

内 容

(二) 类病毒

(三) 核酶介导的植物抗病性

(四) 马铃薯病毒与温度

目 录

45. 田波, 类病毒的发现, P. 1-4.
46. Chen Wei, Tian Yingchuan, Liu Yong, Peng Bo, Xia Yuannan and Tian Bo, Detection of chrysanthemum stunt viroid by molecular hybridization analysis and polyacrylamide gel electrophoresis, Chinese Science Bulletin, 27(6): 660-664.
47. 陈伟 田颖川 刘勇 彭勃 夏远南 田波, 1981, 用互补 DNA 杂交和电泳测定我国菊花矮化类病毒, 科学通报 14: 886-889
48. 田波, 夏远南, 1982, 类病毒研究进展和展望, 病毒学集刊, 第二期, p. 5-15 .
49. 陈伟 田波 朱玉香 刘勇, 1982, 牛旁矮化类病毒的研究 I. 类病毒 RNA 提取和性质, 微生物学报 22(3): 241-247 .
50. 陈伟, 田波等, 1985, 牛旁矮化类病毒(BSV)的研究 — BSV-RNAs 的变性行为和植株中的分别存在, 中国科学, 9: 806-812 .
51. Chen Wei, Tian Bo et al., 1986, Study on burdock stunt viroid (BSV) — The denaturing behavior and occurrence in separate plant of BSV RNA-1 and RNA-2, Scientia Sinica, 2: 147-155.
52. 陈伟 田波, 1985, 牛旁矮化类病毒的研究 III. 牛旁病叶组织的超微结构, 植物病理学报 15(3): 185-188.
53. Tien Po, 1985, Viroids and viroid diseases in China, in: Subviral Pathogens of Plants and Animals: Viroids and Prions(K.Maramorosch and J.J. Mckelvey. eds.), pp.123-136, Academic Press, New York.
54. 陈伟 田波 朱玉香 杨希才 丁明孝 盖秀珍 翟中和 陈立华, 1985, 美人蕉矮化病组织中发现的一种类病毒 RNA, 病毒学报 2(4): 268-272 .

55. 陈伟 田波, 1985, 苹果锈果病组织中发现的类病毒 RNA, 科学通报 30(17): 1360。
56. 于大文 彭渤 杨新颖 陈常庆 杨希才 田波, 1985, 用化学合成的 DNA 探针检测类病毒, 生物化学与生物物理学报 17(4): 520-525。
57. 张奇亚, 刘勇, 杨平, 林木兰, 翁兆葵, 糜克永, 卓中琪, 丁达明, 杨希才, 陈炜, 田波, 柑桔裂皮类病毒和菊花矮化类病毒互补 DNA 探针的合成及检测, 病毒学杂志, 1(4): 93-98。
58. 李孟津 杨希才 田波, 1987, 我国菊花退绿斑驳类病毒鉴定, 微生物学报 27(2): 121-127。
59. Tien Po, Chen Wei, 1987, Burdock Stunt, in "The Viroid" ed.by T.O.Diener P.333-339.
60. 陈伟 林蕾 杨希才 田波, 1988, 苹果锈果病类病毒的侵染性, 植物病理学报 18(3): 157-161。
61. 陈伟 林蕾 田波 刘福昌 王伯平, 1988, 接种外表健康的梨芽引起苹果产生锈果类病毒, 病毒学报 4(4): 367-370。
62. 蒋伶话 陈伟 田波, 苹果锈果类病毒的温度梯度凝胶电泳, 微生物学报 30(4): 278-283。
63. 陈伟 林蕾 田波, 1988, 菊花矮化类病毒 cDNA 的分子克隆, 病毒学报 4(2): 173-175。
64. Tien Po and Chen Wei, 1991, Studies on Apple Scar Skin Viroid. Viroids: Pathogens at the Frontier of Life. ed by K. Maramorosch. CRC Press. p.18-26.
65. 叶寅, 刘怡之, 赵丰, 康良仪, 田波, 1992, 特异切割马铃薯纺锤形块茎类病毒的 Ribozyme 的体外活性测定, 中国科学 B 辑 (5): 491-496。
66. 杨希才, 田波等, 1993, 南芥菜花叶病毒卫星 RNA 及其核酶的结构分析, 微生物学报, 33(4): 239-247。
67. 刘玉乐, 魏征宇, 刘奔, 叶寅, 朱锋, 康良仪, 田波, 1994, 重

组 LacZ' 基因的非常规表达, 科学通报, 39(3): 261-264。

- √ 68. 王苏燕, 盛刚, 刘伟平, 叶寅, 田波, 1996, 抗水稻矮缩病毒的反义核酶及复制酶部份序列的合成、克隆及表达载体构建, 中国病毒学, 11(2): 164-169.
- √ 69. 杨文定, 叶寅, 王苏燕, 田波, 1996, 表达反义核酶 RNA 的转基因水稻对矮缩病毒的复制和症状的抑制作用, 中国病毒学, 11(3): 277-283.
- 70. 刘力, 陈声祥, 邱并生, 康良仪, 田波, 1996, 抗水稻条纹叶枯病毒核酶的设计、克隆及体外活性的测定, 中国病毒学, 11(2): 157-163, 1996。
- 71. Yang Xicai, Yie Yin, Zhu Feng, Liu Yule, Kang Liangyi, Wang Xiaofeng, Tien Po, Ribozyme-mediated high resistance against potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes, Proc. Natl Acad. Sci USA, 94, 4861-4865, 1997
- 72. 王苏燕, 叶寅, 赵淑珍, 田波, 转基因油菜中核酶介导的对花椰菜花叶病毒的高度抗病性, 中国科学(C), 27(5): 426-431, 1997。
- 73. 刘灿辉, 杨希才, 王小凤, 田波, 高抗马铃薯纺锤形块茎类病毒的转基因马铃薯细胞内核酶转录产物的分布, 科学通报, 43(17): 1851-1854。
- 74. 田波, 1958, 马铃薯块茎发芽条件对芽内 X-病毒浓度的影响, 植物病理学报 4(1): 71-80。
- 75. 田波 张秀华 林传光, 1960, 马铃薯在温度条件影响下对花叶病毒抵抗力改变与种薯退化关系的证据, 植物病理学报 6(1): 68-86
- 76. 林传光 田波, 1961, 在马铃薯退化问题上耐病性变化概念的形成和验证, 中国农业科学, (10): 6-9
- 77. Lin C.G., Tien P., 1961, Loss of Tolerance to Mosaic Viruses as the cause of Potato Degeneration, Scientia Sinica 10(8): 962-975
- 78. 覃秉益 田波 林传光, 1963, 西藏高原生态条件对马铃薯花叶型退化的影响, 植物病理学报 6(2): 163-167。
- 79. 田波 虞明霞 崔文华, 1963, 感染花叶病毒的马铃薯块茎中含氮

