原核表达的 PRSV HC-Pro 基因同源 dsRNA 诱导番木瓜抗性的研究

杨国峰[1,3]，沈文涛[2]，言 普[2]，黎小瑛[2]，周 鹏[1,2,*]

（[1]海南大学农学院，海口 570228；[2]中国热带农业科学院热带生物技术研究所，分析测试中心，海口 571101；[3]海南师范大学生命科学学院，海口 571158）

摘 要：利用番木瓜环斑病毒（PRSV）HC-Pro 基因 3′端 824 bp 区段，通过 OZ-LIC 法构建了含有 PDK 内含子的发夹 RNA 编码结构，并选用 pSP73 和 M-Jm109LacY 分别作为宿主载体和宿主菌，构建了高效的同源 dsRNA 原核表达工程菌 M-Jm109LacY/pSP73-RNAi-H824，经 IPTG 诱导表达的 dsRNA 不被 DNase I 和 RNase A 降解，稳定性较好。采用喷洒 dsRNA 粗制品的方式对番木瓜植株进行保护性处理和治疗性处理，症状观察及 ELISA、Real-time RT-PCR 分析结果表明，保护性处理能有效诱发对番木瓜环斑病毒的抗性（发病率低，发病时间晚）；治疗性处理（植株已接种 PRSV 25 d）能在处理初期引起番木瓜环斑病毒积累量发生短暂降低。

关键词：番木瓜环斑病毒；HC-Pro；dsRNA；原核表达；RNA 沉默

中图分类号：S 667.9 **文献标志码**：A **文章编号**：0513-353X（2013）07-1269-09

Studies of Bacterially Expressed dsRNAs Targeting PRSV HC-Pro Gene Inducing Resistance to PRSV

YANG Guo-feng[1,3]，SHEN Wen-tao[2]，YAN Pu[2]，LI Xiao-ying[2]，and ZHOU Peng[1,2,*]

（[1]*College of Agriculture*，*Hainan University*，*Haikou* 570228，*China*；[2]*Institute of Biotechnology and Bioscience*，*Analysis and Testing Center*，*Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences*，*Haikou* 571101，*China*；[3]*College of Life Sciences*，*Hainan Normal University*，*Haikou* 571158，*China*）

Abstract：A Hairpin RNA coding structure of the 824 bp region（from 2 274 to 3 097）of PRSV HC-Pro gene was constructed by the OZ-LIC method. After inserted into the plasmid pSP73，the structure was transformed into M-Jm109LacY of the RNaseⅢ-deficient strain and induced with IPTG. The recombinant *E. coli* strain could express H824-dsRNA that remained stable in the presence of DNase Ⅰ enzyme and RNase A enzyme. We carry out a protective resistance assay and a therapeutic resistance assay. In the protective resistance assay，dsRNA was used to spray onto the plant surface before inoculation of papaya leaves with PRSV. Protective treatment experimental results showed dsRNA derived from the functional gene of PRSV could protect papaya plants from virus infection. ELISA analysis and Real-time RT-PCR results confirmed that the virus accumulation could be inhibited by dsRNA. In the therapeutic resistance assay，dsRNA was used to spray onto the plant surfaces 25 days after inoculation of papaya

收稿日期：2013－03－25；**修回日期**：2013－06－03

基金项目：国家自然科学基金项目（31171822，31000844）；海南省重点科技计划项目（ZDXM20120027）

* 通信作者 Author for correspondence（E-mail：zhp6301@126.com）

leaves with PRSV. ELISA analysis and Real-time RT-PCR results showed that the virus accumulation declined slightly after spraying dsRNA for 3 days.

Key words：*Papaya ringspot virus*（PRSV）；HC-Pro；dsRNA；prokaryotic expression system；RNA silencing

番木瓜环斑病毒（*Papaya ringspot virus*，PRSV）属于马铃薯 Y 病毒科（Potyviridae）马铃薯 Y 病毒属（*Potyvirus*），其引起的番木瓜环斑病毒病是目前影响番木瓜种植业最为严重的病害（肖火根和范怀忠，1996）。生产中控制 PRSV 的方法大多是限制蚜虫介导的传播或销毁病株，仅能在一定程度上控制病毒的蔓延。由于番木瓜种内缺乏抗病资源，且种间杂交不亲和等原因，尚未得到适合大面积推广应用的高抗品系。通过基因工程技术得到的转基因抗病毒番木瓜品系虽然在部分地区有效控制了 PRSV 的危害，但其抗性谱较窄，且存在潜在的生态风险和食品安全问题。番木瓜生产中迫切需要既适合于大田生产又行之有效的 PRSV 防治方法。

