

利用酵母双杂交筛选槟榔黄化相关病毒 p26 的宿主互作蛋白

梁泳琪^{1#}, 王雨天¹, 高保森¹, 赵瑞白², 王洪星², 李 瑾^{2*}, 曹先梅^{2*}

(1. 海南大学 热带农林学院, 海南 儋州 571737 中国; 2. 海南大学 三亚南繁研究院, 海南 三亚 572025 中国)

摘要: 槟榔黄化病(yellow leaf disease, YLD)是严重威胁海南槟榔(*Areca catechu* L.)产业的病害, 其致病因子槟榔黄化相关病毒(areca palm velarivirus 1, APV1)编码的 p26 蛋白在病毒侵染中发挥关键作用, 但是与其宿主相互作用的蛋白还未明确。本研究采用酵母双杂交技术筛选槟榔 cDNA 文库, 以 p26 为靶标筛选互作因子。成功构建 pGBKT7-p26 诱饵载体并通过毒性及自激活检测, 确认其适用于互作筛选体系。之后通过筛库获得 6 个候选互作蛋白, 包括 Ras 相关蛋白 RABE1c、叶绿体铁蛋白(ferritin-4)、油棕应激蛋白 PHOS34 和三个未知功能蛋白。经复筛和测序比对, 聚焦于含卷曲螺旋结构域的未知功能蛋白——卷曲螺旋结构域蛋白 2(CHCHD2)。回转变验证表明, p26 与 CHCHD2 在酵母中存在特异性互作。生物信息学分析显示, CHCHD2 分子式为 C₆₂₈H_{1 007}N₂₀₁O₁₉₈S₈, 分子质量 14.8 kDa, 属亲水性不稳定蛋白, 二级结构以无规则卷曲为主, 亚细胞定位预测定位于叶绿体, 无信号肽及跨膜结构域。本研究揭示 APV1 的 p26 与宿主 CHCHD2 的互作关系, 为解析 p26 在病毒侵染中的功能及 CHCHD2 介导的宿主防御机制提供了理论基础。

关键词: 槟榔黄化相关病毒; p26 蛋白; 酵母双杂交; 宿主互作蛋白; CHCHD2

中图分类号: S432.4+1

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2026)01-0091-10

梁泳琪, 王雨天, 高保森, 等. 利用酵母双杂交筛选槟榔黄化相关病毒 p26 的宿主互作蛋白[J]. 热带生物学报(中英文), 2026, 17(1): 91–100. DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250066 CSTR: 32425.

14.j.cnki.rdswwb.20250066



槟榔(*Areca catechu* L.)属于棕榈科槟榔属, 为常绿乔木, 位居中国四大南药之首, 是海南省第一大特色经济作物, 在海南种植面积接近 20 万 hm²[1-2]。近年来, 黄化病严重威胁槟榔种植业, 已经成为限制海南地区槟榔产业发展最重要的因素[3], 其中, 槟榔黄化相关病毒(areca palm velarivirus 1, APV1)被确定为关键病原之一[4-6]。APV1 典型症状包括叶片黄化、植株矮化、果实畸形等, 最终导致产量锐减甚至绝收[4]。

APV1 属于长线形病毒科(*Closteroviridae*)隐症病毒属(*Velarivirus*)^[7], 是单分体正义单链 RNA(plus sense single-stranded RNA, +ssRNA)植物病毒, 其病毒粒子呈弯曲的丝状, 长度为 2 000 ~ 3 500 nm^[4,8-9]。APV1 基因组具有高度保守性, 其 11 个开放阅读

框(open reading Frame, ORF)呈现功能模块化分布特征^[10]。5'端 ORF1a/b 编码病毒复制必需的多聚酶复合体, ORF2 编码 4.3 kDa 疏水多肽 p4, ORF3 编码具有分子伴侣功能的 Hsp70 同源蛋白。结构蛋白编码区中, ORF5 编码 60 kDa 的 p60 组装调控因子, ORF6/ORF7 分别编码主要衣壳蛋白(coat protein, CP)与次要衣壳蛋白(minor capsid protein, CPm)。其中, CP 特异性识别并包裹病毒基因组 RNA(gRNA)3'端约 95% 区域, 与 CPm 协同完成核衣壳的层级组装, 而 CPm 则负责 gRNA 尾部 5% 区域的包裹, 是病毒能否侵染宿主最重要的蛋白, 并且发现 CP 蛋白分别与 sHSP 和 DnaJB13 互作^[11]; 除了以上编码蛋白, ORF4、ORF8、ORF9、ORF10 未能比对到相似的蛋白, 其功能未知。在



收稿日期: 2025-05-22

修回日期: 2025-08-01

基金项目: 海南省自然科学基金青年基金项目(324QN202); 海南省自然科学基金青年基金项目(325QN231); 海南省研究生创新研究课题项目(RC2500003503)

***第一作者:** 梁泳琪(1999—), 女, 海南大学热带农林学院 2023 级硕士研究生。Email: 744474632@qq.com

***通信作者:** 李瑾(1993—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 槟榔病害综合防控。Email: lijn2017@hainanu.edu.cn
曹先梅(1991—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 槟榔病害综合防控。Email: 18217924350@163.com

植物与病毒长期的协同进化“军备竞赛”进程中,几乎全部植物病毒均可编码 RNA 沉默抑制子(viral suppressors of RNA silencing, VSR)。该类蛋白的主要作用是抵御宿主的防御反应,从而助力病毒完成侵染、复制及系统性扩散的生命过程^[12]。得益于长线形病毒复杂的基因组提供的负载能力,部分成员能够编码多个 VSR,且其通常定位在基因组上 3'端可变区域。长线形病毒编码的多个 VSR 在功能上表现出分工和协作,例如柑橘衰退病毒(citrus tristeza virus, CTV)编码 3 个 VSR,其中 p20 在本氏烟上抑制局部和系统沉默,而 CP 仅靶向系统沉默,p23 仅靶向局部沉默^[13];p20 和 p23 的共同表达增强了对局部沉默的抑制^[14]。菠萝凋萎病毒 2(pineapple mealybug wilt associated virus-2, PMWaV-2)编码 4 个 VSR,p20 和 p22 都靶向系统沉默^[15]。尽管 APV1 的基因组序列已被解析^[16],但其 3'端的 ORF4、ORF8、ORF9、ORF10 编码的 p21、p26、p18、p25 蛋白功能仍然未知。p26 蛋白大小为 25.7 kDa,海南大学黄惜教授团队前期研究表明 p26 是 RNA 沉默抑制子,也是重要的致病因子(未发表)。因此,揭示 p26 蛋白的互作蛋白对解析 APV1 的致病机制具有重要意义。

