



研究与探索

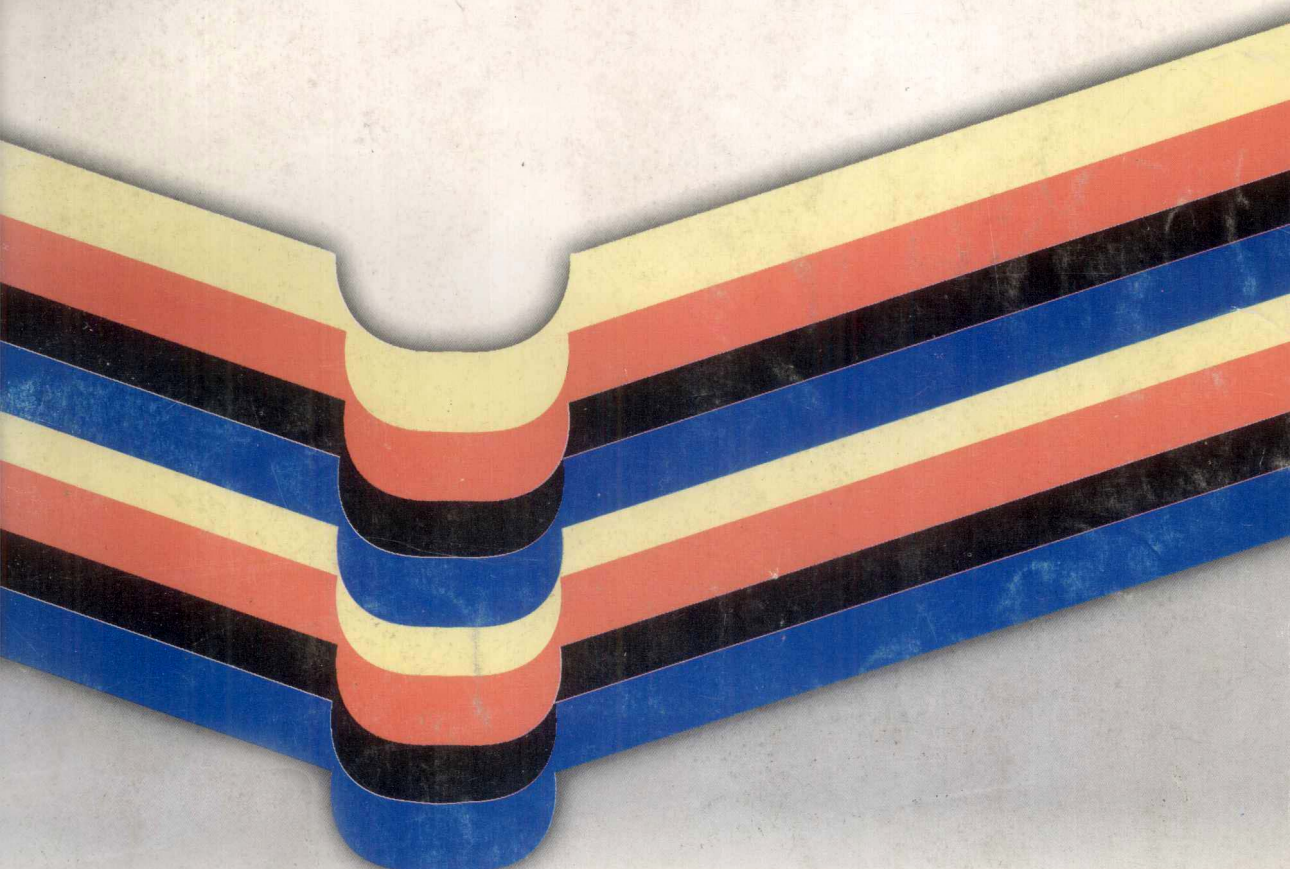
—— 面向 21 世纪博士后论文集

STUDYING AND EXPLORING

—— A POST-DOCTORAL SYMPOSIUM FACING THE CENTURY

主 编 张耀洲 吴天星

副主编 陈 刚 刘 红



上海科学技术出版社

研究与探索

——面向 21 世纪博士后论文集

STUDYING AND EXPLORING

——A POST-DOCTORAL SYMPOSIUM FACING THE CENTURY 21

主 编 张耀洲

吴天星

副主编 陈 刚

刘 红

上海科学技术出版社

研究 与 探 索

——面向 21 世纪博士后论文集

主编 张耀洲 吴天星

上海科学技术出版社出版、发行

(上海瑞金二路 450 号)

浙江农业大学印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 16.25 字数 376,000

1997 年 6 月第 1 版 1997 年 6 月第 1 次印刷

印数 1—1,000

ISBN 7-5323-3938-6/N·62

定价:31.00 元

序

1985年由美籍华人科学家、诺贝尔奖金获得者李政道教授提倡,在邓小平同志亲自关心下建立起的中国博士后流动站制度已经十一年了。十一年来,全国已先后有4000余名优秀博士进入博士后流动站工作,其中2000多人已圆满完成了博士后研究工作,走上新的工作岗位。他们在各有关科研、教学领域取得了许多令人瞩目的成绩,一大批优秀青年人才脱颖而出,很多人被破格晋升为教授、研究员,还有相当一部分人已成为博士生导师、学术带头人。去年10月在北京举行的“庆祝博士后制度实施十周年系列活动”初步展现了博士后制度所取得的巨大成就,国家领导人江泽民、李鹏、乔石、李瑞环等为此亲笔题词。国务院副总理李岚清及我国博士后制度倡导者李政道博士等到会祝贺。

为促进博士后之间的学术交流,在1994年杭州举行的“面向21世纪学术研讨会”的基础上,论文经专家审核,选出具有较高学术水平的42篇博士后论文,题名为《研究与探索——面向21世纪博士后论文集》,由上海科学技术出版社编辑出版。展示了博士后的研究领域十分宽广。对推动浙江省乃至全国的博士后制度的建议具有积极的作用。

