

MicroRNA 靶向病毒携带的 microRNA 模拟靶序列对病毒的抑制作用*

王妹妹¹⁾ 陈文虎^{1,2)} 廖乾生¹⁾ 杜志游^{1)**}

(¹⁾ 浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018; ²⁾ 杭州医学院基础医学部, 杭州 310058)

摘要 MicroRNA 模拟靶序列(target mimic, TM)通过竞争性结合 miRNA, 从而干扰 miRNA 对靶标 mRNA 的调控。我们前期工作发现: 以黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)作为载体在植物体内表达 TM 序列有效地抑制了 miRNA 的活性或稳定性, 从而消减了 miRNA 对靶基因的调控。但是, miRNA 与 CMV 携带的 TM 序列的结合在一定程度上抑制了病毒的积累。研究分析了 miRNA 靶向病毒携带的 TM 序列对病毒抑制作用的内在原因。a. 通过 RNA 印迹分析 CMV 携带不同 miRNA TM 序列对病毒积累的影响, 进一步明确 miRNA 靶向病毒携带的 TM 序列对病毒的抑制作用; b. 利用 GFP 作为报告基因, 通过荧光显微镜、蛋白质印迹以及 RNA 印迹分析 TM 序列对重组病毒积累的影响; c. 以 GFP 作为报告基因, 利用荧光显微镜观察和免疫印迹方法分析模拟靶序列对 GFP 翻译的影响; d. 利用 CMV 病毒的反式复制系统分析 miRNA 模拟靶序列对病毒负链 RNA 合成的影响。结果表明, 多种植物内源的 miRNA 靶向 CMV 基因组携带的 miRNA TM 序列, 在不同程度上抑制了病毒的积累, miRNA 与其 TM 序列的结合抑制 GFP 蛋白的翻译和负链的合成。植物内源的 miRNA 通过与病毒基因组携带的 miRNA 模拟靶序列结合, 通过抑制病毒蛋白的翻译以及病毒负链 RNA 的合成, 从而降低了病毒的积累水平。基于该论文的研究结果有可能建立一种抗病毒的新方法。

关键词 黄瓜花叶病毒, microRNA, 靶序列模拟, 抗病毒
学科分类号 Q90, Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0254

在高等植物中, microRNA 作为一类非编码 RNA, 在调控植物的生长发育、应对生物和非生物的胁迫方面扮演着重要的角色^[1-4]。miRNA 通过序列互补的方式引导 RNA 沉默诱导的复合体(RISC)在 miRNA 第 10~11 位相应的位置切割靶标 mRNA^[5], 或者抑制靶标 RNA 的翻译^[6]。Franco-Zorrilla 等^[7]在拟南芥中发现一种调控 miRNA 功能的新机制——miRNA 靶标模拟体(target mimics, TM)。他们发现拟南芥细胞体内编码一个非编码蛋白基因 *IPS1*(induced by phosphate starvation 1), *IPS1* 能够与 miR399 通过序列互补的方式特异性结合, 但在 miRNA 的切割位点形成不完全互补的泡状结构, 使得 miR399 无法切割 *IPS1* RNA, 从而抑制了 miR399 对其靶标 mRNA *PHO2* 的调控。在该发现的基础上, 他们建立了用于调控 miRNA 功能的相关技术, 即模拟靶序列(TM)技术^[8]。近几年, 已有文献报道利用花椰菜花

叶病毒编码的 35 S 启动子在植物体内驱动表达 miRNA 模拟靶序列 RNA, 从而干扰相应的 miRNA 功能^[8-10]。最近, 基于植物病毒作为表达载体的优势, 黄瓜花叶病毒(Cucumber mosaic virus, CMV)、烟草脆裂病毒(Tobacco rattle virus, TRV)和马铃薯 X 病毒(Potato virus X, PVX)已被成功地改造为 miRNA TM 序列的表达载体, 有效地干扰 miRNA 功能^[11-14]。

CMV 是一种重要经济性的 RNA 病毒, 其基因组由 3 条正义单链的 RNA 组成, 根据分子质量大小依次为 RNA1、RNA2 和 RNA3。RNA1 和 RNA2 分别编码 1a 和 2a(RdRP)蛋白, 负责病毒的

* 国家自然科学基金资助项目(31470007)。

** 通讯联系人。

Tel: 0571-86843195, E-mail: duzy@zstu.edu.cn

收稿日期: 2016-08-23, 接受日期: 2016-11-23

复制：以正义基因组 RNA(gRNA)为模板合成负义 gRNA，进而以新合成的负义 gRNA 作为模板，通过不对称形式合成大量的正义 gRNA 以及亚基因组 RNA^[15]。由此可见，负义 gRNA 在不对称病毒复制过程中扮演极为重要的角色。RNA2 还通过亚基因组的形式产生 RNA 沉默抑制子 2b 蛋白。RNA3 含有 2 个开放阅读框(ORF)，分别为 3a(移动蛋白，MP)和外壳蛋白(CP)。CP 蛋白的表达通过亚基因组的方式产生^[15]。由于 CMV 基因组 RNA3 及其亚基因组 RNA4 在植物体内具有高度的表达水平，所以我们前期通过改造 CMV 弱毒株系 LS-CMV，在其 CP 和 3'UTR 之间插入 miRNA 模拟靶序列，分析 CMV 作为 miRNA 模拟靶序列表达载体的可行性^[11, 16]。通过对植物体外源和内源 miRNA 活性的测试，我们发现 CMV 在所测试的多种植物(拟南芥、本生烟、番茄、普通烟等)上均表现为有效的 miRNA 沉默效率。但是，我们也发现 miRNA 靶向病毒携带的 miRNA TM 序列抑制了病毒的积累。为此，本论文试图通过分子生物学、细胞生物学和遗传学等手段分析 miRNA 靶标模拟体的携带对病毒积累的抑制作用，探究 TM 技术作为一种抗病毒方法的可能性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