化合物的初步分析, 植物保护学报 2(4): 417-422。

80. 张秀华 赵淑珍 蔡文启 田波, 1976, 油乳剂对蚜虫传染非持久性植物病毒的抑制作用, 微生物学报 16(2): 142-147。
81. 中科院植物所 微生物所, 1976, 马铃薯种薯生产的研究 I. 用茎尖培养方法生产无病种薯, 植物学报, 18(3): 233-238。
82. 中科院微生物所 植物所, 1977, 马铃薯种薯生产的研究 II. 几种血清学方法对 PVX 诊断效果比较, 微生物学报, 17(1): 29-33。
83. 中科院植物所 微生物所, 1978, 马铃薯无病毒留种体系的研究, 科学通报, 23(3): 181-184。
84. 田波, 1978, 病毒和高温在马铃薯花叶型退化中的作用, 中国农业科学 1978(4): 70-76。
85. 田波 张秀华 夏远南, 1982, 我国马铃薯纺锤型块茎类病毒的初步研究, 病毒学集刊 1(1): 119-122。
86. Tien Po, 1982, Potato Degeneration Research in China, American Potato J. 59: 46-50.

类 病 毒 的 发 现

田 波

(一) 引 言

病毒是已知的最简单的生物,许多病毒在其成熟颗粒中只含有蛋白质和核酸(RNA或DNA)*两种成分。自从发现单独的病毒核酸就具有完整的侵染性之后,有人曾经设想,既然核酸携带有病毒的全部遗传信息,在自然界是否存在只含有核酸的更简单的生命形式。这一设想在美国农业部农业研究部植物病毒实验室工作的瑞士科学家迪纳(Diener, T. O.)的工作所证实,该实验室自1967年以来所进行的一系列工作证明,马铃薯纺锤形块茎病毒是一种只含有侵染性RNA的植物致病因子,而且其RNA的分子量非常小(只有50,000左右)。迪纳为了与一般的病毒相区别,把它称为马铃薯纺锤形块茎类病毒(Potato spindle tuber viroid—PSTV)。类病毒一词引自阿尔顿伯格(Altenburg, E.)的著作⁽¹⁾,原意是在高等生物体内存在的能突变成病毒的假想物质。也有人把类病毒称为无蛋白质病毒。迪纳的这一发现立即引起了各方面的重视。下面将对这一工作做一介绍。为了便于了解,先简述其生物学特性。

PSTV的生物学特性: PSTV由于引起马铃薯块茎变长、形似纺锤而得名。这种病害在许多国家(例如美国、加拿大、苏联等)造成危害,减产25—70%。自从舒尔茨(Schultz, E. S.)和福尔索姆(Folsom, D.)⁽²⁾以及吉尔伯特(Gilbert, A. H.)⁽³⁾发现这一病害并把它归入病毒病害以来,已有50年的历史。尽管它极易通过病株汁液人工传染,但关于其病毒病原的本质几乎一无所知。在电子显微镜下未能观察到病毒颗粒,也未能制备出它的抗血清。按核蛋白方法进行提纯的企图从未成功⁽⁴⁾,这些事实也促使人们对其病毒病原本质提出了怀疑。

在这个病害的生物学特性中最值得注意的是其传染性的特点,在生产上它可以通过切种薯的刀传染⁽⁵⁾。这在马铃薯病毒病害中是一个极其特殊的现象。尽管感染马铃薯的病毒很多,而且有的病毒(例如马铃薯X-病毒)比PSTV还要稳定,但都不能借切刀感染块茎细胞。这可能与只以侵染性RNA形式

存在有关。另外,近年来发现PSTV可通过种子传病,病株结的种子几乎百分之百带病⁽⁶⁾,这也是一个很值得注意的问题。

由于缺少敏感的鉴别寄主,以往对PSTV的研究只能在马铃薯上进行。自从赖默和奥布赖恩(Rymer, W. B., Obrien, M. J.),发现PSTV在番茄(Rutger品种)上引起束顶和矮化病状后⁽⁷⁾,才有条件进行比较系统的研究。因为番茄感染PSTV后只表现系统性病状,其相对浓度是用“侵染性指数”(Infectivity index)表示的。它是根据接种物稀释度、病状出现所需时间和被感染植株的数目计算出来的⁽⁸⁾。

(二) PSTV为一无蛋白质的侵染性RNA的证据

1. 有机溶剂和酚处理对PSTV侵染性没有影响: 发病的马铃薯或番茄叶片用高离子强度的0.5克分子浓度的 K_2HPO_4 抽提可得到侵染性指数为48的提取液;用0.005克分子浓度的 K_2HPO_4 时其指数只有5。如果在提取液中加入二分之一容积的氯仿和正丁醇则其侵染性指数可达83。可见PSTV对有机溶剂是不敏感的,其组成中并无脂类化合物。上述提取液连续用等量酚抽提三次,水相以乙醚除去残留的酚,然后进行生物测定,结果证明用酚处理过的PSTV汁液保持着原来的侵染性^(9,11)。一般植物病毒用酚或其他方法提取核酸时,其侵染性只有完整病毒的0.1%—1% (个别病毒可达50%左右)⁽¹²⁾,而且PSTV经酚处理后也不改变其沉降速度^(6,10)。用酚提取的PSTV的侵染性核酸可被乙醇沉淀,侵染性得到相应的浓缩。这些证据都有利于认为PSTV是以游离核酸形式存在的。

