

南芥菜花叶病毒卫星 RNA 及其核酶的结构分析*

杨希才¹ Ksper, J. M.² Hadidi, A.² Tousignant, M. E.² 田波¹

¹(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

²(Plant Sciences Institute, USDA-ARS, Beltsville, MD 20705, USA)

以提纯的南芥菜花叶病毒 (Arabis Mosaic Virus, ArMV) 卫星 RNA (sArMV) 为模板, 以合成的 DNA 寡核苷酸为引物, 经过反转录-PCR 扩增合成全长的 ds cDNA。ds cDNA 的两端连接 EcoRI Adaptors, 插入到经 EcoRI 酶解的脱磷酸化的 pUC 9 质粒中, 转化 *E. coli* JM83。用 ³²P 标记的 sArMV 为探针, 进行菌落原位杂交和 EcoRI 酶解分析, 筛选出含有全长 cDNA 片段的克隆。用 Taq Track^R Sequencing Systems 的序列分析表明: 克隆的 sArMV cDNA 由 300bp 脱氧核糖核苷酸组成, 与其 RNA 序列分析的结果相同, 含有一个首尾相连的由 54 个核苷酸组成的核酶, 具有完整的垂头状结构及能自我切割 5'GUC ↓3' 的生物功能。

关键词 南芥菜花叶病毒卫星 RNA; 核酶; DNA 序列

自从 Kaper^[1] 首先报道了影响植物病毒侵染性能的病毒卫星 RNA (CARNA 5), 已陆续在十种植物病毒中发现了不同的低分子量的有复制能力的病毒卫星 RNA^[2]。根据病毒卫星 RNA 的功能性特征, 在分类学中形成了 3 类, 即能加剧辅助病毒的毒性, 减弱辅助病毒的毒性和不影响辅助病毒的毒性。这些不同种类的病毒卫星 RNA 中, 有几种卫星 RNA 自身含有一个完整的有自我切割功能的核酶 (Ribozyme) 结构, 南芥菜花叶病毒卫星 RNA (sArMV) 含有一个首尾相连的由 54 核苷酸组成的核酶。

sArMV 是加剧辅助病毒毒性的病毒卫星 RNA, 能引起酒花植物的 nettlehead 病, 在寄主昆诺藜 (*Chenopodium quinoa*) 上表现严重的花叶和组织变形症状。在植物体内存在着环型和线型二种分子结构, 而在 ArMV 病毒中仅包裹线型的 RNA 分子。在 ArMV 病毒核酸的分析中, sArMV 的含量占病毒总核酸的 80% 以上。根据 sArMV 的 RNA 序列分析, 它是由 300 核苷酸组成, 含有完整的核酶的垂头状结构^[3]。当核酶表达自我切割功能时, sArMV 即由首尾相连的环型分子转变成具有 5' 羟基和 2', 3' 磷酸环化的线型分子。

本实验的目的是获得 sArMV 全长 cDNA 的克隆并分析其核苷酸序列以使用分子生物学的方法对核酶的结构和功能进行深入的研究。

材 料 和 方 法

(一) 病毒的提取和病毒卫星 RNA 的纯化

来自英国的 ArMV (含有 sArMV) 酒花株, 温室条件下接种寄主植物昆诺藜 (*Chenopodium quinoa*), 接种 2—3 星期后, 收集昆诺藜叶片, 根据 Davis 和 Clarck^[4] 叙述的步骤提取 ArMV

本文于 1992 年 10 月 8 日收到。

* 中美合作研究课题。

病毒。用酚 - SDS 抽提 ArMV 病毒总核酸, 并按照 Kaper 等人的 rate zonal 超离心法分离 ArMV 基因组 RNAs 和 sArMV。纯化 sArMV 的另一种方法是直接从感染 ArMV 的昆诺藜叶组织中提取总核酸, 经过 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 将含有 sArMV 区带的凝胶胶片经电洗脱回收获得纯化的 sArMV。纯化的 sArMV 作为 cDNA 合成的模板, 放置 -70°C 备用。

(二) sArMV 的 ss cDNA 合成和 ds cDNA 的扩增 (RT-PCR 扩增法)