pLS109、pLS209、pLS309 分别为 T7 启动子驱动的 LS-CMV 基因组 RNA1、RNA2、RNA3 的侵染性克隆^[17]。pCB301-LS109、pCB301-LS209 和 pCB301-LS309 则是由 2×35S 启动子驱动的 LS-CMV 基因组 RNA1、RNA2、RNA3 的侵染性克隆^[16]。本研究所用质粒包括 pLS109、pLS209、pLS309、pCB301-LS109、pLS309-trioX-MX3、pCB301-LS209、pCB301-LSR3GFP、pCB301-Fny1a、pCB301-Fny1b、pCB301-Fny 3aΔΔGFP 和 pBI-EGFP，均由本实验室构建或保存；农杆菌 GV3101 菌株为实验室保存；本生烟(*N. benthamiana*)、NN 三生烟(*N. tabacum* Samsun)种子播种后，约 10 天后移苗，幼苗在 22℃~28℃、16 h 光照周期的植物生长室中培养。野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, Col-0)种子播种约 2 星期后移苗，幼苗培养于 22℃~25℃、8 h 光照周期的植物生长室。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建

利用 Site-Directed Mutagenesis 方法，在质粒

pLS309 的 CP 和 3'UTR 之间引入 *Xho* I 和 *Mlu* I 克隆位点，然后对此克隆进行 *Xho* I /*Mlu* I 双酶切，分别与 miRNA 模拟靶序列正反向引物退火形成的 DNA 片段连接，筛选获得携带不同 miRNA TM 序列的重组质粒：pLS309-MIMNT(对照)、pLS309-MIM159、pLS309-MIM162、pLS309-MIM165、pLS309-MIM 168 和 pLS309-MIM170(图 1a)。

利用 In-phusion 克隆方法，将 GFP 替换 pCB301-LS309 中的 CP 序列，获得 pCB301-LSR3GFP 重组质粒。进而利用以上相同的方法，将 miRNA TM 序列插入在 pCB301-LSR3GFP 的 GFP 和 3'UTR 之间，获得以下重组质粒：pCB301-LSR3GFP-MIMNT、pCB301-LSR3GFP-MIM159、pCB301-LSR3GFP-MIM162、pCB301-LSR3GFP-MIM164 和 pCB301-LSR3GFP-MIM170(图 2a)。

以上构建的 pCB301-LSR3GFP、pCB301-LSR3GFP-MIMNT、pCB301-LSR3GFP-MIM162、pCB301-LSR3GFP-MIM164 和 pCB301-LSR3GFP-MIM170 为模板，通过 PCR 扩增获得编码 EGFP-MIM-3'UTR-核酶的 DNA 片段，克隆至 pBI121 载体，获得重组质粒：pBI-EGFP、pBI-EGFP-MIMNT、pBI-EGFP-MIM162、pBI-EGFP-MIM164、pBI-EGFP-MIM170(图 3a)。

经测序确定序列正确后，转化农杆菌 GV3101。用于构建以上重组体的引物序列，详见附件表 S1。

1.2.2 病毒 RNA 的体外合成、接种和病毒粒子提纯

将侵染性克隆 pLS109、pLS209、pLS309 和 pLS309-MIM(表示携带不同 miRNA TM 的克隆)用 *Pst* I 或 *Sac* I 进行线性化，然后利用体外转录试剂盒(Promega)合成 LS-CMV 的 RNA1、RNA2、RNA3 和 RNA3-MIM。根据文献[11]的方法将 CMV 的 3 条基因组以 1:1:1 的比例混合，摩擦接种至 4~5 叶期的三生烟，20 天后提取病毒粒子。将提纯的病毒粒子以 100 mg/L 的浓度接种 5~6 叶期的拟南芥。

1.2.3 农杆菌浸润接种

根据前期描述的农杆菌浸润方法^[16]，将以上涉及和构建的 T-DNA 克隆通过电击法转化至农杆菌 GV3101。农杆菌在含 50 mg/L 卡那霉素和 20 mg/L 利福平的 LB 液体培养基(含 10 mmol·L⁻¹ MES, 200 mmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮)中进行培养。对于病毒侵染实验，将单独携带 pCB301-LS109、pCB301-

LS209 的农杆菌, 或者 pCB301-LS1a 和 pCB301-LS2a 的农杆菌与携带 pCB301-LS309 或 pCB301-LS309 的 TM 重组体按 1:1:1 的比例混合, 菌液浓度调至 A_{600} 为 0.5~0.6, 将菌液注射本生烟的第 5~6 片真叶. 对于 GFP 的翻译实验, 将携带 pCB301-EGFP 和其 TM 重组体的农杆菌调整浓度至 $A_{0.5}$, 单独注射本生烟.