RNA 沉默（RNA silencing）是广泛存在于植物、动物、线虫和真菌等真核生物中的一种高度保守且序列特异的 RNA 降解机制，RNA 沉默对于调控发育、维持基因组的稳定性以及响应生物和非生物胁迫等具有重要作用。本研究中利用 dsRNA 介导的 RNA 沉默抗病毒机制，构建了 PRSV 辅助成分—蛋白酶（helper component-proteinase，HC-Pro）基因同源 dsRNA 的原核表达系统，并通过在番木瓜植株上喷洒 dsRNA 粗提液的方式对番木瓜植株进行保护性处理和治疗性处理，研究了喷洒 dsRNA 粗提物对番木瓜叶片中环斑病毒积累的抑制作用，探索了利用原核表达产物在体外防治番木瓜环斑病毒的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2011 年 6 月至 2012 年 9 月在中国热带农业科学院热带生物技术研究所进行。

M-Jm109LacY 菌株[由大肠杆菌 JM109(DE3)菌株敲除 rnc 基因和氯霉素抗性基因后得到]（Yin et al.，2009）由山东农业大学生命科学学院朱常香博士惠赠。pRNAi-LIC 载体（Xu et al.，2010）由清华大学生命科学学院刘玉乐教授、胥国勇博士惠赠。番木瓜环斑花叶病毒海南株（PRSV-HN）由本实验室分离保存。PRSV 全长 cDNA 克隆 pG-J（GenBank 登录号：HQ424465）由本实验室保存。*E. coli* Top10 感受态细胞购自天根公司。pSP73 载体购自 Promega 公司。所用番木瓜品种为‘穗中红’，试验用苗为 2 月龄的非转基因无毒组培苗。

1.2 PRSV HC-Pro 基因同源 dsRNA 原核表达工程菌株的构建

基于 PRSV HC-Pro 基因 3′端 824 bp 区段（2 274 ~ 3 097）和利用 pRNAi-LIC 载体构建含发夹 RNA 编码结构的原理，设计引物（表 1）。以 PRSV 全长 cDNA 克隆 pG-J 为模板，用 H8-1/HC-1 和 H8-2/HC-2 两对引物分别扩增 HC-Pro 基因 3′端 824 bp 区段（2 274 ~ 3 097），回收得到产物 1 和产物 2。利用 OZ-LIC 法（Xu et al.，2010）使用 pRNAi-LIC 载体构建含发夹 RNA 编码结构（图 1）的重组质粒，通过 *Sal* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ双酶切鉴定重组质粒。将发夹 RNA 编码结构与 pSP73 载体重组构建 dsRNA 原核表达载体，通过菌液 PCR 初步鉴定阳性克隆，再将阳性克隆送 Invitrogen（上海）公司测序。dsRNA 原核表达载体通过热激法转入 M-Jm109LacY 菌株感受态细胞，提取阳性克隆质粒，通过 *Sal* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ双酶切鉴定重组菌株。用 pSP73 空载体转化 M-Jm109LacY 菌株感受态细胞，构

建 M-Jm109LacY/pSP73 工程菌株用于对照组试验。

表 1　引物序列

Table 1　The sequences of the primers

名称 Name	序列 5′－3′　Sequence
H8-1	CGACGACAAGACCCTGTCGACAACGTTCTGGAAAAGCTCATTTCAA
	LIC1 adaptor　*Sal* Ⅰ
HC-1	GAGGAGAAGAGCCCTACCAACAATGTAGTGCTTCATTTCG
	LIC2 adaptor
H8-2	AGAGCACACGACCCTGGTACCAACGTTCTGGAAAAGCTCATTTCAA
	LIC4 adaptor　*Kpn* Ⅰ
HC-2	CCAGCACGGAACCCTACCAACAATGTAGTGCTTCATTTCG
	LIC3 adaptor
Actin-F	GCCGGAATTCGCGATTGACAAAACTGA
Actin-R	TGAGTGATGGCTGGAAGAGAAC
NR-F	CTCGGGAGAATTTGGTTGTCA
NP-R	TGACCAATGGATTGCCACAAT

