

植物抗病毒基因工程研究进展及其问题

Research on Gene Engineering of Plant Antivirus

麦君宇

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

刘进元

(清华大学生物科学与技术系, 教授 北京 100084)

深入研究病毒与植物的相互作用机制, 力求寻找有效的防治途径, 以减少病毒对农作物造成的危害, 一直是生物学家、农学家关注的重要问题, 病毒结构虽然简单, 但变异频繁, 繁殖迅速, 这给人们寻找有效的防治方法带来不少困难。近十年来, 随着分子克隆及转基因植物培育方法的成熟, 在抗病毒基因工程方面的研究有了很大的发展。例如将植物病毒的核酸成份或以病毒为作用目标的 DNA 片段导入宿主植物, 得到对病毒侵染具抗性的植株已获成功。目前这方面的文献报道多, 但仍未有统一的理论来准确解释各种实验现象。要彻底了解各种抗性机制, 还有待对病毒与植物的相互作用关系进行深入研究。本文将就自 1986 年来植物抗病毒基因工程的研究进展及其存在的问题进行综述。

一、主要抗病毒基因工程途径

目前抗病毒基因工程研究的内容主要集中在将病毒的核酸组份导入植物, 筛选出对病毒具抗性的植株并分析其中外源基因的转录、翻译等方面。具体的实验过程如下: 建立病毒 cDNA 文库, 筛选出含所需 DNA 片段的克隆, 通过 PCR 等方法扩增目的 DNA, 经一定程度的修饰(如截除、点突变等)后, 插入根癌农杆菌的 T_1 质粒, 采用三亲交配法导入植物叶盘, 经愈伤组织诱导及生根诱导等长出再生植株, 再经进一步培育及筛选后即可用于抗性检测。现在所研究的转基因植物多为双子叶植物。单子叶植物因在转化及再生过程中有技术困难而很少有报道。

被转基因多为病毒的外壳蛋白基因及非结构性蛋白基因。如复制酶、运动蛋白、核酸结合蛋白基因等。对它们所作的修饰包括: 蛋白关键部位的点突变、N 端或 C 端的部分截除、与 35s 启动子反向结合以表达反意 mRNA、去除起始密码 AUG 以表

达非翻译的 mRNA 等, 采用上述各种方法所获得的转基因植物, 都得到了对病毒侵染不同程度的抗性。

此外, 还有一些抗病毒基因工程方法也在研究之中, 例如在转基因植物体内表达能抑制病毒侵染的卫星 RNA, 针对病毒外壳蛋白的单克隆抗体 IgG 或 Fab₂, 对目标 RNA 即病毒 RNA 起反式剪切作用的核酶, 以及在病毒侵染后可被激活的自杀基因等等。这些方法都有成功的例子, 但又有各自存在的问题, 仍不能作为成熟有效的手段应用于实践。

二、抗病毒基因在重组植株中的命运

在抗病毒基因工程的研究中, 人们关心的不仅仅是转基因植物能否表现出抗性, 更重要的是导入植物的外源基因是如何发挥抗病毒能力的, 是通过表达的 RNA, 还是蛋白? 是直接与入侵病毒 RNA 作用, 还是系统性地调动植物的防御体系? 至今为止许多实验室都建立了转基因植物系统, 也提供了许多有关的数据, 但各种实验现象差别很大, 很难得出统一的结论。同时这也暗示不同的转基因植物可能是由几种不同的机制产生抗性的。

1、蛋白的作用

1986 年比奇(Beachy)研究小组成功地将烟草花叶病毒 TMV 和 CP 基因导入烟草, 获得抗性植株, 带动了世界各地关于外壳蛋白介导抗性 CPMR 的研究。大量实验数据表明 CPMR 的有效性与 CP 在植物体内的表达量有关。据此推测, 也许是植物体内表达的外源 CP 阻止了病毒的早期脱外壳过程, 或是外源 CP 重新包装了病毒的 RNA 成份。其中一个较为典型的例子是: 表达 Alfalfa Mosaic Virus (AIMV) 野生型外壳蛋白的植株可产生对 AIMV 的抗性, 而表达突变的 AIMV CP 的转基因植株却没有抗性, 说明是表达的完整蛋白在抗性表现

