

· 研究报告 ·

## 大麦黄矮病毒运动蛋白是RNA沉默抑制因子

申永梅<sup>†</sup>, 刘国富<sup>†</sup>, 杨纪君, 霍晓辉, 曹雪松<sup>\*</sup>

聊城大学生命科学学院, 聊城 252059

**摘要** 大麦黄矮病毒(barley yellow dwarf virus, BYDV)属黄症病毒科家族, 其基因组包含6个开放阅读框(open reading frames, ORFs)。将BYDV的6个基因分别克隆到pWEIMING101载体上, 得到重组基因。电击转化农杆菌后, 利用农杆菌瞬时表达方法渗透注射转GFP基因的本氏烟草16c植株的叶片, 在长波长紫外灯下观察GFP的表达, 并通过Northern blot证明所得现象。研究结果表明, BYDV的PAV株系ORF4编码的运动蛋白(movement protein, MP)是RNA沉默抑制因子, 其表达可以抑制局部和系统RNA沉默。BYDV-MP与GFP的双链RNA(dsGFP)共表达后仍能抑制RNA沉默, 荧光强度与叶片中GFP的mRNA和其沉默降解形成的siRNA的量有对应关系, 其N端核定位序列对抑制局部基因沉默起主要作用, 第5、6位氨基酸是抑制基因沉默的关键氨基酸。BYDV-MP单独渗透注射的部位均产生细胞死亡。

**关键词** 大麦黄矮病毒, 运动蛋白, RNA沉默, 抑制因子

申永梅, 刘国富, 杨纪君, 霍晓辉, 曹雪松 (2012). 大麦黄矮病毒运动蛋白是RNA沉默抑制因子. 植物学报 47, 395–404.

转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)是一种重要的抵抗外界病毒入侵的特定序列降解机制, 它调节基因的表达并广泛存在于真菌、动物和植物中, 在植物中称为RNA沉默或RNA干涉(RNA interference, RNAi)。双链RNA(dsRNA)由Dicer酶(一种类似RNase III的酶)切割成21–24个核苷酸大小的RNA, 称作小干扰RNA(short interference RNA, siRNA)。siRNA与RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)结合并引导降解同源RNA分子, 引发PTGS(Bernstein et al., 2001; Ding and Voinnet, 2007)。在长期的进化过程中, 许多植物病毒通过编码RNA沉默抑制因子(RNA silencing suppressor, RSS)来抵抗RNA沉默过程, 这些抑制因子在氨基酸成分和蛋白质结构方面表现出多样性, 并且作用于RNA沉默途径的不同靶位点(Meister et al., 2004)。比如, 烟草蚀纹病毒(tobacco etch potyvirus, TEV)基因编码的HC-Pro蛋白结合siRNA, 这说明HC-Pro蛋白可能削弱了Dicer和RISC的切割功能(Lakatos et al., 2006)。番茄丛矮病毒(tomato bushy stunt virus, TBSV)基因编码的p19蛋白和甜菜黄花叶病毒(beet yellows virus, BYV)基因

编码的p21蛋白通过结合siRNA分子来抑制RNA沉默(Chapman et al., 2004; Dunoyer et al., 2004)。水稻矮缩病毒(rice dwarf virus, RDV)基因编码的Pns10蛋白在RNA沉默过程中作用于dsRNA结构的上游步骤(Cao et al., 2005)。另外, Azevedo等(2010)提出在许多动植物病毒中, RSS中的重复甘氨酸/色氨酸(GW)基序(即AGO钩)可竞争性结合AGOs并抑制寄主基因沉默。这种方式可能是一种保守的抵抗寄主RNA沉默的机制。例如, 芜菁皱缩病毒(turnip crinkle virus, TCV)基因编码的P38。

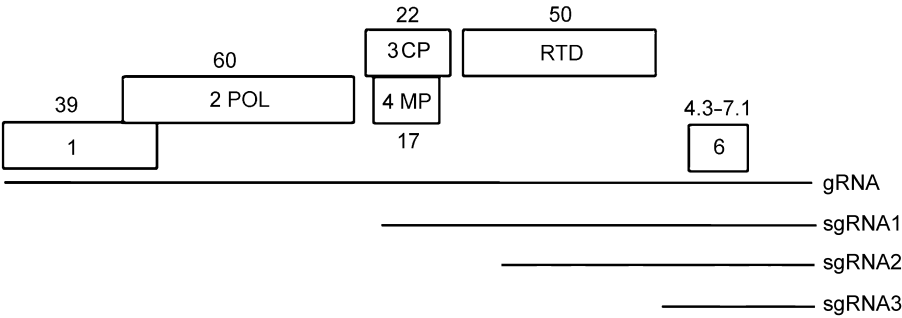
BYDV是黄症病毒科家族的一员, 是引发小麦和其它禾谷类作物病症的主要来源, 在植物筛管中运输, 约经14种蚜虫介体以循环非增殖方式传播。因此根据其传播介体蚜虫种类, 可将其划分为5个株系, 即PAV、MAV、SGV、RPV和RMV。我国主要有4种株系: GAV、GPV、PAV和RMV。BYDV的基因组是单链正义5.6–5.8 kb大小的RNA, 包含6个开放阅读框(open reading frames, ORFs)(Miller et al., 2002)(图1)。ORF1和ORF2通过核糖体框架移位编码1个融合蛋白, 即依赖于RNA的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)。ORF3编码外壳蛋白

