

木薯花叶病毒 AC4 蛋白与 AtPARN 互作研究

刘琳玉^{1,2}, 赵平娟², 符艳², 刘志昕², 任艳利^{1*}, 张秀春^{2*}

1. 伊犁师范大学生物与地理科学学院, 新疆伊宁 835000; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101

摘要: 木薯 (*Manihot esculenta* Crantz) 作为重要的热带作物, 是全球六大粮食作物之一, 并为全球近七亿人口提供主粮, 然而病毒侵染引起的病害在全球范围内严重威胁木薯产业的发展。木薯花叶病毒病 (cassava mosaic disease, CMD) 是最有威胁的病害之一, 造成严重的经济损失。斯里兰卡木薯花叶病毒 (*Sri Lankan cassava mosaic virus*, SLCMV) 是引发木薯花叶病的病原物之一, SLCMV 是典型的双组分双生病毒, 其基因组由 DNA-A 和 DNA-B 两个环状组分组成。无义介导的 mRNA 降解 (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) 是真核细胞 mRNA 降解的主要途径之一, 也是真核生物普遍存在的抗病毒防御机制。越来越多的研究显示, NMD 不仅是真核生物重要的 mRNA 数量、质量调控机制, 还与转录后基因沉默 (post transcriptional gene silencing, PTGS) 同样能降解病毒 RNA, 是真核生物普遍存在的抗病毒防御机制。NMD 的 mRNA 衰减过程包括 PTC 的识别、脱腺苷酸、脱帽和最后的核酸外切酶降解 4 个过程, UPF1、PARN、DCP2 和 XRN4 分别是上述 4 个过程中的关键蛋白。病毒是专性寄生生物, 必须逃避或耐受寄主细胞的降解, 才能成功感染。聚腺苷酸特异性核糖核酸酶 [poly(A)-specific ribonuclease, PARN] 是 NMD 信号通路的一个关键因子。目前, 关于 SLCMV 抵御寄主 NMD 的分子机制尚不明确。本研究采用酵母双杂交 (yeast two-hybrid system) 和荧光双分子互补 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 试验证明斯里兰卡木薯花叶病毒 (SLCMV) 编码的沉默抑制子 AC4 与拟南芥 PARN 相互作用。据此推测 SLCMV AC4 蛋白可能通过与 AtPARN 相互作用而抑制寄主 NMD 的病毒防御功能帮助病毒逃避或耐受寄主细胞的降解。研究结果为阐明木薯花叶病毒调控寄主 NMD 抗病毒防御功能的分子机理奠定基础。

关键词: 斯里兰卡木薯花叶病毒 (SLCMV); AC4 蛋白; 聚腺苷酸特异性核糖核酸酶 (PARN); 酵母双杂交 (Y2H); 荧光双分子互补 (BiFC)

中图分类号: S435.33 文献标识码: A

The Interaction Between Cassava Mosaic Virus AC4 Protein and AtPARN

LIU Linyu^{1,2}, ZHAO Pingjuan², FU Yan², LIU Zhixin², REN Yanli^{1*}, ZHANG Xiuchun^{2*}

1. School of Biological and Geographical Sciences, Yili Normal University, Yining, Xinjiang 835000, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: As an important tropical crop, *Manihot esculenta* Crantz is one of the top six global food crops and provides a staple food for nearly 700 million people worldwide. However, diseases caused by virus infection are a serious threat to the development of the cassava industry worldwide. Cassava mosaic disease (CMD) is one of the most threatening diseases, causing serious economic losses. *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) is one of the pathogens causing cassava mosaic disease. SLCMV is a typical two-component geminiviruses, and its genome consists of two circular components, DNA-A and DNA-B. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is one of the major pathways of mRNA degradation in eukaryotic cells and a prevalent antiviral defense mechanism in eukaryotes. More and more studies have shown that NMD is not only an important

收稿日期 2022-10-08; 修回日期 2022-11-02

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 322CXTD528, No. 320RC709); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630052022021)。

作者简介 刘琳玉 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物病毒致病机制。*通信作者 (Corresponding author): 任艳利 (REN Yanli), E-mail: 864672445@qq.com; 张秀春 (ZHANG Xiuchun), E-mail: zhangxiuchun@itbb.org.cn。

mechanism for regulating mRNA quantity and quality in eukaryotes, but also degrades viral RNA as well as post transcriptional gene silencing (PTGS), which is a prevalent antiviral defense mechanism in eukaryotes. The mRNA decay process of NMD includes four processes: recognition of PTC, deadenylation, decapitation and final exonuclease degradation, and UPF1, PARN, DCP2 and XRN4 are the key proteins in these four processes, respectively. Viruses are specialized parasitic organisms that must escape or be resistant to degradation by host cells in order to successfully infect. Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) is a key factor in the NMD signaling pathway. At present, the molecular mechanism of SLCMV resistance to host NMD is unclear. In this study, we will demonstrate that the silent suppressor AC4 encoded by SLCMV interacts with *Arabidopsis* PARN using yeast two-hybrid system and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiments. It is hypothesized that the SLCMV AC4 protein may help the virus evade or tolerate degradation by the host cell by inhibiting the viral defense function of the host NMD through interaction with AtPARN. The results lay the foundation for elucidating the molecular mechanism by which *cassava mosaic virus* regulates the antiviral defense function of host NMD.

