

内 容

(一) 植物病毒卫星 RNA 及其应用

目 录

1. 田波, 1985, 亚病毒---病毒学的一个新分支, 病毒学报 1(2): 190-197。
2. 田波, 黄瓜花叶病毒组的卫星 RNA, 197-205。
3. Tien Po, C. Davies, T.Hatta and R.I.B. Francki, 1981, Viroid-like RNA Encapsidated in Lucerne Transient streak virus, FEBS Letters 132(2):353-356
4. 邱并生 田波 丘艳 张秀华, 1985, 植物病毒卫星 RNA 及其在病毒病生物防治上的应用 I. 用加入卫星 RNA 的方法组建成黄瓜花叶病毒的疫苗, 微生物学报 25(1): 87-88
5. Tien P., Zhang X., 1983, Control of two seed-borne virus diseases in China by the use of protective inoculation. Seed Sci. & Technol.11: 1-4
6. 田文会 曹寿先 孙茜 张书萍 张秀华 田波, 1985, 卫星 RNA 作为黄瓜花叶病毒的生防因子 III. 含有卫星 RNA 的黄瓜花叶病毒 S51 的某些生物学特性的研究, 植物病理学报 15(3):145-149.
7. 田波, 1985, 植物病毒病害生物防治途径的探讨, 生物防治通报, 1(2):41-45
8. 杨希才 覃秉益 田波, 1986, 卫星 RNA 作为黄瓜花叶病毒病生防因子的研究 III. 卫星 RNA 对黄瓜花叶病毒感染的烟叶组织中病毒双链 RNA 含量的影响, 微生物学报 26(2):120-126
9. 吴建国, 卢文筠, 田波, 邱并生, 1985, 含有拟病毒 RNA 的绒毛烟草斑驳病毒在克里夫兰烟原生质体内的增殖, 微生物学报, 25(3): 221-225.
- √10. 田波等, 1986, 一种新的植物病毒防治方法: 用卫星 RNA 防治黄瓜花叶病毒病, 科学通报 31(6):479
- √11. Tian Bo et al., 1986, A new method to control plant virus diseases - using satellite RNA as a biological control agent of plant diseases caused by cucumber mosaic virus, Chinese Science Bulletin, 1: 69-70.

12. 郭林瑞 张秀华 章秉益 田波, 1986, 用卫星 RNA 生防治剂与 S-52 防治番茄病毒病, 植物病理学报 16(4):235-237
13. Wu J.Q., Lu W.J., and Tien P., 1986, Multiplication of Velvet Tobacc Mottle Virus in *Nicotiana clevelandii* protoplasts Is Resistant to Amanitin. J. Gen Virol. 67, 2757-2762
14. 吴健国 卢文俊 田波, 1987, amanitin 对 VTMoV 及其拟病毒复制的影响微生物学报 27(3):233-237
15. 仲崇仁 张秀华 田波, 1987, 烟台应用疫苗 S-51 和 N-14 防治青椒花叶病的田间试验, 植物病理学报 27:251-253
16. Tien P., Zhang X., Qiu B., and Wu G., 1987, Satellite RNA for the control of plant diseases caused by cucumber mosaic virus. Ann. Appl. Biol. 113:143-152
17. Tien P., Gerhard Steger, Volker Rosenbaum, Jaap Kaper and Detlev Riesner, 1987, Double-stranded cucumovirus associated RNA 5: Experimental analysis of necrogenic and non-necrogenic variants by temperature-gradient gel electrophoresis. Nucleic Acids Research, 15:5069-5083
18. Gerhard S., Tien P., Kaper J., and Riesner D., 1987, Double-stranded Cucumovirus associated RNA 5: which sequence variations may be detected by optical melting and temperature-gradient gel electrophoresis? Nucleic Acids Research 15(13):5085-5103
19. 张渝英, 刘年娟, 杨开宇, 杨希才, 陈炜, 田波, 1988, 酵母 RNA 聚合酶 II 体外转录亚病毒 RNA 的研究, 科学通报, 24: 1895-1898
20. 康良仪 毋谷德 许水蝉* 田波, 1988, 带卫星 RNA 黄瓜花叶病毒, 保护接种的植物中病毒积累与基因组 RNA 合成及病状表达, 病毒学报 1(4):45-52
21. 毋谷穗, 康良仪, 田波, 1988, 用 A 蛋白夹层酶联免疫吸附法对黄瓜黄叶病毒的血清学鉴定, 微生物学报, 28(3): 211-215.
22. Wu Shi-Xuan, Zhao Shu-Zhen, Wang Ge-Jiao, Yang Xi-Cai, Zhang Chun-Xia, Wang Xin and Tian Bo, 1992, Genetic engineering of tobacco plants with CMV resistance conferred by monomer cDNA of satellite RNA, Science in China, 35(6): 677-687.

23. 赵淑珍, 叶寅, 王昕, 王革娇, 张秀华, 张春霞, 徐雷新, 田波, 抗黄瓜花叶病毒的卫星 RNA 互补 DNA 转基因番茄, 科学通报, 10: 799.
24. Wu G.S., Kang L.Y., and Tien P., 1989, The effect of satellite RNA on cross-protection among cucumber mosaic virus strains. *Ann. appl. Biol.* 114, 489-496
25. 张春霞, 吴世宣, 王革娇, 田波, 1989, 黄瓜花叶病毒卫星 RNA-1 的 cDNA 合成、克隆及序列分析, 科学通报, 7: 540-543.
26. Zhang C.X., Wu S.X., Wang G.J., and Tien P., 1989, The cDNA synthesis, cloning and sequencing of cucumber mosaic virus satellite RNA-1. *Chinese Science Bulletin* 34(22):1913-1916
27. 赵淑珍 王革娇 张秀华 张春霞 杨希才 许雷新 刘怡之 田波, 1990, 由卫星互补 DNA 单体和双体基因构建的抗黄瓜花叶病毒的转基因番茄, 中国科学 7(B):708-713
28. 田波, 1990, 植物病毒卫星核糖核酸的应用与植物抗病毒基因工程, 中国科学院院刊, 2: 142-145.
29. Tien P., and Wu G.S., 1991, Satellite RNA for the biocontrol of plant disease. *Advance in Virus Research*, 39: 321-339
30. 叶寅, 卢文筠, 康良仪, 田波, 1992, 绒毛斑驳病毒卫星 RNA 的一种突变体的初步研究, 微生物学报, 32(1):6-10。
31. 朱水方, 叶寅, 赵丰, 田波, R. I. B. Francki, 1992, 黄瓜花叶病毒外壳蛋白质进入叶绿体与症状发生的关系, 植物病理学报 22(3):229-233。
32. Bingyi Qin, Xiuhua Zhang, Gusui Wu and Po Tien, 1992, Plant resistance to fungal diseases induced by the infection of cucumber mosaic virus attenuated by satellite RNA, *Ann. Appl. Biol.* (printed in Great Britain) 120, 361-366.
33. Y. Yie, F. Zhao, S. Z. Zhao, Y. Z. Liu, Y. L. Liu and Po Tien, 1992, High resistance to cucumber mosaic virus conferred by satellite RNA and coat protein in transgenic commercial tobacco cultivar G-140, *Molecular Plant-Microbe Interreaction*, 5(6):460-465.
34. Yie Y., and Tien P., 1993, Plant virus satellite RNAs and their role in