收稿日期: 2011-10-28; 接受日期: 2012-04-12

基金项目: 国家自然科学基金(No.30870109)

<sup>†</sup> 共同第一作者。

<sup>\*</sup> 通讯作者。E-mail: caoxuesong@lccu.edu.cn



**图1** 黄症病毒属BYDV- PAV株系基因组结构  
长方形代表开放阅读框(ORF), 框内数字代表ORF编号, 框外数字代表蛋白质分子量(kDa), 黑色线条代表基因组RNA(gRNA)和亚基因组RNAs(sgRNAs)。POL: 依赖RNA的RNA聚合酶; CP: 外壳蛋白; MP: 运动蛋白; RTD: 蚜传蛋白或通读蛋白。

**Figure 1** BYDV genome organization  
Boxes represent open reading frames (ORFs) with the sizes of encoded proteins indicated in kilodaltons (kDa). Black lines represent genomic RNA (gRNA) and subgenomic RNAs (sgRNAs). POL: RNA-dependent RNA polymerase; CP: Coat protein; MP: Movement protein; RTD: Read-through domain of the coat protein gene required for aphid transmission.

(coat protein, CP)。ORF5无起始密码子AUG, 它是通过ORF3终止密码子的通读而与ORF5形成融合蛋白进行表达, 称为通读蛋白(read-through domain, RTD)。CP-RTD是蚜虫传播所必需的。ORF4编码运动蛋白(movement protein, MP)(Chay et al., 1996)。ORF6所编码的蛋白其功能还需要进一步鉴定。

BYDV-MP是一个分子量为17 kDa的蛋白, 与病毒基因组RNA共同定位于细胞质、细胞核以及病毒诱导产生的小泡的纤维状结构中。有推测认为MP的N端 $\alpha$ 螺旋结构在与核膜(nuclear membranes, NE)相互作用中起着十分重要的作用, 这说明MP可能帮助病毒基因组RNA运输并穿过宿主植物细胞的NE(Nass et al., 1998; Liu et al., 2002)。BYDV的GAV株系(BYDV-GAV)的MP可以与单链RNA(ssRNA)结合, 其中C端是具有RNA结合活性的结构域(Xia et al., 2008)。在本研究中, 我们报道了BYDV-MP的一个新功能, 即MP是RNA沉默的抑制因子。MP表达可抑制由单链GFP的mRNA(GFP)和双链GFP的mRNA(dsGFP)诱导的局部RNA沉默, 并且抑制由GFP引起的系统GFP沉默。MP的N端包含核定位信号(nuclear localization signal, NLS), 第5、6位氨基酸是与进核有关的关键氨基酸, 突变之后均削弱了局部RNA沉默抑制效应。这说明MP的N端核定位信号对抑制基因

沉默有着重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 植物材料及质粒和菌种

本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*, N.ben)和转GFP基因烟草(称作16c)种子由David Baulcombe教授提供。重组载体GFP、dsGFP和BYDV六个ORFs编码的基因由本实验室自行构建。载体pWEIMING101、大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 、农杆菌GV3101[四环素抗性(Tet)]均由本实验室保存。大麦黄矮病毒BYDV-PAV株系由W.Allen Miller教授提供。PCAM-BIA1300-TAV2b(以下均简称为T2b)由丁守伟教授提供。

#### 1.1.2 酶和试剂

限制性内切酶和T4连接酶购自TakaRa公司。PCR引物合成及测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。质粒提取试剂盒和DNA胶回收试剂盒购自BioFlux公司。Trizol试剂为Invitrogen公司产品。DIG DNA Labelling and Detection Kit由Roche公司提供。尼龙膜N购自Amersham Biosciences公司。其它试剂

均为进口或国产分析纯。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 基因片段的获得

PAV6包含了BYDV-MP的cDNA序列的全长。以PAV6为模板,设计编码BYDV-MP基因片段的上下游引物BYDV-MP5'和BYDV-MP3'、BYDV-MP基因N端核定位序列缺失突变基因片段上游引物BYDV-mpΔN(下游引物为BYDV-MP3')和C端RNA结合序列缺失突变基因片段下游引物BYDV-mpΔC(上游引物为BYDV-MP5')、BYDV-MP核定位序列第5、6位关键氨基酸突变基因片段上游引物BYDV-mp1(下游引物为BYDV-MP3')。引物序列见表1。通过PCR扩增出BYDV-MP、BYDV-mpΔN、BYDV-mpΔC和BYDV-mp1基因片段。BYDV其它有关基因的克隆与此类似。

### 1.2.2 重组载体的构建

用胶回收试剂盒回收得到PCR扩增产物,将扩增产物分别和pWEIMING101同时用*Bam*HI和*Xho*I酶切。经1%的琼脂糖凝胶电泳后用回收试剂盒纯化产物,分别和pWEIMING101用T4 DNA Ligase 16°C过夜连接。连接产物用热激法转化*E. coli* DH5α,筛选阳性克隆,用质粒提取试剂盒提取质粒。质粒经PCR、酶切初步鉴定后进行序列测定。将质粒命名为101-MP等。

### 1.2.3 电击转化农杆菌

根据产品说明(Model Electroporator 2510; Eppendorf),取3 μL的重组载体质粒101-MP等分别与60 μL的农杆菌感受态GV3101于已灭菌预冷的电击杯中充分混匀,置于冰上10分钟。再将电击杯置于电击仪中进行电击(电击参数:电压2.3 kV,电容25 μF,阻抗