Keywords: *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV); AC4 protein; poly(A)-specific ribonuclease (PARN); yeast two-hybrid (Y2H); bimolecular fluorescence complementation (BiFC)

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.01.021

木薯花叶病毒 (*Cassava mosaic geminivirus*, CMVs) 引发的木薯花叶病 (cassava mosaic disease, CMD) 严重危害木薯产业发展和粮食安全^[1]。2018 年在我国海南、福建首次报道 CMD, 随后在其他种植区也有报道^[2]。斯里兰卡木薯花叶病毒 (*Sri Lankan cassava mosaic virus*, SLCMV) 是首先在斯里兰卡发现的引发木薯花叶病的一个株系, 在分类上属于双生病毒科 (*Geminiviridae*) 菜豆金黄花叶病毒属 (*Begomovirus*)^[3-4]。SLCMV 是典型的双组分双生病毒, 其基因组由 DNA-A 和 DNA-B 两个环状组分组成。DNA-A 组分正义链上编码 AV1(CP) 和 AV2 两个蛋白, 反义链编码 4 个蛋白, 分别为 AC1、AC2、AC3 和 AC4; DNA-B 组分则编码 BV1 和 BC1^[3, 5]。据报道, SLCMV AC4 蛋白可抑制寄主 PTGS 提高病毒致病性, 是病毒致病因子^[6]。

无义介导的 mRNA 降解 (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) 是真核细胞 mRNA 降解的主要途径之一, 通过识别由于出现提前终止密码子 (premature termination codons, PTCs) 而产生的在 3' 端有长非编码区域的 mRNA (也称为 long non-coding RNAs, lncRNAs), 并利用核糖核酸酶迅速进行降解^[7-8]。越来越多的研究显示, NMD 不仅是真核生物重要的 mRNA 数量、质量调控机制, 还与转录后基因沉默 (post transcriptional gene silencing, PTGS) 同样能降解病毒 RNA, 是真核生物普遍存在的抗病毒防御机制。NMD 途径降解 RNA 包括 PTCs 识别、脱腺苷酸、脱帽和最后的核酸外切酶降解 4 个连续过程, UPF1 (up-frame shift protein 1)、PARN[poly(A)-specific ribonuclease]、DCP2 (decapping 2) 和 XRN4

(exoribonuclease 4) 分别是上述 4 个过程中的关键蛋白^[9-11]。在真核生物中, 去腺苷酸化是 mRNA 降解的首要限速步骤。PARN 不仅在降解 mRNA poly(A) 尾中发挥关键作用, 还参与非编码 RNA 的加工成熟、DNA 损伤以及肿瘤等疾病发生过程^[12-13]。病毒是专性寄生生物, 必须逃避或耐受寄主细胞的降解才能成功感染寄主^[14]。病毒如何调控 NMD 的抗病毒防御功能的分子机制研究已取得一些进展。有研究发现, 系统沉默 *upf1* 后摩擦接种烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV), 病毒 RNAs 与蛋白的表达量均有增加, 结果表明 TMV 的致病性可能与 *upf1* 有关^[15]。萝卜花叶病毒 (*Turnip mosaic virus*, TuMV) 中 2 个沉默抑制子 VPg、HC-Pro 分别与 DCP2、XRN4 相互作用并降低 NMD 的抗病毒防御功能, 增强致病性^[16]。GARCIA 等^[17]发现 NMD 能够靶标马铃薯 X 病毒 (*Potato virus X*, PVX) 并限制其复制, 研究结果显示 PVX 中 2 个含长的 3'UTR 亚基因组均会被 NMD 降解, 并且在烟草中过量表达 *upf1* 能够抑制另一正链 RNA 病毒——芜菁皱缩病毒 (*Turnip crinkle virus*, TCV) 的复制, 说明抑制 RNA 病毒复制可能是 NMD 的普遍功能。

SLCMV 复制过程中产生大量的 lncRNAs, 这些 lncRNAs 是如何逃避或耐受被寄主 NMD 降解, 目前还知之甚少^[18]。尚不明确 SLCMV AC4 蛋白是否可与 NMD 信号通路中的关键蛋白相互作用而抑制寄主 NMD 功能从而提高病毒致病性。本研究利用酵母双杂交 (yeast two-hybrid, Y2H) 技术和荧光双分子互补 (BiFC) 试验, 对 SLCMV AC4 蛋白与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) NMD 信号通路中的关键蛋白 PARN 之间的相互作用

进行研究, 研究结果将为阐明木薯花叶病毒是如何调控 NMD 的抗病毒防御功能的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 种植于植物生长培养房, 光照 16 h, 黑暗 8 h, 培养温度为 20 ℃。酵母表达载体 pGADT7、pGBKT7、pGBKT7-PARN 以及 BiFC 载体: pGN1 和 pPARN-P28 均为本实验室保存; pGADT7-T 与 pGBKT7-53 (阳性对照)、pGADT7-T 与 pGBKT7-Lam (阴性对照) 共转化的酵母菌、沉默抑制子表达载体 pPTN-P19 均为本实验室保存。