- engineering resistance to virus diseases, *Seminars in virology*, 14: 363-368.
35. 叶寅 魏征宇 赵丰 刘玉乐 覃秉益 田波, 1993, 一株新黄瓜花叶病毒卫星 RNA 结构和生物学分析, *中国科学*, 23(8):821-826.
 36. 叶寅, 田波, 1993, 黄瓜花叶病毒卫星 RNA 的 cDNA 双体基因的构建, *自然科学进展-国家重点实验室通讯* 3(5): 451-456。
 37. Yie Y., and Tien P., 1994, Construction of Dimer cDNA of Satellite RNA of Cucumber Mosaic Virus, *Progress in Natural Science*, 4: 53-59.
 38. Yie Y., Wu ZX, Wang SY, Zhao SZ, Zhang TQ, Tien P., 1995, Rapid production and field testing of homozygous transgenic tobacco lines with virus resistance conferred by expression of satellite RNA and coat protein cucumber mosaic virus, *《Transgenic Research》* 4:256-263.
 39. 杨海花, 康良仪, 赵大健, 田波, 1996, 卫星 RNA 对黄瓜花叶病毒基因组 RNA 体外合成的影响, *中国病毒学*, 11(4): 373-377。
 40. 田波等, 1996, 黄瓜花叶病毒卫星 RNA 与马铃薯块茎类病毒序列同源性分析, *中国病毒学*, 11(4): 378-383。
 41. Yang Xicai, Kang Liangyi, Tien Po, Resistance of tomato infected with cucumber mosaic virus satellite RNA to potato spindle tuber viroid, *Annals of Applied Biology*, 129, 543-551, 1996.
 42. 梁德林, 叶寅, 施定基, 康良仪, 田波, 1998, 黄瓜花叶病毒卫星 RNA 致弱辅助病毒的机理, *中国科学*, 28(3): 251-256。
 43. Po Tien, Satellite RNA for the control of plant diseases, *Risk Assessment in Agricultural Biotechnology: Proceedings of the International Conference*, p. 1928-1937.
 44. Y. Yie and P. Tien, Controlling mosaic virus diseases under field conditions using multiple gene strategies in transgenic plants, p.129-141.

亚病毒——病毒学的一个新分支

田 波

(中国科学院微生物所)

1971年美国的Diener^[1]发现马铃薯纺锤形块茎病是由分子量仅为 1.2×10^6 的、具有很高的碱基配对的单链环状RNA引起的, 称谓“类病毒”(Viroid)。这一发现揭示了自然界存在着比病毒更简单的病原物。后来在许多经济植物上不断报道新的类病毒, 在澳大利亚又发现, 类似类病毒的环状RNA还能与类似病毒的线状大RNA共同包被于线状RNA编码的外壳蛋白中, 引起绒毛状^[2]、苜蓿^[3]、苜蓿^[4]和地下三叶草^[5]的病害。这种类似类病毒的RNA被称谓“拟病毒”(Virusoid)。羊瘙痒病(Scrapie)是最初寻找动物类病毒的对象, 经过近十年的研究, 美国的Prusiner^[6]于1982年证明, 瘙痒因子不是类病毒, 而是一种分子量只有 3.0×10^4 的蛋白质, 称谓“蛋白侵染子”(Prion)或“朊病毒”(Virino)。

根据类病毒的发现, Lwoff^[7] (1981) 首先提出把病毒分为真病毒(Euvirus)和类病毒的概念。随着拟病毒和朊病毒的相继发现, 1983年在意大利召开的“植物和动物的亚病毒病原: 类病毒和朊病毒”国际学术讨论会上, 正式把类病毒、拟病毒和朊病毒归入亚病毒(Subvirus)^[8]。

亚病毒的研究不但可以解决植物、动物和人的许多疑难疾病的病原问题; 在理论上, 也具有特殊的重要性。信息量不足以编码任何蛋白质的类病毒, 其致病和复制机理是饶有兴趣的^[9]。只含蛋白质的朊病毒, 其遗传信息是如何传递的^[10]? 这些问题的阐明, 不仅对病毒学的理论是重要的, 对真核生物基因调控和表达也将做出贡献。

本文试图就80年代以来亚病毒领域的研究进展和发展方向做一综述。

类病毒的结构与功能

类病毒引起许多重要经济植物(如马铃薯、柑桔、椰子和啤酒花等)的严重病害。世界上已正式报道了12种类病毒^[11], 其中包括我国发现的牛蒡矮化类病毒。我国是类病毒发生 and 危害比较严重的国家, 除存在国际上已报道的马铃薯纺锤形块茎类病毒(PSTV)^[12]、柑桔裂皮类病毒(CEV)^[13]、菊花矮化类病毒(CSV)^[14]和菊花褪绿斑驳类病毒^[15]外, 还发现了牛蒡矮化类病毒^[16]和美人蕉矮化类病毒^[17]。前两种类病毒是马铃薯和柑桔生产上的重大威胁。最近又在苹果锈果病组织中发现了环状类病毒RNA^[18]。锈果是我国苹果生产中的一个危害普遍、病原长期不明的病害, 其病原的阐明和相应的诊断和防治方法的制订具有重要意义。正是由于生产上的迫切要求, 增加了对类病毒研究的兴趣。

