



# 植物基因工程的克隆载体(续)

吴乃虎

(中科院发育所)

黄美娟

(中科院遗传所)

## 三、植物基因克隆的质粒载体

关于病原土壤杆菌和双子叶植物之间相互作用的细胞生物学和分子生物学的研究表明,这些细菌所携带的特殊质粒具有用作植物基因克隆载体的潜在可能,因而越来越受到科学工作者们的广泛的重视。其中有两种病原土壤杆菌,即根瘤土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 和发根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*), 尤其引人注目。

土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 和根瘤菌属 (*Rhizobium*) 的细菌,是同属于根瘤菌科 (*Rhizobiaceae*) 的格兰氏阴性菌,在土壤中的含量极为丰富。土壤杆菌区别于绝大多数其它细菌的最主要特性是,它们能够诱发植物产生肿瘤(当然,最近也已经从自然界中分离出一些不能诱发植物产生肿瘤的无毒的土壤杆菌菌株)。能够诱发冠瘿的土壤杆菌分类为根瘤土壤杆菌,而能够诱发茎瘿的土壤杆菌分类为毛根土壤杆菌,它们分别是分布广泛的植物疾病“冠瘿病”和“毛根病”的病原菌,所以习惯上又称这类菌株为毒性菌株。

虽然说早在1907年,Smith和Townsend就已经报了植物的冠瘿病是由于根瘤土壤杆菌的作用所引起的,二十年后,即1927年,Stapp又进一步地认识到这种植物癌症同动物癌症之间存在着惊人的相似性。但在当时及尔后的一段相当长的历史时期中,人们对于这种植物冠瘿病同根瘤土壤杆菌之间相互关系的遗传本质并不了解。直到1958年,Braun才提出了植物肿瘤诱导因子说用以解释冠瘿瘤诱导的机理,而且还推测这种因子可能是一种染色体外的遗传成分。然而,将Braun假说的这种肿瘤诱发因子,同某种遗传实体直接地联系起来那已经是1974年的事了。那时Eaenen等人用实验证明,这种因子实质上是一种存在于根瘤土壤杆菌细胞质中的巨大的致瘤质粒,土壤杆菌的致瘤能力,正是由于这种质粒的存在所造成的。现在已经知道,尽管诱发敏感植物产生冠瘿瘤是需要Ti质粒的存在,但是一旦植物确立了产瘤生长模式之后,继续维持肿瘤生长就不

再需要这种质粒了。根据这种特性，我们可以在没有细菌污染的培养基中生长冠瘿瘤，从而便于在实验室中进行有关的实验操作，这无疑对于从分子生物学角度分析冠瘿病的遗传学本质是十分有用的。

在根瘤土壤杆菌中，决定冠瘿病的质粒叫做Ti质粒，即诱发寄主植株产生肿瘤的质粒 (Tumor-inducing plasmid)，而在毛根土壤杆菌中，决定毛根症的质粒称为Ri质粒，即诱发寄主植株产生毛根的质粒 (Root-inducing plasmid)。毛根土壤杆菌诱发的“茎瘿” (Cane gall) (在其表面密布毛状的根)，同根瘤土壤杆菌诱发的“冠瘿” (Crown gall) 在本质上是一样的，但在自然界中它们主要产生在植物的地上部位。与冠瘿病相比，人们对于毛根病的了解则少得多。因此，目前有关植物基因克隆载体的研究工作，主要是集中在Ti质粒上。

### 1. 植物冠瘿的诱发与冠瘿细胞的特性：

冠瘿是一种植物肿瘤，一堆未分化的组织团，许多裸子植物和双子叶的被子植物，都可以被诱发产生冠瘿瘤。形成了冠瘿瘤的植株，由于水分运输和营养流输送受到干扰，往往会导致生长减缓，甚至出现病态，从而给农业生长造成严重的经济损失。根瘤土壤杆菌诱发冠瘿瘤的过程大体上可以分为如下几个步骤：