200 Ω),电击结束后把电击混合液转移到微量离心管中,分别加入1 mL的LB液体培养基(含有50 mg·L<sup>-1</sup> Rif和5 mg·L<sup>-1</sup> Tet),于28°C下放置1小时。将100 μL悬浮液均匀涂布于含有50 mg·L<sup>-1</sup> Kan、50 mg·L<sup>-1</sup> Rif和5 mg·L<sup>-1</sup> Tet的LB固体培养基上,28°C倒置培养30–40小时,长出单菌落后进一步作菌落PCR鉴定。鉴定正确的克隆命名为3101-MP等(以下均简称MP)。转化农杆菌的各有关基因也均直接表示。例如,克隆正确并转化农杆菌的BYDV-mpΔN简写为mpΔN。

### 1.2.4 农杆菌的侵染

将携带MP等基因的农杆菌放置于5 mL含Kan、Rif、Tet的LB培养基中28°C培养24小时,以1:50(v/v)转接到50 mL含有相应抗生素及乙磺酸(MES,终浓度为100 mmol·L<sup>-1</sup>)和乙酰丁香酮(acetosyringone, AS,终浓度为20 μmol·L<sup>-1</sup>)的培养基中,28°C培养过夜。离心机4 390 ×g离心10分钟,弃去上清,用农杆菌渗透缓冲液(含MES、AS和MgCl<sub>2</sub>,终浓度分别为100 mmol·L<sup>-1</sup>、20 μmol·L<sup>-1</sup>和100 mmol·L<sup>-1</sup>)悬浮沉淀(Martín-Hernández et al., 2008),并稀释至600 nm下OD值为1.0,室温下悬浮3小时。利用农杆菌渗透注射技术(Hamilton et al., 2002)注射16c烟草。渗透注射前后的16c烟草均在22–24°C温室中恒温培养,光照周期为16小时光照/8小时黑暗。

### 1.2.5 GFP和dsGFP的表达

渗透注射之前把转化MP的农杆菌等分别与转化GFP的农杆菌(OD<sub>600</sub>值均为1.0)等体积混合。单独渗透注射GFP作为阴性对照,GFP和T2b等体积混合作为阳性对照。用紫外光灯照射并连续几天观察绿色荧光蛋白的表达(Black Ray model B 100A; UV Products)。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primers	Sequences(5'–3') (Underlines indicate recognition sites of restriction enzyme)	Restriction enzyme
BYDV-MP5'	AGTCGGATCCATGGCACAAGAAGGAGGCG	<i>Bam</i> HI
BYDV-MP3'	ACAGCTCGAGTCGTTGATTC CTGGAATTCC	<i>Xho</i> I
BYDV-mpΔN	GCTAGGATCCATGTGGTCCAACCCAATCGA	<i>Bam</i> HI
BYDV-mpΔC	CAGTCTGCAGTGCTGATGGTGAAGGAATTA	<i>Pst</i> I
BYDV-mp1	GCAAGGATCCATGGCACAAGAACCACCCGCGTAGAACAGTTCGGCCA	<i>Bam</i> HI
BYDV-mp2	CATGCTGCAGATGGCACAACCAGGAGGCGCCGTAGAA	<i>Pst</i> I

用带有Y48黄色滤波片的SONY α200数码相机拍照。

转化dsGFP、GFP及MP的农杆菌用渗透缓冲液稀释至OD<sub>600</sub>值为1.5, 渗透注射前将含dsGFP、GFP和MP的农杆菌分别等体积混合。以GFP加dsGFP为阴性对照, GFP加dsGFP和T2b为阳性对照。其它步骤均与转化GFP相同。

### 1.2.6 Northern blot分析

用Trizol法(Invitrogen)提取叶片总RNA。每个样品含RNA 5 μg, 用1%甲醛琼脂糖凝胶分离并转移到尼龙膜N上。转膜后用地高辛(DIG)和LNA改进的探针杂交, 探针与GFP全长基因序列相对应, 并用碱性磷酸酶(AP)标记。根据DIG DNA Labelling and Detection Kit (Roche)说明书所述实验方法进行免疫检测(Liu et al., 2007)。在siRNAs的Northern杂交分析中, 大分子量RNA用5%聚乙二醇(PEG 8000)加上0.5 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl去除后, 小分子量RNA可大量积累, 之后用15%聚丙烯酰胺(7 mol·L<sup>-1</sup>尿素)凝胶分离, 并转移到尼龙膜上。siRNA分析中用到的探针和免疫检测步骤与上述GFP的mRNA Northern杂交相同。

## 2 结果与讨论

### 2.1 BYDV编码RNA沉默抑制因子的筛选

分别将BYDV基因组6个ORF片段转化的农杆菌GV3101与转化GFP的农杆菌等体积混合, 侵染16c烟草。以单独渗透注射GFP作为阴性对照; 等体积混合GFP和T2b作为阳性对照(Voinnet et al., 1998)。为保证实验的严谨性, 叶片的左侧均渗透注射GFP。在第6天观察, 渗透注射GFP的叶片很难检测到绿色荧光, 在GFP分别和BYDV六个ORFs编码基因的共表达叶片中, 只有ORF4编码的MP与T2b一样, 仍然有绿色荧光蛋白的表达(图2A–G)。每组实验渗透注射50个叶片, 并重复至少3次。结果发现98%的叶片与图2A–G所示结果相一致。这些结果充分说明, BYDV-MP具有RNA沉默抑制效应, 即MP是BYDV编码的RSS。

