

植物病毒与 分子生物学

〔日〕 岡田吉美 著



科学出版社

植物病毒与分子生物学

〔日〕 岡田吉美 著

梁训生 译

袁维蕃 校

内 容 简 介

此书是东京大学出版会出版的生物学丛书之一,内容简明扼要,引用材料较新,并能提出一些新观点。本书共分五部分:1.植物病毒与分子生物学的发展和近况;2.植物病毒的化学物质;3.植物病毒的遗传信息系统;4.植物病毒的分子聚合体系;5.胞质因子与植物病毒。可供从事植物病毒学、微生物学、遗传学、生物化学等方面的科研工作者及高等院校有关师生参考。

岡田吉美 著

植物ウイルスと分子生物学

東京大学出版会, 1977

植物病毒与分子生物学

〔日〕岡田吉美 著

梁训生 译

裘维蕃 校

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

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

*

1980年8月第一版 开本: 787×1092 1/32

1980年8月第一次印刷 印张: 4 1/4

印数: 0001—5,730 字数: 92,000

统一书号: 13031·1335

本社书号: 1854·13—9

定价: 0.68 元

此书采用的植物病毒缩写名称

- AMV (Alfalfa mosaic virus; 苜蓿花叶病毒)
- BBMV (Broad bean mottle virus; 蚕豆斑驳病毒)
- BMV (Bromegrass mosaic virus; 雀麦花叶病毒)
- CCMV (Cowpea chlorotic mottle virus; 豇豆褪绿斑驳病毒)
- CGMMV (Cucumber green mottle mosaic virus; 黄瓜绿斑驳花叶病毒)
- CMV (Cucumber mosaic virus; 黄瓜花叶病毒)
- PVX (Potato virus X; 马铃薯X病毒)
- TMV (Tobacco mosaic virus; 烟草花叶病毒)
- TNV (Tobacco necrosis virus; 烟草坏死病毒)
- TRSV (Tobacco ringspot virus; 烟草环斑病毒)
- TRV (Tobacco rattle virus; 烟草脆裂病毒)
- TYMV (Turnip yellow mosaic virus; 芜菁黄色花叶病毒)

译 者 的 话

随着现代科学技术的发展,植物病毒学与分子生物学这两门学科已相互渗透,相互衔接,正朝着微观世界深入发展。

这本书是运用深入浅出的笔法,以植物病毒的核酸与蛋白为主要对象,以植物病毒的重组实验体系为中心,从大分子物质的角度,阐述了植物病毒的提纯、化学结构与组成、遗传与变异;并阐述了植物病毒的分子聚合体系与形态形成过程;还从胞质因子方面概述了多分体病毒与类病毒的关系等。内容较新,实例较多,图示明确,适于一般从事生物科学的人们参考。

这本书是日本东京大学出版会编辑的“UP 生物学”丛书之一,当然是学科间相互融合的新的著作。书中有许多新的理论和新的观点,还有待今后深入研究,使其日臻完善。

尽管如此,由于分子生物学在当前生物科学领域中占有相当重要的位置,该书对植物病毒学及分子生物学的发展有着重要的现实意义,因此特将它译成中文。由于水平所限,译文中错误难免,希读者们加以指正。

在此书翻译过程中,曾蒙刘仪同志给予热情指导,特此致谢。

1979 年 5 月

本丛书发刊词

“信息公害”这一名词不仅成为日常用语，而在新书中也相继出现。我们专门发行这套生物学丛书，主要有下列的想法：

(1) 在广泛的生物学领域中，觉察到现有生物学讲义中的一些内容已过于简单，只是采用“详见某某方面”或推荐某种参考资料。这样就缺乏学生适用的参考书。

(2) 为了将详细些的生物学知识，面向热衷于深入学习的同学，没有内容简练的、富于吸引力的书是不行的。

(3) 在目前注意普及生物学常识的时代，既要从各个角度了解系统的理论知识，同时也要廉价易得。如采用分册的形式出版这类参考书，就可以满足教师及社会上按需选购的要求。

(4) 作者仔细参考了广泛的专业书刊，以科研为中心，编写了此书的总论及其详细的内容。这些专业的知识已涉及到各学科间衔接的边缘科学知识，不较详细的予以描述，就难以使同学了解到生物学的全貌。

由于各方面作者们的期望和热情支持，内容上是较多地强调了生物学的领域。如果此书使青年读者感到兴趣，并对自已遇到的问题给与帮助和解决的话，我们发行委员们将会感到高兴。