中起作用。但近期的许多实验又表明 CPMR 也可能由 RNA 介导。

在关于运动蛋白的实验中,只有突变的 MP 才能诱导抗性。有人发现,若将全长 TMVMP 基因导入烟草,烟草表达的运动蛋白具备正常病毒运动蛋白的功能,即增大胞间连丝的孔径,并结合 TMVRNA 穿过胞间连丝,使 TMV 的侵染范围局部扩大,这样的转基因烟草可与运动蛋白缺失的病毒起互补作用,支持病毒在植物体内的运动与复制。但将缺失第 3、4、5 位氨基酸的 MP Δ 3—5 基因导入烟草,情况就不一样。突变的 MP 不能有效地扩大胞间连丝的孔径,并使烟草对 TMV 的侵染产生抗性,其中可能的机制是:正常 MP 作用于特定的植物成份,而组成性表达的 MP Δ 3—5 可优先与这些目标成份结合,致使病毒侵染时表达的 MP 无法发挥作用,MP Δ 3—5 转基因植物对 TMV、TMV—RVA 及其它几种相关病毒的侵染都表现出抗性,预示这是一种比外壳蛋白抗病毒特异性更低、效率更高的防治手段。

另外一种令人感兴趣的抗病毒方法是利用潜伏的自杀基因。其作用原理是在反意的细胞毒蛋白 mRNA 3' 端加上反意的植物病毒亚基因组 RNA 启动子,然后将此复合基因导入植物,病毒侵染转基因植物时,在它制造后代正链 RNA 及亚基因组 RNA 过程中,导入植物体内的 DNA 中的反意启动子被病毒成分识别并激活细胞毒蛋白的表达,从而杀死细胞,抑制病毒在植物体内的复制和扩散。依照这个思路,用 PVX 亚基因组 RNA 启动子和白喉毒素 mRNA 转化烟草,接种了 PVX 的叶片逐渐变黄,并在 6~7 天后脱落,而上半部烟草叶片中病毒的浓度下降到原来的 1/20,由此,证明了自杀蛋白的有效作用。

2. RNA 的作用

虽然早期关于 CPMR 的实验表明很可能是表达的外壳蛋白介导了植物的抗性,但用反意 CP 基因或非表达(-AUG)CP 基因导入植物,也获得了大批抗病毒植物。这些植株不表达外壳蛋白,但通过 Northern 杂交,可知外源 DNA 在其体内的转录水平很高。很显然这是 RNA 在抗性表现中起决定性作用。可能是表达的反意 RNA 与病毒的 RNA 杂交或竞争相同的复制体系,阻止了病毒 RNA 的后期复制而呈介导抗性。

最近报道的一个实验结果引起了很多人的关注,用 Tobacco Etch Virus (TEV) 接种导入了 TEVCP 基因的转基因烟草叶片,新生的叶片象普通对照烟草那样表现出病症,但却不含病毒。转基因植物以这种方式克服 TEV 的侵染。对转基因烟草中的蛋白及 RNA 进行分析,发现 CP 基因的转录十分活跃,但 CPmRNA 却只维持在很低的水平上,而且

未能检测到蛋白存在。根据这样的实验结果,研究人员提出了关于转录后抑制的假设:由外源基因转录出的 RNA 若超过植物可忍受的范围,就会激发起植物对这些异常 RNA 的降解作用,使它们的含量维持在一低水平上。当病毒侵染叶片时,病毒的 RNA 进入植物细胞,因其序列与转化基因相同,同样也被降解,于是抑制了病毒在植物体内的复制与扩散。