2. PSTV的沉降性质

(1) PSTV的侵染性不为超离心所沉淀:

* 本文所用缩写: DNA=脱氧核糖核酸; DNase=脱氧核糖核酸酶; RNA=核糖核酸; RNase=核糖核酸酶; rRNA=核蛋白体RNA; TMV=烟草花叶病毒; tRNA=转移RNA。

PSTV的提取液经每分钟40,000转 (Spinco L 型离心机, 40号转头) 1小时超速离心后, 其侵染性仍存在于上清液中, 不为超离心所沉淀^(9,10)。已知病毒的沉降常数 ($S_{20,w}$) 都在50—100之间, 在此种超离心条件都应沉淀下来。可见 PSTV 的沉降常数比一般病毒小的多。

(2) 密度梯度离心: 用酚提取的 PSTV 在高低离子强度下, 在0.2—0.7克分子浓度的蔗糖密度梯度中每分钟24,000转离心2—4小时, 对侵染性的分部测定结果说明, PSTV 只存在于管的上部。也证明其沉降常数是低的。以17S和27S的 rRNA 为指示测知其沉降常数为10S左右^(6,11)。

(3) 平衡离心: 将 PSTV 的酚提取液在1.70克/厘米³的 CsCl 或1.617克/厘米³ Cs₂SO₄中每分钟35,000转 (Spinco L-2 型离心机, SW39 转头) 离心72小时。结果在 CsCl 梯度中只有1个 DNA 紫外吸收峰, 所有 RNA 都在沉淀中, 侵染性也只存在于沉淀中。在 Cs₂SO₄ 梯度中有一个 RNA 的主峰, 侵染性大致与此峰相符^(6,11)。这一实验与认为侵染性物质是RNA, 而不是DNA的看法是一致的。

3. PSTV 对 RNase 的敏感性: PSTV 在提取液中和寄主体内都对 RNase 非常敏感。

(1) 体外: 用酚或超离心制备的 PSTV (在0.005克分子浓度 K₂HPO₄ 中) 加入0.1—1.0微克/毫升的RNase, 在25℃下保温1—2小时就可使侵染性完全丧失, 而在同样条件下对 DNase 却完全不敏感 (表1)。在高离子强度下 (1.0克分子浓度 K₂HPO₄ 或0.15克分子浓度 NaCl-0.015克分子浓度柠檬酸钠 pH 7.0) 对RNase较抵抗^(6,10,11)。这一结果证实 PSTV 为RNA。

(2) 体内: PSTV 在体外对 RNase 的敏感性说明它是 以RNA 形式被提取出来的。但它在寄主体内还可能以核蛋白状态存在。为了验证这一点, 曾将 RNase (10微克/毫升) 真空渗入于感染 PSTV 的番茄叶组织中, 在25℃下保温22—25小时, 可以钝化95—100%原已存在的侵染性, 而真空渗入 DNase 则侵染性没有显著降低 (表1)。在相同试验条件下, 如将 RNase 渗入感染 TMV 的番茄叶组织中, 其侵染性没有可测定的变化⁽⁹⁾。这进一步证明 PSTV 在细胞内也是以RNA 状态存在的。迪纳⁽⁹⁾还研究了 PSTV 在各种细胞器上的分布, 结果指出 PSTV 存在于细胞核内, 而且是和染色质结合着的。这一事实也许是PSTV种子传病的一种可能的解释。

4. 在 PSTV 感染的番茄叶中没有外壳蛋白产生: PSTV 在体外和体内都不与蛋白质结合着, 那么在感染的植物中是否产生外壳蛋白呢? 为了回答这个问题, 泽特林 (Zaitlin, M.) 等曾用 H³-亮氨酸和 C¹⁴-亮氨酸分别标记感染 PSTV 的和健康的番茄叶中的蛋白质, 然后根据两种标记氨基酸的相对多入比例来测定 PSTV 的感染是否引起新的蛋白质的合成。结果在聚丙烯酰胺凝胶 (5, 10 和 15%) 电泳上没有发现相当病毒外壳的蛋白质⁽¹²⁾。在同一实验中, TMV 感染的番茄叶内却产生了大量外壳蛋白。

(三) PSTV 性质的进一步研究

上述证据都是以未经提纯的样品以侵染性为唯一的测定方法获得的。PSTV 为一无蛋白质的 RNA 这一结论的确立还必须用提纯的样品来验证。最近迪纳应用 DNase 处理、乙醇和 LiCl 沉淀、Sephadex

表1 PSTV对核酶的敏感性*

实验材料	核 酶 处 理	25℃保温时数	侵 染 性 指 数
酚提取的浓缩PSTV (在0.005克分子浓度K ₂ HPO ₄ 中)	无	0	150
	无	1	183
	1微克/毫升 RNase	0	12
	1微克/毫升 RNase	1	0
	1微克/毫升 DNase	2	156
	1微克/毫升 DNase	1	171
感染PSTV的番茄叶 片	渗入 10微克/毫升 RNase	22	0
	渗入 H ₂ O	22	98
	渗入 10微克/毫升 DNase	22	63
	渗入 H ₂ O	22	76

*根据迪纳资料⁽⁹⁾整理。

G100和羟基磷灰石分离液以及聚丙烯酰胺凝胶电泳等方法,由500克病叶中可提出30微克 PSTV 的RNA⁽⁹⁾。并用这一材料对 PSTV 的生物化学、生物物理性质进行了初步研究。

1. PSTV 的紫外吸收性质: 由感染 PSTV 和健康的番茄叶中提取的 RNA, 经20%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 从其260毫微米吸收图谱(图1)可以看到, 病叶 RNA 的吸收峰 I 是健叶中所没有的, 此吸收峰与侵染性完全重合, 因此吸收峰 I 即 PSTV。经过进一步纯化后, 测知其最高吸收为260毫微米; 最低吸收为234毫微米; 最高吸收光密度/最低吸收光密度 = 1.41; 260/280毫微米比值为2.2⁽¹⁰⁾。

