

萝卜中一种新 dsRNA 的全长 cDNA 克隆及序列分析

李露露¹, 李力强¹, 乔爱民², 陈亮¹, 陈集双^{1*}

(¹ 浙江理工大学生物工程研究所, 杭州 310018; ² 仲恺农业技术学院农业与园林学院, 广州 510225)

摘要: 从‘一点红’萝卜 (*Raphanus sativus*-root ‘Yidianhong’) 叶片中提取 dsRNA, 应用 SPAT 方法对各 dsRNA 条带进行 cDNA 克隆并测序, 除获得先前报道的 5 条序列 (RasR 1 ~ RasR 5) 以外, 还得到一条新的全长序列, 将其定名为 RasR 6 (EU285027)。序列分析结果表明: RasR 6 全长为 1 778 bp, 其正义链编码 1 个由 502 个氨基酸组成、分子量约为 55.1 kD 的蛋白质。该序列与前人报道的双分病毒科 5 个病毒序列具有相似性, 且它们均编码双分病毒科病毒的外壳蛋白 (capsid protein, CP)。核苷酸序列比对结果显示: RasR 6 与同时来源于萝卜的 RasR 1 和 RasR 2 的 5'UTR 序列高度同源, 且其 3'末端具有 poly A 结构, 而与 RasR 3、RasR 4 和 RasR 5 的 UTR 则没有明显的相似性。因此, 推测 RasR 6 与 RasR 1、RasR 2 同属于双分病毒 RasV 1 (*Raphanus sativus virus* 1), 可能与 RasR 2 共同编码该病毒的 CP 或作为 RasV 1 的卫星 RNA 存在。

关键词: 萝卜; 双链 RNA; 双分病毒科; *Raphanus sativus virus* 1

中图分类号: S 631.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 08-1209-06

Full-length cDNA Clone and Sequence Analysis of A New Double-stranded RNA from Radish

LI Lu-lu¹, LI Li-qiang¹, QIAO Ai-min², CHEN Liang¹, and CHEN Ji-shuang^{1*}

(¹ Institute of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; ² College of Agriculture and Landscape Architecture, Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou 510225, China)

Abstract: Double-stranded RNA (dsRNA) were extracted from leaf tissues of radish (*Raphanus sativus*-root ‘Yidianhong’) grown in Hangzhou China. Complementary DNAs corresponding to the dsRNA segments were obtained by using a modified single primer amplification technique (SPAT), and followed by cloning and sequencing. The results revealed that a new dsRNA sequence, different from all the previously reported sequences RasR 1 to RasR 5, was obtained. And the newly detected RasR 6 (EU285027) was found to be 1 778 bp in length. It predicted that the positive strand of RasR 6 potentially encoded a protein of about 55.1 kD, containing 502 amino acids. Five members of Partitiviridae, all of which encoded putative viral CPs, were found to have some identity with RasR 6. Multiple alignments showed that RasR 6 were highly conserved at the 5' (UTR regions with RasR 1 and RasR 2 previously reported from the same radish varieties, but had no similarity with RasR 3 to RasR 5. Thus, it could be presumed that both RasR 6, RasR 1 and RasR 2 should belong to *Raphanus sativus virus* 1 (RasV 1), and RasR 6 encodes CP together with RasR 2, or is a satellite dsRNA of this virus.

Key words: *Raphanus*; double-stranded RNA; Partitiviridae; *Raphanus sativus virus* 1

双分病毒科 (Partitiviridae) 由 3 个属组成, 即 α 隐潜病毒属 (*Alphacryptovirus*)、 β 隐潜病毒属

收稿日期: 2008-03-04; 修回日期: 2008-05-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671361); 科技部国际合作重点项目 (2004DFA05000)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: chenjs@zstu.edu.cn; Tel: 0571-86843197)

(*Betecryptovirus*) 和双分病毒属 (*Partitivirus*)。通常情况下, 双分病毒科病毒的基因组由两条大小相近的 dsRNA 构成, 且长度均在 1.4 ~ 3.0 kb 之间。每条 dsRNA 都编码一个蛋白, 一般较大的 dsRNA 编码病毒的 RdRp, 较小的 dsRNA 编码病毒的 CP。此外, 某些病毒除了含有两条完整的基因组 dsRNA 之外, 还含有只有部分基因组序列的缺省 RNA (defective RNA) 和卫星 RNA (satellite RNA), 这两种 RNA 的存在依赖于基因组 dsRNA 的支持 (Ghabrial et al., 2005)。双分病毒科病毒的病毒粒子的直径 30 ~ 40 nm, 在寄主中积累量低, 且不引起明显的寄主症状 (Boccardo et al., 1987; Ghabrial et al., 2005)。 α 隐潜病毒属和 β 隐潜病毒属成员的自然寄主为植物, 双分病毒属成员的自然寄主为真菌。

