

· 基础研究 ·

重组腺病毒过表达 Notch1 受体胞内结合域(NICD1)外源性激活 Notch 信号通路

廖军义¹, 杜婷婷², 黄伟¹, 何通川³, 徐伟^{1*}¹重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016; ²重庆市第七人民医院内分泌与肾病科, 重庆 400054; ³芝加哥大学医学中心分子肿瘤实验室, 伊利诺伊州 芝加哥 60637, 美国

[摘要] 目的: 构建 Notch1 受体胞内结合域(Notch1 intracellular domain, NICD1)的重组腺病毒 AdNICD1, 探讨外源性过表达 AdNICD1 对 Notch 信号通路激活的影响。方法: 利用高保真 PCR(high fidelity PCR, Hi-Fi PCR)扩增 NICD1 编码区, 并通过 Gibson Assembly 方法将其克隆至腺病毒载体中, 经过菌落 PCR、测序鉴定后, 在大肠杆菌 BJ5183 中进行同源重组, 再次通过质粒 PCR 鉴定, 然后运用 *Pac I* 酶切线性化后用重组腺病毒载体转染过表达 pTP 基因的人胚肾 293 细胞(human embryo kidney 293 cell line, HEK293)中进行包装, 收取病毒后使用过表达 pTP 基因的 HEK293 细胞扩增重组腺病毒 AdNICD1。运用 AdNICD1 感染脂肪来源的间充质干细胞(imortalized multipotent adipose-derived mesenchymal stem cells, iMAD), 检测病毒感染效率; 通过 Q-PCR 检测 NICD1 和 Notch 下游基因表达情况; 利用 Western blot 检测 NICD1 在蛋白水平的表达情况。结果: 成功构建过表达 NICD1 的重组腺病毒并有效感染 iMAD; 利用 AdNICD1 可明显增加 NICD1 在基因和蛋白水平的表达, 并激活 Notch 信号下游基因的表达。结论: 成功构建过表达 NICD1 的重组腺病毒, 并有效激活 Notch 信号通路。

[关键词] Notch1 受体胞内结合域; 重组腺病毒; Notch 信号通路**[中图分类号]** R392.11**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)03-320-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20190302

Recombinant adenovirus mediated overexpression of Notch1 intracellular domain (NICD1) stimulates the activation of Notch signaling pathway

Liao Junyi¹, Du Tingting², Huang Wei¹, He Tongchuan³, Xu Wei^{1*}¹Department of Orthopaedic Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016; ²Department of Endocrinology and Nephrology, the Seventh People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400054; ³Molecular Oncology Laboratory, the University of Chicago Medicine, Chicago, Illinois 60637, USA

[Abstract] **Objective:** To construct and identify the recombinant adenovirus AdNICD1 carrying Notch1 intracellular domain (NICD1) and observe the influence of the overexpression of AdNICD1 on the activation of Notch signaling pathway. **Methods:** NICD1 coding area was amplified by high fidelity PCR (Hi-Fi PCR) and then subcloned to recombinant adenovirus vector by Gibson assembly. Bacteria screening and gene sequencing were used to make sure NICD1 was subcloned to recombinant adenovirus vector accurately. And then the plasmid was transfected into BJ5183 to complete homogenous recombination and generate recombinant adenovirus plasmid pAdNICD1. pAdNICD1 was identified by plasmid screening and linearized by *Pac I* enzyme, and then transfected to human embryo kidney 293 cell line (HEK293) for packaging. The packaged AdNICD1 were collected and amplified stepwisely. Immortalized multipotent adipose-derived mesenchymal stem cells (iMAD) were infected by AdNICD1, and the infection efficiency was tested. QPCR and Western blot were used to detect the expression of NICD1, and the downstream gene expression of Notch signaling pathway was determined by QPCR. **Results:** NICD1 was successfully subcloned to the recombinant adenovirus vector, and AdNICD1 was successfully packaged and amplified in HEK293 cell line. The overexpression of NICD1 was confirmed by QPCR and Western blot in

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81371972, 81572142); 重庆市科委基础研究与前沿探索项目(cstc2018jcyjAX0088); 重庆市研究生科研创新项目(CYB15098); 重庆医科大学附属第一医院院内培育基金资助项目(2018PYJJ-11)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 30545400@qq.com

MSCs. Notch signaling pathway downstream gene expressions were also upregulated by AdNICD1. **Conclusion:** The recombinant adenovirus AdNICD1 was successfully constructed, and overexpression of NICD1 can exogenously activate Notch signaling pathway.

