

植物分子生物学

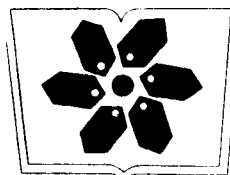
— 成就与前景



荆玉祥 匡廷云 李德葆 主编

科学出版社

17F21/08



中国科学院科学出版基金资助出版

植物分子生物学

——成就与前景

荆五祥 匡廷云 李德葆 主编

科学出版社

1995

(京)新登字 092 号

内 容 简 介

本书介绍我国第一次植物分子生物学研讨会上一些专家的报告和撰写的文章,反映了生命科学前沿之一——植物分子生物学及其高新技术领域的国际新进展和我国近几年在这方面的新成就,提出了研究发展方向、战略设想和广阔前景。本书第一部分有植物病毒、高等植物基因组和基因结构及其功能、植物 DNA 重复序列研究及其意义、线粒体基因及其组织结构和雄性不育、种子贮存蛋白和植物肌动蛋白基因的分子生物学;第二部分有光合作用的分子基础、光反应系统的叶绿素蛋白复合体和叶绿素蛋白基因、光合作用中碳固定的磷酸核酮糖羧化酶及其他蛋白质和基因、光敏色素分子生物学;第三部分为固氮作用的分子基础,有共生固氮根瘤菌的固氮基因及其表达,固氮根瘤宿主植物的产物和基因表达,以及豆科植物和根瘤菌的相互作用和非豆科植物的根瘤固氮工程;第四部分为植物抗性分子生物学,有植物抗病、抗旱、耐盐和植物对病害的防御系统;第五部分为植物基因工程和其他技术,有植物基因工程的载体和抗病毒基因工程、转基因植物、植物体细胞杂交转基因、细菌结抗蛋白对病害的防治,以及反义 RNA 和基因扩增的最新技术在植物基因工程和分子生物学研究中的应用。共有 26 章,从基础研究、应用基础研究到应用开发研究都作了广泛而系统的论述,列有大量的参考文献,可供大专院校生物系、生命科学院校各专业的师生,从事微生物、植物、生化、遗传、农学等科研的研究人员、硕士生、博士生以及这方面的爱好者参考。

植 物 分 子 生 物 学

——成 就 与 前 景

荆玉祥 匡廷云 李德葆 主编

责任编辑 梁淑文 赵甘泉

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

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

*

1995 年 4 月第 一 版 开本: 787 × 1092 1/16

1995 年 4 月第 一 次印刷 印张: 19 1/2

印数: 1 1600 字数: 449 000

ISBN 7-03-004335-9/Q. 533

定价: 28.50 元

序

十几年前,为了筹备中国植物学会五十周年大会,我作为即将卸任的理事长,曾就今后植物学发展的方向问题召集过一系列的讨论会。当时由于分子生物学发展很快,经典的植物学(也包括植物生理学)正面临前所未有的强烈挑战,我认为,植物学家不仅可以运用经典积累的丰富知识,也可以利用分子生物学的最新技术,来更加全面地、深刻地揭示植物个体和群体生命活动的规律。并可进一步根据对植物生命现象和本质的认识,结合生物工程技术,达到最终实现开发、利用和改造植物界的目的。因此,经典植物学已经从描述分析实验时期进入了一个再发展的新时期,即“创新植物学”的时期。

十几年过去了,包括植物分子生物学、细胞生物学和生物技术在内的“创新植物学”发展怎样了呢?在我国目前还面临着什么样的问题?放在大家面前的这本书则是一个很好的总结和分析。这本书是1991年11月在杭州由中国植物学会和浙江省科委联合召开的中国第一次植物分子生物学研讨会之后,由中国植物学会组织一些著名专家撰写文章汇编而成的,我看后感到,这本书至少有以下两个特点。

第一个特点是其全面和系统性。本书几乎覆盖了当代植物分子生物学和生物工程技术发展的全部领域。全书共分五个部分。

第一部分主要包括了植物基因结构与功能的知识,既有一般性的介绍(第二章),也有分别讨论某些重点问题的章目,如重复DNA序列(第三章),线粒体基因组和雄性不育(第四、五章),RNA病毒(第一章)等,此外还有一些专题评述,包括水稻种子蛋白(第六章),马铃薯块茎贮藏蛋白(第七章)和肌动蛋白(第八章)等基因的表达和调控。