### 2.2 GFP的连续观察结果

用紫外光灯照射并对GFP进行连续观察。结果显示, 在所有渗透注射的组织中, GFP在第3天荧光强度最大。渗透注射GFP的叶片, 在第5天之后会显示GFP

沉默。相反, 在加入T2b抑制因子的叶片中, 一直有绿色荧光蛋白的表达。而MP虽然不如T2b抑制GFP沉默表现得强烈, 但与BYDV其它几个ORFs相比, MP可以明显抑制GFP沉默, 加入dsGFP后情况相同(表2)。

### 2.3 BYDV-MP抑制dsGFP诱导的基因沉默

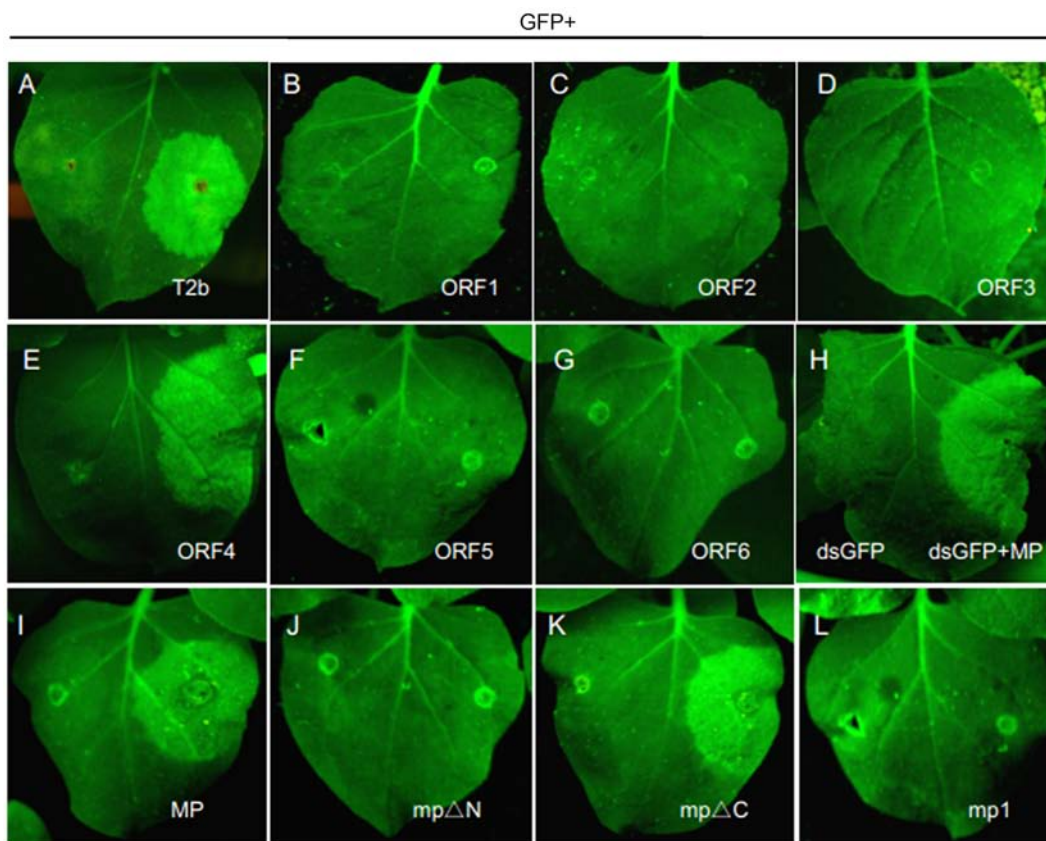
已证明dsRNA是RNA沉默的引发因子。我们渗透注射16c烟草叶片, 在第4天观察, 单独注射GFP的叶片仍有绿色荧光, 而加入dsGFP的叶片已明显表现出沉默。因此我们的结果支持了上述结论。如果抑制因子的抑制作用发生在形成dsGFP的上游, 那么加入dsGFP后抑制因子将不能抑制RNA沉默; 相反如果发生在下游, 那么不管是否加入dsGFP, 抑制因子仍能抑制RNA沉默。渗透注射GFP和dsGFP的叶片在第6天已表现沉默; 而加入MP后渗透注射的叶片却没有沉默(图2H; 表2)。对每组渗透注射的叶片进行数据统计, 98%的叶片与上述结果相符。这些结果表明, BYDV-MP抑制RNA沉默发生在形成dsRNA的下游。

### 2.4 Northern杂交结果分析

渗透注射GFP、GFP加MP、GFP加T2b的叶片在第6天提取总RNA。Northern杂交分析结果显示, 渗透注射GFP加MP或T2b与单独注射GFP的叶片相比, 前者比后者GFP mRNA的表达量多; GFP单独注射的叶片有大量的21 nt和24 nt大小的GFP siRNAs积累, 而GFP加MP或T2b注射的叶片则没有或很少; 加入dsGFP后, 结果相同(图3)。由于RNA沉默抑制因子MP和T2b的表达导致GFP的mRNA较稳定, 在没有抑制因子的情况下, GFP的mRNA会降解形成siRNA。因此我们从分子学角度证明了BYDV-MP和T2b一样抑制了GFP mRNA的降解, 具有RNA沉默抑制活性, 其沉默作用发生在形成dsGFP的下游。