酵母双杂交(yeast two-hybrid, Y2H)技术是检测蛋白质间相互作用(protein-protein interaction, PPI)的经典方法^[17]。其原理基于利用转录因子的模块化特性:将报告基因(如 *HIS3*、*LacZ*)置于该转录因子(如 Gal4)结合位点(UAS)下游;同时,将转录因子的 DNA 结合域(DNA-binding domain, BD)与诱饵蛋白(Bait)融合,激活域(activation domain, AD)与潜在的互作蛋白(猎物, Prey)融合。只有当诱饵蛋白与猎物蛋白发生特异性相互作用时,才能将 BD 和 AD 在空间上拉近,重构出有功能的转录因子,从而激活下游报告基因的表达,使酵母在特定筛选培养基上生长或显色。该技术因其直接在活细胞(酵母)内检测互作、灵敏度高、可高通量筛选文库等优势,被广泛应用于构建病毒-宿主互作研究。例如,利用水稻条纹病毒(RSV)的 VSR p3 蛋白作为诱饵筛选烟草 cDNA 文库,鉴定出宿主互作蛋白 NbP3IP^[18]。

基于上述研究背景,本研究选取 APV1 的 p26 蛋白作为诱饵,借助酵母双杂交技术对槟榔 cDNA 文库进行筛选,并鉴定与 p26 存在互作关系

的宿主蛋白。后续将针对所筛选获得的宿主因子开展生物学功能解析研究,以期为深入揭示 p26 蛋白在 APV1 病毒侵染寄主过程中的作用机制提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料 本研究采用槟榔黄化病病叶,源自海南省三亚市崖州区(18°21'32.9" N, 109°10'2.5" E)。DH5 α 大肠杆菌感受态细胞、Y2HGold 与 Y187 酵母感受态细胞均采购于上海唯地公司。酵母双杂交系统配套载体 pGBKT7(诱饵载体)及 pGADT7(猎物载体)购自大连宝生物公司。槟榔 cDNA 文库由邢增宇等^[11]前期构建。所有引物的合成工作委托上海生工生物工程公司完成(详见表 1)。

1.2 槟榔 APV1 病叶总 RNA 提取与 cDNA 第 1 链的合成 利用天根生化科技公司的总 RNA 提取试剂盒(#DP441)对含有 APV1 病毒的槟榔叶片进行 RNA 提取(RNA 质量利用吸光度法测量,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2.0)。使用山东思科捷生物技术有限公司的第一链 cDNA 合成试剂盒(#AG0304),参考说明书进行 cDNA 第 1 链的合成。

1.3 酵母双杂交试验

1.3.1 诱饵载体 pGBKT7-p26 的构建 参考 NCBI 数据库中 APV1-WNY 株(GenBank 登录号:MK956940.2)的基因序列信息,设计特异性引物 pGBKT7-p26-F/R,以上述得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,纯化回收后得到目的片段。采用南京诺唯赞公司的重组一步克隆试剂盒(#C115),构建诱饵表达载体 pGBKT7-p26,PCR 验证后经生工生物测序,序列正确的样品于-20℃保存。

1.3.2 诱饵载体毒性与自激活检测 毒性检测: pGBKT7-p26 质粒与 pGBKT7 空载质粒分别转入酵母 Y2H Gold,涂布于 SD/-Trp 固体平板培养基并于 2×YPDA 液体培养基培养,稀释菌液点板于 SD/-Trp 固体平板后,30℃培养 1~2 d 观察生长情况。

自激活检测:将 pGBKT7-p26 和 pGADT7 空载共转化至 Y2H Gold,涂布 DDO(SD-Trp/-Leu)固体平板,筛选阳性单克隆,稀释菌液后点板于 DDO、QDO/X(SD-Trp/Leu/-His/-Ade+X- α -gal)平板上(本文所用 X- α -gal 浓度均为 20 mg·mL⁻¹),30℃培养 3~5 d 观察生长情况。

表 1 引物序列信息

Tab. 1 Primer sequence information

引物名称 Primer	引物序列 Sequence
pGBKT7-p26-F	CAGAGGAGGACCTGCATATGGAAGATCTTGACACG
pGBKT7-p26-R	TAGTTATGCGGCCGCTGCAGTCATAATTTTATTTTC
CHCHD2-F	GTACCAGATTACGCTCATATGATGCCTCGCCGAAGCTC
CHCHD2-R	CAGCTCGAGCTCGATGGATCCTTAAGCACCCAGTGTAG
AD-F	AATACCACTACAATGGATGATG
AD-R	ATGGTGACGATGCACAGT
BD-F	GTGCGACATCATCATCGGAAG
BD-R	CTAAGAGTCACTTTAAATTTGTA TACAC
cLUC-p26-F	CGGGGCGGTACCCGGGATCCAGAGGACTTGGACACGAAGGT
cLUC-p26-R	CGAAAGCTCTGCAGGTCGACCTACAGCTTGATCTTGCCCA
nLUC-AcCHCHD2-F	ACGAGCTCGGTACCCGGGATCCATGCCTCGCCGAAGCTCTG
nLUC-AcCHCHD2-R	GGTGCTACACTGGGTGCTGTGCGACCAGATCTCGTACGCGT

1.3.3 互作蛋白筛选 酵母双杂交筛库实验参考北京宝日医生物技术有限公司的酵母双杂交操作手册^[1], 并调整具体流程如下: 4 ~ 5 mL pGBKT7-p26 诱饵菌株与 1 mL pGADT7-cDNA 文库(文库来源于邢增宇等^[11])混合, 于 45 mL 2×YPDA 液体培养基 30 °C 共培养 24 h 后涂布于 30 个 TDO/X(SD/-Trp/-Leu/-His+X-α-gal)平板, 30 °C 条件下培养 3 ~ 5 d, 待长出约 800 个克隆后筛选蓝色菌落; 阳性菌落依次在 TDO/X 和 QDO/X 复筛 3 次和 5 次, 确认互作特异性, 提取酵母质粒转化 DH5α, PCR 验证阳性菌液后, 经生工生物公司测序, 并通过 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 分析互作基因。