质粒小量中提取试剂盒和 DNA Marker 均购自天根生化科技(北京)有限公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 等购自宝日医生物技术(北京)有限公司 (TaKaRa); 高效无缝克隆试剂盒购自莫纳生物科技有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 试剂盒购自上海易汇生物科技有限公司 (OMEGA); 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、GV3101 感受态细胞和酵母 AH109 菌株感受态细胞均购自上海唯地生物技术有限公司; SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基均购自北京泛基诺科技有限公司; LB 培养基购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 基因合成和测序由华大基因科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 酵母表达载体 pGADT7-AC4 的构建 参考已报道的 SLACMV 序列(GenBank: KT861468.1), 人工合成两端分别添加酵母猎物载体 pGADT7 限制性核酸内切酶 *Eco*R I 和 *Bam*H I 位点两侧

序列的目的片段 Y2H-AC4 (表 1)。利用无缝克隆试剂盒将目的片段与经限制性核酸内切酶 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切后的酵母猎物载体 pGADT7 进行连接反应, 连接产物转入大肠杆菌菌株 DH5 α 感受态细胞中, 将其涂布于含氨苄青霉素 (50 mg/L) 的 LB 平板上, 置于恒温培养箱中, 于 37 ℃, 倒置培养 12 h。然后, 挑取 3~5 个单菌落, 使用通用引物 pGADT7-F 和 pGADT7-R (表 2) 对其进行 PCR 鉴定, PCR 反应体系(20 μ L): 各 0.4 μ L 引物(10 μ mol/L), 2 μ L 10 $\times$ Easy *Taq* PCR Buffer (含 Mg²⁺), 1.5 μ L dNTPs, 0.2 μ L Easy *Taq* DNA Ploymerase, 15.5 μ L ddH₂O。PCR 反应条件为: 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 40 s, 56 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 40 s, 34 个循环; 72 ℃延伸 10 min。选取阳性克隆提取质粒进行测序、鉴定^[19]。

1.2.2 荧光双分子互补表达载体 pGN-AC4 的构建 参考已报道的 SLACMV 序列 (GenBank: KT-861468.1), 人工合成两端分别添加荧光双分子表达载体 p1300-GN1 限制性核酸内切酶 *Mlu* I 和 *Kpn* I 位点两侧序列的目的片段 BiFC-AC4 (表 1)。利用无缝克隆试剂盒将目的片段与经限制性核酸内切酶 *Mlu* I 和 *Kpn* I 进行双酶切后的含绿色荧光蛋白 N 端 159 个氨基酸的植物表达载体 pGN1 进行连接反应, 连接产物转入大肠杆菌菌株 DH5 α 感受态细胞中, 将其涂布于含卡那霉素 (50 mg/L) 的 LB 平板上, 于 37 ℃, 倒置培养 12 h。最后挑取 3~5 个单菌落, 使用 AC4 特异引物 AC4-1F 和 AC4-250R (表 2) 对其进行 PCR 鉴定, PCR 反应体系 (20 μ L) 与 1.2.1 相同, 选取阳性克隆质粒进行测序、鉴定。

1.2.3 酵母自激活检测 参照产品说明书进行酵母表达载体的共转化, 具体如下: 取 100 μ L 冰上

表 1 目的片段序列
Tab. 1 Synthesized target fragments

片段名称 Fragments name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
Y2H-AC4	GGCCATGGAGGCCAGTGAATTCATGGGGAACCTCACCTCCATGCTCTGCTTCAGTTCGAAGGGAAGCTCACAA TCACAAACAATCGGCAATTCGATTGTGTACACCCAAGCAGTAGCACCAGTTTCCACCCCAACATACAGAGCG CTAAGTCCAGCTCAGACGTCAAGTCCTACATCGACAAGGATGGAGACACCATCGACTGGGGTGAGTTTCAG ATCGATGGACGATCTACAAGAGGGGGACAGCAGTCAGCAAACGACGCTTACGCCCGCAGCACTTAACACAGG CAGTAAGCCAGAGGCTCTTAGAGTCATTAAGGAGTTGAGGATCCATCGAGCTCGAGCTGCA
BiFC-AC4	GCAGAAGACTAGTAGATCTACGCGTATGGGGAACCTCACCTCCATGCTCTGCTTCAGTTCGAAGGGAAGCTCA CAATCACAACAATCGGCAATTCGATTGTGTACACCCAAGCAGTAGCACCAGTTTCCACCCCAACATACAGA GCGCTAAGTCCAGCTCAGACGTCAAGTCCTACATCGACAAGGATGGAGACACCATCGACTGGGGTGAGTTT CAGATCGATGGACGATCTACAAGAGGGGGACAGCAGTCAGCAAACGACGCTTACGCCCGCAGCACTTAACAC AGGCAGTAAGCCAGAGGCTCTTAGAGTCATTAAGGAGTTGGTACCGGATCCGGGATCTTTTACC

注: 斜体字母为含酶切位点的载体序列。
Note: The italicized letters are vector sequences containing the enzyme cut site.

