

系统感染寄主中黄瓜花叶病毒 及其卫星 RNA 的动态变化*

陈集双** 柴立红 吴 平

(浙江大学生命科学院, 杭州 310029)

摘要 以³²P 标记的黄瓜花叶病毒 (CMV) RNA3 cDNA 片段和卫星 RNA 全长 cDNA 作为探针, 定量测定 CMV 基因组 RNA 和卫星 RNA 的含量变化, 结果显示: 二者均具有明显的寄主效应和时间效应。在 16~20℃ 条件下, 接种不携带卫星 RNA 的分离物 CMV-R3, 15 天、30 天和 75 天时, CMV 基因组 RNA 负荷量呈显著下降的趋势。在第 15 天, RNA3 的负荷量以烟草> 心叶烟> 克里夫兰烟> 番茄的顺序表现为不同寄主的显著性差异。相同条件下接种携带高拷贝卫星 RNA 的分离物 CMV-RS, 在 5 天和 15 天之间基因组 RNA 和卫星 RNA 负荷量均呈现上升的趋势, 同时测得其基因组 RNA 和卫星的负荷量具有相似的寄主效应和时间效应, 但程度不同。第 15 天时, 二者负荷量以烟草> 心叶烟> 番茄的顺序表现寄主效应的显著性差异。在 18~21℃ 条件下, 接种携带坏死卫星 RNA 的 CMV 强毒株 HC4, 第 5 天、第 10 天和第 15 天时, 基因组 RNA 和卫星 RNA 的负荷量均以番茄> 心叶烟> 烟草的顺序表现出显著性差异, 并表现出明显的时间效应。不同来源 CMV 分离物还存在寄主选择性差异。

关键词 黄瓜花叶病毒, 卫星 RNA, 负荷量, 寄主效应, 时间效应

学科分类号 Q785

植物单链 RNA 病毒往往表现高拷贝、快速复制和高突变率的特点^[1]。黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 是典型的 3 分体单链 RNA 病毒, 该病毒在茄科等多种植物组织中表现系统感染, 是典型的高拷贝快速复制的植物病毒^[2,3]。

CMV 卫星 RNA (satRNA) 是病毒基因组以外的遗传因子, 通常干扰辅助病毒的复制并降低其致病性^[4], 有一些卫星 RNA 则不明显影响辅助病毒的致病作用^[5], 另一些 satRNA 还导致寄主产生坏死症状, 称之为“坏死卫星”^[6]。植物病毒在寄主中的含量变化表现为明显的时间效应。但是, 关于 RNA 病毒在不同寄主之间负荷量变化规律的研究, 以及病毒和卫星 RNA 等亚病毒因子互作的定量分析模型和研究方法, 至今鲜见^[4,6,7]。因此, 定量检测在接种条件下 CMV 基因组和卫星 RNA 负荷量的动态变化, 了解二者在该系统中对时间和寄主反应的程度, 将为进一步研究卫星 RNA 与辅助病毒互作的分子机制提供量化依据。

1 材料与方法

1.1 病毒毒原

所采用的病毒分离物均为本实验室分离或保存^[5,6], CMV-R3: 分离自萝卜, 不携带卫星 RNA; CMV-RS: 分离自萝卜, 携带一个 368 nt 的卫星

RNA; HC4: 分离自番茄, 携带一个“坏死”卫星 RNA; HC3: 分离自番茄, 不携带卫星 RNA。

1.2 cDNA 克隆

用于制备 CMV 基因组探针的 cDNA 克隆为 CMV RS 的 RNA3 全序列克隆 (pUC19 重组质粒); 卫星 RNA 的 cDNA 克隆为 CMV-RS 卫星 RNA 的全序列克隆 (pUC19 重组质粒)。

1.3 病毒接种

供试病毒分离物在接种前 7 天, 分别在心叶烟 (*Nicotiana glutinosa*) 上转接, 以获得高感染力的毒源。实验植物分别为: 克里夫兰烟 (*N. clevelandii*)、烟草 (*N. tabacum*)、番茄 (*Lycopersicon esculenta*)、假酸浆 (*Nicandra physalodes*)。

在防虫、控温、控光条件下, 培养长势、大小基本一致的指示植物, 每处理培养 6 盆 (2 株/盆, 控温 16~20℃ 和 18~21℃, 光照 12L: 12D); 采用常规汁液摩擦方法接种病毒。

1.4 DNA 模板的制备

1.4.1 试剂和试剂盒: 5'-α-³²P 标记的 dCTP (放射性浓度为 3.7 × 10¹¹ Bq/L) 购自北京亚辉生物医

* 国家自然科学基金资助项目 (30270744)。

** 通讯联系人。

Tel: 0571-86971586, E-mail: mmlab@zju.edu.cn

收稿日期: 2002-10-14, 接受日期: 2002-11-28

学工程公司; 探针合成试剂盒和 PCR 试剂盒等购自宝生物工程 (大连) 有限公司.

