

文章编号: 1674-7054(2012)02-0126-04

番木瓜 *eIF4E* 突变基因的构建

张东东^{1,2}, 言 普², 沈文涛², 黎小瑛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/分析测试中心, 海南 海口 571101)

摘 要: 真核翻译起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, *eIF4E*) 的缺失或突变能影响病毒对植物的侵染, 并介导植物对病毒产生抗性。已有研究证明, 番木瓜环斑病毒的 VPg 能与番木瓜 *eIF4E* (*Cp-eIF4E*) 互作, 在此基础上, 笔者通过蛋白序列比对和同源建模分析, 确定了 6 个突变位点, 采用套叠 PCR 方法 *Cp-eIF4E* 基因进行点突变, 然后, 将它们分别连接到酵母双杂交系统和双分子荧光互补系统两套表达载体上, 为后续互作实验和抗病功能验证奠定基础。

关键词: *eIF4E*; 点突变; VPg; 互作

中图分类号: Q 781

文献标志码: A

Wittmann 等通过酵母双杂交技术发现芜菁花叶病毒 (TuMV, 马铃薯 Y 病毒属) 的基因组连接蛋白 (VPg) 与拟南芥的 *eIF(iso) 4E* 互作, 并在 1997 年首次提供了植物病毒与植物的真核翻译起始因子复合物互作的证据^[1]。研究表明, 植物 RNA 病毒侵染植物普遍依赖寄主的 *eIF4E* 因子, 而寄主 *eIF4E* 因子的缺失和突变会使寄主获得隐性抗性。研究人员在辣椒、甜瓜、莴苣、番茄、豌豆、拟南芥等多种植物中, 检测到 *eIF4E* 的突变对马铃薯 Y 病毒属病毒产生抗性^[2-6]。番木瓜是热带亚热带地区重要的经济作物, 番木瓜环斑病毒 (potyvirus papaya ringspot, PRSV) 是制约番木瓜生产的一个重要因素, 但通过常规育种方法很难获得抗病品种, 为此, 笔者希望通过转基因技术手段获得番木瓜新的抗病品种。本实验室先前研究表明, 番木瓜环斑病毒的 VPg 能与 *Cp-eIF4E* 互作^[7], 如能确定番木瓜在 *eIF4E* 上影响其与 PRSV 互作的关键位点, 对获得抗病基因及培育新的抗病品种具有重要意义。因此, 笔者构建一系列突变基因, 并将它们分别连接到酵母双杂交系统和双分子荧光互补系统的表达载体上, 旨在为后续互作和抗病功能验证奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 限制性内切酶 *BamH* I 和 *Sal* I 购自 Fermentas 公司, *LA Taq* DNA 高保真聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 均购自大连 Takara 公司, 质粒提取试剂盒和 DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程技术服务有限公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 菌种质粒 pMD18-T 克隆载体购自大连 Takara 公司, 大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。表达载体 pAD-GAL4-2.1 购自 stratagene 公司。表达载体 pSANT-nEYFP-C1 由 Stanton B. Gelvin 教授赠送。

1.3 方法

1.3.1 突变位点的选择 番木瓜中抗 PRSV 种质匮乏, 目前没有获得 *Cp-eIF4E* 抗病基因, 因此缺乏 *Cp-eIF4E* 上抗性位点信息。本研究利用生物信息学手段, 将已克隆的 *Cp-eIF4E* 感病基因与其他物种的 *eIF4E* (包括植物中感病和抗病的 *eIF4E* 以及小麦、人、小鼠、酵母中已知蛋白晶体结构的 *eIF4E*) 进行序列

收稿日期: 2012-02-14

基金项目: 国家自然科学基金 (30960218); 海南省自然科学基金 (808186)

作者简介: 张东东 (1985-), 男, 河北唐山人, 海南大学农学院 2009 级硕士研究生。

通信作者: 周鹏 (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 从事生物技术研究工作。联系电话: 0898-66895006, E-mail: zhp6301@126.com

比对。同时,采用 Vector NTI 软件对 *Cp-eIF4E* 和其他物种中的 *eIF4E* 进行蛋白序列比对,并利用 Swiss-Mode软件通过同源建模预测其三维结构,确定 6 个突变位点。

