

黄瓜花叶病毒坏死型卫星 RNA 的 cDNA 克隆和全序列分析

程宁辉* 潘祖芹 方中达

(南京农业大学植保系, 南京 210095)

方荣祥 **

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 从田间发生坏死病害的番茄病株中分离得到黄瓜花叶病毒 TN 分离物, 经研究证实 TN 分离物带有 1 株坏死型卫星 RNA(TN-SatRNA)。利用已知 CMV 卫星 RNA 的两端序列作引物扩增并克隆了 TN-SatRNA 的 cDNA。序列分析显示 TN-SatRNA 全长为 390 个核苷酸。比较 TN-SatRNA 与富有代表性的 CMV 卫星 RNA 的结构表明, 这几种卫星 RNA 中具有 4 个结构同源区(I: 1~81nt, II: 216~261 nt, III: 278~338 nt; IV: 349~390 nt), 而在 82~215 nt 的区域几种卫星 RNA 的结构变化较大。在 TN-SatRNA 的 3' 端具有已报道的坏死型卫星 RNA 特征性序列结构。经 3'RACE 方法确定 TN-SatRNA 的 3' 端自然序列, 与 PCR 扩增引物有 1 个核苷酸的差别。

关键词 黄瓜花叶病毒 卫星 RNA cDNA 克隆 序列分析

黄瓜花叶病毒卫星 RNA 是 70 年代后期在研究番茄坏死病时发现的^[1]。至今已报道的 CMV 卫星 RNA 不下 25 种, 其中 25 种已进行全序列分析^[2]。黄瓜花叶病毒的卫星 RNA 是一类不能自身复制, 必须依赖辅助病毒完成复制过程, 包裹于辅助病毒颗粒中, 与辅助病毒核苷酸同源性极低的小分子 RNA^[3]。已有的研究表明, CMV 携带的卫星 RNA 因其结构不同对辅助病毒侵染寄主症状的调节作用也不同^[2]。一类可以减轻辅助病毒对寄主的危害, 起致弱作用。1993 年我国报道了在南方香蕉上分离的 CMV 携带有卫星 RNA, 测定结构及分析生物学功能表明, 这株卫星 RNA 属致弱类型^[4]。另一类是加重辅助病毒对寄主的危害, 引起番茄坏死病的 CMV 卫星 RNA 就是这一类中的一种^[5]。因为携带坏死型卫星 RNA 的 CMV 引起番茄坏死病可以造成十分严重的损失^[6], 目前, 对这一类的卫星 RNA 的研究日益受到重视。作者于 1991 年秋在田间坏死番茄上分离得到黄瓜花叶病毒 TN 分离物, 并证实 TN 分离物也带有 1 株卫星 RNA^[7]。这是国内首次报道这一类卫星 RNA。本文对这株卫星 RNA 进行了 cDNA 克隆和全序列分析研究, 并比较了不同卫星 RNA 的结构和功能区别。

1996-01-24 收稿, 1996-03-16 收修改稿

* 现在地址: 复旦大学遗传研究所, 上海 200433

** 联系人

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒材料 病毒材料是本研究室从田间坏死番茄植株上采集病毒标本, 经分离、纯化和鉴定, 得到带卫星 RNA 的 TN 分离物, 繁殖于三生烟上备用。

1.1.2 寡核苷酸引物 参照已发表的 CMV 卫星 RNA 两端保守序列设计了 5' 和 3' 端 2 个寡核苷酸引物。3' 端引物 (primer 1): 5'-GACCCGGGTCCCTGTAGAGGAA-3' 和 5' 端引物 (primer 2): 5'-CCAAGCTTAATACGACTCACTATAGTTTGTGATGGAG-3'。引物由中国科学院微生物研究所技术中心合成。

1.1.3 试剂 DNA 限制性内切酶购自 Boehringer 公司。cDNA 合成试剂盒, T4 DNA 连接酶是 Promega 公司产品。RNA poly (A) 聚合酶购自 Pharmacia 公司。Sequenase Version 2.0 试剂盒购自 USB 公司。同位素 α -³⁵S-dATP, α -³²P-dATP 为 NEN 公司产品。dT₁₇-BamH I 接头引物 (BT17) 5'-GCGGATCCTTTTTTTTTTT-3', 由中国科学院植物生物技术开放实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 病毒核酸组分分析和卫星 RNA 的分离 病毒的提纯和病毒核酸的提取参照文献 [7] 进行。提取的核酸在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳分析核酸组分, 切下卫星 RNA 组分, 再次用 1.5% 的琼脂糖凝胶分离纯化, 回收卫星 RNA 组分。