1.4 槟榔候选基因 CHCHD2 的克隆 将同源物种的 CHCHD2 碱基序列在槟榔转录组数据库中 BLAST, 选取同源性最高的基因设计上下游引物 CHCHD2-F/R, 使用大连宝生物(#R050)高保真酶 Prime STARGXL DNA Polymerase 扩增目标产物, 连接 pGADT7 载体(pGADT7-AcCHCHD2), 转化 DH5α, PCR 验证后经生工生物测序。序列正确的样品于-20 °C 保存。

1.5 阳性克隆的验证 对槟榔候选基因 CHCHD2 进行回转验证实验^[19], 具体步骤如下: 将 pGBKT7-p26 与 pGADT7-AcCHCHD2 质粒共转化至 Y2H Gold 中, 涂布于 DDO(SD/-Trp/-Leu), 筛选阳性单克隆

的菌液稀释后分别点板于 DDO 和 QDO/X 平板, 30 °C 培养 3 ~ 5 d 观察菌落生长状况。

1.6 萤光素酶互补成像 (LCI) 实验 在萤光素酶互补成像(luciferase complementation imaging, LCI)分析中, 将 p26 的编码序列克隆至萤光素酶(luciferase, LUC)的 C 端, 构建 cLUC-p26, 同时将 AcCHCHD2 编码序列克隆至 LUC 的 N 端, 构建 nLUC-AcCHCHD2(所用引物见表 1)。通过农杆菌浸润法, 使重组构建载体在本氏烟草叶片中瞬时表达。在侵染后 48 h 收获叶片, 用 1 mmol·L⁻¹ D-萤光素钾盐涂抹于叶片背面避光孵育 8 ~ 10 min, 然后使用 NightShade LB 985 植物活体成像系统(德国贝托尔德技术公司)进行检测, 并拍摄图。

1.7 生物信息学分析 蛋白质理化性质通过 ExPASy ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析; 亲疏水性利用 ProtScale(<https://web.expasy.org/protscale/>)预测; 同源性比对采用 NCBI BLAST, 本地比对用 Bioedit 软件; 跨膜结构域通过 TMHMM Server v.2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)分析; 信号肽预测使用 SignalP 4.1 Server(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>); 二级结构通过 SOMPA 网站(https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automatic.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html)预测; 亚细胞定位利用 PSORT 网站 (<https://wolfsort.hgc.jp/>)

分析。

2 结果与分析

2.1 诱饵载体 pGBKT7-*p26* 的构建

以槟榔黄化病病叶 cDNA 为模板, 用特异性引物 pGBKT7-

p26-F/R 经高保真酶 PCR 扩增 APV1-*p26*, 产物电泳检测条带正确(图 1-A); 将目的片段连接 pGBKT7 载体后转化 DH5 α , 挑取 5 个单克隆菌落 PCR 检测, 电泳结果与阳性对照一致(图 1-B), 表明成功构建 pGBKT7-*p26* 诱饵载体。

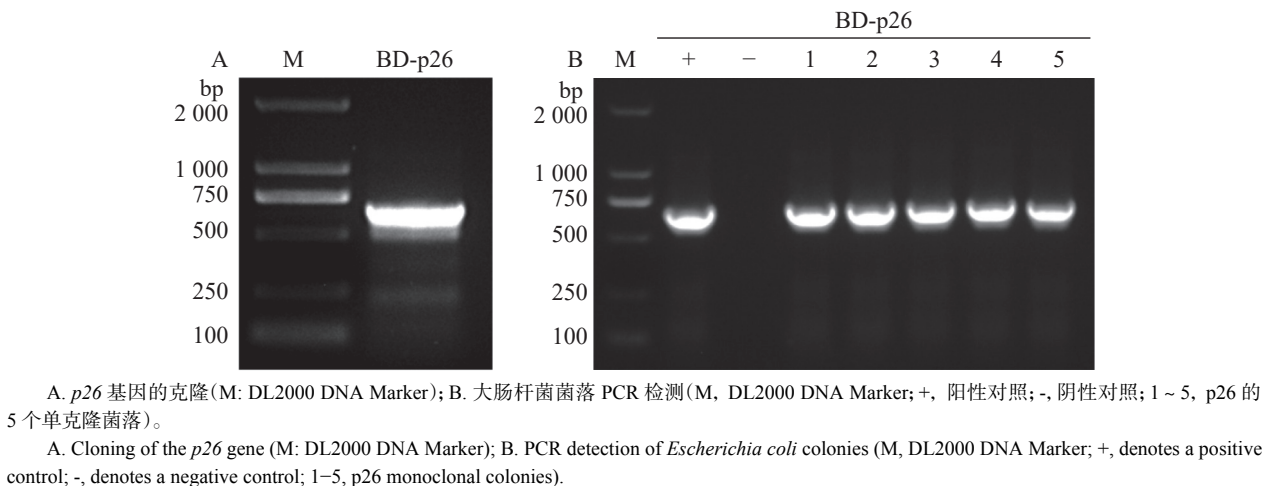


图 1 pGBKT7-*p26* 诱饵表达载体构建
Fig. 1 Construction of the pGBKT7-*p26* bait expression vector

2.2 诱饵载体 pGBKT7-*p26* 毒性检测 将 pGBKT7-*p26* 重组质粒及 pGBKT7 空载体分别转化 Y2H Gold 感受态细胞, 结果显示两者单克隆数量及直径无显著差异, 证实 pGBKT7-*p26* 诱饵载体对酵母细胞无毒性(图 2)。

显蓝。这表明 pGBKT7-*p26* 无自激活活性, 可用于酵母双杂交筛库(图 3)。

2.3 诱饵载体自激活检测 将 pGBKT7-*p26* 与 pGADT7 空载体共转化 Y2H Gold, 营养缺陷型筛选结果显示: 实验组(pGBKT7-*p26* + pGADT7-Empty)与阴性对照(pGBKT7-Lam + pGADT7-T)在 DDO 平板生长但 QDO/X 平板不生长; 阳性对照(pGBKT7-53 + pGADT7-T)在 DDO 平板生长且 QDO/X 平板