希望通过论文集的出版,扩大与外界的交流,使博士后成长为跨世纪人才和学术带头人。看到博士后的成长,我十分高兴,特此作序。

朱祖祥

1996.4.18 于杭州

前 言

中国的博士后制度是美籍华人科学家、诺贝尔奖金获得者李政道教授向中国政府建议,在邓小平同志的亲自关怀下建立起来的高层次学术制度。其实施形式为在高等院校及科研单位中挑选一部分学术水平与师资力量属全国前列、达到或接近国际先进水平的学科,设立博士后流动站,招收国内外新近获得博士学位的优秀青年学者进站从事为期两年的研究工作。其目的就是为他们提供良好的学术环境、工作条件和生活条件,通过一种特殊的方式来帮助他们尽快成长为一批跨世纪的新一代高级专业人才。十年来的实践证明,在我国建立博士后制度是完全正确、十分必要的,一批博士后在学业上得到了进一步的扩充和提高,取得了丰硕的成果,成长为新一代学术骨干。

为了加强交流、增进了解,我们在浙江省人事厅的关心下,在1994年11月于杭州召开了“面向21世纪——博士后学术研讨会”,有来自全国各科研院校的四十多位博士后参加了研讨会,交流了学术论文,会议研究决定在此基础上,编辑出版《研究与探索——面向21世纪博士后论文集》,由浙江农业大学生物化学研究所和浙江博联营养与工程科学研究所负责稿件收集、审稿等工作,并在资金上予以大力支持。本书的出版,是对我国博士后学术水平的一次检阅,增加人们对博士后的了解,为促进博士后制度的建设作出自己的贡献。

在成书过程中,得到了上海科学技术出版社周星娣老师的大力支持,浙江博联营养与工程科学研究所朱洪柱副编审对本书的整理作了大量的工作,在此深表谢意。

因编者水平有限,本书内容涉及广泛,书中错误难免,敬请专家和同行多提宝贵意见。

编 者

1996.6.3

研究与探索

——面向 21 世纪博士后论文集

目 录

马铃薯 Y 病毒的分子生物学	张耀洲 林 蓉 徐敏琳(1)
中国白菜分类的认识和方法论	曹家树 蒋有条 曹寿椿(14)
昆虫迁飞过程中的边界层顶现象	翟保平(20)
顽拗性黄皮种子发育过程中脱水敏感性、ABA 水平和 Dehydrin 蛋白表达的变化	何军贤 金剑平 傅家瑞(26)
几种常用苯二氮草类化合物对动物摄食和增重的影响	吴天星 张耀洲 徐敏琳(31)
蜕皮激素的应用研究	吴天星 张耀洲(38)
单子叶植物可作为农杆菌介导的遗传转化的寄主	刘明志(46)
脱落酸和抑制剂对萌发花生子叶肽链内切酶和花生球蛋白降解的影响	宾金华 沈 芸 傅家瑞(50)
植物诱导抗病的研究进展	宾金华(58)
茉莉酸甲酯(Methyl jasmonate)的生理生化及在植物抗病中的作用	宾金华 潘瑞炽(62)
家蚕血液中超氧化物歧化酶(SOD)的研究	胡家恕 张耀洲(68)
抗癌药物顺铂肾毒性发病机理的研究	谢立平(72)
氨基酸肾功能保护作用的实验研究	谢立平(78)
程控冻存对单个核细胞非 MHC 限制性杀伤作用影响的研究	黄 河 林茂芳 林修基(85)
抗癌药物(V):鬼臼毒素自旋标记衍生物在人红细胞中的还原和穿透细胞膜的速度	王彦广 陈耀祖(91)
血管内氧合器的研制及仿生学探讨	江朝光 李功宋 朱朗标 林 刚 周 津 杨浦臣(96)
小波、分形与图象数据压缩	陈 刚(102)
C^{∞} 中光滑有界域上的动力学	张文俊(108)
天然产物绝对构型的反应质谱法测定	潘远江 翟建军 陈耀祖(112)
边缘生存空间——概念、识别及意义	邹欣庆(117)

一种描述生物地理学研究的新方法

- 以白垩纪钙质超微化石为例..... 邹欣庆 葛晨东(120)
- 数值天气预报模式预报技巧变化的机制..... 谭季青(125)
- 大气臭氧损耗中的 Diels-Alder 反应 赵黎明 孙华斌 刘成卜(130)
- 稳恒磁场用于金属凝固时的强迫流动..... 杨院生 胡壮麒(136)
- 腐蚀磨损交互作用研究中腐蚀分量的一种暂态测量方法..... 黄彦良 姜晓霞 李诗卓(140)
- 对有底水层油藏火烧油层过程的三维模拟 王运东 M. Greaves(144)
- 黑液浓度在线自动检测仪的设计..... 徐海松 孙优贤(152)
- 等离子束表面改性..... 严 密(157)
- 等淬温度对奥-贝球铁形态的影响 严 密(161)
- 循环机进出口法兰的力学分析..... 刘 红 张康达 高增梁 方德明(166)
- 一种新型的扁壳元..... 刘 红(172)
- 邮电通讯电源集中监控系统研究..... 路林吉(177)
- 实际表面接触的声发射模型..... 王庆明(181)
- 我国矿井开采技术的发展方向及地质研究对策 徐凤银 朱兴珊 马志存 乔增飞 徐 靖(186)
- 南桐矿区构造特征及其成因..... 朱兴珊 徐凤银 甘志杰 严 锦(191)
- 环境优化管理的产权途径及其在中国市场体系中的应用前景..... 潘家华(198)
- 排污许可额贸易机理分析..... 潘家华(206)
- 一类分形曲面的构造及其维数刻划..... 陈 刚 王宏勇(212)
- 静海县家庭农业操作的社会化..... 刘 迁(219)
- 关于样条小波的注记..... 刘有明(232)
- 手性麻黄碱的研究(I)柱前荧光标记高效液相色谱法分离 1-麻黄碱/d-伪麻黄碱和
1-新麻黄碱/d-新伪麻黄碱等手性异构体
..... 邵 刚 朱 荣 宋 刚 陈淑娟 罗 旭(237)
- 手性麻黄碱的研究(II)轴不对称性荧光标识剂的合成与柱前荧光标记高效液相色谱
法拆分消旋体心得安和甲基麻黄碱
..... 邵 刚 王德胜 吴 芳 王 岫 罗 旭(242)

