

黄瓜花叶病毒卫星 RNA XJs1 侵染性 cDNA 克隆构建 及其生物学功能初步研究

席德慧¹ 林宏辉^{1*} 向本春²

(¹ 四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室 成都 610064)

(² 石河子大学农学院植物保护系 石河子 832003)

摘 要 利用 RT-PCR 的方法, 获得了黄瓜花叶病毒卫星 RNA XJs1 的全长侵染性 cDNA 克隆 pMSC20。序列分析显示 XJs1 全长 384nt (GenBank 登录号 :DQ070748), 比较 XJs1 与具有代表性的 CMV 卫星 RNA 的序列结构表明, 在 XJs1 核苷酸序列的 325nt ~ 350nt 间, 具有典型的坏死型卫星 RNA 保守序列。通过体外转录, 将 XJs1 与不含卫星 RNA 的辅助病毒分离物 CMV-AH 组合接种普通烟和心叶烟并进行检测。初步研究结果表明 XJs1 为一致弱卫星 RNA。

关键词 黄瓜花叶病毒; 卫星 RNA; 侵染性 cDNA 克隆; 生物学功能

中图分类号: Q939.4 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)02-0219-04

黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV) 是雀麦花叶病毒科(*Bromoviridae*) 黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*) 典型成员, 为三分体正义 RNA 病毒。CMV 是迄今已知病毒中寄主范围最广泛的病毒, 能侵染 85 科 365 属 1000 多种单子叶、双子叶、木本及草本植物^[1]。由于广泛的寄主和地域适应性, CMV 的株系分化十分普遍。一些 CMV 株系除含有三分体的基因组 RNA 外, 还包含有一类小分子的线性、单链核酸分子, 大小在 330 ~ 405nt 之间, 是病毒的卫星 RNA。一些 CMV 卫星 RNA 能加重辅助病毒对寄主的危害, 另一些减轻辅助病毒对寄主的危害, 还有一些则不改变辅助病毒的致病能力。卫星 RNA 作为病毒的分子寄生物, 完成复制依赖于辅助病毒, 但寄主植物、辅助病毒以及环境条件等因素无一不对其产生影响, 并使其与辅助病毒及寄主植物的相互作用发生变化。因此, 黄瓜花叶病毒及其卫星 RNA 已成为研究 RNA 病毒进化的模型^[2]。

虽然 CMV 的寄主范围十分广泛, 但进行了深入研究的 CMV 及卫星 RNA 多分离自茄科、十字花科、葫芦科等科属的植物。XJs1 是我们从甜菜上分离到的一株新的 CMV 卫星 RNA, 在田间与辅助病毒共同作用引起甜菜的亮黄泡斑花叶^[3], 但该病毒分离物的寄主范围狭窄, 在心叶烟上不产生症状, 在 NC-89 普通烟上亦无明显症状。分析辅助病毒的外壳

蛋白序列, 发现它与山东的 CMV 烟草分离物进化关系较为接近(待发表)。是否是因为卫星 RNA 的存在, 使其显现了在烟草上较为特殊的侵染特性? 我们对 XJs1 的序列进行了测定, 构建了 XJs1 全长侵染性克隆, 并对其生物学功能进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 卫星 RNA 及病毒分离物 卫星 RNA XJs1 由作者自甜菜上分离获得, 其辅助病毒为 CMV 甜菜分离物石-B-2(CMV-XJ1)^[3]。不含卫星 RNA 的 CMV 安徽分离物(CMV-AH)由农业部植物检疫实验所张成良研究员馈赠, 经分子生物学实验鉴定, 属于 CMV 亚组 I, 甜菜黑色焦枯病毒全长 cDNA 侵染性克隆 pUCB2 由中国农业大学农业生物技术国家重点实验室于嘉林教授赠送。各分离物经苜蓿藜(*Chenopodium amaranticolor*) 繁殖备用。

1.1.2 菌株、质粒和试剂 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 由本实验室保存, MLV 逆转录酶购自 Promega 公司, 测序试剂盒为 PE 公司产品, 地高辛标记和检测试剂盒购自 Roche 公司, Hybond-H⁺ 尼龙膜为 Amersham Pharmacia 公司产品, pMD18-T Vector、T7 RNA 聚合酶、限制性内切酶等购自 TaKaRa 公司。

基金项目 教育部博士点基金(20040610015); 教育部优秀人才支持计划; 四川省科技厅基金(04ZQ026-036); 成都市科技攻关项目(05HJSW117)

