

## 我国水稻齿叶矮缩病毒的分离提纯及 病毒形态和核酸的研究

吴建华 陆惠华 陈作义 龚祖埙

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

林瑞芬 金登迪

(浙江农业科学院病毒研究室, 杭州)

### 提 要

应用比较简单的一次四氯化碳澄清, 二次聚乙二醇浓缩沉淀, 差速离心和20%—50%的蔗糖密度梯度离心, 可以获得分离提纯效果较好的水稻齿叶病病毒(RRSV)制剂, 在260nm处有最大吸收值, 在 $A_{260}/A_{280}$ 的比值为1.6。用醋酸铀负染方法, 可以观察到RRSV为直径54nm—65nm的球状颗粒, 具有底部较宽的突起, 突起的高度为8—11nm, 宽度约为22nm。病毒的核酸为双链RNA, 共有十组分散的基因组, 这一结果和四方<sup>[5]</sup>报道的一致, 在这一提纯病毒的制剂中, 尚发现有其他三种大小不同的球状和线状颗粒, 对它们的可能来源进行了讨论。

水稻齿叶矮缩病是70年代后期发现的一种新的, 比较严重的水稻病毒病害<sup>[1]</sup>。最初流行于印度尼西亚、印度、菲律宾、泰国、斯里兰卡等东南亚国家, 以后在我国也有发现。起先在台湾、福建, 后来扩展到广东、湖南、江西、浙江等省。

我国的水稻齿叶矮缩病毒(RRSV)的生物学特性及电镜观察虽有一些报道<sup>[2]</sup>, 但这一病毒在我国还未被分离提纯过, 也未明确, 是否和国外报道的病毒一致。本文报道我国水稻齿叶矮缩病毒的分离提纯方法以及对病毒进行的形态和核酸的研究结果, 并讨论了我国RRSV和国外报道的RRSV之间的关系。

### 材料和方法

#### 1. RRSV 毒源和传毒介体: RRSV 毒源于1980年秋来自福建建阳地区大田典型病

作者感谢本所曹天欽教授对本工作的支持和指导。

中国科学院科学基金资助的课题

本稿1986年元月27日收到

株，症状表现为植株矮缩，叶缘呈齿裂，叶尖卷曲，叶鞘上可见脉肿。经无毒介体褐稻虱 (*Nilaparvata Lugeus*) 饲毒分离，并不断通过饲毒介体，接种水稻，保存毒源。

介体褐稻虱采自浙江省农科院农场（无RRSV区），人工饲养繁殖。无毒介体以无病健稻饲养，有毒介体以2龄若虫在典型病稻上吸食饲毒5—7天，再转移至健稻饲养，在日平均温度25℃以上时，约需20天以上的循环期，至成虫即可供接种之用。水稻品种，矮脚南特，接种稻苗约4—5叶期。

**2. RRSV 的接种：**以二端通玻管为接种工具，一端先包上纱布，然后每管内放上4—5只带毒介体褐稻虱和二棵稻苗，下端再包纱布，将玻管竖立于水盘中，接种24—36小时后，将饲毒过的稻苗移种于防虫条件下，约25天左右，出现RRSV的典型病症，至45—60天采收病稻作为实验材料。

**3. 水稻齿叶矮缩病病毒的分离纯化：**取典型病症的新鲜叶子100克，加入三倍体积的0.3M甘氨酸-0.01M氯化镁缓冲液，pH7.6。绞肉机绞碎，尼龙纱布过滤，滤汁3000转/分，离心15分钟，按上清的体积加入25%的四氯化碳，激烈振荡5分钟，静止分层，弃去底部四氯化碳及杂质层，上层经6000转/分，离心15分钟，按上清液体积加入6%聚乙二醇（分子量6000d）和3%的氯化钠。冰浴中搅拌，溶解后存放4℃过夜。7000转/分，离心15分钟，取沉淀，用0.1M甘氨酸-0.01M氯化镁缓冲液，pH7.2，悬浮沉淀物，6000转/分，离心20分钟，重复四次。最后合并收集上清液。进行第二次聚乙二醇沉淀（6%的聚乙二醇，3%的氯化钠），将最后收集的上清液。在40,000转/分，离心90分钟，沉淀物用1ml的0.1M甘氨酸-0.01M氯化镁缓冲液，pH7.2，重新悬浮，6000转/分，离心20分钟。重复三次，经20%—50%的连续蔗糖密度梯度离心，16,000转/分，离心3小时，除收集清晰的乳白色病毒带外，再从管底部穿刺取样，每2毫升为一管，共分10管，再经一次差速离心，沉淀悬浮液经电镜观察后，合并收集有乳浊光的上清液。

