

# 黄瓜花叶病毒卫星 RNA 人工突变体的构建及其侵染性测定

金 波<sup>1,2</sup> 陈集双<sup>2\*</sup> 张华荣<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup>浙江中医学院生命科学系 杭州 310053)

(<sup>2</sup>浙江理工大学生物工程研究所 杭州 310018)

(<sup>3</sup>浙江大学生命科学学院微生物研究所 杭州 310029)

**摘 要** 从 1 个 369 nt 的黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)卫星 RNA 的 cDNA 出发,采用 DNA 改组技术构建人工突变体,经过体外转录,将其与不携带卫星 RNA 的黄瓜花叶病毒株进行假重组,鉴定突变体的生物活性,结果显示:所获得的 4 个卫星 RNA 的点突变子 MS1、MS5、MS6 和 MS11 中,只有 MS11 仍然具有复制能力,而其他 3 个点突变子,尽管均只有 1 个位点的替换,却不能在辅助病毒作用下复制。序列比较分析发现,MS11 的突变位点位于卫星 RNA 变异区内,发生的突变与自发突变一致,其他 3 个突变子的突变位点发生在卫星 RNA 的高度保守区。而且通过侵染性试验证实突变子 MS11 与野生型 Yi 没有明显的差异。由此可推测卫星 RNA 序列中的高度保守区与卫星 RNA 的生物活性密切相关,个别碱基的突变会导致 RNA 二级结构的改变,进而引起其复制能力或稳定性的完全丧失。

**关键词** 黄瓜花叶病毒,卫星 RNA, DNA 改组技术,人工突变

**中图分类号** S436.31 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2005)04-0610-04

DNA 改组技术(DNA shuffling)是 1994 年发展起来的一项基于 PCR 方法的体外突变重组技术<sup>[1]</sup>,进行片段化的 DNA 的体外随机重组,通过单个基因的多次突变、重组和筛选来进行核酸、蛋白质的人为快速进化。近几年来,利用 DNA 改造技术已成功改造了一系列核酸、蛋白质、酶和抗体等<sup>[2-4]</sup>,证实它作为一种快速、高效且实用的分子定向进化技术。

黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)卫星 RNA 是一种亚病毒因子,其本身不编码任何蛋白质,其复制和包裹都依赖于辅助病毒。卫星 RNA 具有极强的二级结构,其序列中 42%~52% 的碱基处于完全互补状态<sup>[5]</sup>,其生物活性也完全依赖于二级结构来维持;卫星 RNA 的序列具有多样性的特点,拥有相对集中的保守区和变异区<sup>[6]</sup>。序列中的某些特定的位点决定其致病性<sup>[7]</sup>,而且自发性的突变一般发生在一些特定的区域内,有些位点的碱基的置换或转换会导致卫星 RNA 致病性的改变甚至失活,而某些位点的碱基转换、置换甚至插入对卫星 RNA 的生物活性或致病性毫无影响<sup>[8]</sup>。究竟哪些碱基的突变不会影响卫星 RNA 的生物活性,哪些位点允许碱基的突变、插入或缺失, DNA 改组技术给我们提供了一个高效快速的技术手段来实现对其突变的研究。

本文应用 DNA 改组技术,对已经获得克隆的一株 CMV 卫星 RNA-Yi 的 cDNA 片段进行体外分子进化研究,获得了该卫星的 DNA 突变子,并通过体外转录方法与 CMV 进行假重组,比较体外进化与体内进化的差异性,以期进一步了解卫星 RNA 突变规律与进化趋势,同时为研究 RNA 亚病毒因子

的突变和进化规律提供新的方法学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒分离物** CMV 分离物 CNa,分离自葫芦科南瓜植株,不携带卫星 RNA,病毒株接种保存在心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)上,进行假重组前 6d 转接心叶烟进行毒源扩繁<sup>[10]</sup>。

**1.1.2 质粒** 质粒 psatY 是携带有卫星 RNA-Yi cDNA 全序列的 pUC19 质粒。卫星 RNA-Yi 分离自十字花科萝卜植株,大小为 369nt,由本实验室构建保存<sup>[9]</sup>。

**1.1.3 试剂** T7 体外转录试剂盒(Riboprobe System-T7), pGEM-T easy Vector 试剂盒购自 Promega 公司, RT-PCR(AMV)试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自大连 TaKaRa 公司。寡聚核苷酸引物由大连 TaKaRa 公司合成。