* 通讯作者。Tel 86-28-85411175 E-mail honghuilin@vip.sina.com

作者简介 席德慧(1969-)女, 四川人, 副教授, 博士, 研究方向为分子植物病毒学。E-mail: xidehui@126.com

收稿日期 2005-07-21 接受日期 2005-09-13 修回日期 2005-11-17

1.2 卫星 RNA 的 RT-PCR 检测

1.2.1 植物总 RNA 的提取 参照 Cao 等^[4]的方法从病叶中提取植物总 RNA。

1.2.2 引物设计 根据 GenBank 中已发表的 CMV 卫星 RNA 序列(AJ236905; AY589729; AJ457163; X54065; X54066; AJ236904; AJ457164; U31661; X65455; D10039; AY589728; AF451897)设计引物。上游引物为 sCMV-1: 5'-GTAATACGACTCACTATA GGTTTTGTTTG-3', 在卫星 RNA 5' 端上游引入 T7 RNA 聚合酶启动子(斜体部分), 为了增加转录活性, 在 T7 RNA 聚合酶启动子与卫星 RNA 5' 末端序列之间引入一个 G(下划线所示), 下游引物为 sCMV-2: 5'-GGAATTCCCGGGTCCTG-3', 在卫星 RNA 3' 末端引入 *EcoR* I 位点和 *Sma* I 位点(下划线和斜体部分), 引物由上海 Sangon 公司合成。

1.2.3 RT-PCR 以提取的植物总 RNA 为模板, 反转录合成 cDNA 第 1 条链。在 20 μ L 反应体系中加入 4 μ L 5 \times MLV 逆转录反应缓冲液, 1 μ L 10mol/L dNTP, 20U HRP, 1 μ g 引物 sCMV-2, 5 μ L RNA 模板, 200U MLV 逆转录酶, 42 $^{\circ}$ C 反应 60min。以 5 μ L cDNA 为模板, 以 sCMV-1 和 sCMV-2 为引物进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 59 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。

1.3 卫星 RNA 的 cDNA 克隆、测序和序列分析

回收 RT-PCR 产物, 与 pMD18-T Vector 连接, 转化 *E. coli* DH 5 α 。阳性克隆经 PCR 鉴定后, 得到重组质粒克隆。采用 ABI PRISM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 测序试剂盒和 ABI-377 型 DNA 自动测序仪对重组质粒进行序列测定。利用 DNAMAN (Version 5.2.2, Lynnon BioSoft) 序列分析软件进行序列分析。

1.4 侵染性 cDNA 克隆的体外转录与接种

将重组质粒用 *Sma* I 线性化后作为模板, 用 T7 RNA 聚合酶按照试剂说明书体外合成全长卫星 RNA。取 CMV-AH 接种的心叶烟叶片 0.5g, 根据 Cao 等^[4]的方法提取病叶总 RNA 后溶于 20 μ L DEPC 处理过的重蒸水中。按照 Liu 等^[5]的方法进行体外转录物的组合接种。取上述总 RNA 10 μ L 加入全长卫星 RNA 体外转录物 10 μ L 以及 20 μ L 2 \times GKP 接种缓冲液(50mmol/L 甘氨酸, 1% 硅藻土, 1% 皂土, 30mmol/L K₂HPO₄, pH 9.2), 混合后分别摩擦接种普通烟 NC-89 和心叶烟, 每个处理接种 2 株植物; 同时取总 RNA 10 μ L 加入 DEPC 处理过的重蒸水 10 μ L 以及 20 μ L 2 \times GKP 接种缓冲液, 混合后同样处理作为

对照, 实验重复 3 次。

1.5 RT-PCR 和 Northern blot 检测

按照前述方法, 对接种显症后的普通烟和心叶烟进行 RT-PCR 检测。同时, 用引物 sCMV-1 和 sCMV-2 扩增获得 XJs1 384bp 的全长片段, 经 DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 标记后作为探针。取 1 μ L 叶片总 RNA, 加入 3 μ L RNA 样品稀释液(1 \times MOPS 电泳缓冲液, 2.2mol/L 甲醛, 50% 甲酰胺) 68 $^{\circ}$ C 变性 5min, 冰浴 2min 后, 在 1% 的变性琼脂糖凝胶^[6]上 60V 电泳 2h。电泳后的凝胶经 5 \times SSC 漂洗, 在 20 \times SSC 中用毛细管法转移至 Hybond-H⁺ 尼龙膜上。转移完成后, 80 $^{\circ}$ C 2h 固定。预杂交、杂交、洗膜和显色等步骤均按照该试剂盒的说明进行。