1.4.2 DNA 探针模板的制备

CMV RNA3 探针 cDNA (亚基因组启动子区) PCR 引物序列如下: RNA3 F6, 665 ~ 684 5'-TGTGTAGTAATTGGCAAGCA-3'; RNA3 R3, 1370 ~ 1389 5'-GCTGCGACAAGACTCTAAAG-3'. 以质粒 DNA 为模板, PCR 扩增获得 CMV 亚基因组启动子区 cDNA 片段 (约 600 bp). CMV 卫星 RNA 探针 cDNA (全长卫星 RNA) PCR 扩增引物序列如下: SatF, 5' CCTCTAGAGGCCTGTTTT-GTTTGTGGAG 3'; SatR, 5' TTGAGCTCCCGG-TCCTGTAGAGGAAT 3'.

以质粒 DNA 为模板, PCR 扩增获得 CMV 卫星 RNA 全序列 cDNA 片段 (约 390 bp).

回收纯化的探针模板, 于 -20℃ 保存^[8].

1.5 病毒侵染植株中总 RNA 的提取

每个样品采取 0.2 g 新鲜叶片组织, 采用 Trizol 试剂方法提取总 RNA^[8].

1.6 RNA 样品的变性和点样

在 40 μl RNA 提取物中加入 100% 甲酰胺 80 μl、37% 甲醛 28 μl 和 20×SSC 8 μl, 混合液于 68℃ 水浴 15 min, 迅速置于冰上. 加入等体积的 20×SSC, 作为杂交样品.

用点样器将变性的 RNA 样品加到尼龙膜上, 每次点样 5 μl, 重复点样 5 次. 每处理设置 3 个重复. 尼龙膜于 80℃ 干燥 1.5 h^[8].

1.7 杂交反应

预杂交、杂交反应和洗膜条件参照常规³²P 标记核酸斑点杂交 (NASH) 方法^[9].

1.8 放射性活度测定

用检测放射性强度的 FUJIFILM BAS-1800 激光荧光屏分析仪, 于暗盒内将磷屏感光尼龙膜 2~5 h, 扫描读取感光屏上的所成图像、测定反映放射性活度的数字信号 PSL 值^[8].

1.9 数据处理

杂交膜上各斑点的曝光度 (PSL 值) 对应于各处理的靶 RNA 的相对浓度, 采用 DPS 分析软件对不同处理组织中的 CMV 基因组 RNA 或卫星 RNA 的负荷量进行方差分析和差异显著性分析^[8].

2 结果与讨论

2.1 CMV-R3 的基因组含量变化

不携带卫星 RNA 的 CMV 十字花科分离物

R3, 在 16~20℃ 条件下接种 4 种常见寄主 15~75 天, 通过定量提取 0.2 g 鲜叶组织中的总 RNA, 用 RNA3 探针进行点杂交, 用激光荧光屏分析仪测定相应的 RNA 杂交结果 (以放射性活度表示), 分析病毒基因组 RNA 含量变化趋势的结果见图 1 和图 2.

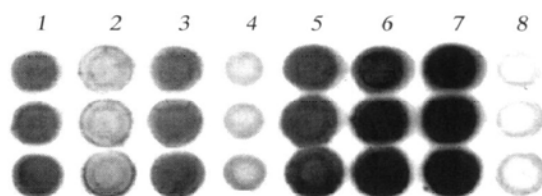


Fig. 1 Dot hybridization of CMV-R3 genomic RNA (RNA3)
1, 5: *N. clelandii* 30 days, 15 days respectively; 2, 4, 6: *N. glutinosa* 30 days, 75 days, 15 days; 3, 7: *N. tobacum* 30 days, 15 days; 8: tomato 15 days.