### 1.2 引物设计

根据 T7 启动子序列和卫星 RNA 的 cDNA 序列设计合成两端引物。上游引物 Fsat: 5'-CCTCTAGAGGCTGTTTGTGTTGTTGGAG-3', 下游引物 Rsat: 5'-GGTCCTGTAGAGGAATGTG-3'; 上游转录引物 T7-Fsat: 5'-TAAGCTTAATACGACTCATATAGGTTTTGTTTGTGTTGGAG-3', 上游转录引物的 5' 端为 T7 启动子结构。

### 1.3 DNA 改组程序

**1.3.1 卫星 RNA-Yi 基因的易错 PCR (error-prone PCR) 扩增**: 为引入一定量的突变,增加 Mg<sup>2+</sup> 的浓度至 3mmol/L,以 psatY 质粒为模板,以 Fsat、Rsat 为引物 PCR 扩增卫星 DNA 片段。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30270744)

\* 通讯作者。Tel: 86-571-86843200; E-mail: chenjs@zist.edu.cn

作者简介 金 波(1974-),女,浙江嵊州人,助教,微生物分子生物学研究方向。E-mail: jinbont@sina.com

收稿日期 2004-08-20,修回日期 2005-04-28

100 $\mu$ L PCR 反应体系 :10  $\times$  PCR buffer 10 $\mu$ L ,MgCl<sub>2</sub>( 25mmol/L ) 12 $\mu$ L ,Fsat/Rsat ( 20pmol/ $\mu$ L )各 1 $\mu$ L ,dNTP( 10mmol/L )2 $\mu$ L ,psatY 质粒 2 $\mu$ L( 约为 20ng )及 Taq 聚合酶 ( 5U/ $\mu$ L )5U。反应条件 :94 $^{\circ}$ C 3min ,94 $^{\circ}$ C 30s ,55 $^{\circ}$ C 30s ,72 $^{\circ}$ C 30s ,35 个循环 ,72 $^{\circ}$ C 5min ,PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 ,割胶回收扩增片段。

**1.3.2 DNase I 降解 DNA 及小片段回收** 取 2 $\mu$ g 回收的目标 DNA 在 0.02 U DNase I 的反应体系中 ,25 $^{\circ}$ C 处理 10min ,然后 90 $^{\circ}$ C 加热 10min 使 DNase I 失活。降解产物经 12% 聚丙烯酰胺电泳分离 ,用压碎浸泡法回收 50bp 以下的小片段 ,溶解于 10 $\mu$ L 的 TE ( pH8.0 )中。

**1.3.3 无引物 PCR 扩增** 反应体系 ( 50 $\mu$ L ) 5 $\mu$ L DNA 片段 ( 约 200ng ) ,1 $\mu$ L dNTP ( 10mmol/L ) ,5 $\mu$ L 10  $\times$  PCR Buffer ,33 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O ,1 $\mu$ L ExTaq ( 5U/ $\mu$ L )进行无引物 PCR 扩增。PCR 反应条件 :94 $^{\circ}$ C 30s ,42 $^{\circ}$ C 30s ,72 $^{\circ}$ C 30s ,40 个循环 ,72 $^{\circ}$ C 10min。

**1.3.4 常规 PCR** 取无引物 PCR 扩增产物 5 $\mu$ L ,PCR 反应体系 ( 100 $\mu$ L ) :10  $\times$  PCR buffer 10 $\mu$ L ,MgCl<sub>2</sub>( 25mmol/L )8 $\mu$ L ,Fsat/Rsat ( 20pmol/ $\mu$ L )各 1 $\mu$ L ,dNTP( 10mmol/L )2 $\mu$ L ,Taq 聚合酶 ( 5U/ $\mu$ L )5U。反应条件 :94 $^{\circ}$ C 3min ;94 $^{\circ}$ C 30s ,55 $^{\circ}$ C 30s ,72 $^{\circ}$ C 30s ,进行 30 个循环 ,72 $^{\circ}$ C 5min。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 ,回收 PCR 扩增产物。

1.4 卫星 DNA 突变子的筛选

将改组的 DNA 片段连接到 pGEM-T easy Vector 上 ,转化 *E. coli* TG1 感受态细胞 ,挑选白色菌落用 PCR 鉴定重组质粒 ,在 ABI 377 测序仪上进行序列测定。