STUDYING AND EXPLORING

—A POST-DOCTORAL SYMPOSIUM

FACING THE CENTURY 21

CONTENTS

Molecular biology of potyviruses	Zhang Yaozhou, Lin Rong, Xu Minglin(1)
On the understandin and method of classification in Chinese cabbage	Cao Jiashu, Cao Shouchun, Jiang Youtiao(14)
PBL-TOP phenomena in migratory process of insects	Zhai Baoping(20)
Changes in desiccation-sensitivity, ABA Levels and dehydrin expression during development of recalcitrant wampee seeds	He Junxian, Jin Jianping, Fu Jiarui(26)
Some benzodiazepines on animal weight growth and intake	Wu Tianxing, Zhang Yiaozhou, Xu Minglin(31)
Monocotyledonous plant is host of agrobacteriu-mediated transformation	Liu Mingzhi(46)
Effects of abscisic acid (ABA) and inhibitor on endopeptidase and arach degradation during peanut (Arachisin hypogaea L.) seeds germination	Bin Jinhua, Shen Yun, Fu Jiarui(50)
Advanced in the study of induced disease resistance of plant	Bin Jinhua(58)
Methyl jasmonates biochemistry, biophysiology and role in plant resistace	Bin Jinhua, Pen Ruizhi(62)
Study on superoxide dismutase of the blood from silkworm (Bombyx mori)	Hu Jiasu, Zhang Yaozhou(68)
Insights into pathogenesis of cisplatin-induced acute renal failure	Xie Liping(72)
Experimental investigations on nephroprotection by amino acids in rats ...	Xie Liping(78)
Effect of cryopreservation on no-MHC restricted killer cells activities in mononuclear cells	Huang He, Lin Maofang, Lin Xiuji(85)
Anticancer drugs (V):reduction in hnman erythrocyte and membrane penetration	

rate of spin-labeled derivatives of podophyllotoxin

..... Wang Yanguang, Chen Yaozu(91)

Fabrication and experimental study of intravascular oxygenator (IVOX) and bionics

research Jiang Chaoguang, Li Gongsong, Zhu Langbiao, Lin Gang et al. (96)

* * * * *

Wavelets, fractals and image compression Chen Gang(102)

Dynamics on smooth bounded domains of C^n Zhang Wenjun(108)

The determination of the absolute configuration of natural products by reaction

mass spectrometry Pan Yuanjiang, Zhai Jianjun, Chen Yaozu(112)

Marginol surviving space—concept recognition and significances Zou Xinqing(117)

A new method in descriptive biogeography study—cretaceous calcareous

nannoplankton as an example Zou Xingqing, Ge Chendong(120)

The mechanism of why forecast skill of numerical weather forecast model changes

..... Tan Jiqing(125)

Diels-Alder reaction in the ozone loss in the atmosphere

..... Zhao Liming, Sun Huabin, Liu Chengbu(130)

* * * * *

Metal flow forced by stationary magnetic field in solidification processing

..... Yang Yuansheng, Hu Zhuangqi(136)

A transient method for the measurement of corrosion component in the study of the

mutual effects between corrosion and wear

..... Huang Yanliang, Jiang Xiaoxia, Li Shizhuo(140)

3D modelling of in situ combustion (ISC) processes in oil reservoirs with an

underlying water aquifer Wang Yundong(144)

A design of the automatic refractometer for on-line black liquor consistency

measurement Xu Haisong, Sun Youxian(152)

Plasma arc surface modification Yan Mi(157)

Study on the bainite microstructure in Austenitic-Bainitic ductile iron

..... Yan Mi(161)

Mechanics analysis of in & out flanges of compressor

..... Liu Hong, Zhang Kangda, Gao Zengliang, Fang Deming(166)

A new kind shallow shell element Liu Hong(172)

Research on concentrated monitor system of communication power supply systems

..... Lu Linji(177)

An acoustic emission model of real surface contact process Wang Qingming(181)

Development direction of mining technology and its geological countermeasure

in China Xu Fengyin, Zu Xingshan et al. (186)
Structural feature and origin of Nantong mining area
 Zhu Xingshan, Xu Fengyin, Gan Zhijie, Yan Jing(191)

* * * * *

Property rights approach to optimal environmental management and its applications
in the transitional Chinese economic system Pan Jiahua(198)
Market mechanism of a tradable permit system for pollution control Pan Jiahua(206)

* * * * *

Constructton and dimension characteristics of a class of fractal surfaces
 Chen Gang, Wang Hongyong(213)
The socialization of familial agriculture function in Jinqhaicounty Liu Qian(219)
A note on spline wavelets Youming Liu, D. R. Huang(232)
Studies on ephedrine stereoisomers [I] Separation and chaacterization of (1)-ephedrine
(d)-pseudoephedrine and (1)-norephedrine/(d)-norpseudoephedrine by high-
performance liquid chromatography with fluorescence detection
 Shao Gang, Song Gang, Zhu Rong, Chen Shujuan, Luo Xu(237)
Studies on ephedrine stereoisomers [II] A chiral axis derivatization reagent for
resolution of aromatic propanolamines by high-performance liquid chromatography
 Shao Gang, Wang Desheng, Wu Fang, Wang Xiu, Luo Xu(242)