[Key words] Notch1 intracellular domain; recombinant adenovirus; Notch signaling pathway

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(03): 320-325]

Notch 信号通路参与调控一系列生理及病理过程中的生命活动,决定细胞命运、分化、增殖、凋亡、上皮间质转化、血管生成、迁移和黏附等^[1-5]。目前发现,哺乳动物中主要有4种Notch受体(Notch 1~4)和5种Notch配体(Delta 1、Delta 3、Delta 4和Jagged1、Jagged2)。Notch信号在不同生物甚至同一个体的不同部位发挥着不同作用^[1-4]。Notch信号通过胞内分泌将配体分泌到细胞外,然后Notch配体通过细胞外结合域(Notch extracellular domain, NECD)与Notch受体结合,Notch配体和Notch受体结合以后,在 γ 内分泌酶的作用下,跨过胞膜露出Notch受体胞内结合域(Notch intracellular domain, NICD),在CSL(CBF1, suppressor of hairless, Lag-1)的定向引导下NICD定向进入到细胞核内,进而定向整合到双链DNA分子中,激活Notch信号转录因子Hes(Hes1、5、6、7)和Hey(Hey1、2和HeyL),最后实现细胞信号转导和功能^[2,6-8]。也就是说,虽然Notch信号有多种配体和受体,但其中起关键作用的是NICD。因此能否通过重组腺病毒系统来表达NICD,从而直接激活Notch信号通路,最终为Notch信号通路研究提供更加简单和直接的方法。本研究通过重组腺病毒载体构建的相关技术和方法,将NICD1克隆到重组腺病毒载体中,以观察NICD1的表达情况和Notch信号通路的激活情况。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒、细菌穿梭质粒pAdTrace-TO4、同源重组大肠杆菌BJ5183、感受态DH10B由美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤实验室提供,表达NICD1的质粒pcDNA-ICN1由美国哈佛大学医学院Jon C. Aster教授馈赠。

人胚肾293细胞(human embryo kidney 293 cell line, HEK293)购自美国ATCC公司,过表达pTP基因的HEK293细胞、永生化的脂肪来源的间充质干细胞(immortalized multipotent adipose-derived mesenchymal stem cells, iMAD)由美国芝加哥大学医学中心骨科分子肿瘤实验室构建^[9-10]。胎

牛血清(FBS)、DMEM高糖培养基(Gibco公司,美国)。

限制性内切酶*Swa* I、*Pac* I和Gibson Assembly Master Mix、逆转录试剂盒、DNA聚合酶(NEB公司,美国);多克隆山羊抗人NICD1抗体、GAPDH抗体,HRP标记驴抗山羊二抗(Santa Cruz公司,美国);TRIzol试剂、Lipofectamine 2000(Invitrogen公司,美国),SYBR Green Mix(Bimake公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 NICD1片段的扩增和纯化

根据NICD1的全长(NM_017617.4),设计特异性扩增NICD1的引物,并在引物前段和后段的5'端增加与载体质粒的互补序列,即上游5'-AATCG-GAAAGCGGACGCGGAattt accacc atgggcTCCCGCAAG-CGCCGCGGCAGCAT-3',下游5'-AAGCGCTCAC-GGGATACTCGattTTACTTGAAGCCTCCGGAATGC-G-3'(斜体部分为与载体的互补序列,attt为*Swa* I的酶切位点)。反应条件为:96℃ 45 s;92℃ 20 s,55℃ 30 s,70℃ 60 s,共循环26次;70℃ 5 min;12℃ 保存。特异性扩增NICD1后,胶回收特异性的NICD1片段并通过PC-8纯化备用。