在自然界的环境中，冠瘿主要是在植物的创伤部位，例如根冠的创伤处，由感染的根瘤土壤杆菌诱发产生的，因此植株的创伤是导致冠瘿诱发的首要条件。这不但是因为根瘤土壤杆菌是一种非浸染性的细菌，而且还因为创伤对于健康的植物细胞也具有一种“调节”作用。一般说来，受到创伤之后，植物体的各个部位对于肿瘤的形成都变得敏感起来。在实验室中通常是使用生长迅速的植物，例如蕃茄和向日葵的茎作为致瘤性的试验材料，此外像豌豆茎的片段，胡萝卜及土豆的薄片也经常被采用。植物受到创伤之后，需要在25℃环境中保持30小时，创伤部位的细胞才会对根瘤土壤杆菌呈现敏感性反应，而且这种敏感性只能维持有限的一段时间。

诱发肿瘤的具体方法，可以用针或解剖刀在健康的植株茎部划上一个或数个切口，然后将新培养根瘤土壤杆菌涂到伤口处；也可以用带适当型号针头的注射器，直接将新培养的细菌注射到植株茎上，然后在25℃下温育二星期到一个月便会在切口部位出现肿瘤组织。

必须指出的是，根瘤土壤杆菌并不是“侵入”到创伤部位的健康的植物细胞中去，而只是附着在它们的细胞壁上。实验证明，只有在创伤部位生存了16小时之后的细菌才能诱发肿瘤，这段时间称之为“细胞调节期”。在调节期，为植物转化所必须的细菌功能已被诱导出来。在细菌的附着过程中，有毒的及若干无毒的土壤杆菌互相竞争植物细胞壁表面上数量有限的附着位点。竞争中，如果无毒的土壤杆菌先于有毒的土壤杆菌接种到创伤部位，就不会形成肿瘤，反之则会形成正常的肿瘤。

附着到植物细胞壁上之后，土壤杆菌便会产生出细微的纤丝而将自身缚附在壁的表面，同时别的细菌也会被包陷在由这种细丝组成的网络之中，从而最终在植物细胞壁上出现细菌集结。随后，根瘤土壤杆菌便将它的一种遗传信息片段导入因创伤而被“调节”的植物细胞内，并使之转化成肿瘤细胞进而形成冠瘿瘤。

目前，科学家们已经对冠瘿瘤细胞作了相当深入的研究，对它们的一些特性也已十

分了解。最主要的一个特性是冠瘿细胞能够合成特称为冠瘿碱 (Opine) 的化合物, 这是一类正常植物细胞不能够合成的低分子量的碱性氨基酸衍生物。根瘤土壤杆菌能够选择性地利用这些化合物作为自己唯一的能源、碳源和氮源。最常见的冠瘿碱有章鱼碱 (Octopine)、胭脂碱 (nopaline) 和农杆菌 (Agropine) (表 2)。在组织培养中的冠瘿瘤细胞能够继续合成冠瘿碱, 而且从冠瘿瘤细胞系再生的幼苗和整体植株, 同样也能够继续合成冠瘿碱。

根据所产生的冠瘿碱的类型的差别, 可以将冠瘿瘤细胞分为: (1) 章鱼碱型肿瘤细胞, (2) 胭脂碱型肿瘤细胞, 和 (3) 农杆菌型肿瘤细胞等三种类型。其中第三种类型过去曾称为“零型”肿瘤细胞, 原因是这类肿瘤细胞既不产生章鱼碱也不合成胭脂碱, 因而得名。但最近观察发现所谓“零型”肿瘤细胞, 其实能够合成农杆菌及其它的一些冠瘿碱化合物。