**4. 水稻齿叶矮缩病病毒的电镜观察：**取部分提纯的病毒样品点于火棉胶-碳膜覆盖的铜网，1%醋酸铀负染，在日立H-3000电镜下进行观察。

**5. 水稻齿叶矮缩病病毒的RNA的分离：**RRSV制剂中加入1%SDS，使溶，振荡2分钟，加入等体积有机溶剂（饱和酚：氯仿：异戊醇，25:24:1），室温振荡10分钟，8000rpm，离心5分钟，水相用有机溶剂反复抽提至变性蛋白层消失，水相中加几滴pH5.2的3M乙酸钠，加2倍体积预冷乙醇，-80℃放过夜。15,000rpm，离心20分钟，沉淀用75%乙醇洗涤1—2次，沉淀溶解于重蒸水。

**6. 水稻齿叶矮缩病病毒RNA聚丙烯酰胺凝胶电泳：**按常规方法制备含10%的丙烯酰胺，0.26%的N,N'-甲叉双丙烯酰胺，注入玻璃板（厚1.5cm，长16cm）形成凝胶，在10微升部份纯化的RRSV制剂中加入10微升样品缓冲液（20%蔗糖，2%SDS，4M尿素，用2倍浓度的电泳缓冲液，1%巯基乙醇，pH7.4）。60℃作用5分钟，迅速冷却。电泳缓冲液使用L缓冲液（40mM Tris，20mM Sodium acetate和2mM EDTA，pH7.4），电流20mA，泳动40小时，电泳完毕EB染色，20分钟后紫外观察。

## 结果与讨论

### 1. RRSV 的分离提纯

与国外报道的 RRSV 纯化方法相比较<sup>[3]</sup>, 我们使用了比较简单的一次四氯化碳澄清, 二次聚乙二醇浓缩沉淀, 一次差速离心和一次20%—50%的蔗糖密度梯度离心方法, 可以获得分离提纯效果较好的病毒制剂。经蔗糖密度梯度离心, 可获得清晰的两条病毒带(图1)。第一条病毒带颜色较淡, 经电镜检查, 病毒含量较第二条病毒带少, 并且以空壳为多。第二条病毒带乳白色浓, 绝大部分病毒集中于第二条带内。病毒带经透析稀释后测定, 在紫外全波吸收光谱中, 表现出典型的病毒吸收曲线(图2), 在260nm处有最大吸收值; 260nm/280nm的比值达1.6。应用这一分离提纯的病毒制剂在测定病毒核酸的种类和分子量时, 凝胶图谱上未发现存在有任何寄主核酸。

### 2. RRSV 的形态观察

提纯的RRSV制剂, 应用UAC负染方法, 在电镜下可观察到大量直径为54—65nm的球状病毒(图3), RRSV颗粒具有底部较宽的突起, 突起的高度为8—11nm, 突起的宽度约为22nm, 由于突起可能位于病毒颗粒20面体的12个顶点上, 所以无论在2、3、5、对称的位置, 在电镜下均能看到6个突起, 有时, 隔离的3个突起位于20面体的表面, 负染相衬颜色较深。另外, 隔离的三个突出于颗粒表面, 清晰可见。

Milne<sup>[4]</sup>和四方<sup>[5]</sup>均报道了RRSV的形态研究工作, 我们的结果和上述报道相近。

国外已有的报道都认为, RRSV颗粒不具有双层衣壳, 因此在形态上和具有双层衣壳的植物呼肠孤病毒, 例如水稻黑条矮缩病毒不同。在我们提纯病毒制剂中, 除大量存在有上述典型的RRSV颗粒外, 还能发现经常伴有下述三种形态不同的颗粒。

(1) 平均直径约比RRSV大10nm的球状颗粒。这类球状颗粒染色较浅, 似膜状, 表面结构明显。在个别的颗粒表面也似有突起(图4)。这一类颗粒的本质目前尚难确定, 是否为RRSV的外膜还是其它来源的聚合物尚需进一步研究。