1.2.2 重组腺病毒载体AdNICD1的构建

用*Swa* I消化载体质粒后,将NICD1与*Swa* I消化后的质粒混合,将Gibson Assembly反应液Master Mix与载体和NICD1片段在50℃水浴中反应50 min,乙醇沉淀回收DNA。将回收的DNA电转染感受态DH10B,在卡那霉素平板上过夜,挑选细菌做菌落PCR鉴定(引物:上游5'-CGGCATGGTGCC-GAACCAATACAAC-3',下游5'-AAGCGCTCACGG-GATACTCGATT-3'),将阳性菌落扩增后,提取质粒再次行质粒PCR鉴定。将菌落PCR和质粒PCR均阳性的质粒纯化后送DNA测序,并通过Blast比对。将pAdtrace-NICD1转染大肠杆菌BJ5183并进行同源重组,挑选菌落进行鉴定和扩增,并通过PCR鉴定(引物:上游5'-CGGCATGGTGCCGAAC-CAATACAAC-3',下游5'-AAGCGCTCAC-GGGATACTCGATT-3'),然后通过酶切鉴定和线性化后进行下一步包装。

1.2.3 重组腺病毒 AdNICD1 的包装、纯化后滴度测定

将用 *Pac* I 酶切线性化后的重组腺病毒按照 Lipofectamine 2000 说明书要求转染过表达 pTP 基因的 HEK293 细胞,在不同时间点观察过表达 pTP 基因的 HEK293 细胞的荧光表达情况,待大多数细胞出现细胞病理效应 (cytopathic effect, CPE) 后,运用反复冻融的方法收取腺病毒。将收取的腺病毒再次感染过表达 pTP 基因的 HEK293 细胞,并观察荧光表达情况,待大多数细胞出现 CPE 后再次收取腺病毒,如此重复多次,获得高滴度的重组腺病毒。使用 CsCl 梯度离心纯化收取重组腺病毒备用。

1.2.4 重组腺病毒感染小鼠脂肪来源间充质干细胞 (iMAD)

将 iMAD 细胞在含 10% FBS 的完全培养基中培养并传代,传代后 4~6 h 待细胞贴壁后将 AdNICD1 按照感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 的 50~200 倍感染 iMAD 细胞,48 h 后观察红色荧光表达情况。

1.2.5 检测 iMAD 外源性 NICD1 mRNA 水平和蛋白水平的表达

将 iMAD 细胞在 6 孔板中培养,按照上述方法感染细胞后 (48 h 荧光量约为 30%~40%),按照 TRIzol 试剂说明提取细胞总 RNA,经逆转录后进行 Q-PCR 检测,引物设计如下:上游 5'-CCTGAGGGCTTCAAAGTGTC-3',下游 5'-CGGAACCTTCTGGTCTCCAG-3'。内参 GAPDH 引物设计如下:上游 5'-GCCTCGTCCCCTAGACAAA-3',下游 5'-TTCCCATCTCGGCCCTTGAC-3'。

按照上述方法用 AdNICD1 感染 iMAD 细胞后 48 h 提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度后加上样缓冲液,煮沸使蛋白变性,使用 SDS-PAGE 胶分离蛋白,使用电转仪将蛋白转移到 PVDF 膜中,转膜后使用脱脂奶粉封闭,然后孵育一抗 (多克隆山羊抗人 NICD1 抗体,1:200),充分洗涤后孵育二抗 (1:1 000),洗膜后进行化学发光显影,每组实验重复 3 次。

1.2.6 Notch 下游基因表达检测

如前所述提取 iMAD 细胞感染 AdNICD1 48 h 后的总 RNA,以 AdGFP 作为对照,经逆转录后进行 QPCR 检测 Notch 下游基因 Hey1 和 Hey2 的表达情况,以 β -actin 作为阴性对照。引物设计如下:Hey1 上游 5'-CTCTGTGGCCTCGCTCTC-3',下游 5'-CGATCTCTGTCCCCAA-3';Hey2 上游 5'-CAGCTGCACACAGCTTCC-3',下游 5'-CTGCGGATACCGACAAGG-3'; β -actin 上游 5'-CTGGCTCCTAGCAC-

