. D.

(美国宾夕法尼亚州立大学医学院微生物学系及癌症研究中心)

THE ASSESSMENT OF VIRUS AS RISK FACTORS IN HUMAN CANCER

Fred Rapp Ph. D.

(*Department of Microbiology and Specialized Cancer Research Center the Pennsylvania
State University College of Medicine Hershey, Pennsylvania 17033, U. S. A.*)

各种病毒与人癌的联系,部分是根据 Rous, Marek, Shope, Lucké 和 Gross 早期研究,在这些研究中,曾发现鸡、兔、蛙和小鼠感染病毒后自然发生肿瘤。Lucké 于 1938 年首先证实一种疱疹病毒与蛙肾腺瘤有联系。马立克氏病是一种小鸡淋巴增生性疾病,其致病因子已确定为一种疱疹病毒。此外,豚鼠、兔和牛的淋巴瘤也与疱疹病毒有关,并且有两种在它们的天然宿主——松鼠和蜘蛛猴中非致癌性的疱疹病毒却能在猿上产生恶性淋巴瘤。这些研究推动了对乙型肝炎病毒、EB 病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、几种逆转录病毒和 BK 与 JC 乳多空病毒,以及它们在诱发人癌中的作用的更为新近的研究。

与特定癌的病因学最有关系的人病毒,是乙型肝炎病毒,它引起的慢性肝脏感染常常发展为肝癌。还有一种人疱疹病毒,EB 病毒,它在 Burkitt 淋巴瘤的发生中所起的作用是公认的,并与鼻咽癌有关。目前尚未认识但怀疑与其它类型人癌有关的是两种其它人疱疹病毒——巨细胞病毒,它与前列腺癌,其次与宫颈癌有关,还有单纯疱疹病毒 II 型,它与宫颈癌的发生关系非常密切。将这两种人疱疹病毒与人瘤形成联系起来的体内和体外研究正在世界各地的实验室中进行,并包括使用流行病学、血清学、免疫学、分子生物学和生物学的技术。已经叙述了逆转录病毒组(即具有逆转录酶的 RNA 病毒)的成员与某些类型人白血病有联系,但是很少有令人信服的资料能证明逆转录病毒参与人白血病或淋巴瘤的发展。然而,由很多种动物所得的实验证据却又不容许在进一步广泛进行研究前排除这种可能性。

由于在最初感染后疱疹病毒组的成员在宿主的某些组织中终身潜伏存在,因而是致癌的卓越候选者。已知它们在重新激活后会随时引起急性发作。特别重要的部分是,宿主的基因组和辅助因素如激素、化学致癌物质、和免疫缺陷在病毒致癌中可能起作用。在这样的环境下,病毒基因组的部分或全部可能整合到宿主细胞染色体而导致细胞恶性改变。

宫 颈 癌

几年来,曾把很多病因与宫颈癌联系起来。对于性传染病在癌病因学中可能起的作用进行了大量的详尽研究。此外,包皮垢被怀疑为不受割礼的丈夫使妇女发展宫颈癌的原因;更为新近的流行病学研究不能证实未进行包皮环割术与宫颈癌的发展有任何联系。

通过使用巴氏(Papanicolaou)染色技术对宫颈涂片中非典型增生细胞进行细胞学检查,首次推测疱疹病毒 II 型与宫颈癌有联系。巴氏涂片法之所以能检测出疱疹性宫颈感染是因为疱疹病毒引起特有的细胞改变。后来,血清流行病学的研究证明患宫颈癌妇女比对照有较高的单纯疱疹病毒 II 型抗体,从而把这种病毒与宫颈癌联系起来了。

单纯疱疹病毒和巨细胞病毒在女性生殖道的存在已得到很好地证明,并已从正常女性生殖器及宫颈癌活组织检查中分离出这两种病毒。在宫颈癌细胞中还发现了单纯疱疹病毒抗原以及通过分子杂交技术研究在人宫颈肿瘤细胞中检测出单纯疱疹病毒 DNA 片段。非常有希望的是最近的实验应用原位杂交法用病毒互补 DNA 在宫颈肿瘤细胞中检测出单纯疱疹病毒 DNA。证实这一工作对于加强把单纯疱疹病毒作为宫颈癌致病因子的证据将是非常重要的。