(2) 直径约为35nm的小球状颗粒结构紧密(图4)。Kawano<sup>[3]</sup>等在报道RRSV的分离提纯和形态研究时也曾提及这一类似病毒的小颗粒, 并认为和RRSV无关, 可能是另一种不知来源的病毒。我们的初步实验证明, 这类小颗粒也许和RRSV有关, 是RRSV病毒颗粒蛋白质或核蛋白体的聚合物(待发表材料)。

(3) 我们在RRSV提纯过程中, 发现始终伴随有一种长短粗细不一的线状颗粒

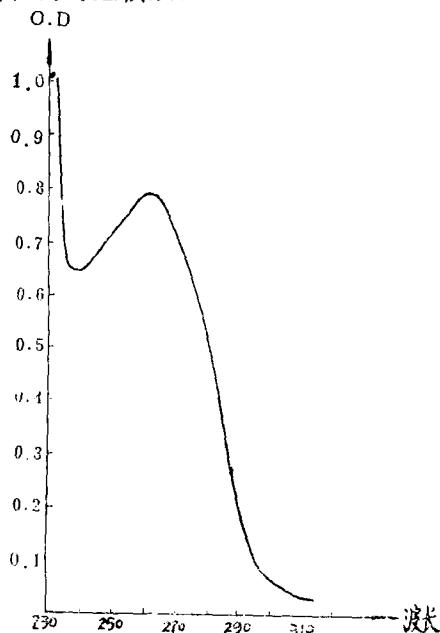


图2 RRSV提纯制剂的紫外吸收曲线

Fig. 2. The curve of UV for purified preparations of RRSV.

(图3)，这类线状颗粒在形态上有些类似于线状病毒。在健稻制剂中，虽也能发现相似的线状物，但数量少得多，而且随RRSV的提纯分离，这类线状物明显增加。

我们认为这类线状物一种可能来源自寄主的本身，作为病毒感染的反应而增生，因而在病稻中含量较大，随病毒的浓缩而浓缩。第二种较大可能是和病毒有关，特别是病毒的突起在提纯过程中可能脱落，从而聚集成不同形态的线状物。

在我们的试验材料中杂有其它的水稻病毒可能性不大。在目前已知的14种水稻病毒中，由同一介体传毒褐稻虱(*N. Lugeus*)传播的，只有水稻草丛矮缩病毒(*Grassy stunt virus*)，而水稻草丛矮缩病病毒的本质迄今尚未明确，一种认为是20nm的球状。另一种则认为是宽度为5—12nm的线状<sup>[2]</sup>。后者与我们的线状颗粒有些相似，但是浙江地区为水稻草丛矮缩病非发病地区，而且发病材料中也未见有典型的草丛矮缩病毒的典型病症。