1.5 卫星 RNA 的体外转录和体外重组

**1.5.1 转录模板的制备** :以插入卫星 RNA cDNA 克隆的质粒为模板 ,以 T7-Fsat 和 Rsat 为引物 ,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 ( 100 $\mu$ L ) :10  $\times$  PCR buffer 10 $\mu$ L ,MgCl<sub>2</sub>( 25 mmol/L )8 $\mu$ L ,Fsat/Rsa ( 20pmol/ $\mu$ L )各 1 $\mu$ L ,dNTP( 10mmol/L )2 $\mu$ L ,cDNA 克隆质粒 2 $\mu$ L ( 约 20ng ) ,Taq 聚合酶 ( 5U/ $\mu$ L )5U。反应条件 :94 $^{\circ}$ C 3min ,94 $^{\circ}$ C 30s ,55 $^{\circ}$ C 30s ,72 $^{\circ}$ C 30s ,进行 30 个循环 ,72 $^{\circ}$ C 5min。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 ,并回收目的条带 ,溶解于 10 $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O 中。

**1.5.2 体外转录获得全长卫星 RNA** :采用 Riboprobe System-T7 体外转录试剂盒 ,按试剂盒说明进行体外转录 ,取 DNA 模板量约为 1 $\mu$ g ,反应总体积为 20 $\mu$ L ,37 $^{\circ}$ C 反应 90min ,置 70 $^{\circ}$ C 5min 终止转录。

**1.5.3 卫星 RNA 与 CMV 的体外重组** :采取接种 CMV-CNa 10d 的心叶烟 ( *N. glutinosa* )新鲜病叶组织 0.1g ,用 TRIzol 法提取其总 RNA ,取 20 $\mu$ L ( 约 200 $\mu$ g/mL 总 RNA )与等体积转录产物 ( 约 20 $\mu$ g/mL )混匀 ,采用汁液摩擦接种方法接种于 4 ~ 6 叶期的 4 种常见系统寄主心叶烟、假酸浆 ( *N. physalodes* ) 番茄 ( *Lycopersicon esculentum* )和西葫芦 ( *Cucurbit pepo* ) ,每株接种 3 片叶 ,每个叶片接种 8 ~ 10 $\mu$ L ,26 $^{\circ}$ C 恒温培养 ;每次接种 6 株 ,试验重复 2 次。

接种 5d 取系统叶提取其总 RNA 经 RT-PCR 扩增。反应条件 :模板总 RNA 10 $\mu$ L 经 68 $^{\circ}$ C 变性 5min ,置冰上 5min ,加入 CMV 卫星 RNA 反向引物 Rsat ( 10pmol/L )2 $\mu$ L 和反转录酶 5U

进行 cDNA 第一链的合成 ,42 $^{\circ}$ C 反应 30min ,99 $^{\circ}$ C 5min ,随后加入上游引物 Fsat 进行 PCR 扩增 ( 同 1.3.4 ) ,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检验扩增结果。取接种 48h 的接种叶 2g ,转接至健康植株 ,转接 5d 后取系统发病叶提取病毒双链 RNA<sup>[10]</sup> ,确定重组效果。

1.6 序列分析

对重组后的 CMV 卫星 RNA 进行 RT-PCR 扩增 ,回收卫星 RNA 扩增条带并按照 1.4 的方法进行克隆和序列测定 ,用 DNASTar 软件对获得的序列进行同源性分析。

1.7 寄主反应

将重组有 MS11 的 CNa 与携带野生型卫星 RNA-Yi 的 CNa 分别接种藜科、葫芦科、茄科和豆科等常见供试植物 ( 表 1 ) ,以接种缓冲液作为对照 ,观察接种植株的症状发生情况 ,接种试验重复两次 ,每次重复接种 6 株。

表 1 供试寄主植物

| Table 1 Host plants  |                   |   |             |
|--|-------------------|---|-------------|
| Pigweed  | Leguminous plants | Nightshade  | Cucurbit    |
| Goosefoot  | Cowpea            | Tobacco   | Pumpkin     |
| ( <i>Chenopodium uinoa</i> ) ( <i>Vigna sinensis</i> ) ( <i>Nicotiana glutinosa</i> ) ( <i>C. pepo</i> ) |                   |   |             |
| Goosefoot  |                   | Tobacco   | Towel gourd |
| ( <i>C. amaranticolor</i> )  |                   |   |             |
|  |                   | ( <i>N. clelandii</i> ) ( <i>Luffa cylindrica</i> ) |             |
|  |                   | Tomato  | Squash      |
|  |                   | ( <i>L. esculentum</i> ) ( <i>C. moschata</i> )     |             |
|  |                   | Tobacco   |             |
|  |                   | ( <i>N. tabacum</i> )                               |             |
|  |                   | Stramonium  |             |
|  |                   | ( <i>Datura stramonium</i> )                        |             |