### 2.5 BYDV-MP抑制系统RNA沉默

为了检测BYDV-MP是否干涉系统RNA沉默, 我们用农杆菌瞬时表达方法渗透注射四叶期的16c烟草并检测系统叶片GFP的表达情况。第12天, 大多数单独注射GFP的植株上部系统叶片的叶脉开始失去绿色荧光(图4A)。相反, 大多数(约94%)GFP和MP或T2b共同注射的植株在12天之后仍然具有绿色荧光(图4B, C)。这些结果说明, BYDV-MP和T2b均能抑制由单链



**图2** BYDV相关基因与GFP、dsGFP共表达结果  
(A)–(G) BYDV ORFs与GFP共表达结果; (H) BYDV-MP抑制GFP和dsGFP诱导的基因沉默; (I)–(L) BYDV-MP抑制基因沉默关键氨基酸的鉴定。除了(H)外, 每张图的叶片叶脉左侧均为GFP单独表达(作为对照), 右侧为图中所示各基因与GFP的共表达。所有照片均拍摄于渗透注射后第6天。

**Figure 2** The co-expression of GFP and the individual gene from BYDV in the tobacco leaves  
(A)–(G) The co-expression of GFP and 6 ORFs from BYDV; (H) BYDV-MP inhibited gene silencing induced by both GFP and dsGFP; (I)–(L) The identification of the key amino acid in BYDV-MP inhibition of gene silencing. GFP was infiltrated alone in the left side of leaves as negative control, while the co-expression of GFP plus each BYDV's gene was indicated in the right side, except for Figure H. All photographs were taken at the sixth day post-infiltration.

GFP的mRNA引起的系统RNA沉默。

### 2.6 BYDV-MP核定位序列的鉴定

将GFP基因融合在全长BYDV-MP的N端和C端, 构建GFP:MP和MP:GFP; 将MP的N端核定位信号区(1–30 bp)缺失及其核定位关键氨基酸(Gly5、Gly6、Ala7)替换的突变基因分别融合GFP基因, 构建mpΔN:GFP、mp1:GFP(Phe5替换Gly5, Phe6替换Gly6)和mp2:GFP(Phe7替换Ala7)。

利用农杆菌渗透注射技术将转化农杆菌的有关

重组质粒渗透注射N.ben, 于第36小时在荧光显微镜下观察。图5显示, 未经处理的N.ben叶片没有荧光出现(图5A), 16c有绿色荧光出现(图5B), 分别将其作为阴性和阳性对照; 将GFP渗透注射到N.ben的叶片, 发现荧光显微镜下其视野和16c几乎完全相同(图5C); GFP:MP和MP:GFP侵染的叶片的细胞核中均有荧光出现(图5D, E), 说明MP蛋白主要定位于细胞核中; mpΔN:GFP和mp1:GFP侵染的叶片的细胞核中没有荧光出现(图5F, G), 而mp2:GFP侵染的叶片的细胞核中有荧光出现(图5H)。这些结果说明, BYDV-MP

表2 GFP表达的连续观察结果

Table 2 The time-course of GFP expression

		1 dpi	2 dpi	3 dpi	4 dpi	5 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi
A	GFP	—	+	+++	++	+	—	—	—
B	GFP+T2b	—	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
C	GFP+ORF1	—	+	+++	++	+	—	—	—
D	GFP+ORF2	—	+	+++	++	+	—	—	—
E	GFP+ORF3	—	+	+++	++	+	—	—	—
F	GFP+ORF4	—	+	+++	+++	+++	++	++	++
G	GFP+ORF5	—	+	+++	++	+	—	—	—
H	GFP+ORF6	—	+	+++	++	+	—	—	—
I	GFP+dsGFP	—	+	+++	++	+	—	—	—
J	GFP+dsGFP+MP	—	+	+++	+++	+++	++	++	++

+、++、+++分别表示GFP表达量由弱至强;—表示无GFP表达; dpi: 注射后天数。  
+, ++ and +++ indicate the brightness degree of GFP; — indicates no GFP; dpi: Day post-infiltration.

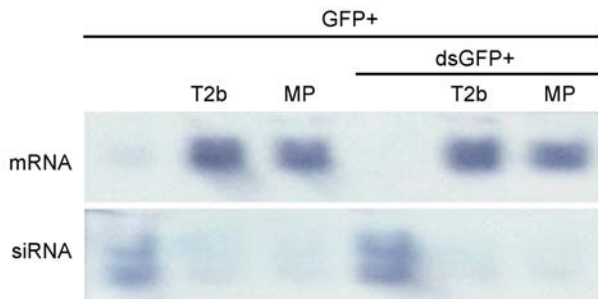


图3 GFP mRNA和siRNA的Northern杂交结果  
6条泳道从左至右分别为GFP、GFP+T2b、GFP+MP、GFP+dsGFP、GFP+dsGFP+T2b和GFP+dsGFP+MP。

Figure 3 Northern blot for GFP mRNA and siRNA  
Six lanes from left to right indicate GFP, GFP+T2b, GFP+MP, GFP+dsGFP, GFP+dsGFP+T2b and GFP+dsGFP+MP, respectively.