表 2 本研究所用引物
Tab. 2 Primers used in this study

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
pGADT7-F	GGAGTACCCATACGACGTACC
pGADT7-R	TATCTACGATTTCATCTGCAGC
AC4-1F	ATGGGGAACCTCACCTCCAT
AC4-250R	GCGGCGTAAGCGTCGTT

融化的酵母 AH109 菌株感受态细胞,依次加入预冷的酵母猎物表达载体 pGADT7-AC4、酵母诱饵表达载体 pGBKT7, 10 μ L 变性后的 Carrier DNA (95~100 $^{\circ}$ C, 5 min,快速冰浴,重复 1 次),500 μ L PEG/LiAc 并吸打几次混匀, 30 $^{\circ}$ C 水浴 30 min (15 min 时翻转 6~8 次混匀)。置于 42 $^{\circ}$ C 水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6~8 次混匀)。5000 r/min 离心 40 s, 弃上清液, 400 μ L ddH₂O 重悬, 离心 30 s, 弃上清液。50 μ L ddH₂O 重悬后, 取 15 μ L 涂布于 SD/-Trp/-Leu 培养基上, 置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 48~96 h。挑取经 PCR 鉴定的单菌落进行梯度稀释, 等体积同时点板于 SD/-Leu/-Trp (SD-LW) 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (SD-LWHA) 营养缺陷型培养基中, 观察并记录菌落生长以判断是否具有自激活活性。

1.2.4 木薯花叶病毒 AC4 与 PARN 蛋白互作验证参照 AH109 Chemically Competent Cell 产品说明书将诱饵质粒 pGADT7-AC4 与质粒 pGBKT7-PARN 共转化酵母 AH109 感受态细胞后, 涂布于 SD/-Trp/-Leu 培养基上, 置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱, 倒置培养 48~96 h, 观察酵母菌落的生长情况。待长出菌落后, 使用枪头挑取经 PCR 鉴定的单菌落于 25 μ L 无菌水中, 然后再将其分别稀释 10、100、1000 倍, 各取 2 μ L 不同浓度稀释的菌液分别点板于 SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基, 置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱, 倒置培养 3~5 d, 观察并记录木薯花叶病毒 AC4 与 PARN 是否互作^[20-21]。

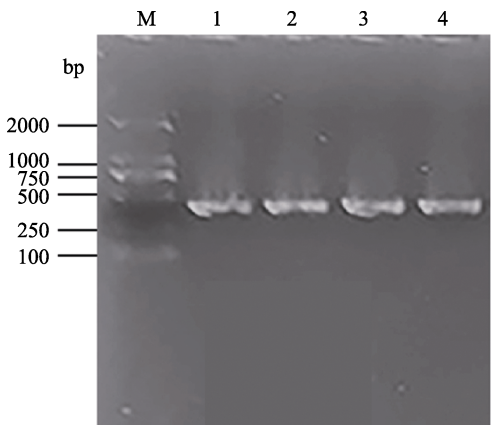
1.2.5 荧光双分子互补验证 AC4 与 PARN 蛋白互作 采用 BiFC 方法, 注射本氏烟草进行蛋白互作检测。根据 GV3101 Chemically Competent 产品说明书将重组质粒 pGN-AC4、pPARN-GC、pGN-P28 和 pPTN-P19 分别转化到农杆菌 GV3101 感受态细胞内, 涂布于含相同抗生素 (利福平、链霉素、卡那霉素) 的 LB 平板中, 倒置放于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中, 培养 2~3 d。待 LB 培养基长出菌落后, 挑取单菌落于 LB 液体培养基中 (含利福平、链霉素、卡那霉素), 置于 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 恒温摇床中震

荡培养 16~20 h。配制 200 mL 缓冲液:2 mL 1 mmol/L MgCl₂、2 mL 1 mol/L 2-吗啡乙磺酸(MES)、200 μ L 100 mmol/L 乙酰丁香酮, 最后用超纯水定容至 200 mL。将培养过夜的菌液取出以 7000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 收集菌体用 10 mL 缓冲液重悬, 使用紫外分光光度计检测每种菌液 OD₆₀₀ 值, 将菌液浓度稀释至 OD₆₀₀ 值为 0.5。取等体积的 pPARN-GC、pPTN-P19 与 pGN-AC4 或 pGN-P28 的 3 种菌液, 混匀后用无针头注射器缓慢将其分别注入 3 株本氏烟草中, 每株注射 3 片叶, 注射面积约为 4 cm², 置于培养房黑暗培养 24 h 后, 继续光照培养 96 h, 从每株本氏烟草中各取 2 片叶进行激光共聚焦荧光显微镜 (尼康 FV 1000) 观察并拍照, GFP 激发光为 488 nm^[22]。

2 结果与分析

2.1 酵母表达载体 pGADT7-AC4 的构建

使用通用引物 pGADT7-F 和 pGADT7-R 进行鉴定, 如图 1 所示, 1~4 泳道均为 pGADT7-AC4 (AD-AC4) 不同菌落 PCR 产物的电泳结果, 产物大小约为 450 bp, 与预期大小一致, 均为阳性克隆。选取 2 个阳性克隆的质粒进行测序鉴定, 测序结果比对正确, 说明酵母表达载体 pGADT7-AC4 构建成功。



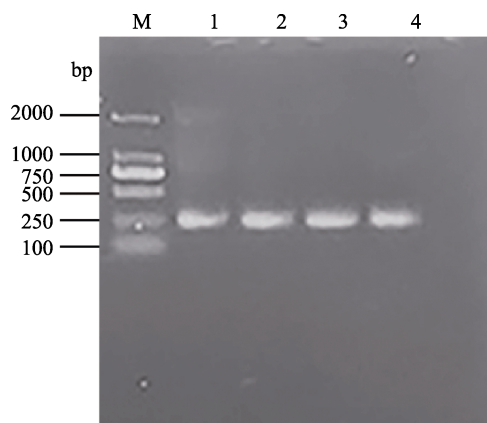
M: DL 2000 DNA marker; 1~4: 酵母 AD-AC4 扩增产物。
M: DL 2000 DNA marker; 1-4: AD-AC4 colony PCR product.