2. PSTV 的热变性性质: 在低离子强度下 PSTV 的热变性曲线如图2所示, 变性后260毫微米的吸收共增加24%, T_m 约为50°C。从其热变性性质看, PSTV 不具有象双链RNA那样规则的二级结构, 但是它可能象 tRNA 那样是具有不规则二级结构的单链 RNA。加热变性的 PSTV 缓慢冷却时, 其 $\frac{A_{260}(T)}{A_{260}(20^\circ)}$ 只恢复70%, 说明此冷却的 PSTV 的二级结构与未加热的不同⁽¹¹⁾。但二级结构的丧失并不

影响其活性, 因为即使把 PSTV 加热到90°C (迅速冷却)⁽¹²⁾ 也不失去侵染性, 可能二级结构对侵染性并不是必须的。PSTV 为单链 RNA 的看法, 还得到免疫学实验的证明⁽¹³⁾。

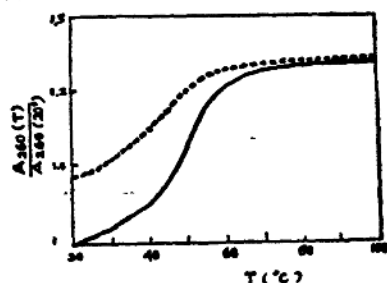


图2. PSTV 的热变性曲线 (—) 和缓慢冷却时的吸收变化 (.....)。⁽¹¹⁾

3. PSTV 分子量的初步测定: 根据 PSTV 的低沉降常数和不含低密度的脂类, 估计其分子量是很小的。用密度梯度离心法和聚丙烯酰胺凝胶电泳法的测定证实了这一点。

(1) 密度梯度离心法: 提取的 PSTV 用几种已知沉降常数和分子量的核酸作为标准, 每分钟24,000 转离心24—26小时, 测出各样品的沉降常数。根据吉尔 (Giere) 公式计算分子量。在各梯度中 PSTV 有两个峰, 其分子量分别为 4.7×10^4 和 7.5×10^4 ⁽¹⁷⁾。

(2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳法: 将提取的 PSTV 和几种已知分子量的 RNA 在3%、5%、7.5%、10%和20%的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳, 根据相对迁移率与已知 RNA 的分子量标出 PSTV 的分子量。在20%聚丙烯酰胺凝胶电泳上只得到一个带, 其分子量 5×10^4 , 但在其他浓度的聚丙烯酰胺凝胶电泳中也可分别测出分子量为 2.5×10^4 、 7.5×10^4 和 1×10^5 的成分。对 PSTV 组分的这种多型性, 迪纳的解释是, 分子量为 2.5×10^4 的组分是无侵染性的单体, 其二聚体为 5.0×10^4 , 三聚体为 7.5×10^4 , 四聚体为 1×10^5 ^(11,12)。

(四) 讨论

迪纳实验室关于 PSTV 的工作, 虽然已得到一个加拿大实验室⁽¹⁸⁾ 和另一个美国实验室⁽¹⁹⁾ 的部分证实, 但由于在大多数研究中用的是未经提纯的材料, 以及侵染性几乎作为唯一的测定方法, 因此还需要从生物化学和生物物理学的研究中得到进一步的证实。尽管如此, 从已有的资料可以肯定 PSTV 与一般病毒的性质是十分不同的。虽然在 TMV⁽²⁰⁾ 和 TRV⁽²¹⁾ 中曾发

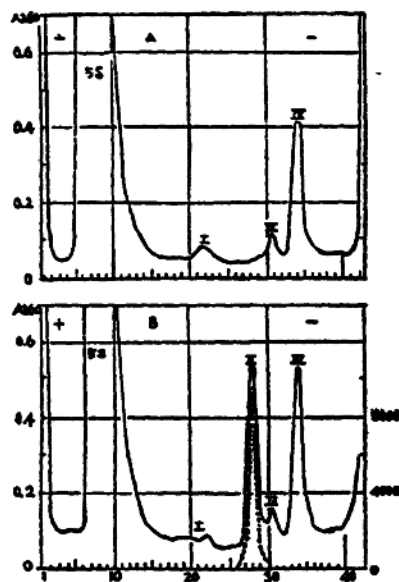


图1. 健叶(A)和病叶(B)提取的RNA经20%聚丙烯酰胺凝胶电泳后的紫外吸收(—)和侵染性指数(···)的分布。5S为5SrRNA⁽¹¹⁾。

现有不与蛋白质结合的RNA突变种,但这些缺陷株都是极不稳定的和难于传染的,在自然界不能生存的人工产物。而PSTV和这些缺陷株不同是十分稳定和极易传染的,在自然界有广泛的分布。

PSTV可能是一种比病毒更简单的生命形式的代表。近年来发现柑橘剥皮病毒(Citrus exocortis virus)也是一不含蛋白质的低分子量RNA(分子量为 1×10^6)⁽²²⁻²⁷⁾。菊花褪化病毒也可能是类病毒的一员⁽²⁸⁾。在动物病毒方面,根据迪纳的意见,“斯克赖波”(Scrapie)似应归入类病毒⁽⁹⁾它引起羊的神经性疾病,以往曾根据“斯克赖波”可通过细菌过滤器,而把它归入病毒,其性质在很多方面与PSTV相似。例如它们都是致死温度较高,很易传染的病原体;都具有很长的潜伏期;在病组织中观察不到病毒样子的颗粒;都具有低的分子量。用电离辐射钝化法,根据“靶子容积”(Target volume)的计算“斯克赖波”的分子量为 1.5×10^6 ⁽²¹⁾。对于“斯克赖波”之所以抵抗紫外线照射和核酸酶的作用,则认为可能是由于“斯克赖波”与某些细胞成分结合着的缘故。