前 列 腺 癌

前列腺癌是美国黑人(43000)中第二位最常见类型的癌,并且在美国白人(26000)癌症中占第四位。这些数字是根据 1973—1976 年国家癌症研究所公布的统计材料,在美国前列腺癌的死亡率非常高,这种病目前是各年龄组中第三种最常见的癌。估计在 1979 年前列腺癌死亡人数是 21000,1979 年新的前列腺癌患者的估计数是 64000。美国黑人由于前列腺癌造成的死亡率是惊人的。然而,没有资料将前列腺癌与性病、社会等级、环境因素或种族牢固地联系起来。在美国多数黑人生活在城市的事实可以说明黑人比白人前列腺癌发病率较高的原因,因为所有类型的癌症在城市居民中都有较高发病率。生活方式、饮食、吸烟及缺乏医疗可能也对城市居民的较高癌症率起作用。

将病毒与前列腺联系起来已有几年了。从男性泌尿生殖道的器官和分泌物中曾分离出单纯疱疹病毒,但是有更多的证据可能将巨细胞病毒与前列腺癌联系起来。在患过巨细胞病毒单核细胞增多症而痊愈的男性生殖道中已确定有正在复制的巨细胞病毒。在精液中高效价的巨细胞病毒持续存在一年以上,尽管宿主无症状。在有循环抗体的存在下,巨细胞病毒在精液中的持续存在提示:巨细胞病毒可能逃避生殖道免疫机制的防御。通过直接的分子杂交方法还把巨细胞病毒与结肠癌联系起来了。

伯 基 特 淋 巴 瘤

EB病毒暂时确定为 Burkitt 淋巴瘤的病因,而疟疾在此瘤的发展中则是主要的辅助因子。最近在乌干达进行的前瞻性血清流行病学研究结果强烈地提示在 EB 病毒与 Burkitt

淋巴瘤之间存在着因果关系,因为所有患这种病的儿童先前在幼年都感染过这种病毒,并在肿瘤发展前有对 EB 病毒的显著高抗体效价。复发的疟疾看来是主要的启动子,因为它显著地改变了感染 EB 病毒儿童的免疫系统。当疟疾不存在时,在高 EB 病毒感染区域中 Burkitt 淋巴瘤是不常见的。这种病毒满足了 Henle-Koch 所提条件的全部要求。而且,最近的研究证实了在 Burkitt 肿瘤组织中存在 EB 病毒 RNA,从而支持了病毒 DNA 在肿瘤细胞中转录和翻译的假说。此外,染色体 8 的一片断移位至染色体 14 上可代表这种病的重要生物学标记。在美国描述过一种 X-连锁遗传综合症,它预示对 EB 病毒异常的敏感性,因而会产生致命的传染性单核白细胞增多症和高频率的 B 细胞肿瘤。

鼻 咽 癌

正如人们所知,鼻咽癌,一种鼻咽的疾病,是在新加坡和中国南方的中国人群中流行的。对这些人群中的鼻咽癌的全部研究都证实在肿瘤中存在 EB 病毒的遗传信息。已提出了辅助因子的作用(类似于伯基特淋巴瘤中 EB 病毒与疟疾的相互作用),并且有证据表明某些组织相溶性抗原的存在对于诱发鼻咽癌可能是必须的。在炭火上烹调食物的作法可能也起一份作用。EB 病毒的发病机制及其与鼻咽癌的关系都还不清楚。目前,对与病毒相关的抗原的免疫反应可以用作诊断和/或预后的指示物。

肝 癌

乙型肝炎病毒感染与肝癌通过血清流行病学证据已明确地联系起来了。活动性乙型肝炎感染的标记物,特别是表面抗原和抗表面抗原的抗体,在具有原发性肝癌的病人中比对照或一般人群占优势已得到了证明。还有明显的母系影响。但是,正如在 EB 病毒和 Burkitt 淋巴瘤的情况中一样,担当启动子的重要辅助因素看来起着主要的作用。这种病毒在肝癌的发展中似乎是发动因素,但促进剂如黄曲霉素、乙醇和其它肝毒素可能是重要的辅助因素。排除这些辅助因素是预防这种肿瘤的现实方法,但是发展和使用一种抗乙型肝炎病毒的安全疫苗能同时防止其它一些由乙型肝炎病毒引起的急性和慢性疾病。