第二部分是关于光合作用分子作用机理的知识。光合作用是植物学的经典研究领域,目前发展得十分迅速。读者可以从光系统Ⅰ及反应中心叶绿素蛋白复合体的结构和功能(第九章),光合作用光系统Ⅰ反应中心D1蛋白基因(第十章)以及Rubisco和光合碳代谢有关的其它蛋白基因的研究(第十一、十二章)等内容中,了解到光合作用光能转化及碳素同化分子生物学研究的最新进展和发展趋势。另外,作为光生物学内容的光敏色素基因及表达也放在了这部分(第十三章)。

第三部分包括的共生固氮研究也是植物学研究的经典领域。近年来发展很快,主要有根瘤菌固氮基因(第十四章),共生固氮的宿主基因(第十五章)及两者的相互作用(第十六章)等内容。

第四部分是植物抗性分子生物学,主要涉及植物抗病和抗旱耐盐等问题。它包括国内实验室很有特色的工作结果(第十七章)以及目前在植物抗旱耐盐和胁迫防御系统的研究进展。

第五部分(最后一部分)是植物基因工程和有关技术的内容,这是植物分子生物学所依赖的重要工具。它主要包括目前最常用的基因工程载体Ti质粒vir基因的分析(第二十章)以及作为转基因有效途径的植物体细胞杂交工作(第二十四章)。这一部分还包

括应用反义 RNA 获得所需性状的植物重组体的介绍 (第二十三章), 确定转基因植物标准的讨论 (第二十二章), 进入大田的抗病毒基因工程介绍 (第二十一章), 九十年代发明的随机引物扩增多态 DNA 技术 (第二十六章) 以及拮抗蛋白在植物病害防治中的应用研究 (第二十五章) 等内容。

本书第二个特点是其现实性、具体性和指导性。由于作者所介绍、评述的内容大多是他们熟悉并且投入多年的工作领域, 有的是作者实验室长期工作的总结, 因此其内容和论点具有国内实验室工作的特点。这些成绩说明, 我国的植物分子生物学不仅在理论和应用上取得了重要结果, 而且已经形成了一个初步完整的体系, 奠定了今后发展的基础。作者们大多是我国的中、青年学术带头人, 因此他们代表着“创新植物学”发展的现在和将来, 创新植物学后继有人, 作为老一代的植物学家, 这也是我感到尤其高兴的事情。最后祝同志们在工作中取得更大成绩!

汤佩松

(中国科学院院士)

1992 年 7 月, 北京

前 言

植物分子生物学是在分子水平上研究植物基因组和基因,及其表达产物蛋白质、酶的结构、功能和调节控制作用的一门学科。在分子生物学发展过程中,由于蛋白质、酶的分离、纯化和结构研究,DNA 内切酶的发现、DNA 重组技术、聚合酶链反应(PCR)、DNA 限制片断长度多态性(RFLP)、随机引物扩增多态 DNA (RAPD)、基因定位诱变、基因工程、蛋白质工程等方法建立,使植物分子生物学研究日新月异地发展。在此基础上建立的生物工程,不仅成为一个新的生产领域,同时又反向地促进了植物生物化学、植物细胞生物学、植物生理学,甚至植物分类学等诸多学科的发展。植物分子生物学在植物学中占有战略发展趋势的重要地位。

我国植物分子生物学研究的原有基础薄弱。自从 70 年代末 80 年代初实行改革和开放政策后,我国政府派出了大量留学人员,他们学成回国后,对我国植物分子生物学研究起了重大推动作用。正是在这种形势下,中国植物学会会同浙江省科委于 1991 年 11 月在杭州联合召开了我国第一次植物分子生物学研讨会。与会专家的报告,反映了生命科学前沿的生物高技术领域内国际新进展,以及我国近几年在这一领域内的新成就。同时与会专家对国际动态,结合我国实际作了认真的分析,以期明确今后的发展方向,展示研究前景。这次研讨会无疑在中国植物分子生物学发展史上具有重要意义。

本书是这次会议后组织的一些著名专家撰写的文章,内容有植物基因组和基因的结构与功能、植物基因的表达和调控、光合、固氮和植物抗性的分子基础、基因载体和基因工程,以及与植物分子生物学研究等有关的新技术和应用。全书由荆玉祥、匡廷云、李德葆进行了审校。整理过程中由于水平局限,可能有不当之处,敬请读者指正。

1992 年 6 月 25 日

目 录

序

前言

第一部分 植物基因结构和表达

第一章	植物正链 RNA 病毒基因组结构与表达策略	叶 寅 田 波 (3)
第二章	植物基因的结构和功能	赵微平 (18)
第三章	植物重复 DNA 顺序的研究方法和进展	刘良式 唐东江 刘钊连 (39)
第四章	植物线粒体基因组及其组织结构	郑佐华 汪训明 (50)
第五章	植物雄性不育分子机理研究进展	谢纬武 王 斌 (62)
第六章	水稻种子贮存蛋白及其基因表达调控	范云六 周先锦 (68)
第七章	马铃薯块茎贮藏蛋白 (patatin) 基因的表达与调控	宋东光 汪训明 (71)
第八章	高等植物肌动蛋白基因的分子生物学研究	王荣臣 曹晓风 阎隆飞 (80)