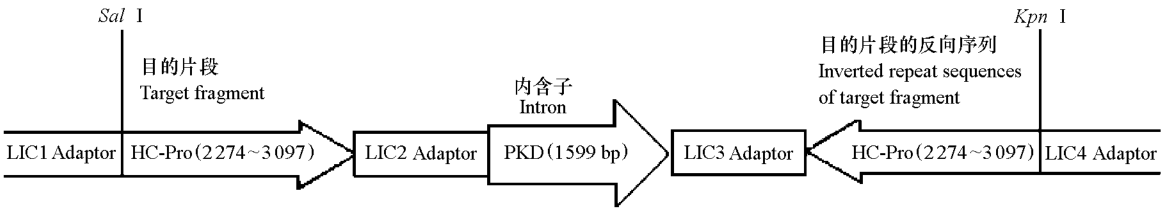

图 1　含内含子的发夹 RNA 编码结构示意图

Fig. 1　The structural diagram of ihpRNA Coding sequence

1.3　同源 dsRNA 的表达分析

将重组工程菌株接种至到 10 mL 的 LB 液体培养基（Kan^r，Amp^r）中 37 ℃振荡培养过夜，将菌液 20 倍稀释后于 37 ℃振荡培养 2 h 至对数生长期，加入 IPTG（终浓度 0.4 $mmol \cdot L^{-1}$）于 37 ℃诱导培养 3 h 后，用 Trizol 试剂（Invitrogen 公司）提取 dsRNA。先使用 DNaseⅠ对 dsRNA 样品进行消化，反应体系为：10× DNaseⅠ Buffer 1.0 μL、DNaseⅠ（1 $U \cdot \mu L^{-1}$）1.0 μL、dsRNA 样品 2.0 μL（大约 1 μg）、ddH_2O 6.0 μL，反应条件：37 ℃ 30 min。再用 RNase A 对 DNaseⅠ的消化处理液进行进一步消化，反应体系为：RNase A（1 $ng \cdot \mu L^{-1}$）0.75 μL、DNaseⅠ消化处理液 5.0 μL、NaCl（1 $mol \cdot L^{-1}$）5.75 μL，反应条件：37 ℃，1 h。利用 1%琼脂糖凝胶电泳分析 dsRNA 样品。

1.4　同源 dsRNA 粗制品的制备

使用 Constant TS 型高压细胞破碎仪（Constant Systems 公司，英国）处理已表达同源 dsRNA 的工程菌重悬液（用去离子水重悬），处理压力为 0.87 kPa，破碎 1 次。

1.5　使用同源 dsRNA 粗制品处理番木瓜植株

保护性处理分 2 组，每组选用 30 株番木瓜苗。一组使用 dsRNA 粗制品（加入 0.2%中性洗衣液作为黏着剂）喷洒番木瓜苗；另一组使用经 IPTG 诱导的 M-Jm109LacY/pSP73 工程菌高压破碎处理液喷洒番木瓜苗作对照。2 组叶片的正面和反面都要均匀喷洒，至叶面布满液体刚好不滴下即可。喷洒后第 2 日清晨使用新研磨的番木瓜环斑病毒病病叶汁液通过人工摩擦接种法接种番木瓜植株。

每天观察发病情况。每组随机选 3 株番木瓜作为取样植株，于接种后 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 d 分别从取样植株上剪取接种叶以上的叶片用于 ELISA、Real-time RT-PCR 分析。

治疗性处理也分 2 组，每组选用 30 株通过人工摩擦接种法接种 PRSV 后 25 d 的番木瓜苗（全部表现环斑病症状）。一组使用 H824-dsRNA 粗制品（加入 0.2%中性洗衣液作为黏着剂）喷洒番木瓜苗；另一组使用经 IPTG 诱导的 M-Jm109LacY/pSP73 工程菌高压破碎处理液喷洒番木瓜苗作对照。每天观察发病情况。从每组随机选 3 株番木瓜作为取样植株，于喷洒前（0 d）和喷洒后 3、6、9、12、15、18 d 分别从取样植株上剪取上部显症叶片用于 ELISA、Real-time RT-PCR 分析。

1.6　ELISA 分析

使用 PRSV 双抗体夹心 ELISA（DAS-ELISA）试剂盒（Agdia 公司，美国）分析各处理组各时间点叶片样品中的 PRSV 积累量。

1.7　Real-time RT-PCR

使用 PrimeScript® RT reagent Kit（Perfect Real Time）（TaKaRa 公司）以番木瓜叶片总 RNA 为模板反转录合成 cDNA。定量 PCR 反应在 Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪（Stratagene 公司，美国）上进行。采用 SYBR® Premix Ex *Taq*™ Ⅱ Kit（Perfect Real Time）（TaKaRa 公司），以反转录合成的 cDNA 为模板，使用引物 Actin-F 和 Actin-R（表 1）扩增 Actin 基因（内参基因），使用引物 NR-F 和 NP-R（表 1）扩增 PRSV NIa-Pro 基因，通过检测 PRSV NIa-Pro 基因 mRNA 的相对表达情况，对样品中 PRSV 的积累量进行实时定量分析，反应条件为：95 ℃预变性 30 s；95 ℃ 3 s，61 ℃ 25 s，共 40 个循环。每个样品设 2 个技术重复。相对表达量按 $2^{-\Delta\Delta ct}$ 法计算，由荧光定量 PCR 仪的检测系统软件自动完成。

2　结果与分析

2.1　dsRNA 原核表达工程菌株的构建

以 PRSV 全长 cDNA 克隆 pG-J 为模板，使用设计引物扩增 PRSV HC-Pro 基因 3′端 824 bp 区段，PCR 扩增产物的电泳结果表明扩增产物的大小与预期大小一致，命名为：H824。利用 OZ-LIC 法构建含有 PDK 内含子的发夹 RNA 编码结构，经筛选、提取质粒及 *Sal* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ双酶切，产生的片段大小与设计的发夹 RNA 编码结构大小一致，将重组质粒命名为：pRNAi-H824。

