

文章编号: 1674-7054(2017)04-0415-04

番木瓜 eIF4E 家族蛋白的亚细胞定位

熊越¹ 沈文涛² 庾德财² 黎小瑛² 言普² 周鹏^{1,2}

(1. 海南大学 热带农林学院, 海口 570228;

2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海口 571101)

摘要: 真核翻译起始因子 eIF4E 是多种病毒侵染植物的必须因子。笔者通过扩增番木瓜 eIF4E 家族基因 *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E*, 分别构建它们与绿色荧光蛋白(GFP) 融合的植物表达载体。转化烟草叶片的原生质体后研究了番木瓜 eIF4E 家族蛋白的亚细胞定位情况。结果表明, *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E* 在细胞质和细胞核中均有表达。本研究为进一步探讨番木瓜 eIF4E 家族蛋白与病毒的互作机制以及解析其在病毒侵染中的功能奠定了理论基础。

关键词: 番木瓜; eIF4E; eIFiso4E; 亚细胞定位

中图分类号: Q 943.2

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2017.04.007

番木瓜(*Carica papaya* L.) 是一种重要的热带经济作物,但一直以来番木瓜环斑病毒(Papaya Ringspot Virus, PRSV) 引起的毁灭性病害严重威胁着各国番木瓜种植业和加工产业的发展。目前在栽培技术上还无法通过化学药剂防治 PRSV, 并且番木瓜的抗病种质资源匮乏, 常规的抗病品种选育难度大^[1]。随着人们对植物病毒基因组结构和功能研究的不断深入, 发现病毒蛋白与寄主蛋白之间的相互识别与作用在病毒侵染过程中起重要作用^[2]。已有研究发现, 在多种病毒侵染植物过程中, 病毒与植物真核翻译起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E) 之间的互作起关键作用^[3-4]。eIF4E 上氨基酸位点的突变能阻断 eIF4E 与病毒的互作, 植株具有病毒抗性, 使得 eIF4E 成为一个重要的抗病基因^[5-6]。但有关番木瓜 eIF4E 与 PRSV 是否存在互作, 以及 eIF4E 能否作为一个重要的抗病基因获得一种安全有效的预控病毒病害的新途径尚未见研究报道。植物 eIF4E 是一个基因家族, 笔者所在研究团队通过番木瓜全基因组序列的分析和比对, 探明了其成员的组成情况, 发现番木瓜 eIF4E 家族基因只包括 1 个 *Cp-eIF4E* 和 1 个 *Cp-eIFiso4E*。本研究旨在通过扩增 *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E*, 并分别构建它们与绿色荧光蛋白(GFP) 融合的植物表达载体, 转化烟草叶片原生质体后研究番木瓜 eIF4E 家族蛋白的亚细胞定位情况, 为进一步研究番木瓜 eIF4E 家族蛋白与病毒的互作以及在病毒侵染中的功能提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料 番木瓜品种‘苏罗 I 号’(最早用于生产种植且面积较大的非转基因原种, 抗病性较差, 易感 PRSV) 种植于中国热带农业科学院热带生物技术研究所试验基地。本生烟草(*Nicotiana benthamiana*) 种植于热带生物技术研究所实验室温室。

1.2 *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E* 基因的扩增 根据笔者所在实验室已克隆的 *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E* 基因的序列(GenBank 登录号分别为 FJ644949 和 FJ595992), 设计扩增 *Cp-eIF4E* 基因开放阅读框的引物对 eIF4EF: act gtcgac atggtagtagaaggaaccc 和 eIF4ER: ctt gggccca taccgagtagcgattcttag, 以及扩增 *Cp-eIFiso4E* 基因

收稿日期: 2017-05-08

修回日期: 2017-10-28

基金项目: 国家自然科学基金(31301639); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630052016005)

作者简介: 熊越(1991-), 女, 海南大学热带农林学院硕士研究生, E-mail: 3295275307@qq.com

通信作者: 言普(1981-), 男, 副研究员, 研究方向: 病毒分子生物学, E-mail: yupan305@126.com;