CATGA-3',下游 5'-CCTGCTTGCTGATCCACAT-3'。

2 结果

2.1 PCR 扩增 NICD1 基因片段

运用高保真 PCR 从 pcDNA-ICN1 质粒中扩增 NICD1 片段,将 5 个反应体系混合,取其中 10 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳检测,大小与 NICD1 2 406 bp 相符 (图 1),剩余 90 μ L 进行胶回收、纯化后进行 Gibson Assembly 反应。

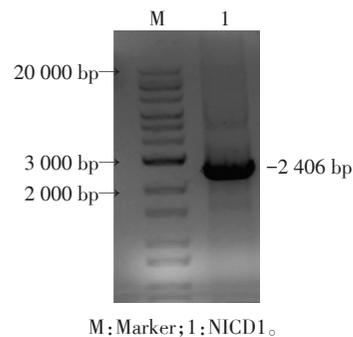


图1 高保真 PCR 扩增 NICD1 基因片段

Figure 1 Amplification of NICD1 with Hi-Fi PCR

2.2 重组腺病毒 AdNICD1 的构建和鉴定

将载体质粒用限制性内切酶 *Swa* I 消化后,将其与 NICD1 片段和 Gibson Assembly Master Mix 混合后反应,然后电转感受态细菌 DH10B,并置于带有卡那霉素的 LB 平板上过夜,挑选可能阳性克隆进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性菌落 (图 2),所挑选菌落均为阳性,扩增片段大小与预期大小相符。将阳性菌落再次扩增,PCR 鉴定后,纯化,送 DNA 测序,测序结果在 Pub Med Blast 软件上进行比对无误后进行同源重组。

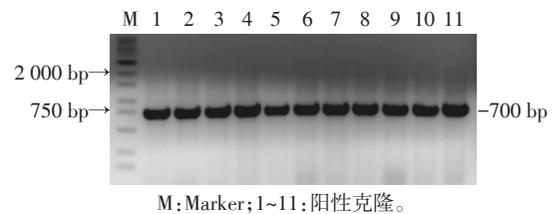
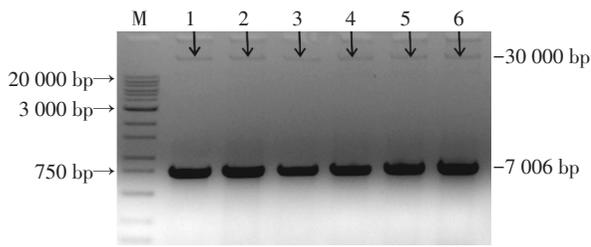


图2 菌落 PCR 筛选阳性克隆

Figure 2 Screening positive colonies by colony PCR

将测序鉴定的阳性克隆电转大肠杆菌 BJ5183 进行同源重组,重组后扩增菌落并提取质粒进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,重组成功的菌落再次进行质粒 PCR 鉴定 (图 3),从图 3 中可以看出,PCR 扩增片段大小约 700 bp,与预期大小相符,同时可以看到大小约 30 000 bp 的质粒条带 (图 3 箭头所示),提示重组



M: Marker; 1~6: 阳性质粒。箭头所示为重组成功质粒。

图3 质粒PCR筛选成功重组克隆

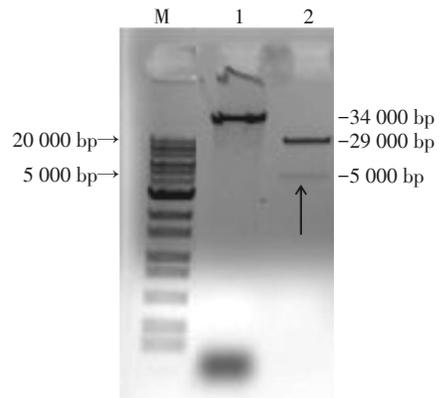
Figure 3 Screening the recombinant adenovirus colonies by plasmid PCR