1.2.4 GFP 绿色荧光的观察

农杆菌浸润接种 5 天后, 剪取叶片注射斑, 使用奥林巴斯倒置荧光显微镜观察 GFP 的荧光情况, 并拍照记录.

1.2.5 蛋白质印迹

根据我们描述的方法^[18], 将农杆菌浸润接种的叶片进行总蛋白的提取、SDS-PAGE 电泳、转膜和免疫印迹, 利用 GFP 的多克隆抗体(Santa Cruz)对 GFP 进行检测, 利用 ECL 底物化学发光和 X 胶片进行显影.

1.2.6 RNA 印迹

根据 TRIzol 试剂(Life Technology 公司)提供的实验步骤, 提取各 CMV 病毒侵染的拟南芥植株的总 RNA. 然后根据我们描述的 RNA 印迹步骤^[11], 对病毒的 RNA 进行检测.

1.2.7 半定量 PCR

将单独携带 pCB301-LS1a 和 pCB301-LS2a 的农杆菌与携带 pBI-EGFP、pBI-EGFP-MIMNT、pBI-EGFP-MIM162、pBI-EGFP-MIM164 或 pBI-EGFP-MIM170 农杆菌按等比例混合, 注射本生烟. 注射后 3 天, 提取注射叶组织的总 RNA, 并用 DNase I 进行消化. 以 DNase I 消化的 RNA 作为模板, 用 EGFP 正向引物和 GAPDH 反向引物进行逆转录. 最后用 EGFP 和 GAPDH 的特异引物扩增 EGFP 和 GAPDH 的部分片段, PCR 循环数设为 25、30 和 35 个循环, 通过电泳检测 PCR 扩增的产物. EGFP 和 GAPDH 的引物见表 S1.

2 结 果

2.1 携带 miRNA 模拟靶序列对 CMV 病毒积累的抑制作用

我们前期研究发现: LS-CMV 携带 miR159 或 miR165/166 的模拟靶序列, 一定程度上降低了病毒基因组的积累^[16, 19]. 为了明确 miRNA 靶向病毒携带的 miRNA 模拟靶序列对病毒的抑制作用, 我们进一步构建了携带 miR162、miR168 或 miR170 的模拟靶序列的 RNA3 重组体(图 1a). 分别将携带

不同 miRNA 模拟靶序列的病毒接种拟南芥. 接种后 14 天, RNA 印迹检测病毒 RNA 的结果显示: 携带对照序列的重组病毒 LS-CMV-MIMNT 与野生型病毒有着相似的积累水平; 携带 MIM59 或 MIM65 均抑制了病毒的积累, 这些结果与前期的报道相一致^[11, 16](图 1b). 而且, LS-CMV-MIM162、LS-CMV-MIM168 和 LS-CMV-MIM170 的积累也明显低于野生型 LS-CMV 或 LS-CMV-MIMNT(图 1b), 这些结果明确了植物内源 miRNA 与 CMV 携带的模拟靶序列互作会抑制病毒积累.

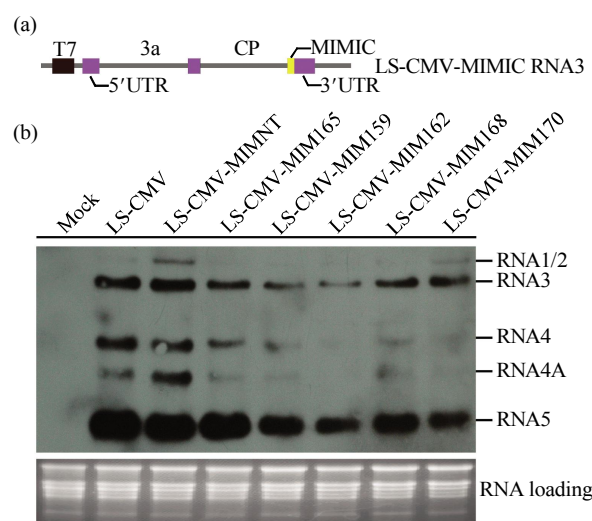


Fig. 1 RNA blotting analysis of viral progeny RNAs in *Arabidopsis thaliana* plants with infection of CMV wildtype or mutants carrying miRNA target mimics

(a) Schematic diagram of RNA3 construct carrying miRNA target mimic sequence (MIM). (b) RNA blotting analysis of viral progeny RNAs in *Arabidopsis thaliana* plants with infection of CMV wild type or mutants carrying miRNA target mimics. Total RNA was extracted at 14 dpi, and probed by a Dig-labeled DNA oligo complementary to the 3' UTR of CMV genome.