第二部分 植物光合作用的分子基础

第九章	光合作用光系统 II 反应中心叶绿素蛋白的分子机理	匡廷云 于振宝 唐崇钦 彭德川 姜世庆 汤佩松 (89)
第十章	光合作用光系统 II 反应中心 D1 叶绿素蛋白基因-psbA 的研究	姜世庆 马建忠 匡廷云 黎 家 童 哲 汤佩松 (102)
第十一章	Rubisco 的分子生物学	吴相钰 吴光耀 (114)
第十二章	光合作用碳代谢中的蛋白质及其基因	孙崇荣 (125)
第十三章	光敏色素基因及其表达	童 哲 王 台 赵玉锦 马 进 (138)

第三部分 固氮作用的分子基础

第十四章	共生固氮根瘤菌固氮基因的结构功能与表达调控	郭俊	王子芳	(155)
第十五章	共生固氮的宿主产物及其基因表达	关常辉	荆玉祥	(168)
第十六章	豆科植物与根瘤菌的相互作用和非豆科植物的根瘤工程	荆玉祥	李广善	单雪琴 (180)

第四部分：植物抗性分子生物学

第十七章	植物抗病分子生物学	曾以申	(193)
第十八章	植物抗旱耐盐基因研究进展	胡志昂	王洪新 (204)
第十九章	植物对病害的防御系统	林志平	(214)

第五部分 植物基因工程和其他技术

第二十章	植物基因工程载体 Ti 质粒毒性区 (vir) 基因的组织结构、遗传功能及 表达调控.....	李宝健	尹中朝	许 耀	(229)
第二十一章	植物抗病毒基因工程研究进展和展望.....	叶 寅	田 波		(242)
第二十二章	转基因植物.....	贾士荣	曹冬孙		(254)
第二十三章	反义 RNA 与植物基因表达调控	宋艳茹	马庆虎		(268)
第二十四章	植物体细胞杂交是基因转移的一种有效途径				
		钱迎倩	王铁邦	林忠平	(279)
第二十五章	拮抗蛋白在植物病害防治中的应用前景				
		李德葆	朱伟光	陈卫良	陈雄风
		徐 平	葛起新		(289)
第二十六章	RAPD 及其在植物分子生物学研究中的应用 ...	王 斌	李松涛		(295)

第一部分

植物基因结构和表达

第一章 植物正链 RNA 病毒基因组结构与表达策略

叶 寅 田 波

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

目 次

一、基因组组成和结构

1. 基因组的组成成分
2. 基因组 5'末端结构与 5'端非编码区
3. 基因组 3'端非编码区域
4. 基因排列

二、非结构蛋白与病毒功能表达

1. 复制酶——依赖于 RNA 的 RNA 多聚酶 (RdRp)

2. 蛋白酶

3. 移动蛋白 (movement protein, MP)

三、基因表达策略

1. 翻译后加工
2. 亚基因化
3. 形成亚基因组+多聚蛋白加工

植物病毒依据其基因组的不同可划分为五大类①单链 DNA 病毒；②双链 DNA 病毒；③单链正义 RNA 病毒（正链 RNA 病毒）；④单链反义 RNA 病毒；⑤双链 RNA 病毒。其中单链正义 RNA 病毒占 75%。达 470 多种^[33]。在如此众多的病毒中，基因组的结构与排列各不相同，其复制及表达机制形式多样。随着分子病毒学研究的深入，越来越多的病毒基因组的核苷酸序列被测定，使得这些资料的积累与比较更为丰实与具体。本文将植物正链 RNA 病毒为材料，阐述它们的基因结构与表达策略。

一、基因组组成和结构

植物正链 RNA 病毒的 RNA 结构与基因组排列因不同的病毒而异，随即影响了基因组的表达，即表达方式的差异。根据病毒 RNA 的组成，即病毒基因组是否分段，将病毒分为单分体病毒，如烟草花叶病毒 (TMV)，马铃薯 Y 病毒，马铃薯 X 病毒；双分体病毒，如豇豆花叶病毒 (CPMV)，烟草脆裂病毒 (TRV)；三分体病毒如苜蓿花叶病毒 (AIMV) 等；同时基因组的末端结构也各不相同，由此决定了病毒的基因组结构与表达策略的差异。