周鹏(1963-), 男, 研究员, 研究方向: 农业生物技术, E-mail: zhp6301@126.com

开放阅读框的引物对 eIFiso4EF: act gtcgac atggcgagtgaggttagcgat 和 eIFiso4ER: ctt gggccca cacattgtatcgacttttttgc。上游和下游引物的两端分别设计有 Sall 和 ApaI 酶切位点,用于载体构建。使用 Trizol 提取番木瓜叶片的 RNA,反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,分别以上述引物对进行 PCR 扩增,扩增条件为 94 °C 预变性 2 min,再 94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 60 s,30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。扩增后进行电泳和切胶回收。

1.3 亚细胞定位载体的构建 含 GFP 的植物表达载体 pSAT-GFP^[7] 以及回收后的 *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E* 基因的 PCR 产物均使用 Sall 和 ApaI 进行双酶切,回收后使用 T4 DNA 连接酶进行连接。连接产物转化大肠杆菌后获得的菌落进行 PCR 鉴定,并提取质粒进行酶切鉴定,鉴定正确的克隆送到 Invitrogen (广州) 公司测序。

1.4 烟草原生质体的分离 取烟草叶片 0.5 ~ 1.0 g,用切片刀将叶片中间部切成 1 mm 条型,置于 10 mL 酶解液中真空渗透 30 min,然后黑暗中 23 °C 酶解 3 h。酶解液过 100 ~ 200 目的筛子,将过滤后的绿色混合物置于 15 mL 离心管 60 × g 离心 5 min。弃上清,沉淀用冰冷的 W5 溶液轻柔洗涤,100 × g 离心 2 min,重复上述步骤,沉淀用适量 W5 悬浮即为所需原生质体。其中酶解液配置(10 mL):0.12 g cellulose R10 (1.2%) 0.03 g macerozyme R10 (0.3%) 6.5 mL 0.8 mol · L⁻¹ Mannitol (0.55 mol · L⁻¹) 1 mL 0.2 mol · L⁻¹ KCl (20 mmol · L⁻¹) 2 mL 0.1 mol · L⁻¹ MES (20 mmol · L⁻¹)。将所得酶解液与 55 °C 水浴 10 min,冷却至室温后加入 100 μL 1 mol · L⁻¹ CaCl₂ (10 mmol · L⁻¹) 100 μL 5% PVP (0.05%) 和 300 μL H₂O。W5 溶液配置(50 mL):2.58 mL 3 mol · L⁻¹ NaCl (154 mmol · L⁻¹) 6.25 mL 1 mol · L⁻¹ CaCl₂ (125 mmol · L⁻¹) 1.25 mL 0.2 mol · L⁻¹ KCl (5 mmol · L⁻¹) 1 mL 0.1 mol · L⁻¹ MES (2 mmol · L⁻¹) 2.5 mL 0.1 mol · L⁻¹ glucose (5 mmol · L⁻¹) 36.42 mL H₂O。以上括号内浓度为物质终浓度。

1.5 烟草原生质体的转化 将冰浴过的原生质体离心(100 × g)后用 MMg (15 mmol · L⁻¹ MgCl₂ 4 mmol · L⁻¹ MES, pH 5.7 0.4 mol · L⁻¹ D-Mannitol) 重悬;每 100 uL 原生质体中加入 10 μL 约 2 ~ 4 μg 质粒 DNA,轻柔混匀,室温静置 5 min;加 110 μL 40% (W/V) PEG8000 溶液(0.2 mol · L⁻¹ D-Mannitol, 0.1 mol · L⁻¹ CaCl₂) 轻柔混匀;室温静置 10 min;加 440 μL W5 溶液终止反应,室温 100 × g 离心 2 min,再次以适量 W5 洗涤,离心弃上清;加入 300 ~ 500 μL WI 溶液(0.5 mol · L⁻¹ D-Mannitol 20 mmol · L⁻¹ KCl 4 mmol · L⁻¹ MES, pH 5.7) 23 °C 暗培养 18 ~ 24 h 后观测荧光。

1.6 绿色荧光蛋白检测 转化后的原生质体在激光共聚焦显微镜(Olympus, FV1000)下进行绿色荧光检测。

2 结果与分析

2.1 *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E* 基因的扩增 通过提取番木瓜叶片 RNA,以反转录后的 cDNA 为模板,利用基因特异引物进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图 1 所示,获得了预期大小的特异条带,其中 *Cp-eIFiso4E* 预期为 628 bp, *Cp-eIF4E* 预期为 718 bp。将目标条带进行切胶回收,用于后续的亚细胞定位载体的构建。