1.2.2 cDNA 克隆和重组质粒筛选 cDNA 合成反应体系为 20 μ L, 反应条件: 5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100, 1 mmol/L dNTPs, 0.5 U RNase Inhibitor, 10 pmol 引物 1, 1 μ g 卫星 RNA, 15 U AMV RTase, 42℃ 1 h, 52℃ 0.5 h。

PCR 反应总体积 30 μ L: 3 μ L 10 × amplification buffer, 3 μ L, 10 × dNTPs (2 mmol/L, primer1 和 primer2 各 3 μ L (10 pmol), 2 μ L 第 1 链 cDNA 产物, 15.5 μ L ddw, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L (5U/ μ L)。PCR 扩增分二步法: 前 5 个循环为 94℃ 变性 40 s, 40℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 60 s; 后 30 个循环为 94℃ 变性 60 s, 55℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 90 s, 最后 72℃ 延伸 10 min, 扩增完毕, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 酚抽提, 乙醇沉淀回收 PCR 产物。

载体 pUC19 和 PCR 产物经 Hind III 和 Sma I 双酶切后, 在连接反应体系中经 T4 DNA 连接酶在 16℃ 下连接 9 h, 连接产物经电激法转化感受态细胞 (XL1-blue), 后涂于含 X-gal, IPTG 和 Ap 的固体 LB 平板上, 37℃ 培养 12 h, 挑白色菌落, 煮沸法制备质粒, 酶切及 PCR 检测, 筛选重组克隆。

1.2.3 RACE 法扩增 cDNA 3' 端序列 为获得 SatRNA 3' 端真实序列, 利用 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法扩增 cDNA 3' 端序列, 方法略加改进^[8]。卫星 RNA 加 poly (A) 尾: 反应条件为 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.9, 10 mmol/L MgCl₂, 2.5 mmol/L MnCl₂, 250 mmol/L NaCl, BSA 2.5 μ g, 250 nmol/L ATP, 20U RNase Inhibitor, 1 μ g 卫星 RNA, 2 U poly(A) 聚合酶, 37℃ 10 min。cDNA 合成和 PCR 扩增引物为 BT17 和引物 2, 反应条件及 PCR 程序同方法 1.2.2。PCR 产物和载体 pSK 经 Hind III 和 BamH I 双酶切后, 连接, 转化及重组质粒筛选同方法 1.2.2。

1.2.4 核苷酸序列分析 用双链质粒 DNA 模板进行序列测定, 方法按 Sequenase Version

2.0 试剂盒说明进行。测定的卫星 RNA 的 cDNA 序列输入计算机中, 进行数据处理。

2 结果与讨论

2.1 病毒分离物核酸组分分析

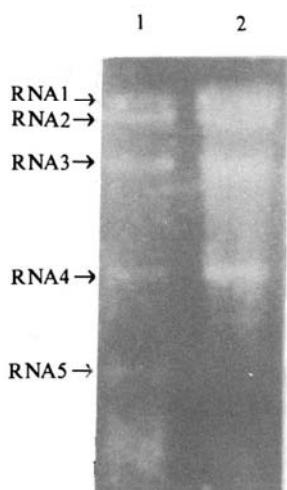


图 1 TN 分离物与普通 CMV 分离物核酸组分比较

1 为 TN 分离物, 2 为普通分离物
1991 年春起, 我们陆续在江苏的南京、南通、苏州以及上海等地发现由黄瓜花叶病毒引起的番茄坏死病害。从田间坏死番茄植株上分离的 CMV TN 分离物在茄科寄主上产生坏死症状, 与常见 CMV 株系不同, 但在血清学反应和外壳蛋白分子量上均与常见 CMV 株系一致^[7]。在 1% 琼脂糖凝胶上电泳分析病毒核酸组分, 结果表明, TN 分离物核酸除病毒基因组外还有第 5 个组分(卫星 RNA), 其中病毒基因组组成和大小与常见 CMV 株系一致(图 1), 这说明 TN 分离物带有卫星 RNA(定名为 TN-SatRNA)。我们利用电泳分离回收的卫星 RNA 和其他 CMV 分离物混合接种番茄植株也产生了典型的急性坏死症状(结果未显示)。