1.3.2 引物设计 根据番木瓜 *eIF4E*、酵母表达载体 pAD-GAL4 和双分子荧光互补表达载体 pSAT6-cEYFP 的序列,设计了引入突变点(下划直线位置)的引物,并在引物 4Ef 和 4Er 两端分别加入酶切位点 *Bam*H I (GGATCC) 和 *Sal* I (GTCGAC),引物送上海生物工程技术服务公司合成,引物序列如表 1 所示。

表 1 PCR 引物

Primers	Sequence(5' to 3')	Primers	Sequence(5' to 3')
4Ef	TA GGATCCATGGTAGTAGAAGGAACCCCC	115r	AAAGTCTGCTCTAACAGCCAA
4Er	GA GTCGACTCATACCGAGTAGCGATTCTT	129f	GAACCAAAAAGCGGAGGACCCT
83f	CAAGCCACAGCGGTAGCTCT	129r	AGGGTCCTCCGCTTTTGTTTC
83r	AGAGCTACCCGCTGTGGCTTG	162f	GCAATGATTGAGAACAGTTT
100f	GAGGAGTTCGCGAGCCTTTAC	162r	AAACTGTTCTGCAATCATTGC
100r	GTAAAGGCTCGCGAACTCCTC	229r	CGATTCTTAGCCAGTCTCTCAAG
115f	TTGGCTGTTAGAGCAGACTTT		

1.3.3 套叠 PCR 进行点突变 除第 229 位点外,根据套叠 PCR 反应原理,以 *Cp-eIF4E* 的感病基因为模板,将引物 4Ef 和 4Er 分别与各个突变位点的下游引物 r 和上游引物 f 进行组合,扩增各个突变型 *eIF4E* 基因的前后 2 个片段,反应程序为:94 ℃ 预变性 4 min,94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,30 个循环,最后一轮循环 72 ℃ 再延伸 5 min。回收鉴定各个 PCR 反应产物。将各个突变型 *eIF4E* 序列的前后 2 个片段连接起来,回收鉴定。在进行第 229 位点突变时,模板不变,先由 4Ef 和 229r 引物组合扩增出部分序列,再由 4Ef 和 4Er 引物组合扩增出完整序列。

1.3.4 克隆载体的构建 将各个突变型 *eIF4E* 目的片段与 pMD18-T 克隆载体进行连接,然后转化进大肠杆菌中,37 ℃ 过夜培养。挑取并培养阳性单菌落克隆,提取目的质粒做酶切鉴定。