2 结果和分析

2.1 卫星 RNA 的 RT-PCR 扩增

为了对 CMV 甜菜分离物石-B-2 的卫星 RNA 进行研究, 利用 CMV 卫星 RNA 特异引物 sCMV-1、sCMV-2 对接种显症的苋色藜叶片进行了 RT-PCR 检测。从接种病叶中扩增得到了大小约 400bp 的特异片段, 与 CMV 卫星 RNA 核苷酸序列长度的理论大小相符, 推测此即为 XJs1 卫星 RNA 目的片段。

2.2 CMV-XJ1 卫星 RNA 的克隆和序列分析

回收上述目的片段, 连接、转化、经 PCR 鉴定后获得重组质粒克隆 pMSC20。序列分析表明, XJs1 全长 384nt (GenBank 登录号: DQ070748), 在其序列的 325nt ~ 350nt 区段, 具有典型的 CMV 卫星 RNA 的“坏死保守序列”: GA-GCUAAGGCUUA... UGCUAUG CUGAU。与部分已发表的卫星 RNA 序列的一致性在 73.27% ~ 91.93%^[7], 其中与大片段卫星 RNA 序列一致性较高, 如与卫星 RNA J876 序列一致性为 91.93%, 与卫星 RNA D27、T43、OY2 的序列一致性分别为 87.24%、89.82% 和 88.02%, 但这 4 个已知卫星 RNA 对辅助病毒致病性作用却各不相同, 因此无法从序列特征推测 XJs1 对辅助病毒的作用。

2.3 体外转录、接种及检测

为了明确卫星 RNA XJs1 对辅助病毒的影响, 将重组克隆 pMSC20 经 *Sma* I 线性化后进行体外转录, 同时以甜菜黑色焦枯病毒全长 cDNA 侵染性克隆 pUCB2 为参照进行体外转录随后也做相应的侵染性活性检测。结果表明, 以线性化 pMSC20 作为转录模板进行体外转录获得了预期大小的卫星 RNA 体外转录物。

提取 CMV-AH 接种心叶烟总 RNA 按照材料与方法 1.4 所述,将病叶总 RNA 和 XJs1 体外转录物作相应组合处理,分别接种于普通烟和心叶烟。接种 5d 后,CMV-AH 接种心叶烟开始出现系统症状,最初表现为绿色斑驳花叶,逐渐发展为叶片畸形、线形植株矮化;CMV-AH + sat-XJs1 接种心叶烟 8d 后才出现轻微系统症状,此后始终表现为轻微绿色斑驳花叶或轻症。CMV-AH 接种普通烟在 6~7d 后也出现可见系统症状,表现为叶缘内卷,逐渐发展为黄色斑块花叶,叶片畸形;CMV-AH + sat-XJs1 接种普通烟出现症状迟后 2~3d,病症较前者轻微;3 次实验重复结果基本一致。图 1 示接种 15d 后的症状图。

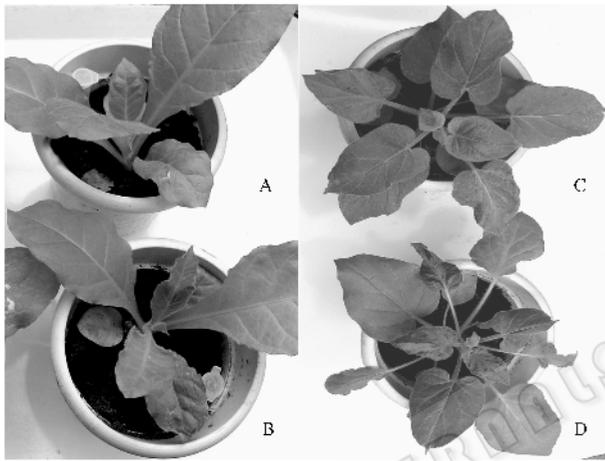


图 1 CMV-AH 单独或与 XJs1 组合接种两种烟的症状 (15dpi)

Fig.1 Symptoms produced by CMV-AH or CMV-AH + XJs1 on two kinds of tobaccos(15dpi). A: CMV-AH + XJs1 on *N. tabacum*; B: CMV-AH on *N. tabacum*; C: CMV-AH + XJs1 on *N. glutinosa*; D: CMV-AH on *N. glutinosa*.

