文章编号:1674-7054(2010)01-0050-05

番木瓜 eIF4E 和 eIFiso4E 酵母双杂交诱饵表达载体的构建及自激活检测

吴金燕[1,2],言　普[2],沈文涛[2],周　鹏[1,2]

(1. 海南大学 农学院,海南 海口 570228;
2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所,农业部热带作物生物技术重点开放实验室,海南 海口 571101)

摘　要:通过 RT-PCR 获得番木瓜 eIF4E 和 eIFiso4E 基因的编码区,将其分别克隆到 pBD-GAL4 载体中,构建酵母双杂交系统的诱饵载体 pBD-GAL4-eIF4E,pBD-GAL4-eIFiso4E。测序正确后,将重组质粒导入 YRG-2 酵母菌株,检测其表达产物对酵母细胞有无毒性及对报告基因有无激活作用。结果表明,获得了正确的番木瓜 eIF4E,eIFiso4E 基因编码区,并成功克隆到 pBD-GAL4 诱饵载体中,且转化有诱饵载体的 YRG-2 在 SD/-Trp营养缺陷平板上生长良好,在 SD/-His-Trp 营养缺陷平板上不能生长,说明表达产物对酵母细胞无毒性,对报告基因也无自激活作用,这为下一步利用酵母双杂交系统检测番木瓜 eIF4E,eIFiso4E 蛋白与病毒的相互作用奠定了基础。

关键词:番木瓜;eIF4E;eIFiso4E;酵母双杂交;自激活检测

中图分类号:S 667.9;Q 78　　**文献标志码**:A

在植物中,真核翻译起始因子 eIF4E(eukaryotic translation initiation factor 4E)家族成员包括 eIF4E 及其异构体 eIFiso4E。研究结果表明,eIF4E 和 eIFiso4E 在植物与多种病毒互作中起重要作用。病毒侵染寄主植物并在植物体内进行自我复制和增殖需要借助寄主自身蛋白质合成机理[1-3]。因此,通过鉴定病毒必需的寄主蛋白并以其为靶点阻断它与病毒之间的互作,就有望控制病毒的侵染[4]。番木瓜环斑病毒(Papaya ringspot virus,PRSV)病一直是番木瓜(*Carica papaya* L.)种植业的毁灭性病害,发病率可高达 90% 以上,使得番木瓜产业的发展受到极大限制[5]。PRSV 是马铃薯 Y 病毒属(Potyviruses)的成员之一,已有研究发现,在多种马铃薯 Y 病毒属病毒侵染植物过程中,病毒基因组连接蛋白(viral genome-linked protein,VPg)与植物真核起始因子 eIF4E 或 eIFiso4E 之间的互作起关键作用[6-9]。因此,研究番木瓜 eIF4E 家族与 PRSV 的互作情况,对寻找抗 PRSV 新靶点具有重要意义。酵母双杂交技术(yeast two-hybrid system,YTHS)是一种研究蛋白质相互作用的方法,该技术在研究已知蛋白间的互作以及筛选与诱饵蛋白互作的未知蛋白有着重要作用和广泛应用[10]。本研究以番木瓜 eIF4E 与 eIFiso4E 为诱饵蛋白,构建诱饵载体 pBD-GAL4-eIF4E 和 pBD-GAL4-eIFiso4E,转化 YRG-2 酵母菌株后进行毒性和自激活检测,为利用酵母双杂交系统研究番木瓜 eIF4E 和 eIFiso4E 与病毒的相互作用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　主要试剂　限制性内切酶 *Pst* Ⅰ,*Sal* Ⅰ,Taq 聚合酶,T4 DNA 连接酶等工具酶、T 载体、DNA 标准

收稿日期:2009-09-09
基金项目:国家自然科学基金项目(30760134);中央级公益性科研院所基本科研业务费资助项目(ITBBZD0732)
作者简介:吴金燕(1985-),女,湖南岳阳市人,海南大学农学院,生物化学与分子生物学专业 2007 级硕士生.
通信作者:周鹏(1963-),男,研究员/教授,博士生导师,E-mail:zhp6301@126.com Tel. 0898-66988564.