2.2 miRNA 模拟靶序列对不同 CMV 株系的抑制作用

为了更好地展示携带 TM 序列对病毒的抑制作用, 我们将 LS-CMV 或 Fny-CMV RNA3 的双元质粒侵染性克隆 pCB301-LS309 和 pCB301-Fny309 进行了改造, 利用 GFP 序列替换二者的 CP ORF, 并在 GFP 与 3'UTR 之间插入不同的 TM 序列或对照序列(MIM-NT), 从而构建了携带 GFP 和不同 TM 序列的重组质粒(图 2a). 然后, 通过农杆菌浸润的方法, 将构建的重组质粒分别与表达 LS-CMV RNA1 和 RNA2 的双元质粒混合注射生烟的叶组

织. 注射后 5 天, 荧光显微镜观察结果显示: mock 样品(只注射携带 RNA3-GFP 的农杆菌)没用呈现可见的绿色荧光, 这与预期的相符. 在 GFP 和 3'UTR 之间不含插入序列的重组病毒(WT)与含插入对照序列的重组病毒(MIM-NT)呈现相近强度的绿色荧光, 而且, 二者的荧光信号明显高于携带 MIM159、MIM162、MIM170 的重组体(图 2b). 蛋白质印迹检测各处理组的 GFP 蛋白表达水平如图 2b 所示, 其结果与所观察的荧光结果相一致.

利用相同的方法, 我们测试了 TM 序列对强毒株系 Fny-CMV 的抑制作用. WT 与 MIM-NT 呈现相似的 GFP 荧光信号, 而且, 二者的荧光信号均明显高于携带 MIM162、MIM164、MIM170 的重组体(图 2c). 进而通过免疫印迹检测 GFP 蛋白的积累水平, 其结果与 GFP 的荧光信号相一致(图 2c). 可见, 不管是 CMV 强毒株还是弱毒株, 内源性 miRNA 与 CMV 携带的 TM 模拟靶序列的结合在一定程度上抑制病毒的积累.

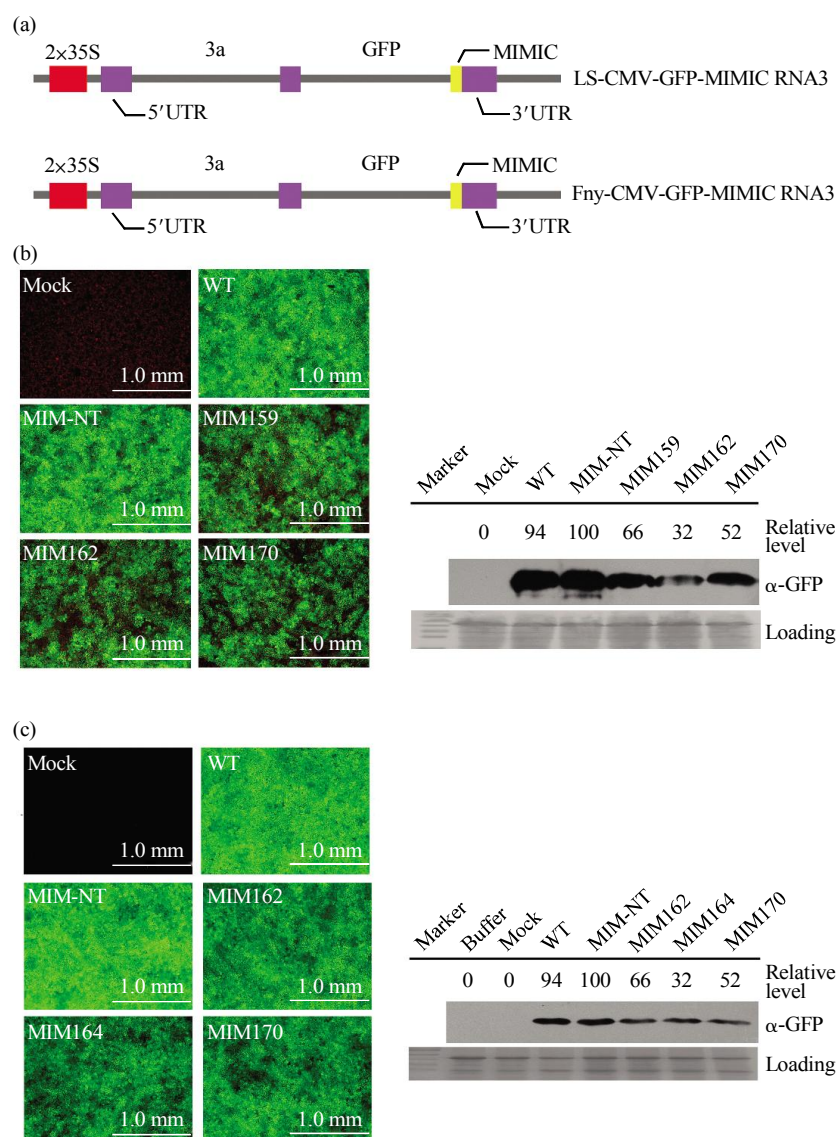


Fig. 2 Effect of target mimic on GFP expression from CMV genome

(a) Schematic diagram of CMV-GFP-MIMIC RNA3. (b) Detection of GFP from a mild strain LS-CMV using fluorescence observation and Western blot. (c) Detection of GFP from a severe strain Fny-CMV using fluorescence observation and Western blot.