2.2 卫星 RNA 的 cDNA 克隆和序列分析

参照已发表的 CMV 卫星 RNA 序列, 人工合成 3' 和 5' 端序列作为 cDNA 合成和 PCR 扩增的引物。根据已有的研究表明, CMV 卫星 RNA 5' 端多余的核苷酸影响其复制和降低在寄主中的侵染力^[9], 因此, 我们在构建 TN-SatRNA 的 cDNA 克隆时, 在 5' 端引物中人为加上一个 T7RNA 聚合酶启动子, 在 3' 端引物中引入 SmaI 位点。由此构建的 cDNA 克隆在体外转录时将得到 3' 和 5' 端均与自然状态的 TN-SatRNA 完全一样的转录体, 利用这种转录体可以进一步研究其结构、功能以及同辅助病毒和寄主的相互作用。

我们以提纯的卫星 RNA 为模板, 逆转录合成 cDNA 第 1 链, 再以此为模板, PCR 扩增获得 1 条大小约 0.4 kb 的特异带(图 2)。经酚抽提, 乙醇沉淀, 回收得到双链 cDNA。PCR 扩增获得的双链 cDNA 和载体 pUC19 分别用 HindⅢ, SmaI 双酶切后相连接。连接体系转化 *E. coli* 的 XL1-blue, 挑白色菌落, 制备质粒, 经酶切分析和 PCR 检测, 筛选得到有卫星 RNA 的 cDNA 插入的重组质粒(定名为 pUCT)。

选用 3 个重组质粒进行 DNA 序列分析, 核苷酸序列测定表明 TN-SatRNA 全长序列为 390 个核苷酸(图 3)。从核苷酸序列推知, 它含有 3 个 ORFs, 分别编码由 20, 14, 15 个氨基酸组成的多肽。全序列经 DNAsis 软件处理表明: TN-SatRNA 同几种代表性 CMV 卫星 RNA 的序列同源性达 70% 以上, 其中 3' 端和 5' 端序列同源性更高(图 3)。