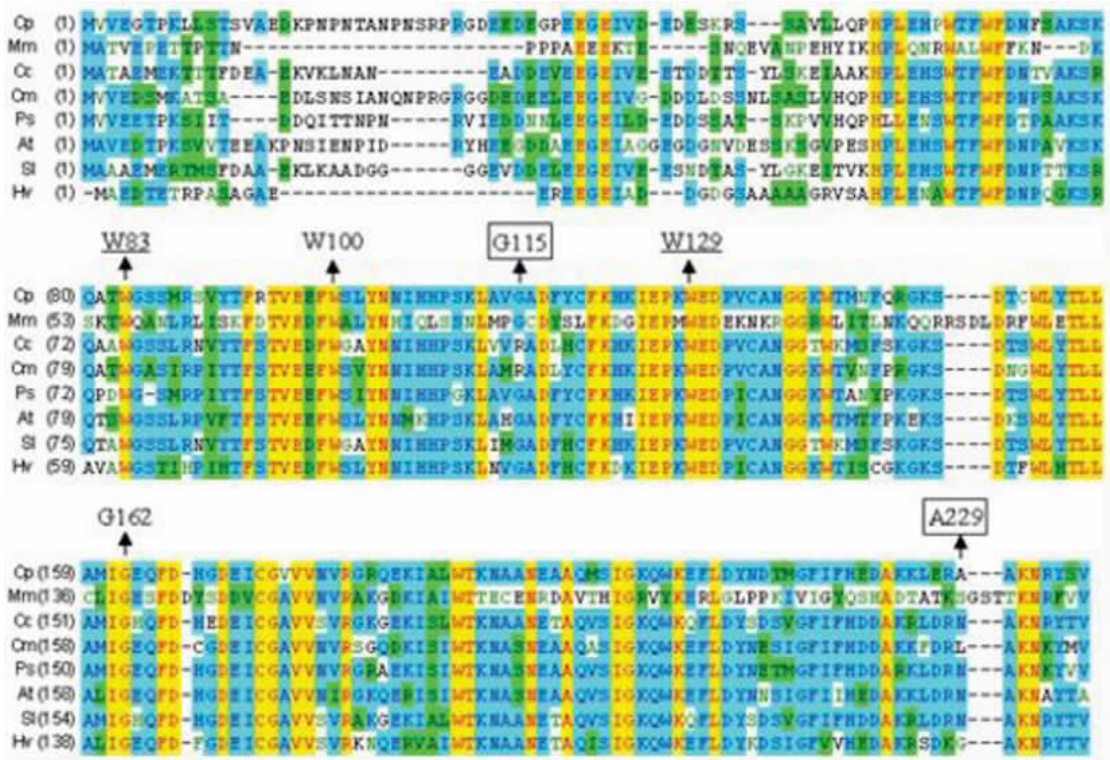


图 1 *eIF4E* 蛋白序列比对

Cp: 番木瓜, Mm: 小鼠, Cc: 辣椒, Cm: 甜瓜, Ps: 豌豆, At: 拟南芥, Sl: 番茄, Hv: 大麦; 下划线为 *eIF4E* 与 mR-NA 的结合位点, 黑框为辣椒和甜瓜 *eIF4E* 抗性基因的关键抗性位点在番木瓜 *eIF4E* 上的对应位点, 无线框为 *eIF4E* 与 *eIF4G* 的结合位点, 数字表示在番木瓜 *eIF4E* 上的位置。

1.3.5 表达载体的构建 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 从 pMD18-T 克隆载体上切取各个突变型 *eIF4E* 目的基因,再将它们分别连接到酵母表达载体 *pAD-GAL4-2.1* 和双分子荧光互补表达载体 *pSAT6-cEYFP* 上。然而,由于 *Bam*H I 和 *Sal* I 2 个酶切位点的前后位置在表达载体 *pAD-GAL4-2.1* 和 *pSAT6-cEYFP-C1* 中不同,而 *Bam*H I 和 *Bgl* II 是同尾酶,所以目的片段被连接到表达载体 *pSAT6-cEYFP-C1* 的 *Bgl* II 和 *Sal* I 2 个酶切位点间。将构建好的表达载体转化进大肠杆菌感受态细胞中,37℃ 过夜培养。次日,挑取并培养阳性单菌落,提取质粒做酶切鉴定。最后,将菌液送到上海生物工程有限责任公司测序。

2 结果与分析

通过蛋白序列比对和同源位点分析确定了 *Cp-eIF4E* 上 6 个关键位点: W83, W100, G115, W129, G162 和 A229(如图 1 所示)。笔者以最接近的大麦的 *eIF4E* 蛋白质的晶体结构模型为模板,通过分子替代方法,模拟了 *Cp-eIF4E* 的三维晶体结构(如图 2 所示)。通过比较发现, W83 和 W129 位于帽识别结构域的边缘,而 G115 和 A229 分别为辣椒 *eIF4E* 抗性基因(*pvr1*) 107 位残基和甜瓜 *eIF4E* 抗性基因(*nsv*) 228 位残基在 *Cp-eIF4E* 上的活性位点,它们位于帽识别结构域附近, W100 和 G162 位于 *eIF4E* 的 *eIF4G* 结合域。根据已有的研究结果, *eIF4E* 与 mRNA 以及 *eIF4G* 作用的保守位点突变为丙氨酸,能使 *eIF4E* 的相应的结合能力丧失^[8],因此,本研究将 6 个突变点中的 3 个色氨酸和 1 个甘氨酸均突变为丙氨酸。另外,根据辣椒和甜瓜的 *eIF4E* 抗性基因上的关键位点,将 *Cp-eIF4E* 上与之同源的 115 位甘氨酸和第 229 位丙氨酸分别突变为相应的抗性位点精氨酸和亮氨酸^[9]。

