

863

生物高技术丛书

水稻病毒的 分子生物学

李 毅 陈章良 编著



科学出版社

“863” 生物高技术丛书

水稻病毒的分子生物学

李 毅 陈章良 编著

科学出版社

2001

内 容 简 介

本书是“863”生物高技术丛书中的一本。本书系统介绍了侵染水稻的病毒的分子生物学及水稻基因转化。全书共分14章,前13章介绍侵染水稻的13种病毒,第14章介绍水稻的基因转化。内容主要包括已发现的13种侵染水稻病毒的分类地位、生物学、病毒粒子结构、生物物理和生物化学特征、基因组结构、基因组的转录、复制与调控、基因组的产物与功能、水稻基因转化涉及的方法和技术,书中也包括了作者及其同事在水稻矮缩病毒粒子三维结构、分子生物学及水稻抗病毒基因工程的最新研究成果。附录中有已经克隆和测序的12种病毒的全部或部分基因序列及编码蛋白的氨基酸序列,以备读者查阅和参考。

本书可作为从事生命科学(如植物基因工程、病毒学、抗病育种等)研究的科研人员,综合大学、农业院校的教师、研究生及本科高年级学生的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

水稻病毒的分子生物学/李毅,陈章良编著. -北京:科学出版社, 2001.2

(“863”生物高技术丛书)

ISBN 7-03-008428-4

I. 水… II. ①李… ②陈… III. 水稻-植物病害-病毒-分子生物学
IV. S435.111.4

中国版本图书馆CIP数据核字(2000)第06005号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2001年2月第一版 开本:787×1092 1/16

2001年2月第一次印刷 印张:16 1/2 插页:1

印数:1—2 500 字数:369 000

定价:38.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈北燕〉)

“863”生物高技术丛书编辑委员会

丛书主编:

侯云德 强伯勤 沈倍奋

丛书编委会(按汉语拼音排序):

陈永福	陈章良	陈 竺	丁 勇	顾健人	侯云德
黄大昉	贾士荣	李育阳	刘 谦	卢兴桂	马大龙
强伯勤	沈倍奋	唐纪良	许智宏	杨胜利	赵国屏

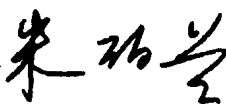
丛书序 I

生物技术是 20 世纪末期,在现代分子生物学等生命科学的基础上发展起来的一个新兴独立的技术领域,已被广泛应用于医疗保健、农业生产、食品生产、生物加工、资源开发利用、环境保护,对农牧业、制药业及其相关产业的发展有着深刻的影响,成为全球发展最快的高技术之一。在近 20 余年的时间里,各种生物新技术不断涌现。70 年代创建了重组 DNA 技术和杂交瘤技术之后,动植物转基因技术、细胞大规模培养技术,以及近几年的基因组学、蛋白组学、生物信息学、组合化学、生物芯片技术和自动化药物筛选技术等相继发展起来。可以说,生物技术的范围在不断地扩展,进入了蓬勃发展的新阶段。

我国的生物技术在“国家高技术研究与发展(863)计划”的支持下,经过 15 年全国生物技术科技人员的努力拼搏,在农业生物技术和医药生物技术的研究和开发方面都取得了很大的进展。一方面,我们在研究上取得了一批国际影响的创新成果,并获得一批拥有了自己知识产权的专利;另一方面,在开发上已有一批生物技术产品进入市场,还有相当一批产品正在研究开发中;海洋生物技术和环境生物技术也已起步。目前,生物技术研究和产业化已引起了全社会的关注,并将成为我国 21 世纪的一个新兴支柱产业。

在辞别 20 世纪,迈入 21 世纪之际,“863”计划生物领域专家委员会回顾我国生物技术发展历程,展望生物技术发展前景,编写了“‘863’生物高技术丛书”。借此机会,我希望所有从事生物技术研究 and 开发的科技人员,要进一步团结拼搏,增强创新意识,注重成果转化,为我国生物技术不断发展壮大做出新的贡献!

科学技术部 部长



2000 年 7 月 15 日

丛书序 II

生物技术是 20 世纪末人类科技史中最令人瞩目的高新技术,为人类解决疾病防治、人口膨胀、食物短缺、能源匮乏、环境污染等一系列问题带来了希望。国际上科学家和企业家公认,信息技术和生物技术是 21 世纪关系到国家命运的关键技术和作为创新产业的经济发展增长点。

生物技术是指有机体的操作技术。它从史前时代起就一直为人类所开发利用,造福于人类。在我国的悠久历史中,传统的生物技术在经济的发展中一直起重要作用,特别是农业。据传,在石器时代的早期,神农氏曾传授人民如何种植谷物,并实行轮作制度;在石器时代的后期,我国早就善于酒精发酵;在公元前 221 年的周代后期,我国就能做豆腐并酿制酱油和醋,其所用的基本技术沿用至今。公元前 200 年,在我国最早的诗集——《诗经》中就提到过采用厌氧菌进行亚麻浸渍处理。早在 16 世纪,我国的医生就知道,被疯狗咬可以传播狂犬病。公元 10 世纪,就有了预防天花的活疫苗,到了明朝(1368~1644),这种疫苗就广泛用于大量人群接种,此后,这种疫苗接种技术通过有名的丝绸之路传入欧洲国家。