### 3. RRSV的RNA研究

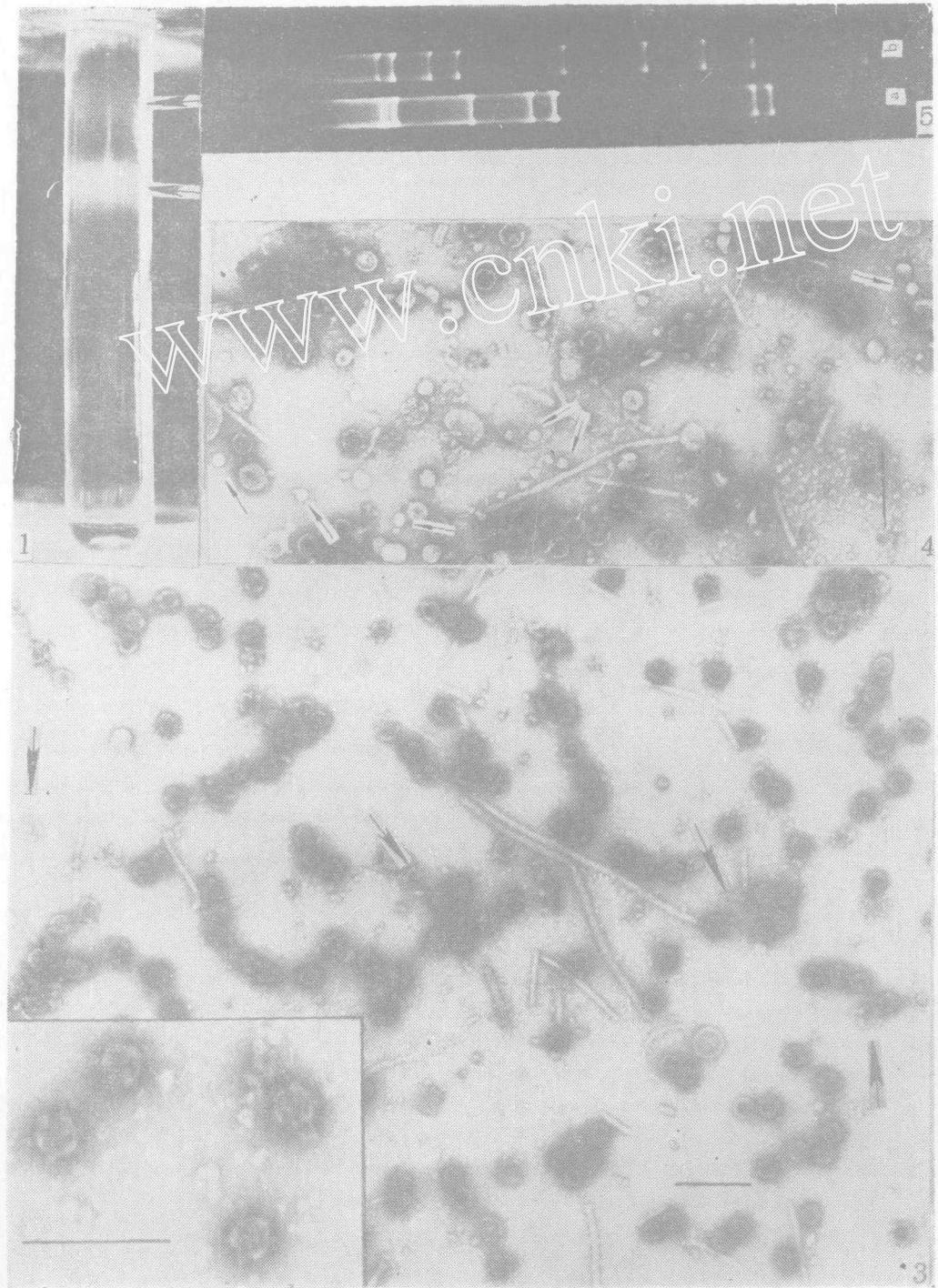
病毒基因组性质的研究对于确定病毒的分类地位和了解不同地区发现的引起相同病症的病毒之间关系是极为重要的，最初 Milne<sup>[7]</sup>等对RRSV基因组的研究结果表明，RRSV含有8组分散的双链RNA，以后，四方等<sup>[5]</sup>利用不同浓度的聚丙烯酰胺凝胶并延长了电泳时间，最终确定RRSV含有10组分散的双链RNA。我们对分离提纯的RRSV的RNA进行与四方报道的条件相仿的聚丙烯酰胺电泳表明，我国的RRSV病毒也含有10组分散的双链RNA，并且10组的RNA分布的位置，根据电泳对照已知的家蚕细胞质多角体病毒dsRNA的分子量，测得RRSV的每组RNA的分子量以及病毒含有的总分子量均和四方报道的极为相似。见表一。

表1 我国RRSV病毒含有的双链RNA基因组  
Table 1. The dsRNA genomes of Chinese RRSV

基 因 组 编 号	我 国 RRSV <sup>[a]</sup>	国 外 报 道 [5]
1	2.57	2.49
2	2.55	2.45
3	2.44	2.37
4	2.42	2.32
5	1.78	1.71
6	1.38	1.34
7	1.24	1.25
8	1.24	1.23
9	0.53	0.57
10	0.49	0.51
总分子量	16.6	16.2

[a] 根据聚丙烯酰胺凝胶浓度7.5%的电泳值计算。RRSV病毒颗粒的第7、第8基因组分子量几乎完全相等，第1与第2，第3与第4也极为近似[图5]，因此在电泳分辨率不高的情况下，容易造成Milne等报道的误差。