分子质量 Marker、反转录试剂盒等均购自大连 Takara 公司,Trizol 购自 invitrogen,质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司,DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司,酵母用培养基(SD,YPAD)成分分别购自 Sigma,BD 和上海生工生物工程技术服务有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2　*菌株及质粒*　大肠杆菌 DH5α,本实验室保存。大肠杆菌 XL1-Blue,酵母菌株(YRG-2),表达载体 pBD-GAL4 均购自 Stratagene 公司。

1.2　方法

1.2.1　*引物设计*　根据 GenBank 已登录的番木瓜 eIF4E(登录号 FJ644949)、eIFiso4E(登录号 FJ595992)基因的编码区序列,结合酵母表达载体 pBD-GAL4 的阅读框、多克隆位点,设计引物序列(上海生工生物工程技术服务有限公司合成)如下:

1)eIF4E

F1:5′-TA GTCGAC TCATGGTAGTAGAAGGAACCC- 3′

Pst Ⅰ

R1:5′-GC CTGCAG TCATACCGAGTAGCGATTCTT- 3′

Sal Ⅰ

2)eIFiso4E

F2:5′-TA GTCGAC TCATGGCGAGTGAGGTAGCG- 3′

Pst Ⅰ

R2:5′-GC CTGCAG TCGAGGTTACACATTGTATC- 3′

Sal Ⅰ

1.2.2　*总 RNA 提取和 cDNA 合成*　以番木瓜叶片为材料,采用常规 Trizol 法提取总 RNA,采用 Takara 公司反转录试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver. 3.0 进行 cDNA 合成。

1.2.3　*PCR 扩增*　用上述引物和 cDNA 模板分别扩增番木瓜 eIF4E 和 eIFiso4E 基因的编码区。PCR 反应程序均为:94 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,30 个循环,72 ℃延伸 7 min。产物回收后与 T 载体连接,并进行克隆和测序。

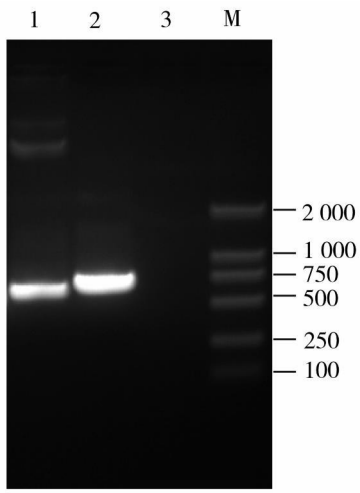
1.2.4　*诱饵载体构建*　测序正确后,用限制性内切酶 *Pst* Ⅰ,*Sal* Ⅰ对含目的基因的 T 载体和 pBDGAL4 进行酶切,回收基因片段和表达载体片段。用 T4 连接酶将回收的基因片段和表达载体片段建立连接反应,16 ℃过夜。次日,连接产物转化 XL1-Blue 感受态细胞,37 ℃过夜静置培养。挑取单菌落小量抽提质粒并酶切鉴定,样本送英骏生物公司测序。

1.2.5　*重组质粒转化酵母菌株*　酵母感受态细胞的制备采用醋酸锂转化法,转化酵母感受态细胞按照 Stratagene 公司说明书进行。即将构建好的诱饵载体、鲑鱼精 DNA 和酵母感受态细胞混合,加入 0.7 mL 的 PEG/LiAc 溶液振荡混匀。30 ℃振荡培养 30 min,加入 0.07 mL 的 DMSO 混匀,在 42 ℃水浴 15 min,冰浴 10 min,离心,弃上清,以 1.5 mL 1 ×TE 重悬细胞,铺于 SD/-Trp 平板,然后将平板于 30 ℃培养,直至带有诱饵载体的酵母克隆长出。

1.2.6　*自身激活作用检测*　用无菌牙签随机挑取酵母菌单个克隆,分别划线于 SD/-Trp,SD/-His-Trp 平板上,于 30 ℃培养,观察酵母菌的生长情况。以转化了 pBD-WT 的 YRG-2 作阴性对照,转化了 pGAL4 的 YRG-2 作阳性对照,采用 β-半乳糖苷酶印膜法检测诱饵载体 pBD-GAL4-eIF4E 和 pBD-GAL4-eIFiso4E 中 LacZ 报告基因的表达情况。用无菌牙签随机挑取酵母单个克隆,点样于滤纸上,将带有酵母克隆的滤纸在液氮中迅速冷冻 10 s,再置于室温裂解菌体,这样反复冻融 2 ~3 次后,将点有菌体的滤纸面朝上,放在另一张同样大小浸有 Z buffer/X-gal 的滤纸上,去气泡,于 30 ℃孵育 8 h,观察颜色变化,判定试验结果。