马铃薯 Y 病毒的分子生物学^{*}

张耀洲 林 蓉^{**}

(浙江农业大学生物化学研究所, 杭州 310029)

徐敏琳

(浙江医科大学附属第二医院, 杭州 310004)

摘 要 马铃薯 Y 病毒基因组为单链正义 RNA, 分子量改为 10kb, 通过蚜虫等昆虫进行传播。由真菌传毒的病毒则有交叉的两个 RNA 分子组成。马铃薯 Y 病毒编码一个大蛋白, 5'-端有 VPg 基因, 3'-端有 Ploy(A) 尾巴。大蛋白经加工消化形成 8 个以上的成熟功能蛋白。本文分析了马铃薯 Y 病毒基因和蛋白的结构和功能, 探讨了今后的研究和发展方向。

关键词 马铃薯 Y 病毒、分子生物学、基因组、蛋白质

1 前 言

马铃薯 Y 病毒组是 34 个植物病毒组中公认的最大一个病毒组(Ward, 1991)。这个组至少有 30% 的病毒对农作物有严重的危害性(Ward, 1991)。这些病毒特点是在感染过程中形成的病毒粒子为杆状(Lesemann, 1988), 一个典型的特征是在被感染的细胞质中形成一个特殊的风轮状体或螺旋状体(Edwardos, 1974)。圆柱形包含体(Cylindrical inclusion, CI)是由病毒编码的蛋白所构成, 是马铃薯 Y 病毒组的许多重要的表现特征之一(Milne, 1988; Shukla 等, 1989; Ward 等, 1991)。一些马铃薯 Y 病毒也可产生不定型包含体病毒, 长为 680nm~900nm, 宽为 11nm~15nm, 一个约 10kb 的 ssRNA 分子周围缠绕着 2000 个单位以上的单一结构蛋白(Dougherty 等, 1988)。马铃薯 Y 病毒的传播媒介主要是蚜虫。另外, 有一些病毒是通过螨类或是由粉虱来传播的。此外, 有一些病毒是通过特殊的方法传播的, 即真菌传毒, 其病毒具有两条 ssRNA 基因组, 与马铃薯 Y 病毒无血清学关系, 可以将其视为是从马铃薯 Y 病毒组中进化而来的(Kashiwazaki 等, 1990)。菌传病毒的顺反子的顺序, 基因组表达的形式, 氨基酸序列的

* 国家自然科学基金浙江省自然科学基金和中国博士后科学基金资助项目。

** 浙江农业大学蚕学系。

同源性和在感染细胞中的不定型包含体的形状等,表明这些病毒与典型的马铃薯病毒两者之间有一个共同的祖先来源和相同的进化选择关系[典型成员是大麦黄花叶病毒(BaYMV)]。关于马铃薯 Y 病毒组的分类已被广泛地研究,Khan 等(1993)提出用序列来解决菜豆普通花叶病毒和黑眼豇豆花叶病毒分离株的分类位置。但马铃薯 Y 病毒的分类是一个十分复杂的问题(Ward 等,1991;Barnett,1991)。

马铃薯 Y 病毒研究的一个里程碑是 1986 年所完成的该组两个成员的全基因组的序列分析:一个是烟草蚀刻病毒(TEV, Allison 等,1986);另一个是烟草脉斑纹病毒(*Tobacco etch mottling virus*, TEMV, Domier 等,1986)。通过多年的潜心研究,业已基本上弄清了马铃薯 Y 病毒的基因组的结构和表达产物,测定了 9 个以上完整马铃薯 Y 病毒基因组的序列。

最近的研究表明,马铃薯病毒 A 基因组 RNA 的核苷酸序列类似于其他已报道的马铃薯 Y 病毒序列,长为 9565 个核苷酸,有一个 9177 个碱基的开读架编码 3059 个氨基酸的聚蛋白,分子量为 340KDa(Pwurand 等,1994)。根据序列比较发现,在马铃薯 Y 病毒和其他组的植物和动物病毒之间存在一定的关系(Domier 等,1987;Lain 等,1989)。现已弄清了一些马铃薯 Y 病毒的基因产物的功能,但总的来说,关于这些产物功能的了解实际上是很不充分的,也不是所有基因产物都能在体内检测到的。

在马铃薯 Y 病毒研究中,第二个突破性的结果大概是反转录合成 3 个马铃薯 Y 病毒完整长度的 cDNA 克隆,TVMV(Domier 等,1989)、PPV(Riechmann 等,1990)、BBWV 是 3 个正链 ssRNA 片段,都带有 mGpppA 的帽子结构,4 株 BBWV 的全长 cDNA 已被克隆,转录后的 BBWV RNAs 含有一 5'非病毒的 G 残基,这种 RNA 接种后可以产生与野生病毒粒子的 RNA 相似的症状,但在原生质体内的转录效果较低(Pogany 等,1994)。

马铃薯 Y 病毒的 cDNA 克隆开创了利用遗传工程技术在分子水平研究该病毒的生物学之路。关于马铃薯 Y 病毒生活史方面,如复制翻译、症状产生,以及细胞到细胞和植物到植物的传播,是目前要解决的问题。马铃薯 Y 病毒基因产物的功能,可在体外进行研究,这将对我们所了解的大部分正链 RNA 病毒的知识产生影响。另一方面,其他病毒的研究结果可以对我们研究马铃薯 Y 病毒组提供帮助。由于这些原因,及时地对马铃薯 Y 病毒的研究进行综述和总结是必不可少的。