2.3 携带 miRNA 模拟靶序列对病毒翻译水平的影响

为了分析病毒携带的 miRNA 模拟靶序列对病

毒抑制作用的内在原因, 我们通过构建 EGFP-MIM-3'UTR 的双元质粒克隆(图 3a), 进而通过农杆菌注射和荧光显微镜观察, 分析 miRNA 模拟靶

序列对 GFP 翻译的影响. 荧光观察结果显示: Mock 样品(只注射浸润缓冲液)没有产生可见的绿色荧光, 而在 EGFP 与 3'UTR 之间不含任何插入序列(标示为 EGFP-WT)和仅插入对照序列(标示为 EGFP-MIMNT)二者均产生很强的绿色荧光. 然而, 在 EGFP 与 3'UTR 之间插入 MIM162、MIM164 和 MIM170 则均显示明显的绿色荧光, 但是显著低于 EGFP-WT 或 EGFP-MINNT(图 3b). 然后, 通过提取叶片的总蛋白, 并进行 GFP 的免疫印迹检测.

结果显示: EGFP-WT 和 EGFP-MINNT 处理的样品中检测到相似水平的 GFP 蛋白, 二者的蛋白质水平平均高于 MIM162、MIM164 和 MIM170 处理的样品 (图 3c), 该结果与荧光显微镜的结果相一致. 以上结果说明, 内源 miRNA 与其模拟靶序列结合抑制了 GFP 蛋白的翻译, 暗示 CMV 病毒携带 miRNA 模拟靶序列降低病毒蛋白质的翻译, 从而抑制病毒的积累.

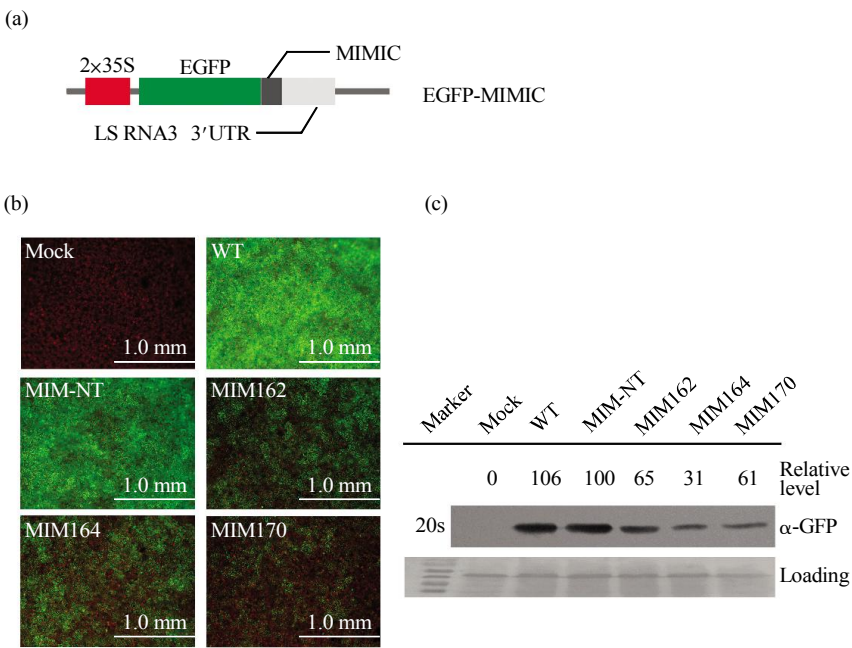


Fig. 3 Effect of miRNA target mimics on EGFP translation
(a) Schematic diagram of EGFP-MIM-3'UTR. (b) Observation of GFP fluorescence from the leave expressing EGFP with or without miRNA TM sequences. (c) Western blot analysis of EGFP protein in the leaves as shown in the panel.

2.4 携带 miRNA 模拟靶序列对病毒负链合成的影响

为了回答携带 miRNA 模拟靶序列是否会干扰病毒负链 RNA 的合成, 我们通过农杆菌注射的方法, 在本生烟的叶组织瞬时共表达 CMV 复制酶 1a 和 RdRp, 分析其合成 EGFP-MIM-3'UTR 的负链情况. 半定量 RT-PCR 结果显示(图 4): 当 PCR 运行 25 个扩增循环, 在所有的 RNA 样品检测到条带亮度相近的 GAPDH 内参基因的条带, 但是, 没有检测到 EGFP-MIM-3'UTR 负链相应的条带. 当 PCR 运行 35 个扩增循环, 在所有的样品中均检测到 EGFP-MIM-3'UTR 负链 RNA 相应的条带, 而且, WT 和 NT 的扩增条带亮度相近, 比其他 MIM 样品的条带亮, 该结果暗示 miRNA 靶向其模拟靶

序列, 很可能在一定程度上抑制了病毒负链的合成.

