

黄瓜花叶病毒辣椒分离物侵染性克隆构建

廖乾生, 杜志游, 张华荣, 吴 鹏, 朱丽萍, 陈集双

(浙江理工大学生物工程研究所, 杭州 310018)

摘要: 【目的】鉴定引起辣椒产生褪绿黄化症状的病原物, 构建侵染性克隆。【方法】大田辣椒样品通过 ELISA 检测, 结合病毒外壳蛋白 SDS-PAGE 及病毒 RNA 分析, 初步确定辣椒中病原物为黄瓜花叶病毒 (CMV) Phy 株系。以辣椒病毒粒子 RNA 为模板, 采用含 T7 启动子的不同正向引物通过 RT-PCR 扩增 CMV-Phy 全长基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3。PCR 产物经过双酶切后连接到 pUC118 载体, 并分别比较 5 种 (DH5 α 、HB101、JM109、LE392 和 NM522) 感受态细胞的转化效率。体外转录 CMV-Phy 的基因组 cDNA 克隆 (pUC-P1、pUC-P2 和 pUC-P3) 成 RNA 分子 (P1P2P3), 分析其转录效率和侵染活性。P1P2P3 与 CMV 的卫星 RNA 进行假重组, 进一步确定 CMV-Phy 侵染性克隆的成功构建。【结果】引起辣椒产生褪绿黄化症状病原物为 CMV, 携带卫星 RNA; 心叶烟接种辣椒病毒粒子后同样产生褪绿黄化症状。HB101 感受态细胞最适合 CMV-Phy 基因组转化。CMV-Phy 基因组及其卫星 RNA 的大小如下: RNA1 为 3 356 nt, RNA2 为 3 048 nt 和 RNA3 为 2 220 nt, 卫星 RNA Pz-satRNA 为 384 nt (序列登陆号分别为: DQ402477, DQ412731, DQ412732 EF363688)。CMV-Phy 的 cDNA 克隆体外转录在 5' 端添加 G 有利于提高转录效率, 但影响其侵染活性; P1P2P3 在莴色藜和心叶烟产生的症状与其病毒粒子产生的症状相一致。除了 Pz-satRNA, P1P2P3 还能作为 T1-satRNA、Rs-satRNA 和 Tsh-satRNA 辅助病毒; T1-satRNA 可加重 CMV-Phy 在心叶烟症状反应, 而其它 3 个卫星 RNA 则对此起减弱作用。【结论】以病毒粒子 RNA 为模板, 采用 touch-up PCR 扩增参数在 1 个反应管中同时获得 CMV-Phy 基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3; CMV-Phy RNA1、RNA2 和 RNA3 的 5' 端添加 1 个 G 最有利于侵染性克隆构建。

关键词: 黄瓜花叶病毒; 全长基因组; 侵染性克隆; 假重组

Construction of Infectious Clone for *Cucumber Mosaic Virus Pepper Isolate*

LIAO Qian-sheng, DU Zhi-you, ZHANG Hua-rong, WU Peng, ZHU Li-ping, CHEN Ji-shuang

(Institutes of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018)

Abstract: 【Objective】 In this study, the pathogen which caused chlorosis symptom on *Capsicum frutescens* was confirmed as CMV-Phy, and infectious clones for CMV-Phy were constructed. 【Method】 Serological ELISA, SDS-PAGE and viral RNAs analysis were adopted to identify the virus in the seedlings of *C. frutescens*. With different forward primers containing T7 promoter at 5' terminal, full length of RNA1, RNA2 and RNA3 or satRNA were amplified by RT-PCR, using CMV-Phy viral RNA as template. PCR products of CMV-Phy RNA1, RNA2 and RNA3 were ligated into pUC118 vector, respectively. Transformation efficiency among DH5 α , HB101, JM109, LE392, and NM522 *E. coli* competent cell was compared. cDNA clones of CMV-Phy genomic RNAs (pUC-P1, pUC-P2 and pUC-P3) were transcribed into RNA *in vitro* and RNA transcripts were mechanically inoculated onto *Nicotiana glutinosa*. In order to further prove that infectious clones were successfully constructed, pseudorecombination between CMV-Phy RNA transcripts and CMV-satRNA was analyzed. 【Result】 The virus in *C. frutescens* tissues was CMV-Phy, which harboring a satRNA and *N. glutinosa* also expressed chlorosis symptom when inoculated with CMV-Phy viroin isolated from the *C. frutescens*. RNA1, RNA2 and RNA3 of CMV-Phy were obtained by RT-PCR. Only HB101 competent cell was suitable to pUC-P1 transformation, but all the five kinds of *E. coli* were fit for pUC-P2 and pUC-P3 transformation. Full length of RNA1, RNA2, RNA and Pz-satRNA was 3356, 3048 2220, and 384 nt, respectively (accordingly Accession Number: DQ402477, DQ412731, DQ412732).

收稿日期: 2007-04-23; 接受日期: 2007-07-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671361) 和科技部国际合作项目 (2004DFA05000)

作者简介: 廖乾生 (1975-), 男, 江西兴国人, 博士研究生, 研究方向为植物病毒学。E-mail: qshliao@yahoo.com.cn。通讯作者陈集双 (1962-), 男, 湖南石门人, 教授, 研究方向为植物病毒学。E-mail: Chenjs@zist.edu.cn

In vitro transcription efficiency improved but RNA transcripts was no activity when guanosine was added to 5' end of RNA1, RNA2 and RNA3 cDNA clones. Biological assays of CMV-Phy infectious RNA (P1P2P3) showed that symptom induced by P1P2P3 was the same as that induced by CMV-Phy virion. Besides Pz-satRNA, P1P2P3 could support replication of T1satRNA, Rs-satRNA and Tsh-satRNA in *N. glutinosa*. The presence of T1-satRNA aggravated symptom induced by P1P2P3 while the addition of other satRNAs attenuated symptom expression. 【Conclusion】 Whole genome of CMV-Phy was obtained in a reaction by touch-up RT-PCR, using viral RNAs as template. The addition of guanidine to 5' end of RNA1, RNA2 and RNA3 cDNA clones was propitious to infectious clone's construction.