成功。

将成功重组的腺病毒用 *Pac* I 进行酶切,在载体质粒中存在2个 *Pac* I 酶切位点,在质粒上相距约5 000 bp,如图4所示,可见酶切后存在2个片段,小片段大小约5 000 bp,与酶切位点设计相符。使用 *Pac* I 酶切后释放腺病毒的左臂和右臂,线性化后使用化学转染入 HEK293 细胞进行包装。

2.3 AdNICD1 的包装、扩增和感染效率测定

将线性化的重组腺病毒转染入过表达 pTP 基因的 HEK293 细胞后 2 d,在荧光显微镜下可以看到红



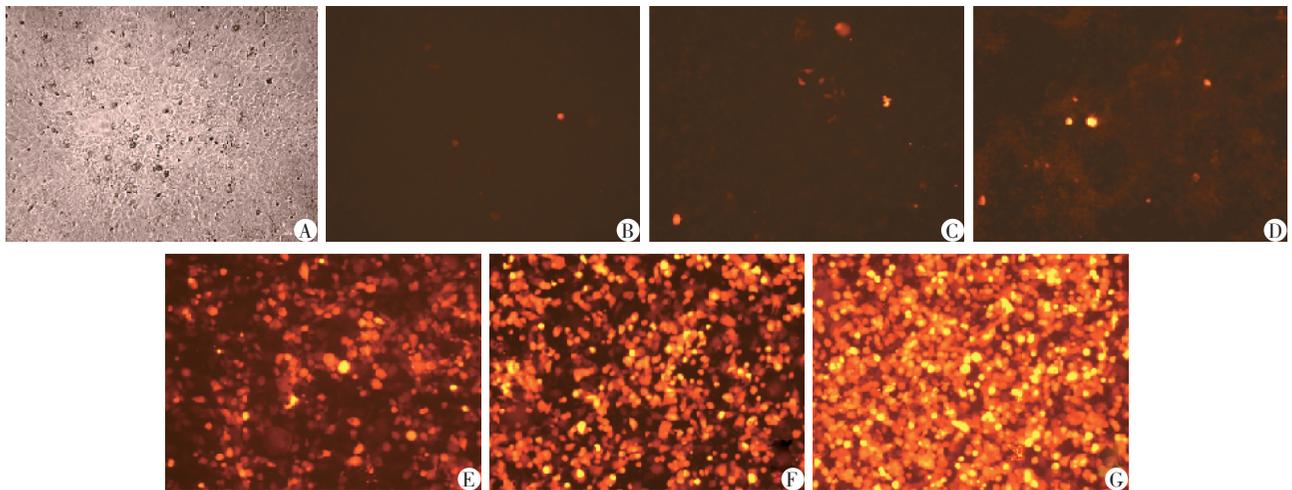
M: Marker; 1: 酶切前; 2: 酶切后。

图4 *Pac* I 酶切鉴定并线性化重组腺病毒载体

Figure 4 *Pac* I digestion to identify and linearize recombinant adenovirus vectors

色荧光表达(图5A、B),随着时间延长,红色荧光逐渐增多,感染细胞出现细胞病理效应(图5C、D),采用反复冻融的方法收取包装完成的重组腺病毒,并继续用于感染过表达 pTP 基因的 HEK293 细胞扩增,随着扩增次数的增加,荧光强度不断增强(图5E~G)。

将收取的腺病毒经 CsCl 密度梯度离心纯化后,



A、B:线性化的重组腺病毒转染入过表达 pTP 基因的 HEK293 细胞后 2 d,在荧光显微镜下可以看到红色荧光的表达;C、D:第 5 天(C)和第 7 天(D)细胞逐渐出现细胞病理效应;E~G:将收取的病毒再次感染过表达 pTP 基因的 HEK293 细胞,第 1 轮扩增(E)、第 2 轮扩增(F)、第 3 轮扩增(G)情况。