图 1 酵母 AD-AC4 的 PCR 扩增产物

Fig. 1 Yeast colony AD-AC4 PCR validation

2.2 SLACMV AC4 荧光双分子表达载体构建

使用 AC4 特异引物 AC4-1F 和 AC4-250F 进行鉴定, 如图 2 所示, 1~4 泳道均为 pGN1-AC4 (pGN-AC4) 菌落 PCR 产物的鉴定结果, 产物大小约为 250 bp, 与预期大小一致, 均为阳性克隆。



M: DL 2000 DNA marker; 1~4: pGN-AC4 扩增产物。

M: DL 2000 DNA marker; 1-4: pGN-AC4 colony PCR product.

图 2 菌落 pGN-AC4 扩增产物

Fig. 2 PCR validation of pGN-AC4 colonies

选取 2 个阳性克隆质粒进行测序鉴定, 测序结果比对均正确, 说明双分子荧光互补表达载体 pGN-AC4 构建成功。

2.3 酵母自激活验证

将 pGADT7-AC4+pGBKT7、pGADT7+pGBKT7-PARN 分别共转化酵母 AH109 感受态细胞, 培养共转化的酵母菌落后, 从 SD/-Leu/-Trp (SD-LW) 营养缺陷型平板中挑取单菌落, 溶于 25 μ L 无菌水中, 按浓度梯度稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} , 梯度稀释后等体积同时点板于 SD/-Leu/-Trp (SD-LW) 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (SD-LWHA) 营养缺陷型培养基中。以同样稀释浓度分别共转化 pGADT7-T+pGBKT7-53、pGADT7-T+pGBKT7-Lam 的酵母 AH109, 分别为阳性对照和阴性对照。结果表明 pGADT7-AC4 与 pGBKT7、pGADT7 与 pGBKT7-PARN 共转化的 AH109 酵母菌株、阳性对照和阴性对照均能在 SD/-Leu/-Trp (SD-LW) 营养缺陷型培养基中生长, 而在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (SD-LWHA) 营养缺陷型培养基中只有阳性对照能生长。说明酵母表达载体 pGADT7-AC4 和 pGBKT7-PARN 均无自激活活性 (图 3)。

2.4 木薯花叶病毒 AC4 与 AtPARN 蛋白互作

将经验证无自激活活性的 AD-AC4 和 pGBKT7-PARN (BD-PARN) 共转化的酵母菌落, 从 SD/-Leu/-Trp (SD-LW) 营养缺陷型平板中挑取单菌落, 溶于 25 μ L 无菌水中, 按浓度梯度稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} , 点板于 SD/-Leu/-Trp (SD-LW)、SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (SD-LWHA) 营养缺陷型培养基中, 3 d 后观察拍照, 发现

AD-AC4 与 BD-PARN 在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp (SD-LWHA) 营养缺陷型培养基上均能生长, 说明其具有相互作用 (图 4)。

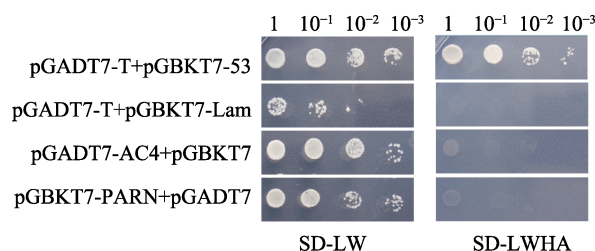


图 3 pGADT7-AC4+pGBKT7-PARN 酵母自激活验证

Fig. 3 Validation of yeast self-activation of pGADT7-AC4 and pGBKT7-PARN

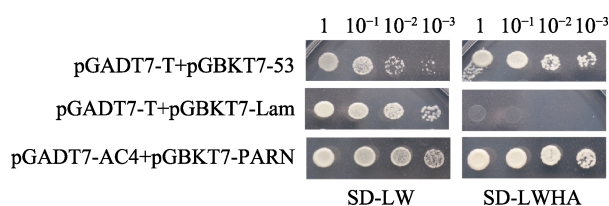


图 4 AD-AC4+BD-PARN 酵母互作

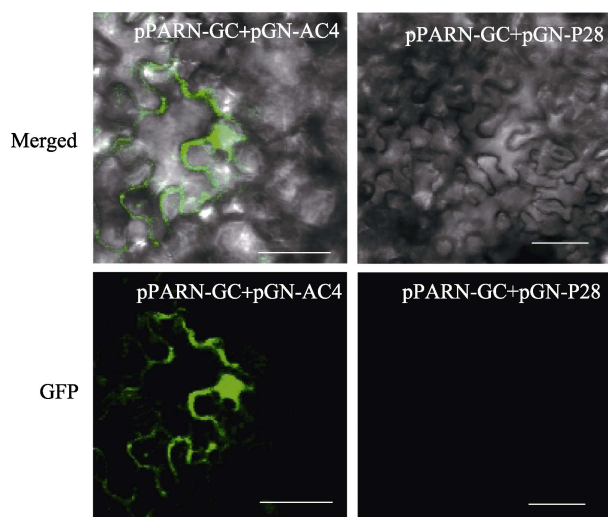
Fig. 4 AD-AC4+BD-PARN yeast two-hybrid interaction