2 基因组的结构和组成

马铃薯 Y 病毒的基因组为一条单链正链 RNA, RNA 长约 10kb, 5'端连接一个病毒基因组编码的蛋白(Vpg)(Siaw 等,1985;Riechmann 等,1989;Murphy 等,1990), 3'端有一个 Poly A 尾巴(Hari 等,1979)。它有一个长的开读架并翻译成一个大的前体蛋白(大小在 340~386KDa),进而被切割成小的成熟多肽。芜菁花叶病毒 TuMV 的全序列已有报道(Nicolas 等,1992)。在所有这些病毒的基因组中,基因成串联排列并编码不同的蛋白,在保守序列中,有些非结构蛋白的成员表现出特殊的氨基酸组成,被认为与 RNA 的复制有关。不管复制基因的特殊程序存在与否,外壳蛋白顺反子始终都位于基因组的 3'端。病毒的前体蛋白水解作用需要 3 个水解活性蛋白,马铃薯 Y 病毒蛋白的结构和非结构蛋白与一些远缘的病毒相比,存在序列类似性,这就强有力地支持这样一种假说,即在病毒进化过程中,发生不同程度的基因系列的

重组,并导致这些进化向更加复杂的方向发展。

马铃薯 Y 病毒的前体蛋白被切割成不同的基因产物,是从前体蛋白的 N 端到 C 端作用的。它们在基因组中的顺序为 P1(第一蛋白;蛋白酶),辅助因子/蛋白酶(HC-pro)蛋白,P3(第三蛋白),一个推测的 6K 多肽(6K1),CI 蛋白(具有 RNA 螺旋酶的活性),另一个 6K 多肽(6K2),核包含体 a 蛋白(NIa;VPg 和蛋白酶),核包含体 b 蛋白(NIb;推测具有 RNA 聚合酶功能),以及外壳蛋白(CP)。与马铃薯 Y 病毒有关的有两个 BaYMV 基因组完整核苷酸序列已被报道(Kashiwazaki 等,1990,1991;Davidson 等,1991)。顺反子所编码的 N 末端蛋白,可能的 6K1 多肽、CI、NIa、NIb 蛋白和 CP 已被定位于较长的 RNA 上(RNA1),排列序列类似于马铃薯 Y 病毒的中部分 3' 区域(Kashiwazaki 等,1990),比较发现,BaYMV RNA2 不同于马铃薯 Y 病毒基因组的 5' 端区域(Kashiwazaki 等,1991;Davidson 等,1991)。

马铃薯 Y 病毒的 5' 端非编码区的长度在 130(TuMV)~205(TVMV)个核苷酸范围内,它们的特点是 A 含量丰富,G 较少,PPV、TEV、TVMV、PVY 和 TuMV 的非编码区的排列揭示在这 5 个病毒中存在一些核苷酸保守序列(Lain 等,1989;Turpen,1989;Olivier 等,1992),尽管这也许并不是形成二级结构的关键(Turpen,1989),在这 5 种马铃薯 Y 病毒中的这些序列的保守性可能在病毒生活史上具有重要的功能。例如,在内衣壳形成转录和复制过程中(Lain 等,1989)就表现出这种功能。

不同的马铃薯 Y 病毒的 3' 非编码区在长度上、序列上以及所能形成的二级结构上的差异已有报道(Lain 等,1988;Turpen,1988;Quemada 等,1990),其共同的特征就是 AU 丰富区,并可相应形成二级结构(Turpen 等,1989)。(1)相同的马铃薯 Y 病毒的不同株系,它们的序列更加保守,如 CP 编码区(Wtzel 等,1991;Cervera & Garcia,未发表结果)。一些常用的遗传标记方法可举例说明,遗传标记亦被用于马铃薯 Y 病毒分类(Shukla 等,1989;Ward 等,1991;Quemada 等,1990)。(2)9 个短的部分序列同源性在不同的马铃薯 Y 病毒中均被发现(Lain,1990;Ugeda 等,1990),PolyA 尾巴在长度上是不尽相同的(Allison 等,1985;Lain 等,1988)。芜菁花叶病毒 RNA 的 3' 端非编码区包含一个 82 个核苷酸长的类似 tRNA 结构区(Tsai 等,1992)。

3 基因组表达:前体蛋白的加工

马铃薯 Y 病毒基因组 RNA 功能类似 mRNA,其翻译加工知道得较少,TEV 中的 5' 端非编码区的功能类似翻译增强子(Carrington & Freed,1990)。其特征与已讨论过的其他植物病毒的引导序列的增强子相似(Jobling & Gehrke,1987;Altmann 等,1990),马铃薯 Y 病毒基因组 RNA 存在一个非典型的结构-VPg 代替帽子结构,位于其 5' 端,PPV RNA 翻译起始点位于 AUG 位点(Riechmann 等,1991)。CPMV B-RNA 的 200KDa 前体蛋白的编码序列基因在昆虫细胞中通过杆状病毒载体进行表达,这种 200KDa 前体蛋白在病毒中具有 RNA 复制的功能,经 24KDa 蛋白酶作用切割成 170KDa 和 32KDa 两个产物,170KDa 蛋白进一步加工产生 60KDa、84KDa、87KDa、110KDa 和 112KDa 等一系列产物,类似于在豇豆细胞中的情况(Hans van Bokhoven 等,1992)。

马铃薯 Y 病毒 RNA 合成的前体蛋白后的水解过程已被详细阐述,这个过程可以在体外

(无细胞翻译系统)和在异质体内(*E. coli*)或者同源(转基因植物)体内系统中进行研究。两种病毒编码的蛋白酶,NIa(Carrington 等,1987a;Hellmann 等,1988;Chang 等,1988;Garcia 等,1989;Chabrial 等,1990)和 HC-pro(Carrington 等,1989),与病毒前体蛋白的后加工有关,现已发现,在整个加工过程中存在三种蛋白水解活性蛋白(Carrington 等,1990)。即 P1 蛋白参与整个水解过程(Verchot 等,1991),由烟草蚀刻马铃薯 Y 病毒编码的 NIb 蛋白酶催化 6 个加工过程,其中 3 个是自动蛋白水解机制(Maria 等,1992);NIa 切割前体蛋白 2/3 的 C-末端(Dougherty 等,1988)。TVMV 的 N 端蛋白 P1-HC-P3 通过重组杆状病毒在昆虫细胞和虫体中表达,这个前体蛋白片段在昆虫细胞中具有活性,通过特殊的抗体进行 Western blots,可以检测到成熟的 P1、HC 和 P3 蛋白的存在,证明在昆虫细胞中可以进行 HC 从前体蛋白上成熟的自动水解加工,从重组病毒感染的昆虫细胞中提取出来的 HC 在蚜虫试验中没有活性(Thorabury 等,1993)。