1. 基因组的组成成分

病毒基因组随着病毒所属的分类学上位置不同，其大小差异亦大，当然基因组的编码信息量即病毒编码蛋白种类也随之不同。例如，目前研究得较为清楚的马铃薯 Y 组的成员——烟草脉斑病毒 (TVMV) 编码的结构蛋白与非结构蛋白达 8 种之多，它们是圆

柱形包涵体蛋白(CI,在细胞质内形成风轮状或涡轮状结构)^[50],两种核包涵体蛋白(NIa、NIb在细胞核内形成包涵体)^[16],辅助成分蛋白(HC)(与蚜虫传毒有关)^[14,20],外壳蛋白(CP),基因组连接蛋白(Vpg),蛋白酶(P)(参与翻译后加工)及病毒特异性的RNA多聚酶(参与复制)。另外还存在二个目前尚不知其功能的蛋白(34kD及42kD蛋白)。但Carmoviruses组的CarMV基因组就小得多,目前根据序列推测其仅编码几种蛋白:复制酶、外壳蛋白及一种27kD蛋白(功能不详)。

在病毒的长期进化中,各种病毒形成了各自独特的复制与表达策略,但这些差异取决于病毒的基因产物,尤其是病毒的非结构蛋白扮演重要的角色。

2. 基因组 5'末端结构与 5'端非编码区

植物正链RNA病毒的RNA的5'端具有二类特殊的结构:一类是帽子结构(m^7G_5' /ppp $_5'$ XP),如烟草花叶病毒组,黄瓜花叶病毒组,马铃薯X病毒等。一般认为,植物病毒RNA5'端的帽子结构的功能同于真核mRNA,即促进mRNA与核糖体的识别,有利于翻译起始复合物的形成以及防止核酸酶的降解破坏。另一类是与RNA共价连接的蛋白质VPg(viral protein genome-linked),该蛋白由病毒本身编码。如马铃薯Y病毒组,蠕传多角体病毒组,豇豆花叶病毒组等。据推测VPg的存在与病毒的复制有关,即VPg可能作为引物分子以起始复制^[33]。

在RNA的5'端都有一段长度不一的非编码区,称为5'端非编码区。5'端非编码区长度不一,一般为10—100个核苷酸。在这段序列中,A、U含量丰富,有些病毒的5'端非编码区能形成二级发夹结构。一般认为,5'端非编码区序列参与基因的复制和表达的调控。TMV 5'端非编码区长为70个核苷酸,在126kD蛋白编码序列的起始密码子AUG上游第51位碱基处为AUC。该区域为一与核糖体80S相结合的位置,形成80S核糖体启动126kD及180kD蛋白的翻译^[26,27],而且实验证明5'端非编码区还是真核和原核生物体内和体外翻译的通用增强子。Takamatsu等为研究5'端非编码区的生物学功能,构建了缺失长度不同的突变体来分析病毒的复制及126kD的体外表达。结果表明,第1至第8位的核苷酸(UAUUUUUU)及位于48至61位核苷酸(UACAUUUUACAUC)对于病毒的复制是必需的。推测TMV复制酶识别病毒特异性序列,因此只复制TMV RNA^[62]。

3. 基因组 3'端非编码区域

植物正链RNA病毒的基因3'端结构有3种结构:①tRNA状结构;②poly(A)尾;③无规则顺序。病毒基因组的3'端不管具有何种结构,其结构对于病毒的功能表达,如复制等都是极其重要的。

(1) tRNA 状结构

在感病的细胞体内,一些正链RNA病毒专一地被氨酰tRNA合成酶识别,结合专一的氨基酸,例如TYMV特异结合缬氨酸,TMV特异结合组氨酸,CMV、BMV结合酪氨酸等。测定BMV及TYMV等病毒组的RNA 3'端核苷酸序列,发现这些病毒RNA 3'端确能自身折叠形成类似于tRNA的三叶草结构,且这些RNA的3'端结尾的三个核苷

酸都是 CCA。已证明了 BMV RNA 类似于 tRNA 的结构在病毒基因组的复制中起着重要的作用,它包含了复制复合物起始识别所需的 3' 端序列^[22,23]。然而,该结构是否存在着其它功能呢?有人推测,它还可能作为氨基酸参与蛋白质合成及通过氨酰 tRNA 合成酶的作用增强病毒 RNA 的翻译能力^[38,45]。

(2) poly (A) 尾

仅在 Goldbach 划分体系中第一大组病毒中存在,包括分类学上属于马铃薯病毒 Y 组,豇豆花叶病毒组及蠕传多角体病毒组的成员。各种病毒 RNA 的 poly (A) 长度不一,通常为 15—200 个核苷酸。到目前为止,还没有证据表明 poly (A) 在病毒复制中的功能,但已知 poly (A) 主要是维持病毒 RNA 的稳定性,增强其翻译能力^[44]。