经发夹 RNA 编码结构与 pSP73 载体重组、转化、筛选鉴定初步获得阳性克隆，送 Invitrogen（上海）公司测序，测序结果显示插入 pSP73 载体的含 PDK 内含子的发夹 RNA 编码结构序列均与设计序列一致，将 dsRNA 原核表达载体命名为：pSP73-RNAi-H824。将 pSP73-RNAi-H824 转入 M-Jm109LacY 菌株感受态细胞，经筛选、提取质粒及 *Sal* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ双酶切鉴定，产生的片段与设计的发夹 RNA 编码结构大小一致，将 dsRNA 原核表达工程菌株命名为：M-Jm109LacY/pSP73-RNAi-H824。

2.2　dsRNA 的表达分析

使用 IPTG 诱导工程菌株 M-Jm109LacY/pSP73-RNAi-H824 和 M-Jm109LacY/pSP73 表达，获得相应的 RNA 样品。酶解分析结果如图 2 所示，转入空载体的对照工程菌株 RNA 样品经 DNase Ⅰ和 RNase A 先后处理后被消化，而转入重组载体的工程菌株 RNA 样品经 DNase Ⅰ和 RNase A 先后处理后不被消化，说明样品中主要是 dsRNA，其大小与预期一致，获得的 dsRNA 样品命名为：H824-dsRNA。

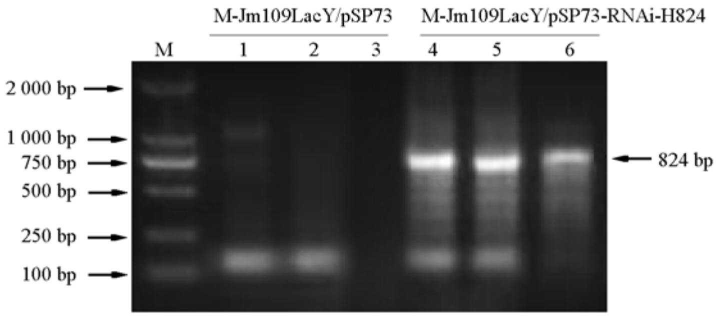

图 2　Trizol 法提取的 dsRNA 样品及其经 DNase I 和 RNase A 消化分析结果

M：DL2000 DNA marker；1、4：利用 Trizol 法由 M-Jm109LacY/pSP73 和 M-Jm109LacY/pSP73-RNAi-H824 中提取的 RNA 样品；2、5：DNase I 处理过的上述 RNA 样品；3、6：RNase A 处理过的上述 DNase I 处理液。

Fig. 2　Digestion analysis with DNase I and RNase A

M：DL2000 DNA marker；1，4：Extracts from M-Jm109LacY/pSP73 and M-Jm109LacY/pSP73-RNAi-H824 induced with IPTG by Trizol method；2，5：Digested products of extracts as above with DNase I；3，6：Digested products of DNase I digesting podocts as above with RNase A.

2.3　H824-dsRNA 处理后番木瓜植株的发病情况

保护性处理中，接种 PRSV 后 18 d 时对照组的番木瓜植株顶部叶片开始表现番木瓜环斑病症状，19 d 时全部发病；喷洒 H824-dsRNA 的处理组植株中有 15 株在接种 PRSV 后 30 d 内不发病，另外 15 株发病也晚于对照组（表 2）。接种 PRSV 后 30 d，喷洒 H824-dsRNA 粗制品的处理组发病率（50%）明显低于对照组（100%）。不同处理植株的症状表现见图 3，A。