对于乙型肝炎病毒在肝癌发展中起什么作用有几种解释:

1. 肝癌患者可能对急性乙型肝炎病毒感染和持续携带状态的发展是高度敏感的。但是,在肝癌高发区,乙型肝炎病毒感染继之以获得持续携带状态最经常地发生于婴儿和儿童中。因此,看来持续存在的乙型肝炎病毒感染发生在慢性肝病开始之前。
2. 慢性乙型肝炎病毒感染产生出坏死后肝硬变,而肝癌可能是由再生结节,通过非病毒机制而发生的。
3. 乙型肝炎病毒可能在持续感染的肝细胞中担当致癌物或辅致癌物。其它辅致癌物的影响,诸如遗传的、激素的、免疫学的和环境的因素可能对诱发肝癌都是必需的。如果持续的乙型肝炎病毒感染在肝癌中是一种重要的致癌因子,预防童年的乙型肝炎病毒感染应能减少该肿瘤的发生率。

一 般 讨 论

按照人群的数目来评价肿瘤疾病的特殊危险如果不是不可能的,也是困难的。这种说法的理由如下:

1. 大多数个体从一生的早期就暴露于很多这些病毒中,从而形成阳性病例的本底高,从而使流行病学研究得不出结论。

2. 很多与病毒相联系的癌是区域性集中的(如 Burkitt 淋巴瘤),这提示辅助因素在病因学中起作用。

3. 由这些病毒所致的感染经常是无症状的,并且没有报告给公共卫生当局。因此,活动性病例的数目(如性病)仅能加以估计。

使事情进一步复杂的是,可能和其它肿瘤一样,多重病因可能对病毒相关的肿瘤起作用。尽管有这些限制,看来假设这些病毒在 Burkitt 淋巴瘤、鼻咽癌和肝癌的发展中代表一种因素是合情合理的。但是,看来 EB 病毒与 Burkitt 淋巴瘤和鼻咽癌相关而乙型肝炎病毒与肝癌有联系主要适用于地方性流行病区。虽然较不确定,但看来疱疹病毒也与男性和女性泌尿生殖系统的癌症有关。曾经列举过人癌病毒候选者的一些共同的特色。如果单纯疱疹病毒的牵连能够得到证实,在美国宫颈癌或阴茎癌发生的危险对那些因疱疹病毒而患活动性性病的人来说是七十分之一到百分之一,这个估计是根据美国每年在约 14000000 个因疱疹病毒而患性病的病例中(假定男的和女的是相等的)新发生的泌尿生殖道癌症的病例数目(10000 例女的和 70000 例男的)。

最后,使病毒和癌症有关的一系列证据应包括免疫学的、病毒学的和实验的观察(表 11)。对于今天讨论的病毒,在所有三个领域中都有某些证据,但是没有很好地研究到足以确证它是特定人癌的单一致病因子。今后几年应产生证实这点所需要的报道,并应导致更好地控制和处理这些严重的疾病。

参 考 文 献

- [1] Blumberg, B. S., 1977, *Science* 197: 17—25.
- [2] de Thé, G., Geser, A., Day, N. E., Tukei, P. M., Williams, E. H., Beri, D. P., Smith, P. G., Dean, A. G., Bornkamm, G. W., Feorino, P. and Henle, W., 1978. *Nature* 274: 756—761.
- [3] Laychock, A. M., Geder, L., Sanford, E. J. and Rapp, F. 1978. *Cancer* 42: 1766—1771.
- [4] Melnick, J. L., Dreesman, G. R. and Hollinger, F. B., 1977. *Scientific American* 237: 44—52.
- [5] Pagano, J. S. and Okasinski, G. F., 1978. in "Oncogenesis and Herpesviruses," (G. de The, W. Henle, F. Rapp, Eds.), p. 687, international Agency For Research on Cancer, Lyon, France.