通过套叠 PCR 技术,获得 W83A, W100A, G115R, W129A, G162A 和 A229L 突变型 *eIF4E* 基因的前后片段,共 11 个基因片段,其理论长度(不包括酶切位点)分别是 249, 459, 300, 408, 345, 363, 387, 321, 486, 222, 683 bp。图 3A 所显示的结果符合上述理论设计。除第 229 位点外,每组前后片段通过套叠拼接获得突变基因全长,其凝胶电泳结果如图 3B。由图 3 可知,获得 6 个突变基因大小在 708 bp 左右,序列长度符合。这样,就获得了两端带有酶切位点的突变型 *eIF4E* 基因。

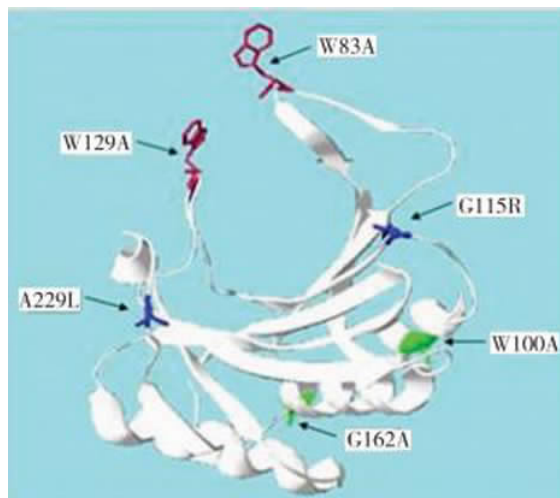


图 2 突变位点在 *Cp-eIF4E* 三维结构上的定位 红色为 *eIF4E* 与 mRNA 的结合位点 绿色为 *eIF4E* 与 *eIF4G* 的结合位点 蓝色为辣椒和甜瓜 *eIF4E* 抗性基因的关键抗性位点在番木瓜 *eIF4E* 上的相应位点 数字前后字母分别代表突变前后的 AA。

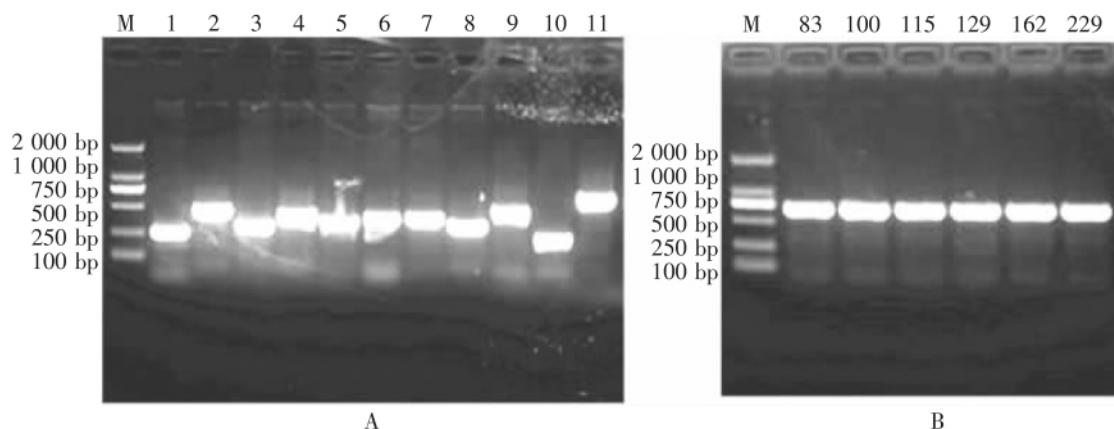


图 3 套叠 PCR

A: M 为 DL2000 Marker 数字 1~10 依次为 83, 100, 115, 129 和 162 5 个突变类型的前后扩增条带, 数字 11 为 229 扩增条带; B: M 为 DL2000 Marker 数字代表突变位点。

Cp-eIF4E 连接到表达载体 pAD-GAL4-2.1 后, 做双酶切鉴定, 切下的片段大小符合 708 bp(如图 4 所示), 且测序结果显示正确。在构建 pSAT6-eYFP 表达载体时, 由于采用同尾酶进行目的片段的连接, 所以不能对 pSAT6-eYFP-C1 表达载体进行酶切鉴定, 但可通过测序来鉴定。测序结果显示 6 个突变点正确, 其他位置没有发生改变。2 套表达载体可以用于后续的验证实验。