一、类病毒的一、二级结构与毒力的关系 自从Gross等^[19]1978年发表了PSTV的核苷酸序列以来, 至今已有9种类病毒完成了一、二级结构分析^[11]。所有类病毒的结构都具有下列共同特征: 它们都是单链共价闭合环状RNA分子。在天然状态下呈高度碱基配对的杆状结构存在, 由一系列短的双链区和不配对的单链区相间排列而成。通过类病毒中不配对单

链内环上密码与tRNA上反密码的结合实验等证明,类病毒没有三级的折叠结构。类病毒的单位长度的大小介于240至380个核苷酸之间。

在自然界类病毒存在着毒力不同的株系。PSTV的弱毒株系只减产10%左右,而强毒株系减产70—80%。不同毒力的PSTV的总核苷酸数是保守的,均为359。其差异表现为核苷酸的交换、插入和缺失(图1)。所有变化都发生在第40—55、115—125和305—320位核苷酸之间。从二级结构看,随着毒力的增加,左手端核苷酸改变的数目也增加(2—6个),并随之降低了碱基配对的数目,增加了相应区域的不稳定性。根据计算,这个毒力调节区的T_m值随着毒力的增加而降低:温和株系KF6为80°,中毒株系DI为66°,强毒株系HS为53°,致死株系为49°C。PSTV二级结构的右手端的变化,只限于被两个腺嘌呤取代尿嘧啶。因此只有当左手端有缺失时才能保持总核苷酸数目359不变。上述毒力调节区的功能,可能是由于结构的不稳定性,有利于单链RNA区域与寄主成分的相互作用,发挥致病力^[11]。

CEV毒力与结构关系的研究更为有趣。在知道柑桔裂皮病的类病毒本质之前,找到一种可芽接传染的矮化因子,可使柑桔密植增产。后来证实,所谓矮化因子实际上是CEV的一个弱株系。序列分析结果证明,与具有CEV典型症状的(裂皮和矮化)株系相比,只裂皮不矮化的株系有两个核苷酸的变化,只矮化不裂皮的株系(即矮化因子)有12个核苷酸的变化。

二、类病毒致病性机理 类病毒的基因组小,而且其正负链中都没有蛋白质合成的起始密码AUG。在体内也不能刺激、抑制或诱导蛋白质合成。那么类病毒的致病性可能是基于其RNA分子直接干扰寄主细胞的核酸代谢。类病毒可能是逃脱了DNA的控制、调节,成为可自我复制的RNA^[20]。这一假说从类病毒和小核U1aRNA序列比较中得到支持^[20~21]。16⁵个核苷酸长的U1aRNA在真核生物mRNA拼接(Splicing)中起重要作用。拼接过程是基于其5'末端与基因内含子的5'和3'末端序列互补,使U1aRNA分子能同时与内含子两个末端形成碱基对,mRNA前体的两个编码区靠近,产生拼接。与识别前mRNA编接点有关的U1aRNA的ACCUG序列也存在于类病毒(ACCCG)中。因此类病毒也能结合到前mRNA的识别位点上,干扰mRNA的加工。类病毒的致病性可能是由于它可作为U1aRNA的竞争者。

此外,体外转录实验指出,类病毒的正链和负链RNA还能作为寄主基因组DNA模板的竞争者,与依赖于DNA的RNA聚合酶Ⅱ结合,使之指导类病毒的复制,破坏了mRNA的合成^[22]。可见,类病毒模仿寄主核酸的结构,干扰mRNA的合成和加工,可能是其致病作用的基础。

三、类病毒的复制 类病毒的遗传信息不足以编码任何复制酶,一个合理的设想是类病毒依靠预先存在于寄主细胞中的核酸合成机制进行复制。已知健康植物中含有两种类型的RNA合成系统。即依赖于DNA的RNA聚合酶Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ,以及依赖于RNA的RNA聚合酶。从理论上讲类病毒应通过其互补RNA,用依赖于RNA的RNA聚合酶进行复制,由健康番茄叶中提取的这类酶能合成全长的PSTV线状分子^[23]。

由于类病毒RNA在分子内的高度碱基配对和G+C含量,使其非常像DNA分子。因此它可能是寄主依赖于DNA的RNA聚合酶的有效模板,由健康番茄组织中提取的这种聚合酶Ⅱ在体外合成出全长的PSTV线状分子^[22]。

线状的类病毒分子是如何环化的呢?最近发现由麦胚中分离的RNA联接酶能够通过2'-磷酸单酯和3', 5'-磷酸二酯键的形成,把线状类病毒分子联接成环状分子^[24]。有理由认为