的NLS位于N端, Gly5和Gly6为介导核定位的关键氨基酸。

2.7 BYDV-MP核定位序列是RSS发生所必需的

为了验证BYDV-MP的NLS是否与抑制RNA沉默作用有关, 将上述共表达方法应用于MP及其突变的瞬时表达。在第6天, 单独注射GFP或者GFP加mpΔN、mp1均产生局部GFP沉默, 而渗透注射GFP加mpΔC的结果相反(图2 I–L)。每组实验渗透注射50个叶片, 对第6天仍显示绿色荧光的叶片进行数据统计。每组实验重复3次。数据统计结果表明, 98%的叶片符合上

述结果, 从而也证实了上述结论。这些结果说明MP的N端NLS和第5、6位甘氨酸残基在MP的RSS活性中起重要作用, BYDV-MP产生RSS依赖于它的进核过程。

2.8 BYDV-MP引起的细胞死亡

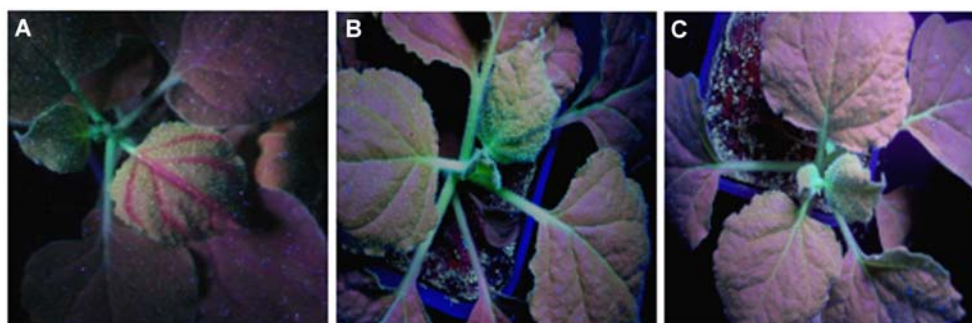
用单独渗透注射转空载体pWEIMING101的农杆菌作对照。图6结果显示, 在第12天, 烟草叶片有MP注射过的地方全部坏死, 而渗透注射转空载体pWEIMING101农杆菌的叶片没有此现象。这个结果说明BYDV-MP能引起细胞死亡。

2.9 讨论

以往研究证明, RNA沉默是植物中一种普遍的抗病毒防御机制, 它能阻止病毒在受侵染植物中积累。因此, 为了抵消这种植物抗病毒防御机制, 病毒(包括RNA和DNA病毒)在长期进化过程中已逐步形成各种策略来抵抗这种机制, 其中包括编码RNAi抑制因子的能力(Voinnet et al., 2005)。我们的研究结果首次报道了BYDV-MP是基因沉默抑制因子, 并且证实了BYDV-MP抑制植物的局部和系统基因沉默。

RNA沉默过程有3个阶段, 包括沉默启动、沉默信号局部及系统运输和持续沉默(Voinnet, 1998)。不同的抑制因子会在不同阶段干扰RNA沉默, 因此其抑制机制也不尽相同。已有证据表明, 21 nt和24 nt siRNA是引起系统沉默的信号分子, 在细胞之间运动, 而且还可通过维管系统长距离运输, 在远处组织



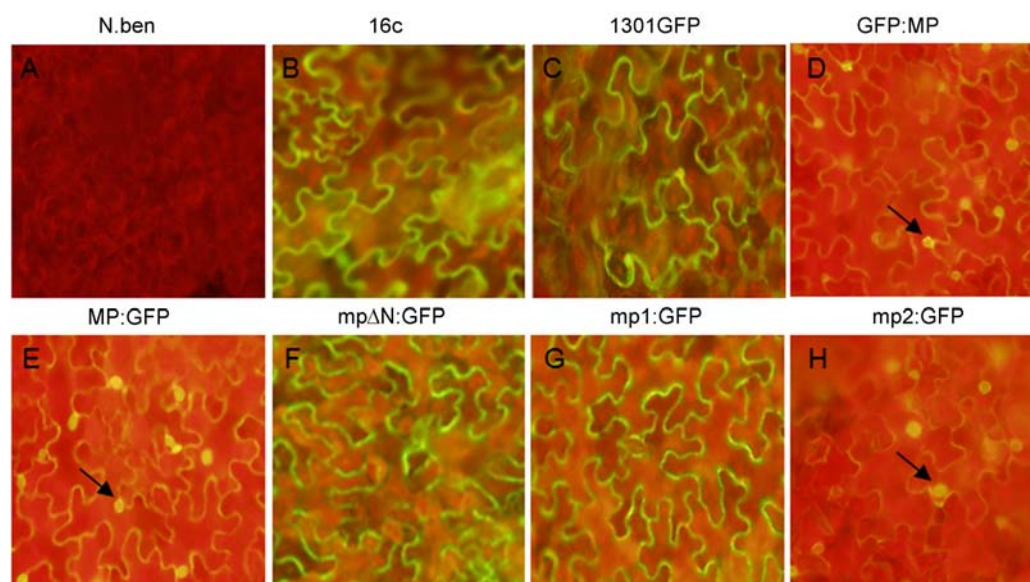


**图4** BYDV-MP抑制系统基因沉默的鉴定

(A) GFP; (B) GFP+T2b; (C) GFP+MP。照片均拍摄于渗透注射后第12天。

**Figure 4** The identification of BYDV-MP inhibiting systemic gene silencing

(A) GFP; (B) GFP+T2b; (C) GFP+MP. All photographs were taken at the 12th day post-infiltration.