1953 年 Watson 和 Crick 提出了脱氧核糖核酸(DNA)的双螺旋结构模型,阐明了它是遗传信息的携带者,从而开辟了现代分子生物学的新纪元。DNA 分子是所有生命机体发育和繁殖的蓝本。众所周知,一切生命活动主要是蛋白质的功能,而蛋白质是由基因编码的。60 年代初就破译了“遗传密码”。生命现象千姿百态,但生命体的本质却有高度的一致性。它们的蛋白质都是由 20 种氨基酸以肽链连接而成,核酸都由 4 种核苷酸以磷酸链构成,其遗传密码在整个生物界也基本一致。于 70 年代,科学家们发展了一种新技术,也就是众所周知的 DNA 重组技术。它向人们提供了一种手段,人们可以在试管内,根据人们的意愿来操作基因、改造基因,新的基因信息可以转入一种简单的生命体中,如大肠杆菌,或转入另一种机体,借以提供一种手段来改造谷物和家畜品种,或生产有效药物,制作疫苗和一系列自然蛋白质,或进行基因治疗。显然,新生物技术是一场革命,是生产力的一次解放,被认为是 20 世纪人类的一项最伟大贡献,它必将深刻地促进世界经济的发展。

广义的新生物技术包括基因工程、细胞工程、发酵工程和酶工程,但新技术的核心是基因工程技术,它能带动其他生物技术的发展,最具有革命性。

近 20 年来,国际上生物技术飞跃发展,特别是基因操作技术、生物治疗技术、转基因动植物技术、人类和其他生命体基因组工程、基因治疗技术、蛋白质工程技术、生物信息技术、生物芯片技术等。生物技术的创新正在带动着生物技术巨大产业的发展,它包括基因药物、重组疫苗、生物芯片、生物反应器、基因工程抗体、基因治疗与细胞治疗、组织工程、转基因农作物、兽用生物制品、生物技术饲料、胚胎移植工程、基因工程微生物农药、环保、海洋生物技术,以及现代生物技术对发酵、制药、轻工食品等传统产业的改造等领域。

目前,生物技术产业与信息产业相比较还处于发展初期,至 1998 年全世界共有生物技术公司 3600 余家,主要集中在美国和欧洲,其中年产值超过 10 亿美元的有约 20 家。

生物技术产业在 20 年中市场总值增加了 50 多倍;涨幅最快是在近 10 年,例如美国在 1980 年生物技术产品的销售额还处于零增长,1991 年达到 59 亿美元,1996 年为 101 亿美元,1998 年增至 147 亿美元;目前,生物技术仍保持 25% 左右的增长速度,20% 左右的融资率和 12.5% 就业增长率以及 8.76% 平均股市涨幅。另一方面,也要看到,美国的 1300 余家生物技术公司中上市公司为 300 家,而赢利的公司约为 20 家,这是由于生物技术产品的研究和开发周期较长,因此从整体看生物技术产业还处在投入阶段。从另一方面来看,尽管美国公司的赢利公司不多,但赢利公司的数量却在稳步上升。

1999 年全球生物技术产品的总销售额约为 500 亿美元,而产生的间接经济效益超过 3000 亿美元,全球有一半以上的人直接享用过生物技术产品。其主要产品为医药产品、农产品和食品。

我国自 1986 年实施“863”计划以来的 15 年中,现代生物技术的开发研究与产业化进入飞速发展阶段:二系法杂交稻的开发与推广对我国的粮食增产起了重要作用,2000 年已推广 5000 万亩以上。1993 年我国第一例转基因作物抗病毒烟草进入了大田试验。1997 年第一例转基因耐贮存番茄获准进行商品化生产,至 1999 年 5 月共有 6 种转基因作物其产品投放市场。2000 年我国转基因抗虫棉花种植面积超过 550 万亩。1990 年我国研制了第一例转基因家畜,1991 年山羊克隆获得成功,生物技术饲料添加剂已经实现了规模化生产。我国自 1989 年第一种基因药物——重组 $\alpha 1b$ 干扰素获准投放市场以来,至 1999 年我国已有 18 种基因药物和疫苗获准进行商业化生产,另有 26 种基因药物处于临床前或临床 I、II 期试验,我国生物技术医药产业已初具规模。我国已列为人类基因组计划国际大协作的成员国,承担完成 1% 的任务,美、英、日、法、德、中科学家于 2000 年 6 月 26 日宣布人类基因组全部 DNA 序列的工作框架图已经完成。我国在国际上首先发现神经性耳聋的基因,基因治疗已有 4 个项目进入临床试验阶段;生物芯片技术的开发研究与产业化正在与国际上同步发展。15 年来我国在生物技术领域中取得的成就是举世瞩目的,同时还培养了一大批中青年科技人才,为下世纪初 S-863 计划的实施和生物高技术产业化奠定了扎实的基础,也将为下世纪初我国的经济建设做出应有的贡献。