Key words: *Cucumber mosaic virus*; Full length of genomic RNAs; Infectious clone; Pseudorecombination

0 引言

【研究意义】辣椒 (*Capsicum frutescens*) 是具有重要经济价值的蔬菜。现已发现大约 45 种病毒能感染辣椒, 在中国大陆已发现 7 种, 主要为黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV)、马铃薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY)、烟草蚀纹病毒 (*Tobacco etch virus*, TEV)、马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX)、苜蓿花叶病毒 (*Alfalfa mosaic virus*, AMV)、蚕豆萎蔫病毒 (*Broad bean wilt virus*, BBWV)。其中以 TMV、CMV 和 PVY 为主, 并且往往是多种病毒复合侵染。辣椒病毒病危害, 严重影响了辣椒产量和质量^[1-5]。CMV 在中国是寄主最多、分布最广、对农作物危害最为严重植物病毒之一, 目前已从 38 个科的 120 多种植物上分离到了该病毒^[6-9]。CMV 是中国甜椒上的主要毒源种类, 并有许多不同株系^[1,2,5]。CMV 在辣椒上主要症状表现为花叶 (mosaic)、斑驳 (mottle)、蕨叶 (fern) 和矮化 (stunt) 等。【前人研究进展】目前辣椒病毒的研究主要集中在病害的发生与分布调查, 病原物的鉴定与形态学电镜观察以及辣椒病毒病有比较系统的检测和分析, 辣椒病毒的防治也制定了一系列的措施^[10-16]。侵染性克隆技术首先在噬菌体病毒 Q β 、脊髓灰质炎病毒 (*poliovirus*) 中获得成功, 植物 RNA 病毒侵染性克隆由 Ahlquist 等在雀麦花叶病毒 (*Brome mosaic virus*, BMV) 首次报道, 至今国外已有大量的植物病毒被成功地构建了全长 cDNA 侵染性克隆^[17-19]。RNA 病毒的 cDNA 侵染性克隆技术的发展, 使人们可以在 DNA 水平上开展 RNA 病毒的分子生物学研究, 为深入地研究 RNA 病毒与寄主的相互作用机制提供了有效手段。【本研究切入点】侵染性克隆在病毒学研究中的意义日渐突出, 但由于全长 cDNA 侵染性克隆的构建技术性较强, 目前, 国内除了 TMV 的侵染性克隆外, 还未见有其它植物 RNA 病毒的类似研究工作的报道^[20,21]。本研究组从杭州郊区

大田呈黄化症状辣椒上获得一株 CMV 分离物 (CMV-Phy), 该病毒在心叶烟上引起褪绿症状。【拟解决的关键问题】本研究以 CMV-Phy 的病毒粒子 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 通过 touch-up 的 PCR 循环参数, 克服 CMV 全长基因分段克隆与测序的繁琐; 比较 5 种感受态细胞的转化效率, 确定感受态细胞最适合 CMV-Phy 基因组克隆转化过程中效率低问题; 最后分析 CMV-Phy 基因组 cDNA 克隆在体外转录的过程中, 基因组 5'端添加 G 或加帽子类似物对体外转录产物侵染活性的影响。

1 材料与方 法

1.1 毒源和寄主

自然感病辣椒植株采自于浙江杭州郊区, 并保存于防虫温室中。CMV-Fny 基因组 cDNA 克隆 (pF109、pF209 和 pF309, 序列登录号分别为 D00356、D00355 和 D10538) 由苏格兰作物研究所 Palukaitis 教授提供。CMV 卫星 RNA 的 cDNA 克隆保存于浙江理工大学生物工程研究所。其中 T1-satRNA (DQ785472, 337 nt) 和 Tsh-satRNA (DQ249297, 383 nt) 分离自 CMV 侵染的番茄, Rs-satRNA (AF451896, 368 nt) 分离自 CMV 侵染的萝卜。病毒接种采用汁液摩擦接种方法, CMV 系统寄主为心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*), 枯斑寄主为莧色藜 (*Chenopodium amaranticolor*)。

1.2 酶与试剂

植物病毒 ELISA 试剂盒购自美国 Agdia 公司, 包括 CMV、TMV、PVY、PVX、AMV、TEV 和 BBMV 抗体检测试剂盒。RNA 酶抑制剂 RNase inhibitor、PyrobestTM DNA Polymerase、载体质粒 pUC118、限制性内切酶 *Sph* I、*Sma* I、感受态细胞 DH5 α 、HB101、JM109 购自大连 TaKaRa 公司; Trizol 试剂、Superscriptase II 逆转录酶购自美国 Invitrogen 公司, 体外转录试剂盒、Cap 类似物、T-easy 载体, 感受态细胞 LE392 和 NM522 购自美国 Promega 公司; T4 DNA ligase 连接酶购于美国 New England Biolabs 公司。

1.3 病毒粒子提纯

病毒提纯按照本实验室方法^[22], 提纯病毒粒子保存在 -80°C 冰箱中^[8], 病毒外壳蛋白 SDS-PAGE 分析和病毒 RNA 电泳分析按照常规方法进行。