发行委员

江上信雄 倉石 晋

佐藤七郎 日高敏隆

目 录

1. 植物病毒与分子生物学的发展和近况	1
1.1 病毒的发现	1
通过陶制滤器的烟草花叶病病原物	1
发现病毒的时代	3
烟草花叶病毒的生物学定量	3
1.2 从烟草花叶病毒的结晶到病毒的理化研究时 代	4
烟草花叶病毒的结晶过程	4
病毒是核酸与蛋白质的复合物	6
电子显微镜观察病毒的形态	7
X射线测定病毒的形态	10
烟草花叶病毒的结构模型	11
病毒粒体形态的规则性及其在生物学上的意义	12
烟草花叶病毒蛋白一级结构的确定	14
烟草花叶病毒核糖核酸的一级结构	15
1.3 近代分子生物学	17
不具有核糖核酸的病毒粒体无侵染性	17
烟草花叶病毒降解一部分蛋白并不改变其遗传性	18
核糖核酸与蛋白质在试管中重组成烟草花叶病毒的粒 体	19
人工重组病毒的遗传性状决定于核酸	20
人工重组病毒的形态决定于蛋白质	21
烟草花叶病毒中仅核糖核酸具有侵染性	22
氨基酸的排列决定于核糖核酸	23

烟草花叶病毒与遗传密码	25
植物病毒核糖核酸的信息核糖核酸 (mRNA)	28
植物病毒的分子聚合体系	29
1.4 多分体病毒: 遗传基因的分离	31
植物病毒中存在着多分体病毒	31
烟草脆裂病毒由长短两种粒体组成	32
烟草脆裂病毒由稳定型及不稳定型病斑组成	33
长粒体具有核糖核酸复制酶的遗传基因, 短粒体具有蛋 白质外壳的遗传基因	33
卫星病毒	34
多分体病毒在生物学上的意义	35
1.5 类病毒	36
马铃薯纤块茎病不属于病毒	36
类病毒	36
2. 植物病毒的化学物质	38
2.1 病毒的提纯	38
利用蛋白质的特性提纯病毒	38
利用大分子粒体的特性提纯病毒	38
聚乙二醇法提纯病毒	39
植物病毒提纯后的产量	41
2.2 病毒结构的成分	41
蛋白质系由 20 种氨基酸所组成	41
病毒蛋白质的化学结构	43
病毒蛋白易于聚合	45
核酸系由 4 种碱基组成	50
最近对植物病毒核糖核酸末端结构的重要校正	52
烟草花叶病毒核糖核酸的两端为 3'-末端结构	55
植物病毒核糖核酸的一级结构	56
3. 植物病毒的遗传信息系统	60
3.1 植物病毒核糖核酸的功能	60

植物病毒核糖核酸具有遗传基因	60
植物病毒的寄主范围亦决定于核糖核酸	61
植物病毒的遗传基因图	63
植物病毒的核糖核酸亦具有信息核糖核酸(mRNA)	64
转移核糖核酸(tRNA)的活性依赖于植物病毒的核糖核 酸	64
核糖核酸的5'-末端“壳”结构与侵染性	67
多分体病毒与遗传基因的分离	68
3.2 植物病毒核糖核酸的复制与转译	71
从复制机构观察植物病毒核糖核酸的特性	71
植物病毒核糖核酸的复制机构	74
植物病毒核糖核酸转译之谜	75
植物病毒核糖核酸的遗传密码	77
在受侵植物上观察到来自植物病毒的蛋白	79
作为植物病毒一步增殖实验体系的原生质体培养	80
3.3 植物病毒与变异	83
从烟草花叶病毒变异株系观察外壳蛋白的结构变化	83
氨基酸被取代后外壳蛋白功能的改变	85
4. 植物病毒的分子聚合体系	87
4.1 病毒的形态依赖于亚基结构	87
病毒粒体由亚基结构组成	87
从烟草花叶病毒观察亚基结构的聚合	88
从球状病毒观察亚基结构的聚合	90
4.2 核酸与蛋白质的聚合体系组成病毒	92
烟草花叶病毒在试管中重组的成功与发展	92
人工取代核酸及蛋白质获得重组病毒	94
两种蛋白质重组的病毒	97
烟草花叶病毒的脱外壳反应具有方向性	98
4.3 烟草花叶病毒的形态形成反应及其分子的识 别	99