PSTV

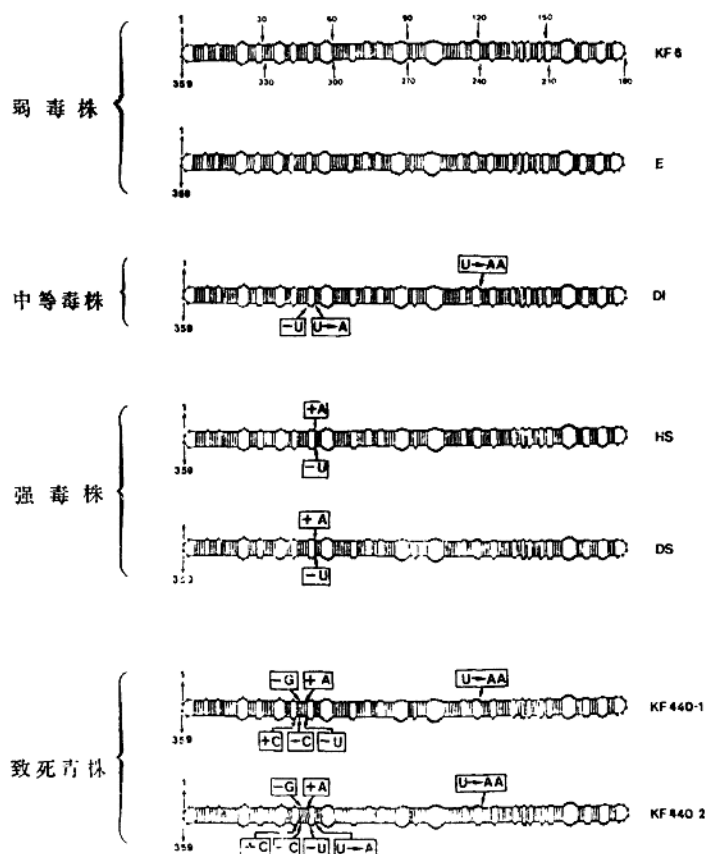


图1 在番茄上引致弱、中、强和致死症状的各种PSTV株系核苷酸改变的位置。

这种改变是以弱毒株为标准并框起来。应当指出，未标出二级结构引起的变化[11]。

类病毒的寄主植物也含有RNA联接酶，能够完成分子环化的作用。

在细胞中除存在线状和环状类病毒分子外，还存在互补的(−)RNA分子和(−)RNA的寡聚物以及(+)RNA的寡聚物[25]。根据这些复制中间产物，提出了类病毒复制的滚环理论：侵染性(+)RNA分子先转变成(−)RNA寡聚物再以(−)RNA寡聚物为模板转变成(+)RNA寡聚物，即PSTV(+)RNA单体的前体。(+)RNA寡聚物裂解成PSTV(+)RNA单位长度的线状分子，经过末端修饰后，联接成共价闭合环状分子。裂解和联接都是由寄主细胞RNA拼接有关的酶完成的。

对类病毒复制和致病机理的研究有可能提供控制类病毒病的途径。

四、类病毒的分子克隆及其用途 自从1980年Owens和Cress^[26]首先获得PSTV的克隆化cDNA以来,已克隆了6种类病毒的cDNA。发现它们有广泛的实际和理论用途。用克隆化类病毒cDNA在硝酸纤维素薄膜与待测样品做点杂交,其检测灵敏度比常规电泳法提高了一万至十万倍,还具有特异性强和快速的优点,是一种有前途的诊断方法。cDNA还可用于类病毒序列分析和复制中间产物的测定。由于克隆化的PSTV cDNA还具有侵染性,这不但对类病毒起源有启发,还有可能作为植物基因工程的载体^[27]。

朊病毒的本质

危害中枢神经系统的羊瘙痒病(Scrapie)、人库鲁病(Kuru)和克-雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease, CJ-D)曾认为是慢病毒病,但从未发现病毒颗粒。它们的病原一直是个谜。由羊脑制备的瘙痒因子感染仓鼠后,可在2个月内发病,成为研究这类持续性感染的良好模型。Prusiner实验室系统研究了能区分蛋白质和核酸的许多试剂对瘙痒因子的作用。发现它对蛋白酶、氨基酸化学修饰剂(如磷酸二乙酯)、蛋白质变性剂(尿素、SDS和苯酚)敏感;而对核酸酶、核苷酸修饰剂(如羟胺)和核酸变性剂等均有抵抗力。这些试验暗示瘙痒因子中含有为侵染所必需的蛋白质成分,而不是核酸^[28]。为了验证上述推论,首先要提纯瘙痒因子。通过大量提纯瘙痒因子,获得侵染性较匀浆液高3,000倍的分部。在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳和蔗糖密度梯度离心中只有一种蛋白质成分。称谓朊病毒蛋白质(PrP)^[27]。

一、PrP的结构 PrP的分子量为27,000至30,000,是构成朊病毒的基本单位。PrP本身不具有侵染性。由3个PrP分子构成的“朊病毒单体”有高度侵染性。PrP分子还能聚合成杆状颗粒,即电子显微镜下看到的直径25nm,长100至200nm的杆状物,约由1,000个PrP构成。这种杆不单独存在,总是排列成丛,有的丛含有多达100个杆。杆和丛都有传染性^[30]。

PrP的天然构型对蛋白酶有抵抗力,但变性后变得敏感了。提纯的PrP在1—2% SDS中加热后变性,导致侵染性降低和杆结构的消失。PrP具有嗜刚果红的双折射性。其染色特性与人脾中分离的淀粉状蛋白(Amyloid)相似,反映出它们在结构上的共同性。哺乳动物的蛋白质聚合物凡在电镜下呈杆状结构的,用刚果红染色后都表现绿色双折射性。

二、PrP的化学性质 PrP由17种氨基酸的246个分子组成。含量最多的氨基酸是甘氨酸、天门冬氨酸/天门冬酰胺和谷氨酸/谷氨酰胺。PrP-N末端15个氨基酸的序列是G-Q-G-G-C-T-H-N-Q-W-N-K-P-S-K。曾查询了贮存所有已知氨基酸序列的计算机数据,未能发现PrP与任何蛋白质有共同序列(指15个氨基酸中有7个以上是相同的)。根据以上序列引导出两个对阐明朊病毒本质有意义的设计:首先可按此序列合成一寡肽作为产生PrP抗体的抗原;其次,根据其氨基酸序列合成一寡核酸引物,作为检测自然编码PrP的DNA的探针。

提纯的PrP具有典型的蛋白质紫外吸收光谱,最高吸收值为280nm, A₂₈₀/A₂₆₀比值=1.41。根据这一比值计算最多只能含有0.75%的核酸。按PrP分子量为28,000计算,每个PrP分子中只能含有不到一个核苷酸^[31]。

三、羊痒病朊病毒的免疫反应 羊痒病属慢性神经系统感染,不引起显著的体液或细

胞免疫反应。寄主不发烧,脑脊髓液和血液中白细胞数目正常。羊瘙痒朊病毒缺少免疫反应的原因有两个可能的解释:(1)朊病毒为疏水蛋白质,紧密地与脂类结合着,隐蔽了抗原决定簇^[32]。已报道过疏水蛋白质抗原性弱或无抗原性的例子;(2)也可能朊病毒的抗原性与寄主相似,使寄主耐受朊病毒的免疫^[33]。

最近的实验证明,用高度提纯的PrP成功地在兔血清中产生了抗体。此抗血清与PrP起反应,而不与未感染的仓鼠脑中提取的蛋白质起反应。仓鼠PrP抗血清还能与CJ-D实验性感染的小鼠脑提取的蛋白质有反应。