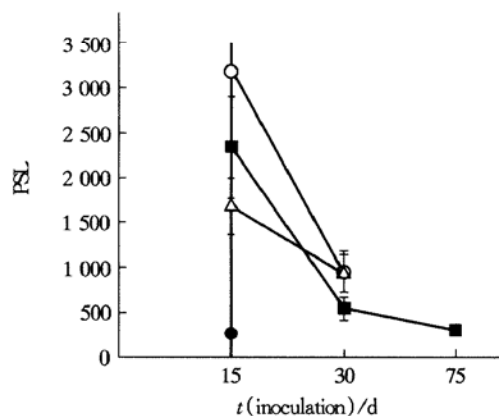


Fig. 2 Variation trend of CMV-R3 genomic RNA (RNA3)
△: *N. clelandii*; ○: *N. tobacum*; ■: *N. glutinosa*; ●: tomato.

CMV-R3 基因组的含量变化在 4 种供试寄主上具有显著的寄主效应: 接种第 15 天, RNA3 的含量在每两两寄主之间均有极显著差异, 其中在烟草上的含量最高, 番茄上的含量最低, 心叶烟和克里芙兰烟上的居中. 叶片中 CMV-R3 基因组含量在第 15 天、第 30 天和第 75 天之间具有显著的时间效应: 烟草、心叶烟和克里芙兰烟均显示在第 15 天时病毒 RNA 含量最高, 在第 15 天到第 30 天, 其含量明显下降.

2.2 CMV-RS 的基因组和卫星 RNA 的含量变化

携带高拷贝卫星 RNA 的萝卜分离物 CMV-RS, 在 16~20℃ 温室条件下, 接种 5 种常见寄主 5~15 天, 从 0.2 g 植物叶片组织中提取总 RNA, 分别用 CMV 基因组探针和卫星 RNA 探针进行杂交检测, 其含量变化的分析结果见图 2 和图 3.

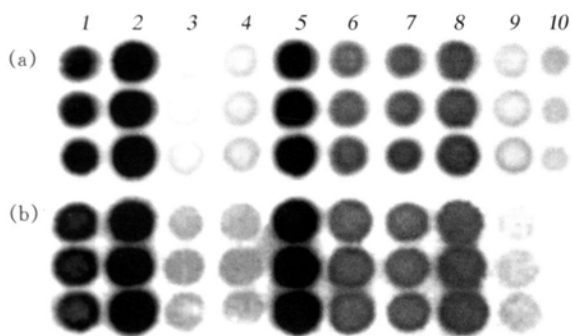


Fig. 3 Dot hybridization of CMV-RS genomic RNA (a) and satRNA (b)

1, 6: *N. glutinosa* 15 days, 5 days respectively; 2, 7: *N. tabacum* 15 days, 5 days; 3, 8: *N. physanodes* 15 days, 5 days; 5: *N. clevelandii* 5 days; 9: tomato 5 days; 10: R3 tomato 5 days.

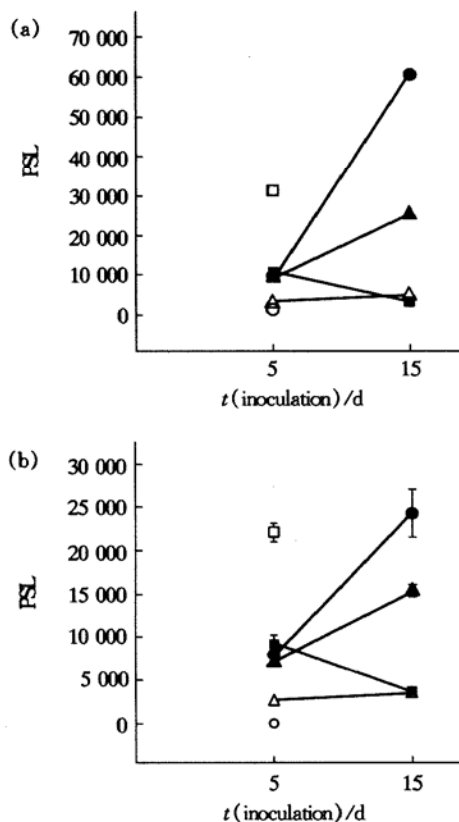


Fig. 4 Variation trend of CMV-RS genomic RNA (a) and satRNA (b)

▲: *N. glutinosa*; △: tomato; ●: *N. tabacum*; □: *N. clevelandii*; ■: *N. physalodes*; ○: tomato R3.