2 结果和分析

2.1 从质粒 psatY 进行易错 PCR 反应

通过提高 Mg<sup>2+</sup> 浓度进行易错 PCR ( 图 1 )。结果显示 :易错 PCR 反应扩增出与卫星 RNA-Yi 相对应的条带 ,但扩增产物不如常规 PCR 扩增产物那样专一 ,由此 ,可初步确定是引入了一定的突变。

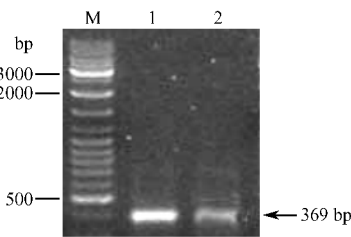


图 1 从质粒 psatY 中扩增 Yi 基因

Fig.1 PCR amplification of Yi fragment form plasmid psatY  
M. DNA Ladder ; 1. Normal PCR ; 2. Error-prone PCR.

2.2 DNase I 降解和回收结果

经纯化回收的 PCR 产物 ,溶解于 ddH<sub>2</sub>O ,用 DNase I 降解后 ,聚丙烯酰胺电泳检测结果显示 :经 DNase I 处理 ,DNA 降解为小片段 ,呈现一片弥散状 ;而且随着反应时间的推移 ,DNA 亮度越来越小 ,说明 DNA 降解越来越完全。从凝胶中

割取 50 bp 以下的小片段 ,用浸泡法回收 DNA。

### 2.3 PCR 扩增获得 DNA 改组基因

回收获得 DNA 小片段以 50 $\mu$ L 体系进行无引物 PCR 反应 ,经过 40 个循环的扩增 ,加入卫星 RNA 扩增引物进行下一轮 PCR 反应。扩增产物在 400 bp 处有单一条带 ,周围还存在一些弥散的非专一性条带(图 2)。表明 PCR 重配成功 ,但是否存在错配或重组 ,还需要通过进一步的试验予以证实。

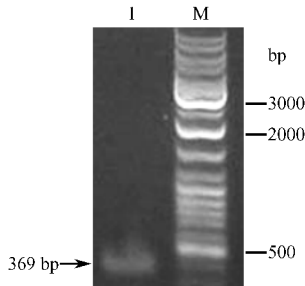


图 2 PCR 扩增改组后的片段 DNA  
Fig.2 Results of PCR amplification after DNA shuffling  
M.10kb DNA marker ; 1.PCR product of satRNA.

### 2.4 突变子的筛选

由于卫星 RNA 不表达蛋白质 ,序列中也无标记信号 ,故无法从表型上区分突变子和野生株 ,因此只有通过序列测定分析核苷酸序列进行比较。将改组后的 DNA 片段经 T4 DNA 连接酶与 T 载体连接 ,转化 *E. coli* TG1 菌株获得突变体库。从中随机选取 12 株进行测序分析 ,结果显示 :12 株中有 4 株突变子 ,分别命名为 MS1、MS5、MS6 和 MS11 ,其余均为野生型 ,每个突变子均为单碱基突变(表 2)。而且 ,4 株突变子均是 A-G 碱基对的置换。

表 2 4 个卫星突变子的突变位点和核苷酸改变

| Transcripts | Mutations | Nucleotide positions |
|-------------|-----------|----------------------|
| MS-1        | A→G       | 15                   |
| MS-5        | A→G       | 304                  |
| MS-6        | A→T       | 304                  |
| MS-11       | G→A       | 163                  |

### 2.5 卫星突变子的侵染性实验

为确定卫星 RNA 突变子的生物活性及侵染力 ,将突变

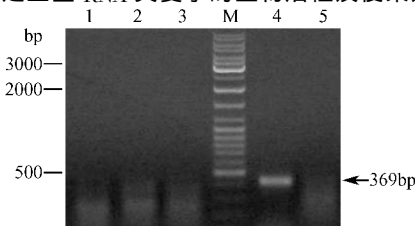


图 3 卫星突变子在番茄上的 RT-PCR 分析结果  
Fig.3 Results of RT-PCR analysis for 4 satRNA mutants on *L. esculentum*  
CK. CMV-CNa ; M. 10kb DNA Ladder ; 1. CNa pseudo-recombinant with MS1 ; 2. CNa pseudo-recombinant with MS5 ; 3. CNa pseudo-recombinant with MS6 ; 4. CNa pseudo-recombinant with MS11.