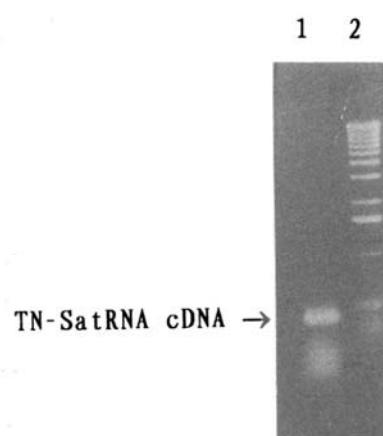


图 2 PCR 扩增 TN-SatRNA 的 cDNA

1 为 TN-SatRNA 的 cDNA,
2 为核酸分子量标准

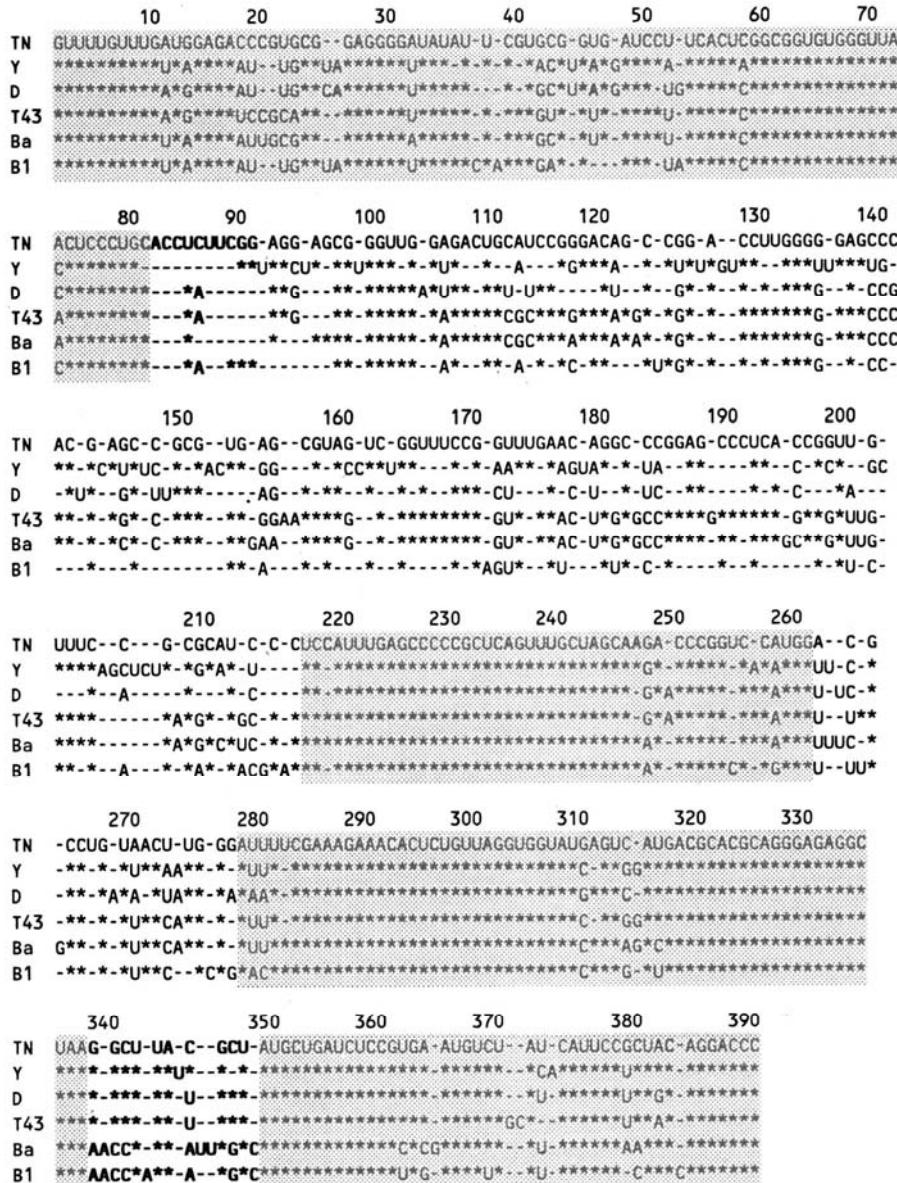


图 3 6 种 CMV 卫星 RNA 的结构比较

TN, Y^[10], D^[11] 和 T₄₃^[12] 为番茄坏死型卫星 RNA; Ba^[4], B1^[13] 为番茄非坏死型卫星 RNA.

- 表示缺失, * 表示一致, 阴影表示同源区

2.3 TN-SatRNA 3' 端序列的测定

为了获得 TN-SatRNA 3' 端序列, 在 poly(A) 聚合酶作用下, TN-SatRNA 3' 端加上 poly(A) 尾, 以 BT17 为逆转录引物, 合成 cDNA 第 1 链, 经 PCR 扩增, 获得 1 条大小约 0.4 kb 的特异带。载体 pSK 和 PCR 产物分别经 Hind III, BamH I 双酶切后连接, 连接产物转化受体细菌 (XL1-blue), 挑选白色菌落, 制备质粒, 经酶切分析和 PCR 检测得到重组克隆 pSKT3. 用双链质粒 DNA 作模板进行 DNA 序列分析, 得到 cDNA 3' 端序列, 同人为的 PCR 3' 端引物比较发

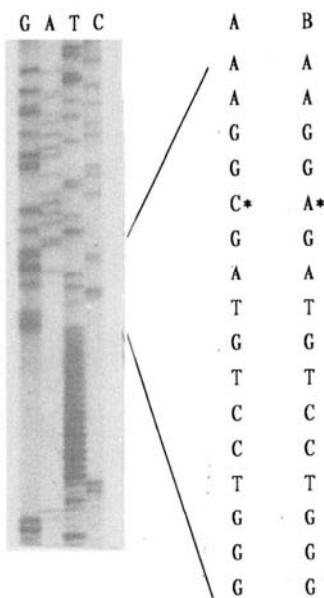


图 4 TN-SatRNA 3' 端序列和
PCR 引物 1 的比较
A 为 TN-SatRNA, B 为 PCR 引物 1

现, TN-SatRNA 的 cDNA 3' 端自然序列与 PCR 引物序列仅有 1 个核苷酸的差别, 即距 3' 端 12 位的 U 应为 G (图 4), 这样就得到了完整的 TN-SatRNA 3' 端序列(图 3)。