类病毒之所以引起生物学工作者的浓厚兴趣,是因为这种新的生命形式的发现为实践和理论研究开辟了新的领域。在实践上,类病毒可能是生物疾病的一个重要类型。它可能包括着一些未知病原和以往归入病毒的一些疾病。大家知道,归为病毒性病害的一些原则,有时是极不确切的。例如就某些植物病毒病来说,对一些可以机械接种传染的病害主要是根据其过性,但是对一些不能机械传染的病害,则只是由于可信其他方式传染(昆虫,嫁接)。近年来发现过去认为是病毒引起的一些植物病害,其真正病原却是类胸肺炎炎微生物(PPLO)也说明了这种情况。对PSTV性质的研究为寻找其他类病毒提供了指示。但是就传染性而言,其他类病毒不一定象PSTV那样稳定和容易传染(这正是PSTV被首先发现的原因)。有的可能很难传染,甚至只有纵的传染,而无横的传染。根据类病毒游离核酸本质的阐明,可以想象其分离,培养,传染,免疫和治疗等方面将不同于一般的病毒。这对于类病毒病的防治是很重要的。

在理论上类病毒的发现对生物学上一些基本问题的研究,例如生命起源,模板的演化等将产生影响。类病毒是低分子量的核酸,如PSTV的分子量以50,000计,所含核苷酸数不超过150个,为分子生物学中结构与功能以及人工合成的研究提供了一个合适的材料。象PSTV这样低分子量的RNA的复制也是一个新问题。病毒核酸的分子量一般都不低于 1×10^6 ,可编码几种蛋白质。而类病毒核酸所含遗传信

息量很小,不足以产生自身复制所需的核糖聚合酶。也未发现有所谓“协助”病毒的存在⁽¹⁹⁾,因此其复制也不同于卫星病毒。根据现有知识可提出两种可能的复制机制。(1)用寄主中正常的依赖于DNA的RNA聚合酶进行复制,其模板来源有两种可能的途径,其一,可以设想寄主DNA的某些片断作与模板,类病毒的侵入使这些DNA片断起解阻抑的作用而被活化。其二,也可设想寄主中存在的反转录酶(在健康哺乳动物细胞已证明存在这种酶⁽²²⁾)将类病毒的RNA反转录为DNA,再起模板的作用。(2)类病毒也可能借助寄主体内已存在的依赖于RNA的RNA聚合酶(在健康的白菜叶细胞中已证明存在这种酶⁽⁹⁾)或多核苷酸磷酸化酶而复制。可以预期,类病毒复制机制的阐明必将促进这一领域的发展。

参 考 资 料

- (1) Alper, T., 1966, *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, 22, 278-284
- (2) Altenburg, E., 1946, *Amer. Natur.*, 80, 559-567.
- (3) Astier-Mansfacier, S. & Cornuet, P., 1971, *Biochim. Biophys. Acta*, 232, 318.
- (4) Cadman, C. H., 1962, *Nature*, 193, 48.
- (5) Diener, T. O., In *Comparative Virology* pp. 433-478
- (6) Diener, T. O., 1971, *Virology*, 43, 75-89.
- (7) Diener, T. O., 1971, *Virology*, 45, 411-428.
- (8) Diener, T. O., 1972, *Nature*, 235, 218-219.
- (9) Diener, T. O., 1972, *Virology*, 50, 606-609.
- (10) Diener, T. O., & Raymer, W. B., 1967, *Science*, 158, 378-381.
- (11) Diener, T. O., & Raymer, W. B., 1969, *Virology*, 37, 351-366.
- (12) Diener, T. O., & Smith, D. R., 1971, *Virology*, 46, 498-499.
- (13) Diener, T. O., Smith, D. R., & O'Brien, M. J., 1971, *Virology*, 43, 844-846.
- (14) Goss, R. W., 1956, *Phytopathology*, 46, 299-303.

DETECTION OF *CHRYSANTHEMUM* STUNT VIROID BY MOLECULAR HYBRIDIZATION ANALYSIS AND POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS*

CHEN WEI (陈 伟), TIAN YINGCHUAN (田颖川), LIU YONG (刘 勇)**,
PENG BO (彭 勃)***, XIA YUANNAN (夏远南) AND TIAN BO (田 波)

(Institute of Microbiology, Academia Sinica)

Received January 22, 1981.

It has been discovered in the past few years that viroid is a new kind of pathogen, which causes diseases in some important economic plants. Viroids may also be the causative agents of certain animal and human diseases⁽¹⁾. Containing only nucleic acid species of low molecular weight, viroid is a suitable material for the studies of structure and function of nucleic acid and the origin of life.

The existence of potato spindle tuber viroid in China has been demonstrated⁽²⁾. Symptoms similar to that of *Chrysanthemum* stunt viroid⁽³⁾, such as stunting, chlorotic and yellow spot, were observed recently on *Chrysanthemum* in Beijing and Guangzhou. Diseased and healthy plants (Fig. 1) of *Chrysanthemum* "Guanghuang" and "Guangbai" were collected in the Temple of Heaven, Beijing, in May, 1980. By infection test carried out in insect-proof greenhouse and in laboratory, molecular hybridization analysis using complementary DNA and polyacrylamide gel electrophoresis, the existence of CSV in China has been demonstrated.

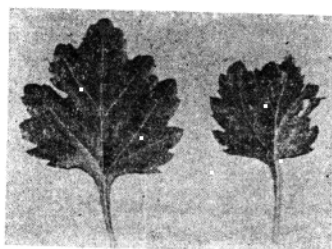


Fig. 1. Leaves of *Chrysanthemum* stunt disease.

Left—healthy leaf; right—diseased leaf.

* The study of viroids was carried out under the guidance of Drs. J. W. Randles and P. Palukaitis during their stay in our Institute. Dai Renmin and Kang Liangyi also participated partially in the work. Lin Saoguang of the Gardens Bureau of Beijing Municipality cooperated in collecting plant materials.

** Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica.

*** Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica.

I. INFECTION EXPERIMENT

Gynura aurantiaca is the most sensitive host for identifying CSV⁽⁴⁾. Needle-puncture method was used in inoculation. Leaves of *G. aurantiaca* grown to 5—6 leaves were cut off from petioles with a sterilized razor, leaving 2—3 small tender leaves on the top of the plant. Sap from diseased or healthy *Chrysanthemum* was dropped onto the surface of petiole excision and on the stem, then the sap dropped positions were punctured with needles. Such inoculated plants were incubated in greenhouse at 30—35°C. The top leaves of *G. aurantiaca* inoculated with the sap from diseased plant became small and epinasty (Fig. 2) and severe syndrome appeared on the new leaves (Fig. 3), in the contrast, the *G. aurantiaca* inoculated with the sap from healthy plant grew normally.