根据 sArMV 的 RNA 序列分析图谱, 合成 2 个 DNA 寡核苷酸引物 (引物 -1 和引物 -2), 分别用于 sArMV 单链 ss cDNA 和双链 ds cDNA 的合成。ss cDNA 合成的操作步骤如下: $3\ \mu\text{g}$ sArMV ($30\ \text{pmol}$) 和 $1.55\ \mu\text{g}$ DNA 引物 -1 ($300\ \text{pmol}$) 悬浮于 $30\ \mu\text{l}$ 反转录缓冲液 ($1\times: 50\text{mmol/L}$ Tris - HCl, $\text{pH}8.3$, 75mmol/L KCl, 3mmol/L MgCl_2 , 10mmol/L DDT) 100°C 处理 5 分钟, 冰中 1 分钟, 转移至室温放置 1 小时, 使 sArMV 模板与 DNA 引物 -1 复性。然后, 加入 $20\ \mu\text{l}$ 反应液 (含有 $4\ \mu\text{l}$ $5\times$ 反转录缓冲液, $5\ \mu\text{l}$ 0.3mol/L β -巯基乙醇, $5\ \mu\text{l}$ 10mmol/L dNTP, $20\ \text{U}/0.5\ \mu\text{l}$ RNasin, $400\text{U}/2\ \mu\text{l}$ M-MLV 反转录酶和 $3.5\ \mu\text{l}$ 无离子水)。 42°C 反应 1-2 小时, 即获得 sArMV ss cDNA 的合成样品。转移 $5\ \mu\text{l}$ 样品到另一 Eppendorf 管中, 加入 $45\ \mu\text{l}$ PCR 扩增反应液 (含有 $5\ \mu\text{l}$ $10\times$ PCR 缓冲液, $1\ \mu\text{l}$ 10mmol/L dNTP, $60\ \mu\text{mol/L}/1.2\ \mu\text{l}$ 引物 -1, $60\ \mu\text{mol/L}/1.2\ \mu\text{l}$ 引物 -2, $2.5\text{U}/0.5\ \mu\text{l}$ Ampli Taq^R DNA 聚合酶和 $36.1\ \mu\text{l}$ 无离子水), 用 $50\ \mu\text{l}$ 矿物油覆盖以防止反应液蒸发, 放置 Perkin Elmer Cetus PCR 扩增仪中, PCR 扩增反应的程序: $94^{\circ}\text{C}/1\ \text{min}$, $55^{\circ}\text{C}/2\ \text{min}$, $72^{\circ}\text{C}/3\ \text{min}$, 执行 40 次重复循环, 最后延长 $72^{\circ}\text{C}/10\ \text{min}$ 。PCR 扩增反应后的产物取 $0.5-2\ \mu\text{l}$, 用 6% PAGE 和银染色方法检测合成的 ds DNA 的大小及产物的质量和数量。

(三) sArMV ds cDNA 的两端连接 EcoRI Adaptors

RT-PCR 扩增的 sArMV ds cDNA 用等体积的酚 / 氯仿 (1:1, V/V) 抽提一次, 乙醇沉淀, 按照 Ribo Clone^R EcoRI Adaptor Ligation Systems 步骤^[5], sArMV ds cDNA 的 5' 端经磷酸化后, 其两端分别连接 EcoRI Adaptors。 $30\ \mu\text{l}$ 连接反应的体积包括: 适量的 ds cDNA, $3\ \mu\text{l}$ $10\times$ 连接缓冲液, $3\ \mu\text{g}/3\ \mu\text{l}$ BSA, $7.5\text{pmol}/1\ \mu\text{l}$ EcoRI Adaptor, $2\text{U}/1\ \mu\text{l}$ T₄ DNA 连接酶和 $22\ \mu\text{l}$ 无离子水。反应条件: 14°C , 6-12h。连接 sArMV ds cDNA 的 EcoRI Adaptors 的 5' 端经磷酸化后, 用酚 / 氯仿抽提和乙醇沉淀。沉淀悬浮在少量无离子水中, 通过 Bio-Spin 30 柱 (Bio-Rad 产品) 层析, 在 Beckman GPR 台式水平离心机中于 $2200\text{rpm}/1100\text{g}$ 离心 3 分钟, 获得纯化的样品。