(王静怡译 朱既明, 刘年翠校)

类病毒研究进展和展望

田 波 夏远南

(中国科学院微生物研究所, 北京)

提 要

本文综述了十年来类病毒研究进展和我国类病毒的初步调查。包括下列专题: (1) 类病毒的发现; (2) 动物类病毒存在的可能性; (3) 类病毒的分子结构; (4) 复制和致病机制; (5) 类病毒的起源; (6) 研究展望。

类病毒的发现在生物学上是一个重要事件。它不仅揭示了一类病害的病原本质, 而且开拓了研究生命物质的新领域^[1-3]。研究类病毒的独特性质以及这种低分子侵染性核酸和真核细胞基因组的相互作用方式, 必将有助于阐明生命活动的分子机制。具有生物基本特征小分子核酸的研究, 可能对生命起源提供新的资料。病毒学家和病理学家则更关心类病毒病的普遍性, 许多未知病原的人的疑难疾病是否与类病毒有关^[4]。只有短短十年历史的类病毒研究已经取得很大成就, 正在酝酿着新突破。本文将概述其进展, 并展望其未来。

一、类病毒的发现

从 1967—1971 年美国植物病毒学家 Diener 等在试图分离马铃薯纺锤形块茎病——多年来被认为是病毒病——的病毒时, 发现其病原不是病毒, 而是一种不具有蛋白质的、分子量为 10^5 左右的 RNA。这样小的基因组不足以编码任何蛋白质。根据其特殊的性质, Diener 把这类致病因子称为“类病毒”^[5-6]。关于马铃薯纺锤形块茎类病毒 (PSTV) 的这一发现很快得到其他实验室的证实, 并陆续发现柑橘裂皮病^[7]、菊花矮缩病^[8]、黄瓜白果病^[9]、菊花褪绿斑驳病^[10]、酒花矮化病^[11]属于类病毒病, 椰子死亡病^[12]和鸚梨日斑病^[13, 14]的病原也可能是类病毒(表 1)。其证实的方法是: (1) 病原物不为超速离心所沉淀, 说明其分子量低和沉降系数小(已报道的类病毒的沉降系数为 6—15S); (2) 用酚和有机溶剂处理不降低病毒的侵染性, 说明不含有蛋白和酯类; (3) 用 RNase 或 DNase 处理后丧失侵染性, 证明为一单链核酸, 但没有理由排除有双链核酸类病毒的可能性; (4) 抽提的核酸能进入较高浓度的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分子量为 1×10^5 左右; (5) 此低分子量 RNA 经人工接种后可产生典型的病状^[15]。从椰子死亡病和鸚梨日斑病中分离的核酸尚未接种成功。

表 1 已发现的植物类病毒的种类

类 病 毒	作为病毒病的 最初报告者	最初证实为类 病毒的报告者	分子量(道尔顿)	传染方式	地理分布
马铃薯纺锤形块茎类病毒 Potato Spindle Tuber Viroid (PSTV)	Martin (1922)	Diener 等 (1967—1971)	$8-9 \times 10^4$ 1.25×10^5	汁液、种子、 昆虫	美国、加拿大、苏 联、南非(阿扎尼 亚)、中国
柑橘裂皮类病毒 Citrus Exocortis Viroid (CEV)	Fawcett等 (1948)	Semancik 等 (1968)	$5-6 \times 10^4$ 1.25×10^5	汁液	世界各国
菊花矮缩类病毒 Chrysanthemum Stunt Viroid (CSV)	Dimoch (1947)	Diener 等 (1973)	4.8×10^4	汁液	美国、英国、荷 兰、加拿大、中国
黄瓜白果类病毒 Cucumber Pale Fruit Viroid (CPFV)	—	Van Dorst 等 (1974)	1.1×10^5	汁液	荷兰
菊花褪绿斑驳类病毒 Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid (CCMV)	Dimock 等 (1971)	Romaine 等 (1975)	沉降常数 6—14S	汁液	美国
椰子死亡类病毒 Coconut Cadang-Cadang Disease	—	Randles (1975)	8.4×10^4	侵染性待测定	菲律宾
洒花矮化类病毒 Hop Stunt Viroid (HSV)	Yamamoto (1970)	Sasaki 等 (1977)	6—9S	汁液	日本
鸭梨日斑病类病毒 Avocado Sunblotch disease Viroid (ASBV)	Ho-ne 等 (1931)	Dale 和 Thomas 等 (1979)	小于 CSV	侵染性待测定	美国、澳大利亚