Fig. 2. Symptom of *Chrysanthemum* stunt viroid on *G. aurantiaca*.
Left—control; right—infected.

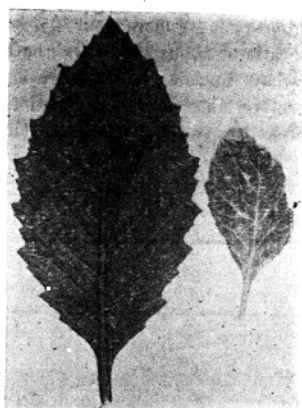


Fig. 3. Symptom of CSV on the leaves of *G. aurantiaca*.
Left—control; right—infected.

II. HYBRIDIZATION EXPERIMENT WITH COMPLEMENTARY DNA (cDNA)

The detection of viroid using cDNA as a probe is very sensitive and has high specificity⁽³⁻⁵⁾. Using ³H-CSV-cDNA provided by Dr. P. Palukaitis of the University of Adelaide, Australia as a probe, we detected the presence of *Chrysanthemum* stunt viroid in China.

Partially purified nucleic acids (for purification method see part III) from healthy and diseased *Chrysanthemum* leaves were hybridized to cDNA. Three μ l of ³H-CSV-cDNA (1500 cpm/ μ l) were added to the sample solution in hybridization buffer (0.18 M NaCl, 0.01 M Tris, 0.001 M EDTANa₃, 0.05% SDS, pH 7.0) in a volume of 40 μ l, the mixture was then sucked up into a siliconized capillary and the capillary was sealed and heated for 3 min in boiling water. Hybridization was carried out at 60°C for 60 hr.

After 60 hr hybridization, the samples were removed from the capillaries to 450 μ l S_1 assay buffer (0.05 M NaCl, 0.001 M $ZnSO_4$, 5% glycerol, pH 4.6) containing 0.004% denatured salmon DNA. Two hundred μ l aliquots of this mixture were transferred to two test tubes respectively. To one of the two tubes, 20 units of nuclease S_1 were added and both tubes were then incubated at 45°C for 30 min. To terminate the reaction, 1 ml 10% TCA was added to each tube and 10 μ l 1% calf serum albumin were also added as carrier. After precipitation for 30 min in an ice bath, the samples were filtered onto a millipore filter (45 μ), washed three times with 5% TCA and 95% alcohol respectively. After drying up, the filter was put into a vial containing 2 ml toluene scintillation fluid and the radioactivity was counted in a NE-801 liquid scintillation counter and the hybridization percentages were calculated. The results are shown in Table 1.

Six samples from diseased plants hybridized with 3H -CSV-cDNA had a hybridization ratio of more than 70% while the samples from healthy plants had a hybridization ratio of about 10%. On the basis of many experiment data, it is considered that they have nucleic acid sequence homology if the hybridization ratio reaches over 40%. Therefore, the results indicated that all six diseased plants were infected with CSV, whereas the two control plants (healthy) were not.

Table 1
Hybridization Ratio of Nucleic Acid Extracts From Stunted and Healthy
Chrysanthemum Leaves With 3H -CSV-cDNA

Samples		cpm		Hybridization Percentage (%)
		Plus nuclease S_1	Without nuclease S_1	
Diseased leaves	CD ₁	424	430	99
	CD ₂	370	525	70
	CD ₃	343	444	77
	CD ₄	311	416	75
	CD ₅	301	340	72
	CD ₆	235	256	92
Healthy leaves	CH ₁	35	342	10
	CH ₂	40	342	12
Purified CSV(V ₁₂) as a standard		201	215	93

III. PARTIAL PURIFICATION AND POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS OF CSV^(4,9)

Fifty g leaves from diseased (CD₁-CD₆) or healthy (CH₁, CH₂) *Chrysanthemum* were homogenized in 75 ml solution A (1 M NaCl, 1% SDS, 0.2 M Tris, adjust pH to 8.5 with HCl) and 75 ml solution B (25 mM Mg (OAc)₂, 5% polyvinylpyrrolidone, 2% sodium azide, 2% 2-mercaptoethanol, 1 mM mercaptobenzothiazol, 1% sodium diethyldithiocarbamate) with a Waring blender at high speed. To the homogenate, 20 g NaCl were added and the homogenate was stirred continuously for 20 min, then kept in an ice bath for 30 min. After centrifugation of the homogenate at 15,000×g for 20 min,

the supernatant was removed and the nucleic acids in the supernatant were precipitated with 2.5 volumes of cold alcohol at 0°C for more than 2 hr. The precipitate was collected by centrifugation and dried *in vacuo*. The dried precipitate was then resuspended in 8 ml solution A with half of its concentration (containing 1% 2-mercaptoethanol). After low speed centrifugation, 2 ml 90% saturated phenol (containing 0.1% 8-hydroxyquinoline) and 2 ml TCA were added to the supernatant. The mixture was shaken or stirred for 20 min and then centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min. The supernatant was dialyzed against 1000 ml dialyzing solution (1 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) with two changes at 4°C for 16 hr, and then 4 M NaOAc were added to a final concentration of 0.2 M. Cold alcohol (2.5 volumes) was added to the dialyzed solution and left at 0°C for more than 3 hr. The precipitate was collected by centrifugation at $10,000 \times g$ for 10 min and dried *in vacuo*.

The dried samples were resolved in TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM NaOAc, 2 mM EDTA, pH 8.1) containing 10% sucrose. Gel electrophoresis of the samples was performed on 5% polyacrylamide disc gel (0.6×12 cm) at 4 mA/gel for 5 hr, using TAE as the electrophoresis buffer. After electrophoresis, the gels were scanned at 265 nm, and then stained with toluidine blue and destained in distilled water. The nucleic acid from diseased plant gave a significant UV-absorption peak on the profile of UV scanning and a stained band on the gel, whereas the nucleic acid from healthy plant did not (Fig. 4). If the gels were loaded with the nucleic acid from diseased tissue and CSV standard sample (V_{ss}) provided by Dr. Palukaitis respectively and electrophoresis was run simultaneously under the same condition, the nucleic acid bands and the UV absorption peaks appeared at the same position (Fig. 5).