本丛书是在科学技术部中国生物工程开发中心、“863”计划生物技术领域专家委员会的领导下,由在第一线从事“863”生物高技术研究开发的科技人员撰写的系列丛书。本丛书包括了农、医生物技术的各个方面,不仅基本上概括了近 10 年来国际上的研究进展和发展趋势,而且还全面反映了我国“863”计划实施 15 年来在生物技术领域取得的进展和成果。本丛书的出版无疑将进一步推动我国生物技术开发研究和产业化的进程,促进我国经济的持续发展。同时,本丛书也是培养新一代青年生物技术科学家的重要教科书。



2000 年 1 月 16 日

前 言

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是发展中国家最重要的粮食作物, 全世界几乎有半数人口 (主要集中在亚洲) 以水稻作为主要食品。据统计资料显示, 全世界年均播种面积近 20 亿公顷。水稻也是我国重要的粮食作物, 种植面积占粮食作物总面积的近三成, 稻谷产量占粮食总产量的近五成, 稻谷平均亩产超过 350 公斤, 比世界平均产量高出四成, 在主要稻产国中名列前茅。在我国约有 6 亿多人口以水稻为主食。

长期以来, 水稻受到多种病毒的侵染, 使水稻的产量严重下降, 品质降低。常见的水稻病毒有引起水稻普通矮缩病的水稻矮缩病毒, 水稻条纹病的水稻条纹病毒和水稻矮缩病的水稻黑条矮缩病毒等。国内外对水稻病毒及引起的病害研究非常重视, 但目前对水稻病毒研究和了解的深度远不如一些侵染双子叶植物的病毒。原因有两个方面, 第一, 侵染水稻的病毒在自然界几乎均由虫媒传播, 多数不能通过机械传播; 第二, 病毒在寄主中的滴度很低, 且难以提纯, 所以对水稻病毒的分子生物学研究还比较肤浅。但水稻病毒也有其独特之处, 如病毒不但能侵染水稻而且可以侵染传毒媒介昆虫, 并且可以在传毒昆虫体内复制, 这与其他病毒有显著的不同, 探明这个现象具有重要的生物学意义。

我们实验室在国家 863 计划、国家自然科学基金、中欧合作项目、国际遗传工程与生物技术中心和美国洛克菲勒基金会基金等项目资助下, 对水稻矮缩病毒和水稻东格鲁病毒的分子生物学进行了较为系统、深入的研究, 完成了水稻矮缩病毒全基因组克隆和序列分析, 并阐明了病毒的一些基因的功能, 同时还获得了多个抗病毒转基因水稻系, 部分已进入大田试验。此外, 北京大学生命科学学院卢光莹教授对水稻矮缩病毒的三维结构做了较为深入的研究, 这些结果均包括在本书内。在此, 对资助这些研究的组织和提供照片的科学家表示深深的感谢。

最后, 本书在写作过程中得到本实验室门淑珍、李春波、刘慧君、李胜、唐显丽、高震、齐涛等的大力协助, 他们查阅并整理了大量的文献、资料, 在此对他们的辛勤劳动表示感谢。由于我们的知识有限, 难免有疏漏的地方, 而且时间紧, 编辑量大, 恐有不当、不周之处, 敬请读者指正。