作者继从杭州市郊的‘一点红’萝卜品种中鉴定出可能属于两种 *Partitiviridae* 病毒的 5 条 dsRNA 以后, 继续从同一地点采集该萝卜品种的叶片, 并抽提叶片组织的 dsRNA, 获得了 4 条大小在 1 400 ~ 2 000 bp 范围的 dsRNA 条带。但是, 在某些萝卜样品中只发现含有两条较大的 dsRNA。继续用 SPAT 方法即单引物扩增的方法, 获得了全部 dsRNA 条带的 cDNA 并随之克隆测序, 重复获得 RasR 1 ~ RasR 5 的序列, 其大小依次分别为 1 866 bp、1 791 bp、1 717 bp、1 521 bp 和 1 486 bp (Lambden et al., 1992; 刘莉等, 2005)。推测 RasR 1 和 RasR 2 共同组成一个植物潜隐病毒 *Raphanus sativus virus* 1 (RasV 1), RasR 1 编码该病毒的 RdRp (RNA dependent RNA polymerase), RasR 2 编码该病毒的 CP。而 RasR 3 ~ RasR 5 组成另一植物潜隐病毒 *Raphanus sativus virus* 2 (RasV 2), RasR 3 编码该病毒的 RdRp, RasR 4 与 RasR 5 编码该病毒的 CP (Chen et al., 2006a, 2006b)。

此外, 作者还发现在萝卜植株中可以单独检测到 RasV 1 的存在, 但是未发现 RasV 2 单独存在的情况。在克隆 RasR 2 时, 还获得了一条和 RasR 2 大小相近的 dsRNA, 即 RasR 6。为了验证其确实存在并确定其序列, 参照新获得的 RasR 6 序列设计 3 对特异性引物, 分别以叶片组织的总 RNA 和 dsRNA 为模板进行 RT-PCR 并克隆、测序, 最终重复确认了该序列的存在并验证了该序列的来源, 为深入研究萝卜中 dsRNA 病毒相互作用的侵染机制提供分子生物学基础。

1 材料与方法

1.1 叶片的采集与保存

试验用‘一点红’萝卜植株叶片于 2006 年 4 月采集自杭州市农业科学院蔬菜研究所实验田, 与 2004—2005 年为同一采样地点。样品于 4 °C 冰箱短期保存或存于 -80 °C 冰箱中。单株或多株材料分别提取 dsRNA 或总 RNA 进行病毒检测。

定点收集标记植株的萝卜种子, 同一株植株的种子苗用于进一步鉴定。

1.2 主要试剂

T4 DNA 连接酶、T4 RNA 连接酶、反转录酶 AMV、LA *Taq* 和 pMD18-T 载体试剂盒为 TaKaRa 公司产品; 反转录酶 SuperScript™ III 购自 Invitrogen 公司; DNA 回收试剂盒购自 Axygen 公司; 引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成; Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。

1.3 引物的设计

用于 SPAT 的接头 primer A 与 primer B 根据马铃薯纺锤形块茎类病毒 (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) 的基因组序列设计 (刘莉等, 2005), 序列如下:

primer A: 5'-PO₄-TCTTCGGGTGTCCTTCCTCG-NH₂-3';

primer B: 5'-CGAGGAAGGACACCCGAAGA-3'。

在 RasR 6 序列内设计的 3 对特异性引物:

primer 1-F: 5'-AGAAAGGTTTATAGACTCTCTCCTAATT-3';

primer 1-R: 5'-GAAGGTAGACACTTCAGGGTATTG-3';

primer 2-F: 5'-CCACCACTTCTGTTTCACG-3';

primer 2-R: M13M4 + Oligo d (T)₁₈, 即 5'-GTTTT CCCAG TCACG AC + Oligo d (T)₁₈-3';

primer 2-R-1: M13M4, 即 5'-GTTTTCCCAG TCACG AC-3';

primer 3-F: 5'-GCCCCAACAGCAACAAGTGAT-3';

primer 3-R: 5'-GTGTAGGCATCGGGGAATAT-3'。

1.4 dsRNA 的提取和 SPAT

萝卜叶片组织 dsRNA 的提取参照本实验室方法 (陈集双, 2001) 进行, 并进行割胶回收。在 T4 RNA 连接酶与 T4 DNA 连接酶存在的条件下 primer A 连接到 dsRNA 序列的 3'端。其后模板 dsRNA 的末端被 DNA 聚合酶补平, 再在 DMSO 的存在下高温变性, 以 primer B 为下游引物, 进行反转录合成 cDNA 的第一条链; 继续以 primer B 为上下游引物, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。