同正常的植物细胞相比, 冠瘿瘤细胞的另一个重要特性是, 组织培养的冠瘿瘤细胞在没有补加植物激素, 包括植物生长素和细胞分裂素的情况下也能良好地生长, 而对照的正常植物则必须在加入这些植物激素的培养基中才能生长。这种独立于植物激素的生长能力, 可用来作为选择转化的冠瘿细胞的一种选择性遗传标记。除此之外, 冠瘿瘤细胞还具有其它的一些特性, 例如在它的细胞壁上有若干特异性的抗原位点, 而且其细胞壁的果胶部分的甲基化程度也要比正常细胞的高得多; 再如, 现已证实将冠瘿瘤组织嫁接到健康的植株上, 后者便会被诱发重新形成冠瘿瘤等等。

## 2. Ti 质粒的遗传特性

### A. 冠瘿瘤诱发之遗传本质

很久以前, 人们就已经注意到植物细胞的致癌转化并不需要根瘤土壤杆菌的持续存在, 因此便设想一定是有一种遗传物质从细菌转移到创伤部位的植物细胞中去, 而且还相信, 如同在肺炎球菌中发现的转化现象一样, 这种可转移的遗传物质也必定是 DNA。但由于当时技术水平的限制, 试图从植物的肿瘤细胞中检出这种细菌 DNA 的任何尝试都以失败而告终。直到 1974 年, Eaenen 等人才首次在有毒的根瘤土壤杆菌中发现了一种大小约为 140—235Kb 的大质粒, 即所谓的 Ti 质粒。现已证实根瘤土壤杆菌的致癌特性正是由于这类质粒的存在所引起的。

例如在实验中发现, 有些土壤杆菌菌株的致癌特性是一种不稳定的遗传性状。用 37℃ 代替 28℃ 的培养温度生长土壤杆菌, 便可消除它们所携带的 Ti 质粒, 而且随着质粒的消除, 菌株的致癌毒性也伴之丧失, 同时也失去了利用章鱼碱或胭脂碱的能力。当用有毒的及无毒的两种土壤杆菌菌株的混合物接种植物细胞, 然后再从该植株所产生的冠瘿瘤中回收土壤杆菌, 结果发现有一部分原来无毒的菌株现在已经变成了有毒的菌株。此外, 实验还发现, 如果胭脂碱菌株的质粒转移到章鱼碱菌株的无毒衍生株中去, 那么这种无毒的衍生株也就获得了诱发胭脂碱肿瘤和分解代谢胭脂碱的能力。上述这些资料强有力地证明, 在冠瘿瘤的诱发中, 质粒的基因起着决定性的作用, 无疑诱发冠瘿瘤的遗传本质是 Ti 质粒。

但是任何问题都不可能是绝对的, 以为凡是有质粒存在的根瘤土壤杆菌就一定是致癌的, 这种看法并不符合实际情况。因为在自然界中, 有许多根瘤土壤杆菌的菌株含有非

常大的隐蔽质粒，却并不具备致癌毒性，而且在若干种自然分离的菌株中，存在着隐蔽质粒同Ti质粒共存的现象。

### B. Ti质粒的遗传功能

根瘤土壤杆菌的Ti质粒是一种分子量为90—150×10<sup>6</sup>道尔顿的环形的染色体外的DNA分子，它除了能够诱发植物产生冠瘿瘤之外，还具有多方面的功能。这些功能包括：（1）为其寄主根瘤土壤杆菌提供附着于植物细胞壁的能力；（2）参与寄主细菌制造植物激素吲哚乙酸（IAA）和一些细胞分裂素的活动；（3）决定所诱导的肿瘤之形态学特性和冠瘿碱的成分；（4）赋予寄主菌株具有分解代谢各种冠瘿碱化合物的能力；（5）赋予寄主菌株对土壤杆菌所产生的细菌素的反应性；（6）决定寄主菌株的植物寄主范围；（7）有的Ti质粒能够抑制某些根瘤土壤杆菌噬菌体的生长与发育，即具有对噬菌体的“排斥性”。