李毅 陈章良

2000 年 1 月 31 日凌晨于北大生物技术楼

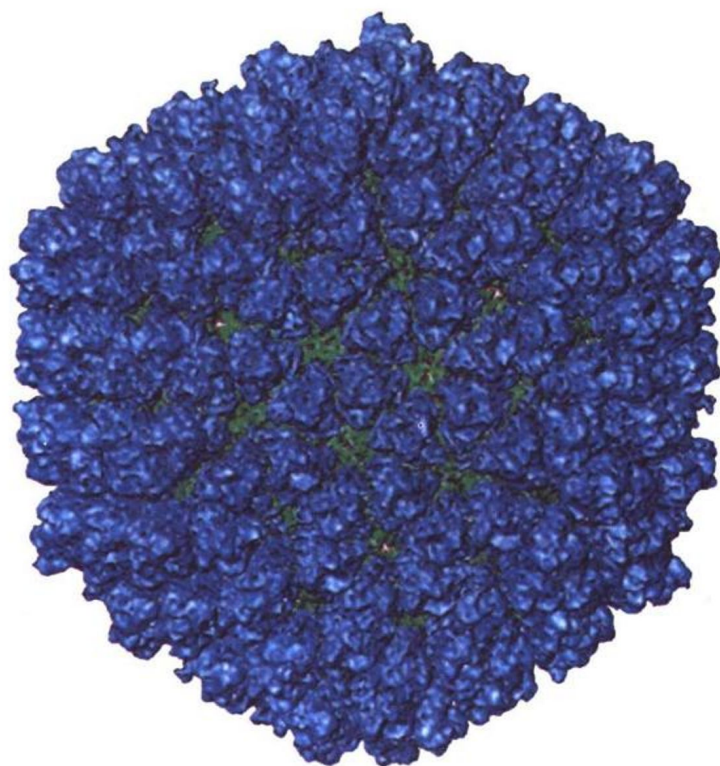
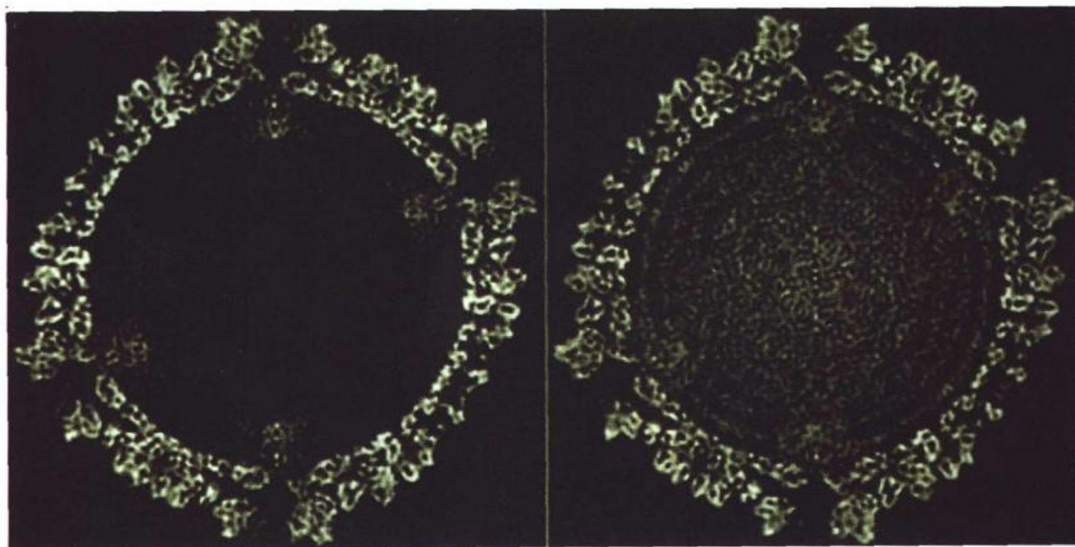


图 1.2 RDV 完整粒子的(8Å)三维结构图 RDV 的外壳由 260 个 P8 的三聚体组成,这些三聚体按 T=13 的晶格排列



a.RDV 空粒子(无 RNA)

b.RDV 完整粒子(有 RNA)

图 1.3 RDV 粒子(无 RNA)和完整粒子的结构比较 (a)中心片层(1.8Å 厚)显示转录酶复合体附着于五聚体基部;(b)排列成同心斑纹状的 RNA 层位于完整 RDV 粒子中