我们的工作可以证明，我国发现的RRSV和日本报道的并来源于南亚国家的RRSV是同一种病毒。鉴于RRSV是一类较新发现的病毒，因此对于这一病毒的其他特性研究我们正在进行之中。



## 图 版 说 明

图1, 20%—50% 线性蔗梯糖度电泳中的两条 RRSV 病毒带。

图3, 部分提纯的RRSV电镜照片, 箭头所示为直径约75nm大球状颗粒。

左下角为 RRSV 部分放大照片, 可清晰看到病毒的突起。放大标记为  $0.1\mu\text{m}$ 。

图4, 在RRSV的制剂中, 常有35nm大小的小球状颗粒(箭头所示)。放大标记为 $0.1\mu\text{m}$ 。

图5, RRSV 的核酸聚丙烯酰胺电泳图谱。

a. RRSV 的 ds—RNA。

b. 家蚕细胞质多角体病毒的 ds—RNA。

## Legends

Fig. 1. Two virus bands obtained in 20%-50% linear sucrose gradient centrifugations.

Fig. 3. Partial purified preparations of RRSV

Arrows pointed to the big isometric particles with diameter about 70—75nm.

Scale bars  $0.1\mu\text{m}$

Fig. 4. Small isometric particles with diameter 35 nm pointed by arrows in the preparation of RRSV, scale bars  $0.1\mu\text{m}$

Fig. 5. PAGE of ds-RNA of RRSV and the Cytoplasmic polyhedral virus ( CPV )

a. ds-RNA of RRSV

b. ds-RNA of CPV

## 参 考 文 献

1. K.C. Ling, E.R. Tiongeo, V.M. Aguirre, Rice Ragged Stunt, a new virus disease Plant Dis. Rep. 1978, 62: 701.
2. 何愚, 柳淑华等, 水稻齿叶矮缩病毒寄主植物研究初报 自然杂志 1982, NO 12, 953。
3. Kawano, S. Shikata, E. Senboku, T.. Purification and morphology of Rice Ragged Stunt Virus J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 1983, 61: 209.
4. Milne, R.G., Dose Rice Ragged Stunt Virus lack the typical double shell of the Reoviridae? Intervirology 1980, 14: 331.
5. Kawano, S. Uyeda, I. Shikata, E., Particle structure and double-stranded RNA of Rice Ragged Stunt Virus J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 1984, 64: 408.
6. 斋藤康夫, Rice grassy stunt virus. 植物ライルス事典, 与良清, 斋藤康夫等编集, 昭和 58年 461. 朝仓书店。
7. Boccardo, G., Milne, R.G., Electrophoretic fractionation of the double-stranded RNA genome of Rice Ragged Stunt Virus Intervirology 1980, 14: 57.

## STUDIES ON PURIFICATION, MORPHOLOGY AND DOUBLE STRANDED RNA OF RICE RAGGED STUNT VIRUS

Wu Jiang-hua Lu Hui-hua Chen Zuo-yi Gong Zu-xun

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)

Lin Rui-fen Jin Deng-di

(Laboratory of Virus Research, Chekiang Agricultural Research Institute, Hangchow)

The partial Purified preparations of Rice Ragged Stunt Virus (RRSV) from fresh diseased rice leaves could be obtained in the high yield by the combination of the techniques of clarification with  $\text{CCl}_4$ , precipitation with Polyethylene Glycol, differential centrifugations and linear sucrose gradient centrifugations. The preparations showed the maximum of the ultra-violet absorption spectra was at 260 nm and the value of the  $A_{260}/A_{280}$  ratio was 1.6. By Electron microscopy the RRSV particles showed spiked isometric morphology in diameter ranged 54—65 nm. Electrophoresis experiments have demonstrated that the RRSV contain 10 separated ds-RNA genomes. The sizes and electrophoresis pattern of 10 viral ds-RNA genomes were consistent with the results reported by S. Kawano et al.<sup>[5]</sup> In the partial purified preparations of RRSV three kinds of other particles could be also observed. Two isometric particles were in diameter about 75 nm and 35nm respectively. The third had filamentous appearance and the concentration of the filaments obviously increased with the steps of purification of RRSV. The possible origins of these three particles were discussed.