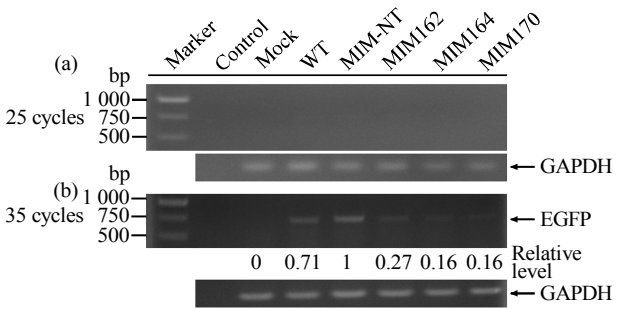


Fig. 4 Effect of miRNAs binding to target mimic sequences on synthesis of CMV 3'UTR-mediated minus strand RNA

3 讨 论

本论文是在前期研究结果的基础上,通过测定多种 miRNA 模拟靶序列,明确了病毒携带模拟靶序列对病毒积累的抑制作用,进而通过分析 miRNA 模拟靶序列对 EGFP 的翻译以及由病毒 3'UTR 介导的 EGFP 负链的合成,说明 miRNA 靶向其模拟靶序列很可能抑制了病毒蛋白质的翻译和负链的合成,从而表现出对病毒的抑制作用。

在测试的 3 种 miRNA 的模拟靶序列,包括 MIM162、MIM164 和 MIM170 均有效地抑制了 EGFP 的翻译(图 3),这与 Franco-Zorrilla 等^[7]先前报道的结果相一致。成熟的单链 miRNA 在细胞体内是以 RNA 诱导的沉默复合体(RISC)的形式存在,一旦与 miRNA 模拟靶序列结合,RISC 将覆盖整个模拟靶序列和其周边的部分序列。当模拟靶序列位于编码框的终止密码子下游时,RISC 很可能掩盖终止密码子,从而使得核糖体无法合成完整的蛋白或提前终止,这可以解释 miRNA 模拟靶序列抑制 EGFP 表达的原因。而且,已有文献报道 miRNA 与 mRNA 3'UTR 的结合,抑制 mRNA 的翻译^[6],这也进一步支持我们的结果。我们所测试的这 3 种模拟靶序列同时还抑制了病毒 3'UTR 指导的 EGFP 负链的合成(图 4)。负链合成的抑制很可能是由于携带相应 miRNA 的 RISC 复合体与其模拟靶序列稳定结合,这将成为病毒 RdRp 复制过程中的一个障碍,使得负链合成受阻,从而表现出抑制作用。RNA 病毒基因组的复制是不对称性的,在寄主因子 GAPDH 特异性的选择下,以少量的基因组负链 RNA 合成大量的基因组 RNA^[20]。因此,抑制负链的合成是抑制病毒复制的一个有效途径,这对于抗病毒方法的建立具有重要的生物学意义。

RNA 沉默是高等植物最为重要的抗病毒防御机制。然而,为了抑制 siRNA 介导的抗病毒沉默,大量植物病毒编码 1 个或多个 RNA 沉默抑制子^[21-22]。CMV 2b 蛋白是最早被鉴定的 RNA 沉默抑制子之一^[23]。CMV 亚组 I 株系,而非亚组 II 株系编码的 2b 蛋白能有效地干扰 miRNA 途径^[11, 24-26]。然而,我们发现不管是亚组 I 株系 Fny,还是亚组 II 株系 LS,携带 miRNA 模拟靶序列都抑制了病毒的积累(图 2),这说明亚组 I 和 II 株系编码的 2b 蛋白均不能有效地干扰 miRNA 与其模拟靶序列的结合,这很可能是 miRNA-RISC 识别病毒携带的 miRNA 模拟靶序列先于病毒 2b 蛋白的产生。

与 siRNA 介导的抗病毒沉默不同,miRNA 与病毒携带的 miRNA 模拟靶序列结合并不导致 miRNA 模拟靶序列被切割,而是滞留在病毒基因组上,阻断病毒蛋白的合成和基因组负链的合成。由此推测:通过转基因方法在植物体内转录合成靶向病毒基因组的 miRNA,使其靶向但不切割病毒 RNA,可能具有较好的抑制病毒效果。因此,本研究为发展抗病毒的新方法提供了一条新思路。

附件 表 S1 见本文网络版附录(<http://www.pibb.ac.cn>)

参 考 文 献

- [1] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, **57**: 19-53
- [2] Shan R, Velazquez C, Knaus E E. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in Plant Science*, 2007, **12**(7): 301-309
- [3] Ruizferrer V, Voinnet O. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual Review of Plant Biology*, 2009, **60**(1): 485-510
- [4] Sunkar R, Li Y F, Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends in Plant Science*, 2012, **17**(4): 32-41
- [5] Morel J B, Godon C, Mourrain P, *et al.* Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell*, 2002, **14** (3): 629-639
- [6] Lanet E, Delannoy E, Sormani R, *et al.* Biochemical evidence for translational repression by *Arabidopsis* microRNAs. *Plant Cell*, 2009, **21**(6): 1762-1768
- [7] Jm F-Z, A V, M T, *et al.* Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nature Genetics*, 2007, **39**(8): 1033-1037
- [8] Todesco M, Rubio-Somoza I, Paz-Ares J, *et al.* A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in *Arabidopsis thaliana*. *PloS Genetics*, 2010, **6** (7): e1001031-e1001031
- [9] Wu G, Park M Y, Conway S R, *et al.* The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 2009, **138**(4): 750-759
- [10] Debernardi J M, Rodriguez R E, Mecchia M A, *et al.* Functional specialization of the plant miR396 regulatory network through distinct microRNA-target interactions. *Plos Genetics*, 2012, **8**(1): e1002419
- [11] Du Z, Chen A, Chen W, *et al.* Using a viral vector to reveal the role of microRNA159 in disease symptom induction by a severe strain of *Cucumber mosaic virus*. *Plant Physiology*, 2014, **164**(3): 1378-1388
- [12] Sha A, Zhao J, Yin K, *et al.* Virus-based microRNA silencing in plants. *Plant Physiology*, 2014, **164**(1): 36-47