(四) sArMV ds cDNA 的克隆和克隆菌的筛选

取适量的 pUC9 质粒用 EcoRI 酶解和脱磷酸化处理。纯化的 sArMV ds cDNA 连接线型的脱磷酸化的 pUC9 质粒, 15°C 连接过夜。取少量的连接产物转化感受态细胞 (*E. coli* JM83), 涂皿 (YT 培养基: 每升含 5g NaCl, 5g 酵母浸出液, 8g 蛋白胨, 15g bacto-agar, 50mg Ap。每平皿表面预先用 $50\ \mu\text{l}$ 2% X-gar 涂皿) 放置 37°C 培养过夜。挑选白色菌落分别转移到 82nm NYTRAN 膜 (Schleicher and Schuell, Ince Keene, NH) (覆盖在含有 AP 的 YT 平皿上) 和 YT 平皿中, 用菌落原位杂交的方法, 使用 ^{32}P 标记的 sArMV 作为探针, 从 NYTRAN 膜中筛选与 sArMV 探针有强烈杂交反应的菌落。碱法提取其质粒, 用 EcoRI 酶解, 产物经 6% PAGE 和银染色检测插入的 cDNA 片段的大小, 挑选含有全长 sArMV ds

cDNA 片段的质粒进行序列分析。

(五) 克隆的 sArMV cDNA 核苷酸的序列测定

质粒经碱变性处理, 按双脱氧测序法和 TaqTrack^R Sequencing Systems 的步骤^[6]进行。³²P-dATP 标记的产物经 90 °C 处理 5 分钟, 加样到 8% 序列胶中, 电泳条件控制在 35—40mA/1500—2000V, 二次加样。序列胶直接 (也可将序列胶烘干) 用于放射性自显影, 获得不同数码质粒的核苷酸序列。

(六) 异构的 sArMV ds cDNA 单体的亚克隆

根据 EcoRI 酶解分析, 将 sArMV ds cDNA 双体克隆质粒用 EcoRI 酶解, 1.5% 琼脂糖电泳回收全长的异构单体 ds cDNA 片段, 分别插入到 pSP65, pGEM3Z 和 pGEM9Zf(-) 质粒中, 转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α 而获得亚克隆。

结 果

sArMV 在病毒粒子中为单链线型 RNA 分子, 在寄主细胞中存在单链环型和线型两种 RNA 分子。图 1 显示 ArMV 病毒 RNAs 和感染寄主植物昆诺藜 (*Chenopodium quinoa*) 的总核酸的 PAGE 分析结果。

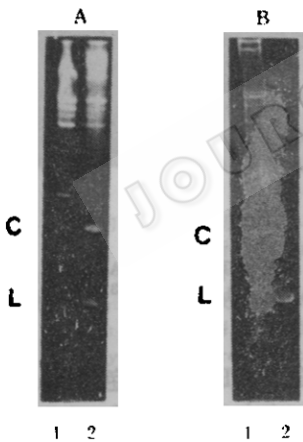


图 1 ArMV 病毒 RNAs 和感染 ArMV 病毒的昆诺藜的总核酸在变性条件的 6%PAGE 分析图谱
A: 1. 健康的昆诺藜总核酸; 2. 感染 ArMV 的昆诺藜总核酸

B: 1. 感染 ArMV 的昆诺藜总核酸; 2. 提纯的 ArMV 病毒 RNAs

Fig. 1 Comparative 6% PAGE analysis under denaturing conditions of RNA mixtures from ArMV infections in *Chenopodium quinoa*
A: TNA extracts of uninfected (lane 1) and ArMV-infected (lane 2) B: TNA extracts from ArMV-infected plants (lane 1) and purified ArMV virions (lane 2)

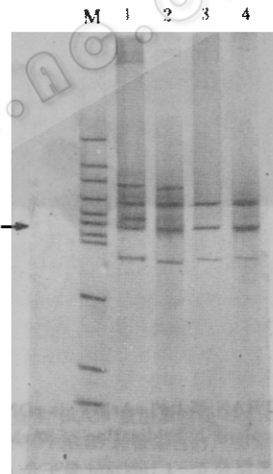


图 2 sArMV 的 RT-PCR 扩增产物连接 EcoRI Adaptors 后在 6%PAGE 的产物分析

M: DNA 分子量 marker, 片段大小分别为 587、454、434、359、320、298、282、267、173、102 和 80bp; 1, 3. 连接 EcoRI Adaptors 的 sArMV ds cDNA 通过 Bio-Spin 30 柱之前的产物; 2, 4. 分别是通过 Bio-Spin 30 柱之后的样品