3 讨论

哺乳动物和大麦等的 *eIF4E* 蛋白的晶体结构已有报道, 并显示不同物种 *eIF4E* 蛋白的一级结构和三级结构均高度保守, 其活性部位主要包括 m^7GpppN 帽结合结构域和 *eIF4G* 结合结构域。目前, 已从自然界存在的抗病种质中定位了多种抗病基因, 而这些抗病基因多数与 *eIF4E* 位点有关^[8]。*eIF4E* 等位基因引起的植物抗病性已在多种植物中观测到, 这些抗病 *eIF4E* 等位基因与感病 *eIF4E* 基因相比, 其编码的蛋白序列上只有单个或少数几个氨基酸发生改变, 但这些改变能导致植物对多种病毒或是一种病毒的多个株系的抗性。Hiroshi Miyoshi 等人发现, 将拟南芥 *eIF(iso) 4E* 蛋白的 Trp46 和 Trp92 都突变成 Leu 后, *eIF(iso) 4E* 则丧失与芜菁花叶病毒 (TuMV) 的 VPg 的结合能力^[10]。这 2 个位点的空间位置与本研究的 W83 和 W129 一样, 都位于帽识别结构域的边缘。此外, 抗大麦黄花叶病毒 (Barley yellow mosaic, BaYMV) 大麦中的 *eIF4E* 突变点 (Ser57, Lys118, Thr120, Asn160, Gln161, Ser205, Asp206 和 Gly208) 和豌豆的 (W75, W121, R171 和 W180) 也都定位在 *eIF4E* 的帽识别结构域上^[10-11]。因此, 人们推断 VPg 可能有类似 m^7GpppN 帽子的功能。可见, 帽子识别口袋附近的氨基酸残基是必要位点。此外, 为了探究 *Cp-eIF4E* 的各种结构特性在 PRSV 循环中的作用, 本研究又对 *eIF4G* 结合部位和抗性同源位点做了突变。但是 *eIF4E*/VPg 互作介导的病毒侵染的潜在机制仍未探明。笔者构建了一系列 *Cp-eIF4E* 突变基因及其 2 套表达载体, 旨在为后续蛋白互作验证中的互作机理分析提供一定的依据。

参考文献:

- [1] WITTMANN S, CHATEL H, FORTIN M G, et al. Interaction of the viral protein genome linked of *Turnip mosaic potyvirus* with the translational Eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system [J]. *Virology*, 1997, 234: 84-92.
- [2] RUFFEL S, DUSSAULT M H, PALLOIX A, et al. A natural recessive resistance gene against *Potato virus Y* in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (*eIF4E*) [J]. *The Plant Journal* 2002, 32(6): 1067-1075.
- [3] GAO Z, JOHANSEN E, EYERS S, et al. The potyvirus recessive resistance gene *sbm1* identifies a novel role for translation initiation factor *eIF4E* in cell-to-cell trafficking [J]. *The Plant Journal* 2004, 40(3): 376-385.
- [4] RUFFEL S, GALLOIS J L, LESAGE M L, et al. The recessive potyvirus resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene [J]. *Molecular Genetics and Genomics* 2005, 274(4): 346-353.
- [5] NICAISE V, GERMAN-RETANA S, SANJUAN R, et al. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the Potyvirus *Lettuce mosaic virus* [J]. *Plant Physiology* 2003, 132(3): 1272-1282.
- [6] NIETO C, MORALES M, ORJEDA G, et al. An *eIF4E* allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon [J]. *The Plant Journal* 2006, 48(3): 452-462.
- [7] 吴金燕, 沈文涛, 言普, 等. 番木瓜 *eIF4E* 和 *eIFiso4E* 克隆及其与 PRSV-VPg 互作研究 [D]. 海口: 海南大学, 2010.
- [8] MAULE A J, CARANTA C, BOULTON M I. Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects [J]. *Mol. Plant Pathol.*, 2007, 8(2): 223-231.
- [9] INHWA Yeom, JASON R Cavatorta, DANIEL R Ripoll, et al. Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in *eIF4E* that confers recessive potyvirus resistance in plants [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19: 2913-2928.