2.5 BiFC 验证 AC4 与 PARN 蛋白互作

在酵母双杂交试验中验证了木薯花叶病毒 AC4 蛋白与 PARN 蛋白具有相互作用。采用 BiFC 方法进一步验证其互作的真实性。将菌液 OD₆₀₀ 值均为 0.5 的 pPARN-GC、pPTN-P19 与 pGN-AC4 或 pGN-P28 的农杆菌按 1:1:1 比例混匀, 室温放置 2 h, 分别共浸润 3 株本氏烟草, 每株注射 3 片叶片, 浸润 96 h 后使用激光共聚焦显微镜 (FV 1000) 观察, 结果发现 pGN-AC4+pPARN-GC 农杆菌浸润的烟草叶片在激发光 488 nm 均可恢复荧光, 对照组 pPARN-GC 和 pGN-P28 未恢复荧光 (图 5), 结果表明, 斯里兰卡木薯花叶病毒 AC4 蛋白与拟南芥中的 NMD 关键因子 PARN 在本氏烟草中具有相互作用。

3 讨论

双生病毒是世界上最具有破坏性的植物病毒之一, 对具有经济和生存重要性的作物造成严重损害^[23]。由双生病毒引起的木薯花叶病, 通过烟粉虱为媒介进行传播^[24]。2018 年在我国首次报道, SLCMV 编码的 AC4 蛋白是一种致病因子, 在 SLCMV 抵御寄主 NMD 中发挥着重要作用。有研究发现, 从非洲木薯花叶病毒 (*African cassava*



A: pPARN-GC+pGN-AC4 共同注射烟草; B: pPARN-GC+pGN-P28 共同注射烟草; Merged: YFP 与白场荧光; GFP: GFP 荧光。

A: Coinfiltration of pPARN-GC and pGN-AC4; B: Coinfiltration of pPARN-GC and pGN-P28 groups; Merged: Fluorescence of YFP and light; GFP: Fluorescence of GFP.

图 5 BiFC 验证 SLCMV AC4 蛋白与 PARN 蛋白在烟草中相互作用

Fig. 5 BiFC assay for protein-protein interactions between SLCMV AC4 and PARN in *Nicotiana benthamiana*

mosaic virus, ACMV) 中基因敲除 AC4 蛋白, 其致病性被消除, 表明该蛋白是 ACMV 病毒感染所必须的蛋白^[25]。病毒是专性寄生生物, 必须逃避或耐受寄主细胞的降解才能成功感染^[14]。

无义介导的 mRNA 降解 (NMD) 不仅是真核生物重要的 mRNA 数量、质量调控机制, 还是真核生物普遍存在的抗病毒防御机制^[26]。因此, 为初步解析 SLCMV 抵御 NMD 介导的抗病毒防御机制, 本研究人工合成了 AC4 基因, 并构建了酵母表达载体 pGADT7-AC4 和双分子荧光互补表达载体 pGN-AC4, 首先采用酵母双杂交技术证明 AC4 蛋白与 NMD 信号通路的关键因子 PARN 相互作用, 通过 BiFC 技术进一步验证 AC4 蛋白与 PARN 之间的相互作用, 其在烟草中均能恢复 GFP 的绿色荧光, 通过对酵母双杂交和 BiFC 的试验结果, 分析发现 PARN 与 AC4 蛋白具有很强的相互作用。从酵母到高等真核生物的各种生物中, 去腺苷酸化是许多 mRNAs 降解的第一步, 也是限速步骤^[27]。REVERDATTO 等^[28]发现 AtPARN 对于拟南芥的胚胎发生是不可缺少的, AtPARN 在多种植物脱腺苷酶中具有独特的、非冗余的作用。3'核糖核酸外切酶——聚腺苷酸特异性核糖核酸酶[poly(A)-specific ribonuclease, PARN]可以

高效降解真核生物 mRNA 的聚腺苷酸尾。PARN 不仅在降解 mRNA poly(A)尾中发挥着关键作用, 还参与了非编码 RNA 的加工成熟以及肿瘤等疾病过程^[29-30]。有研究表明, NMD 相关因子 upf1、upf2 和 upf3X 能与去帽酶 DCP2、外切酶复合体 (exosome) PM/Sc1100 和 PARN 等因子相互作用, 并下调 PARN 后包含无意义密码子的 mRNA (non-sensecontaining mRNA) 含量增高^[31]。MAR-AGOZIDIS 等^[32]发现, PARN 在急性淋巴细胞白血病中的 mRNA 和蛋白水平明显升高, 并且 PARN 蛋白能被磷酸化。磷酸化的 PARN 还能与 eIF4E 竞争性结合 mRNA 的 5'-帽端, 从而降解 mRNA^[29]。丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 编码 NMD 抑制蛋白, 影响 EJC 复合体的完整性^[33]。有研究表明, 花椰菜花叶病毒 (Cauliflower mosaic virus, CaMV) 的病毒翻译反式激活因子 TAV 蛋白可作为 NMD 的抑制子, 通过与 NMD 相关因子 VARICOSE 互作抑制 NMD 的降解功能^[34]。推测 SLCMV 编码蛋白 AC4 不仅是 RNA 沉默抑制子, 而且还可能通过与 PARN 相互作用抑制寄主 NMD 信号通路的抗病毒防御功能, 从而提高致病性。