1.4 CMV 基因组 RNA 和卫星 RNA 克隆

取 CMV-Phy 病毒粒子 10 mg, 参照 Trizol 试剂使用说明提取病毒粒子 RNA。CMV-Phy 基因组和卫星 RNA 的 cDNA 第一条链分别以 CMV123R [5'-AATTGGGCCCGGTCTCCTTTTRGAG-3' (TGG TCTCCTTTTRGAG 为 RNA1、RNA2 和 RNA3 保守的 3' 端 16 nt)] 和 satR (5'-GGGGTCCTGTAGAGGA-3') 为反转录引物, 反转录反应参照 Superscriptase II 使用说明进行。以高保真的 *Pyrobest*TM DNA Polymerase 进行 PCR 扩增获得 CMV-Phy 基因组全长 RNA1、RNA2 和 RNA 3。扩增的上游引物分别为: CMV12F (5'-AATCGCATGCTAATACGACTCACTA TAGGTTTATTACAAGAGCGTACGG-3', 其中, TAATACGA CTCACTATA 为 T₇ RNA polymerase 启动子和 GTTTATTTACAAGAGCGTACGG 为 CMV RNA1、2 的 5' 保守的 22 nt), 用于扩增 RNA1 和 RNA2; CMV3F (5'-AATCGCATGCTAATACGACTCACTAT AGGTAATCTTACCACTGTGTGTGTG-3', 其中 GTA ATCTTACCACTGTGTGTGTG 为 RNA3 基因组 5' 的 23 nt), 用于扩增 RNA3; CMV 基因组 RNA3 全长序列扩增的下游引物为 CMV123R。PCR 反应体系按照 *Pyrobest*TM DNA Polymerase 的使用说明进行, PCR 的循环参数为: 94°C 预变性 2 min, 前 10 个循环为 94°C 20 s, 56°C 30 s, 68°C 3.5 min, 后 25 循环为 94°C 20 s, 64°C 30 s, 68°C 3.5 min, 68°C 延伸 20 min。PCR 扩增目的片段 (RNA1、RNA 2 和 RNA 3 的全长 cDNA) 经回收、*Sph* I 和 *Sma* I 双酶切, 产物纯化后与相对应的双酶切 pUC118 质粒连接。连接产物转化与阳性克隆的筛选见常规方法^[9]。阳性克隆质粒 (RNA1、RNA 2 和 RNA 3 的 cDNA 克隆 pUC-P1、pUC-P2 和 pUC-P3) 用 *Sph* I 和 *Sma* I 双酶切进行鉴定; 并分别挑取 3 个克隆进行测序。卫星 RNA 的 PCR 扩增的反应条件为: 94°C 预变性 2 min, 94°C 30 s, 54°C 30 s, 68°C 30 s, 68°C 延伸 20 min。目的片段回收后, 参照 T-easy 载体使用说明, 进行连接反应; 连接产物按常规方法转化到大肠杆菌菌株^[23]。挑取 3 个克隆 (pPz-satRNA) 进行测序。

1.5 CMV 基因组和卫星 RNA 的体外转录及假重组

CMV-Phy 的 cDNA 克隆 (pUC-P1、pUC-P2 和

pUC-P3) 经 *Sma* I 酶切后直接作为 RNA 转录模板, 体外转录参考试剂盒方法进行。同时以 Pz-satRNA、T1-satRNA、Rs-satRNA、Tsh-satRNA 的 cDNA 克隆为模板, 按照克隆 Pz-satRNA 的 PCR 反应条件, 扩增出各个 satRNA 的 PCR 产物经过回收, 作为体外转录模板。体外转录反应体系为: $5\times$ buffer 4 μl , 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT 2 μl , RNasin Ribonuclease Inhibitor 20 U, rATP、rGTP、rCTP 和 UTP (均为 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 μl , 线性化 DNA 0.5 μg , T7 RNA Polymerase 40 U, 加 DEPC- H_2O 到总体积 20 μl 。用 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 9.2) 将转录产物稀释到 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。CMV-Phy 基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3 各 5 μl 混合接种时期心叶烟和莧色藜第一片真叶上, 接种前黑暗处理 24 h。CMV-Phy 与 Pz-sat RNA、T1-satRNA、Rs-satRNA、Tsh-satRNA 假重组则以 CMV-Phy 基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3 各 5 μl 的混合物再加入 2 μl 卫星 RNA 体外转录产物, 共同接种于心叶烟上。

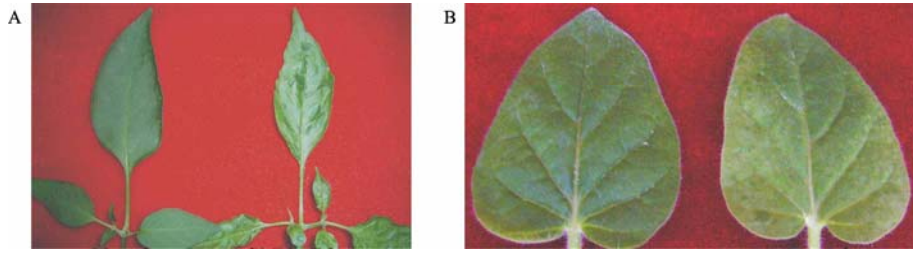
1.6 病毒 dsRNA 分析

CMV-Phy 的转录产物与 Pz-sat RNA、T1-sat RNA、Rs-sat RNA、Tsh-sat RNA 混和接种于心叶烟 4 d, 然后取接种叶扩繁与新的心叶烟上 14 d, 采集所有植株叶组织用于 dsRNA 的提取, dsRNA 提取按照本实验室方法^[23]。