缺失研究表明,CPMV,BNYVV 及 PPV 在细胞内在 3' 端从头开始加到 poly (A) 很可能是由细胞质中的 poly (A) 聚合酶加上去的。然而其聚合机制尚不清楚^[24,46,65]。Guilford 等^[37]构建了一系列白三叶草花叶病毒 (WCIMV) cDNA 克隆的突变体,这些突变体减短了 3' 端 poly (A) 的长度,分别为 74 到 27 个,10 个或 0 个 (A) 残基。以这些 cDNA 的体外转录体进行的感染实验表明,虽然这些短 poly (A) 尾的突变体比野生型 RNA 的感染性小得多,但完全不含 poly (A) 尾的转录体仍有感染性。以不含 (A) 残基的体外转录体感染植物后,后代 RNA 分子加上了不同长度的 poly (A) 尾,表明 WCIMV 感染的植物中具有 poly (A) 聚合酶的活性。然而,如果改变 3' 端序列,即以非病毒核苷酸序列加到转录体 3' 端而又在其末端不加上 poly (A),则这样的体外转录体完全无感染性。若在含 10 个 (A) 残基的转录体 3' 端非编码区域内可能的 poly (A) 聚加信号序列处加以突变,则其后代聚加 (A) 残基的效率降低。以不含 poly (A) 尾的转录所作的同样的实验,其结果相同。这一信号序列位于 poly (A) 尾上游处第七位核苷酸处的 AAUAAA,这一信号序列及其所处的位置与真核 mRNA 相一致 [位于 poly (A) 上游第 5—30 位核苷酸处]。同时 Guilford 等认为,这一信号序列不仅决定着 poly (A) 的聚加,而且影响着聚加的 poly (A) 尾的长度。目前还不清楚是否在所有的含 poly (A) 尾结构的植物病毒中,这一位点是否具有功能性聚加 poly (A) 信号的作用?

(3) 3' 端无规则序列

这类成员包括 PVX, AIMV, TRV 及烟草条斑病毒。基因组 RNA 的 3' 端的一级结构与高级结构都没有规律性。这类病毒有一个重要性质,即当外壳蛋白不存在,则病毒 RNA 不能复制,外壳蛋白可能与 RNA 的某一区域专一识别以激活 RNA 的复制^[71,72]。

(4) “拟结 (Pseudoknot)” 结构

在 TMV-L 3' 端,非编码区域长度为 202 个核苷酸,除位于 6280—6384 处的 105 个核苷酸折叠形成类 tRNA 结构,在紧接着的上游区域 (6203—6277) 包含三个“拟结”结构。这一结构发现存在于所有的烟草花叶病毒组成员的 RNA 3' 端。TMV 三个“拟结”结构分别称为 5' “拟结” (第 6203—6225), 中心“拟结” (6226—6247) 及 3' “拟结” (6248—6277)。Takamatsa 构建了一系列在 3' 端不同长度的突变体,分析这些突变体在烟草及植物叶绿体中的复制以研究这些“拟结”结构的生物学功能。实验结果表明,至少 3' “拟

结”结构的 3'端一半序列是复制所必需的^[62]。

4. 基因排列

由于反转录合成 cDNA 技术的改进以及序列测定方法的完善,越来越多的病毒基因组的全长序列得到测定。因此,尽管目前已知的正链 RNA 病毒基因结构复杂多样,但是借助计算机进行序列分析与比较已经证明,大多数该类病毒(即使不是全部)都有着某种程度的遗传相关性,而且,大多数植物病毒与动物病毒之间也显示出或远或近的关系^[30—33]。

Goldbach 按照基因组结构并与动物正链 RNA 病毒相比较,将目前已知的一些正链 RNA 病毒划分为二个大组。这样的比较与划分也有其优点。其一是通过比较划分可找出不同病毒之间的相互关系及进化途径,其二是根据已知病毒的基因组排列推测新的病毒基因组成,有利于新病毒的研究。本文在这里着重介绍 Goldbach 的划分体系。

(1) 第一组——与动物细小 RNA 病毒相关的植物病毒组

豇豆花叶病毒组,蠕传多角体病毒组和马铃薯病毒 Y 组被划归于这一大组。该大组病毒与动物细小 RNA 病毒具有遗传相关性(图 1.1),而动物细小 RNA 病毒(例如脊髓灰质炎病毒)已研究得相当清楚。本大组成员都具有以下共同的性质:

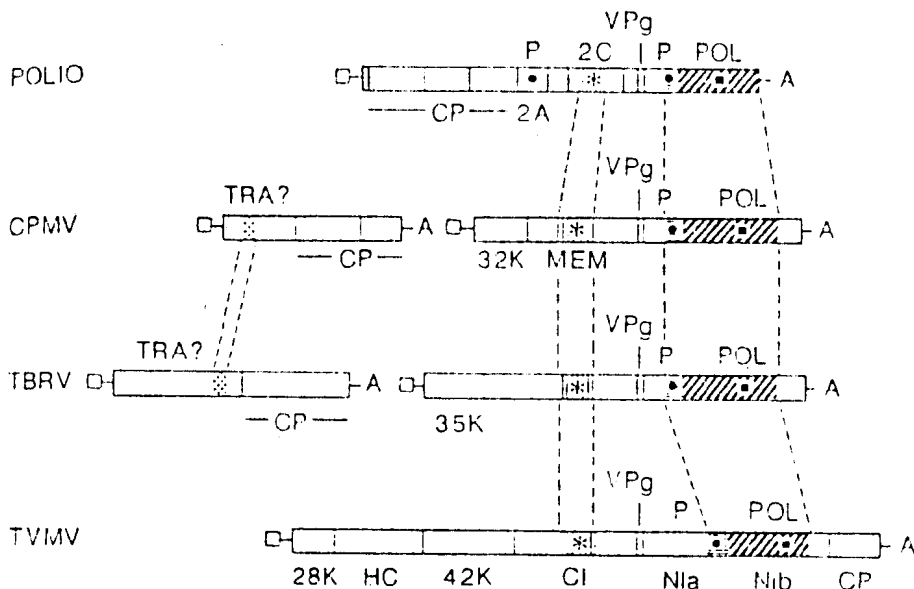


图 1.1 与动物细小 RNA 病毒 (picornaviruses) 相关的植物病毒组

氨基酸序列同源区域以相同的图形表示,其它符号: CP, 外壳蛋白;
TRA, 可能的转运功能; P, 蛋白酶; MEM, 膜结合区; POL, 核心 RdRp;
HC, 辅助组分; *, 核苷酸结合区域; ●, 半胱氨酸蛋白酶区;
■, 保守的多聚酶区域 (Goldbach, 1990^[33], 经作者同意引用)。

①基因组 RNA 的 5'端具有 VPg 结构, 3'端带有 poly (A) 尾; ②基因组 RNA 表达方式为 RNA 作为一单顺反子合成一个多聚蛋白, 后者经蛋白酶加工形成各种成熟的功能蛋白; ③它们编码一些非结构蛋白, 且这些非结构蛋白表现出极大的序列同源性; ④已经证明或推测参与病毒复制的蛋白的基因在基因组的排列位置上相似; ⑤推测该大组的所有病毒利用相同复制机制, 都以 VPg 作为引物分子启动复制。

从基因组组成与排列上看, 豇豆花叶病毒组与细小 RNA 病毒关系最近。该组病毒为二分体病毒, 其基因组由二分段 RNA 组成: M-RNA、B-RNA (见图 1)。把 M-RNA 排在 B-RNA 之左边, 则其遗传图谱几乎与细小 RNA 病毒完全对应。尤其是豇豆花叶病毒 (CPMV) 的两种外壳蛋白折叠形成三个 β 条纹状 (β -barrel) 区域, 其精细结构极接近于细小 RNA 病毒的三种大外壳蛋白的 β 条纹结构。因此豇豆花叶病毒组的病毒被看作为“分段”的细小 RNA 病毒。两组病毒之间似乎应该存在着共同的祖先。

(2) 第二大组——与动物 Sindbis 病毒相关的植物病毒

该大组的成员包括烟草花叶病毒组 (tobamoviruses)、烟草脆裂病毒组 (tobraviruses)、苜蓿花叶病毒组 (alfalfa mosaic virus group)、雀麦花叶病毒组 (romoviruses)、大麦病毒组 (hordeiviruses)、马铃薯病毒 X 组 (PVX)、芜菁花叶病毒组 (tymoviruses)、黄化病毒组 (lutroviruses) 等 (见图 1.2)。

但实际上, 这一大组的病毒只能说与 Sindbis 病毒有或多或少的相关性, 将它们划归于同一大组相当勉强。不论是从基因组大小来看, 还是从末端结构及翻译策略上看, 这一大组病毒的差异性都相当大 (见图 2)。随着越来越多的病毒 RNA 的序列被测定, 该大组病毒的关系越来越杂乱无章, 尤其是基因组较小的病毒, 如番茄束矮病毒组 (tombusviruses) 及黄化病毒组等的位置还有待于进一步讨论。然而其中的 tricornaviruses, tobamoviruses, tobraviruses, furoviruses 及 hordeiviruses 等组的病毒与 Sindbis 病毒的遗传学关系最为明显, 图 2 中标明的三种非结构蛋白与 Sindbis 病毒具有很大的序列同源性, 且其基因的排列位置相近, 其中的二种蛋白为核苷酸结合区域序列及一种 RNA 多聚酶功能区域。