**图5** BYDV-MP及其相关核定位结构域突变体的亚细胞定位观察

(A) N.ben野生型叶片; (B) N.ben的16c叶片; (C) GFP单独渗透注射N.ben; (D)–(H) 渗透注射到N.ben的各融合表达基因。(D)、(E)和(H)中的箭头示细胞核。照片均为渗透注射后第36小时在荧光显微镜下的观察结果。

**Figure 5** Subcellular localization of BYDV-MP and its related mutants of the NLS domain

(A) N.ben; (B) N.ben line 16c; (C) GFP expression; (D)–(H) Fusion expression of MP and its mutants with GFP in N.ben. The arrows indicate the nucleus in Figure D, E, and H. The photographs were taken under fluorescence microscope at 36 h post-infiltration.

引起非细胞自主性的系统性沉默(Dunover et al., 2010)。Hamilton等(2002)报道显示, 几种病毒编码的抑制因子在局部和系统RNA沉默中能阻止细胞中24

nt siRNA的积累。Himber等(2003)报道21 nt siRNA能在植物细胞间运动并引起局部RNA沉默。Baulcombe等(2004)研究表明, 植物中沉默信号的运动在抗

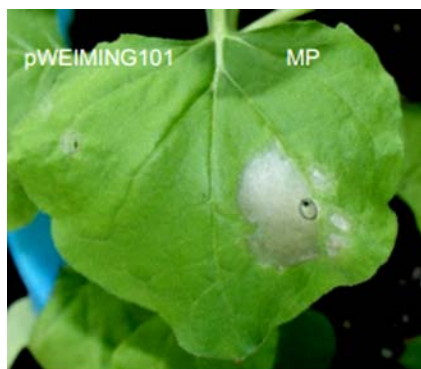


图6 BYDV-MP引起的细胞死亡

图中叶片左侧渗透注射pWEIMING101空载体; 右侧为MP。图片拍摄于渗透注射后第12天。

**Figure 6** Cell death induced by BYDV-MP expression

The pWEIMING101 was infiltrated in the left side of the leaves and MP was in the right. The photograph was taken at the 12th day post-infiltration.

病毒传染中起着重要作用。在本研究中, GFP和MP共表达的叶片细胞中只含少量的21 nt和24 nt siRNAs, 这说明BYDV-MP抑制系统基因沉默可能是通过减少21 nt和24 nt siRNA的量来实现的。

Merai等(2006)报道植物病毒通过结合2种不同的dsRNA成分(long dsRNAs和siRNAs)来干扰寄主RNA沉默; 病毒编码的长dsRNA结合蛋白和寄主DCLs竞争性结合以降低或妨碍siRNAs的积累。本实验结果表明, BYDV-MP抑制RNA沉默的靶位点在形成dsGFP的下游。由于PTGS路径中dsRNA的下游还有很多组分及步骤, 如Dicer和RISC的切割功能、与Ago1蛋白相互作用等, 因此BYDV-MP具体作用于PTGS路径中的哪个组分及其作用机制等还有待于进一步研究。

已知中国番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl China virus, TYLCCNV)的分离物Y10及伴随的DNA $\beta$ 编码的 $\beta$ C1蛋白(Cui et al., 2005)、水稻条纹病毒(rice stripe virus, RSV)编码的NS3蛋白(Xiong et al., 2009)和烟草脆裂病毒(tobacco rattle virus, TRS)编码的16 kDa富含半胱氨酸的蛋白(Ghazala et al., 2008)等均是病毒基因沉默抑制因子, 并且其抑制作用均与进核有关。在本研究中BYDV-MP抑制RNA沉默也与进核有关, 其N端的NLS是抑制基因沉默的结

构域, 其中的第5、6位氨基酸是抑制基因沉默的关键位点。但究竟为什么BYDV-MP的进核会产生抑制作用还有待进一步研究。

在农杆菌瞬时表达的过程中, 我们还发现了一个有趣的现象, 即有BYDV-MP渗透注射的部位均产生细胞死亡。已有报道显示, BYDV-MP产生细胞死亡的原因可能是因为MP能阻止细胞分裂周期的M期进入G2期, 从而阻止了正常的有丝分裂, 但这方面的直接分子证据还有待进一步验证(Zhao et al., 2006)。

虽然BYDV-MP抑制局部和系统基因沉默的具体作用机制还不清楚, 但是BYDV是黄症病毒科家族的一员, 是引起小麦和其它禾谷类作物的主要病原菌。此类病毒的传播会对粮食生产造成一定程度的危害, 病毒大爆发时还会造成严重减产。本研究对BYDV-MP抑制因子的鉴定将有助于进一步了解BYDV与宿主之间的相互作用关系。