2 结果与分析

2.1 引起辣椒褪绿黄化病的病原鉴定

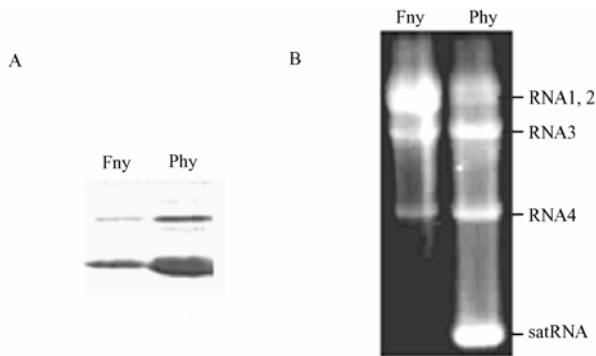
自然感病辣椒症状如图 1-A 所示。针对该症状与发生在辣椒等茄科植物上病毒病表现典型花叶症状特点的不同, 而辣椒上存在多种病毒的复合侵染的可能性, 首先利用多种病毒抗体对自然感病植株样品进行 ELISA 检测, 结果显示: 典型褪绿黄化症状辣椒组织只与 CMV 抗体呈阳性反应, 而与 TMV、PVY、PVX、AMV、TEV 和 BBMV 的抗体反应呈阴性。这表明引起辣椒褪绿黄化症状的病原可能为 CMV。病叶以汁液摩擦接种于心叶烟 14 d, 寄主产生系统褪绿黄花症状, 如图 1-B 所示。从辣椒样品组织中提取病毒粒子, SDS-PAGE 分析病毒外壳蛋白结果如图 2-A 所示, 显示该病毒分离物 CP 条带与 CMV-Fny 基本一致。从病毒粒子中提取 RNA, 核酸电泳分析结果如图 2-B 所示, 显示未知病毒粒子中包含典型多分体 RNA 基因组, 与 CMV-Fny 比较, 其分别对应于 CMV 基因组 RNA1、2 和 3, 以及亚基因组 RNA4, 同时携带 satRNA。因此推测引起辣椒出现褪绿黄化症状的病原物为 CMV。



A: CMV-Phy 在大田引起的褪绿和花叶症状; B: CMV-Pny 接种于心叶烟的症状
A: Chlorosis and mosaic on *C. frutescens* collected from Hangzhou suburb; B: Chlorosis and yellow mosaic on *N. glutinosa* at 14 days post-inoculation (dpi)

图 1 CMV-Phy 在辣椒和心叶烟上的症状反应

Fig. 1 Symptoms induced by CMV-Phy on leaves of *C. frutescens* and *Nicotiana glutinosa*



CMV-Phy 病毒粒子和病毒粒子 RNA 的电泳分析均以 CMV-Fny 为对照
CMV-Fny was used as control strain in both cases

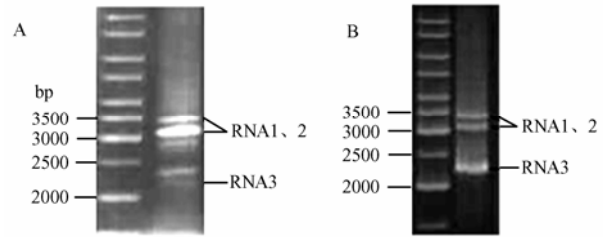
图 2 CMV-Phy 病毒粒子中蛋白质和 RNA 的电泳分析结果

Fig. 2 SDS-PAGE of viral protein and agarose gel electrophoresis of viral RNAs extracted from purified CMV-Phy virions

提纯病毒接种枯斑寄主上, 单斑纯化 2 次, 获得病毒分离物 CMV-Phy。

2.2 CMV-Phy 基因组全长克隆

为了进一步确定该 CMV 分离物基因组序列, 分别以接种病毒心叶烟组织的总 RNA 和病毒粒子 RNA 作为模板, 进行 RT-PCR 扩增。2 种 RNA 模板均能在一个 PCR 反应中同时扩增得到 CMV-Phy 基因组得一定数量的阳性克隆。从病毒粒子和总 RNA 中均 RNA1、RNA2 和 RNA3 的 cDNA (图 3)。但以总 RNA 为 RT-PCR 模板扩增, 尽管能够获得 RNA1、RNA2 和 RNA3 的全长 cDNA, 但 RNA3 扩增效率较低, 且存在非特异性扩增; 以病毒粒子 RNA 为模板, CMV-Phy 的基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3 扩增效率没有明显的差别, 也不存在明显的非特异性扩增。PCR 产物经双酶切并连接到 pUC118 载体, 分别转化 DH5 α 、HB101、JM109、LE392 和 NM522 感受态细胞, 不同感受态细胞的转化效率如表 1 所示。DH5 α 、



A: CMV-Phy 感染辣椒总 RNA 为模板; B: CMV-Pny 病毒粒子为模板
A: Total RNA extracted from systemically infected leaf tissue of *C. frutescens* was used as RT-PCR templates; B: RNA extracted from purified virions of CMV-Phy was used as templates

图 3 CMV-Phy 基因组 RNA 的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 3 Results of RT-PCR for full-length CMV-Phy genomic RNAs

表 1 5 种菌株感受态细胞转化效率的比较

Table 1 Transformation efficiency of five kinds of competent cells

	DH5 α	HB101	JM109	LE392	NM522
RNA1	-	+	-	-	-
RNA2	+++	+++	+++	+++	++++
RNA3	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++

JM109、LE392 和 NM522 4 种感受态细胞都能有效地克隆 CMV-Phy RNA2 和 RNA3 的 cDNA, 但与 RNA1 的 cDNA 克隆进行转化均未获得阳性克隆; HB101 对 RNA1 的 cDNA 片段转化效率低于 20%, 但是能够获得扩增获得卫星 RNA 产物, 并获得阳性克隆。经测序, CMV-Phy 基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3 符合 CMV 基因组结构特征。RNA1、RNA2 和 RNA3 的 cDNA 序列登录号分别为 DQ402477, DQ412731 和 DQ412732。从病毒粒子 RNA 中以及 CMV-Phy 感染