二、非结构蛋白与病毒功能表达

病毒侵入细胞后, 病毒增殖并获得感染依赖于病毒功能蛋白的表达。病毒增殖主要包括四个连续的步骤: 脱衣壳 (decapsidation) —翻译 (translation) —复制 (replication) —包被 (encapsidation)。其中, 脱衣壳与包被两步骤为非酶促过程。但翻译与复制则是酶反应过程, 这些反应的完成依赖于病毒编码蛋白及寄主成分的参与。正链 RNA 病毒进入细胞内, 其 RNA 分子可直接作为 mRNA, 利用细胞的物质系统与能量系统翻译病毒的早期功能蛋白, 如复制酶、蛋白酶等, 这些功能蛋白则启动病毒增殖的下一个步骤, 如复制。同时病毒的感染的完成还需要在移动蛋白的帮助下进入邻近细胞。

1. 复制酶——依赖于 RNA 的 RNA 多聚酶 (RdRp)

正链 RNA 病毒的复制包括二个相区别的过程: 即病毒 RNA 的负链拷贝的合成及子

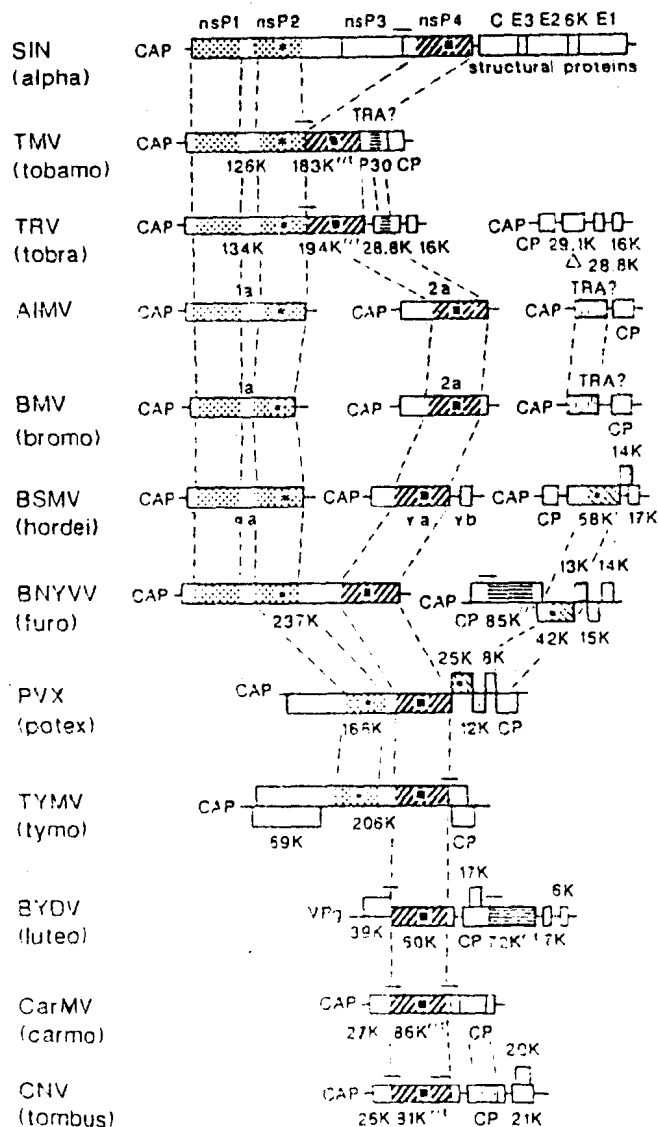


图 1.2 与动物 Sindbis 病毒相关的植物病毒组
氨基酸序列同源区域以相同的图形表示，其它符号同于图 1
(Goldbach, 1990^[33]，经作者同意引用)

代病毒 RNA (+链 RNA) 的合成。在 RNA 病毒的复制中，依赖于 RNA 的 RNA 多聚酶 (RdRp) 是一种关键性的酶。按照一般的观点，使用的术语“复制酶 (replicase)”应该是能够特异合成病毒正链与负链 RNA 的 RdRp，其核心功能是合成全长的基因组 RNA^[64]。然而到目前为止，分离纯化的酶制剂一般还不具有既合成 (+) 链又可合成 (-) 链的功能，因此，目前描述复制酶时采用术语 RdRp 比较恰当。