体 DNA 进行体外转录以获得相应的单链 RNA ,并与 CMV 毒株 CNa 在系统寄主植物上进行假重组。结果表明 :在接种 5d 的番茄系统叶上 ,RT-PCR 均可扩增出 MS11 的条带 ,而其他 3 种突变子则没有相应的条带(图 3) ,在其他 3 种寄主植物上也得到了相同的结果 ;提取 dsRNA 的结果也进一步证实了 MS11 具有可随 CMV 进行复制的生物活性 ,而 MS1、MS5 和 MS6 则丢失了复制能力(图 4) ;而且其复制能力在供试的 4 种系统寄主中没有明显差异。

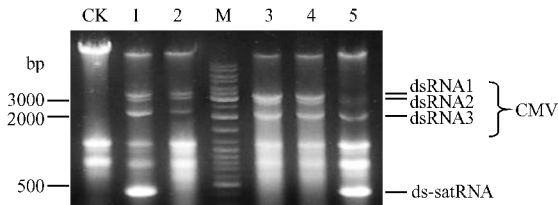


图 4 卫星突变子在心叶烟上的 dsRNA 分析结果  
Fig.4 Results of dsRNA analysis for 4 satRNA mutants on *N. glutinosa*  
CK. Health plant ; M. 10kb DNA Ladder ; 1. CNa containing Yi ; 2. CNa pseudo-recombinant with MS1 ; 3. CNa pseudo-recombinant with MS5 ; 4. CNa pseudo-recombinant with MS6 ; 5. CNa pseudo-recombinant with MS11.

### 2.6 寄主反应

将重组有 MS11 的 CNa 与携带野生型卫星 RNA-Yi 的 CNa 分别接种藜科、葫芦科、茄科和豆科等常见供试植物 ,两个毒株引起寄主枯斑症状的时间和坏死程度没有明显差异。

### 2.7 序列分析

获得卫星突变子序列与 GenBank 上的卫星 RNA 序列进行 Blast 比较 ,发现 MS11 的突变与自然存在的卫星 RNA 已有的突变一致 ,现有的卫星 RNA 序列中在该位点存在 G-A 的置换 ,而且均为 384~391nt 的大卫星组 ,在小卫星组没有相同的变异 ,而 15 和 304 位点在自然存在的卫星 RNA 序列中未发现相同变异。以上结果显示 :个别位点的突变(碱基置换)即有可能影响卫星 RNA 的复制与存活。

## 3 讨论

我们运用 DNA 改组技术构建获得了卫星 RNA-Yi 的 4 个点突变子 MS1、MS5、MS6 和 MS11 ,经体外转录和假重组实验证实 ,MS11 具有生物活性 ,而其他 3 个失去了生物活性 ;而且 MS11 在寄主上的反应与野生型没有明显差异。序列分析发现 MS11 的突变位点位于卫星 RNA 变异区内 ,发生的突变与自发突变一致 ;其他 3 个的突变位点发生在卫星 RNA 的高度保守区 ,因此可推测卫星 RNA 序列中的高度保守区与卫星 RNA 的复制与活性相关 ,个别碱基的突变会导致 RNA 二级结构的改变 ,进而引起生物活性的丧失 ;而且体外突变获得的卫星 RNA 突变子 MS11 其生物活性与野生型并没有明显的差异 ;以上结果还需要对卫星 RNA 序列的保守区与变异区进一步划分 ,进行验证和深入研究。

(0.27%) ,比已报道的 0.7% 要低<sup>[1]</sup>。原因之一是因为卫星 RNA 不编码任何蛋白质 ,无法通过表型或功能的差异进行筛选 ,而只有通过测序和序列分析部分菌落 ,却又限制了突变率的最终计算结果。

已有研究表明 ,利用基因家族的改组效果要明显高于单基因的改组效果 ,单个基因改组的效果为改组前的 8 倍 ,4 个基因同时改组后效果增加 270 ~ 540 倍<sup>[12]</sup>。卫星 RNA 之间的同源性一般较高 ,因此 ,在今后的工作中我们可利用多个卫星 RNA 的 cDNA 同时进行 DNA 改组 ,这有可能获得较高突变率的突变子 ;或者对现有的突变子 ,继续进行第二轮的 DNA 改组 ,再一次筛选突变子 ,并通过辅助病毒和寄主植物的再次筛选 ,有望更深入地了解卫星 RNA 的突变范围和进化趋势。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Stemmer W P C. DNA shuffling by random fragmentation and ressembly : *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1994 , **91**( 22 ) : 10747 - 10751.
- [ 2 ] Stemmer W P. Molecular breeding of genes , pathways and genomes by DNA shuffling. *J Mol Catalysis B : Enzy* , 2002 , **19-20** : 3-12.
- [ 3 ] Raillard S , Krebber A , Chen Y H , *et al.* Novel enzyme activities and functional plasticity reveals by recombining highly homologous enzymes. *Chem & Bio* , 2001 , **8** : 891 - 898.