四、朊病毒复制的可能机理 第一种假说认为有一编码朊病毒氨基酸序列的基因组,但此DNA基因不存在于朊病毒中,而是正常哺乳动物基因组的一部分。朊病毒的感染可能活化或改变这一基因,使之转译出蛋白质。如果朊病毒中存在某种小的核酸片段,它可能是基因活化的扳机。此片段插入到寄主细胞染色体的PrP基因的前面,即在此基因转录起始点之前。插入的核酸片段可作为基因表达的启动子或强化因子(Enhancer)。如果朊病毒本身只含有蛋白质,PrP本身可能结合到细胞DNA控制PrP基因转录的区域而起到同样的作用。大多数结合到DNA上去的蛋白质都趋向于阻遏基因表达,但一种蛋白质刺激其本身合成的现象并不是没有先例的。可从PrP部分氨基酸序列制备的DNA探针来发现细胞中PrP基因^[34]。

第二种假说认为朊病毒是通过与生物中心法则不同的信息流来复制的。它可能先逆转译成RNA或DNA,然后再合成子代朊病毒。这一过程需要逆转译酶和逆转录酶,前一种酶还从未被发现过。也可设想朊病毒的氨基酸序列可直接作为模板合成新的蛋白质分子,但这种蛋白质指导的蛋白质合成也从未被发现过^[34]。

可见,朊病毒复制的研究不仅对这类特殊病原物是重要的,还牵连到生物的中心法则,是一个十分有意义的问题。

五、朊病毒的已知和可能的成员 根据现有资料,羊瘙痒病和CJ-D是已知的朊病毒病,至少还有四种神经系统疾病可能是朊病毒引起的。它们都有传染性,症状与羊瘙痒病类似,并引起相似的脑组织病变。表1列出6种疾病的病理特点。CJ-D在许多方面与羊瘙痒病相似,由

表 1 由和可能由朊病毒引起的人和动物疾病^[34]

疾 病	由朊病毒引起	天然寄主	实验寄主	潜 伏 期
羊瘙痒病	是	绵羊,山羊	小鼠,仓鼠,猴子	2月至2年或更长
克雅氏病	是	人 类	猿,猴,小鼠,山羊,豚鼠	4月至20年或更长
库鲁病	可能	人 类	猿,猴	18月至20年或更长
格斯氏综合症 (Gerstmann-Straus- sler syndrome)	可能	人 类	猿,猴	18月或更长
传染性水貂脑病	可能	水 貂	猴,山羊,仓鼠	5个月至7年或更长
鹿慢性萎缩病	可能	鹿,麋鹿	雪 貂	18月或更长

患者脑组织提取的因子能感染山羊,其表现无论在临床上还是在神经病理学上都不能与天然瘙痒因子相区别。有人推测可能有更多的疑难疾病与朊病毒有关,都有待验证^[34]。我国还没有关于朊病毒方面的报道。

拟病毒与卫星RNA的关系

一、拟病毒的生物功能 包被于衣壳内的类似类病毒的拟病毒是大小为300—400核苷酸、有高度二级结构的单链共价闭环状RNA分子。已知有4种病毒内含有拟病毒,即绒毛茛斑驳病毒(VTMoV)苜蓿斑驳病毒(SNMV)、苜蓿暂时性条斑病毒(LTSV)和地下三叶草斑驳病毒(SCMoV)。已把这4种病毒归为一个新的病毒组——绒毛茛斑驳病毒组。在这4种病毒中拟病毒RNA的功能是不同的。VTMoV和SNMV中的拟病毒是侵染性所必需的,即其线状RNA和环状RNA共同对侵染性负责,类似二分体基因组病毒^[36]。而LTSV的拟病毒的作用类似卫星RNA,线状RNA可单独侵染,而环状RNA的复制必须依靠线状RNA^[37]。序列分析结果指出,VTMoV的拟病毒含有365个核苷酸,SNMV的含有377个核苷酸,它们之间有95%的序列同源性,但两者的拟病毒交换后不表现生物活性,说明它们的结合有特异性。LTSV的拟病毒由324个核苷酸组成,SCMoV的由321个核苷酸组成,根据它们之间具有较高的序列同源性,推测SCMoV的拟病毒可能也具有卫星RNA的性质。

拟病毒不但在二级结构上与类病毒相似,而且还与许多类病毒有序列同源性。VTMoV,SNMV和SCMoV的拟病毒与PSTV、CSV、CEV和CCCV等类病毒二级结构的中心区是同源的^[35]。

二、卫星RNA与拟病毒 卫星RNA是伴随病毒复制的线状小RNA,它与病毒RNA无序列同源性。黄瓜花叶病毒的卫星RNA是最著名的例子,它由335个核苷酸组成^[38]。其复制依赖辅助病毒,但又干扰辅助病毒RNA的复制,降低病毒的致病能力,有理由认为它既是侵染病毒的RNA^[39],也是亚病毒的一员。

具有卫星性质的LTSV拟病毒与卫星RNA的主要区别是前者为环状分子结构。最近发现茛斑驳病毒的卫星RNA能折叠成类似杆的结构^[40],并已分离到环状分子^[41]。可见在拟病毒和卫星RNA之间不能划出明显的界限。有趣的是茛斑驳病毒卫星RNA中心区的50—60个核苷酸与VTMoV和SNMV的拟病毒有80%的同源性,但与LTSV却无同源性。

用卫星RNA作为黄瓜花叶病毒生物防治因子的实验所取得的成功^[42],增加了人们对卫星RNA研究的兴趣。1985年11月在加拿大召开的国际比较病毒学会议将把“卫星RNA的分子生物学及其作为生物防治因子的前景”作为一个讨论会的主题。最近发现乙型肝炎病毒的伴随因子具有卫星RNA性质,值得注意^[43]。

类病毒、拟病毒和卫星RNA有区别,也有共同点和联系。它们的结构与功能和起源的比较研究是很有意义的。

亚病毒研究提供的启发

亚病毒作为病毒学的一个分支虽然还处于发展的初期阶段,有些成员的本质尚待进一步阐明,也还存在一些争论的问题。但已提供出一些有益的启发:

对病毒学和病理学工作者来说,亚病毒病原物的发现及其病理学的研究指出:(1)传染病原物的种类还远未穷尽,许多病原长期未弄清的病害的深入研究,有可能发现新型的致病因子。(2)类病毒和朊病毒病害防治研究和实践证明,病原物的基因组愈小愈简单,它

所引起的病害的防治愈困难。对植物病毒病害脱病毒非常有效的茎尖分生组织培养技术,对类病毒病不奏效。类病毒和阮病毒对紫外线(260nm)的抵抗力比一般病毒高5,000—40,000倍。

对分子病毒学和分子生物学工作者来说,亚病毒发现及其基因组的研究指出:(1)可复制的致病因子的基因组大小的下限也未穷尽;(2)生物大分子无疑是分子生物学研究的主要对象,但生物小分子也不容忽视。

参 考 文 献

- [1] Diener T O: Virology, 45: 411, 1971
- [2] Randles J W et al: Virology, 108: 111, 1981
- [3] Tien Po (田 波) et al: FEBS Lett, 132: 353, 1982
- [4] Gould A R and T Hatta: Virology, 109: 137, 1981
- [5] Francki R I B et al: Plant Pathol, 32: (in press) 1983
- [6] Prusiner S B: Science, 216: 136, 1982
- [7] Lwoff A: Ann Virol, 132E, 121, 1981
- [8] 田 波: 病毒学集刊, 4: 209, 1984
- [9] 田 波, 夏远南: 病毒学集刊, 2: 5, 1982
- [10] 李孟津, 田 波: 生物科学动态, (3): 1, 1984
- [11] Sanger H L: The Microbe Part I Viruses, ed by B W J Mahy and J R Pattison, Cambridge University Press, 1984
- [12] Tien Po (田 波): Subvirus Pathogens of Plant and Animal, Viroid and Prion ed by Maramorosh AP, 1985 (In press)
- [13] 赵学沅等: 植物病理学报, 14: 2, 1984
- [14] Chen Wei (陈 伟) et al: Kewue Tongbao, 24: 660, 1982
- [15] 李孟津, 田 波: 植物病理学报 (投稿中)
- [16] Chen Wei (陈 伟) et al: J gen Virol, 64: 409, 1983
- [17] 陈 伟等: 中国科学 (印刷中), 1985
- [18] 陈 伟, 田 波: 科学通报 (投稿中)
- [19] Gross H J et al: Nature, 272: 203, 1978
- [20] Diener T O: Proc Natl Acad Sci USA, 78: 5014, 1981
- [21] Gross H J et al: Euro J of Biochem, 121: 219, 1982
- [22] Rackwitz H R et al: Nature, 291: 297, 1981
- [23] Eoege F et al: Bioscience Reports, 2: 185, 1982
- [24] Branch A D et al: Science, 217: 1147, 1982
- [25] Muhlbach H P et al: Plant Molecular Biology, (in press) 1983
- [26] Owens R A and Diener T O: Proc Natl Acad Sci, USA, 77: 5332, 1980
- [27] Diener T O et al: Genetic Engineering in the Plant Science, ed by N J Panopoulos p. 165—177, Praeger, New York, 1984
- [28] Diener T O et al: Proc Natl Acad Sci USA, 79: 5220, 1982
- [29] Prusiner S B et al: Biochemistry, 21: 6912, 1982
- [30] Prusiner S B et al: Cell, 35: 349, 1983
- [31] Prusiner S B et al: Cell, 38: 127, 1984
- [32] Kasper K C et al: J of Neuroimmunology, 3: 187, 1982
- [33] Bendgeim P E et al: Nature, 310 (5976): 418, 1984
- [34] Prusiner S B: Scientific American, October, 50—59, 1984
- [35] Matthews R E F: Intervirology, 1, 17: 1, 1982
- [36] Haseloff J et al: in "Plant Infectious Agents: Viruses, Viroids, Virusoids and Satellites", p 81—181, 1983
- [37] Franks R I B et al: in "Plant Infectious Agents: Viruses, Viroids, Virusoids and Satellites", pp. 175—180, 1983
- [38] Kaper J M: in "Plant Molecular Biology" Alan R Liss Inc, p. 81—100, 1983
- [39] 田 波: "病毒与农业", 田 波、龚祖坝编, 科学出版社, 1985 (在印刷中)

-
- [40] Kaper J M; Control of Virus Diseases ed. Kurstak E, p317—343, New York, Marcel Dekker 1984
- [41] Kaper J M; Plant Molecular Biology Reporter, 1 (2) : 49, 1983
- [42] Tien Po and Chang Xiuhua (田 波, 张秀华); Seed Sci & Technol, 11 : 869, 1983
- [43] Hoyer B et al; in "Viral Hepatitis and Delta Infection" Alan R Liss, Inc, New York, p.91, 1983

黄瓜花叶病毒组的卫星 RNA

田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京)

一、引 言

本世纪六十年代初英国著名植物病毒学家 Kassanis 等 (1960) 发现烟坏死病毒 (TNV) 的甘面体病毒颗粒中, 有时伴随有一种较小的甘面体颗粒, 这种小颗粒只有在 TNV 侵染的植株中才能复制, 称为卫星烟坏死病毒 (STNV)。这一发现开创了病毒学研究的一个新领域。

此后, 美籍印尼学者 Kaper 等 (1967) 又在黄瓜花叶病毒 (CMV) 的四分段基因组中发现了一种伴随的低分子量 RNA, 它的复制依赖于 CMV 的存在, 称为黄瓜花叶病毒伴随 RNA 5 (CARNA 5), 即卫星 RNA。

近廿年来对卫星 RNA 的性质开展了一些研究。表 1 是这些研究的一个概括性的总结。两者都具有两个引人注目的共同性质, 即它们的复制都依靠辅助病毒, 又都降低辅助病毒的复制。

表 1 卫星 RNA 和卫星病毒性质的比较

性 质	卫星 RNA	卫星病毒
1. 依赖于辅助者才能复制	+	+
2. 包被于特殊的衣壳内	-	+
包被于辅助者衣壳内	+	-
3. 干扰辅助者的复制	+	+
4. 与辅助者核酸有序列同源性	-	-
5. 能保持自己的遗传性并有株系特异性	+	+