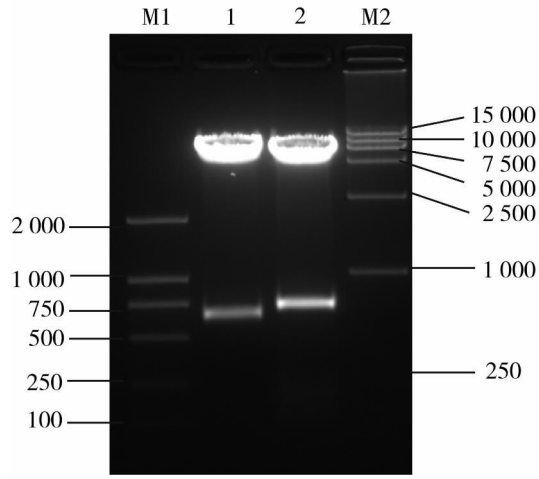
2 结果与分析

2.1 番木瓜 eIF4E 和 eIFiso4E 基因编码区的 PCR 扩增 根据 GenBank 已登录的番木瓜 eIF4E 和 eIFiso4E 基因序列，以反转录获得的番木瓜 cDNA 为模板，用所设计的引物分别扩增出的 DNA 片段约 650 bp 和 750 bp（见图 1），片段经电泳回收后进行克隆转化，通过酶切鉴定和克隆载体测序分析，碱基序列与 GenBank 登录的完全一致，说明已克隆获得 eIF4E 和 eIFiso4E 基因的编码区。



1. eIFiso4E 基因；2. eIF4E 基因；3. 阴性对照；M. DL 2 000 Marker

图 1 PCR 扩增 eIFiso4E 和 eIF4E 基因

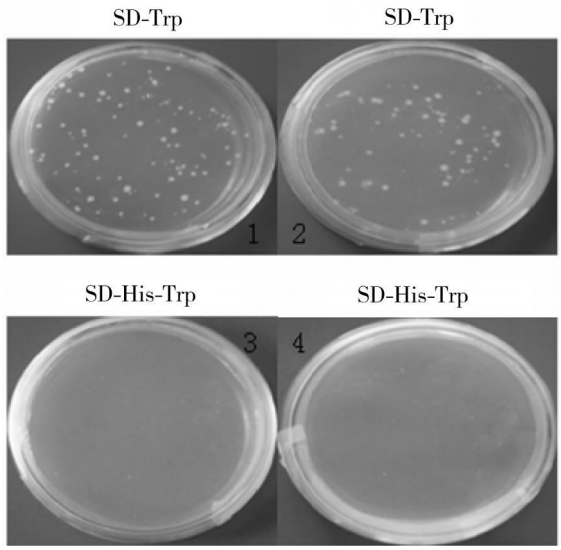


M1. DL 2 000 Marker；1. pBD-GAL4cam-eIFiso4E；2. pBD-GAL4cam-eIF4E；M2. DL 15 000 Marker

图 2 诱饵蛋白表达载体的双酶切鉴定

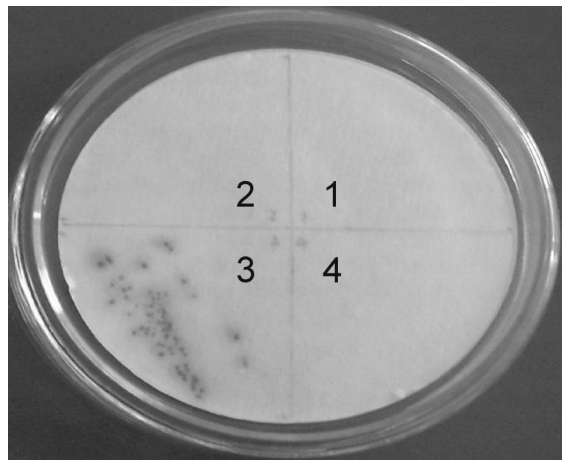
2.2 诱饵蛋白载体的构建 将在克隆载体上测序正确的 eIF4E，eIFiso4E 片段与相同酶切线性化的酵母双杂交诱饵载体 pBD-GAL4 连接，构建与 pBD-GAL4 融合表达的载体 pBD-GAL4-eIF4E，pBD-GAL4-eIFiso4E，并转化大肠杆菌 XL1-Blue。将得到的阳性克隆用 pBD-GAL4 载体测序引物进行 PCR 鉴定，并提取质粒纯化酶切后（见图 2），由英骏公司测序，测序结果与 pBD-GAL4 载体多克隆位点和 eIF4E，eIFiso4E 序列进行比对后证明融合区域的读码框正确，并有正确的方向，诱饵载体 pBD-GAL4-eIF4E 和 pBD-GAL4-eIFiso4E 构建正确。