NIa 蛋白酶切割位点,通过实验已经证明为 7 个氨基酸(Carrington 等,1987,1988;Carrington 等,1989),有 6 个 NIa 切割位点存在于马铃薯 Y 病毒蛋白中的前体,被称为 A 到 F。通过体外系统或 *E. coli* 中的水解产物和若干种马铃薯 Y 病毒蛋白的 N 末端序列的分析,其中 5 个切割位点已被证明(B 到 F)(Carrington 等,1987;Hellmann 等,1988;Garrington 等,1988;Garola 等,1989)。目前,PPV 的位点 A 可被部分切割的证据已从体外翻译中得以证实,尽管切割位点在 TEV 中未被发现(Parks 等,1992),推测在该区域的部分加工在体内也是存在的,在感染后的植物中,用抗体可以检测到 TVMV 的 37KDa 和 42KDa 蛋白(Rodriguez-Cerezo 等,1991)。这两个产物的序列比较研究发现,切割仍发生在该位点上,P3 和 6K1 的形成也支持这个推论(Lain 等,1989;Lain,1990)。因为位点 A 不属于最适当功能切割位点,所以只进行部分加工,7 个多肽的氨基酸序列可以看到各个必要的功能切割位点(Dougherty 等,1989),或影响切割效率的因素(Dougherty 等,1989),生物化学和缺失分析研究 TEV 的 F 位点以及更进一步地研究不同的 7 个多肽序列,证明至少在体外都具有不同程度的切割反应(Dougherty 等,1989),在 NIa 切割位点上,马铃薯 Y 病毒有一个特别保守序列基元,而在其他病毒组中没有发现(Wellink 等,1988)。前体蛋白作为底物主要是在氨基酸序列水平上进行切割,因为 7 个多肽的 NIa-CP 连接区插入到一个非特殊蛋白中也可以被正确水解;此外,左右序列结构可以帮助提高底物效能(Carrington 等,1988;Garcia 等 1989),这个结果主要是在 TEV 中得到的,这在其他马铃薯 Y 病毒中也是可行的,尽管切割位点的试验并没有完全揭示保守切割基元,但许多生化特征已被证实(Ghabrial 等,1990)。NIa 蛋白酶的序列是高度保守的(Garcia 等,1989)。PPV、TEV 和 TVMV 的切割位点的有效识别是依赖于它们唯一的特殊蛋白酶(Garcia 等,1989;Garcia & Lain,1991;Darks & Dougherty,1991),这种位点之间非常特别的关系表明,必须在整个水解反应中才能被确定,在 TEV 中,最近被证明存在一种特殊情况,即 NIa 蛋白酶在内切点上存在细胞后转录蛋白切割的功能(Dougherty 等,1991),这个切点的序列(称为 V)与其他 8 个 NIa 位点的序列相比,尽管存在某些相关性,但毕竟是两个不同的序列(A 到 F),这些不同之处有可能具有启动适度的切割功能,事实上,这种蛋白水解的结果并不是在所有 NIa 分子上发生而只是部分地发生(Dougherty 等,1991),这个位点位于 VPg 和 NIa 蛋白的蛋白酶区,它的切割与病毒 RNA 复制过程有关。

多拷贝的 Tohnsongrass mosaic virus 的 CP 基因在大肠杆菌中进行表达,可以装配形成

类马铃薯 Y 病毒粒子的结构(Mittur 等,1993)。在体外转录和翻译系统及 *E. coli* 表达系统中, NIa 切割位点对顺式或反式加工过程中的敏感性方面存在差异(Carrington 等,1987;Carrington 等,1988;Hellmann 等,1988;Garcia 等,1989,1990),NIa 蛋白酶催化活性在前体蛋白中,除了自身需要在位点 D 和 E 进行顺式切割外均有作用,其过程在蛋白水解连续反应中具有重要作用(Carrington 等,1987;Carrington 等,1988;Hellmann 等,1988;Garcia 等,1990)。总之,NIa 催化的前体蛋白的水解成熟反应是一个有序过程,与位点的不同效率和顺式或反式切割的不同作用的比例有关。因此,像马铃薯 Y 病毒这类病毒,在转录和翻译水平上不能控制基因表达的差异,但可逐步由连续的切割来控制基因表达的产物(Dougherty 等,1989)。这种翻译后的控制可能暗示产物和早期物质具有不同的功能(Dougherty 等,1989)。在兔网状细胞系统中翻译全长(EFLV)RNA1 编码的 24KDa 蛋白酶,在体外可以被完全水解。新的研究表明,GFLV-FB RNA2 的基因组结构和前体蛋白切割位点的位置,122KDa 前体蛋白的蛋白顺序为 N 末端 28KDa 蛋白,在 C 末端的 56KDa 外壳蛋白,之后为 38KDa 蛋白,这些蛋白为 122KDa 聚蛋白的最后水解产物,66KDa 蛋白为 28KDa 和 38KDa 蛋白的中间产物(Margis 等,1993)。蛋白水解的中间过程是否可能存在相互作用,这一直是人们关注的问题。分子遗传学研究结果表明,NIa 和其他病毒码的蛋白酶[如细小 RNA 病毒 3C 和豇豆花叶病毒(CPMV)24KDa 蛋白酶]与细胞中的类胰蛋白酶族有关系(Bazan 等,1988;Gorbal-Levy 等,1989)。催化由 His、Asp 和 Lys 的残基构成的三位一体,位于 C-末端(Dougherty 等,1989;Garcia 等,1990;Ghabrial 等,1990),事实上,NIa 很可能有多种功能,它的一半的 N-端在体外或 *E. coli* 中不具有蛋白水解活性(Carrington 等,1987;Garcia 等,1991;Dougherty 等,1991),却发现它能共价结合到基因组 RNA 上(VPg)。更有趣的是,在 TEV 和 PPV 中,蛋白酶基因的 Asp 被代替以 Glu,NIa 蛋白酶表现异常的蛋白水解活性(Dougherty 等,1989;Garcia 等,1990)。根据这些结果可以推测,TEV 和 PPV 蛋白酶是在不同的切割位点发生作用的。在不同的马铃薯 Y 病毒中的 NIa 蛋白酶的氨基酸同源性在 C-端是很低的,这表明蛋白酶的这个区域对底物结合的构型是很重要的,允许每种马铃薯 Y 病毒的 NIa 蛋白酶可以识别自己的靶位点(Ghabrial 等,1990),目前已找到蛋白酶的靶位点(Garcia 等,1991;Parks 等,1991)。NIa 蛋白酶的识别和催化位点是紧密相连的,对底物识别区位于蛋白酶 C-端的三分之一处(Garcia 等,1991;Parks 等,1991),蛋白酶末端的羟基可能与维持其构象有关,并允许其他部分蛋白在不同的切割位点正确地与其相互作用。马铃薯 Y 病毒的 NIa 的蛋白酶活性可以高效地作用于大量的底物(Garcia 等,1989)。