根据本研究发现的斯里兰卡木薯花叶病毒 AC4 与 AtPARN 蛋白的相互作用, 推测 SLCMV 编码蛋白 AC4 可能通过与 NMD 相关因子 PARN 的相互作用来增强自身病毒侵染力, 从而抑制其抗病毒防御功能。为证实此假说, 可以使用免疫共沉淀、蛋白定位和蛋白共定位等方法对互作蛋白基因进行进一步验证, 或采用过量表达 NMD 相关因子 PARN 的方法研究互作蛋白在 SLCMV 侵染过程中的生物学功能, 进一步明确 SLCMV 编码蛋白 AC4 与寄主相互作用的分子机制。SLCMV 编码的 AC4 蛋白与寄主蛋白如何互作? AC4 如何通过寄主蛋白互作来发挥其抑制 NMD 功能? 这些问题均有待进一步研究。

参考文献

- [1] SCHOLTHOF K B, ADKINS S, CZOSNEK H, PALUKAITIS P, JACQUOT E, HOHN T, HOHN B, SAUNDERS K, CANDRESSE T, AHLQUIST P, HEMENWAY C, FOSTER G D. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12(9): 938-954.
- [2] 时涛, 王国芬, 李超萍, 林兆威, 黄贵修. 木薯花叶病在中国发生的首次报道[J]. *热带农业科学*, 2018,

- 38(10): 99-100.
SHI T, WANG G F, LI C P, LIN Z W, HUANG G X. First report of *Sri Lankan mosaic virus* infected cassava in China[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2018, 38(10): 99-100. (in Chinese)
- [3] REY C, VANDERSCHUREN H. Cassava mosaic and brown streak diseases: current perspectives and beyond[J]. Annual Review of Virology, 2017, 4(1): 429-452.
- [4] PATIL B L, FAUQUET C M. Cassava mosaic geminiviruses: actual knowledge and perspectives[J]. Molecular Plant Pathology, 2009, 10(5): 685-701.
- [5] CHEN K, KHATABI B, FONDONG V N. The AC4 protein of a cassava geminivirus is required for virus infection[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2019, 32(7): 865-875.
- [6] VANITHARANI R, CHELLAPPAN P, PITA J S, FAUQUET C M. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing[J]. Journal of Virology, 2004, 78(17): 9487-9498.
- [7] 贾晓波, 胡剑. 无义介导的 mRNA 降解[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(2): 115-120.
JIA X B, HU J. Nonsense-mediated mRNA decay[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 28(2): 115-120. (in Chinese)
- [8] KUROSAKI T, POPP M W, MAQUAT L E. Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019, 20(7): 406-420.
- [9] 张新岩, 朱颖, 吴辉辉, 郭红卫. 植物转录后水平基因沉默: 调控基因表达的一把双刃剑[J]. 中国科学: 生命科学, 2016, 46(6): 716-722.
ZHANG X Y, ZHU Y, WU H H, GUO H W. Post-transcriptional gene silencing in plants: a double-edged sword[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2016, 46(6): 716-722. (in Chinese)
- [10] ZHANG X, GUO H. mRNA decay in plants: both quantity and quality matter[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2017, 35: 138-144.
- [11] LI B S, WU H H, GUO H W. Plant mRNA decay: extended roles and potential determinants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2018, 45: 178-184.
- [12] NANJAPPA D P, BABU N, KHANNA-GUPTA A, O'DONOHUE M F, SIPS P, CHAKRABORTY A. Poly (A)-specific ribonuclease (PARN): more than just "mRNA stock clearing"[J]. Life Sciences, 2021, 15: 119953.
- [13] BABU N, NANJAPPA D P, NAZARETH S, ARJUNA S, CHAKRABORTY A. PARN knockdown in cell lines results in differential and cell-specific alterations in the expression of cancer-associated mRNAs[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2022, 23(1): 207-215.
- [14] MUHAMMAD T, ZHANG F, ZHANG Y, LIANG Y. RNA interference: a natural immune system of plants to counteract biotic stressors[J]. Cells, 2019, 8(1): 38.
- [15] 陈思涵. *Upf* 基因在 *Tobamovirus* 属病毒侵染过程中的功能研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
CHEN S H. Function of virus infection during *Upf* gene belongs in *Tobamovirus*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [16] LI F F, WANG A M. RNA decay is an antiviral defense in plants that is counteracted by viral RNA silencing suppressors[J]. PLoS Pathogens, 2018, 14(8): e1007228.
- [17] GARCIA D, GARCIA S, VOINET O. Nonsense-mediated decay serves as a general viral restriction mechanism in plants[J]. Cell Host Microbe, 2014, 16(3): 391-402.
- [18] WALSH H A, VANDERSCHUREN H, TAYLOR S, REY M E C. RNA silencing of *South African cassava mosaic virus* in transgenic cassava expressing *AC1 AC4* hp-RNA induces tolerance[J]. Biotechnology Reports, 2019, 30(24): e00383.
- [19] 张春微, 张秀春, 陈柏岑, 武亚丹, 余乃通, 王健华, 刘志昕. 本生烟 *eIF4Es* 基因克隆及其酵母双杂交诱饵载体构建[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(12): 5550-5557.
ZHANG C W, ZHANG X C, CHEN B C, WU Y D, YU N T, WANG J H, LIU Z X. Cloning *eIF4Es* from *Nicotiana benthamiana* and construction of its recombinant pLexA plasmid[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(12): 5550-5557. (in Chinese)
- [20] 王怀琴, 郭晓荣, 杨新兵, 苏娇, 曹晓燕. 利用酵母双杂交筛选与丹参 R2R3-MYB 类转录因子 SmPAP1 互作的蛋白[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(10): 2819-2826.
WANG H Q, GUO X R, YANG X B, SU J, CAO X Y. Screening of proteins interacting with the SmPAP1 of R2R3-MYB transcription factor from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by yeast two-hybrid system[J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(10): 2819-2826. (in Chinese)
- [21] 樊锦涛, 贾娇, 蒋琛茜, 王冠宇, 张靖, 邢继红, 董金皋. 拟南芥转录因子 AtMYB73 转录活性区域分析及互作蛋白的筛选[J]. 中国农业科学, 2014, 47(23): 4754-4762.
FAN J T, JIA J, JIANG C Q, WANG G Y, ZHANG J, XING J H, DONG J G. Regional analysis of transcription activity and screening of interaction proteins at AtMYB73 transcription factor in *Arabidopsis*[J]. China Agricultural Science, 2014, 47(23): 4754-4762. (in Chinese)
- [22] 李安, 童伟杨, 罗维, 舒健虹, 王小利. 二穗短柄草 *BdFKF1* 基因表达、亚细胞定位及蛋白互作分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(20): 6697-6707.
LI A, TONG W Y, LUO W, SHU J H, WANG X L. The expression, subcellular localization and protein interaction of