- [13] Zhao J, Liu Q, Hu P, *et al.* An efficient *Potato virus X* -based microRNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 20573
- [14] Fei Y, Guo W, Wu G, *et al.* A virus-based miRNA suppression (VbMS) system for miRNA loss-of-function analysis in plants. *Biotechnology Journal*, 2014, **9**(5): 702–708
- [15] Palukaitis P, García-Arenal F. *Cucumoviruses*. *Advances in Virus Research*, 2003, **62**(4): 241–323
- [16] Liao Q, Tu Y, Carr J P, *et al.* An improved cucumber mosaic virus-based vector for efficient decoying of plant microRNAs. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 13178
- [17] Zhang L, Handa K, Palukaitis P. Mapping local and systemic symptom determinants of cucumber mosaic *Cucumovirus* in tobacco. *Journal of General Virology*, 1994, **75**(Pt 11): 3185–3191
- [18] Xu A, Zhao Z, Chen W, *et al.* Self-interaction of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein plays a vital role in the suppression of RNA silencing and the induction of viral symptoms. *Molecular Plant Pathology*, 2013, **14**(8): 803–812
- [19] Du Z, Chen A, Chen W, *et al.* Nuclear-cytoplasmic partitioning of *Cucumber mosaic virus* protein 2b determines the balance between its roles as a virulence determinant and an RNA-silencing suppressor. *Journal of Virology*, 2014, **88**(10): 5228–5241
- [20] Wang Y L, Nagy P D. Tomato bushy stunt virus Co-opts the RNA-binding function of a host metabolic enzyme for viral genomic RNA synthesis. *Cell Host & Microbe*, 2008, **3**(3): 178–187
- [21] Roth B M, Pruss G, Vance V B. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research*, 2004, **102**(1): 97–108
- [22] Li F, Ding S W. Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annual Review of Microbiology*, 2006, **60**(1): 503–531
- [23] Brigneti G, Voinnet O, Li W X, *et al.* Retracted: Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Embo Journal*, 1998, **17**(22): 6739–6746
- [24] Chapman E J, Prokhnovsky A I, Gopinath K, *et al.* Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes & Development*, 2004, **18**(10): 1179–1186
- [25] Zhang X, Yuan Y R, Pei Y, *et al.* Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes & Development*, 2006, **20** (23): 3255–3268
- [26] Lewsey M, Robertson F C, Canto T, *et al.* Selective targeting of miRNA-regulated plant development by a viral counter-silencing protein. *Plant Journal*, 2007, **50**(2): 240–252

MicroRNAs Targeting to Virus-carrying MicroRNA Target Mimics Inhibit Virus Accumulation*

WANG Mei-Mei¹⁾, CHEN Wen-Hu^{1,2)}, LIAO Qian-Sheng¹⁾, DU Zhi-You^{1)**}

¹⁾ College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

²⁾ Institute of Basic Medical Science, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China)

Abstract MicroRNA Target Mimics (TM) interfere with regulation of miRNA to its target mRNA by competitively binding the miRNA. Previously, we found that *Cucumber mosaic virus* (CMV) as a vector expressing a TM sequence effectively inhibited the activity or stability of some miRNAs in plants, thereby impaired their regulation to the targets. However, the miRNAs binding to their TM sequences carried by CMV inhibited accumulation of the virus to some extent. To analyze underlying reason of the inhibition to virus accumulation when a miRNA binds to its TM sequence in CMV genome, we analyzed influence of various miRNA TM sequences in CMV genome on virus accumulation using RNA blotting. Then, using GFP as a reporter gene, effect of the TM sequences on virus accumulation was analyzed by fluorescence microscopy, Western blotting and RNA blotting. Subsequently, using GFP as a reporter gene again, we analyzed effect of the TM sequences on GFP translation. Finally, the influence of the TM sequences on virus negative-strand RNA synthesis was tested using CMV *trans*-replication system. The results showed that targeting of five plant endogenous miRNA species tested to their TM sequences carried by CMV genome inhibited virus accumulation to a varied extent. Binding of the miRNAs to their TM sequences suppressed translation of the GFP protein and synthesis of the negative strand. Plant endogenous miRNAs targeting to their target mimics carried by viral genome inhibits translation of viral protein and synthesis of negative strand, thus reduces virus accumulation. The data present here provide possibility for developing a new antiviral methods.

Key words Cucumber mosaic virus, microRNA, target mimic, antiviral

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0254

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31470007).