早期研究病毒复制酶时，得到的纯化或部分纯化的酶制剂大都是宿主成分，例如从 CPMV 与 CMV 感染的植物中分离得到的 130kD^[17]和 100kD^[32]即是宿主蛋白，它们在体

外合成的产物是小分子植物 RNA 或病毒 RNA^[17,58],但在病毒未感染组织中。这些具有 RdRp 活性的蛋白水平很低,而病毒侵染后其含量及活性提高了几十倍,因此有人提出了宿主编码的复制酶参与了病毒的复制;但另外一种观点是病毒自身编码的蛋白质作为病毒复制酶的核心酶,而宿主编码的蛋白——绝非宿主编码的 RdRp——则为复制酶的组分,这一观点与已知的多数动物 RNA 病毒及 RNA 噬菌体的复制酶的组成相吻合。纯化病毒复制酶,搞清其组成成分,并研究酶与模板的相互作用则是解决以上争论的关键所在。因此研究的重点一直在于病毒复制酶的纯化与定性。到目前为止,四种病毒的 RdRp 已被分离:TYMV^[8,58,60];BMV^[25,39,42,47,55,57,63];CCMV^[56,70];AIMV^[43];CMV^[41]。其中以从 TYMV 与 CMV 感染的植物中分离的 RdRp,其组成研究得最为清楚。

Hayes 等纯化出一种完全的 CMV 复制酶,而不仅仅是 RdRp。他们首先构建了 CMV RNA 各组分的克隆,其体外转录产物混合接种有感染性。由这些 cDNA 克隆转录得到的 CMV RNA 各组分都是均一大小的 RNA 分子。Hayes 测其所得的 RdRp 的活性时,就采用这些 cDNA 克隆的体外转录产物 RNA 作为模板。实验证明,该酶以 CMV 的全基因组 RNA 及单个基因组 RNA 组分为模板都能合成全长的单链 RNA 和双链 RNA,单链产物中既有(+)RNA 又有(-)RNA;以 RNA3 为模板时,可以合成单链 RNA3 和 RNA4。为了证明合成产物的极性和大小,他们构建了与 RNA1 不同位置互补,极性不同的寡核苷酸链,使之与合成的单链 RNA 互补配对粘合,以 RNase H 处理电泳,放射自显影,证明其酶合成片段大小与预测的全长 RNA1 的酶解片段大小一致,所以该酶是完全意义上的病毒复制酶。

Hayes 还构建了 RNA1、RNA2 cDNA 克隆的表达载体,转化大肠杆菌表达得到 protein 1a 和 protein 2a,并用该产物分别制备抗体,用 Western 杂交,ALPA,抗原二次反应及抗体抑制酶活反应证明复制酶中两个组分是 P1a 和 P2a,第三组分为宿主的 50kD 蛋白;50kD 蛋白存在与否决定了复制酶的酶活的有无,因此 50kD 不是复制酶中的污染杂质。所以该复制酶由两个病毒编码的蛋白和一个宿主编码的蛋白组成。另外,当负链合成后,以负链为模板进行正链合成时,显然得打开 dsRNA,所以该酶还具有解旋酶的活性。

Hayes 等从烟草中完全纯化与鉴定黄瓜花叶病毒复制酶,一方面给其它病毒复制酶的纯化提供了参考,另一方面也将带来复制酶结构、功能区域、功能行使等各方面酶本身性质的研究的更大突破。

根据 Goldbach 的划分体系,动、植物正链 RNA 病毒之间存在着或近或远的亲缘关系,因此,可以借助于了解得比较清楚的动物正链 RNA 病毒复制酶的进展来比较研究植物正链 RNA 病毒的复制酶。动物病毒中,病毒编码的复制酶组分蛋白包含 Gly-Asp-Asp (GDD) 序列,此为所有正链植物 RNA 病毒非结构蛋白中的保守序列^[6,64]。一般认为含有 GDD 序列的非结构蛋白就是病毒复制酶的组分,另一个存在于动、植物病毒非结构蛋白的保守序列是 NTP 结合位点,一般认为带有这一位点的蛋白可能在病毒 RNA 复制中行使某种功能,例如结合 NTP 及可能的 NTP 水解^[35]。

正如前面介绍 CMV 复制酶组分中提到宿主 50kD 蛋白一样,宿主的组分参与了病毒的复制。但有关这方面的信息了解得很少。

尽管在病毒复制酶的研究中已取得很大的进展,但彻底了解病毒复制酶的组分及功