## 参考文献

- Azevedo J, Garcia D, Pontier D, Ohnesorge S, Yu A, Garcia S, Braun L, Bergdoll M, Hakimi MA, Lagrange T, Voinnet O (2010). Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev* **24**, 904–915.
- Baulcombe D (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356–363.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363–366.
- Cao XS, Zhou P, Zhang XM, Zhu SF, Zhong XH, Xiao Q, Ding B, Li Y (2005). Identification of an RNA silencing suppressor from a plant double-stranded RNA virus. *J Virol* **79**, 13018–13027.
- Chapman EJ, Prokhnovsky AI, Gopinath K, Dolja VV, Carrington JC (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* **18**, 1179–1186.
- Chay CA, Gunasinge UB, Dinesh-Kumar SP, Miller WA, Gray SM (1996). Aphid transmission and systemic plant infection determinants of Barley Yellow Dwarf Luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17 kDa protein, respectively. *Virology* **219**, 57–65.
- Cui XF, Li GX, Wang DW, Hu DW, Zhou XP (2005). A begomovirus DNA $\beta$ -encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell



- nucleus. *J Virol* **79**, 10764–10775.
- Ding SW, Voinnet O** (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**, 413–426.
- Dunoyer P, Lecellier CH, Parizotto EA, Himber C, Voinnet O** (2004). Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* **16**, 1235–1250.
- Dunoyer P, Schott G, Himber C, Meyer D, Takeda A, Carrington JC, Voinnet O** (2010). Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science* **328**, 912–915.
- Ghazala W, Waltermann A, Pilot R, Winter S, Varrelmann M** (2008). Functional characterization and subcellular localization of the 16K cysteine-rich suppressor of gene silencing protein of tobacco rattle virus. *J Gen Virol* **89**, 1748–1758.
- Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D** (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* **21**, 4671–4679.
- Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O** (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* **22**, 4523–4533.
- Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, Dolja VV, Calvino LF, López-Moya JJ, Burguán J** (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* **25**, 2768–2780.
- Liu H, Reavy B, Swanson M, MacFarlane SA** (2002). Functional replacement of the tobacco rattle virus cysteine-rich protein by pathogenicity proteins from unrelated plant viruses. *Virology* **298**, 232–239.
- Liu Y, Sun B, Wang XF, Zheng CL, Zhou GH** (2007). Three digoxigenin-labeled cDNA probes for specific detection of the natural population of barley yellow dwarf viruses in China by dot-blot hybridization. *J Virol Methods* **145**, 22–29.
- Martín-Hernández AM, Baulcombe DC** (2008). Tobacco rattle virus 16-kilodalton protein encodes a suppressor of RNA silencing that allows transient viral entry in meristems. *J Virol* **82**, 4064–4071.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T** (2004). Human argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* **15**, 185–197.
- Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D** (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* **80**, 5747–5756.
- Miller WA, Liu S, Beckett R** (2002). Barley yellow dwarf virus: Luteoviridae or Tombusviridae? *Mol Plant Pathol* **3**, 177–183.
- Nass PH, Domier LL, Jacstys BP, D’Arcy CJ** (1998). *In situ* localization of barley yellow dwarf virus-PAV 17 kDa protein and nucleic acids in oats. *Phytopathology* **88**, 1031–1039.
- Voinnet O** (2005). Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* **6**, 206–220.
- Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC** (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**, 177–187.
- Xia ZL, Wang Y, Du ZQ, Li JM, Zhao RY, Wang DW** (2008). Apotential nuclear envelope-targeting domain and an arginine-rich RNA binding element identified in the putative movement protein of the GAV strain of *barley yellow dwarf virus*. *Funct Plant Biol* **35**, 40–50.
- Xiong RY, Wu JX, Zhou YJ, Zhou XP** (2009). Characterization and subcellular localization of an RNA silencing suppressor encoded by *rice stripe tenuivirus*. *Virology* **387**, 29–40.
- Zhao RY, Wang DW** (2006). BYDV MP is a viral determinate responsible for plant growth retardation. US Patent, PCT/US2006/047472. 2006-12-13.

## The Movement Protein of Barley Yellow Dwarf Virus is a Suppressor of RNA Silencing

Yongmei Shen<sup>†</sup>, Guofu Liu<sup>†</sup>, Jijun Yang, Xiaohui Huo, Xuesong Cao<sup>\*</sup>

*School of Life Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China*

**Abstract** The genome of barley yellow dwarf virus (BYDV), a member of the Luteoviridae family, contains 6 open reading frames (ORFs). We cloned the 6 ORFs into plasmid of pWEIMING101 and electroporated them into *Agrobacterium tumefaciens* for transient coexpression of BYDV ORFs and GFP in *Nicotiana benthamiana* line 16c, a transgenic GFP plant. Northern blot analysis revealed the movement protein (MP) encoded by BYDV-PAV ORF4 as a suppressor of both local and systemic GFP RNA silencing and RNA silencing triggered by double-stranded GFP RNA. The fluorescent intensity was associated with steady state levels of GFP mRNAs and its degradation product of siRNAs. The nuclear localization signal in the N terminus of the MP and amino acid 5 and 6 were the functional domain and motif, respectively, essential for inhibiting RNA silencing. Transient expression of BYDV-MP alone in infiltrated tissue resulted in cell death.

**Key words** barley yellow dwarf virus, movement protein, RNA silencing, suppressor

**Shen YM, Liu GF, Yang JJ, Huo XH, Cao XS** (2012). The movement protein of barley yellow dwarf virus is a suppressor of RNA silencing. *Chin Bull Bot* **47**, 395–404.

---

<sup>†</sup> These authors contributed equally in this paper.

<sup>\*</sup> Author for correspondence. E-mail: caoxuesong@lcu.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)