以上述接种显症的心叶烟再接种普通烟和心叶烟也出现相似的病程发展和症状。同时,以体外转录物接种番茄或以上述接种显症的心叶烟转接番茄的结果显示,卫星 RNA XJs1 亦能减轻 CMV-AH 在番茄上的致病症状(图片未列出)。

为检测卫星 RNA XJs1 与辅助病毒 CMV-AH 组合接种后,卫星 RNA 是否在寄主体内得到复制表达,以确认引起接种烟症状差异的原因。接种 15d 后,提取各处理接种烟系统显症叶片总 RNA,用引物 sCMV-1、sCMV-2 对上述样品进行 RT-PCR 检测,结果表明,卫星 RNA 在两种处理接种的烟草中都得到了复制(图 2),说明辅助病毒 CMV-AH 在两种烟草上致病性的变化与卫星 RNA 有关。Northern blot 杂交结果更进一步证实了这一结论(图 3)。

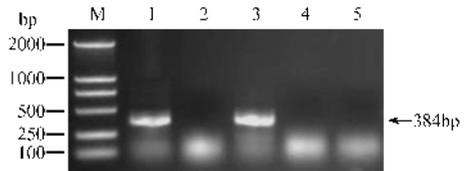


图 2 XJs1 与 CMV-AH 组合接种两种烟的 RT-PCR 检测
Fig.2 RT-PCR detection of CMV-AH combined with XJs1 inoculated on two kinds of tobaccos. M. DL2000 marker; 1. CMV-AH + XJs1 on *N. tabacum*; 2. CMV-AH on *N. tabacum*; 3. CMV-AH + XJs1 on *N. glutinosa*; 4. CMV-AH on *N. glutinosa*; 5. Healthy *N. glutinosa*.

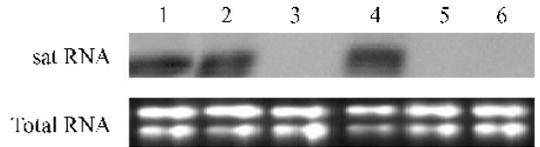


图 3 XJs1 与 CMV-AH 组合接种两种烟的 Northern blot
Fig.3 Northern blot of CMV-AH combined with XJs1 inoculated on two kinds of tobaccos. 1. CMV-XJI; 2. CMV-AH + XJs1 on *N. tabacum*; 3. CMV-AH on *N. tabacum*; 4. CMV-AH + XJs1 on *N. glutinosa*; 5. CMV-AH on *N. glutinosa*; 6. Healthy *N. glutinosa*.

3 讨论

许多引起坏死症状的 CMV 卫星 RNA 具有坏死保守序列,坏死卫星 RNA 能加重辅助病毒的致病症状,常导致寄主的死亡^[8]。Grieco 等^[7]对意大利 22 个主要来自番茄的 CMV 卫星 RNA 进行了序列测定和致病性分析,发现序列分析预测与实际的致病性检测基本相符,说明一定情况下,CMV 卫星 RNA 的序列与致病性有一定的相关性。但由于辅助病毒的种类、寄主植物的种类以及生长环境条件等因素的不同,序列的结构又常常不与致病性相对应。例如,6 个 CMV 卫星 RNA 一级结构和二级结构的改变与不同的致病性变化没有对应关系^[9];而 CMV B5 卫星 RNA 在辅助病毒为亚组 II 株系时,引起寄主褪绿症状,与亚组 I 辅助病毒作用则能减轻致病症状^[10]。覃明等^[11]对 SatC382 的研究结果也出现了类似的结果。上述实验结果说明卫星 RNA、辅助病毒、寄主植物之间的互作关系是相当复杂的。本实验研究结果表明,虽然 XJs1 具有典型的坏死卫星保守序列,但从其在烟草和番茄上的生物学功能看,此为一致弱卫星 RNA。

卫星 RNA 作为病毒的分子寄生物,与辅助病毒相比,其序列的变异程度更高些,卫星 RNA 的进化机制与辅助病毒也存在着差异,重组可能是一个很重要的进化方式^[12,13]。虽然关于 CMV 卫星 RNA 系统发生的研究有限,但实验结果已清晰地显示出 CMV 卫星 RNA 的趋同进化,序列数据显示的系统发