烟草花叶病毒的形态形成反应是从 RNA 的一端起始吗?...	99
形态形成反应受烟草花叶病毒蛋白聚合物所控制	101
烟草花叶病毒的形态形成反应系由 3'-末端的 830 核苷	
酸区段起始然后向两端伸长	103
在断片一边的两股核糖核酸尾端具有中间体粒子	106
烟草花叶病毒形态形成反应的模型	109
根据烟草花叶病毒的形态形成反应观察植物病毒的复	
制与进化	112
5. 胞质因子与植物病毒	114
胞质因子	114
类病毒属于核糖核酸的性胞质因子吗?	114
胞质因子与多分体病毒	115
参考书	117
结语	118
图版来源	120
中文索引	122
外文缩写语索引(附: 株系名称索引)	126

1. 植物病毒与分子生物学的发展和近况

1.1 病毒的发现

通过陶制滤器的烟草花叶病病原体

自从 Leeuwenhoek 发展了显微镜以后,我们才了解到世界上存在着肉眼观察不到的大量微生物。到 19 世纪后半叶, Koch, Pasteur 及 Lister 等集中精力研究了并逐渐认识到这些微生物是造成人类疾病、发酵和腐败的原因。

烟草叶片上呈现花叶症的病害(图 1)。Mayer 观察到这种病烟叶的压出汁液可以传播花叶病,当时一直认为是压出汁液中含有细菌造成的。在同一时期,俄国学者 Ivanovsky 曾使用陶制滤器过滤压出汁液除掉细菌,奇怪的是通过陶制滤器的压出汁液,仍保留着侵染性。这个试验说明了引起烟草花叶病的病原体是比细菌还微小得多的生物。但是这个伟大的发现,在当时就连他们自己也不敢相信。那时开始设想这是细菌产生的毒素,以后又认为细菌污染的可能性最大。为此,一些人就将最早发现病毒的 Ivanovsky 的成果予以否定,并将荣誉授与了荷兰学者 Beijerinck。

于 1898 年,Beijerinck 重复了 Ivanovsky 的试验。他亲自反复证明了病烟叶压出汁液的滤液是绝对不会含有细菌的,并且证明了这种侵染性的物质可以扩散到琼胶内。由于当时所了解的就是最小的细菌也绝不会扩散到琼胶内,于是 Beijerinck 相信通过细菌过滤器的烟草花叶病汁液中具有更微小的物体,认为它本身还具有增殖能力,同时主张把这种微

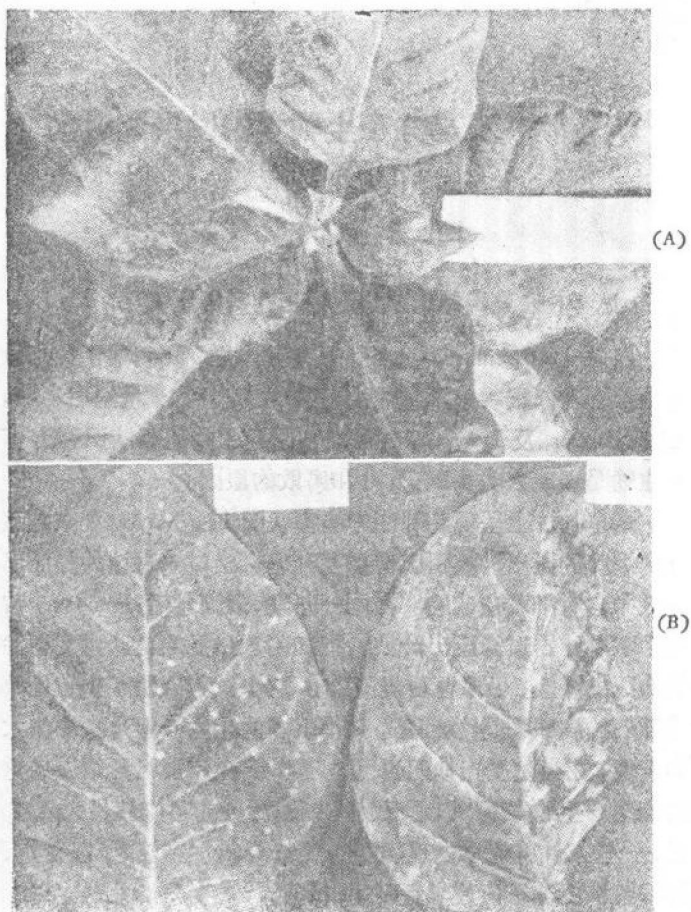


图1 侵染 TMV 的烟草叶片症状
(A) 花叶症； (B) 局部枯斑(仅右半叶受侵染)