上述类病毒中的一些成员如 PSTV, CEV, CSV 等在我国也有不同程度危害^[16]。对 PSTV 和 CSV 进行了类病毒分离,生物学和生化鉴定,证实为强的类病毒株系^[17,18]。

二、动物类病毒存在的可能性

到目前为止,类病毒只存在于高等植物中,并且由 RNA 构成。类病毒发现后,人们就推测它在人和动物中存在的可能性,并怀疑造成持续性感染的、4 个病因不明的中枢神经系统的疾病:羊痒疫(Scrapie)、人的 C-J 病(Creutzfeldt-Jakob)和振颤病(Kuru)以及传染性水貂脑病可能是由类病毒引起的。这类疾病都具有传染性质,潜伏期长,病原体极小,在电镜下找到病毒粒子等性质,与植物中已发现的类病毒有相似之处^[19]。

对羊痒疫因子进行的一系列研究已经证实,这种致病因子具有一种为其侵染性必不可少的 DNA 组分。在凝胶电泳的低分子核酸区域形成一个确定的带,用 DNase 处理可破坏 90% 以上的侵染性,对 RNase 和蛋白酶处理显示抗性,该侵染性 DNA 分子量为 7—10 万。这些试验证实了羊痒疫因子是一种低分子游离侵染性 DNA。因此,有理由认为它是动物上发现的第一个类病毒^[20]。目前几个研究小组正在努力重复上述实验,以期最终肯定或否定上述羊痒疫因子是类病毒的结论^[21]。

寻找动物类病毒的研究还可能揭示出类病毒、慢病毒和内源性病毒之间的联系。现在有不少资料证明病毒基因存在于多种动物的正常细胞中,在一定条件下能产生内源性病毒,在鸡、小鼠、大鼠、地鼠、猫、猪等动物上均已得到证实^[22]。上述三类致病因子都具有某种持续感染的形式,它们在侵染、复制和与寄主基因组相互作用的方式上可能存在着某些相似性。

三、类病毒的分子结构

类病毒所含的信息量不足以编码任何蛋白质,却能引起严重的病害,成为结构与功能研究的一个良好的对象,吸引了人们极大的兴趣。从 PSTV 对 RNase 的敏感性、热变性、抗原性和分子宽度等研究得到的相互矛盾的资料,不能确定 PSTV-RNA 是双链还是单链。1976 年, Sanger 和 Gross 等人^[23]根据电镜观察,末端分析,超速离心和热变性研究所获得的大量证据,第一次提出类病毒是具有高度碱基配对的棒形的单链闭合环状 RNA 分子。两年以后,他和 Henco 根据热力学研究结果提出类病毒的一种共同的可能二级结构模型:由一系列双螺旋分段和交替出现的内环组成的伸长的棒状结构^[24-26]。同年 5 月, Sanger 和 Gross 等人发表了 PSTV 的全部核苷酸序列和二级结构模型,基本上弄清了 PSTV 的结构^[27,28]。其证据是:

1. 关于分子形状的物理学证据

(1) 流体动力学形状:根据斯托克定律^[29],在一定介质中的分子的摩擦系数与分子线度有依赖关系。可从摩擦比 f/f_0 值获得关于类病毒在溶液中形状的知识。根据沉降速度公式和椭球的流体动力学方程,从类病毒的沉降常数、分子量和偏比容计算出其 $f/f_0 = 2.5$,长短轴之比大约为 20。这一值反映了类病毒的高度不对称性,意味着一种高度伸长的结构。已知分子量与类病毒近似的双螺旋 DNA 的 $f/f_0 = 2.9$,长短轴之比约为 25;单链 RNA 的 $f/f_0 = 1.4$ 。比较这些数据表明类病毒更类似短棒状天然 DNA^[29]。

(2) 电镜下分子形状:电镜的直接观察证实了流体动力学的推论。用单分子展层方法对提纯 PSTV 作了研究,发现在 8M 脲中展层的 PSTV 为均一长度的短链分子,平均长度为 0.05 毫微米 (500 Å),与双链 DNA 分子的宽度相当,比单链 RNA 粗^[31]。经甲醛处理的变性 PSTV 有三种形态:短棒形、线形和环形。环形的圆周长为 0.11 ± 0.01 毫微米,线形长为 0.09 ± 0.01 毫微米^[32]。天然 CPFV 也呈棒形和哑铃形,平均长度为 0.035 毫微米,热变性 CPFV 呈从棒形到环形的各种结构^[23]。