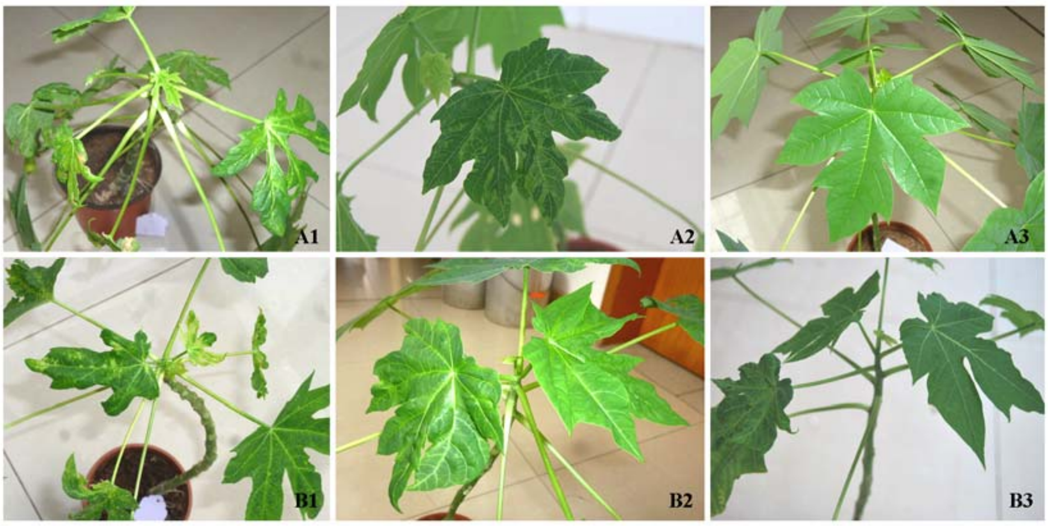

图 3　保护处理（A）和治疗性处理（B）番木瓜植株的症状表现

A：接种 PRSV 后 30 d 保护性处理（A1. 对照，发病严重；A2. 保护处理，发病较轻；A3. 保护处理，没有发病）。

B：喷洒 H824-dsRNA 粗制品后 10 d 治疗性处理（B1. 对照，症状加重；B2. 治疗性处理，部分叶片回绿；B3. 治疗性处理，新生叶片不发病）。

Fig. 3　Results of protective experiments（A）and therapeutic experiments（B）

A：Incidence of protective experimental papaya plants on the 30th day after inoculation with PRSV（A1. Control，serious symptoms；A2. Protective treatment，lighter symptoms；A3. Protective treatment，without symptoms）.

B：Incidence of therapeutic experimental papaya plants on the 10th day after Spraying with H824-dsRNA（B1. Control，serious symptoms；B2. Experimental papaya plant with some regreening leaves；B3. Experimental papaya plant with some new leaves without symptoms）.

表 2　喷洒 H824-dsRNA 的番木瓜植株在接种 PRSV 后 30 d 内的发病数量

Table 2　Incidence of papaya plants sprayed with H824-dsRNA in 30 days after inoculation with PRSV

接种后的天数 Days after inoculation	新增发病植株数量 Increased number of plants with symptoms		接种后的天数 Days after inoculation	新增发病植株数量 Increased number of plants with symptoms	
	处理组 Experimental	对照组 Control		处理组 Experimental	对照组 Control
1 ~ 17	0	0	25	1	0
18	0	17	26	2	0
19	0	13	27	2	0
20	2	0	28	0	0
21	1	0	29	3	0
22	0	0	30	1	0
23	1	0	总计 Total	15	30
24	2	0			

治疗性处理中，在 18 d 内，对照组的番木瓜环斑病症状呈现逐渐加重的趋势，由最初出现水浸斑、花叶发展到叶片卷曲皱缩、新生叶片出现畸形；喷洒 H824-dsRNA 粗制品的处理组在处理 10 d 前后有部分植株出现症状减轻的现象，有部分叶片回绿，有的植株新生叶片表现为正常（图 3，B），但随后症状逐渐重现，并加重。

2.4　H824-dsRNA 处理后番木瓜植株中的病毒滴度

保护性处理中阴性对照的 $A_{405\ nm} = 0.102 \pm 0.008$。对照组 3、6 和 9 d 的样品 ELISA 检测结果均为阴性，12 d 及以后的样品 ELISA 检测结果为阳性，且病毒滴度随天数的增加不断提高；喷洒 H824-dsRNA 粗制品的处理组 ELISA 检测结果出现阳性的时间（18 d）晚于对照，且各样品中的病毒滴度均比同时间的对照组样品低（$P < 0.01$，图 4）。

治疗性处理中阴性对照的 $A_{405\ nm} = 0.106 \pm 0.011$，对照组样品中的病毒滴度随天数的增加不断提高，而喷洒 H824-dsRNA 粗制品的处理组 3 ~ 9 d 的样品中病毒滴度低于对照，但随后病毒滴度逐步升高，至 12 d 时与对照相比已无明显差别（$P > 0.05$，图 5）。

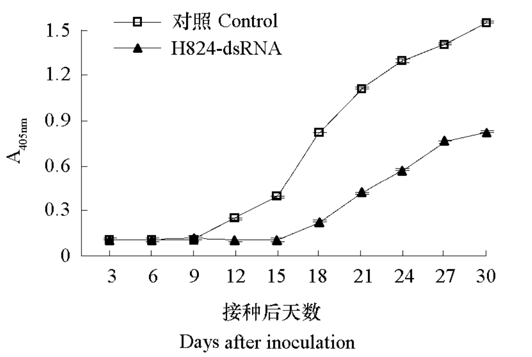

图 4　接种 PRSV 后保护性处理 DAS-ELISA 分析结果

Fig. 4　DAS-ELISA results of protective experimental papaya plants after inoculation with PRSV

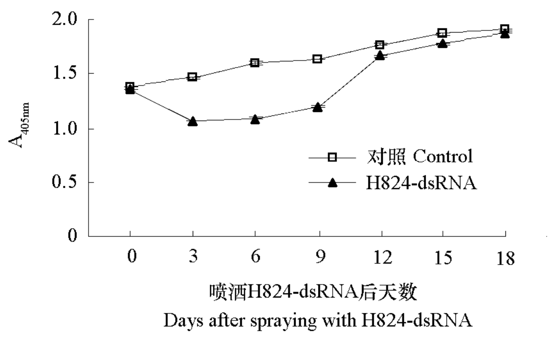

图 5　喷洒 H824-dsRNA 后治疗性处理 DAS-ELISA 分析结果

Fig. 5　DAS-ELISA results of therapeutic experimental papaya plants after spraying with H824-dsRNA