小的物体称为病毒 (Virus; ウィルス)。不仅在那个时代，就是今天的光学显微镜同样也观察不到它的形态。

烟草花叶病毒 (TMV) 的发现，也就是世界上病毒的首次发现。

发现病毒的时代

在 Beijerinck 认识到病毒的同时,很快就被正在研究而尚未搞清楚的多数工作者们所接受,不得不将这种新的生物称为病毒。但是还有些人认为它是一种非常小的细菌。另一方面,对 TMV 以外的多种侵染性病原物也开展了研究工作。结果发现黄瓜花叶病及马铃薯 X 病等多数植物病害,它们的病叶压出汁液,通过陶制滤器后,同样不会丧失其侵染性。

不只限于植物病害,当时对人体病害中的黄热病及狂犬病等,通过同样的方法处理病组织汁液后,发现同样具有侵染性。到 1915 年 Twort 又发现了细菌病毒。两年以后, d'Herelle 将具有溶菌现象的细菌病毒称为细菌噬菌体,并且建立了定量的方法。到这时,对把过滤性病原物称为病毒抱有怀疑态度的人们就不存在了。从 TMV 的发现到病毒的定名,称为发现病毒的时代。不久,就朝着阐明病毒本质及其生物学机制的时代发展。

烟草花叶病毒的生物学定量

细菌适于在具有营养源的琼脂培养基上增殖,所以将混有细菌液的培养基置于适温下,就可以长出许多菌落,根据溶液中的细菌数与生出的菌落数进行比较,就容易得出定量分析的结果。但是病毒在琼脂培养条件下显然不会进行增殖。研究植物病毒的时候,除利用病毒对活植物的侵染性进行定量调查以外,还没有其它的方法。尽管 TMV 比细菌噬菌体发现早得多,但是建立定量法却是 1929 年的事。

所谓局部枯斑法 (Local lesion method),就是指 TMV 在烟草的某些“种”上不表现花叶症(图 1, B),而表现局部坏死斑。通过烟叶上出现的坏死斑数得出 TMV 的相对浓度。采

用这种定量法时,烟叶的生理状态影响较大,同时要在试验的第3—4天计算局部枯斑数目,因此与细菌噬菌体的定量法比较起来就显得麻烦了。在植物病毒学中虽然最早建立的是TMV定量法,但是解决不了病毒的精提纯,病毒结构以及生物活性等问题。以后,在植物病毒学上开展的生物化学及分子生物学等项研究,均以TMV为主要对象,因此TMV在病毒学的研究上具有重要的意义。

容易定量的细菌噬菌体研究法,一直延用到分子遗传学,分子生物学等领域中。较烦琐的TMV定量法,直到病毒的理化研究时代才得到发展。

1.2 从烟草花叶病毒的结晶到病毒的理化研究时代

烟草花叶病毒的结晶过程

病毒这个新的超微病原物的本质可能是什么?人们为了搞清这个问题,大部分选择了TMV为研究对象。

在19世纪20年代后期,才开始提供出有关TMV本质研究的科研成果。其中重要的一项,就是发现TMV属于蛋白质样物质。例如:病毒可以随着蛋白质变性剂的处理而丧失其侵染性,它还可以通过胃脘酶样蛋白质降解酶的降解而丧失其侵染性。另一项重要的研究成果则是制备出TMV的抗血清,说明TMV具有专化的抗原性,而且进一步证明了TMV属于某种蛋白质。

1933年,在普林斯顿的洛克菲勒医学研究所,植物病理系Stanley,曾经开始对TMV的精提纯进行了研究,成为此项科学研究的著名工作者。在他设想TMV为蛋白质的前提下,很多工作者相继对TMV的精提纯开展了详细的研究,同

时对病毒的本质也开展了深入的研究。他特别采用了局部枯斑法,将精提纯过程中的每个步骤进行了侵染性的定量分析,通过反复地试验,对精提纯法进行了科学的改进。Stanley 同该研究所的 Northrop, Kunitz 等幸运地成为研究蛋白质化学的先驱者。人们所了解的酶结晶过程这一伟大贡献,是他们精心钻研,将精提纯技术直接应用到蛋白质上来的结果。同时他们还并用了硫酸反复沉淀法及碱性醋酸铅脱色法。1935 年,Stanley 获得了 TMV 的标样,当时得到了 10^{-9} 克/毫升的 TMV 稀溶液,同时具有高度的侵染性,并且成功地在标样中析出了 TMV 的结晶。

Stanley 曾将 TMV 的结晶过程发表在《科学》(Science)刊物上,已成为厂史性的论文。这篇论文虽然仅有一页多*,但是其中报道的内容是重要的。在论文中谈到 TMV 是靠自己本身触媒的能力获得了大分子的蛋白质。第二年 Bawden 对此结论的本身,对侵染性病原物中的超微生物应该是病毒这样一些结论进行了纠正,而且认为结晶属于化学物质。这一报道,却震动了世界上的自然科学工作者们。