图5 AdNICD1 的包装和扩增

Figure 5 Packaging and amplification of AdNICD1

适量添加到刚贴壁的 iMAD 细胞中,24 h 后观察红色荧光表达情况,如图6所示,随着加入病毒量的增加,感染效率逐渐增加,提示 AdNICD1 可以成功感染干细胞。

2.4 AdNICD1 感染干细胞后 NICD1 的表达

运用重组腺病毒 AdNICD1 感染 iMAD 细胞后,在不同时间点检测 NICD1 表达情况,AdNICD1 组

NICD1 明显高于 AdGFP 组 ($P < 0.01$, 图7),且这种高表达从第3天一直持续到感染后第9天,在第5天时最高,第7天开始下降。以上提示,运用 AdNICD1 外源性过表达 NICD1 可以明显增加 NICD1 mRNA 的表达,且这种高表达可以持续到感染后 9 d。同时,运用 Western blot 检测 AdNICD1 感染 iMAD 细胞后 3 d NICD1 蛋白的表达,以 AdGFP 组为对照,Ad-

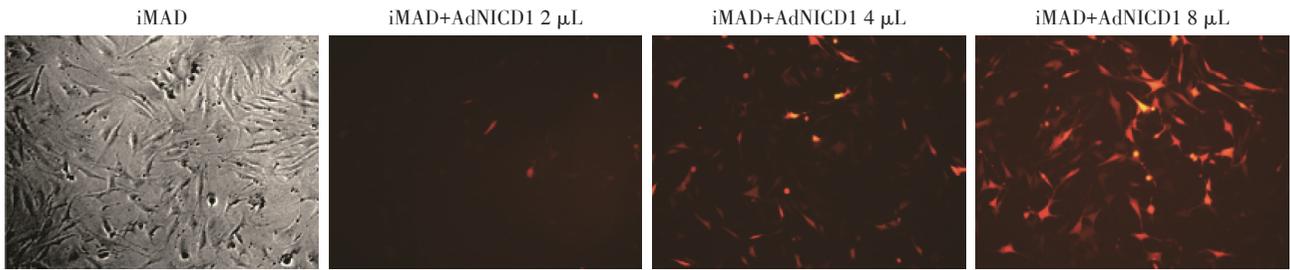


图6 AdNICD1感染脂肪来源间充质干细胞(iMAD)