1.5 叶片组织总 RNA 的提取和 RT-PCR

叶片组织总 RNA 利用 Trizol 试剂提取, 以 primer 1-R、primer 2-R、primer 3-R 为引物进行反转录, 然后分别以 primer 1-F 和 primer 1-R、primer 2-F 和 primer 2-R-1、primer 3-F 和 primer 3-R 三对引物进行 PCR 扩增。扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 然后进行 30 个循环, 循环的条件为 94 °C 变性 1 min, 60 °C (primer 1)、56 °C (primer 2)、58 °C (primer 3) 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min; 最后在 72 °C 条件下延伸 10 min。

1.6 扩增产物的克隆测序与分析

扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 回收后连接到 pMD18-T 载体上, 转化感受态细胞 DH5 α , 经氨苄抗性和蓝白斑筛选后, 挑取 10 个以上的阳性克隆, 用相应引物进行 PCR 鉴定, 挑选 3 个阳性克隆进行测序。

特异性引物的设计采用 Primer premier 5.0 完成。ORF 的搜寻以及核苷酸的统计分析等工作通过 DNASTar 软件完成。在 GenBank 数据库中同源序列的搜索工作利用 BLAST 程序完成 (Altschul et al., 1997)。同源序列的比对通过 Clustal W 程序完成并用 GeneDoc 程序查看 (Nicholas & Nicholas, 1997)。同源序列之间的系统发生树由 MEGA3.1 软件生成。

2 结果与分析

2.1 dsRNA 的提取和 cDNA 的获得

从杭州郊区表现有典型黄边症状或症状不明显的‘一点红’萝卜品种中获得的总 dsRNA, 与我们以前报道的结果相似。在 5% 聚丙烯酰胺凝胶中分离得到大小在 1 500 ~ 2 000 bp 的两条主带, 仍然命名为 dsRNA 1 和 dsRNA 2 (图 1)。

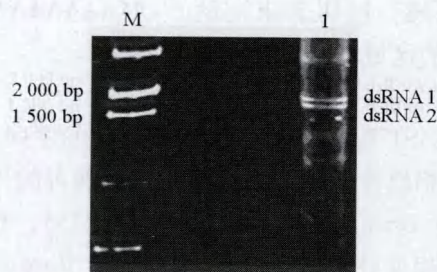


图 1 5% 聚丙烯酰胺凝胶分析‘一点红’萝卜中的 dsRNA

1: dsRNA 1 和 dsRNA 2; M: DNA 分子量标准。

Fig. 1 Electrophoresis of dsRNAs extracted from radish in 5% polyacrylamide gel

1: dsRNAs as two main fragments, dsRNA 1 and dsRNA 2; M: DNA marker.

继续采用 SPAT 方法获得 dsRNA 1 和 dsRNA 2 的 cDNA, 结果仍然为 2 条主带, 大小在 1 700 ~ 1 900 bp 范围内。

2.2 序列测定

目标片段经克隆测序, 发现 dsRNA 1 与我们已经报道的 RasV 1 中的 RasR 1 完全相同, 但 dsRNA 2 实际是由两个共迁移条带组成, 相对大的条带 (1 791 bp) 与 RasR 2 完全相同; 新的条带即本文中的 RasR 6, 全长 1 778 bp, 其中 A、G、T 和 C 的含量分别为 24.63%、18.11%、26.43% 和 30.82%, 很明显 G 的含量比其它 3 种碱基的含量低。

2.3 RT-PCR 验证序列的来源

在新获得的 RasR 6 序列中, 设计 3 对特异性引物 (primer 1-F 和 primer 1-R, primer 2-F 和 primer 2-R 和 primer 2-R-1, primer 3-F 和 primer 3-R) 分 3 段克隆 RasR 6, 由于 RasR 6 的 3' 末端具有 poly (A) 结构, 所以在扩增 RasR 6 的 3' 端序列时采用 M13M4 + Oligo d (T)₁₈ 以及 M13M4 作为扩增引物。以萝卜叶片组织中的 total RNA 为模板, 进行 RT-PCR, 结果均得到预期大小为 379、442、1 298 bp 的目的片段 (分别标记为 a、b、c, 图 2), 测序结果也与 RasR 6 的序列相吻合, 说明 RasR 6 来源于 dsRNA。