箭头方向为 RT-PCR 扩增的 sArMV 全长的 ds cDNA
Fig. 2 Analysis of the RT-PCR amplified sArMV ds cDNA products ligating with EcoRI Adaptor on 6% PAGE

M: Molecular DNA marker with fragments size (bp) of 587, 454, 434, 359, 320, 298, 282, 267, 173, 102 and 80; Lane 1 and 3, sArMV ds cDNA ligating with EcoRI Adaptors passed Bio-Spin 30 column before; Lane 2 and 4. the same products passed Bio-Spin 30 column after; The arrow indicated full length ds cDNA band by RT-RCP amplification

以 sArMV 部分序列合成的 DNA 引物 (p18-6) 用经典的 cDNA Synthesis Systems 步骤仅获得较小片段的 ds cDNA。根据 sArMV 的 RNA 序列合成的 2 个 DNA 引物 (引物-1:16mer, 5'GACAGTTACTAGGATT 3', 与 sArMV 的 nt 285-300 互补。引物-2:16mer, 5'GCCGGATGTGTATCCG 3', 与 sArMV nt 1-16 同源), 采用新的 RT-PCR 扩增法即可得到大量的 sArMV 全长的 ds cDNA。图 2 显示用 0.5-1 μ l RT-PCR 产物连接 EcoRI Adaptors 的 6%PAGE 的分析结果。

RT-PCR 扩增的 sArMV ds cDNA 的 5' 端经磷酸化后可直接连接到含有限制性内切酶平头末端位点 (EcoRV HpaI 或 SmaI) 的质粒中。本实验采用 RiboClone^R EcoRI Adaptor Ligation Systems 步骤, 将 PCR 扩增的 sArMV ds cDNA 的两端连接 EcoRI Adaptors, 并使 Adaptors 5' 端磷酸化的 ds cDNA 通过 Bio-Spin 30 柱层析, 除去 30bp 以下 (包括 DNA 引物) 的寡核苷酸。纯化的 ds cDNA 插入到 EcoRI 酶解的脱磷酸化的 pUC9 质粒中。经转化 *E. coli* JM83 获得较多数量的白色克隆菌, 用菌落原位杂交的方法, 以 ³²P-ATP 标记的 sArMV 作为探针, 筛选出 5 个有强烈杂交反应的克隆菌 (图 3)。碱法提取重组质粒并用 EcoRI 酶解, 图 4 显示克隆菌的重组质粒和酶解产物在 1.5% 琼脂糖电泳的产物分析结果。

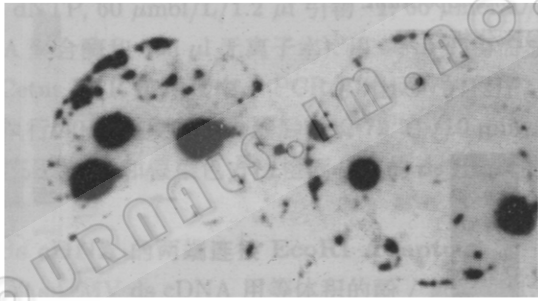


图 3 在 NYTRAN 膜上的 sArMV ds cDNA 克隆的菌落原位杂交结果 (用 ³²P-ATP 标记的 sArMV 作为探针)
Fig.3 In Situ colony hybridization of sArMV ds cDNA clones on NYTRAN membrane using ³²P-ATP labeled sArMV as probe

图 5 显示 pUC9 重组质粒经 EcoRI 酶解后的产物在 6% PAGE 和银染色的 sArMV ds cDNA 片段的区带分布。由于 sArMV 含有 1 个 EcoRI 酶切位点, 含有全长的 sArMV 的重组质粒经 EcoRI 处理后, 单体应是分解成 2 片段 (88bp 和 212bp), 插入片段经连接 EcoRI Adaptors 后, 应分别是 104bp 和 224bp, 如果是双体就含有 3 片段 (分别为 104bp 224bp 和 300bp)。图 5 的 5 个重组质粒 (6 号为对照质粒) 中, 插入片段分别是: 1 号含有 2 片段 (300bp 和 224bp), 2 号含有约 120bp 的片段, 3 号含有 3 片段: (300bp、224bp 和 104bp), 4 号含有 2 片段 (224bp 和 104bp) 5 号含有 2 片段 (约 250bp 和 104bp)。结果表明, 3 号重组质粒是 sArMV ds cDNA 的双体克隆。这个结论在克隆菌的限制性内切酶酶切图谱分析中得到证实。