在5种供试寄主上, CMV-RS 基因组 RNA 的含量变化具有显著的寄主效应。接种第5天, CMV-RS 基因组 RNA 的相对负荷量从高到低的顺序为: 克里芙兰烟> 假酸浆> 心叶烟和烟草> 番茄; 接种第15天, 其相对负荷量顺序为: 烟草> 心叶烟> 假酸浆和番茄。基因组 RNA 含量具有显著的时间效应, 接种烟草和心叶烟, 在第5天和第15天之间呈显著上升的趋势, 只有接种番茄时的

变化不明显。2个十字花科植物 CMV 分离物 (RS 和 R3) 在番茄上均表现为极低的基因组 RNA 负荷量。CMV-RS 所携带卫星 RNA 相对含量变化的寄主效应和时间效应与基因组的趋势相似, 仅存在量的差异。

2.3 CMV-HC4 基因组和卫星 RNA 的含量变化

携带坏死卫星 RNA 的番茄分离物 HC4, 在 18 ~ 21 °C 温室条件下接种 4 种常见寄主 5~ 20 天, 基因组 RNA (RNA3) 和卫星 RNA 相对含量的杂交检测结果, 和变化趋势的分析结果如图 5 和图 6 所示。

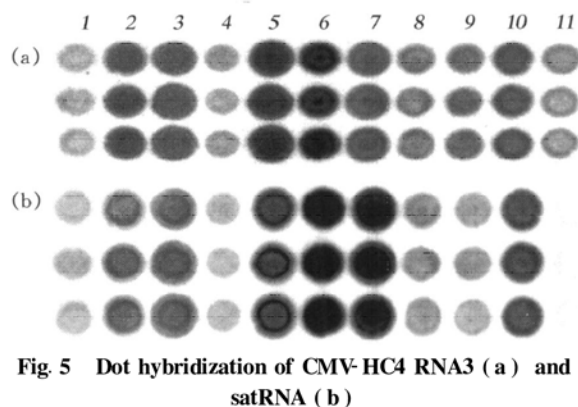


Fig. 5 Dot hybridization of CMV-HC4 RNA3 (a) and satRNA (b)

1, 4, 8: *N. tabacum* 20 days, 10 days, 5 days respectively; 2, 5, 9: *N. glutinosa* 20 days, 10 days, 5 days; 3, 6, 10: tomato 20 days, 10 days, 5 days; 11: HC3 on *N. tabacum* (non-satRNA control) 5 days.

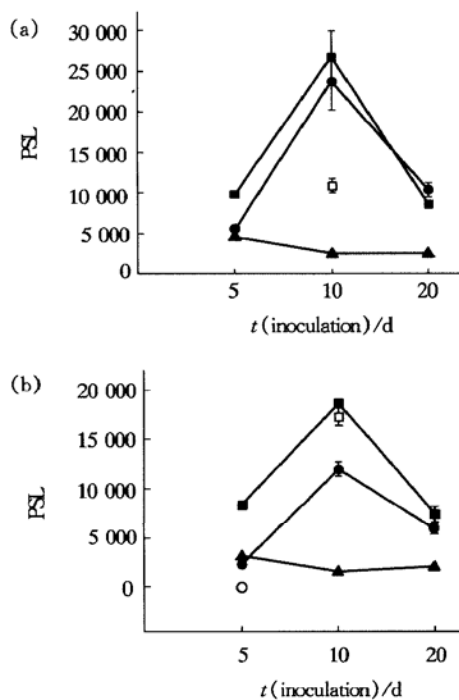


Fig. 6 Variation trend of CMV-HC4 genomic RNA (a) and satRNA (b)

▲: *N. tabacum*; □: *N. physalodes*; ●: *N. glutinosa*; ○: *N. tabacum* (HC3); ■: tomato.

携带坏死卫星的 CMV 番茄分离物 HC4, 在 4 种供试寄主上具有显著的寄主效应, 其寄主选择性明显有别于十字花科分离物 R3 和 RS. 在接种第 10 天, 其基因组 RNA 在烟草上的负荷量明显低于其他寄主, 而在番茄和心叶烟上相对较高. 在不同接种时间基因组 RNA 显示出明显的动态变化. 接种番茄和心叶烟第 5 天, 叶组织中病毒 RNA 负荷量相对较低, 接种第 10 天达到较高水平, 而接种第 20 天病毒基因组 RNA 含量已经明显下降. 病毒基因组 RNA 随时间的变化趋势在心叶烟和番茄上基本一致, 但在烟草上与心叶烟和番茄上具有显著差别. HC4 卫星 RNA 与基因组 RNA 负荷量对寄主效应反应的趋势相近, 但程度上有较大差异. 接种第 10 天, 基因组 RNA 负荷量从高到低的顺序是番茄 > 心叶烟 > 假酸浆 > 烟草, 卫星 RNA 负荷量的顺序是番茄 > 假酸浆 > 心叶烟 > 烟草. 因此, 该卫星 RNA 与辅助病毒之寄主适应性不完全相同.