2.3 诱饵载体的转化及自激活鉴定 将 pBD-GAL4-eIF4E，pBD-GAL4-eIFiso4E 质粒用 LiAc 法转化酵母双杂交报告菌株 YRG-2 后涂布于 SD/-Trp，SD/-His-Trp 平板上，结果菌落在 SD/-Trp 平板上生长，说明表达蛋白对酵母菌无毒害作用，而在 SD/-His-Trp 平板上菌落不能生长，说明诱饵蛋白不具有单独激活 His 报告基因的能力（见图 3）。阳性克隆经过酵母菌落 PCR 鉴定，证明 pBD-GAL4-eIF4E，pBD-GAL4-eIFiso4E 诱饵载体已经成功转化到 YRG-2。为了排除这 2 个融合蛋白具有单独激活 LacZ 报告基因的能力，将 SD/-Trp 平板上长出菌落再次划线接种于 SD-Trp 平板上，以转化了 pBD-WT 的 YRG- 2 作阴性对照，以转化了 pGAL4 的 YRG-2 作阳性对照，30 ℃，孵育 5 ~7 d。由于 pGAL4 质粒含有野生型全长 GAL4 基因，可以激活下游 Lac 启动，使 β-半乳糖苷酶含量增加，分解底物 x-gal，而使滤纸变蓝色。结果显示（图 4），转化了 pGAL4 的 YRG-2 通过 β – 半乳糖苷酶活性检测，菌落变蓝，转化了 eIF4E，eIFiso4E 诱饵载体的 YRG-2 菌落不变蓝，从而证明 pBD-GAL4-eIF4E，pBD-GAL4-eIFiso4E 融合蛋白本身不具有激活 LacZ 报告基因的能力，可以用于下一步的筛选。



1,3 为 eIF4E; 2,4 为 eIFiso4E

图 3　转化酵母毒性及自激活检测



1. 阴性对照;2. eIF4E;3. 阳性对照;4. eIFiso4E

图 4　β-gal 活性检测

3　讨　论

真核翻译起始因子在真核蛋白质翻译过程中起着重要作用。研究表明,eIF4E 及其异构体 eIFiso4E 在植物与马铃薯 Y 病毒属(Potyvirus)病毒互作中发挥极其关键的作用。酵母双杂交分析显示拟南芥中 eIF4E 和 eIFiso4E 能与烟草花叶病毒(TEV)和芜青花叶病毒(TuMV)的 VPg 相互作用;最新发现辣椒中 eIF4E 和 eIFiso4E 均与辣椒叶脉斑驳病毒(ChiVMV)的 VPg 相互作用[11]。病毒依赖寄主因子才能生存,如果寄主缺乏对病毒致病必需的因子,病毒就不能侵染,从而寄主植物具有抗性。因此,寻找参与病毒致病的寄主因子,是进行植物抗病研究的一个有效途径。本研究中番木瓜 eIF4E 和 eIFiso4E 的酵母双杂交诱饵载体的构建,为验证其与病毒的互作打下了基础。