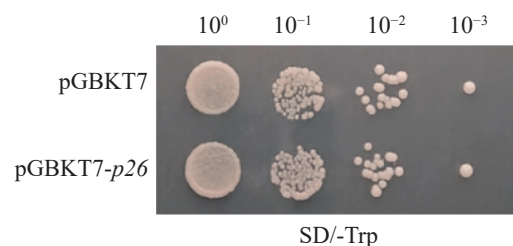


图 2 pGBKT7-*p26* 的毒性检测
Fig. 2 Toxicity detection of pGBKT7-*p26*

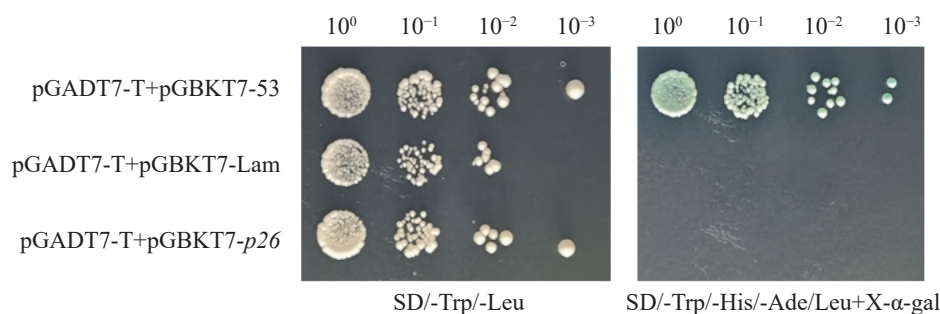


图 3 pGBKT7-*p26* 的自激活检测
Fig. 3 Self-activation detection of pGBKT7-*p26*

2.4 APV1 病毒 *p26* 互作蛋白筛选 将含 pGBKT7-*p26* 的 Y2HGold 菌株培养至对数期($OD_{600} \approx 0.8$), 收集菌体重悬于 2×YPDA, 与 pGADT7-cDNA 文

库共孵育 20 h 后经 0.5×YPDA 洗涤, 涂布 TDO/X 平板。挑取蓝色菌落依次经 TDO/X(3 轮)和 QDO/X(5 轮)复筛(图 4)。从 QDO/X 平板取 12 个稳定显

色的单克隆, 提酵母质粒转化 DH5 α , 菌液 PCR 获 10 个阳性克隆(图 5)。测序结果经 NCBI BLAST 及本地槟榔转录组比对, 筛选出 6 个高可信度候选互作蛋白(表 2)。

2.5 候选互作蛋白 AcCHCHD2 的克隆与酵母双杂交回转变验证 为了进一步验证候选互作蛋白与 p26 蛋白互作的准确性, 选取表 2 中槟榔候选 3 号未知功能蛋白进行酵母双杂交回转变验证。通过结构域预测分析, 发现该基因编码产物具有典型的卷曲螺旋结构域(coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain), 与动物卷曲螺旋结构域蛋白 2 (CHCHD2)家族成员具有显著序列相似性, 故命名为槟榔卷曲螺旋结构域蛋白 2(AcCHCHD2, coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2)。该序列在槟榔转录组数据库中进行 BLAST 比对, 获取同源性最高的编码序列。设计特异性引物 CHCHD2-F/R(表 1), 以槟榔 cDNA 为模板扩增 AcCHCHD2 基因, 构建 pGADT7-AcCHCHD2 重组载体。阳性克隆经测序验证(图 6)后, 与 pGBKT7-p26 共转

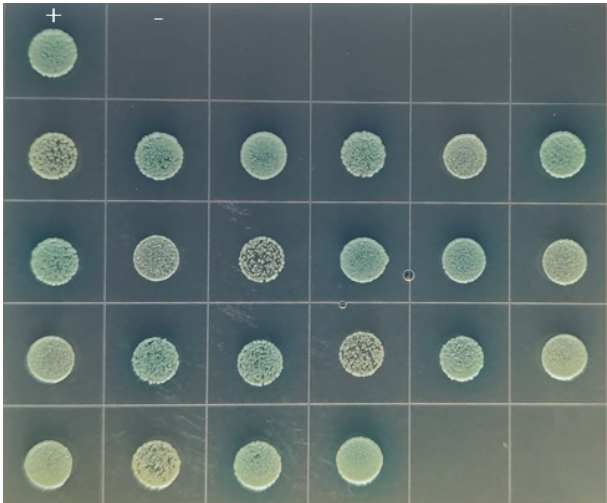


图 4 与 pGBKT7-p26 互作宿主蛋白的筛选
Fig. 4 Screening of host proteins interacting with pGBKT7-p26

注: +, pGBKT7-53 和 pGADT7-T 共转化阳性对照; -, pGBKT7-lam 和 pGADT7-T 共转化阴性对照。
Note: +, Co-transformation positive control of pGBKT7-53 and pGADT7-T; -, Co-transformation negative control of pGBKT7-lam and pGADT7-T.

化 Y2H Gold。转化子在 DDO 培养基上均生长, 表明诱饵和猎物载体已整合并表达。在 QDO/X 选择

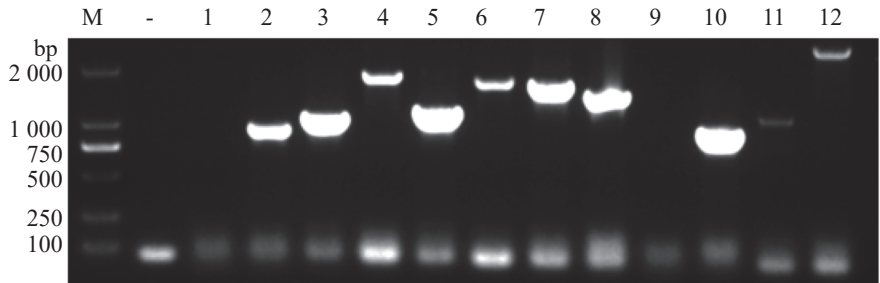


图 5 大肠杆菌菌液 PCR 检测结果(蓝白斑筛选阳性克隆验证)

Fig. 5 Results of *Escherichia coli* bacterial liquid PCR detection (Verification of positive clones by blue-white screening)

注: M, DL2000 DNA Marker; -, 阴性对照; 1~12, 酵母蓝色单克隆转化大肠杆菌菌液 PCR 扩增产物。
Note: M, DL2000 DNA Marker; -, negative control; 1-12, Yeast blue monoclonal transformed *Escherichia coli* liquid PCR amplification product.