的心叶烟叶组织总 RNA 中, 通过 RT-PCR 扩增并克隆测序, 均获得大小为 384 nt 的卫星 RNA (序列登陆号: EF363688), 命名为 Pz-satRNA。

2.3 病毒基因组 RNA 体外转录及侵染性分析

为了检验所获得 CMV-Phy 全长基因组克隆侵染性, 尤其是确定在该病毒基因组克隆过程中是否发生了个别碱基突变而导致 CMV-Phy 的 cDNA 克隆转录产物侵染力与 CMV-Phy 的病毒粒子 RNA 不一致或者是根本丧失活性, 本研究分析 CMV-Phy 的各个基因的 cDNA 克隆由 T7 启动子引导下的体外转录 RNA 分子的活性。首先, 将含 CMV-Phy 基因组插入片段的重组质粒 pUC-P1、pUC-P2 和 pUC-P3 经过酶切线性化后, 进行体外 RNA 转录, 获得理想的线性化 RNA (图 4)。同时分析了 T7 启动子下游与各个基因的 5' 端之间添加 G 对体外转录效率的影响, 结果表明 T₇ 启动子后加与不加 G, CMV-Phy 的 cDNA 克隆转录效率存在明显差异: pUC-R3+GG > pUC-R3+G > pUC-R3。转录 RNA 产物加或不加帽子类似物, 对 CMV-Phy 侵染性克隆活性有明显影响 (表 2)。转录过程中不加帽, 其产物几乎没有活性。虽然在转录模板上添加 GG, 转录效率高, 但其产物也没有侵染活性; 在转录模板上添加 G, 侵染效率达到 80% 以上。因此, 在 CMV-Phy 侵染性克隆构建时, 在 T7 启动子后均加一个 G。体外转录产物分别接种心叶烟和莧色藜, 心叶烟接种 14 d 和莧色藜 4 d 出现症状反应 (图 5)。P1P2P3 在莧色藜上引起的枯斑较 CMV-Phy 病毒粒子引起的枯斑小; 二者接种心叶烟均引起寄主褪绿黄化症状, 但病毒粒子接种症状出现更快。接种 7 d, 取接种叶转接莧色藜和心叶烟, 二者引起的寄主症状

与初症出现时间基本一致。以上结果显示, CMV-Phy 的全长 cDNA 体外转录产物 P1P2P3 具有与病毒粒子相似的侵染特性。

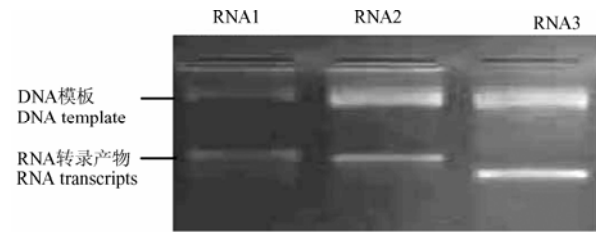


图 4 CMV-Phy 基因组 cDNA 克隆的体外转录产物 TBE 电泳
Fig. 4 TBE electrophoresis of RNA transcribed from CMV-Phy genomic cDNA clones

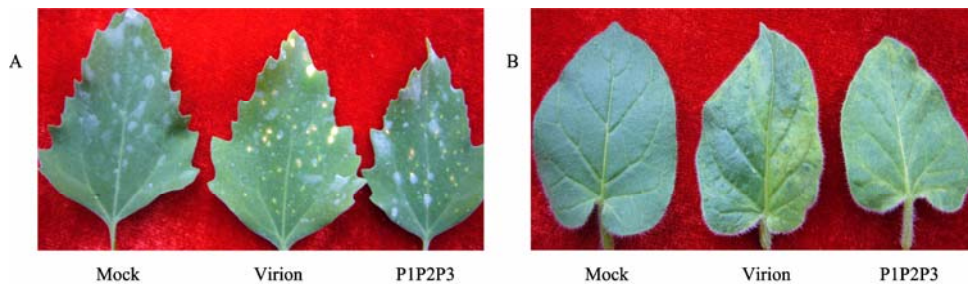
表 2 CMV-Phy 体外转录产物活性分析

Table 2 Infectivity of CMV-Phy RNA transcripts synthesized *in vitro*

Phy 病毒粒子或转录产物 CMV-Phy virion or transcripts	心叶烟 <i>N. glutinosa</i>
Phy 病毒粒子 CMV-Phy virion	14/15*
pUC-P1+pUC-P2+pUC-P3	0/15
pUC-P1G+pUC-P2G+pUC-P3G	2/15
pUC-P1GG+pUC-P2GG+pUC-P3GG	1/15
(pUC-P1+pUC-P2+pUC-P3)+Cap	9/15
(pUC-P1G+pUC-P2G+pUC-P3G)+Cap	13/15
(pUC-P1GG+pUC-P2GG+pUC-P3GG)+Cap	2/15

*CMV-phy 病毒粒子或者 P1P2P3 混合物分别接种于 15 株心叶烟中, 14 天记录寄主的发病情况

CMV-Phy 或 P1P2P3 混合物分别接种于 15 株心叶烟中, 14 天记录寄主的发病情况



15 μ l P1P2P3 混合物分别接种于莧色藜和心叶烟中。莧色藜接种 4 天记录症状, 心叶烟接种 14 天记录症状
15 μ l P1P2P3 mixture was inoculated onto *C. amaranticolor* and *N. glutinosa*, respectively. Symptom expression of *C. amaranticolor* was recorded at 4 dpi; symptom expression of *N. glutinosa* was recorded at 14 dpi