控制冠瘿碱的新陈代谢是Ti质粒最显著的功能之一。由Ti质粒编码的一种特异的透性酶和同膜结合的氧化酶参加了章鱼碱和胭脂碱的分解代谢活动。一般说来，诱发合成某种冠瘿碱的Ti质粒，它所在的寄主根瘤土壤杆菌也就利用该种冠瘿碱作为自己的唯一的能源、碳源和氮源。这就是说利用章鱼碱的细菌含有的是章鱼碱型Ti质粒，而利用胭脂碱的细菌含有的则是胭脂碱型的Ti质粒。由此可见，根瘤土壤杆菌同寄主植物之间的相互关系是一种有益于细菌的特殊的寄生关系。有关的研究工作者们已经作出了很大的努力，以了解这些功能的实质，并希望据此发展成为分离这类Ti质粒的有用的选择记号。

Ti质粒还编码有控制接合转移的基因。在正常的情况下，这些基因是不能表达的，而只有当其同植物组织所产生的冠瘿碱相接触时才会得以表达。在这里冠瘿碱显然起到一种分子“激发剂”的作用，使控制接合转移的和冠瘿碱分解代谢的两组基因去抑制而表现出活性。这种有趣的关系表明，Ti质粒给自己“设计”出一套为其自身存活的非常优秀的进化格局：它感染植物的细胞使之出现愈伤组织的增生，后者便产生出供带有Ti质粒的细菌用作能源、碳源和氮源的冠瘿碱，而冠瘿碱的产生又可激发Ti质粒转移到原先并没有存在这种质粒的土壤杆菌中去，如此周而复始得到不断的发展。

### C. 以Ti质粒为媒介的接合转移

在植物的肿瘤中，无论是Ti质粒还是Ri质粒都是属于接合型的质粒，也就是说能够进行接合转移，因而是具感染性的。然而起初只在植物体内发现这种现象，而在体外并没有观察到这类质粒的接合转移，但后来证明在体外Ti质粒也可以进行接合转移。例如有人设计出一种通过寄主范围广泛的R质粒来带动Ti质粒迁移的体系（图5）。这种迁移的机理是，由Ti质粒和R质粒之间发生了复制子融合的缘故。融合形成的这些临时性的共合体是转位中间体，在这种中间体内，R质粒和Ti质粒是经过原先是位于R质粒上的两个拷贝的转位子序列或插入序列而融合在一起的，临时性的共合体解离成Rec<sup>+</sup>或Rle<sup>-</sup>的受体，结果形成了未改变的R质粒。转位子Tn904（S<sub>m</sub><sup>r</sup>）和Tn1831（H<sub>g</sub><sup>r</sup>S<sub>m</sub><sup>r</sup>S<sub>p</sub><sup>r</sup>S<sub>u</sub><sup>r</sup>），从R质粒跳入章鱼碱型的Ti质粒，看来是十分有效的，因此引起Ti质粒以相当高的频效迁移（10<sup>-3</sup>/每个转移的R质粒）。

应用同上述所描写的同样的机理，已经获得了比较稳定和完全稳定的R质粒和Ti质

粒之间的共合体。在这些共合体中, R质粒和Ti质粒之间的连锁是通过像IS8这样插入序列实现的。在完全稳定的共合体中, 有一至两个拷贝的连锁插入序列是部分或完全缺失的。

而后发现在体外只要适当地改变Ti质粒寄主菌的培养条件, 就可以使Ti质粒变成接合型的。例如, 培养在富裕培养基中的章鱼碱Ti质粒是不能够转移的, 但将它们培养在补加有章鱼碱的基本培养中, 这些Ti质粒便能够转移。广泛地研究了能使章鱼碱Ti质粒发生转移的培养条件之后发现, 在基本培养基和富裕培养基中Ti质粒都不能够转移, 但如果在培养基中加入章鱼碱、赖氨酸或章鱼碱酸等成分, 那么便可以诱发Ti质粒的接合转移能力。不过加入胭脂碱并不会诱发Ti质粒发生转移。而且还发现一些含硫的氨基酸例如甲硫氨酸和半胱氨酸等, 即便在基本培养基中已经加入章鱼碱的培养条件下, 仍会抑制Ti质粒的转移。此外温度也会影响Ti质粒的转移, 在培养温度超过 32℃ 的条件下, 章鱼碱Ti质粒的转移体系也就被抑制了。