辅助因子蛋白(HC-Pro),一种早为人知的蛋白,也称 HC,它与两种功能有关,即昆虫传毒和蛋白酶活性(Carrington 等,1989),C-端具有自身催化作用,但在体外却表现出弱或无蛋白水解的活性(Carrington 等,1989),体外切割发生在 Gly-Gly 肽链上,尽管目前还无法确定 HC-Pro 切割位点的起始序列的特征,但有人认为,不同的马铃薯 Y 病毒作用的 Gly-Gly 底物是一致的,HC 自身催化作用发生在切割位点序列从核糖体上刚穿过之后,作用效率极高(Carrington 等,1989),TEV 的 HC 蛋白的蛋白水解活性区在其 C-端(Carrington 等,1989),有两个非常重要的残基位于该蛋白酶上支持 HC-Pro 最接近于胱氨酸型族的蛋白酶成员的推论。一种和 HC 相似性的并能切割 Gly-Gly 二肽的蛋白酶是由寄生粟枯萎病真菌的一种 dsRNA 无毒力伴随病毒编码的。HC 的蛋白酶活性在蚜传过程中还以一种不明的方式在

起作用(Anington 等,1989)。在转基因植物中通过 TEV 多肽的表达,Carriington 等(1990)指出一种新的(既不是 HC,也不是 NIa 蛋白酶)蛋白酶水解活性对 PIC-端加工是必需的,序列相似性表明这个过程可能由 P1 自身催化。尽管在 TEV、TVMV、PVY 和 PPV 的 P1 蛋白间有很大的差异,但丝氨酸蛋白酶的氨基酸特性在它们当中都完全相同,它们的相关位置也与已发现的丝氨酸蛋白酶一致(Laia,1990;Verchot 等,1991),这个结果已在一种大麦病菌提取物体外翻译系统中证实,两个氨基酸被证明为蛋白水解过程所必需的(Verchot 等,1991)。P1 蛋白与口蹄疫病毒的 L-多肽有些相似,催化它自身从新产生前体蛋白的 N-端释放出来(Strebel 等,1986)。然而,在这个位点完成酶切过程,除 P1 外,还需要其他因子。因为在兔体内网织红细胞溶菌产物系统中它不会被切割(Hiebert 等,1984;Carriington 等,1989a)。在网织红细胞系统中,水解抑制作用可能是由于存在一种蛋白酶抑制因子的缘故(Verchot 等,1991),有关马铃薯 Y 病毒多肽的蛋白水解作用仍有许多问题有待于解决,诸如从 HC 和 P1 的水解切割过程和酶切位点切割的协同因子的存在和特性,P3 蛋白可能是这些蛋白水解的协同因子之一,在不同马铃薯 Y 组病毒中,P3 蛋白的低同源性阻碍了 P3 蛋白功能研究,但在 P3 蛋白的 N 端是高保守性的部分,P3 蛋白在它们各自基因图谱中于相应的位置的实事和序列的相似关系表明,P3 蛋白(Vos 等,1988)在马铃薯 Y 病毒多肽的蛋白水解过程中,不同程度上起到了调节作用。近未,含 NIa 蛋白酶的不同 TEV 多肽体外研究表明,从基因合成的多肽的酶切主要是以蛋白酶_{49KDa}形式进行的,虽然 TEV 50~71KDa 蛋白连接点为几种蛋白酶的共同作用位点(Parks 等,1991),然而,这种无细胞环境中的研究在多大程度上能反映被感染细胞的真实情况,仍是一个未知数。

总之,为探索马铃薯 Y 病毒组多肽的蛋白水解过程,人们做了许多工作,这些实验阐明了 3 个复杂的过程,3 种不同的蛋白酶和可能一些其他因子参加了蛋白的水解过程,在错综复杂的水解过程中,包括顺式和反式水解反应,它们的最初步骤可能是协同翻译自身催化的,所研究的病毒编码的蛋白酶,已鉴定了大多数蛋白的切割位点及水解特性,但是,应该注意的是,从体外实验得来的大多数结果,在活体结果和体内环境中没有什么质的不同,但像蛋白水解时间规律性和空间位置(这些方面对病毒复制循环的规律很重要)仍不能从这些实验中得到明确的阐明。