但并非所有的实验结果都象以上所举的例子那样明确,许多转基因植物的表现,并不符合已有的假设,也不能说明抗病毒基因对植物抗性起什么具体作用。例如:表达 U1 株系 TMV54—KDa 复制酶基因的烟草对同源或相关株系 TMV 及 TMV RNA 接种均有抗性,但在植物体内却检测不到 54—KDa 蛋白的存在,这似乎说明是 mRNA 在作用。如用非转录(-AUG)TMV54—KDa 复制酶基因导入烟草,得到的转基因植物虽然转录大量 RNA,却不表现抗性,这又令人怀疑仍然是那些未检测到的复制酶蛋白诱导了抗性。可能是转基因植物体内表达的外源蛋白不能稳定存在,故它们所引发的植物防御反应,攻击入侵病毒的复制酶。这种假设与上述 TEV CP 实验中 CP 基因 RNA 的作用类似。也有可能是降解后的复制碎片作为失活的亚基参与病毒复制酶复合物的组成,抑制其活性。

抗病毒基因在植物体内的转录与翻译情况还与它们的插入位点与方向有关,能否引发抗病毒反应,也许还必须借助植物自身固有的反应途径。但关于这些,现在仍没有实验结果有力地加以说明。人们只知道转基因植物实验的最后结果,或者说是最表面的现象——能否产生抗性;而对更深入一点的问题,如为什么同一批转基因植物有的有抗性,有的没有抗性,抗性是如何产生的等等,人们还在积极地探索着、思索着。

三、发展趋势与存在问题

以上所提到的各种方法都是将外源基因导入植物而获得抗性植株。现在正在发展的另一种趋势是寻找宿主植物编码的抗病毒基因。在某些病毒的宿主植物中,常常存在有对病毒具有抗性的品种,很多证据显示这些抗性是由植物编码的显性单基因控制的,如果能确认并分离出这些抗性基因,将它们导入植物,也许就能快捷有效地获得抗性植株。这种方法已引起了植物学家的浓厚兴趣。

现在研究得较多的抗性基因有番茄 TM—1、TM—2、TM—2² 基因,马铃薯的 Rx、Ry 基因,烟草的 N、N' 基因等,常用的实验手段包括诱变出抗性消失的突变品种、转座子标记、RFLP、Chromosome—

(下转第 7 页)

算机的量子化学计算已经揭示了 C_{60} 及其衍生物的许多结构方面的信息。

三

克罗托等人证实了 C_{60} 分子结构中五元环和六元环的磁异性, 说是 C_{60} 分子中五元环具有强的顺磁流, 六元环具有一定的介磁流, 并指出六元环的介磁性是和缓的, 五元环的顺磁性则较为强烈一点。由于整个 C_{60} 球体中磁流是中性的, 顺磁性的构成只集中在 12 个五元环上, 而介磁性则分布于 20 个六元环之中, 所以五元环的单环磁效应肯定比六元环大一些。

C_{60} 常规量制备成功以后, 人们提出对 C_{60} 进行化学修饰, 得到了如 $C_{60}O$ 和 $C_{60}H_{36}$ 等简单衍生物, 很快人们又提出 C_{60} 有机化学反应的概念, 紧接着, 许许多多 C_{60} 衍生物被合成, 人们得到一些单加成 C_{60} 衍生物, 发现接上去的基团可以加在 C_{60} 五元环和六元环之间 (5, 6 加成), 也可以键连在 C_{60} 分子中的六元环和六元环之间 (6, 6 加成), 又发现 6, 6 加成在 ^{13}C NMR 谱上 C_{60} 部分给出 17 个共振信号, 原因是 60 个碳原子分为 17 组磁不等价碳原子, 其中 13 组均分别由 4 个碳原子组成, 4 组均分别由 2 个碳原子组成。6, 5 加成在 ^{13}C NMR 谱上 C_{60} 部分共给出