图 5 CMV-Phy 转录产物和病毒粒子接种在寄主上的反应

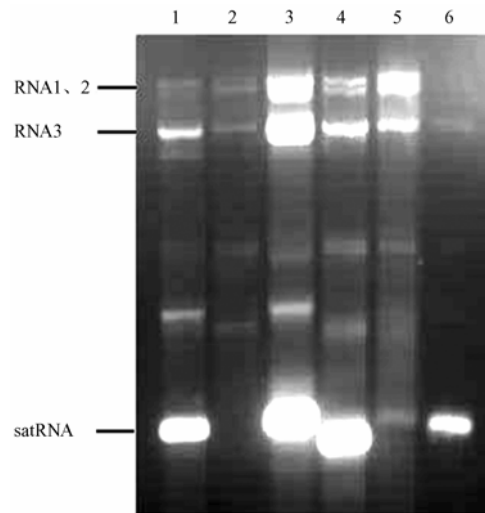
Fig. 5 Host reaction induced by infectious RNA transcripts of CMV-Phy

2.4 CMV-Phy 与卫星 RNA 假重组分析

为了进一步地分析 CMV-Phy 的侵染性克隆的活性,以 CMV-Phy 基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3 的 cDNA 克隆的转录 RNA 产物分别与 Pz-sat RNA、T1-sat RNA、Rs-sat RNA 和 Tsh-sat RNA 的 cDNA 体外转录产物混和接种于心叶烟。接种 14 d, 寄主植物中 dsRNA 分析结果表明 CMV-Phy 能够支持 Pz-sat RNA、T1-sat RNA、Rs-sat RNA 和 Tsh-sat RNA 复制(图 6)。接种 14 d, P1P2P3+Pz 与 CMV-Phy 病毒粒子症状基本一致,均较 P1P2P3 引起的症状轻;但 P1P2P3+T1 在心叶烟上的症状明显比 CMV-Phy 重,而 P1P2P3+Tsh 和 P1P2P3+Rs 均表现与 P1P2P3+Pz 相似的症状。以上结果表明 T1-satRNA 加重辅助病毒 CMV-Phy 的症状,其它 3 个卫星 RNA 则减轻 CMV-Phy 的症状(图 7)。

3 讨论

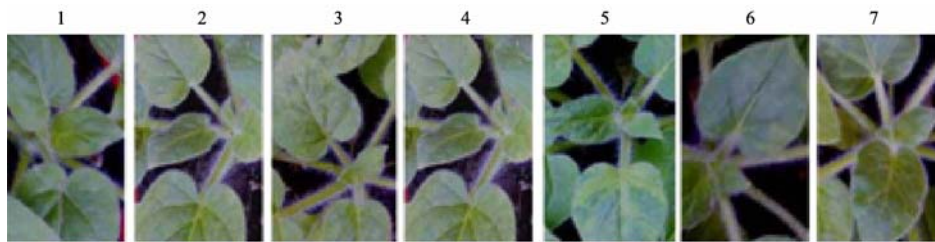
在 CMV 全长基因组克隆过程中,多采用是先分段克隆,克隆片段经过序列测定后,再将不同片段拼接在一起而成完整的基因^[7,8]。在本研究中,根据 GenBank 所报道 CMV 基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3



0.5 g CMV-phy 和卫星 RNA 共同接种的寄主用于提取 dsRNA。1: CMV-Phy 病毒粒子接种; 2: P1P2P3 接种; 3: P1P2P3+Pz-sat 接种; 4: P1P2P3+ T1-sat 接种; 5: P1P2P3+Tsh-sat 接种; 6: P1P2P3+Rs-sat 接种
0.5 g leaf tissue was used for dsRNA extraction. 1: CMV-Phy virions; 2: P1P2P3; 3: P1P2P3+Pz; 4: P1P2P3+ T1; 5: P1P2P3+Tsh; 6: P1P2P3+Rs

图 6 CMV-Phy 与卫星 RNA 假重组 dsRNA 检测

Fig. 6 Detection of pseudorecombination between CMV-Phy and satRNAs by extracting dsRNA from infected host plants



15 μ l P1P2P3 混合物加或不加卫星 RNA 分别接种于心叶烟中。1: 缓冲液接种; 2: CMV-Phy 病毒粒子接种; 3: P1P2P3 接种; 4: P1P2P3+Pz-sat 接种; 5: P1P2P3+ T1-sat 接种; 6: P1P2P3+Tsh-sat 接种; 7: P1P2P3+Rs-sat 接种
15 μ l P1P2P3 mixture with or without CMV-satRNA was inoculated onto *N. glutinosa*
1: Mock inoculation; 2: CMV-Phy virions; 3: P1P2P3; 4: P1P2P3+Pz; 5: P1P2P3+ T1; 6: P1P2P3+Tsh; 7: P1P2P3+Rs

图 7 CMV-Phy 与 4 种卫星 RNA 假重组体侵染心叶烟的症状反应

Fig. 7 Symptom expression on the seedlings of *N. glutinosa* induced by inoculation of pseudo-recombinants between CMV-Phy and different satRNAs

序列,从各个基因组两端设计开始设计正、反向引物,分别以 CMV-Phy 侵染心叶烟总 RNA 以及从大田辣椒样品病毒粒子 RNA 作为模板,进行 RT-PCR 扩增;采用 touch-up 的 PCR 循环参数,在一个 PCR 反应管内把 CMV-Phy 基因组 RNA1、RNA2 和 RNA3 全部得以有效扩增(图 3)。以 CMV-Phy 侵染心叶烟的总 RNA 为模板, RNA1, RNA2 和 RNA3 都能扩增出来,

但是 RNA3 扩增效率很低,并且存在着非特异性扩增,在 RNA2 条带位置的下面和 RNA3 条带位置的上面出现非目的条带,这可能是由于在 PCR 过程中所选用的正向引物比较长(40 bp 以上)并且又是 CMV-Phy 侵染的寄主总 RNA 为模板,因此扩增过程中非特异性比较强。在 RNA1 连接产物与 5 种感受态细胞转化中, DH5 α 、JM109、LE392 和 NM522 4 种感受态细胞的