4 基因复制

有关马铃薯 Y 病毒组 RNA 复制过程人们几乎是一无所知,当前研究病毒亚生活史的每个步骤的方法主要是建立在马铃薯 Y 病毒组和其他研究较多的病毒之上,对在细小 RNA 病毒之间的基因结构、表达方式和 RNA 复制机理尚缺乏了解,相反,氨基酸序列比较已经为人们提供了一些有关哪种蛋白参与这些过程及其作用的线索,这些蛋白由 RNA 复制模型中的顺反子编码,就是 CI 蛋白,6K1、6K2 多肽,NIa 和 NIb 蛋白,可能还包括 P3 蛋白。

CI 蛋白最突出的序列特性就是存在核苷酸结合区域(NTBN)(Domier 等,1987;Lain 等,1989;Robaglia 等,1989),氨基酸结构类似于许多已经确定的或假设蛋白的结合区域(Gorblenga 等,1991),这些结合区域的残基存在于许多正链 RNA 病毒编码蛋白。此外,结合区域的旁侧氨基酸序列相似性已在马铃薯 Y 病毒(CI)以及动物黄病毒(NS3)、鼠疫病毒以及肝类

病毒 C(Lain 等,1989;Gorbalenya 等,1989;Lain,1990;Miller 等,1990)编码的含有 NTBN 的蛋白中发现。进一步比较几种病毒和细胞的氨基酸序列,类似 eIF-4A,被认为这些含有 NTBN 的病毒蛋白具有螺旋酶活性(Gorbalenya 等,1988,1989;Hodgman,1988;Lain 等,1989;Company 等,1991)。

从这些序列比较来看,PPV 的 CI 蛋白有一种由核酸激发的 ATP 酶活性,可以解开 RNA 双螺旋(Lain 等,1990,1991),这种解链活性是依赖于 NTP 的水解加 Pi 到 NDP 上。在体外试验中,PPV CI 蛋白只有解链带有 3'单链的双链 RNA 底物,这表明螺旋酶活性功能作用方向是 3'到 5'(Lain 等,1990)。这是首次发现 RNA 病毒编码的蛋白有关螺旋酶的活性。雀麦花叶病毒基因组编码的类螺旋酶蛋白,称为 1a 蛋白(Hadgman,1989),在体外复制系统中可以催化黄瓜花叶病毒 RNAs 的完整复制(Hayes 等,1990)。CMV 类螺旋酶蛋白有一个易于纯化的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶亚单位(Hayes & Buck,1990)。另外,2C 蛋白是一种含有 NTBN 的脊髓灰质炎病毒蛋白,与新合成的正链 RNA 分子有关(Bienz 等,1987;Li 等,1988),这是一个值得重视的问题。通过序列比较发现,只有 CI 蛋白的 N-端区才与螺旋酶的活性有关(Lain 等,1989)。因此,C-端区的约 230 个氨基酸可能与螺旋酶的活性无关,推测它可能与另外一些 CI 蛋白的功能有关,例如,在复制过程中先结合到膜上的一个通道,然后再与脊髓灰质炎病毒的含有 NTBN 蛋白即 2C 作用(Bienz 等,1987),在感染后的细胞中诱导胞内(Calder & Ingerfeld,1990)或胞间病毒的运输(Langenberg,1986)。上述现象均存在于正链 RNA 病毒的类螺旋酶蛋白中,表明 RNA 的解链可能是基因组复制所普遍需要的因素,研究马铃薯 Y 病毒 CI 蛋白酶的特性,对进一步了解 RNA 复制机制和干扰正链 RNA 病毒感染的设计策略有重要意义。

2 个小肽 6K1 和 6K2,来自马铃薯 Y 病毒的前体蛋白,尽管它们尚未在体内得以证实,但可能在 RNA 的复制中具有重要作用,伸展的疏水氨基酸存在于 6K1 和 6K2 肽链,以及相关位置的顺反子存在于马铃薯 Y 病毒遗传图谱上,显示它们分别类似于细小 RNA 病毒的 2B 和 3A 肽链(Lain 等,1988)。蛋白 2B 可能与 RNA 复制有关(Johnson & Sarnow,1991),3A 的功能是使脊髓灰质炎病毒与膜结合,VPg 前体蛋白是 3A(Giachetti & Semler,1991)。设想 6K2 可以使 NIa/VPg 像锚一样固定在膜上,6K2-NIa 结合体可能与某些 RNA 复制过程有关。

NIa 和 NIb 与 RNA 的复制有关,NIb 蛋白被认为是马铃薯 Y 病毒的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶,在这些酶中存在特殊的保守序列区(Domier 等,1987;Lain 等,1989;Robaglia 等,1989;Poch 等,1989)。NIa 蛋白(或它的 N-末端部分)可以看成是 VPg TVMV 和 PPV 的 VPg 的分子量分别为 24KDa 和 22KDa。TVMV VPg 顺反子位于 NIa 蛋白的 N-GS 端 24KDa 部分(Shahabuddin 等,1988),TEV VPg 大约是 49KDa NIa 蛋白的一半为 24KDa,位于其 N-端(Murphy 等,1990),得到完整的 TVMV 和 PPV NIa 蛋白与它们的特殊 RNAs 的结合体,和弄清在 TEV RNA5'端的这两种不同的蛋白质有什么功能具有重要的意义。分别形成 VPg 和 NIa 蛋白酶区的切割位点已经明确(Dougherty 等,1991),该位点的切割可能与 RNA 的复制过程相关。值得注意的是,这个位点是一种比较适度的切割位点,VPg 前体可能是全部 NIa 分子。相比之下,相关的 como-和 picorna VPg 前体分别是 60KDa(58KDa 蛋白+VPg)和 3AB 前体蛋白(Vos 等,1988;Giachetti 等,1991),说明在这些病毒中有不同的机制存在于类似的蛋白水解和复制过程中。最近,发现 TVMV 的 NIa 蛋白中有一个 Tyr 残基把 TVMV VPg 连