32 个共振信号, 原因是 60 个碳原子共分为 32 组磁不等价碳原子, 其中 28 组均分别由 2 个碳原子组成, 其余 4 组分别均由 1 个碳原子组成, 这用足球模型来表示非常直观。6, 6 加成为 C_{2v} 对称结构, 6, 5 加成为 C_s 对称结构, 6, 6 加成较 6, 5 加成对称性高, 位能约降低 5. 06KJ/mol。6, 5 加成的产物经光照或加热可以转变为 6, 6 加成产物。这些发现将认识很快地一步一步引向深入, 体现了规律的客观性和实践认识的无限性。目前, 人们对 C_{60} 的二加成产物和三加成产物以及多加成产物已经有了一些初步的认识, 有待于进一步的实践和再认识。

C_{60} 的发现, 以及短短几年内的发展, 是认识论的一个写照和缩影, 从哲学方面, 给人的启迪也是深刻的。

每一个化学工作者, 对化学元素周期表没有不熟悉的, 有些人能倒背如流, 人们往往等待着第 120 号元素的问世, 坐等奇异材料的来临, 寄希望于“新”物种的出现, 然而, 新出现的 C_{60} 却隐藏在旧元素中, 其实, 以前报道过的许多原子簇如硼团簇、硅团簇以及杂团簇, 哪一个不是在周期表中藏而不露? 那些尚未被发现的新材料可能会继续在周期表中隐藏下去。看来, 我们需要对自然界再实践, 对周期表再认识。

(责任编辑 刘先曙)

(上接第 4 页)

walking 等。最近美国加州大学研究人员成功地利用转座子标记方法克隆出烟草的 TMV 抗性基因, 经测序表明它编码一个 131. 4KDa 的蛋白, 其氨基酸组成与果蝇 Toll 蛋白和哺乳动物白细胞介素-1 受体 (IL-1R) 相似, 将 N 基因导入不具抗性的 nn 型烟草, 可诱导植物对 TMV 侵染的过敏反应。研究人员推测, N 蛋白可能与 Toll 蛋白或 IL-1R 的作用相似, 即作为信号传导分子引发植物的过敏反应, 进一步的研究仍在进行中。

随着培养转基因植物及确定、分离单个抗病毒基因方法的日趋成熟。大量的文献报道了这些方面的成果, 但关于转化基因在植物体内作用机制的研究却陷入了困境, 目前常用的 Northern 杂交、Western 杂交、抗性检测等手段还不足以给人们的各种假设作出强有力的证明。看来要揭开转基因植物的抗病毒之谜还有待更有说服力的新方法的出现, 另一方面, 寻找更简单的模式植物-病毒作用体系也是很有必要的, 以往的研究多在烟草-TMV 体系中进行, 但烟草的基因组如此庞大复杂, 对研究转

化基因在其中的功能来说是很不利的。如果能找到一种寄主关系特异、基因组结构简单的植物-病毒体系, 将可以避开大部分与病毒侵染无关的问题, 更直接明了地研究植物与病毒的相互作用。

80 年代后期我国一些著名的植物分子生物学实验室也相继开展了抗病毒的基因工程研究, 取得了一些令人高兴的成果, 经过这些年的努力, 在这方面总算是赶上了世界先进水平。但同时也很客观地向我们提出了一个严肃的问题, 这就是我们如何在较短的时间内超过世界先进水平, 干出我们自己的特色, 我们认为中国与世界一样在经历了抗病毒基因工程的高潮之后, 要深入研究转基因植物中外源基因的命运、作用机制, 要加强对病毒与植物相互关系的分子基础的研究。只有弄清了这些问题, 彻底揭开两者间的相互作用之谜, 我们才能有目的地创造出新的更有效、更合理的抗病毒基因工程途径, 培育出更多更好的抗病品种用于农业生产, 作出中国人在这方面的应有贡献。

(责任编辑 王宏章)