现在已经分离到了即使在没有章鱼碱、赖氨酸碱等诱导物的情况下也能够转移的Ti质粒的突变体。这种转移去抑制的突变体显然大大地方便了Ti质粒的改建工作。

#### D. Ti质粒的物理图及遗传图

经限制性内切酶处理之后的Ti质粒DNA, 用琼脂糖凝胶电泳作片段分离, 便可显示出有20多条不同大小片段的复杂模式。有一部分的Ti质粒, 其DNA上的限制片段的顺序已经测定出来, 这样便建立起了这些质粒的物理图。已经建立了限制性内切酶物理图的章鱼碱Ti质粒有pTiAch5, pTiA6和pTiB6等, 它们的SmaI, HpaI, KpnI, XbaI, BamHI, EcoRI, HindIII, XbaI, SstI以及SaiI等限制性内切酶的物理图是类似的或是相同的。此外, 胭脂碱Ti质粒 pTiC58 的 BamHI, EcoRI, HindIII, HpaI, KpnI, SmaI以及XbaI的限制性内切酶物理图也已经建立。

科学家们应用Ti质粒的限制性内切酶物理图来构建它们的遗传图。为此目的, 用限制性内切酶分析质粒的DNA, 以测定突变体Ti质粒中DNA缺失和转位子插入的位置, 结果表明突变的位置是同突变体的表型相一致的。已经发现章鱼碱和胭脂碱这两种Ti质粒都含有同肿瘤诱发有关的两个基因区段, 即T—区段和毒性 (Vir) 区段。T—区段是在肿瘤形成期间从根瘤土壤杆菌的Ti质粒上导入植物细胞的DNA片段, 而Vir—区段则编码有在细菌中表达的基因, 这些基因可能同T—区段从细菌转移到植物细胞的遗传过程有关系。T—区段和Vir—区段在质粒上的位置是彼此相邻的, 而且约占Ti质粒DNA的三分之一左右。Ti质粒其余部分的DNA所编码的基因, 则分别控制冠瘿碱和精氨酸的分解代谢、对噬菌体A<sub>P</sub>I的排它性、对细菌素84的敏感性, 以及Ti质粒接合转移能力等等。

### 3. T—DNA的结构与功能

#### A. T—DNA的整合作用

尽管说植物冠瘿瘤的诱发之遗传本质是由于Ti质粒的浸染所致, 但在根瘤土壤杆菌转化的植物肿瘤细胞中并未能找到完整的Ti质粒的DNA。从感染植物的不同细胞器, 包括细胞核、线粒体和叶绿体等制备DNA, 然后分别同经放射性同位素 <sup>32</sup>P 标记的T—区段探针进行杂交, 结果只有核DNA呈现阳性反应, 表明T—区段是整合到植物细胞核

基因组中去。我们称这段整合在植物细胞核基因组上的、决定植物形成肿瘤的 T—区段为 T-DNA, 即转移 DNA。它唯一地只在植物细胞核中发现, 约占 Ti 质粒 DNA 总长度的 10% 左右, 而且已知植物肿瘤细胞中冠瘿碱的合成和不依赖于植物激素的生长能力, 都是由编码在 T-DNA 上的基因控制的。显而易见, 根瘤土壤杆菌通过 Ti 质粒的转移执行着植物基因的遗传转移, 所以 Ti 质粒有可能用作植物基因克隆的载体。