使用 TaqTrack^R Sequencing Systems 步骤分别测定重组质粒 2、3、4 和 5 的核苷酸序列, 分别获得了 3、4、5 号的正向序列和 2 号的反向序列, 测定的 4 种重组质粒的核苷酸排列顺序完全一致。图 6 显示由克隆的 sArMV ds cDNA 核苷酸反推算成 RNA 的

核苷酸序列, 由此核苷酸序列组成了 sArMV 的二级结构图谱 (图 7)。将 sArMV 的 DNA 序列核苷酸组成与 sArMV 的 RNA 序列图谱相比较, 得到核苷酸序列完全一致的结果 (在 RNA 序列的原始自显影胶片中, U₂₀₄ 和 U₂₀₆ 均含有 U 和 C 的自显影斑迹, 比较 DNA 序列的自显影胶片, 确定 C₂₀₄ 和 C₂₀₆ 是正确的)。

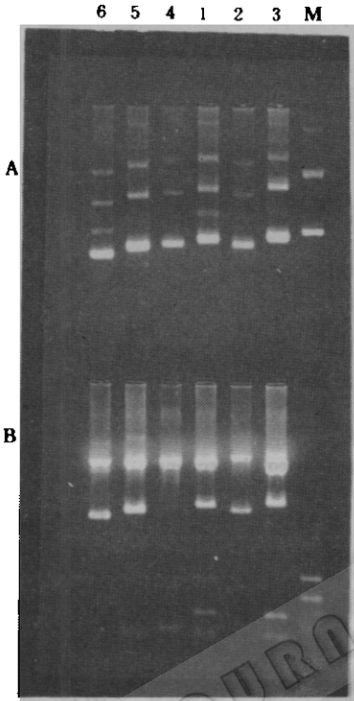


图 4 克隆的 pUC9 重组质粒在 1.5% 琼脂糖电泳中的产物分析 (EB 染色)

A: 1,2,3,4,5 分别是与 ³²P 标记的 sArMV 有杂交反应的重组质粒; 6. 没有杂交反应的对照质粒; M.pUC9
B: 用 EcoRI 酶解后的相同的样品

Fig. 4 Analysis of the products cloning recombinant pUC 9 vectors inserted with sArMV ds cDNA on 1.5% agarose electrophoresis

A: 1-5, The recombinant pUC 9 vectors hybridizationable with ³²P-labeled sArMV probe, respectively; 6. The vector hybridizationless with ³²P-labeled sArMV probe; M. pUC 9 vector
B. The same samples digested with EcoRI



图 5 克隆的 pUC9 重组质粒经 EcoRI 酶解后经 6% PAGE 和银染色的产物分析

M: DNA 分子量 marker; 1-5 分别是与 ³²P 标记的 sArMV 有杂交反应的重组质粒;
6. 没有杂交反应的质粒

Fig. 5 Analysis of the products cloning recombinant pUC 9 vectors digested with EcoRI

M: Molecular DNA marker; 1-5: The recombinant pUC 9 vectors hybridizationable with ³²P-labeled sArMV probe, respectively; 6. The vectors hybridizationless with ³²P-labeled sArMV probe

```

5' GCCGGAUGUGUAUCCGACCGUGACGAUGGAACAAAAGGGCCGAAACAGUACUGCGUCAUGCCGAGUUGGGCAUGGG
GAGACGAGACGUGAAUUCUCUGGAUACUCCAACGGGUAAUAUACCACACAAGGUGUGUUUCGCCGUUCGGCUUC
GCUGUUGCUUGUGGUCGUUAGCCGGACACUCUGGOGAGAGUUACCCGGGUUACCCUAAACAAAAAAGUGAUG
GGGUACCCGGUGUGGAUCGACACCCGGGUAGGUUCGGAUUUCCUAAAGAAACGAACUAUUCUAGUAACUGUC 3'