2.4 RasR 6 核酸序列分析

RasR 6 的 cDNA 序列的 GenBank 登陆号是 EU285027。RasR 6 与 RasR 1 的 5' UTR 长度分别为 79 bp 和 70 bp, 二者同源率为 65.4%, 共同拥有 4 个相同的区域, 包括末端的 5'-AGAAAAATTT-3'。RasR 6 的 3'UTR (190 bp) 明显长于 RasR 1 的 3'UTR (74 bp), 它们之间的同源率为 25.7%, 但两者也有一些相同的区域, 包括 3'末端的 5'-AAAATAAAAA-3'。RasR 6 序列两端的 UTR 分别与相应 RasR 2 序列两端的 UTR 有较高的同源性 (图 3)。RasR 6 与 RasR 2 的 5'UTR 长度相当, 分别为 79 bp 和 77 bp, 同源性高达 82.3%, 二者具有 3 个较长的相同区域, 包括末端的 5'-AGAAAAATTTTAGA-3'; RasR 6 与 RasR 2 的 3'UTR 长度也相当, 分别为 190 bp 和 196 bp, 同源性为 66.0%, 同时具有多个相同的区域, 包括 3'末端的 5'-TAAAAAAA-3' (图 3)。此外, RasR 2 和 RasR 6 的全长序列也有多个相同的区域, 二者同源率为 54%。

2.5 RasR 6 编码蛋白序列分析

在 GenBank 数据库中利用 BLAST 程序搜索与 RasR 6 同源的序列, 结果显示, 有 5 条蛋白序列与 RasR 6 编码的蛋白序列具有较高相似性, 且均为双分病毒科病毒的外壳蛋白: RasV 1 (YP_656505, 相似性 37%), *White clover cryptic virus 1* (WCCV 1, YP_086755, 相似性 21%), *Vicia cryptic virus* (VCV, YP_272125; ABN71235, 相似性 23%), *Amasya cherry disease-associated partitivirus* (ACD-PV, YP_138536, 相似性 30%), *Cherry chlorotic rusty spot associated partitivirus* (CCRS-PV, YP_138539, 相似性 25%)。以从萝卜上克隆到的 RasR 5 为外组对照, 生成系统发生树 (图 4), RasR 6 编码的蛋白与 RasV 1 的外壳蛋白 (即 RasR 2 推测编码的蛋白) 聚到一类。以上结果说明 RasR 6 可能编码 RasV 1 的另外一个外壳蛋白, 或者编码的蛋白具有未知的功能。

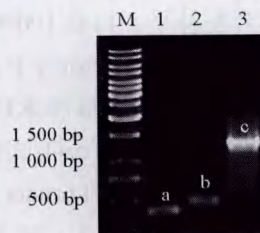


图 2 RT-PCR 验证序列来源的结果

1~3: 以萝卜叶片组织中的总 RNA 为模板, 分别以 primer 1-F 和 primer 1-R, primer 2-F 和 primer 2-R 和 primer 2-R-1, primer 3-F 和 primer 3-R 为引物进行 RT-PCR; M: DNA 分子量标准。
a: 379 bp; b: 442 bp; c: 1 298 bp。

Fig. 2 Results for detection of RasR 6 origin by RT-PCR with specific primer

1~3: Amplification of three specific fragments by RT-PCR with total RNAs from radish by using primer 1-F & primer 1-R, primer 2-F & primer 2-R & primer 2-R-1 and primer 3-F & primer 3-R as primers respectively; M: DNA marker.
a: 379 bp; b: 442 bp; c: 1 298 bp.