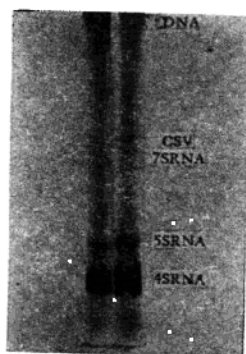


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of low molecular weight RNAs from CSV-infected and healthy *Chrysanthemum* leaves. Left—healthy; right—infected.

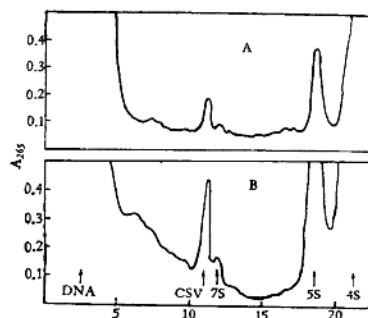


Fig. 5. UV-scanning profile of low molecular weight RNAs from CSV-infected and healthy *Chrysanthemum* leaves after polyacrylamide gel electrophoresis. A—CSV- V_{ss} (standard); B—CSV-c.

The CSV band on the gel was cut down and homogenized with 0.5 ml of 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) in a glass homogenizer. The slurry homogenate was incubated at 60°C for 30 min and then chilled in an ice bath. After centrifugation at 4000

rpm for 10 min, the supernatant was used as inoculum to inoculate *G. aurantiaca* and as a result, it caused typical symptom of CSV. Thus, it was confirmed that the nucleic acid band above 7S RNA band on the gel must be CSV.

REFERENCES

- [1] Diener, T. O., *Viroids and Viroid Diseases*, John Wiley & Sons, 1979, 210—215
- [2] 田波等, 我国马铃薯纺锤形块茎类病毒的初步研究, 病毒学集刊, 1980 (印刷中).
- [3] Diener, T. O. et al., *Virology*, 55(1973), 94.
- [4] Palukaitis, P. et al., *J. Gen. Virol.*, 46(1980), 477.
- [5] Randles, J. W. et al., *ibid.*, 43(1979), 649—662.
- [6] Gould, A. R. et al., *Nucleic Acids Research*, 11(1977), 3787.
- [7] Palukaitis, P. et al., *FEBS Letters*, 92(1978), 268.
- [8] ———, *Virology*, 98(1979), 238.
- [9] Loening, V. E., *Biochemical Journal*, 102(1967), 251.

用互补 DNA 分子杂交和聚丙烯酰胺凝胶电泳测定我国菊花矮化类病毒

陈炜 田颖川 刘勇* 彭勃** 夏远南 田波

(中国科学院微生物研究所)

由北京天坛公园采集的有矮化症状的菊花叶片(广黄、广白品种)的汁液接种爪哇三七(*Gynura aurantiaca*),产生菊花矮化类病毒(CSV)的典型病状。其部分提纯核酸样品与 CSV 的 ^3H -cDNA (互补 DNA) 有 70% 以上的杂交率,在 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳上有一条 CSV 所特有的带,而健叶均无上述反应。证明了 CSV 在我国的存在。

类病毒是近年来发现的一类新的病原物,它引起一些重要经济植物的病害,还可能是某些人和动物疾病的病原^[1]。由于类病毒只有低分子量核酸,它也是研究核酸结构与功能和生命起源问题的材料。

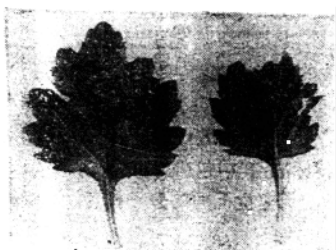


图1 菊花矮化病叶
左:健叶; 右:病叶

我们已证实马铃薯纺锤形类病毒在我国的存在^[2]。最近又在北京和广州的菊花上观察到植株矮化、叶色褪绿并出现黄斑的类似菊花矮化类病毒的症状^[3]。1980年5月,从北京天坛公园“广黄”和“广白”品种上采集病株和健株样品(图1),在防虫温室和实验室中进行了感染实验、互补 DNA 分子杂交实验和聚丙烯酰胺凝胶电泳实验,证实了 CSV 在我国的存在。

一、感染实验

爪哇三七是诊断 CSV 最灵敏的鉴别寄主^[4]。接种方法为针刺法。用消毒刀片将 5—6 片叶子的爪哇三七植株由叶柄处切掉叶片,只留顶端 2—3 片小嫩叶。把由病株和健株的菊花叶所榨取的汁液滴在叶柄切口和茎上,然后用针刺滴有接种物的部位。将植株培养在 30—35℃ 温室中,2—3 周后用病叶汁液接种的爪哇三七顶端叶片变小、皱曲并向叶背反卷(图2)。此后长出的叶片都表现出严重的病状(图3)。而健叶汁液接种的爪哇三七则一直生长正常。

二、互补 DNA (cDNA) 杂交实验

用类病毒的 cDNA 作为探针来检测类病毒是既灵敏又有很高特异性的方法^[5-7]。我们用

本文 1980 年 12 月 1 日收到。

* 中国科学院武汉病毒研究所。

** 中国科学院上海生物化学研究所。

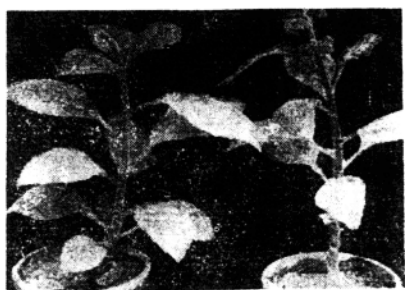


图2 爪哇三七接种菊花矮化类病毒后的病状
左: 对照; 右: 接种



图3 爪哇三七接种菊花矮化类病毒后的叶片病状
左: 对照; 右: 接种

澳大利亚阿德雷德大学 Palukaitis 博士提供的 ^3H -CSV-cDNA 作为探针检测我国菊花中菊花矮化类病毒的存在。

首先从采集的菊花健叶和病叶组织进行核酸的部分提纯【提纯方法见第三节】，然后与 cDNA 进行分子杂交。取 3 微升 ^3H -CSV-cDNA (1500cpm/微升) 加入已溶解在杂交缓冲液 (0.18M NaCl, 0.01M tris, 0.001M EDTA, 0.05% SDS, pH7.0) 的待测样品中, 使总体积为 40 微升, 封装在硅化过的玻璃毛细管中, 在 100°C 水浴中煮沸 3 分钟使其热变性, 然后立即放入 60°C 水浴中杂交 60 小时。