表 2 p26 候选互作蛋白信息

Tab. 2 Information on candidate interacting proteins of p26

编号No.	Genebank登录号 GenBank accession number	基因注释 Gene annotation
1	XM_010924085.3	油棕Ras相关蛋白 RABE1c <i>Elaeis guineensis</i> ras-related protein RABE1c
2	XR_605948.4	海枣未表征蛋白 <i>Phoenix dactylifera</i> uncharacterized protein
3	XM_010924987.3	油棕未表征蛋白 C6C3.02c <i>Elaeis guineensis</i> uncharacterized protein C6C3.02c
4	XM_010910619.3	海枣未表征蛋白 <i>Elaeis guineensis</i> uncharacterized protein
5	XM_010933347.2	油棕应激蛋白 PHOS34 <i>Elaeis guineensis</i> universal stress protein PHOS34
6	XM_010924311.3	油棕叶绿体铁蛋白-4 <i>Elaeis guineensis</i> ferritin-4, chloroplastic

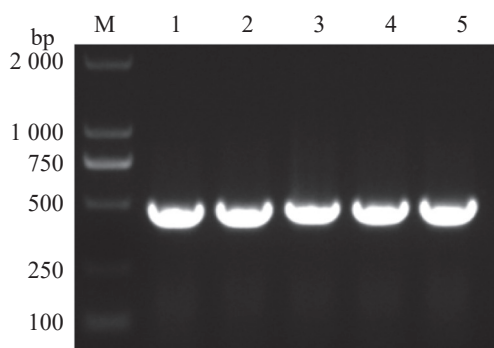


图 6 槟榔 CHCHD2 蛋白基因克隆的大肠杆菌菌液 PCR 验证

Fig. 6 PCR verification of areca palm CHCHD2 protein gene cloned from *Escherichia coli*

注: M, DL2000 DNA Marker; 1~5, 大肠杆菌菌液 PCR 扩增产物。

Note: M, DL2000 DNA Marker; 1-5, *Escherichia coli* liquid PCR amplification product.

性培养基上, 除阴性对照外的所有实验组均生长良好且显色, 证实 p26 与 AcCHCHD2 在酵母细胞中存在特异性相互作用(图 7)。

2.6 LCI 验证 p26 蛋白与 CHCHD2 蛋白的互作

为了验证酵母体系中的试验结果, 将互作蛋白 p26、CHCHD2 基因全长序列分别构建到 cLUC、

nLUC 载体后, 转入农杆菌 GV3101 感受态细胞, 之后注射到本氏烟叶片, 通过生物活体成像仪检测发现 p26 蛋白和 CHCHD2 蛋白在植物体内存在明显的相互作用(图 8), 进一步验证了 p26 蛋白和 CHCHD2 蛋白的互作关系。

2.7 CHCHD2 蛋白生物信息学分析

2.7.1 CHCHD2 蛋白理化性质预测

采用 ExPASy 生物信息学平台对 CHCHD2 蛋白理化特性进行系统解析。分析显示, 该蛋白化学组成为 $C_{628}H_{1007}N_{201}O_{198}S_8$, 编码序列长度 441 bp, 分子质量为 14.8 kDa, 原子总数达 2 042 个, 理论等电点 (pI) 为 9.24。氨基酸组成分析表明其富含丙氨酸 (Ala, 16.3%) 与甘氨酸 (Gly, 12.2%), 电荷分布呈现净正电荷特性 (正电荷残基 12 个, 负电荷残基 8 个)。理化参数显示脂溶指数 62.59 提示适度亲脂性, 不稳定性指数 65.31 (阈值 <40) 明确归类为不稳定蛋白(图 9)。