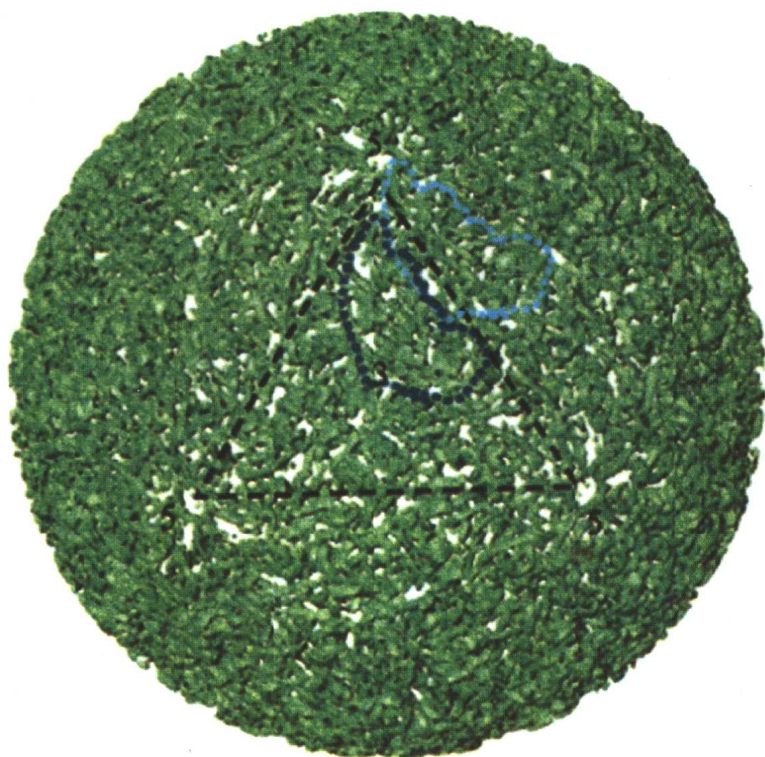


图 1.4 完整 RDV 三维重构图得到的内壳(P3 二聚体),按 T=2 晶格排列



图 1.6 RDV 侵染水稻叶片后引起的花叶症状

集大2 539-149

目 录

丛书序 I

丛书序 II

前言

第一章 水稻矮缩病毒	(1)
一、简介	(1)
二、水稻矮缩病毒的粒子结构	(3)
三、水稻矮缩病毒的侵染和复制	(4)
四、RDV 的基因组结构及编码蛋白的功能分析	(6)
第二章 水稻矮缩病毒	(19)
一、简介	(19)
二、粒子结构	(19)
三、基因组及其功能	(20)
四、RGDV 粒子在感染水稻植株和昆虫介体细胞中的分布	(25)
第三章 水稻黑条矮缩病毒	(28)
一、简介	(28)
二、病毒粒子的形态和结构	(30)
三、基因组结构及其编码蛋白	(30)
第四章 水稻锯叶矮化病毒	(33)
一、简介	(33)
二、基因组结构及编码蛋白	(33)
三、总结	(39)
第五章 水稻条纹病毒	(41)
一、简介	(41)
二、RSV 的基因组结构及编码蛋白	(42)
三、转录及复制	(47)
四、变种	(49)
五、进化上的亲缘关系	(49)
六、总结	(50)
第六章 水稻白叶病毒	(53)
一、简介	(53)
二、RHBV 的粒子结构和分类地位	(53)
三、RHBV 基因组结构和编码蛋白	(54)
第七章 水稻草状矮化病毒	(57)
一、简介	(57)
二、RGSV 的基因组结构	(57)
三、进化上的亲缘关系	(62)

第八章 水稻坏死花叶病毒	(65)
第九章 水稻黄矮病毒	(68)
一、简介	(68)
二、RYSV 的基因组结构及编码蛋白	(69)
三、总结	(74)
第十章 水稻黄斑驳病毒	(76)
一、简介	(76)
二、RYMV 的基因组结构及其编码的蛋白	(76)
三、基因组的表达和功能	(79)
四、RYMV 的细胞间运动和在植物内的长距离运输	(82)
五、小环状 RNA	(83)
第十一章 水稻条纹坏死病毒	(91)
第十二章 水稻东格鲁杆状病毒	(92)
一、简介	(92)
二、病毒粒子结构	(92)
三、基因组结构	(94)
四、转录	(97)
五、剪接	(100)
六、表达	(100)
七、复制	(101)
八、变种	(103)
第十三章 水稻东格鲁球状病毒	(105)
一、简介	(105)
二、基因组结构	(105)
三、外壳蛋白的变异	(108)
四、结论	(108)
第十四章 水稻的基因转化	(111)
一、简介	(111)
二、用于基因转化的水稻外植体	(111)
三、用于筛选的标记基因和启动子	(112)
四、水稻基因导入方法	(114)
五、水稻转化系统的应用	(126)
六、结论及前景	(137)
附录	(150)

第一章

水稻矮缩病毒

一、简介

水稻矮缩病毒(rice dwarf virus, RDV)是呼肠孤病毒科(Reoviridae)植物呼肠孤病毒属(*Phytoreovirus*)的成员。呼肠孤病毒是一类既能感染呼吸道,也能感染胃肠道的病毒。研究表明,它们的病毒粒子能形成具特征的胞浆内含体,用吖啶橙对含有该病毒特异性抗原的内含体进行染色时发现,它的 RNA 与细胞 DNA 一样呈黄绿色,而不是像通常的单链 RNA 那样呈红色,暗示该病毒基因组可能是双链 RNA。这是世界上首次发现双链 RNA 可作为稳定的生命形态存在于自然界。现在已知呼肠孤病毒科是一个庞大的家族,它有 150 个以上成员,包括呼肠孤病毒属(*Orthoreovirus*)、环状病毒属(*Orbivirus*)、轮状病毒属(*Rotavirus*)、植物呼肠孤病毒属和胞浆多角体病毒属(*Cypovirus*)以及一个未定名的属,广泛分布于脊椎动物、无脊椎动物和植物。上述 5 个属的呼肠孤病毒成员主要特征见表 1.1。侵染植物的呼肠孤病毒有 3 个属和一些尚未确定分类地位的病毒,它们的主要特征及基因组构成见表 1.2。

表 1.1 呼肠孤病毒科成员的主要特征

属	代表成员	宿 主	基因组中 dsRNA 的数目及相对 分子质量	粒子组成及直径		
				外壳	直径 (nm)	刺突
正呼肠孤病毒	呼肠孤病毒 I 型	脊椎动物	10(1.5×10^7)	双层	76	+
轮状病毒	人轮状病毒	哺乳动物	11(1.2×10^7)	双层	70	+
环状病毒	兰舌病毒	昆虫,哺乳动物	10(1.2×10^7)	双层	63	-
植物呼肠孤病毒	水稻矮缩病毒	叶蝉,禾本科植物	12(1.7×10^7)	双层	70	-
	伤瘤病毒*	叶蝉,双子叶植物	12(1.5×10^7)	双层	70	-
	斐济病毒	甘蔗,昆虫	10(1.8×10^7)	双层	75	+
胞浆多角体病毒	胞浆多角体病毒	昆虫	10(1.3×10^7)	双层	55	+