**Corresponding author.

Tel: 86-571-86843195, E-mail: duzy@zstu.edu.cn

Received: August 23, 2016 Accepted: November 23, 2016

附 录

Table S1 List of primers used for either generation of DNA constructs or semi-RT-PCR

Primer name	Primer sequence	Constructing clones
MIMNTF	5' tcgCACGCCGTTTCATTTTCGGCAACAAATCCGTGTGT 3'	pLS309-MIMNT
MIMNTR	5' cgcgAACACACGGATTTGTTGCCGAAATGAACGGCGTG 3'	pLS309-MIMNT
MIM159F	5' tcgaAAGAGCTCCCTCAATCAATCCAAA 3'	pLS309-MIM159
MIM159R	5' cgcgTTTGGATTGATTGAGGGAGCTCTT 3'	pLS309-MIM159
MIM162F	5' tcgaCTGGATGCAGATCTGGTTTATCGA 3'	pLS309-MIM162
MIM162R	5' cgcgTCGATAAACACAGATCTGCATCCAG 3'	pLS309-MIM162
MIM165F	5' tcgaGGGGAATGAATCTACCTGGTCCGA 3'	pLS309-MIM165
MIM165R	5' cgcgTCGGACCAGGTAGATTCAATCCCC 3'	pLS309-MIM165
MIM168F	5' tcgaTTCCCGACCTTAAACACCAAGCGA 3'	pLS309-MIM168
MIM168R	5' cgcgTCGCTTGGTGTTAAGGTCGGGA 3'	pLS309-MIM168
MIM170F	5' tcgaGATATTGACATAAAGGCTCAATCA 3'	pLS309-MIM170
MIM170R	5' cgcgTGATTGAGCCTTTATGTCAATATC 3'	pLS309-MIM170
LSR3R-F915	5' GCAGGTGGTTAACGGTCTTTAG 3'	pCB301-LSR3GFP-MIMIC
GFPR	5' TTATTTGTATAGTTCATCCATGCC 3'	pCB301-LSR3GFP-MIMIC
G-MIM162F	5' GGCATGGATGAACTATACAAATAA <u>CTGGATGCAGATCTGGTTTATCGA</u> 3'	pCB301-LSR3GFP-MIM162
G-MIM170F	5' GGCATGGATGAACTATACAAATAA <u>GATATTGACATAAAGGCTCAATCA</u> 3'	pCB301-LSR3GFP-MIM170
G-MIM159F	5' GGCATGGATGAACTATACAAATAAAGAGCTCCCTCAATCAATCCAAA 3'	pCB301-LSR3GFP-MIM159
G-MIM-NT-F	5' GGCATGGATGAACTATACAAATAACACGCCGTTTCATTTTCGGCAACAAATCCGTGTGT 3'	pCB301-LSR3GFP-MIMNT
LSR3R-BamH I	5' TTGGATCCTGGTCTCCTTATGGAGAACC 3'	pCB301-LSR3GFP-MIMIC
Fny-3aΔΔ-gfp F1631	5' GAACTAGTTGTTTTGTACGTTGTACCT 3'	pCB301-FnyR3GFP-MIMIC
Fny-3aΔΔ-gfp R2640	5' CGACGCGTGAATTCAGGCCCTTATTTGTATAGTTCATC 3'	pCB301-FnyR3GFP-MIMIC
Fny-3aΔΔ-gfp F2641	5' TCACGCGTTCGGTGTGTTTACCGGCGTCC 3'	pCB301-FnyR3GFP-MIMIC
MIM162F	5' CTGGATGCAGATCTGGTTTATCGA 3'	pCB301-FnyR3GFP-MIM162
MIM162R	5' cgcgTCGATAAACACAGATCTGCATCCAG 3'	pCB301-FnyR3GFP-MIM162
MIM164F	5' TGCACGTGCCCTATGCTTCTCCA 3'	pCB301-FnyR3GFP-MIM162
MIM164R	5' cgcgTGGAGAAGCATAGGGGCACGTGCA 3'	pCB301-FnyR3GFP-MIM164
MIM170F	5' GATATTGACATAAAGGCTCAATCA 3'	pCB301-FnyR3GFP-MIM170
MIM170R	5' cgcgTGATTGAGCCTTTATGTCAATATC 3'	pCB301-FnyR3GFP-MIM170
LSR3-1878F	5' TCCGTGTGTTTACCGGCGTC 3'	pBI-EGFP-MIMIC
MIMNTF-BE	5' CACGCCGTTTCATTTTCGGCAACAAATCCGTGTGT 3'	pBI-EGFP-MIMNT
MIM162F-BE	5' CTGGATGCAGATCTGGTTTATCGA 3'	pBI-EGFP-MIM162
MIM164F-BE	5' TGCACGTGCCCTATGCTTCTCCA 3'	pBI-EGFP-MIM164
MIM170F-BE	5' GATATTGACATAAAGGCTCAATCA 3'	pBI-EGFP-MIM170
EGFP-F	5' ACGCGTATGGTGAGCAAGGGCGAGG 3'	Semi-RT-PCR
EGFP-R	5' TCACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG 3'	Semi-RT-PCR
GAPDH-F	5' AGGCTGGGATTGCATTGAGCGA 3'	Semi-RT-PCR
GAPDH-R	5' ACACACAAACTCTCGCCGGTGT 3'	Semi-RT-PCR