2.4 卫星 RNA 的结构及功能的分析

核苷酸序列分析表明 TN-SatRNA 由 390 nt 组成, 这在已发表的 CMV 卫星 RNA 之中属于较大的一种。分析已报道的 CMV 卫星 RNA 发现, 卫星 RNA 的大小似乎与其来源有关。欧美等地报道的 CMV 卫星 RNA 大小在 333~342 nt 之间^[3], 而亚洲地区报道的 CMV 卫星 RNA 一般偏大, 如日本先后报道了由 368, 369, 370, 384, 386 nt 组成的较大 CMV 卫星 RNA^[12], 最近 Hidaka 又报道在番茄上产生坏死症状的由 405 nt 组成的卫星 RNA^[5]。在我国已报道的香蕉上分离的 CMV 卫星 RNA 也由 390 nt 组成^[4]。现在还不清楚出现这种现象的原因。在 CYMV(Chickory yellow mottle nepovirus)的卫星 RNA 中就存在着两类大小不同的卫星 RNA, 其核苷酸组成不同, 对寄主症状的调节作用

也不同。在 CMV 卫星 RNA 类群中是否也存在着大小两种类型呢? 目前还不清楚。但在 CMV 卫星 RNA 众多的株系中存在着分化现象。这种分化主要表现在 CMV 卫星 RNA 对辅助病毒依赖的专化性和对寄主症状表达的调节作用不同。例如 B2-SatRNA 同属于 Subgroup II 的 CMV 株系共同侵染烟草, 可以产生系统退绿, 而与属于 Subgroup I 的 CMV 株系共同侵染则没有这种作用^[14]。卫星 RNA 与辅助病毒之间的专化性识别是通过什么途径? Sleat 等提出了一种假说, 在卫星 RNA 中存在着供体, 而辅助病毒中存在着受体, 两者通过供体和受体的作用来实现专化性识别^[14]。但目前还没有证据证实这种假说。

比较 TN-SatRNA 同其它几种 CMV 卫星 RNA 核苷酸序列发现, 在 TN-SatRNA 序列的 81~91 nt(以 TN-SatRNA 序列为基准计算核苷酸数目)有一个 10 nt 插入(图 3), 这个插入片段的作用还不清楚。在 CMV 卫星 RNA 序列中存在着 4 个保守区, 第 1 个保守区位于 1~81 nt, 第 2 个保守区位于 216~261 nt, 第 3, 4 个保守区分别在 278~338 nt, 349~390 nt。这些区域具有很高的核苷酸序列同源性。在 92~215 nt, 339~348 nt 2 个区域, 核苷酸序列同源性较低。Hidaka 等在比较 KN-SatRNA 和 Y, D 卫星 RNA 序列同源性后, 划分出 3 个同源保守区(1~80 nt, 116~177 nt 和 213~405 nt)和 2 个插入片段, 并认为插入片段与坏死症状的产生无关^[5]。Palukaitis 等指出, CMV 卫星 RNA 引起番茄坏死的功能区位于卫星 RNA 的 3' 端, 其中 3' 端的 339~367 nt 之间的核苷酸结构与坏死直接相关^[15]。进一步比较 TN-SatRNA 与其它 5 种 CMV 卫星 RNA 在 339~367 nt 核苷酸序列发现, 在 339~348 nt 之间的区域, 坏死型卫星 RNA(TN, Y, D, T43)和非坏死型卫星 RNA(Ba, B1)存在着有规律差异。坏死型 SatRNA 在 339~341 nt 为 G-GC, 而非坏死型 SatRNA 为 AAC, 在 347 nt 处坏死型 SatRNA 为 C, 而非坏死型 SatRNA 为 G。同时在 348 与 349 nt 之间非坏死型 SatRNA 有 1 个 C 的