```

图 6 sArMV 的核苷酸序列图谱

Fig. 6 Cloning sArMV nucleotide sequence

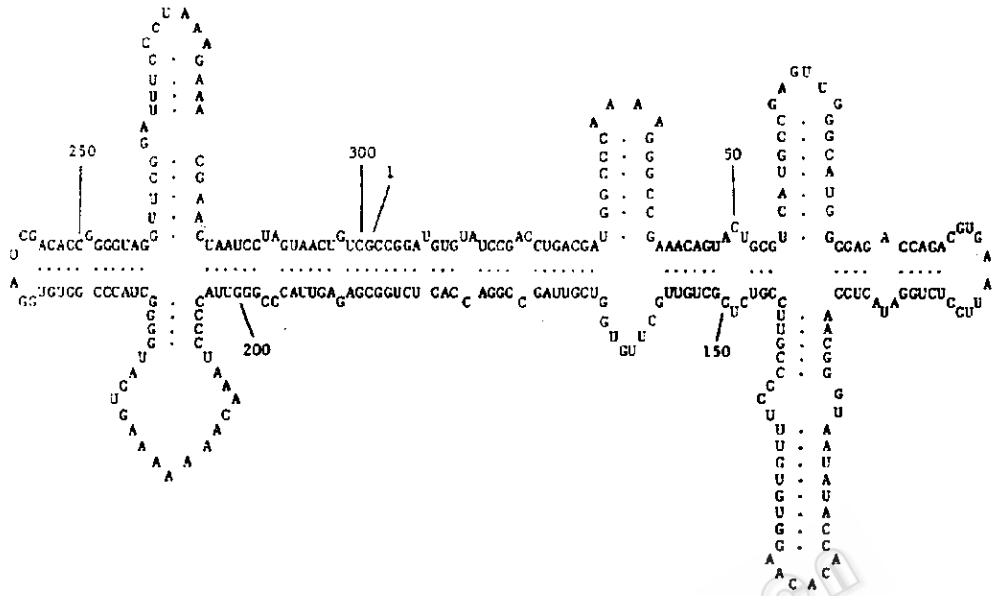


图7 sArMV 核苷酸的二级结构图谱

Fig. 7 Secondary structure of sArMV produced from the nucleotide sequence

克隆的 3 号重组质粒含有双体的 sArMV ds cDNA。3 号重组质粒经 *EcoRI* 酶解, 1.5% 琼脂糖电泳, 从胶中回收含 300bp, 224bp 和 104bp 的片段, 分别亚克隆到 pSP65、pGEM 3Z 和 pGEM 9Zf(-) 质粒中构成不同的正向和反向排列顺序的重组质粒, 转化后获得亚克隆菌。从亚克隆菌提取的重组质粒经 *EcoRI* 酶解而获得 5 个全长的异构单体和 1 个 224bp 片段。图 8 显示亚克隆的不同重组质粒的 *EcoRI* 酶解图谱。

讨 论

sArMV (正链) 含有一个垂头状核酶 (Ribozyme) 结构分子, 有自我切割含 5'GUC ↑...3' 核苷酸序列的生物功能, 根据 DNA 序列和 RNA 序列分析结果, 我们发现这个核酶是由首尾相连的 54 核苷酸组成, 构成一个完整的垂头状核酶结构分子, 与该核酶结构分子相似的还有烟草环斑病毒卫星 (正链)RNA (sTobRV) 和菊巨黄化斑驳病毒卫星 RNA (正链) (sCYMV)^[7,8], 图 9 显示这三种核酶的二级结构。当核酶在植物体内自我表达其切割功能时, sArMV 即从环型分子转变为线型分子 (图 10)。这就解释了为什么在提取感染 ArMV 的昆诺藜的总核酸中含有环型和线型二种结构的 sArMV, 而在提纯的 ArMV 病毒核酸中仅含有线型 sArMV, 由于核酶的自我切割的作用, 线型的 sArMV 被包裹在 ArMV 病毒中。