生可能比较模糊^[10],不同来源的卫星 RNA 有时具有较高度度的序列一致性,但生物学功能却大相径庭。进一步的研究正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] Edwardson JR, Christie RG. Cucumoviruses, CRC Handbook of viruses infecting legumes. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1991.
- [2] Roossinck MJ. Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution. *Mol Plant Pathol*, 2001, **2**(2): 59–63.
- [3] 席德慧, 向本春, 刘升学, 等. 黄瓜花叶病毒甜菜分离物的分离鉴定. *植物病理学报*, 2001, **31**(3): 251–256.
- [4] Cao YH, Cai ZN, Ding Q, *et al.* The complete nucleotide sequence of beet black scorch virus, a new member of the genus *Necrovirus*. *Arch Virol*, 2002, **147**: 2431–2435.
- [5] 刘 涛, 韩成贵, 李大伟, 等. 甜菜坏死黄脉病毒 RNA5 对病毒致病性的影响. *科学通报*, 2003, **48**(5): 464–467.
- [6] 王关林, 方宏筠. *植物基因工程原理与技术*. 北京: 科学出版社, 1998.
- [7] Grieco F, Lanave C, Gallitelli D. Evolutionary dynamics of cucumber mosaic virus satellite RNA during natural epidemics in Italy. *Virology*, 1997, **229**: 166–174.

- [8] Xu P, Blancaflor EB, Roossinck MJ. In spite of induced multiple defense responses, tomato plants infected with *Cucumber mosaic virus* and D satellite RNA succumb to systemic necrosis. *Mol Plant Microbe In*, 2003, **16**(6): 467–476.
- [9] Garcia-Arenal F, Zaitlin M, Palukaitis P. Nucleotide sequence analysis of six satellite RNAs of cucumber mosaic virus: Primary sequence and secondary structure alterations do not correlate with difference in pathogenicity. *Virology*, 1987, **158**: 339–347.
- [10] Simon AE, Roossinck MJ, Havelda Z. Plant virus satellite and defective interfering RNAs: New paradigms for a new century. *Annu Rev Phytopathol*, 2004, **42**: 415–437.
- [11] 覃 玥, 陈集双, 金 波. 卫星 RNA SatC382 对辅助病毒的影响. *植物病理学报*, 2005, **35**(2): 129–133.
- [12] Aranda MA, Fraile A, Dopazo J, *et al.* Contribution of mutation and RNA recombination to the evolution of a plant pathogenic RNA. *J Mol Evol*, 1997, **44**: 81–88.
- [13] Alonso-Prados JL, Aranda MA, Malpica JM, *et al.* Satellite RNA of cucumber mosaic cucumovirus spreads epidemically in natural populations of its helper virus. *Phytopathology*, 1998, **88**(6): 520–524.

Construction of infectious cDNA clone of Cucumber mosaic virus satellite RNA XJs1 and preliminary study on its biological function

XI De-hui¹, LIN Hong-hui^{1*}, XIANG Ben-chun²

(¹ Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

(² Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: Cucumber mosaic virus (CMV) sugar beet isolate caused yellow mosaic, leaf distortion, crinkle and stunt symptoms on sugar beet in nature. It exhibited some special biological properties with narrower host range and had no symptom on *Nicotiana glutinosa* L. and *Nicotiana tabacum* L. cv. NC-89. A new satellite RNA, XJs1 was found to be associated with the helper virus. In order to know the cause of the special pathogenicity of the CMV isolate. Full-length infectious cDNA clone of CMV satellite RNA XJs1, pMSC20, was constructed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Sequence analysis showed that the satellite RNA consists of 384 nucleotides (nt) (GenBank accession number: DQ070748). Compared the nucleotide sequence of satellite RNA XJs1 with those of other representative CMV satellite RNAs displayed that it contains typical necrogenic consensus sequence block from positions 325 to 350, and shared 73.27% ~ 91.93% nucleotide sequence identity with some published CMV satellite RNAs. By in vitro transcription, satellite RNA XJs1 was inoculated on *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glutinosa* together with CMV-AH, a CMV isolate without satellite RNA. The results showed that satellite RNA XJs1 could attenuate symptoms on *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glutinosa* induced by CMV-AH. Detection by RT-PCR and Northern blot hybridization revealed XJs1 obtained replication in the above two host plants, showing the pathogenicity changes of CMV-AH on *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glutinosa* were induced by co-infecting with satellite RNA XJs1. These results indicated that XJs1 is probably an attenuate satellite RNA. The relationship between helper virus, satellite RNA and host plants is discussed.

Keywords: Cucumber mosaic virus; Satellite RNA; Infectious cDNA clone; Biological function

Foundation item: Doctoral Foundation of the Ministry of Education (20040610015); Program for New Century Excellent Talents in University; Sichuan Science and Technology Foundation (04ZQ026-036); Chengdu Programs for Science and Technology Development (05HJSW117)

* Corresponding author. Tel: 86-28-85411175; E-mail: honghuilin@vip.sina.com

Received: 21 July 2005/Accepted: 13 September 2005/Revised: 17 November 2005