2. 关于链性的热力学证据

(1) 融解曲线的特点:五种高度提纯的类病毒(CEV、PSTV、CSV、CPFV、CCMV)的融解曲线的特点是:极狭窄的转变温度范围,半幅在 1—3℃ 之间。证明是包括很多碱基对的高度协同性融解过程,协同性接近 90%。其次是较低的融解温度, T_m 值在 48.5—51℃ 范围。上述特点与 tRNA 的融解显著不同,后者在大于 40℃ 的温度范围内发生完全变性,反映出三叶草结构的不同分叉的融解的大约连续过程。类病毒所显示的这种急剧的融解是迄今已知的任何其他单链天然 RNA 所不具有的^[24,26]。比较了 PSTV 与

水稻矮缩病毒的双链 RNA 的融解曲线,结果后者的变性温度显著地比 PSTV 的高。表明 PSTV 并不具有规则碱基配对结构。

(2) 热变性过程的热力学性质: 核酸的融解过程可看作两种状态的转变过程,即分子由最大数目的碱基配对状态到完全的单链解离状态的转变。从反映这一分子构象改变过程的焓变值 ΔH , 可计算已解离的碱基对数和转变协同性的大小。五种类病毒的热力学参数的测定结果证明热变性是高度协同性过程,不同类病毒表观反应焓的范围是 3140—3770 千焦耳/克分子。其协同性和同源双螺旋 RNA 的一样高,而 T_m 值则低 30℃ 以下。这提示类病毒具有独特的二级结构^[24]。Klump^[25] 用扫描微量热计测量融解过程中 CEV 和 CPFV 的附加热容量的变化,结果与 260 毫微米紫外吸收变化平行,当 $T = T_m$ 时达到最大值。两者的克分子转变焓分别为 4200 千焦耳/克分子和 3930 千焦耳/克分子,表示有序—无序转变过程的总焓值。这一结果与应用紫外吸收从融解研究获得的结果相似(见表 2)。

表 2 由直接量热法和由紫外吸收融解曲线按范德夫作图所测得类病毒的焓变值的比较

类病毒	量 热 法		作 图 法			可能的碱基配对数	协同性
	T_m (°C)	总转变焓 (千焦耳/克分子)	T_m (°C)	表观反应焓 (千焦耳/克分子)	总转变焓 (千焦耳/克分子)		
CPFV	50.5 ± 0.2	3930 ± 150	51 ± 0.2	3470 ± 160	4080	86 ± 4	85%
CEV	53.1 ± 0.2	4200 ± 150	51 ± 0.2	3390 ± 160	3990	84 ± 4	85%

(3) 热变性过程的动力学性质: 应用骤热法对热变性过程的机制的研究证实动力学上三个不同的弛豫过程的存在: 弛豫时间为 1.4 秒的慢变性过程,对应 50—60 个碱基对的“全或无”的打开,对增色效应有重要贡献。弛豫时间为 2.2 毫秒的快变性过程,可能是短的发卡分支存在的标志,对增色效应有较小的贡献。小于 1 微秒的更快的第三个过程,即使加热时间短到 6 微秒,也难以从时间上分辨这一过程,由于单链区的堆集与去堆集平衡 (stacking-destacking equilibrium) 的存在,对增色效应贡献很小。弛豫实验的完全协同性特点也证明高度碱基配对结构的存在^[24]。

3. 环状分子的化学和酶学证据

末端分析是提出类病毒为环状分子的最早依据之一。用高度提纯的 CPFV RNA 进行的末端分析证明 CPFV 没有 5′末端。为了测定 CPFV 的 3′末端,用偏高碘酸氧化- $[^3\text{H}]$ 硼氢化钾还原法处理 CPFV 后作凝胶电泳分析,发现 3′末端不被 ^3H 标记,表明 CPFV 没有游离 3′末端,而且排除了具有 2′, 3′羟基的 5′末端帽子结构存在的可能^[23]。一些植物病毒如 TMV、芜菁黄化叶病毒等象 tRNA 一样,其 3′末端有结合某一种氨基酸的能力,类病毒不具有这种性质,至少证明它不具有 $\text{CCA}_{\text{OH}}3'$ 末端^[33]。