克隆的 3 号重组质粒的 sArMV 核苷酸序列排列是 nt 1 - 300 - 1 - 300, 经 *EcoRI* 酶解后获得亚克隆的异构单体的核苷酸序列排列是 nt 89 - 300 - 1 - 88。由异构单体转录的 cRNA 是线型的 RNA, 区别于植物体内的环型 RNA。异构单体包含着完整的核酶结构的核苷酸序列, 即 nt 295-300-1-48。用线性的 RNA 在体外进行核酶的酶切功能研究将会揭示核酶的功能性作用机制, 因此, sArMV 的双体和异构单体的 cDNA 克隆是研究核酶的有效实验材料。

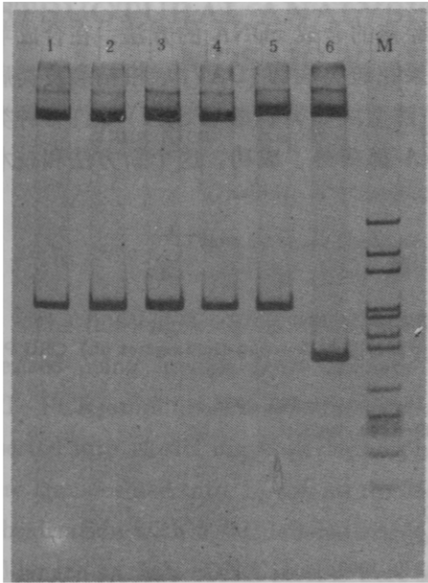


图 8 亚克隆的 sArMV 异构单体 ds cDNA 的重组质粒 EcoRI 酶解产物在 6% PAGE 中的分析
 1,2,3,4.pGEM 3Z 重组质粒; 5. pGEM 9Zf(-) 重组质粒;
 6. pSP65 重组质粒; M.DNA marker
 Fig. 8 Analysis of subcloning sArMV isomonomer of recombinant vectors digested with EcoRI on 6% PAGE
 1,2,3,4. Recombinant pGEM3Z vector; 5. Recombinant pGEM9Zf(-) vector; 6. Recombinant pSP 65 vector; M: Molecular DNA marker

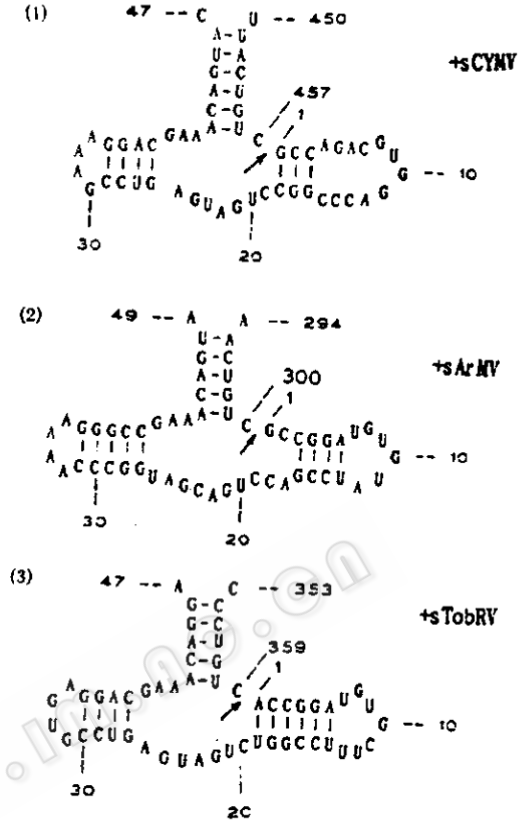


图 9 三种核酶的垂头状二级结构图谱
 1. 菊巨黄斑斑病毒卫星 RNA(正链) (+sCYMV);
 2. 南芥菜花叶病毒卫星 RNA(正链) (+sArMV);
 3. 烟草环斑病毒卫星 RNA(正链) (+sTobRV);
 箭头表示核酶自我切割位点

Fig. 9 Hammer head structure of three Ribozymes from the viral satellites of arabis mosaic virus (ArMV),chi-cory yellow mottle virus (CYMV) and tobacco ringspot virus (TobRV)
 Arrow indicated the proposed self-cleavage site of a circular form

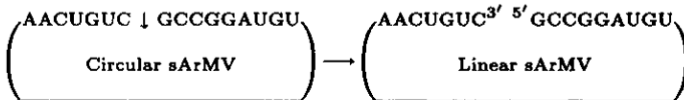


图 10 在核酶作用下环型的 sArMV 分子转变成线型的分子, (箭头指示核酶切割位点)
 Fig. 10 Circular form of sArMV was self-cleaved into linear form of sArMV
 Arrow indicated the proposed self-cleavage site