田波等 (1982) 应用卫星 RNA 作为防治 CMV 病害的尝试, 取得了肯定的结果, 并引起了国际上的注意 (Kaper 1983, Tousignant, 1983, Waterworth, 1983)。关于卫星病毒用于病害防治的试验正在进行中 (裴美云等, 1984)。

我们根据卫星 RNA 和卫星病毒依赖于病毒才能复制, 并能干扰辅助病毒的复制, 改变病毒的致病能力, 以及维持本身遗传性和具有株系特异性的性质, 认为它们是侵染病毒的病毒 (田波, 1984)。

本文将综述黄瓜花叶病毒和花生矮化病毒的卫星 RNA 以及数种植物病毒的卫星病毒、用于病毒病生防的试验和前景以及认为它们是侵染病毒的病毒的理由。

二、黄瓜花叶病毒的三分体基因组

黄瓜花叶病毒属黄瓜花叶病毒组, 它具有直径为 30 毫微米的甘面体颗粒。病毒颗粒

分子量、核酸和蛋白的相对比例,蛋白亚基的数目和分子量以及 RNA 组分的数目和分子量如表 2 所示。Kaper 等 (1965) 首先发现 CMV-RNA 含有一个以上的组分,后来证明在成熟病毒颗粒中共含有 4 种 RNA 组分 (RNA1—4), 侵染必须的组分是 RNA 1、RNA 2 和 RNA 3, 属于三分体基因组。根据 CMV 中 RNA 含量可计算出每个病毒颗粒所包被的 RNA 数量不超过 1×10^6 。因此 RNA1—4 不可能包被于一个病毒颗粒中。经平衡离心后, 形成不同的浮力密度分布。随着浮力密度的降低, 病毒颗粒中包被有 1 分子的 RNA 1, 1 分子的 RNA 3 和 RNA 4, 以及 1 分子的 RNA 2 (Lot 和 Kaper, 1976)。

表 2 黄瓜花叶病毒的理化性质 (Kaper 和 Waterworth, 1982)

特 性	数 值
颗粒分子量	5.3×10^6
蛋白亚基数目	180
蛋白亚基分子量	24,500
RNA 含量	18.25%
RNA 分子量: RNA 1	1.1×10^6
RNA 2	0.89×10^6
RNA 3	0.68×10^6
RNA 4	0.33×10^6

RNA 1—3 的混合物可在寄主上引起侵染 (Peden 和 Symons, 1973; Lot 等, 1974), 即完成侵染循环所需的一切信息都包含在这 3 种 RNA 的核苷酸序列中。在 RNA 1—3 的接种物中, 即使完全除去 RNA 4, 但在子代病毒中仍可出现 RNA 4。“拟重组”试验证明 RNA 3 中含有 RNA 4 的核苷酸序列 (Habibi 和 Francki, 1974; Marchoux 等, 1974)。RNA 4 在体外蛋白质转译体系中可转译成 CMV 的外壳蛋白 (Schwinghamer 和 Symons, 1975)。分子杂交 (Gould 和 Symons, 1977) 和寡核苷酸指纹图谱 (Lot 等, 1977) 分析证实了 RNA 3 中存在着 RNA 4 的核苷酸序列。直接的核苷酸序列分析 (Symons, 1979), 说明 RNA 4 的所有 270 个核苷酸序列, 与 RNA 3 3' 末端起的序列是完全相同的。RNA 1 和 RNA 2 的核苷酸序列只有 11 个核苷酸的不同, 它们可能与编码 CMV-RNA 复制酶有关。

RNA 1—4 的 3' 末端起的 130 个核苷酸的序列是相同的, 这可能与它们在体外与酪氨酸的氨酰化能力有关 (Kohl 和 Hall, 1974), 也可能与 RNA 复制酶的识别位点有关。

三、伴随 CMV 的卫星 RNA

早在 1972 年, Kaper 和 West 就报道了 CMV 中存在一个第五 RNA 组分, 但直到证实它对辅助病毒 CMV 的依赖关系 (Kaper 等, 1976; Diaz-Ruiz 和 Kaper, 1977) 才明确了它的卫星 RNA 本质。现已分离并鉴定了 3 种 CMV 卫星 RNA。即美国由 CMV-D 分离的 CARNA 5、澳大利亚 CMV-Q 株系分离的卫星 RNA 和法国分离的卫星 RNA。

1. 卫星 RNA 的结构 卫星 RNA 与 CMV-RNAs 基因组没有核苷酸序列同源性。用竞争杂交法 (Diaz-Ruiz 和 Kaper, 1977) 和寡核苷酸指纹图谱法 (Lot 等, 1977) 证明, CARNA 5 与基因组 RNA 5 无同源性。CMV-Q 的卫星 RNA 与其协助者基因组也无同源性 (Gould 等, 1978)。

Richards 等 (1978) 对 CARNA 5 的序列分析结果说明, 它是由 335 个核苷酸组成的单链 RNA。其 5' 末端为 m⁷Gppp 帽式结构, 3' 末端为 ACCCOH (见图 1)。CMV-Q 卫星 RNA 的核苷酸序列与 CARNA 5 很相似 (Symons, 1980), 尽管它不引起番茄的坏死。法国和日本的 CMV 卫星 RNA 也与 CARNA 5 的核苷酸序列有很大同源性 (Kaper 和 Tousignant, 1978; Hidaka 等, 1979)。因此, 可以认为, 各个卫星 RNA 的分离物虽然在生物学上具有不同的性质, 但其核苷酸序列是很相似的。另一方面, 从不同病毒材料中得到的 CARNA 5 的序列却有微小的差异。这些差异位于分子的 3' 末端的同一区域, 事实上 CARNA 5 是包括一类核苷酸序列非常近似的分子群体, 其变化局限于分子的少数高度特异的位点。