插入。这些位点核苷酸的差别可能将决定 CMV SatRNA 的功能^[15]。

二级结构分析表明, TN-SatRNA 有 55.9% 的核苷酸参入碱基配对, 因此 TN-SatRNA 可以具有稳定的二级结构, 并且与致弱卫星 RNA 的二级结构不同(结果未显示)。对已报道的完成全序列测定的 25 个 CMV 卫星 RNA 结构分析表明, 在所有引起寄主症状加重的卫星 RNA 中均存在着类似 t-RNA 结构(结果未显示), 而其它卫星 RNA 则没有这一结构。t-RNA 类似结构类型和所处的位置在各卫星 RNA 中不同。TN-SatRNA 和 Ba-SatRNA 均由 390 nt 组成, 也是在我国发现的致弱和致死两种类型卫星 RNA。在 TN-SatRNA 有 t-RNA 类似结构, 而 Ba-SatRNA 则没有。比较两者在 t-RNA 类似结构形成区域(113~181 nt)的序列, 仅有 10 nt 的差异。目前还不清楚 t-RNA 类似结构在卫星 RNA 的功能表达中是否起作用。

参 考 文 献

- 1 Kaper J M, Waterworth H E. Cucumber mosaic virus associated RNAs: causal agent for tomato necrosis. *Science*, 1977, 196: 429~431
- 2 Roossinck M J, Sleat J, Palukaitis P. Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. *Microbiological Reviews*, 1992, 56: 265~279
- 3 Francki R I B. Plant virus satellites. *Ann Rev Microbiol*, 1985, 39: 151~174
- 4 叶 實, 魏征宇, 赵 丰, 等。一株新黄瓜花叶病毒卫星 RNA 结构和生物学分析。中国科学, B 撤, 1993, 23 (8): 821~826
- 5 Hidaka S, Hanada K. Structural features unique to 405 nucleotide satellite RNA of cucumber mosaic virus inducing tomato necrosis. *Virology*, 1994, 200: 806~808
- 6 Jordà C, Alfaro A, Aranda M A, et al. Epidemic of cucumber mosaic virus plus satellite RNA in tomatoes in eastern Spain. *Plant Dis*, 1992, 76: 363~366
- 7 程宁辉, 潘祖芹, 方中达。引起番茄坏死病的黄瓜花叶病毒 TN 分离物的研究。中国病毒学, 1994, 9 (2): 143~150
- 8 Froehman M A. RACE: rapid amplification of cDNA ends. In: PCR protocols: A Guide to Methods and Applications. NY: Academic Press Inc, 1990. 28~37
- 9 Masuta C, Kuwata S, Takanami V. Effects of extra 5' non viral bases on the infectivity of transcripts from a cDNA clone of satellite RNA(strain Y) of cucumber mosaic virus. *J Biochem*, 1988, 104: 841~846
- 10 Hidaka S, Ishikawa K, Takanami Y, et al. Complete nucleotide sequence of RNAs from cucumber mosaic virus (strain Y). *FEBS Lett*, 1984, 174: 38~42
- 11 Richards K E, Jonard G, Jacquemond M, et al. Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus associated RNA5. *Virology*, 1978, 89: 395~408
- 12 Masuta C, Hayashi V, Wang WO, et al. Comparison of four satellite RNA isolates of cucumber mosaic virus. *Ann Phytopath Soc Japan*, 1990, 56: 207~212
- 13 Garcia-Arenal F, Zaitlin M, Palukaitis P. Nucleotide sequence analysis of six satellite RNAs associated with cucumber mosaic virus: primary sequence and secondary structure alteration do not correlate with differences in pathogenicity. *Virology*, 1987, 158: 339~347
- 14 Sleat D, Paluhaitis P. Induction of tobacco chlorosis by certain cucumber mosaic virus satellite RNAs is specific to subgroup II helper strains. *Virology*, 1990, 176: 292~295
- 15 Palukaitis P, Roossinck M J, Shintaku M H, et al. Mapping functional domains in cucumber mosaic virus and its satellite RNAs. *Can J Plant Pathology*, 1991, 13: 155~162