2.5　H824-dsRNA 处理后番木瓜植株中 *PRSV NIa-Pro* 的相对表达量

保护性处理中各组各时间点叶片样品中 *PRSV NIa-Pro* 相对表达量检测结果如图 6，对照组接种后 12 d 开始检测到 PRSV，之后持续增加；喷洒 H824-dsRNA 粗制品的处理组在接种后 18 d 时才开始检测到 PRSV，其积累量较同时间的对照低（$P < 0.01$）。

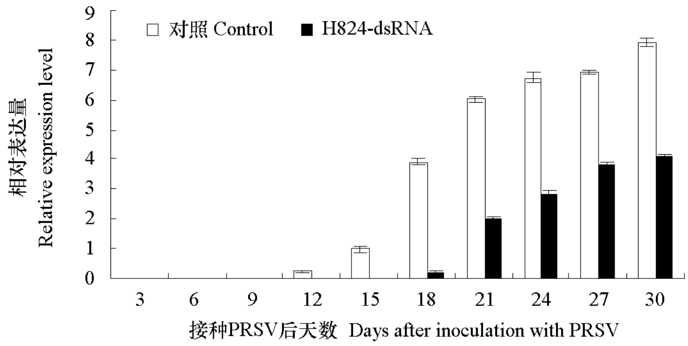

图 6　保护性处理的番木瓜接种 PRSV 后植株中 *PRSV NIa-Pro* 相对表达量

Fig. 6　Relative expression levels of *PRSV NIa-Pro* in protective experimental papaya plants after inoculation with PRSV

治疗性处理各组各时间点叶片样品中 *PRSV NIa-Pro* 相对表达量检测结果如图 7，对照组番木瓜植株中的 PRSV 积累量持续增加，喷洒 H824-dsRNA 粗制品的番木瓜植株处理后 3 d PRSV 的积累量较其喷洒前有所降低，但随后逐步提高，至 12 d 时与对照已无明显差别（$P > 0.05$）。

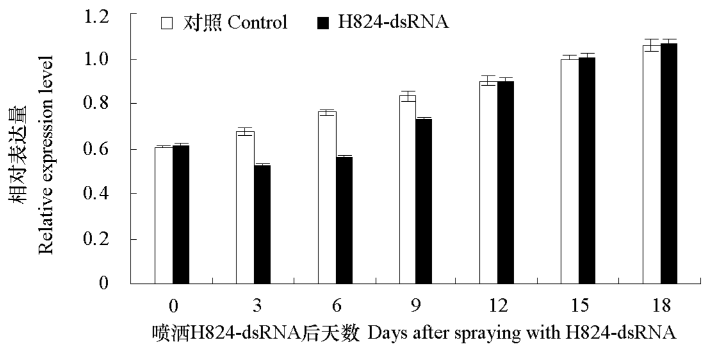

图 7　喷洒 dsRNA 粗制品后治疗性处理番木瓜植株中 *PRSV NIa-Pro* 相对表达量

Fig. 7　Relative expression levels of *PRSV NIa-Pro* in therapeutic experimental papaya plants after spraying with H824-dsRNA

3　讨论

HC-Pro 是马铃薯 Y 病毒属的一种多功能蛋白，能参与蚜虫传毒（Blanc et al.，1998；Peng et al.，1998），影响病毒的复制与系统移动（Cronin et al.，1995；Kasschau et al.，1997），参与病毒间的协同作用（Pruss et al.，1997；Shi et al.，1997），抑制基因沉默（Kasschau & Carrington，1998）等，可在多个方面影响病毒的为害。

dsRNA 介导的 RNA 沉默属于转录后基因沉默（post-transcriptional gene silencing，PTGS），要求 dsRNA 的序列与被沉默的基因有高度的同源性（Sijen & Kooter，2000）。Hammond 等（2000）的研究结果表明，越长的 dsRNA 诱发的沉默效果越明显。为兼顾 dsRNA 的沉默效力和宿主细胞的代谢负荷，本研究中利用与 PRSV HC-Pro 基因 3′端 824 bp 区段（2 274 ~ 3 097）同源的 dsRNA 处理番木瓜植株，保护性抗病毒试验表明该 824 bp 的 dsRNA 能够抑制病毒的积累，诱发针对病毒基因的沉默效应。dsRNA 作为 RNA 沉默的效应物，可以通过多种途径提供给植物细胞。张帆和姜玲（2011）、魏军亚等（2008）通过构建包含目的基因正、反向序列的植物表达载体，并转入植物使其获得自身表达 dsRNA 的能力，抗病性试验证明转基因植物表达的 dsRNA 能够引发 RNA 沉默，但由于转基因植物存在的生态风险和食品安全性问题，其应用前景不容乐观。大肠杆菌的 RNaseIII（由 rnc 基因编码）具有识别和切割 dsRNA 的能力（MacRae & Doudna，2007），不能用于表达 dsRNA。