在最初反转录 sArMV cDNA 的实验中, 由于使用的引物 (p18-6) 是根据 sArMV 的中间序列合成的, 所以不可能反转录出全长的 cDNA, 根据 sArMV 的核酶切割位点而合成

的 2 个引物可避免 sArMV 由于核酶自我切割造成的核苷酸链的中断, 经过 RT-PCR 扩增而获得大量的全长的 ds cDNA。

我们设计和建立的 RT-PCR 扩增技术优先于经典的合成 cDNA 的方法。在合成苹果锈果类病毒 (ASSV)、梨铁锈类病毒 (PRSV)、苹果花斑类病毒 (DAV)、柑桔裂皮类病毒 (CEV)、柑桔 cachexia 类病毒 (CCaV) 和马铃薯纺锤型块茎类病毒 (PSTV) 等许多种类的类型病毒^[9-15] 以及病毒外壳蛋白^[16,17] 的全长 cDNA 都获得了成功。这个新方法和技术已被国内外科科研人员所采用。

参 考 文 献

- [1] Kaper, J. M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**:1237-1243, 1976.
- [2] Kaper, J. M. and C. W. Collmer: *RNA Genetics*, **3**:171-194, (ed. Esteban Domingo et al.) CRC Press, Inc. Florida, 1987.
- [3] Kaper, J. M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**(1):318-325, 1988.
- [4] Davis, D. L. and M. F. Clarke: *Ann. Appl. Biol.*, **103**:439-448, 1983.
- [5] Promega 1991-92 Catalogue, p.225.
- [6] promega 1991-92 Catalogue, p.174.
- [7] Rubino, L. et al.: *J. Gen. Virol.*, **71**(9):1897-1903, 1990.
- [8] Forster, A. C. and R. H.: *Symons. Cell*, **49**:211-220, 1987.
- [9] Hadidi, A. and Yang, X. C.: *J. Virol. Methods*, **30**:261-270, 1990.
- [10] Hadidi, A. et al.: *Res. Virol.*, **142**:289-296, 1991.
- [11] Yang, X. C. et al.: *Phytopathology*, **81**(10):1155, 1991.
- [12] Hadidi, A. et al.: *Photopathology*, **81**(10):1246, 1991.
- [13] Yang, X. C. et al.: *Photopatology*, **82**(3):279-285, 1992.
- [14] Yang, X. C. et al.: *Agricultural Biotechnology* p.301-303, (ed. You, C. B. and Chen, Z. L.) 亚太会议论文集, 北京, 1992 年.
- [15] 何小源等: *中国病毒学*, **7**(3):362-366, 1992.
- [16] 叶长明等: *植物病理学报*, **21**(3):161-164, 1991.
- [17] 叶 寅等: *科学通报*, **36**(17):1340-1344, 1991.

STRUCTURAL ANALYSIS OF SATELLITE RNA OF ARABIS MOSAIC VIRUS AND ITS RIBOZYME

Yang Xicai¹ Kaper, J.M.² Hadidi, A.² Tousignant M. E.² Tien Po¹

¹(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

²(*Plant Sciences Institute, USDA-ARS, Beltsville, MD 20705 USA*)

The full-length cDNA of the satellite RNA of arabis mosaic virus (sArMV) was synthesized using specific DNA primers by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification systems. The amplified cDNA was ligated with EcoRI adaptor and inserted into EcoRI digested dephosphorylated pUC9 vector. The recombinant molecules were transformed into *E. coli* strain JM83. Transformants were screened by *in situ* colony hybridization with a ³²P-labeled sArMV probe. The recombinant pUC9 clones containing full-length sArMV cDNA inserts were selected by digestion with EcoRI and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) analysis. The complete nucleotide sequence was determined by TaqTack Sequencing Systems. It was revealed that the sArMV isolate from the hop strain consists of 300 nucleotides. The cDNA sequence is similar to the sArMV RNA sequence; and the sArMV contains a complete ribozyme hammer head structure with conserved sequences in hold face, which has a 5'-GUC₃₀₀G₁... 3' self-cleavage function.

Key words sArMV; Ribozyme; DNA sequence