本研究结果显示了不同 CMV 分离物之寄主卫星 RNA, 与辅助病毒基因组 RNA 组合之间定量关系的差别, 其量化关系的分析结果与前人通过定性分析所得结论不完全一致^[10~13].

参 考 文 献

- Domingo E, Holland J J. RNA viruses mutation and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*, 1997, **51**: 151~ 178
- Quadt R, Jaspars E M. Characterization of cucumber mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *FEBS Lett*, 1991, **279** (2): 273~ 276
- Gallitelli D. The ecology of cucumber mosaic virus and sustainable agriculture. *Virus Research*, 2000, **71**: 9~ 21
- 杨海花, 康良仪, 赵大健, 等. 卫星 RNA 对黄瓜花叶病毒基因组 RNA 体外合成的影响. *中国病毒学*, 1996, **11** (4): 373~ 377
Yang H H, Kang L Y, Zhao D J, *et al.* *Virologica Sinica*, 1996, **11** (4): 373~ 377
- 陈集双, 张耀洲, 冯明光. 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
Chen J S, Zhang Y Z, Feng M G. *J Zhejiang Univ (Agric Life Sci)*, 2001, **27** (3): 249~ 254
- 陈集双. 黄瓜花叶病毒及其卫星 RNA 的分子生态学研究: [博士论文]. 杭州: 浙江大学生命科学院, 2002
Chen J S. Study on molecular ecology of cucumber mosaic virus and its satellite RNA: [Ph. D thesis]. Hangzhou: Zhejiang University College of Life Science, 2002
- Garcia-Arenal F, Escriu F, Aranda M A, *et al.* Molecular epidemiology of cucumber mosaic virus and its satellite RNA. *Virus Res*, 2000, **71** (1~ 2): 1~ 8
- 柴立红, 徐步进, 陈集双. 用杂交方法定量检测病毒 RNA 负荷量. *核农学报*, 2003, **17** (1): 62~ 66
Chai L H, Xu B J, Chen J S. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2003, **17** (1): 62~ 66
- Anderson M L M. *Nucleic Acid Hybridization*. Singapore: Springer-Verlag, 1999. 35~ 48
- Kaper J M, Geletka L M, Wu G S, *et al.* Effect of temperature on cucumber mosaic virus satellite induced lethal tomato necrosis is helper virus strain dependent. *Arch Virol*, 1995, **140** (1): 65~ 74
- White J L, Tousignant M E, Geletka L M, *et al.* The replication of a necrogenic cucumber mosaic virus satellite is temperature-sensitive in tomato. *Arch Virol*, 1995, **140** (1): 53~ 63
- Carrere I, Tepfer M, Jacquemond M. Recombinants of cucumber mosaic virus (CMV): determinants of host range and symptomatology. *Arch Virol*, 1999, **144** (2): 365~ 379
- Palukaitis P. Pathogenicity regulation by satellite RNAs of cucumber mosaic virus: minor nucleotide sequence changes alter host responses. *Mol Plant Microbe Interact*, 1988, **1** (4): 175~ 181

Change of Relative Loading of Cucumber Mosaic Virus Genomic RNA and Satellite RNA in Systemical infection*

CHEN Ji-Shuang**, CHAI Li-Hong, WU Ping

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Radioactive dsDNA probes were prepared by labeling cDNA fragments of CMV RNA3 partial sequence and the full-length satellite RNA (satRNA) with ³²P, respectively. By using nucleic acid spot hybridization (NASH), relative RNA loading (RRL) of both genomic and satellite RNAs were quantitatively determined from the systemically infected hosts tissue. At 16~ 20 °C, the radish-derived CMV-R3 containing no satRNA was inoculated on four host plants and examined 15 days, 30 days, and 75 days post inoculation, respectively. The resulting RRL showed a declining trend during the test period. On day 15, the RRL for genomic RNA differed obviously among the hosts in the order of *Nicotiana. tabacum* > *N. glutinosa* > *N. clevelandii* > tomato. Meanwhile, the RRL for the CMV-RS, another radish isolate containing high copies