2. 卫星 RNA 的转译 卫星 RNA 对辅助病毒的依赖性及其对后者致病性的影响, 了解它的信使能力是很有意义的。在麦胚无细胞蛋白质合成体系中, CARNA 5 可转译成两种多肽, 其分子量约为 5,200 和 3,800 (Owens 和 Kaper, 1977)。两个产物的大小与 CARNA 5 的 335 个核苷酸的编码能力是适应的 (图 1), 而且与序列分析所确定的起始密码和终止密码也是符合的 (图 1, Richards 等, 1978)。以这些密码和麦胚体系中所转译成的多肽分子量的测定为根据, Richards 等 (1978) 推导出了 CARNA 5 编码的两个多肽的氨基酸序列 (图 1)。但还不知道 CARNA 传染的植物中是否也能产生这两种多肽, 它们的氨基酸序列是否与体外转译产物相同。只有在明确了上述两个问题之后, 才能讨论它的生物学意义。

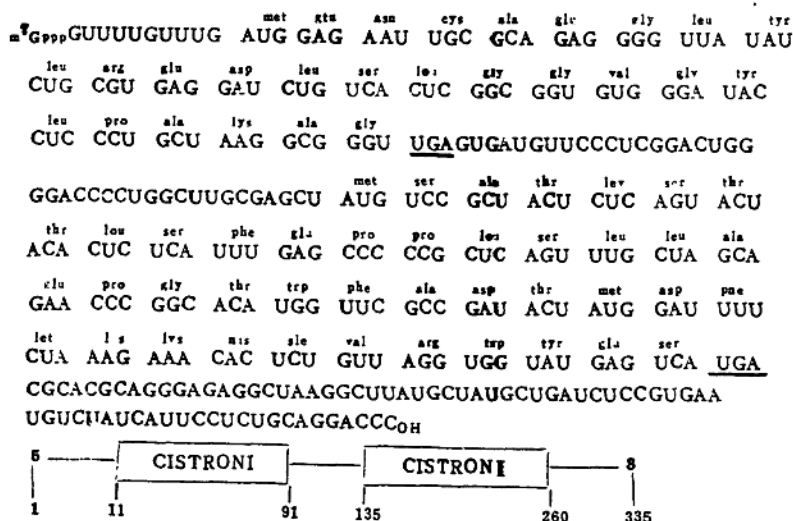


图 1 由 CMV (D 株系) 分离的 CARNA 5 的核苷酸序列以及两种分子量为 2,800 和 4,800 小蛋白的可能的编码顺序 (引自 Richards 等, 1978)

四、伴随黄瓜花叶病毒组其他成员的卫星RNA

1978年 Kaper 等从几个 PSV 的分离物中也鉴定出卫星 RNA 的存在, 並命名为 PSV 伴随 RNA 5 (PARNAS), 它对 PSV 具有同样的依赖关系。Hull(1976) 曾报道在黄瓜花叶病毒组的第三个成员——番茄不孕病毒 (TAV) 中也存在第五个 RNA 组分。Gould 和 Symons (1978) 也报道, 他们的 TAV 株系可支持来自 CMV-Q 的卫星 RNA 的复制。

PARNA 5 略大于 CARNA 5, 而且它们之间似乎没有序列同源性 (Kaper 和 T-ousignant, 1978; Kaper 等, 1978)。CMV 和 PSV 虽然在分类上是很近似的病毒, 甚至它们的基因组 RNA 片段之间可进行交换, 在体外产生稳定的杂种 (Habibi 和 Francki, 1974; Marchoux 等, 1974), 但不能支持同一类型的卫星 RNA 复制。与上述 Gould 和 Symons (1978) 的 TAV 能支持 Q 株系卫星 RNA 复制结果有些不同。关于不同黄瓜花叶病毒组成员间卫星 RNA 的相互关系, 尚待进一步研究。

五、卫星 RNA 是侵染病毒的病毒吗?

1. 卫星 RNA 干扰病毒基因组 RNAs 的复制 CARNA 5 的存在显著降低病毒中基因组 RNAs 的相对比例。病毒基因组 RNAs 的含量对总 RNA 含量的比例大为降低 (Kaper 等, 1976; Waterworth, 1979; Waterworth 和 Kaper, 1981)。最近, 我们实验室的工作 (杨希才, 覃秉益等, 1984) 证明, 卫星 RNA 的侵染还降低寄主细胞中病毒基因组 RNAs 的 dsRNA 含量。烟的枯斑三生品种的幼苗接种带有卫星 RNA 的 CMV 后, 用³H-尿嘧啶标记 RNA, 然后直接分离细胞内病毒的 dsRNA 进行测定。在电泳分析中证明, 随着接种后时间 (2, 4, 6, 8, 10, 12 和 14 天) 的延长, 卫星 RNA 的 dsRNA 含量成直线增长, 第 10 天时达最高峰, 而基因组 RNA 的 dsRNA 的含量却随着接种后时间的延长而降低, 其降低趋势一直延续到所测定的 (最后的) 第 14 天。其相对含量, 卫星 RNA 的比病毒基因组 RNAs 的 dsRNA 的高数十倍之多。但不含卫星 RNA 的 CMV 接种后, 在所测定的 14 天内, 各基因组 RNA 的 dsRNA 含量比较稳定。

与病毒 dsRNA 含量相适应, 卫星 RNA 侵染的植株中 CMV 病毒颗粒的浓度只有 CMV 单独侵染时的 $\frac{1}{4} - \frac{1}{3}$, 或更低。我们的这一结果与 Waterworth 和 Kaper (1981) 的数据很一致, 他们证明, CMV 和 CARNA 5 共同侵染的植物中, 病毒核蛋白的产量只有 CMV 单独侵染时的 10—50%, 並伴随有病毒基因组 RNAs 含量对总 RNA 含量的比例大为降低。他们认为, 基因组 RNAs 产量和比例的降低共同造成低的病毒含量。

2. 卫星 RNA 大大减轻病毒在大部分寄主上引起的症状 所有 CMV 感染试验都证明, 病害症状严重度和组织中存在的病毒 RNA 和病毒颗粒的数量之间有明显的相关性。在绝大多数寄主植物上, 接种物中 CARNA 5 的存在显著降低症状严重度 (Kaper 和 Waterworth, 1982)。至今在所有测定过的寄主上, 番茄是唯一的例外。在番茄植株中 CARNA5 同样降低组织中病毒的含量和病毒 RNAs 对 CARNA5 的比例, 但却引起坏