表1 矮化和健康菊花叶核酸提取物与 CSV- ^3H -cDNA 杂交率

样 品		每 分 钟 计 数 (cpm)		杂 交 百 分 率
		+S ₁ 核 酸 酶	-S ₁ 核 酸 酶	
病 叶	CD ₁	424	430	99
	CD ₂	370	525	70
	CD ₃	343	444	77
	CD ₄	311	416	75
	CD ₅	391	340	72
	CD ₆	235	256	92
健 叶	CH ₁	35	342	10
	CH ₂	40	342	12
CSV 标准样品 (V ₀)		201	213	94

杂交 60 小时后将样品移入含 0.004% 的变性鲑鱼 DNA 的 S₁ 测定缓冲液 (0.05M NaCl, 0.03M NaOAc, 0.001M ZnSO₄, 5% 甘油, pH4.6) 中, S₁ 测定缓冲液体积为 450 微升。混匀后分别取 200 微升分别加到两个试管中, 加 S₁ 核酸酶到一个试管中, 每管 20 单位, 另一个不

加 S_1 核酸酶。两份都在 45°C 保温 30 分钟, 加入 1 毫升 10% 三氯乙酸以终止反应, 加入 10 微升 1% 的牛血清白蛋白作为沉淀的载体。在冰浴中沉淀 30 分钟, 然后将样品洗在微孔滤膜 (0.45 微米) 上, 用 5% 三氯乙酸和 95% 乙醇各洗三次。将微孔滤膜干燥后, 放入装有 2 毫升甲苯闪烁液的测定瓶内, 在 NE8312 液体闪烁仪上测 ^3H 放射性计数, 然后计算杂交率, 结果见表 1。

六个病株样品与 ^3H -cDNA 的杂交率均在 70% 以上, 而两个健株样品的杂交率只有 10% 左右。根据许多实验数据, 40% 以上的杂交率才能证明有核酸序列上的同源性。以上结果说明所用的六个病株都感染了 CSV, 而两个对照(健株)没有感染 CSV。

三、CSV 的部分提纯和聚丙烯酰胺凝胶电泳^[8,9]

取上述 CD_1 - CD_6 的病菊花叶和 CH_1 、 CH_2 的健叶各 50 克, 在 75 毫升溶液 A (1M NaCl, 1% SDS, 0.2M tris, 用盐酸调 pH 至 8.5) 和 75 毫升溶液 B (25mM 醋酸镁, 5% 聚乙烯吡咯烷酮, 2% 叠氮化钠, 2% 2-巯基乙醇, 1mM 巯基苯并噻唑, 1% 二乙基-二硫代氨基甲酸钠) 中用组织捣碎机高速匀浆后, 在室温下边搅拌边加入 20 克氯化钠, 继续搅拌 20 分钟后在冰浴中放 30 分钟, $15,000 \times g$ 离心 20 分钟, 取上清液加入 2.5 体积的冷乙醇, 0°C 以下静置 2 小时以上, 离心收集沉淀, 真空干燥。将沉淀物悬浮在 8 毫升 1/2 浓度的溶液 A 中 (含 1% 2-巯基乙醇), 然后 $4000 \times g$ 离心 10 分钟, 取上清液加入 2 毫升 90% 的酚溶液 (含 0.1% 的 8-羟基喹啉), $2 \times 10^3 \times g$ 离心 10 分钟, 振荡或磁力搅拌 20 分钟, $4000 \times g$ 离心 10 分钟, 取上清液对 1000 毫升含 1mM NaCl, 0.1mM EDTA 溶液在 4°C 下透析 16 小时 (中间换透析液一次)。透析后加入 4M 醋酸钠使溶液中醋酸钠浓度达 0.2M。加入 2.5 体积的冷乙醇, 0°C 以下静置 3 小时以上, $10,000 \times g$ 低温离心, 收集沉淀, 真空干燥。

将干燥的样品溶解在含 10% 蔗糖的 TAE 溶液 (40mM tris, 20mM NaOAc, 2mM EDTA, pH8.1) 中。在 5% 的聚丙烯酰胺管状 ($0.6 \times 12\text{cm}$) 凝胶上进行电泳, 用 TAE 作电泳缓冲液, 电流以 4mA/管, 进行 5 小时, 电泳后用甲苯胺蓝染色。结果在病组织提取的核酸中出现一

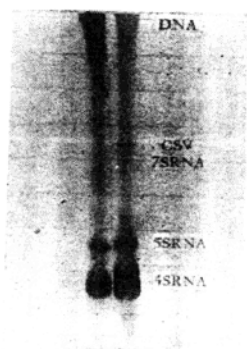


图 4 感染矮化类病毒和健康菊花叶的低分子量核酸的聚丙烯酰胺凝胶电泳图
左: 健康的; 右: 感染的

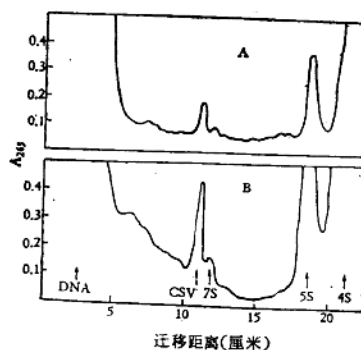


图 5 感染矮化类病毒菊花叶的低分子量核酸的聚丙烯酰胺凝胶电泳图
A 为 CSV-V₁₁; B 为 CSV-C