通过分子生物学技术可获得 rnc 基因突变或缺失的大肠杆菌菌株，缺陷菌株不能降解 dsRNA，可用于 dsRNA 的表达。以大肠杆菌为代表的原核表达系统因具有遗传背景清楚、基因操作容易、培养周期短、成本低、目的基因表达水平高、易于规模化等优点，且无潜在的生态风险和食品安全问题，极具发展潜力。现有研究中的 dsRNA 原核表达系统大多是利用大肠杆菌 HT115（DE3）菌株构建的，该菌株是通过在 rnc 基因内插入 Tn10 转座子获得的 RNaseIII缺陷型菌株，易发生回复突变（Timmons et al.，2001）。尹国华等（2009）通过敲除大肠杆菌 JM109（DE3）菌株的 *rnc* 基因，获得了能高效表达 dsRNA 的大肠杆菌突变体 M-JM109lacY。本研究中即选择 M-JM109lacY 菌株为表达 dsRNA 的稳定高效宿主菌，成功表达了与 PRSV HC-Pro 基因同源的 dsRNA。

目前，已有多种 dsRNA 通过原核系统被成功表达（Tenllado et al.，2003；张德咏 等，2008；尹国华 等，2009；郑海刚和陈启建，2011），dsRNA 不易被 RNase A 消化，稳定性好。在已报道的研究中，dsRNA 多是通过与对应的病毒混合物共同摩擦接种进入植株叶片诱发 RNA 沉默的，植株的抗病率可达 60%，有的能完全抑制病毒的侵染（Tenllado et al.，2003；尹国华 等，2009；郑海刚和陈启建，2011）。摩擦接种 dsRNA 虽然能使植物获得抗病毒能力，但其操作步骤繁琐，不便于在实际生产中应用。Tenllado 等（2003）利用辣椒轻度斑驳病毒（*Pepper mild mottle virus*，PMMoV）复制酶基因序列（IR54）构建了能产生发夹结构的原核表达载体 pGEM/IR54，将其转入大肠杆菌 HT115（DE3）菌株后得到原核表达系统 HT115（DE3）/IR54，经 IPTG 诱导表达后使用细胞高压破碎仪破碎工程菌细胞制备 dsRNA 粗提液，将其直接喷洒在叶片表面上，抗病毒检测结果显示使用 dsRNA 粗提液喷洒叶面可以保护植株在一个生长周期内免受 PMMoV 病毒侵染。张德咏等（2008）以黄瓜花叶病毒（*Cucumber mosaic virus*，CMV）AN 株系 CP 基因为中间间隔序列，分别构建了含有 CMV P3613 株系 RNA2 片段和 MP 基因反向重复片段的原核表达载体，转入大肠杆菌 HT115（DE3）菌株后使用 IPTG 诱导表达，再利用超声波破碎表达 dsRNA 的工程菌细胞，而后直接将细胞破碎液喷洒在烟草叶片上进行保护和治疗试验，结果表明含 dsRNA 的细菌破碎液能够诱导烟草对 CMV 产生抗性，接种病毒 60 d 后保护效果试验病株率分别为 45%和 60%，治疗效果试验病株率分别为 75%和 85%。

与摩擦接种 dsRNA 的方法相比，叶面喷洒的方法操作十分简便，非常适合在生产中推广。本研究中利用细胞高压破碎仪由原核表达工程菌制备了稳定的 H824-dsRNA 粗提物，通过叶面喷洒的方式对番木瓜植株进行了保护性处理和治疗性处理，保护性处理结果表明喷洒 H824-dsRNA 能够抑制 PRSV 的积累、推迟发病，植株在接种病毒 30 d 后有 50%的植株不发病，为开发绿色、廉价、便捷、有效的番木瓜环斑病毒生物制剂奠定了研究基础。

治疗性处理的抗病毒试验结果表明喷洒 H824-dsRNA 粗制品仅能使已感染病毒的番木瓜植株中 PRSV 积累量发生短暂降低，随后病毒积累量又迅速恢复至对照水平，与张德咏等（2008）研究中治疗性处理的抗病效果明显低于保护性处理的结果相似，接种病毒和喷洒 dsRNA 粗提物的时间间隔长短可能会影响治疗性处理的抗病效果，其机理还有待于进一步研究。

References

Blanc S，Ammar E D，Garci'a-Lampasona S，Dolja V V，Llave C，Baker J，Pirone T P. 1998. Mutations in the potyvirus helper component protein：Effects on interaction with virions and aphid stylets. J Gen Virol，79：3119 – 3122.

Cronin S，Verchot J，Haldeman-Cahill R，Schaad M C，Carrington J C. 1995. Long-distance movement factor：A transport function of the potyvirus helper component proteinase. Plant Cell，7：549 – 559.

Hammond S M，Bernstein E，Beach D，Hannon G J. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature，404：293 – 296.