ProtScale 亲疏水性分析显示, 丙氨酸 (Ala) 疏水性最强 (1.522), 脯氨酸 (Pro) 亲水性最强 (-2.356)。

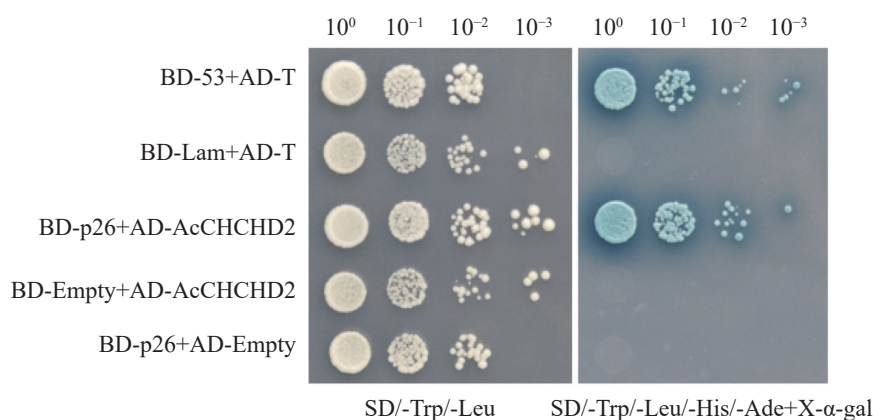


图 7 p26 蛋白与 CHCHD2 蛋白的回转验证

Fig. 7 Rotation validation of p26 protein versus CHCHD2 protein

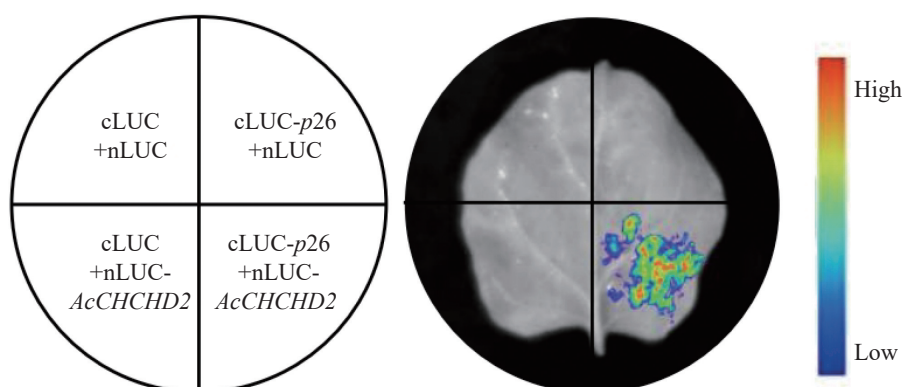


图 8 p26 蛋白与 CHCHD2 蛋白在 LCI 试验中的相互作用

Fig. 8 Interaction between p26 and CHCHD2 in LCI experiment

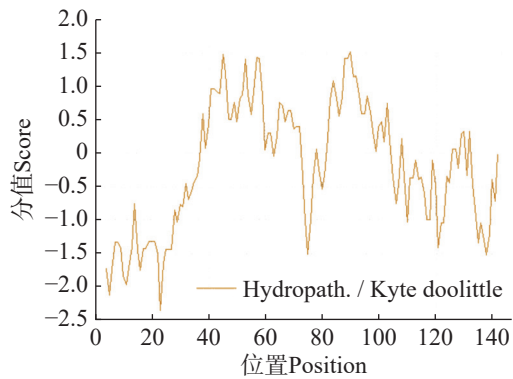


图 9 候选 CHCHD2 蛋白亲/疏水性预测

Fig. 9 Hydrophilic/hydrophobic prediction of candidate protein CHCHD2

注: 正分数值表示疏水性; 负分数值表示亲水性。

Note: Positive score indicates hydrophobicity; Negative score indicates hydrophilicity.

整体亲水性残基比例显著高于疏水性残基(图 9), 表明 CHCHD2 为亲水性蛋白。

2.7.2 CHCHD2 蛋白二级结构分析 利用 SOPMA 工具预测 CHCHD2 的二级结构, 显示无规则卷曲 (random coil) 占比 63.95%, α -螺旋(alpha helix)占 34.01%, β -折叠(Beta-sheet)占 2.04%(图 10)

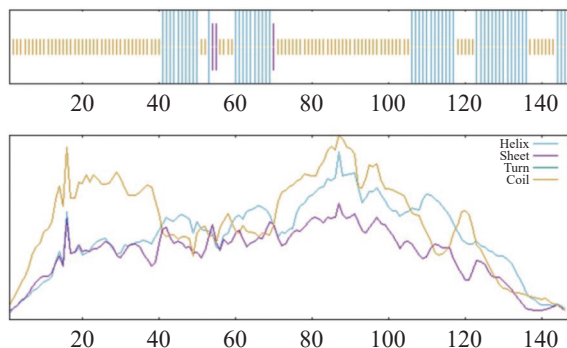


图 10 候选 CHCHD2 蛋白二级结构分析

Fig. 10 Secondary structure analysis of candidate protein CHCHD2

注: Helix, α -螺旋; Sheet, β -折叠; Turn, β -转角; Coil, 无规则卷曲。

2.7.3 CHCHD2 蛋白信号肽和亚细胞定位预测

通过 SignalP 4.1 Server、PSORT 和 TMHMM 在线工具分别对 CHCHD2 进行信号肽、亚细胞定位和跨膜结构域分析。结果显示, 该蛋白不存在信号肽序列, 亚细胞定位预测表明其主要定位于叶绿体, 且不含跨膜结构域。

3 讨论

APV1 属于长线形病毒科, 其基因组包含 11 个开放阅读框(ORF), 其中 ORF8 编码的 p26 蛋白功能尚未明确。值得注意的是, 长线形病毒科的多

个成员编码的 VSR 通常位于基因组 3'端可变区^[18], 而 APV1 的 p26 蛋白定位于此区域, 提示其可能具有 VSR 功能, 也是 APV1 的关键致病因子^[4]。然而当前对于 p26 蛋白参与 APV1 侵染过程, 以及植物如何抵御 APV1 侵染的机制尚不清楚。在植物病毒研究中, Y2H 技术揭示了众多病毒与宿主蛋白关键的互作关系, 有助于对病毒侵染研究。例如, 以黄瓜花叶病毒(CMV)2b 蛋白为诱饵筛选拟南芥文库, 则发现其与 Argonaute 4(AGO4)直接互作^[20]。基于 Y2H 的研究系统性地揭示了多种植物病毒蛋白与宿主因子的互作关系, 为深入理解病毒致病机理和挖掘抗病基因提供了重要的理论依据。因此本研究利用 Y2H 技术, 以 APV1 的 p26 蛋白为诱饵, 筛选得到 6 个与 p26 蛋白互作的寄主因子。

在候选蛋白中已知功能蛋白仅有 3 个为 Ras 相关蛋白(RAB1c), 叶绿体铁蛋白(ferritin-4)和应激蛋白(PHOS34)。RAB1c 作为 ABA 信号正调控因子, 通过增强保卫细胞离子转运的 ABA 敏感性, 缩小气孔开度并提高抗旱性^[21]。病毒蛋白 p26 可能通过靶向 RAB1c(膜运输)和 ferritin-4(铁代谢)促进侵染^[22], 类似机制见于番茄丛矮病毒 p19 结合 RAB5 调控囊泡运输^[23], 及水稻条纹病毒 NS3 抑制铁蛋白引发氧化损伤^[24]。因此 APV1 可能采用类似的“劫持宿主通路”策略, 需要后续验证是否存在互作。

此外, 本研究还筛选到 3 个未知功能蛋白, 其中 3 号未知功能蛋白经序列比对和结构域分析, 被鉴定为卷曲螺旋结构域蛋白 CHCHD2。CHCHD2 是一类保守的线粒体/叶绿体蛋白, 属于卷曲螺旋功能结构域蛋白质家族, 在动物中参与氧化应激调控^[25], 与包括帕金森病在内的多种神经退行性疾病相关, 对细胞的正常功能维持起重要作用, 多数在线粒体中参与调节线粒体代谢并调节呼吸链成分表达, 而在应激情况下其转位至细胞核中调控自身以及细胞色素氧化酶等基因的转录^[26], 而在植物中的功能尚未明确。本研究首次发现其与病毒蛋白 p26 互作, 暗示 APV1 侵染过程中可能影响 CHCHD2 的功能, 从而影响槟榔的叶绿体。回转验证实验和 LCI 实验(图 7)进一步证实 p26 与 CHCHD2 的特异性互作, 排除了筛库过程中的随机结合, 为后续体内外互作验证(如 Co-IP)提供了