平板中, 菌落稀少并且是假阳性或者是空载体, 这可能是由于 CMV 的基因组 RNA1 对细菌有毒性, 杀死了大部分细胞(与苏格兰作物研究所 Palukaitis 教授通讯); 而 HB101, 能获得一定的 RNA1 阳性克隆, 同时菌落数也是特别多。这也解释了为何在 GenBank 已登陆的序列, CMV 的基因组 RNA2 和 RNA3 居多。本研究建立了在一个 PCR 反应中同时高效率的扩增 CMV 的基因组 RNA1-3 的方法, 解决了 CMV 其它株系全长基因克隆技术障碍。

目前体外条件下将 DNA 转录成 RNA 分子, 其策略绝大部分是在目的基因片段的 5' 或 3' 端添加 T7/Sp6/T3 启动子序列, 本研究是分别将 CMV 的基因组 RNA1-3 置于 T7 启动子的下游。在进行转录反应时, 在该启动子的下游连续带 3 个 GGG 转录效率最高^[24,25]; CMV-Phy 基因组 cDNA 克隆体外转录时, 分析在 T7 启动子下游与 RNA3 的 5' 端之间添加 1 个或 2 个 G (CMV 基因组的 5' 端第一个碱基为 G), 其转录效率为 pUC-R3+GG > pUC-R3+G > pUC-R3。尽管 CMV 基因组的 5' 端添加 G 有利于提高体外转录效率从而使得相同量的模板获得更多的 RNA 分子, P1P2P3 的侵染力反而降低(表 2)。mRNA 分子的 5' 端具有一个帽子结构, 该结构有利于 mRNA 翻译成蛋白并且减少 mRNA 降解。本研究发现, 在无帽子类似物存在下, CMV-Phy 基因组 cDNA 克隆的转录产物几乎没有侵染活性(表 2), 这可能是由于转录产物在进入寄主体内后, 因其不能进行翻译或者是翻译效率低而导致病毒不能复制而造成。因此本研究在 CMV-Phy 侵染性克隆构建过程中分别在 T7 启动子下游与各个基因的 5' 端之间添加 1 个 G 和以及体外转录过程反应时添加帽子类似物, 获得转录产量较高并且侵染力强的 RNA 分子。本研究在获得具有侵染活性的 CMV-Phy 的 cDNA 克隆时(图 5 和表 2), 并分析了 CMV-Phy 与卫星 RNA 的假重组, 结果表明 CMV-Phy 均能作为除了自身 Pz-satRNA 外辅助病毒, 同样支持其它 3 个 CMV-satRNA 在心叶烟中高含量积累(图 6), 这进一步的证实 CMV-Phy 的侵染性克隆具有活性。

4 结论

本研究结果表明以 CMV 的病毒粒子 RNA 作为模板进行 RT-PCR 扩增; 采用 touch-up 的 PCR 循环参数, 可在同一 PCR 反应管中同时获得其基因 RNA1、RNA2 和 RNA3; HB101 感受态细胞比较适合 CMV 的基因克隆转化; 体外转录过程中, 基因组 5' 端添加 G 或加

帽子类似物提高体外转录产物侵染活性。

References

- [1] 杨永林, 闫淑珍, 田茹燕, 冯兰香, 梁训生, 王志源. 中国六省、市辣(甜)椒病毒病种群及其分布的研究. 中国病毒学, 1995, 10: 332-339.
Yang Y L, Yan S Z, Tian R Y, Feng L X, Liang X S, Wang Z Y. A report on the research of virus populations on pepper (*Capsicum frutescens* L.) and their distribution in six provinces or cities of China. *Virologica Sinica*, 1995, 10: 332-339. (in Chinese)
- [2] 林清, 吕中华, 黄任重, 黄启中, 雷蕾, 史思茹. 重庆市辣椒 TMV 和 CMV 的鉴定. 中国蔬菜, 2001, (2): 13-15.
Lin Q, Lü Z H, Huang R Z, Huang Q Z, Lei L, Shi S R. Identification of TMV and CMV in pepper in Chongqing area. *China Vegetables*, 2001, (2): 13-15. (in Chinese)
- [3] 柴伟国, 朱丽萍, 陈集双. 杭州地区辣椒病毒病原分子鉴定. 上海蔬菜, 2006, (5): 78-80.
Chai W G, Zhu L P, Chen J S. Molecular identification of pepper pathogen in Hangzhou area. *Shanghai Vegetables*, 2006, (5): 78-80. (in Chinese)
- [4] 饶雪琴, 蓝翠钰. 广州市郊及其邻近地区辣椒 CMV 和 TMV 的鉴定. 江西农业大学学报(自然科学版), 2003, 4: 558-561.
Rao X Q, Lan C Y. Identification of CMV and TMV in pepper in the suburbs of Guangzhou and its adjacent areas. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis (Natural Sciences)*, 2003, 4: 558-561. (in Chinese)
- [5] 吉训聪, 王健华, 王运勤, 肖敏, 罗革彬. 海南黄灯笼辣椒种传病毒的初步鉴定. 海南大学学报(自然科学版), 2006, 24: 284-288.
Ji X C, Wang J H, Wang Y Q, Xiao M, Luo G B. Primary identification of seed-borne virus species of *Capsicum chinense* Jacq in Hainan. *Natural Sciences Journal of Hainan University (Natural Sciences)*, 2006, 24: 284-288. (in Chinese)
- [6] Palukaitis P, Garciaarenal F G. *Cucumoviruses*. *Advances of Virus Research*, 2003, 62: 241-323.
- [7] 徐平东, 周仲驹, 林奇英, 谢联辉. 黄瓜花叶病毒亚组 I 和 II 分离物外壳蛋白基因的序列分析与比较. 病毒学报, 1996, 15: 164-171.
Xu P D, Zhou Z J, Lin Q Y, Xie L H. Coat protein gene sequence analysis and comparison of *Cucumber mosaic virus* subgroup I and II isolates in China. *Chinese Journal of Virology*, 1996, 15: 164-171. (in Chinese)
- [8] 晏立英, 许泽永, 陈坤荣. 侵染花生的黄瓜花叶病毒 CA 株核酸全序列分析. 中国病毒学, 2005, 20: 315-319.
Yan L Y, Xu Z Y, Chen K R. Full sequence analyses of genomic RNAs