用大肠杆菌 RNase IV (对具有广泛的完全双链区域和高度特异序列的 RNA 有特异断裂作用的一种酶)处理不影响 PSTV 和 CEV 的电泳迁移率和侵染性,说明它们不具有完整的双链结构。类病毒对蛇毒磷酸二酯酶和牛脾磷酸二酯酶也有抗性,提示类病毒或者是具有环状结构或者末端具有掩蔽结构。

4. PSTV-RNA 的序列分析

常用的 ^{32}P 正磷酸营养液培养作体内标记的方法不适用于类病毒,因为类病毒复制速度很低,不能分离到足以进行序列分析的高比放射性的样品。Sänger^[27] 等人采用 RNA 体外标记技术,用高度提纯的类病毒以几种核酸酶进行控制消化,通过 T4 5'-多核苷酸激酶的磷酸化作用,用 $[\text{r}^{32}\text{P}]$ 标记酶解核苷酸片段,经双相层析分离酶解片段,应用 P_1RNase 降解的双相层析法或快速凝胶序列分析法进行寡核苷酸片段序列分析,挑选重迭片段综合整理确定完全序列。他们用几种核酸酶对 PSTV 进行有控制的消化后,分离出几百个长的 PSTV 片段;对其中 165 个片段进行了序列分析;最后挑选出 24 个重迭片段进行综合,确定了 PSTV 全部 359 个核苷酸的序列和它的环形结构。

值得注意的是,与真核细胞体系中的 mRNA 不同, PSTV 和 CEV 的 3' 末端不具有 poly(A) 结构,但 PSTV 的序列中第 48 到 65 位为长达 18 个嘌呤,主要为腺嘌呤的多嘌呤结构。在其它类病毒序列中也已发现这种结构。

PSTV 缺乏常见的 AuG 起始部位,而只有 7 个不常见的 GuG 起始部位和 6 个可能的 uAA 或 uAG 终止部位。

PSTV 没有 5' 末端帽子结构,其序列中无法通过甲基化酶引入一个甲基,这些事实支持 PSTV 缺乏信使能力可能是某种调节分子的看法。

^{125}I 标记 PSTV 和 CEV 经 RNase T_1 或胰 RNase 消化后作指印分析,结果表明两者一级结构之间的差异分别为 13% (RNase T_1 消化产物指印图) 和 10% (胰 RNase 消化产物指印图)。应用该法证明四种类病毒的一级结构各不相同^[34]。

Sänger 等人根据 PSTV 的核苷酸序列测定,综合考虑使这些序列有最大数目的碱基配对以及酶消化断裂点的位置和胞苷酸对亚硫酸氢盐的敏感性,提出 PSTV 的二级结构模型如下(图 1): PSTV 的共价闭合环状分子由两个互补半体组成,各含有 179 个和 180 个核苷酸,长度相等。第 1—179 位序列组成是: AMP50, UMP26, GMP59, CMP44。第

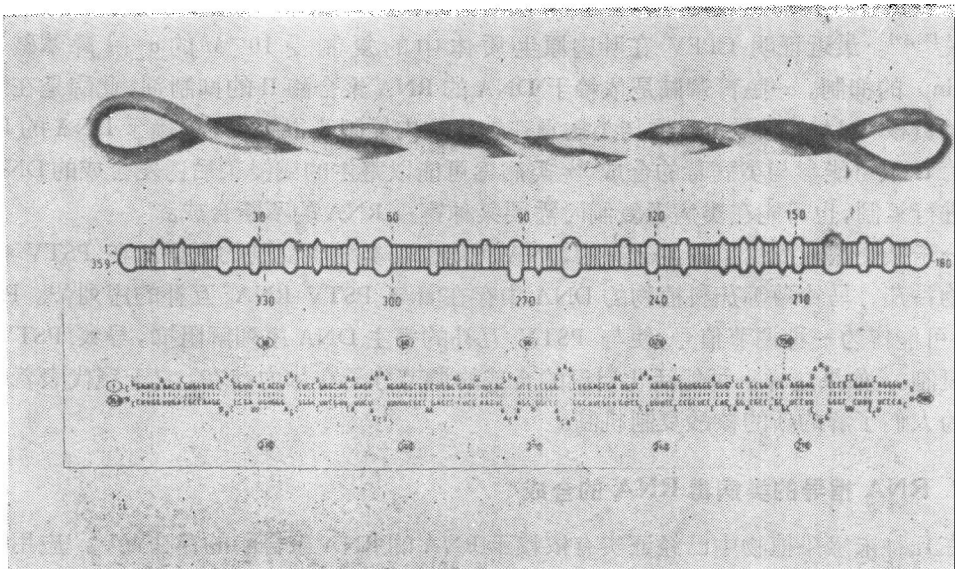


图 1 PSTV 的二级结构模式图(图中数字示核苷酸序列号)