用放射性同位素  $^{32}\text{P}$  标记的 T—区段探针, 检测植物肿瘤细胞系的 T-DNA, 进一步发现其中有的片段是同 T—区段探针等长, 有的则不等长。同 T—区段等长的这种 DNA 片段命名为 T-DNA 的“核心”区, 而同 T—区段不等长的这种 DNA 片段命名为 T-DNA 的“边缘”区。在这些边缘区群体中, 有一部分既能同 T—区段左边部分的探针同源, 又能同 T—区段右边部分的探针同源, 可以推想它们是由串联排列的若干个 T-DNA 拷贝连接而成的“融合片段”; 另一部分边缘区, 它们或者只同 T—区段左边部分的探针同源, 或者只同 T—区段右边部分探针同源, 因此这类边缘区又被称为真正的边缘区。

用这类真正的边缘区 DNA 作探针, 同未经根瘤土壤杆菌转化的植物细胞 DNA 作 Southern 杂交分析, 结果单一类型的谱带和多重类型的谱带都出现了。这表明这类 T—DNA 真正边缘区是由一部分 Ti 质粒 DNA 和一部分植物 DNA 组成的, 因而进一步确证了 T-DNA 的确是整合在植物的核基因组 DNA 上, 而且这种整合作用可以在多个位点上发生。

关于 T-DNA 转移和整合的机理, 迄今尚不清楚。已知在 T-DNA 的两端是被同向重复的 25bp 长的序列包围着, 而且在一系列不同植物的肿瘤 DNA 中发现, T-DNA 的两端是位于这种同向重复序列的当中或其附近, 所以说这种序列实质上就是 T-DNA 的边缘区。一般认为这种序列是同 T-DNA 转移到植物细胞并整合到核基因组的过程有关。其依据是整合 T-DNA 的端点是同这种序列紧密相连的, 通过缺失突变去掉 Ti 质粒的右侧边缘区也就撤除了 T-DNA 的转移能力。当将化学合成的同野生型边缘序列一样的 25bp 长的寡聚体, 克隆到原先已缺失的右侧边缘区位置上以取代这种大缺失, T-DNA 的毒性和转移能力也就得到了恢复。当然, 这种取代恢复也是有条件的, 即只有当合成序列的克隆取向是同野生型的相一致的情况下, 才能获得上述的结果。Koucolikova'-Nikola 等人 (1985) 指出, 在同植物原生质体一道培养的根瘤土壤杆菌细胞中, T-DNA 是在 25bp 同向重复序列处发生删除和环化的, 而且这种环状的 T-DNA 是其从细菌细胞向植物细胞转移的一种中间形式。最近, Machida 等人 (1986) 证实了这种想法, 他们发现同烟草原生质体共同培养时, 土壤杆菌的 T-DNA 可以通过在 25bp 同向重复序列之间发生分子内重组事件, 从而形成环状的 T-DNA。因此看来这种序列, 即 T-DNA 的边缘区, 在 Ti 质粒的转移感染过程中, 很可能起着重要的作用。

#### B. T-DNA 的结构与功能

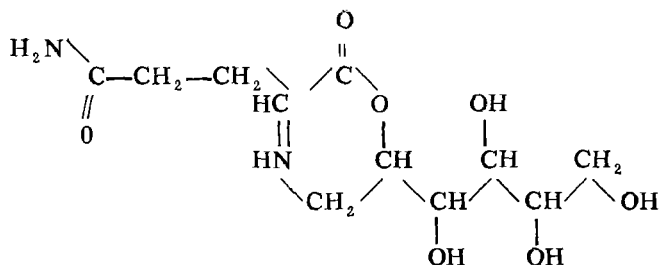
应用转位子和缺失突变形成的遗传分析, 已经鉴定出在 T-DNA 的开放读码结构 (即有转录活性的读码结构) 中有四个遗传位点: (1) 编码章鱼碱合成酶的基因位点 Ocs (或是编码胭脂碱合成酶的基因位点 Nos), (2) 编码细胞分裂素生物合成酶的基因位点 tmr, 这个基因的突变 (多根性突变点) 的结果, 激发肿瘤出现大量的根的增生。(3) 编码控制植物生长素生物合成的基因位点 tms1 和 tms2, 这两个基因中任何一个