- [ 4 ] Kikuchi M , Ohnishi K , Harayama S. Novel family shuffling methods for the *in vitro* evolution of enzymes. *Gene* , 1999 , **236** : 159 - 167.
- [ 5 ] Garcia-Arenal F , Palukaitis P. Structure and functional relationships of satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Curr Top Microbiol Immunol* , 1999 , **239** : 37 - 63.
- [ 6 ] Roossinck M J , Sleat D , Palukaitis P. Satellite RNAs of plant viruses : structures and biological effects. *Microbiol Rev* , 1992 , **56** ( 2 ) : 265 - 279.
- [ 7 ] Palukaitis P , Roossinck M J. Variation in the hypervariable region of *Cucumber mosaic virus* satellite RNAs is affected by the helper virus and the initial sequence context. *Virology* , 1995 , **206**( 1 ) : 765 - 768.
- [ 8 ] Masuta C , Takanami Y. Determination of sequence and structural requirements for pathogenicity of a *Cucumber mosaic virus* satellite RNA ( Y-satRNA ). *Plant Cell* , 1989 , **1** : 1165 - 1173.
- [ 9 ] 陈集双 ,冯明光 ,张耀洲. 黄瓜花叶病毒萝卜分离株卫星 RNA 的克隆及其与 12 个卫星 RNA 核苷酸序列的比较. *浙江大学学报( 农业与生命科学版)* 2001 **27**( 3 ) : 249 - 254.
- [ 10 ] 陈洁云 ,陈集双 ,柴立红 ,等. 两种葫芦科病毒的分子检测和致病性研究. *植物病理学报* , 2003 , **33**( 5 ) : 449 - 455.
- [ 11 ] 熊爱生 ,姚泉洪 ,彭日荷 ,等. 通过 DNA 改组技术获得高活性  $\beta$ -葡萄糖苷酸酶. *中国生物化学与分子生物学报* , 2003 , **19** ( 2 ) : 162 - 167.
- [ 12 ] Stemmer W P C. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* , 1998 , **391** : 288 - 291.

## Studies on construction of artificial mutants of *Cucumber mosaic virus* satellite RNA and their biological activity

JIN Bo<sup>1,2</sup> CHEN Ji-shuang<sup>2\*</sup> ZHANG Hua-rong<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup> Department of Life Sciences , College of Zhejiang Chinese Traditional Medicine , Hangzhou 310053 , China )

(<sup>2</sup> Institute of Bioengineering , Zhejiang University of Sciences , Hangzhou 310018 , China )

(<sup>3</sup> College of Life Science , Zhejiang University , Hangzhou 310029 , China )

**Abstract** : Based on the full length cDNA clone of a *Cucumber mosaic virus* satellite RNA , which was 369nt in size , artificial mutants were developed by the method of error-prone PCR and DNA shuffling. The new satellite cDNAs were transcribed *in vitro* into ssRNA and pseudo-recombined with a helper *Cucumber mosaic virus* , which contains no satellite RNA. Sequence analysis showed that A to T/G or G to A replacement all the four mutants , named MS1 , MS5 , MS6 and MS11 respectively , and there is no C to G or G to C replacement , but amongst , only the mutants MS11 could replicated when recombined with the helper virus strain. No satellite RNA could be detected by RT-PCR amplification and double-stranded RNA analysis for those pseudo-recombination constitution of *Cucumber mosaic virus* strain with mutants MS1 , MS5 and MS6. Sequence homological comparison showed that the single replacement of mutants MS1 , MS5 and MS6 occurred in the highly conservative regions and the T to A replacement of mutant MS11 was located in the normal-variation region. This is the first artificial mutation of satellite RNA of plant RNA viruses. The results indicated that single base in the region of satellite RNA maybe important to maintaining the biological activity of satellite RNA for its replication and stability. The variation and evolution of satellite RNA could be hopefully studied through combination directed evolution by DNA shuffling with pseudo-recombination *in vitro* .

**Key words** : *Cucumber mosaic virus* , Satellite RNA , DNA shuffling , Artificial mutation