180—359 位序列组成是: AMP23, UMP51, GMP42, CMP64。碱基对数目是 G:C 对 73, A:U 对 38, G:U 对 11。一共 122 个碱基对。整个棒状结构具有 27 个内环,最大的螺旋分段含有 8 个碱基对,最大的内环含有 12 个核苷酸^[27,35]。

5. PSTV 二级结构模型正确性的验证

tRNA 通过其反密码子与单链的互补序列发生特异性结合,这一性质使 tRNA 成为研究核酸空间结构的有用工具。应用几种 tRNA 作为探针与 PSTV 某些内环区的单链互补序列结合,结合常数很高,达到 $10^5 M^{-1}$ 。经超速离心分析,光学特性测定 tRNA · PSTV 复合物,获得如下实验结果: 1 个分子 PSTV 分别与 3 个分子 tRNA^{Lys}、1 个分子 tRNA^{Glu} 结合,不与 tRNA^{Val}、tRNA^{Met} 结合。这与 PSTV 二级结构模型中 8 个 AAA 序列 (tRNA^{Lys} 的反密码子的互补序列) 中 3 个、7 个 GAA 序列 (tRNA^{Glu} 的反密码子的互补序列) 中的 1 个位于内环上,内环区不具有 tRNA^{Val}、tRNA^{Met} 的反密码子互补序列的情况十分吻合,为 PSTV 二级结构模型的正确性提供了证据。由于 tRNA 能与整个 PSTV 分子的内环自由结合,也证明了 PSTV 不具有三级结构折迭^[36]。

四、类病毒的复制和致病性

与某些卫星病毒不同,类病毒的复制是自主的,不依赖于协助病毒的同时感染^[5,37]。由于类病毒 RNA 携带的可为蛋白编码的遗传信息量很小,因此,它主要或完全依赖寄主细胞的酶系进行复制。尚不清楚其复制是由 RNA 还是 DNA 指导的。目前围绕以下几个方面对类病毒复制展开研究。

1. DNA 指导的类病毒 RNA 的合成

许多事实表明,寄主 DNA 以某种还不清楚的方式参与类病毒的复制过程。放线菌素 D 抑制番茄叶片和细胞核中 PSTV 的复制的实验说明寄主 DNA 的转录与 PSTV 的复制有关^[38,39]。最近证明 CPFV 在叶肉原生质体中的复制受 $10^{-8} M$ 的 α -鹅膏蕈碱 (α -amanitin) 的抑制, α -鹅膏蕈碱是依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶 II 的抑制剂,此酶是在细胞核内负责核 RNA 的转录的,这与类病毒在细胞核内复制也很吻合,依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶 II 很可能参与类病毒的合成^[40]。类病毒可能以寄主的或侵染后诱发合成的 DNA 为模板进行复制,也可能在类病毒复制时需要某种寄主 RNA 的不断合成。

分子杂交试验提供了寄主已有的 DNA 可能参与类病毒复制的证据。在 PSTV 的寄主植物番茄、马铃薯等茄科植物的 DNA 中存在着与 PSTV RNA 互补的序列^[41]。PSTV RNA 可能作为一种调节信号,使与 PSTV 互补的寄主 DNA 序列解阻抑,导致 PSTV 本身的复制。如果这样一种能活化自己的合成的调节分子在体内存在,它无疑代表着一种还未为人们了解的新的核酸复制机制。

2. RNA 指导的类病毒 RNA 的合成

在几种未感染植物中已经证实有依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶的存在^[42,43]。应用分子杂交试验在 CEV 和 PSTV 感染组织中发现了与类病毒 RNA 互补的 RNA 序列 (cRNA)^[44]。