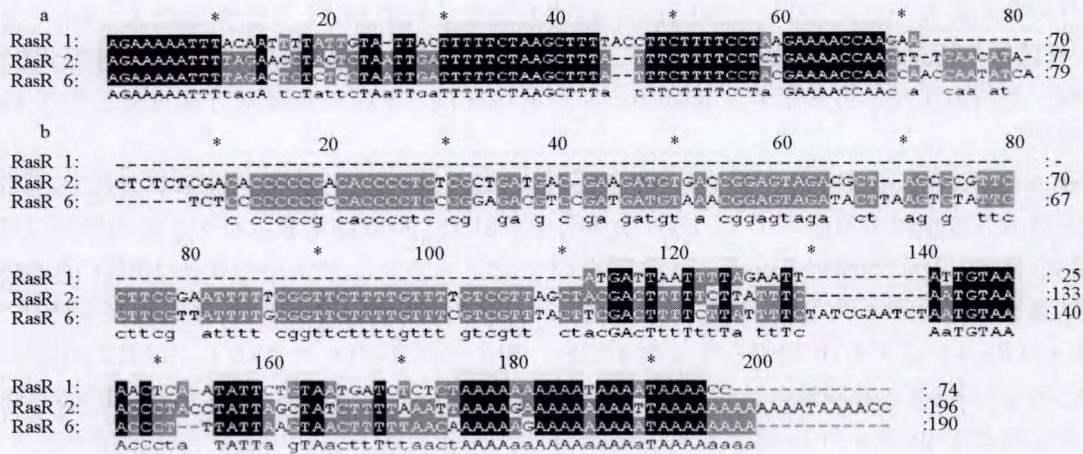


图3 RasR 1、RasR 2 和 RasR 6 的 5'UTR (a) 和 3'UTR (b) 序列比对结果

核苷酸保守性: 黑色 100%, 灰色 >80%, 无阴影 <60%。

Fig. 3 Comparisons of 5'UTR (a) and 3'UTR (b) sequences among cDNAs of RasR 1, RasR 2 and RasR 6

Shading levels in each column represents different similarities; black 100%, grey >80%, unshaded <60%.

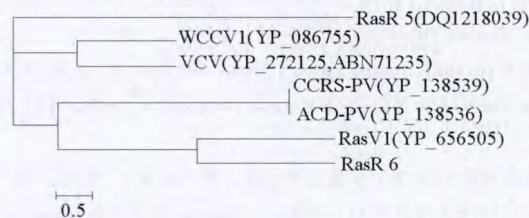


图4 Partitiviridae 成员与 RasR 6 的 CPs 系统发生树

Fig. 4 Phylogenetic tree generated from multiple alignments of Partitiviridae viral CPs and RasR 6

3 讨论

植物组织中大分子双链 RNA 的存在通常与 RNA 病毒的感染相关 (Osaki et al., 1998)。分析 dsRNA 已经成为研究植物病毒的重要途径之一 (Dodds et al., 1984)。Natusuaki 等 (1979) 在日本萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 中发现了一种球状病毒, 直径约 30 nm。感染这种病毒的萝卜幼苗通常表现不明显, 但有时会出现叶片边缘轻微黄化的现象, 因此该病毒被命名为萝卜黄边病毒 (*Radish yellow edge virus*, RYEV)。他们认为: 侵染萝卜的 RYEV 属于双分病毒科 (Partitiviridae) 的 α -潜隐病毒属 (*Alphacryptovirus*), 该病毒只能通过种子传播, 从病毒粒子中提取的基因组为 dsRNA 形式, PAGE 胶电泳结果显示共有 5 条带。分子量换算成碱基数约为 1.91、1.84、1.78、1.68、1.60 kb。他们也发现了有些萝卜中只含有较大的 3 条 dsRNA。对于这种 dsRNA 的多样性有过两种推测: 1) 两条较小条带为依赖于基因组条带的 satellite dsRNA, 有的 RYEV 分离物不携带这两条 satellite RNA; 2) 两条较小条带为另一个病毒的基因组, 该病毒与 3 条较大条带组成的病毒共同侵染萝卜 (Natsuaki et al., 1983)。迄今为止, 还没有 RYEV 基因组序列信息的报道。

近年来, 我们在杭州市郊发现多株‘一点红’萝卜植株叶片带有黄边, 且该现象较为普遍。从

萝卜叶片中分离到大小在 1 500 ~ 2 000 bp 的 dsRNA 条带。利用 SPAT 方法获得相关 dsRNA 条带的 cDNA, 且已经分析报道了克隆所得的 5 条带。继续应用 SPAT 方法从该品种萝卜叶片组织 dsRNA 中克隆得到一条新的序列, 将其命名为 RasR 6; 并且通过分段 (3 段) 克隆的方法重复获得了 RasR 6 的全长序列。