Figure 6 Infection of adipose-derived mesenchymal stem cell (iMAD) by AdNICD1

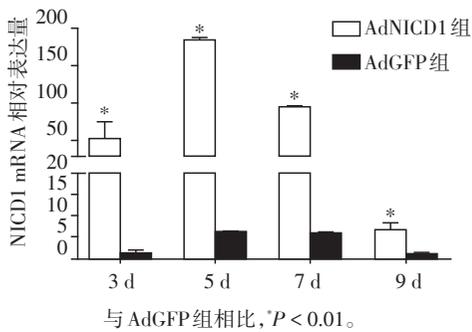


图7 AdNICD1感染iMAD细胞后NICD1 mRNA的表达

Figure 7 Expression of NICD1 mRNA induced by AdNICD1 in iMAD cells

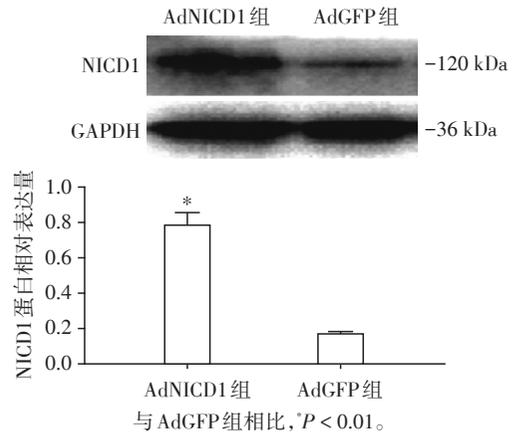


图8 AdNICD1感染iMAD细胞后NICD1蛋白的表达

Figure 8 Expression of NICD1 protein induced by AdNICD1 in iMAD cells

NICD1组NICD蛋白的表达明显高于对照组,经过Quantity One软件进行定量分析也得到了同样的结果($P < 0.01$,图8)。

2.5 AdNICD1对Notch信号通路激活的影响

AdNICD1感染iMAD细胞后,在不同时间点(第3天和第5天)检测Notch信号通路下游因子Hey1和Hey2 mRNA的表达情况,以 β -actin作为内参,与AdGFP组相比在感染后第3天Hey1和Hey2的表达明显增高,到第5天仍持续增高($P < 0.01$,图9)。以上结果提示运用重组腺病毒AdNICD1可以外源性激活Notch信号通路。

3 讨论

Notch信号通路有决定细胞分化、增殖、凋亡、上皮间质转化、血管生成、迁移和黏附等重要功能,

但因Notch信号通路具有多种配体和受体,其激活和行使功能的过程复杂,使Notch信号通路的相关研究具有一定难度^[7,11-12]。根据Notch信号通路激活的原理,本研究成功构建了过表达激活Notch信号通路的功能片段即NICD的重组腺病毒,并证明其能有效激活Notch信号通路,创新性地简化Notch信号通路激活过程,为下一步深入研究Notch信号通路功能奠定了良好基础。

重组腺病毒系统基因表达载体的研究始于20世纪60年代,经过几十年的研究和优化,目前较多采用Luo等^[13]所优化的系统,该系统具有操作步骤简单,构建载体阳性率高,较之前的重组腺病毒系

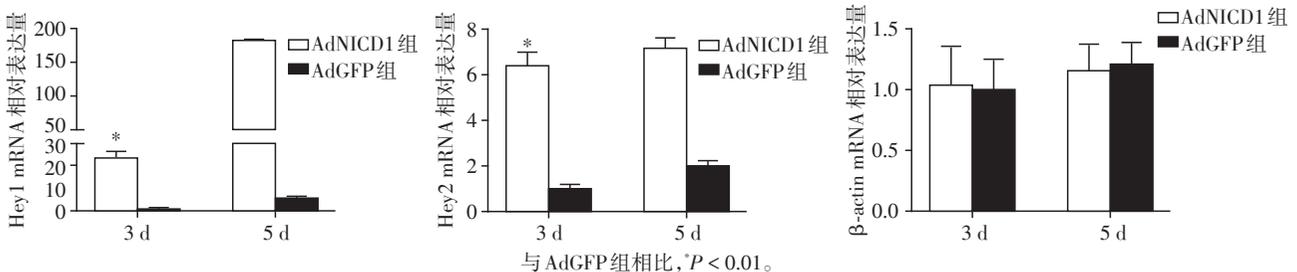


图9 AdNICD1激活Notch信号上调Notch信号通路下游基因

Figure 9 Upregulation of downstream genes in Notch signaling pathway by AdNICD1

统更加简便、快捷,可以反复扩增并高效表达外源基因。本研究也采用这一方法,成功构建了重组腺病毒载体,并通过包装、扩增、纯化等步骤,得到了可外源性激活Notch信号通路的过表达NICD1的重组腺病毒载体。与之前构建的重组腺病毒载体的方法不同,本研究运用了Gibson Assembly的方法^[14-15],与限制性内切酶相比,该方法具有以下优点:①在PCR扩增目的片段DNA后,不需要使用限制性内切酶暴露酶切位点;②该方法只需要一步,在50℃水浴中反应50 min即可将多个线性DNA片段通过互补序列结合在一起,更加简单、快捷、高效;③完成连接后不残留限制性内切酶所导致的多余碱基对,实现“无缝衔接”;④一次反应可以完成最多5个DNA片段的连接;⑤可以实现基因的定点突变,即在特定位点插入碱基实现基因突变。本研究也发现使用Gibson Assembly方法更加简便、快捷,虽然没有将目的基因设计多个具有互补序列的DNA片段,但是目标DNA片段为2 400 bp左右,证实Gibson Assembly系统可以成功地将两个较大的DNA片段进行连接,Gibson Assembly方法的成功运用,为构建基于重组腺病毒的表达载体提供了新的思路与方法。