* 在自然寄主中不致瘤

呼肠孤病毒和轮状病毒只能感染脊椎动物,环状病毒虽是昆虫病毒,但能够感染许多哺乳动物。植物呼肠孤病毒和斐济病毒不仅感染植物,还能在其媒介昆虫——叶蝉和飞虱中增殖。胞浆多角体病毒仅能侵染昆虫。呼肠孤病毒粒子呈球形,有双层外壳,每个外

表 1.2 侵染植物的呼肠孤病毒科成员

属	成员	地理分布	寄主植物	侵染组织	是否形成瘤	昆虫介体	基因组 dsRNA 数
植物呼肠孤病毒	伤瘤病毒(WTV)	北美	双子叶	韧皮部	是	叶蝉	12
孤病毒	水稻矮缩病毒(RDV)	东南亚	单子叶(禾本科)	所有组织	否	叶蝉	12
	水稻瘿矮病毒(RGDV)	东南亚	单子叶(禾本科)	韧皮部	是	叶蝉	12
斐济	斐济病毒(FIV)	澳大利亚	单子叶(禾本科)	韧皮部	是	飞虱	10
	玉米粗缩病毒(MRDV)	地中海地区 北欧,东南亚 阿根廷	单子叶(禾本科)	韧皮部	是	飞虱	10
	水稻黑条矮缩病毒(RISDV)	东南亚	单子叶(禾本科)	韧皮部	是	飞虱	10
	Pangola Stunt Virus (PaSV)	中美洲 斐济岛 台湾 澳大利亚北部	单子叶(禾本科)	韧皮部	是	飞虱	10
病毒	燕麦不孕矮化病毒(OSDV)	欧洲中部和北部	单子叶(禾本科)	韧皮部	是	飞虱	10
稻属病毒	水稻锯叶矮化病毒(RRSV)	南亚	单子叶(禾本科)	韧皮部	是	飞虱	10
	稗锯叶矮缩病毒(ERSV)	南亚	单子叶(禾本科)	韧皮部	是	飞虱	10
尚未确定	大蒜矮缩病毒(GDV)	欧洲	单子叶(百合科)	韧皮部	是	不清楚	10
分类地位	narino dwarf virus	哥伦比亚	单子叶(禾本科)	?	?	不清楚	10
的病毒	Toluca reovirus(TORV)	墨西哥	单子叶(禾本科)	?	?	不清楚	12

壳均呈 20 面体对称,直径为 60~80nm,没有类脂膜。外壳由 3 种蛋白质组成:即 $\sigma 1$ HA、 $\sigma 3$ 和 $\mu 1$ C,核心有 4~6 种蛋白质,双层外壳的精确结构尚不十分清楚。外壳被蛋白酶类消化之后留下的是直径为 52nm 的核心,外观为 20 面体,其纵切面可见 12 个粗短的突出物,即刺突(图 1.1),其核心一般有蛋白质包裹,核心中有依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶。核心内含有线状 dsRNA,其有 10~12 个基因组分。呼肠孤病毒、环状病毒、斐济病毒和胞浆多角体病毒有 10 个基因组分,轮状病毒有 11 个基因组分,植物呼肠孤病毒有 12 个基因组分。

植物呼肠孤病毒属有 3 个成员:伤瘤病毒(wound tumor virus, WTV),水稻矮缩病毒(rice dwarf virus, RDV) 和水稻瘿矮病毒(rice gall dwarf virus, RGDV),每个成员的基因组均由 12 条双链 RNA 片段组成,总相对质量为 1.6×10^6 。三种病毒均由叶蝉传播,与呼肠孤病毒科的其他成员一样,本属病毒粒子均呈 20 面体对称,含有双层外壳蛋白。以 RDV 粒子为例,完整粒子直径为 70nm,内壳为 53nm,外壳和内壳的厚度分别为 17nm 和 7nm。外壳层三角形剖分数 $T=13$ 。外壳由 260 个外壳粒(三聚体)组成,共有 780 个蛋白亚基,无刺突。

在非降解条件下提纯的本属病毒粒子含有 6~7 种病毒编码的结构蛋白,其中主要蛋白成分的相对分子质量为 108~120kDa 和 42~46kDa,这些结构蛋白的相对分子质量及其在病毒中的位置和功能见表 1.3。除了病毒颗粒的结构蛋白外,本属病毒还编码许多可在侵染细胞中表达的非结构蛋白。