(下转第 134 页)

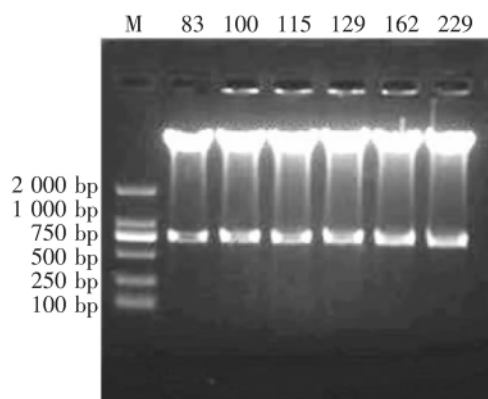


图4 突变型 pAD-4E 融合表达载体的双酶切鉴定
M: DL2000 Marker, 数字代表突变位点。

- ta}-tubulins by proteasomes [J]. J Biol Chem 2009 284(25):17039–17051.
- [19] CHEN Y R, WANG W, KONG A N, et al. Molecular mechanisms of c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis induced by anticarcinogenic isothiocyanates [J]. J Biol Chem 1998 273:1769–1775.
- [20] KIM S H, SINGH S V. p53-Independent apoptosis by benzyl isothiocyanate in human breast cancer cells is mediated by suppression of XIAP expression [J]. Cancer Prev Res, 2010, 3(6):718–26.

Test of Tumor-inhibition of Benzyl Isothiocyanate (BITC) in Papaya Seed

ZHOU Li¹, LI Ze-you², SHEN Wen-tao³, JIN Yun-kui¹, ZHOU Peng³

(1. Hainan Nongken Middle School, Haikou 570226, China; 2. Hainan Medical University, Haikou 571101, China; 3. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Benzyl isothiocyanate (BITC) was extracted from papaya seeds (*Carica papaya* L.) and used to determine its inhibitory effect on the cell growth of 6 common cancers *in vitro* including liver cancer by using the MTT method. The results showed the papaya seed extract with BITC at the concentration of up to $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (equivalent to $0.745 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) inhibited more than 70% of the cell growth of a human liver cancer cell line HepG2, a lung cancer cell line A549, a breast cancer cell line MCF-7, a colon cancer cell line HCT-8, a cervical cancer cell line Hela and a prostate cancer cell line DU-145. Of them the HepG2 liver cancer cells were the most sensitive to BITC which gave an 87% inhibition over the cells at the concentration $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. HCT-8 colon cancer cells had a similar inhibition rate when treated with BITC at both 5.0 and $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. This showed that higher concentration of BITC in the extract of papaya seeds was similar to the lower concentration ($5.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) in inhibition of the growth of the cancer cells.

Key words: *Carica papaya* L.; seed extract; benzyl isothiocyanate; MTT method; tumor-inhibition

(上接第 129 页)

- [10] HIROSHI Miyoshi, NORIKO Suehiro, KOJI Tomoo, 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.
- [11] 卢航, 赵小明, 白雪芳, 等. 翻译起始因子 4E 在植物病毒侵染中的作用 [J]. 中国农业科技导报 2007 9(6):35–40.
- [12] JAMIE A Ashby, CLARE E M Stevenson, GAVIN E Jarvis, et al. Structure-based mutational analysis of *eIF4E* in relation to *sbm1* resistance to pea seed-borne mosaic virus in pea [J]. PLoS One 2011 6(1): e15873.

The Construction of Mutant *eIF4E* in Papaya

ZHANG Dong-dong^{1,2}, YAN Pu², SHEN Wen-tao², LI Xiao-ying², ZHOU Peng^{1,2}

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology/Analysis & Testing Center, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Mutations in or loss of the eukaryotic translation initiation factor 4E (*eIF4E*) can affect infections of viruses to plants, which leads to resistance of the plants against the viruses. The interaction between PRSV-VPg and *Cp-eIF4E* (*eIF4E* in Papaya) has been verified. In this study, six point mutations were determined by protein sequence alignment and analysis of homology modeling, and the point mutations were produced in *Cp-eIF4E* by overlap extension PCR. Then, the mutant *Cp-eIF4E* genes were connected into two sets of expressive vectors, yeast two-hybrid system and bimolecular fluorescence complementation, which lays a foundation for the follow-up verification of interaction and resistance in the plants.

Key words: *eIF4E*; point mutation; VPg; interaction