酵母双杂交系统是建立在细胞内从基因水平研究蛋白质间相互作用的遗传学方法。在构建酵母诱饵表达载体时,由于某些蛋白的表达可能对酵母菌株产生毒害作用,使酵母细胞不能在选择培养基上生长,还有一些蛋白本身可能就是一个转录激活因子,另外一些蛋白含有酸性氨基酸区域或者能够与酵母宿主转录激活因子结合,这些蛋白能够直接激活报告基因的表达[12-13]。因此,在筛选前还需要验证诱饵载体的自激活与毒性作用,用以排除假阳性和假阴性的相互作用。本实验通过 His 和 Trp 二重营养缺陷平板检测无菌落生长,采用 β-半乳糖苷酶印膜法检测诱饵载体,菌落不变蓝,表明 eIF4E 和 eIFiso4E 诱饵载体转化酵母菌株时无毒性且不能自激活 YTHS 系统的报告基因 LacZ 和 His。因此,研究中构建的诱饵融合蛋白表达载体符合本实验的需要,解决了试验中的关键问题,可以进行其相互作用蛋白的验证和筛选,为下一步实验奠定了基础。

参考文献:

[1] LELLIS A D, KASSCHAU K D, WHITHAM S A, *et al*. Loss-of-susceptibility mutants of Arabidopsis thaliana reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyVirus infection[J]. Curr Biol., 2002, 12: 1046-1051.

[2] SATO M, NAKAHARA K, YOSHII M, *et al*. Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of Arabidopsis thaliana by potyviruses[J]. FEBS Lett, 2005, 579: 1167-1171.

[3] ROBAGLIA C, CARANTA C. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection[J]. Trends in Plant Sci, 2006, 11(1): 40-45.

[4] NIMCHUK Z, EULGEM T, HOLT B F, *et al*. Recognition and response in the plant immune system[J]. Annu. Rev. Genet, 2003, 37: 579-609.

[5] GONSALVES D. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study [J]. Annu Rev Phytopathol, 1998, 36: 415 – 437.

[6] SCHAAD M C, ANDERBERG R J, CARRINGTON J C. Strain-specific interaction of the Tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system[J]. Virology. 2000, 273: 300 – 306.

[7] MIYOSHI H, SUEHIRO N, TOMOO K, *et al*. Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and plant translational initiation factors[J]. Biochimie, 2006, 88: 329 – 340.

[8] ROUDET-TAVERT G, MICHON T, WALTER J, *et al*. Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro[J]. J. Gen Virol., 2007, 88: 1029 – 1033.

[9] CHANTAL Beauchemin, NATHALIE Boutet, JEAN-FRANC, *et al*. Visualization of the Interaction between the Precursors of VPg, the Viral Protein Linked to the Genome of Turnip Mosaic Virus, and the Translation Eukaryotic Initiation Factor iso 4E In Planta[J]. J. Virol. 2007: 775 – 782.

[10] 奥斯伯 F, 金斯顿 R E, 塞德曼 J G, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译, 金冬雁, 校. 北京: 科学出版社, 1998: 1 – 80.

[11] HWANG Jeena, JI Jin-jie, LIU Wing-yee, *et al*. Double mutations in eIF4E and eIFiso4E confer recessive resistance to Chilli Veinal Mottle Virus in pepper[J]. Mol Cells, 2009, 27(3): 329 – 336.

[12] YANG M, WU Z, FIELDS S. Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid System[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 1152 – 1156.

[13] JAMES P, HALLADAY J, CRAIG E A. Genonic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid Selection in yeast[J]. Genetics, 1996, 144: 1425 – 1436.

Construction and Autoactivation Identification of Bait Vector Containing Papaya eIF4E and eIFiso4E Gene in Yeast Two Hybrid System

WU Jin-yan[1,2], YAN Pu[2], SHEN Wen-tao[2], ZHOU Peng[1,2]

(1 School of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience Biotechnology, CATAS, Haikou 571101, China)

Abstract: The coding regions of papaya eIF4E and eIFiso4E were amplified by RT-PCR and then fused with pBD-GAL4 vector. After confirmation with sequence analysis, the plasmid was transformed into the yeast cell, YRG-2, and the toxicity and transcriptional autoactivation of expressed protein were tested. The results indicated that the coding regions were successfully amplified and subcloned into pBD-GAL4, and the YRG-2 transformed with bait plasmids grew well on SD/trp plate but not on SD/-his-trp. These data showed that the bait vectors, pBD-GAL4-eIF4E and pBD-GAL4-eIFiso4E, were expressed correctly without toxicity, and could not autoactivate the transcription of reporter gene alone in yeast two hybrid systems, and could be used for analyzing the interaction between papaya eIF4E, eIFiso4E protein and virus.

Key words: papaya; eIF4E; eIFiso4E; yeast two-hybrid; activation identification