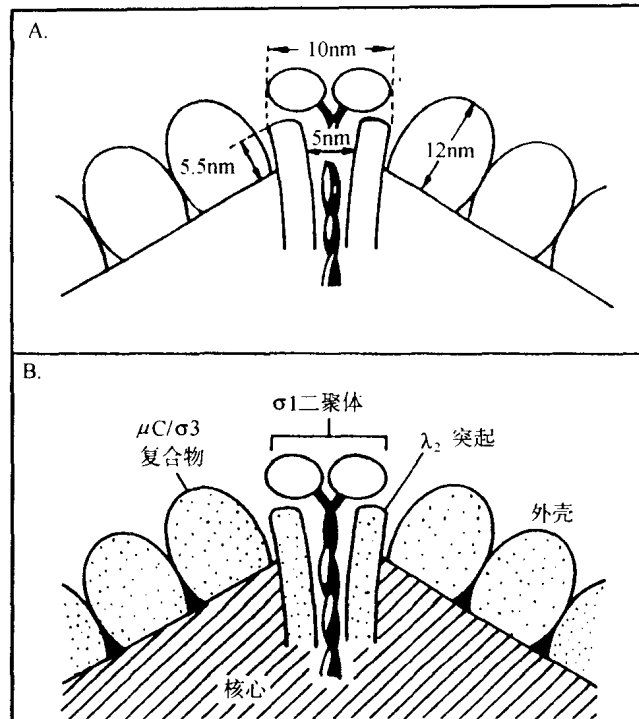


图 1.1 正呼肠孤病毒Ⅲ型病毒粒子外壳结构图。A. 组成病毒粒子外壳亚单位的结构及大小;B. 亚单位的组成及排列; T_1 的 α 螺旋通过 λ_2 的沟缝进入到病毒核心内,而球形结构区则位于 λ_2 的顶端,与细胞表面的受体发生相互作用。

二、水稻矮缩病毒的粒子结构

RDV 病毒粒子为无刺突、无脂蛋白外膜的二十面体,直径为 69.3nm,具有双层外壳蛋白(Inoue & Timmins, 1985; Mizuno et al., 1991)。通过中子小角度散射测定出 RDV 的分子质量为 6.52×10^3 kDa, RNA 组分占总重量的 20%。外层外壳辐长 36nm,厚 8.5nm;内层核心外壳辐长 27.5nm,厚 3.5nm(Inoue & Timmins, 1985)。RDV 含有 12 个双链 RNA 基因组分。用 EDTA 处理 RDV 粒子,使 RDV 粒子部分破裂,从而提取出 RNA 组分。电镜观察结果表明, RNA 基因组分以超卷曲形式包装在病毒粒子内,与蛋白组成复合体(Mizuno et al., 1986)。

Lu 等(1995)用低温电子显微镜观察 RDV 的三维结构,发现 RDV 的外壳由 260 个三聚体的外壳组成,每个外壳共有 780 个蛋白亚基。通过计算分析认为外壳粒为 P8 的三聚体。Zhu 等(1997)得到了 P8 的二维晶体,电镜观察发现,外壳的结构单元——外壳粒类似于等边三角形结构,每边约长 6nm,中间有一个直径约为 2nm 的洞。Lu 等(个人通讯)应用 400kV 的低温电子显微镜及三维重构技术得到了分辨率为 8Å 的 RDV 的三维结构图。进一步确定了 RDV 的外层外壳由 260 个 P8 的三聚体组成,三角形剖分数为 $T=13$

(图 1.2, 见书后彩图); 内层外壳由 60 个 P3 蛋白的二聚体组成, 三角形剖分数为 $T=2$ (图 1.3, 图 1.4, 见书后彩图)。Naitow 等 (1999) 应用 *ab initio* phasing 得到了 RDV 的分辨率为 $20\text{\AA}$ 的三维结构。认为 P2 位于 RDV 外层外壳的三重对称轴处, RDV 核心的 RNA 为有序结构, 双链 RNA 在内层外壳内形成 RDV 的第三层壳。在内层外壳和 RNA 壳层之间有 12 个由 P7 蛋白组成的五聚体 (图 1.5)。