RasR 6 比 RasR 2 小 13 bp, 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳难以把二者分离开。RasR 6 全长为 1 778 bp, 其正义链最大开放编码框编码一个 55.1 kD 的蛋白质, BLAST 检索结果显示有 5 个蛋白序列与其具有较高的相似性, 且它们均编码 Partitiviridae 成员的 CP。对 ‘一点红’ 萝卜中的 6 条 dsRNA 的核酸序列比对, 结果显示: RasR 6 与 RasR 1 和 RasR 2 的 5' UTR 序列高度保守, 而 RasR 6 的 5' UTR 与 RasR 3、RasR 4 和 RasR 5 的 5' UTR 则没有明显的相似性。初步推测 RasR 6 与 RasR 1、RasR 2 同属于 RasV 1, 且 RasR 6 与 RasR 2 共同编码该病毒的 CP, 同时不排除 RasR 6 作为 RasV 1 的卫星 RNA 存在的可能性。要证明关于 RasR 6 与 RasR 2 共同编码 RasV 1 外壳蛋白的假设, 可以在大肠杆菌中表达 RasR 2 和 RasR 6 编码的蛋白, 并制备抗体。用血清学手段来检测病毒粒子提取物中是否含有 RasR 2 和 RasR 6 编码的蛋白质。

如果 RasR 6 也编码 CP, 即说明 RasV 1 的外壳可能由两种蛋白组成, 与目前对 Partitiviridae 成员的认识不一致。关于这两个蛋白是如何相互作用的, 以及 RasV 1 为什么会由两种蛋白组成 CP 等问题, 都有待于更深入的研究。

References

- Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25: 3389 - 3404.
- Boccardo G, Lisa V, Luisoni E, Milne R G. 1987. Cryptic plant viruses. *Adv Virus Res*, 32: 171 - 214.
- Chen Ji-shuang. 2001. Studies on molecular ecology of cucumber mosaic virus and its satellite RNA [Ph. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 陈集双. 2001. 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.
- Chen L, Chen J S, Liu L, Yu X, Yu S, Fu T Z, Liu W H. 2006a. Complete nucleotide sequence and genome characterization of double-stranded RNA 1 and RNA 2 in the *Raphanus sativus*-root cv. Yipinghong. *Arch Virol*, 151: 849 - 859.
- Chen L, Chen J S, Zhang H, Chen S N. 2006b. Complete nucleotide sequences of three dsRNA segments from *Raphanus sativus*-root cv. Yipinghong with leaf yellow edge symptoms. *Arch Virol*, 151: 2077 - 2083.
- Dodds J A, Morris T J, Jordan R L. 1984. Plant viral double-stranded RNA. *Annu Rev Phytopathol*, 22: 151 - 168.
- Ghabrial S A, Buck K W, Hillman B I, Milne R G. 2005. Eight report of the international committee on taxonomy of viruses // Fauquet C M, Mayo M A, Maniloff J, Desselberger U, Ball A L. Partitiviridae. London: Elsevier/Academic Press.
- Lambden P R, Cooke S J, Caul E O, Clarke L N. 1992. Cloning of noncultivable human rotavirus by single primer amplification. *J Virol*, 66: 1817 - 1822.
- Liu Li, Chen Ji-shuang, Yu Shan, Wang Chong. 2005. Full-length cDNA clone and sequences analysis for unknown double-stranded RNA isolated from radish. *Acta Horticulturae Sinica*, 32 (5): 881 - 884. (in Chinese)
- 刘莉, 陈集双, 喻珊, 王冲. 2005. 萝卜中一未知 dsRNA 全长 cDNA 克隆及其序列. *园艺学报*, 32 (5): 881 - 884.
- Natsuaki T, Yamashita S, Doi Y, Yora K. 1979. Radish yellow edge virus, a seed-borne small spherical virus newly recognized in Japanese radish (*Raphanus sativus* L.). *Ann Phytopath Soc Japan*, 45: 313 - 320. (in Japanese)
- Natsuaki T, Yamashita S, Doi Y, Okuda S, Teranaka M. 1983. Radish yellow edge virus, a seed-borne virus with double-stranded RNA, of a possible new group. *Ann Phytopath Soc Japan*, 49: 593 - 599.
- Nicholas K B, Nicholas H B. 1997. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMB Net News*, 4 (2), 1 - 4.
- Osaki H, Kudo A, Ohtsu Y. 1998. Nucleotide sequence of seed- and pollen-transmitted double-stranded RNA, which encodes a putative RNA-dependent RNA polymerase, detected from Japanese pear. *Biosci Biotechnol Biochem*, 62: 2101 - 2106.