- of cucumber mosaic virus CA strain infecting peanut in China. *Virological Sinica*, 2005, 20: 315-319. (in Chinese)
- [9] Gallitelli D. The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. *Virus Research*, 2000, 71: 9-21.
- [10] 冯兰香, 张宝玺, 谢丙炎, 王立浩, 杨宇红, 毛胜利. 3种辣椒新病毒的发生与血清学鉴定. *中国蔬菜*, 2005, (12): 33-34.
Feng L X, Zhang B X, Xie B Y, Wang L H, Yang Y H, Mao S L. Occurrence of 3 new viruses from *Capsicum frutescens* and their serological identification. *China Vegetables*, 2005, (12): 33-34. (in Chinese)
- [11] 何 红, 伍 宏. 粤西地区冬季辣椒病毒病发生与防治. *植物保护*, 2001, (2): 22-23.
He H, Wu H. Pepper virus disease and control in west part of Guangdong province. *Plant Protection*, 2001, (2): 22-23. (in Chinese)
- [12] 赵尊练, 严小良. 中国线辣椒产业发展的思路与对策. *中国农学通报*, 2003, 19: 176-179.
Zhao Z L, Yan X L. The developing strategy and countermeasure of line pepper industry in China. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2003, 19: 176-179. (in Chinese)
- [13] 陈 丽, 樊民周, 卫军锋, 安德荣, 全 鑫. 陕西辣椒病毒病的毒原鉴定及化学防治药剂筛选. *西北农林大学(自然科学版)*, 2007, 35: 121-126.
Chen L, Fan M Z, Wei J F, An D R, Quan X. Virus identification and screening virusicides of pepper virus disease in Shaanxi province. *Journal of Northwest Agricultural and Forestry University (Natural Sciences)*, 2007, 35: 121-126. (in Chinese)
- [14] 徐秉良, 商鸿生, 王 旭. 双抗转 CP 基因线辣椒对非克隆病毒的抗病性. *兰州大学学报(自然科学版)*, 2002, 38: 95-100.
Xu B L, Shang H S, Wang X. Protection of transgenic chili pepper expressing cmv and tmv coat proteins gene against unrelated cmv strains and viruses. *Journal of Lanzhou University (Natural Sciences)*, 2002, 38: 95-100. (in Chinese)
- [15] 李华平, 胡晋生, 王 敏, 范怀忠. 黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因转化辣椒研究. *病毒学报*, 2000, 16: 276-278.
Li H P, Hu J S, Wang M, Fan H Z. Studies on transgenic pepper plants transferred with the coat protein gene of *Cucumber mosaic virus*. *Chinese Journal of Virology*, 2000, 16: 276-278. (in Chinese)
- [16] Grube R C, Zhang Y P, Murphy J F, Loaiza F, Fernando L, Provvidenti V K, Rosario J, Molly K. New source of resistance to *Cucumber mosaic virus* in *Capsicum frutescens*. *Plant Disease*, 2002, 84: 885-891.
- [17] Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C. Q β DNA2 containing hybrid plasmids giving rise to Q β phage formation in the bacterial host. *Nature*, 1978, 274: 223-228.
- [18] Ahlquist P, French R, Janda M, Loesch-Fries L S. Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, 81: 7066-7070.
- [19] Rizzo T M, Palukaitis P. Construction of full-length cDNA clones of *Cucumber mosaic virus* RNAs 1, 2 and 3: generation of infectious RNA transcripts. *Molecular and General Genetics*, 1990, 222: 249-256.
- [20] 薛朝阳, 周雪平, 陈 青, 戚益军, 曹海峰, 李德葆. 一种病毒侵染性全长 cDNA 克隆的快速构建方法. *生物化学与生物物理学报*, 2000, 32: 270-274.
Xue C Y, Zhou X P, Chen Q, Qi Y J, Cao H F, Li D B. Rapid construction of full length cDNA clones of *Tobacco mosaic virus* and the infectivity assay of its *in vitro* transcript. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2000, 32: 270-274. (in Chinese)
- [21] 杨 恭, 刘相国, 邱并生. 烟草花叶病毒及番茄花叶病毒弱毒疫苗 N14 基因组重组体的构建与侵染性的分析. *科学通报*, 2000, 45: 735-740.
Yang G, Liu X G, Qiu B S. Construction of TMV or ToMV attenuated bacteria genomic recombinants and their infectivity assay. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45: 735-740. (in Chinese)
- [22] 陈集双. 黄瓜花叶病毒及其卫星 RNA 的分子生态学研究. 浙江大学博士论文, 2002.
Chen J S. Studies on molecular ecology of *cucumber mosaic virus* and its satellite RNA. Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2002. (in Chinese)
- [23] 萨姆布鲁克, 弗里奈. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南(第 3 版). 北京: 科学出版社, 2001.
Sambrook J, Russell D W. Translated by Jin D Y, Li M F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001. (in Chinese)
- [24] Davanloo P, Rosenberg A H, Dunn J J, Studier F W. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, 81: 2035-2039.
- [25] Reutimann H, Sjoberg B M, Holmgren A. Bacteriophage T7 DNA polymerase: cloning and high-level expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82: 6783-6787.