MacRae I J，Doudna J A. 2007. Ribonuclease revisited：Structural in sights into ribonuclease III family enzymes. Curr Opin Struct Biol，17 (1)：138 – 145.

Kasschau K D，Carrington J C. 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses：Suppression of posttranscriptional gene silencing. Cell，95：461 – 470.

Kasschau K D，Cronin S，Carrington J C. 1997. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. Virology，228：251 – 262.

Peng Y-h，Kadoury D，Gal-On A，Huet H，Wang Y，Raccah B. 1998. Mutations in the HC-Pro gene of *Zucchini yellow mosaic potyvirus*：Effects on aphid transmission and binding to purified virions. J Gen Virol，79：897 – 904.

Pruss G，Ge X，Shi X M，Carrington J C，Vance V B. 1997. Plant viral synergism：The potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. Plant Cell，9：859 – 868.

Shi X M，Miller H，Verchot J，Carrington J C，Vance V B. 1997. Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase（HC-Pro）eliminate potato virus X：Potyviral synergism. Virology，231：35 – 42.

Sijen T，Kooter J M. 2000. Post-transcriptional gene-silencing：RNAs on the attack or on the defense? Bioessays，22 (6)：520 – 531.

Tenllado F，Martínez-García B，Vargas M，Díaz-Ruíz J R. 2003. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. BMC Biotechnology，3：3 – 13.

Timmons L，Court D L，Fire A. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. Gene，263 (1 – 2)：103 – 112.

Wei Jun-ya，Liu De-bing，Chen Ye-yuan，Cai Qun-fang，Zhou Peng. 2008. Transformation of PRSV-CP dsRNA gene into papaya by pollen-tube pathway technique. Acta Bot Boreal-Occident Sin，28 (11)：2159 – 2163. (in Chinese)

魏军亚，刘德兵，陈业渊，蔡群芳，周　鹏. 2008. 花粉管通道法介导 PRSV-CP 基因 dsRNA 转化番木瓜. 西北植物学报，28 (11)：2159 – 2163.

Xiao Huo-gen，Fan Huai-zhong. 1996. Advances of research on the strains，molecular biology and control of *Papaya ringspot virus*. Virologica Sinica，11 (2)：103 – 109. (in Chinese)

肖火根，范怀忠. 1996. 番木瓜环斑病毒株系、分子生物学及其防治研究进展. 中国病毒学，11 (2)：103 – 109.

Xu G，Sui N，Tang Y，Xie K，Lai Y，Liu Y. 2010. One-step，zero-background ligation-independent cloning intron-containing hairpin RNA constructs for RNAi in plants. New Phytol，187 (1)：240 – 250.

Yin Guo-hua，Liu Nan，Sun Zhao-nan，Song Yun-zhi，Zhu Chang-xiang，Wen Fu-jiang. 2009. Knock-out the rnc gene of *E. coli* using red-mediated recombination for construction of dsRNA prokaryotic expression system. Journal of Shandong Agricultural University：Natural Science，40 (3)：461 – 464. (in Chinese)

尹国华，刘　楠，孙兆楠，宋云枝，朱常香，温孚江. 2009. 利用 Red 重组系统敲除大肠杆菌 *rnc* 基因构建 dsRNA 原核表达体系. 山东农业大学学报：自然科学版，40 (3)：461 – 464.

Yin Guo-hua，Liu Nan，Sun Zhao-nan，Song Yun-zhi，Zhu Chang-xiang，Wen Fu-jiang. 2009. Production of double-stranded RNA rof interference with TMV infection utilizing a bacterial prokaryotic expression system. Appl Microbiol Biotechnol，84：323 – 333.

Zhang De-yong，Zhu Chun-hui，Cheng Fei-xue，He Ming-yuan，Zhang Zhan-hong，Liu Yong. 2008. Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect tobaccos against CMV infections. Acta Phytopathologica Sinica，38 (3)：304 – 311. (in Chinese)

张德咏，朱春晖，成飞雪，何明远，张战泓，刘　勇. 2008. 表达 dsRNA 的细菌提取液可抑制黄瓜花叶病毒对烟草的侵染. 植物病理学报，38 (3)：304 – 311.

Zhang Fan，Jiang Ling. 2011. Virus-resistance of *Papaya ringspot virus* mediated by double-strand RNA. Plant Science Journal，29 (3)：385 – 391. (in Chinese)

张　帆，姜　玲. 2011. dsRNA 介导的番木瓜环斑病毒（PRSV）的抗病性研究. 植物科学学报，29 (3)：385 – 391.

Zheng Hai-gang，Chen Qi-jian. 2011. Inhibition of crude extracts of extracted dsRNA by induction on the *Cucumber green mottle mosaic virus*. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University：Natural Science Edition，40 (4)：346 – 350. (in Chinese)

郑海刚，陈启建. 2011. 诱导提取的 dsRNA 粗提液对黄瓜绿斑驳花叶病毒的抑制作用. 福建农林大学学报：自然科学版，40 (4)：346 – 350.