表2. 若干种已知的冠瘿碱的分子结构

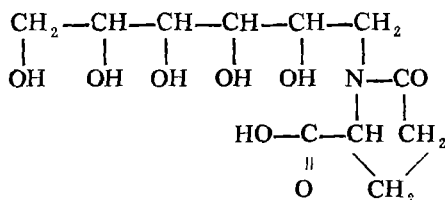
名 称	分 子 结 构
章鱼碱族	
Octopine (羧乙基精氨酸)	$  \begin{array}{c}  \text{NH}_2 \\  \diagup \\  \text{HN} = \text{C} \\  \diagdown \\  \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{CH} - \text{COOH} \\    \\  \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{COOH}  \end{array}  $
Octopine acid or ornoPine (羧乙基鸟氨酸)	$  \begin{array}{c}  \text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_3 - \text{CH} - \text{COOH} \\    \\  \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{COOH}  \end{array}  $
Lysopine (羧乙基组氨酸)	$  \begin{array}{c}  \text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CH} - \text{COOH} \\    \\  \text{NH} \\    \\  \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{COOH}  \end{array}  $
Histopine (羧乙基组氨酸)	$  \begin{array}{c}  \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\    \quad   \\  \text{N} \quad \text{NH} \quad \text{NH} \\  \parallel \quad \diagup \\  \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{COOH}  \end{array}  $
胭脂碱族	
Nopaline (二羧丙基精氨酸)	$  \begin{array}{c}  \text{NH}_2 \\  \diagup \\  \text{HN} = \text{C} \\  \diagdown \\  \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{CH} - \text{COOH} \\    \\  \text{NH} \\    \\  \text{HOOC} - (\text{CH}_2)_2 - \text{CH} - \text{COOH}  \end{array}  $
Nopaline acid or ornoline (二羧丙基鸟氨酸)	$  \begin{array}{c}  \text{NH} \\  \diagup \\  \text{NH}_2 - \text{C} \\  \diagdown \\  \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{CH} - \text{COOH} \\    \\  \text{NH} \\    \\  \text{HOOC} - (\text{CH}_2)_2 - \text{CH} - \text{COOH}  \end{array}  $

## 农杆碱族

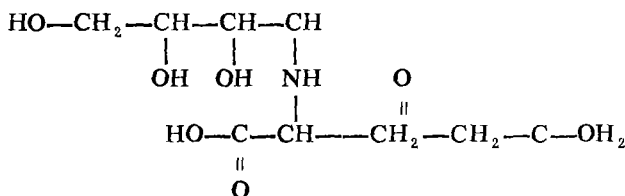
Agropinc (农杆碱)



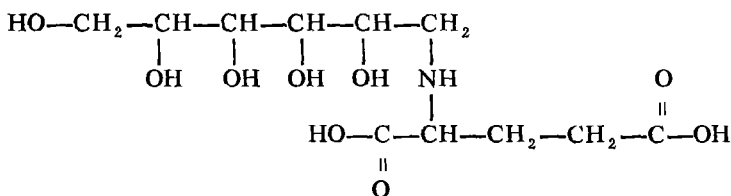
Agropinic acid (农杆碱酸)



Mannopine (甘露碱)



Mannpine acid (甘露碱酸)



## 农杆菌素碱族

AgrocinopineA (农杆菌素碱A)

AgrocinopineB (农杆菌素碱B)

注1:最近在胭脂碱组织中又发现了两种肿瘤特异性更强的化合物即agrocinoPine和agrocinoPineA, 它们都是磷酸化的糖的衍生物, 但关于它们的化学结构式目前尚不知道。