of satRNA, was examined 5 days and 15 days after inoculation on the same hosts with CMV-R3 being included as a non-satRNA control. The RRLs for both genomic RNA and satellite RNA of the CMV-RS displayed a similar host- and time-effect trend. On all the inoculated hosts, the RRL increased from day 5 to day 15 and RRL of CMV-RS for both genomic RNA and satRNA was in the quantitative order of *N. tabacum* > *N. glutinosa* > *Nicandra physalodes* and tomato. At 18 ~ 21 °C, CMV-HC4, a severe tomato isolate containing a necrosis satRNA, was tested after 5 days, 10 days, and 15 days inoculation on 5 hosts. The RRLs of HC4 genomic and satellite RNAs were under the influence of host and inoculation time. The RRLs for satRNA and genomic RNA were similar but had some degree differences among the hosts. On day 10 post inoculation, the relative amount of both genomic RNA and satRNA was ordered as tomato > *N. glutinosa* > *N. tabacum*. The results also showed that different CMV isolates have obvious preference among hosts for replication and accumulation of viral RNAs.

Key words cucumber mosaic virus, satellite RNA, loading, host effect, inoculation-time effect

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30270744).

** Corresponding author. Tel: 86-571-86971586, E-mail: mmlab@zju.edu.cn

Received: October 14, 2002 Accepted: November 28, 2002

小经验介绍

血清中血管紧张素转换酶活性测定与临床应用

刘 阳 张颖冬 葛剑青 茅新蕾

(南京脑科医院, 南京 210029)

1 试剂和材料

电泳缓冲液: 20 mmol/L pH 9.0 硼酸-硼酸盐溶液 (含 50 mmol/L SDS)。

底物反应液: 8.7 mmol/L 马尿酸-组氨酸-亮氨酸溶液 (HHL, Sigma 公司, 以含 500 mmol/L NaCl、100 mmol/L pH 8.3 硼酸-硼酸盐溶液溶解 HHL)。

马尿酸标准液: 3.0 mmol/L (Hip, Sigma 公司, 以蒸馏水溶解 Hip)。

病人血清。

2 仪器

P/ACE5010 毛细管电泳仪 (Beckman 公司), 石英毛细管 75 μm $\times$ 37 cm, pH/3C 酸度计, 电热恒温水箱。

3 实验方法

压力进样 3 S, 电压 16 kV, 电泳时间 7.5 min, 检测波长 200 nm, 实验温度 20 °C。检测前石英毛细管以 0.1 mmol/L NaOH、蒸馏水、电泳缓冲液各冲洗 10 min, 每个样品间用电泳缓冲液冲洗 2 min。

4 酶促反应

在 0.2 ml 离心管中加入 50 μl 底物反应液、10 μl 血清混匀, 37 °C 水浴 120 min, 取出加 0.1 mmol/L HCl 90 μl 终止反应, 对反应液进行电泳分析, 得马尿酸峰面积, 其迁

移时间 4.327 min。

5 马尿酸标准曲线、酶活性计算

以 0.1 mmol/L HCl 将马尿酸标准液稀释成 0.01 ~ 0.9 mmol/L 系列浓度溶液, 按上述第 3 部分方法进行测定, 以峰面积 (A) 对浓度 (c) 作线性回归方程, $A = 304320 \times c - 1281$ $r = 0.996$ 。

血管紧张素转换酶活性单位 (U) 定义: 37 °C 条件下血清与底物反应每分钟催化底物产生 1 μmol 马尿酸的酶量为一个单位 ($\mu\text{mol}/\text{min}$), 临床常以 1 L 血清中酶浓度表示酶活性 (U/L, 即 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$)。

根据马尿酸生成量计算酶活性, 酶活性 = $c_{\text{HIP}} \times 10^3 \times V_{\text{total}} / V_{\text{serum}} \times 1/t = 125 c_{\text{HIP}}$, 其中 $V_{\text{total}} = 150 \times 10^{-6}$ L; $V_{\text{serum}} = 10 \times 10^{-6}$ L; $t = 120$ min。

6 临床应用

取 50 例体检正常人的血清标本按上述方法检测血管紧张素转换酶活性, 血管紧张素转换酶活性范围 5.2 ~ 21.9 U/L ($\bar{x} \pm 1.96s$)。另外测定不同病例组病人的血清血管紧张素转换酶活性, 发现高血压病人中无脑梗塞病人组的酶活性高于有梗塞病人组 ($P < 0.05$), 肺结节病例组、无糖尿病肾病组酶活性明显高于正常对照组 ($P < 0.01$), 肺癌患者组酶活性明显低于正常对照组 ($P < 0.01$)。