到这个时候,生物学者们认为自身增殖现象,仅仅是生命所具有的神秘属性,结晶的化学物质是具有生命的基本性质和能力,不靠强烈的冲击是难于形成结晶的。从那时开始生命现象的研究已经不单是生物学者的事情了。Stanley 以短篇论文报道的 TMV 结晶过程,已成为解释生命现象的生物及化学研究的共同基础。这样的话,化学工作者甚至物理学工作者也都可以着手研究,这样就从历史上给生命现象的研究开辟了广阔的道路。

* 论文照片删掉。——译者注

病毒是核酸与蛋白质的复合物

Stanley 在获得提纯的 TMV 结晶时,就首先报道了病毒是可以通过自己本身的触媒能力获得大分子蛋白。与此同时,脲酶亦开始获得结晶,并证明了脲酶属于蛋白质,这样说明了活体触媒中,有的酶就属于蛋白质。在那个时期,很自然地就认为增殖现象,既要自己本身的触媒能,也要靠蛋白质所具有的功能。

到 TMV 获得结晶的第二年, Bawden 及 Pirie 认为 TMV 经常含有少量的磷和糖,其中还发现了核糖核酸 (RNA)。了解到 TMV 已不是 Stanley 初期所认识的那样属于大分子蛋白, TMV 属于核酸与蛋白质的复合物。

当时,虽然了解到病毒是含有少量的核糖核酸 (TMV 约含 5%),但是并不了解病毒侵染性的本质。当然也不了解核酸在生物学上的重要性。根据多方面报道的实验结果得知, TMV 经过胃脲酶降解后,则丧失其侵染性,这就暗示了蛋白质在侵染性的本质上是重要的。一直到 20 年以后,才证明了 TMV 侵染性的本质为核糖核酸。

由于 TMV 成功地获得了结晶,促进了很多种植物病毒的精提纯研究。例如: 番茄丛矮病毒 (Tomato bushy stunt virus)、南方菜豆花叶病毒 (Southern bean mosaic virus)、芜菁黄色花叶病毒 (Turnip yellow mosaic virus) 等,均分离到了病毒的结晶。当 TMV 获得结晶 20 年以后,在动物病毒中,如小儿麻痹病毒也获得了结晶。事实证明,所有的病毒均与 TMV 初期研究的化学组成一样,是核酸与蛋白的复合物。

但是就核酸的种类而言,长期以来一直认为植物病毒具有特殊性。作为动物病毒或细菌噬菌体的核酸,有的属于核

糖核酸,也有的属于脱氧核糖核酸 (DNA)。除去未了解到的植物病毒以外,为什么植物病毒的核酸仅限于核糖核酸 (RNA),研究工作者们对这个问题的实质曾经进行过讨论,同时默认植物病毒的核酸并不一定全是核糖核酸。于是他们根据这种想法,利用化学的方法,对一个一个的植物病毒进行了核酸种类的研究,结果了解到植物病毒中也存在着少数的脱氧核糖核酸病毒。因此,一直到 1968 年,根据 Shepherd 的实验才认识到古老的花椰菜花叶病毒 (Cauliflower mosaic virus) 就是属于脱氧核糖核酸病毒。到 19 世纪 30 年代,还不知道核酸的种类为病毒定名时所不可缺少的一项内容。

电子显微镜观察病毒的形态

病毒的形态如何? 结构怎么样? 自从 TMV 析出结晶以后,很多人首先把这个问题作为研究的主要对象。大家的愿望是能够观察到病毒的形态。由于病毒比细菌还小,光学显微镜根本观察不到它的形态,到了电子显微镜问世以后,才真正满足了人们的这一愿望。

最初电子显微镜拍摄的 TMV 照片,成像不鲜明,边缘不清楚,好似小球状的块。到 1944 年, Wyckoff 和 Williams 采用了金属蒸气投影法拍照取得了成功。这种方法可以将病毒的外观立体影像清楚的显示出来。例如图 3A,就是采用铬的蒸气,从一侧喷涂 TMV 的电镜照片。影像上的白色部分为 TMV 粒体的一面,是靠喷涂上的铬外膜显示出来的。相对的另一面为黑影部分,是 TMV 粒体未喷涂上铬的部分。根据这种投影的立体照片,就能够将病毒的大小及形态正确地反映出来。

Williams 利用这种投影法,对大蚊虹色病毒 (Tipula iridescent virus) 的球状粒体进行了立体结构造影,成为历史上著