- BdFKF1 gene in *Brachypodium distachyon*[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(20): 6697-6707. (in Chinese)
- [23] WANG D, ZHANG X, YAO X M, ZHANG P, FANG R X, YE J. A 7-amino-acid motif of rep protein essential for virulence is critical for triggering host defense against *Sri Lankan cassava mosaic virus*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2022, 33(1): 78-86.
- [24] 王国芬, 李超萍, 时涛, 周司珊, 李博勋, 蔡吉苗, 林兆威, 黄贵修. 我国木薯花叶病毒病的发生危害及其病原鉴定[J]. 热带作物学报, 2021, 42(6): 1668-1677.
- WANG G F, LI C P, SHI T, ZHOU S S, LI B X, CAI J M, LIN Z W, HUANG G X. Distribution and pathogen detection of cassava mosaic virus disease in China[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(6): 1668-1677. (in Chinese)
- [25] STANLEY J, MARKHAM P G, CALLIS R J, PINNER M S. The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus beet curly top virus[J]. EMBO Journal, 1986, 5(8): 1761-1767.
- [26] JIN Y, ZHAO J H, GUO H S. Recent advances in understanding plant antiviral RNAi and viral suppressors of RNAi[J]. Current Opinion in Virology, 2020, 46: 65-72.
- [27] CHIBA Y, JOHNSON M A, LIDDER P, VOGEL J T, VAN E H, GREEN P J. AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in *Arabidopsis*[J]. Gene, 2004, 328: 95-102.
- [28] REVERDATTO S V, DUTKO J A, CHEKANOVA J A, HAMILTON D A, BELOSTOTSKY D A. mRNA deadenylation by *PARN* is essential for embryogenesis in higher plants[J]. RNA, 2004, 10(8): 1200-1214.
- [29] 岳志宇, 罗瑛, 郑晓飞. 聚腺苷酸特异性核糖核酸酶(PARN)的功能多样性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(2): 109-114.
- YUE Z Y, LUO Y, ZHENG X F. Multi-functional ribonuclease: poly(A)-specific ribonuclease[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 30(2): 109-114. (in Chinese)
- [30] HIRAYAMA T. PARN-like proteins regulate gene expression in land plant mitochondria by modulating mRNA polyadenylation[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(19): 10776.
- [31] LEJEUNE F, LI X, MAQUAT L E. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities[J]. Molecular Cell, 2003, 12(3): 675-687.
- [32] MARAGOZIDIS P, KARANGELI M, LABROU M, DIMOULO G, PAPASPYROU K, SALATAJ E, POURNARAS S, MATSOUKA P, GOURGOULIANIS K I, BALATSOS N A. Alterations of deadenylase expression in acute leukemias: evidence for poly(a)-specific ribonuclease as a potential biomarker[J]. Acta Haematologica, 2012, 128(1): 39-46.
- [33] RAMAGE H R, KUMAR G R, VERSCHUEREN E, JOHNSON J R, VON D J, JOHNSON T, NEWTON B, SHAH P, HORNER J, KROGAN N J, OTT M. A combined proteomics/genomics approach links *Hepatitis C virus* infection with nonsense-mediated mRNA decay[J]. Molecular Cell, 2015, 57: 329-340.
- [34] LUKHOVITSKAYA N, RYABOVA L A. Cauliflower mosaic virus transactivator protein (TAV) can suppress nonsense-mediated decay by targeting VARICOSE, a scaffold protein of the decapping complex[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 7042.