注2：表中所列的化合物，除Octopine（章鱼碱）和Nopaline（胭脂碱）已有公布的统一的中文译名外，其余的均未见统一的中文译名。故本表采用中英对照形式，其中译名仅供参考。

基因发生突变(芽性突变体)都会激发肿瘤出现芽的增生。通常tmr, tms1和tms2这三个基因统称为致癌Onc基因或Onc区段。应用从野生型Ti质粒、多根性突变体及芽性突变体等三种来源不同的T-DNA, 分别转化植物细胞。在这三种不同的转化的肿瘤组织



中, 可以看到改变植物生长素和细胞分裂素的水平对于肿瘤发育的效应, 同在体外用不同浓度的植物生长素和细胞分裂素培养转化的组织所呈现的效应是一致的。这就是说, *tmr* 基因的突变或失活, 会导致植物生长素产量的增加和细胞分裂素产量的下降, 结果有利于根的形成; 而 *tms1* 和 *tms2* 基因的突变或失活, 会导致细胞分裂素产量的增加和植物生长素产量的下降, 从而有利于芽的形成。

在某些章鱼碱肿瘤细胞系中, T-DNA 是以两个分开的独立的片段形式存在的。我们用  $T_L$ -DNA 表示 T-DNA 左边区段, 用  $T_R$ -DNA 表示 T-DNA 右边区段。Ti 质粒的缺失突变体的研究指出, 随着  $T_L$ -DNA 的缺失, 质粒也就失去了它的致瘤性, 这说明决定肿瘤的基因以及通常还有章鱼碱合成酶基因都是位于这个区段上的。而  $T_R$ -DNA 的缺失却不会影响 Ti 质粒的致瘤毒性, 例如在很多肿瘤细胞系中就没有这种区段。

在讨论 T-DNA 功能的同时, 还有必要指出, 除了它所编码的基因外, 位于 T-DNA 区段以外的 Ti 质粒毒性区 (*vir* 区段) 同冠瘿瘤的形成也是有关系的。一般认为, 由这个 *vir* 区段编码的那些基因, 参与了 T-DNA 的转移与整合作用。

(未完待续)

## 乙型肝炎病毒

Pierre Tiollais, Christine Pourcel & Anne Dejean.

序: DNA 重组技术已经从根本上改变了乙肝病毒的病毒学。病毒基因的组合, 转录和复制已基本明了; 肝细胞癌中的整合 HBV 序列结构已被描述。通过重组 DNA 技术生产新疫苗正继续发展。

\* \* \* \* \*

乙型肝炎是一种重要的世界范围的公共疾病。在亚洲的远东和热带非洲, 乙肝病毒慢性携带者占人口的 10% 或更高, 慢性活动性肝炎和肝硬化是死亡的主要原因。此外, 流行病学研究已明确地显示了 HBV 在肝细胞性肝癌 (HCC) 中的重要性, 而 HCC 是世界上最常见的癌肿之一。在中国, 每年约有 50—100 万新肝癌患者。HBV 是已知与人类肿瘤有关的少数病毒之一。

HBV 感染的形式是高度多样化的, 从隐性形式到急性肝炎和慢性重症肝病。病毒感染的病理结果不可预测, 肝损害的机制亦未完全明了。HBV 是非细胞溶解性的, 发生在细胞膜表面的针对病毒抗原的宿主免疫反应在 HBV 相关肝病的病原学方面起着主要的作用。

HBV 属于一组称为嗜肝病毒 (hepatotropic viruses) 的动物病毒。这组病毒的其他成员还有土拨鼠肝炎病毒 (WHV), 欧洲地鼠肝炎病毒 (GSHV) 和北京鸭肝炎病毒 (DHBV)。所有这些病毒有共同的结构, 且主要嗜肝, 导致持续性病毒感染, 而只有 HBV 和 WHV 才引起慢性