重组腺病毒的包装和扩增需要用到HEK293细胞,本研究选用了稳定过表达pTP基因的HEK293细胞,与传统HEK293细胞相比,过表达pTP基因的HEK293细胞能更加高效地包装和扩增重组腺病毒,与传统HEK293细胞相比,扩增速率提高了19.3倍^[10],本研究也证实利用过表达pTP基因的HEK293细胞可以在3轮左右得到高浓度的重组腺病毒,进一步缩短了时间,提高了重组腺病毒表达载体构建的效率。

本研究通过Q-PCR和Western blot证实了AdNICD1介导的NICD1在mRNA和蛋白水平的表达,发现AdNICD1介导的NICD1高表达可以持续至感染后9 d,同时可以显著提高Notch信号通路下游转录因子Hey1和Hey2的表达,提示AdNICD1可以外源性地激活Notch信号通路,并且维持一定时间,为研究Notch信号通路激活后的功能提供良好保障。

综上,本研究创新性地结合Gibson Assembly的方法成功构建了过表达NICD1的重组腺病毒AdNICD1,其可在一定时间内持续性地激活Notch信号通路,为下一步基于Notch信号通路激活功能的相关研究提供了简便快捷的方法。

[参考文献]

[1] Zhao YF, Xu J, Wang WJ, et al. Activation of JNKs is es-

sential for BMP9 - induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells [J]. *BMB Rep*, 2013, 46 (8) : 422-427

[2] Yavropoulou MP, Yovos JG. The role of Notch signaling in bone development and disease [J]. *Hormones (Athens)*, 2014, 13(1):24-37

[3] Engin F, Lee B. NOTCHing the bone: insights into multifunctionality [J]. *Bone*, 2010, 46(2): 274-280

[4] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development [J]. *Science*, 1999, 284(5415): 770-776

[5] Liao J, Wei Q, Zou Y, et al. Notch signaling augments BMP9-induced bone formation by promoting the osteogenesis-angiogenesis coupling process in mesenchymal stem cells (MSCs) [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41 (5) : 1905-1923

[6] Fortini ME. Notch signaling: the core pathway and its post-translational regulation [J]. *Dev Cell*, 2009, 16(5) : 633-647

[7] Rizzo P, Miele L, Ferrari R. The notch pathway: a crossroad between the life and death of the endothelium [J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(32): 2504-2509

[8] Bray SJ, Gomez-Lamarca M. Notch after cleavage [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2018, 51: 103-109

[9] Lu S, Wang J, Ye JX, et al. Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) induces effective bone formation from reversibly immortalized multipotent adipose-derived (iMAD) mesenchymal stem cells [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(9): 3710

[10] Wu N, Zhang H, Deng F, et al. Overexpression of Ad5 precursor terminal protein accelerates recombinant adenovirus packaging and amplification in HEK-293 packaging cells [J]. *Gene Ther*, 2014, 21(7): 629-637

[11] Briot A, Bouloumié A, Iruela-Arispe MN, et al. Notch, lipid and endothelial cells [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2016, 27 (5): 513-520

[12] Yavropoulou MP, Yovos JG. The role of Notch signaling in bone development and disease [J]. *Hormones*, 2014, 13 (1): 24-37

[13] Luo J, Deng ZL, Luo X, et al. A protocol for rapid Generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(5): 1236-1247

[14] Bordat A, Houvenaghel MC, German-Retana S. Gibson assembly: an easy way to clone potyviral full-length infectious cDNA clones expressing an ectopic VPg [J]. *Virol J*, 2015, 12: 89

[15] Blawid R, Nagata T. Construction of an infectious clone of a plant RNA virus in a binary vector using one-step Gibson Assembly [J]. *J Virol Methods*, 2015, 222: 11-15