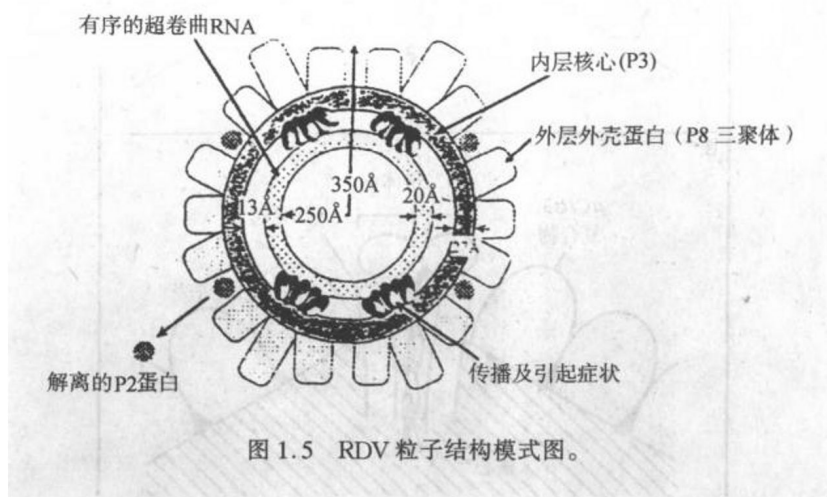


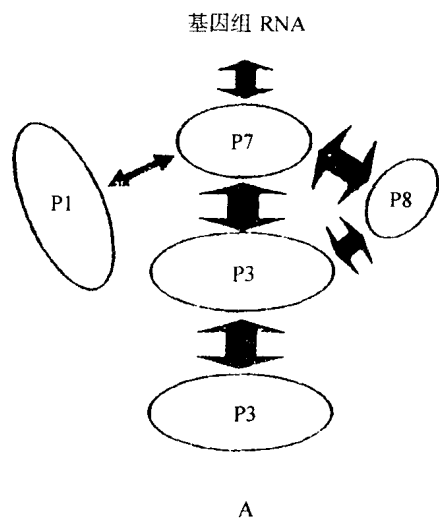
图 1.5 RDV 粒子结构模式图。

三、水稻矮缩病毒的侵染和复制

水稻矮缩病毒在自然界主要侵染少数禾本科植物, 如水稻、稗等。与其他植物呼肠孤病毒不同, RDV 侵染并不诱导瘤的形成。感染 RDV 的植物生长受阻, 植株很矮, 叶片上产生小块褪绿色斑 (图 1.6, 见书后彩图), 如果侵染发生在早期, 被侵染水稻不能产生种子。在自然情况下, 该病毒由两点黑尾叶蝉 (*Nephotettix cincticeps*) 和电光叶蝉 (*Recilia dorsalis*) 以持久方式传播。病毒能在叶蝉和植物中增殖, 且无组织局限性, 病毒经卵传播的比例很高。一般认为, RDV 更适应于它们的昆虫寄主, 而不是水稻寄主, 因为病毒能借助昆虫卵传到后代, 但却不能借助于植物的种子进行传播。虽然病毒可在昆虫中大量增殖, 但不致病。

RDV 病毒粒子除含有基因组 12 条双链 RNA 和外壳蛋白及核心蛋白外, 还有病毒复制酶、甲基化酶等。病毒的复制首先由脱壳而激活, 然后进行单链 mRNA 的转录。转录在完整的病毒核心中进行, 由病毒核心所携带的依赖于 RNA 模板的 RNA 合成酶和甲基化酶共同完成。转录是完全保守的和有选择性的。在病毒核心内, 复制酶依赖负链模板合成正链单链 mRNA, 然后释放到粒子外面, 核心内 dsRNA 不离开病毒核心, 整个复制过程在核衣壳内完成, 病毒粒子保持完整。转录产物首先作为 mRNA 指导合成各种病毒所需的多肽, 其次是作为模板合成负链 RNA, 并合成病毒结构蛋白, 重新组成子代病毒基因组, 再组装成新的病毒颗粒, 这些过程发生在细胞质中的病毒胞质 (viralplasm) 内。为了了解 RDV 的形态建成和装配过程, Ueda 等 (1997) 应用酵母双杂交系统和 far-western 印迹分析, 研究了 RDV 中蛋白质与蛋白质间的相互作用, 发现 RDV 的核心蛋白 P3 除与

本身结合外还与 P7 和 P8 蛋白发生相互作用。P7 蛋白除与 P3 蛋白作用外还与 P1 和 P8 蛋白结合。因此认为病毒的核心壳是以 P3 - P3 相互作用为基础的结构,在病毒粒子装配过程中 P7 与许多结构蛋白结合的同时还与基因组 RNA 结合(图 1.7A)。通过计算机辅助的结构分析,得出 P1:P3:P7:P8 的比值约为 36:180:180:540(图 1.7B)。因此一个



分子量(kDa)	实验 1 计算所得分子数(CM)* 相对分子比例(MR)	实验 2 (CM) (MR)	实验 3 (CM) (MR)	一个病毒粒子中的 分子数
P1(166.2)	39.4 (6.93)	37.66 (8.03)	33.92 (11.8)	36
P3(114.3)	174.94 (30.76)	180.62 (38.56)	179.54 (60.24)	180
P7(55.3)	185.23 (32.57)	175.75 (37.52)	188.69 (63.31)	180
P8(46.4)	536.42 (97.32)	541.96 (115.70)	533.85 (179.12)	540
X ²	0.80<P<0.90 0.6409	0.90<P<0.95 0.1858	0.80<P<0.90 0.6109	936

图 1.7 RDV 的结构蛋白间的关系。A. 蛋白之间以及蛋白与基因组的作用图解;B. 计算机辅助的分子比例分析结果。* 相对分子比例(MR)=聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图中蛋白条带的面积/该蛋白的分子量。计算所得的分子数=(该蛋白的 MR 数值/四种蛋白 MR 的总和)×936。(936 是一个病毒粒子中四种蛋白的总数)。