坚实的前期证据。

本研究的生物信息学预测显示, 槟榔 CHCHD2 蛋白富含丙氨酸(16.3%)和甘氨酸(12.2%), 具有强亲水性(图 7), 且二级结构以无规则卷曲(63.95%)和 α -螺旋(34.01%)为主(图 8), 这类柔性结构常作为蛋白互作的核心区域, 提示其可能通过柔性结构域与 p26 结合。此外, 亚细胞定位预测表明 CHCHD2 主要定位于叶绿体(无信号肽和跨膜结构域)。据报道, 辣椒轻斑驳病毒(pepper mild mottle virus, PMMoV)侵染辣椒可诱导叶绿体外膜蛋白 OMP24 上调。OMP24 过表达触发核周叶绿体聚集及活性氧(ROS)积累, 激活叶绿体向细胞核逆行信号(CRS)通路, 增强宿主基础免疫以抵御病毒。作为反防御策略, PMMoV 外壳蛋白(CP)与 OMP24 互作, 干扰其自身互作, 从而抑制 OMP24 介导的抗病毒免疫^[27]。此外, 中国番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl China virus, TYLCCNV)病因子 β C1 靶向叶绿体蛋白 OSB1。 β C1-OSB1 互作导致 OSB1 被错误定位至细胞质, 阻碍其进入叶绿体并破坏其与叶绿体定位蛋白 ALD1 的结合, 进而促进 ALD 降解, 阻断免疫信号分子哌啶甲酸(PIP)的合成, 最终抑制植物免疫^[28]。因此推测, APV1 p26 可能通过靶向 CHCHD2 干扰叶绿体功能, 破坏宿主 ROS 稳态, 从而削弱抗病毒防御。CHCHD2 作为新发现的 APV1 互作因子, 其功能解析可为植物抗病毒育种提供新靶点。

本研究通过酵母双杂交技术筛选到了 APV1 p26 蛋白的 6 个候选互作宿主蛋白, 并鉴定了 CHCHD2 为 p26 的互作蛋白, 但其互作仍需要 BiFC 等技术进一步验证。此外, CHCHD2 的卷曲螺旋结构域是否为 p26 的直接结合区域, 以及该结构域突变是否影响互作特异性, 需通过结构域截断和定点突变实验明确。后续为解析 CHCHD2 的功能, 可以通过病毒诱导的基因沉默(VIGS)或 CRISPR-Cas9 技术敲低 CHCHD2, 观察 APV1 病毒载量变化, 明确其在病毒侵染中的功能。CHCHD2 作为连接病毒侵染与宿主免疫的枢纽分子, 其功能解析将为槟榔黄化病的防控提供新的靶标。这些发现为阐明 APV1 的致病机制提供了分子基础, 同时为槟榔抗病品种选育提供了潜在靶点。未来结合功能基因组学与分子生物学技术, 将进一步推动槟榔黄化病的综合防控策略开发。

参考文献:

- [1] Khan L U, Zhao R B, Wang H X, et al. Recent advances of the causal agent of yellow leaf disease (YLD) on areca palm (*Areca catechu* L.) [J]. *Tropical Plants*, 2023, 2(1): 7. <https://doi.org/10.48130/TP-2023-0007>
- [2] 申丹艳, 邱苏哈, 林子情, 等. 海南省槟榔种植成本收益分析及产业发展建议[J]. *热带农业科技*, 2025, 48(1): 58–63. <https://doi.org/10.16005/j.cnki.tast.2025.01.011>
- [3] 葛慧远, 孟秀丽, 林兆威, 等. 中国“槟榔黄化病”研究 40 年: 制约科研进展的几个关键问题[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2024 年学术年会论文集. 长春: 中国植物病理学会, 2024: 371. <https://doi.org/10.26914/c.cnkihy.2024.022571>
- [4] Wang H X, Zhao R B, Zhang H W, et al. Prevalence of yellow leaf disease (YLD) and its associated areca palm velarivirus 1 (APV1) in betel palm (*Areca catechu*) plantations in Hainan, China [J]. *Plant Disease*, 2020, 104(10): 2556–2562. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0140-RE>
- [5] Zhang H W, Zhao X, Cao X M, et al. Transmission of areca palm Velarivirus 1 by mealybugs causes yellow leaf disease in betel palm (*Areca catechu*) [J]. *Phytopathology*, 2022, 112(3): 700–707. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-21-0261-R>
- [6] Zhao X, Zhao R B, Cao X M, et al. Transmission of areca palm Velarivirus 1 (APV1) by *Pseudococcus cryptus* [J]. *Phytopathology Research*, 2024, 6(1): 10. <https://doi.org/10.1186/s42483-024-00228-x>
- [7] Yu H M, Qi S S, Chang Z X, et al. Complete genome sequence of a novel Velarivirus infecting areca palm in China [J]. *Archives of Virology*, 2015, 160(9): 2367–2370. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2489-9>
- [8] Agranovsky A A. Closteroviruses: molecular biology, evolution and interactions with cells [C]//GAUR R K, PETROV N M, PATIL B L, et al. *Plant Viruses: Evolution and Management*. Singapore: Springer, 2016: 231–252. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1406-2_14
- [9] Fuchs M, Bar-Joseph M, Candresse T, et al. ICTV virus taxonomy profile: *Closteroviridae* [J]. *Journal of General Virology*, 2020, 101(4): 364–365. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001397>
- [10] Cao X M, Zhao R B, Wang H X, et al. Genomic diversity of areca palm Velarivirus 1 (APV1) in areca palm (*Areca catechu*) plantations in Hainan, China [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 725. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07976-6>
- [11] 邢增宇, 赵瑞白, 曹先梅, 等. 槟榔黄叶病毒 1 外壳蛋白的互作蛋白筛选[J]. *分子植物育种*, 2024, 22(12): 3912–3921. <https://doi.org/10.13271/j.mpb.022.003912>
- [12] Csorba T, Kontra L, Burgyn J. Viral silencing suppressors: tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence [J]. *Virology*, 2015, 479/480: 85–103. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.028>

- [13] Lu R, Folimonov A, Shintaku M, et al. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(44): 15742–15747. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404940101>
- [14] Costâ A, Martins T, Marques N, et al. Combined expression of p20 and p23 proteins from citrus Tristeza virus show enhanced local silencing suppressor activity [J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2016, 55(2): 172–183. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-16093
- [15] Dey K K, Borth W B, Melzer M J, et al. Analysis of pineapple mealybug wilt associated virus -1 and -2 for potential RNA silencing suppressors and pathogenicity factors [J]. *Viruses*, 2015, 7(3): 969–995. <https://doi.org/10.3390/v7030969>
- [16] 赵瑞白. 槟榔黄化相关病毒 (APV1) 侵染性克隆构建 [D]. 海口: 海南大学, 2022. <https://doi.org/10.27073/d.cnki.ghadu.2022.001146>
- [17] Fields S, Song O K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions [J]. *Nature*, 1989, 340(6230): 245–246. <https://doi.org/10.1038/340245a0>
- [18] Jiang L L, Lu Y W, Zheng X Y, et al. The plant protein NbP3IP directs degradation of *Rice stripe virus* p3 silencing suppressor protein to limit virus infection through interaction with the autophagy-related protein NbATG8 [J]. *New Phytologist*, 2021, 229(2): 1036–1051. <https://doi.org/10.1111/nph.16917>
- [19] 余婧, 杨慧, 余世洲, 等. 烟草 *NtCBT* 基因启动子酵母单杂诱饵载体构建及互作蛋白筛选 [J]. *生物技术通报*, 2022, 38(10): 73–79. <https://doi.org/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-1597>
- [20] Hamera S, Yan Y, Song X G, et al. Expression of cucumber mosaic virus suppressor 2b alters FWA methylation and its siRNA accumulation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biology Open*, 2016, 5(11): 1727–1734. <https://doi.org/10.1242/bio.017244>
- [21] 林敏燕. 拟南芥小 GTP 结合蛋白 RABE1C 参与植物干旱胁迫机制研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017. <https://doi.org/10.27272/d.cnki.gshdu.2017.000041>
- [22] 钟晨. 铁胁迫对‘砀山酥梨’叶片矿质营养及相关基因表达的影响 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- [23] Barajas D, Xu K, De Castro Martín I F, et al. Co-opted oxysterol-binding ORP and VAP proteins channel sterols to RNA virus replication sites via membrane contact sites [J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(10): e1004388. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004388>
- [24] Zheng L J, Zhang C, Shi C N, et al. Rice *stripe virus* NS3 protein regulates primary miRNA processing through association with the miRNA biogenesis factor OsDRB1 and facilitates virus infection in rice [J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(10): e1006662. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006662>
- [25] Liu Y, Clegg H V, Leslie P L, et al. CHCHD2 inhibits apoptosis by interacting with Bcl-x L to regulate Bax activation [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2015, 22(6): 1035–1046. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.194>
- [26] 祝柳慧, 张歆悦, 朱洲海, 等. 卷曲螺旋结构域蛋白 2 通过促进线粒体自噬抑制帕金森病 SH-SY5Y 细胞凋亡 [J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(25): 5403–5413. <https://doi.org/10.12307/2025.098>
- [27] Han K L, Zheng H Y, Yan D K, et al. Pepper mild mottle virus coat protein interacts with pepper chloroplast outer envelope membrane protein OMP24 to inhibit antiviral immunity in plants [J]. *Horticulture Research*, 2023, 10(5): uhad046. <https://doi.org/10.1093/hr/uhad046>
- [28] Pan Z X, Wang Y Q, Li F F, et al. A plant viral effector disrupts ALD1-OSB1 immunity module to suppress chloroplast defenses [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2025, 67(9): 2510–2524. <https://doi.org/10.1111/jipb.13959>

Screening of host interaction proteins of areca palm velarivirus 1 (APV1) p26 via the yeast two-hybrid system

Liang Yongqi^{1#}, Wang Yutian¹, Gao Baosen¹, Zhao Ruibai²,
Wang Hongxing², Li Jin^{2*}, Cao Xianmei^{2*}

(1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; 2. Nanfan School/Sanya Nanfan Institute, Hainan University, Sanya, Hainan 572024, China)

Abstract: Areca Palm Yellow Leaf Disease, caused by areca palm velarivirus 1 (APV1), poses a severe threat to the areca palm (*Areca catechu* L.) industry in Hainan. The p26 protein encoded by APV1 plays a critical role in viral infection, yet its interacting host proteins remain unidentified. The yeast two-hybrid (Y2H) technique was employed to screen an Areca palm cDNA library using p26 as the bait to identify interaction partners. The pGBKT7-p26 bait vector was successfully constructed and passed toxicity and autoactivation assays, confirming its suitability for the interaction screening system. Six candidate interacting proteins were identified by library screening, including Ras-related protein RABE1c, chloroplast ferritin-4 (Ferritin-4), oil palm stress-responsive protein PHOS34, and three proteins of unknown function. Following secondary screening and sequencing alignment, the focus was converged on an uncharacterized protein harboring a coiled-coil domain—coiled-coil helix-coiled-coil helix domain-containing 2 (CHCHD2). Retransformation assays confirmed the specific interaction between p26 and CHCHD2 in yeast. Bioinformatics analysis revealed that CHCHD2 has a molecular formula of $C_{628}H_{1007}N_{201}O_{198}S_8$ and a molecular weight of 14.8 kDa. It is predicted to be a hydrophilic, unstable protein, with its secondary structure dominated by random coils. Subcellular localization predictions target CHCHD2 to the chloroplast, and it lacks signal peptides or transmembrane domains. This study reveals an *in vitro* interaction between APV1 p26 and the host protein CHCHD2, laying the groundwork for elucidating the function of p26 in viral pathogenesis and the CHCHD2-mediated host defense mechanisms.

Keywords: areca palm velarivirus 1 (APV1); p26; yeast two-hybrid; host interaction proteins; CHCHD2

(责任编辑: 邹游兴)