2.2 亚细胞定位载体的构建 *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E* 基因的 PCR 产物使用 Sall 和 ApaI 双酶切后,分别克隆到植物表达载体 pSAT-GFP 的 Sall 和 ApaI 位点之间,重组克隆经 PCR 鉴定后提取质粒,进行酶切鉴定,结果如图 2 所示,含 *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E* 基因的质粒经 Sall 和 ApaI 双酶切后,均切下预期大小的 *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E* 基因条带,表明载体构建正确。将结构正确的重组载体进行测序,获得序列正确的 *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E* 的亚细胞定位载体。

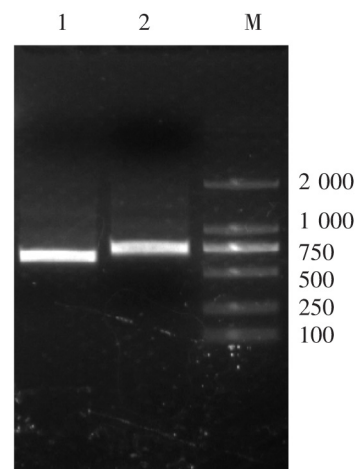


图 1 番木瓜 eIF4E 家族基因的扩增

1: *Cp-eIFiso4E*; 2: *Cp-eIF4E*; M: DL2000 marker

Fig. 1 PCR amplification of papaya eIF4E family genes
1: *Cp-eIFiso4E*; 2: *Cp-eIF4E*; M: DL2000 marker

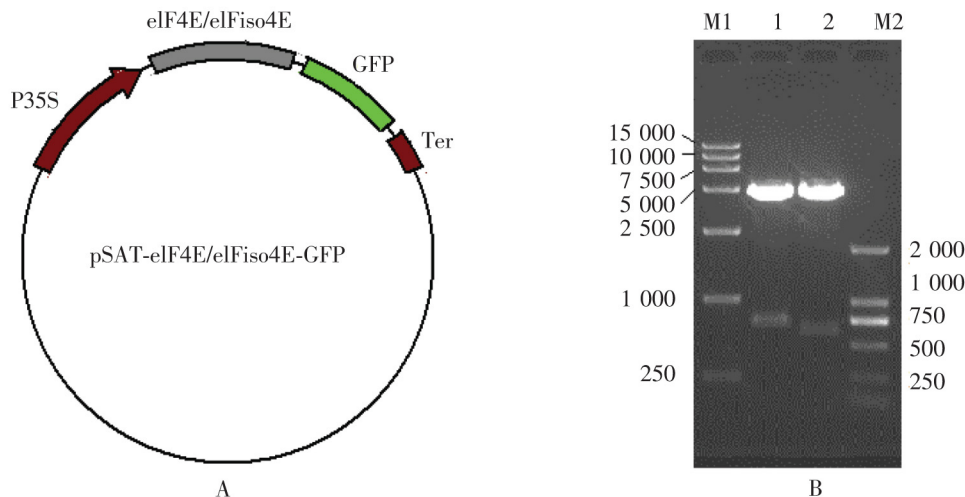


图 2 亚细胞定位载体的结构示意图和酶切鉴定

A: *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E* 的亚细胞定位载体的结构示意图;

B: 载体的酶切鉴定。1: *Cp-eIF4E*; 2: *Cp-eIFiso4E*; M1: DL15000 marker; M2: DL2000 marker

Fig. 2 Schematic structure of subcellular localization vectors and their identification by restriction enzyme digestion

A: Schematic structure of subcellular localization vectors;

B: Identification by restriction enzyme digestion. 1: *Cp-eIF4E*; 2: *Cp-eIFiso4E*; M1: DL15000 marker; M2: DL2000 marker

2.3 烟草原生质体转化和荧光检测 分离烟草叶片的原生质体,将含 *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E* 基因的亚细胞定位载体(与 GFP 融合表达)分别转化原生质体,培养 18 h 后通过激光共聚焦显微镜检测绿色荧光蛋白的表达。结果如图 3 所示,转化 *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E* 基因的原生质体的细胞质和细胞核中均可观测到较强的绿色荧光,表明 *Cp-eIF4E* 和 *Cp-eIFiso4E* 蛋白均定位在细胞质和细胞核。

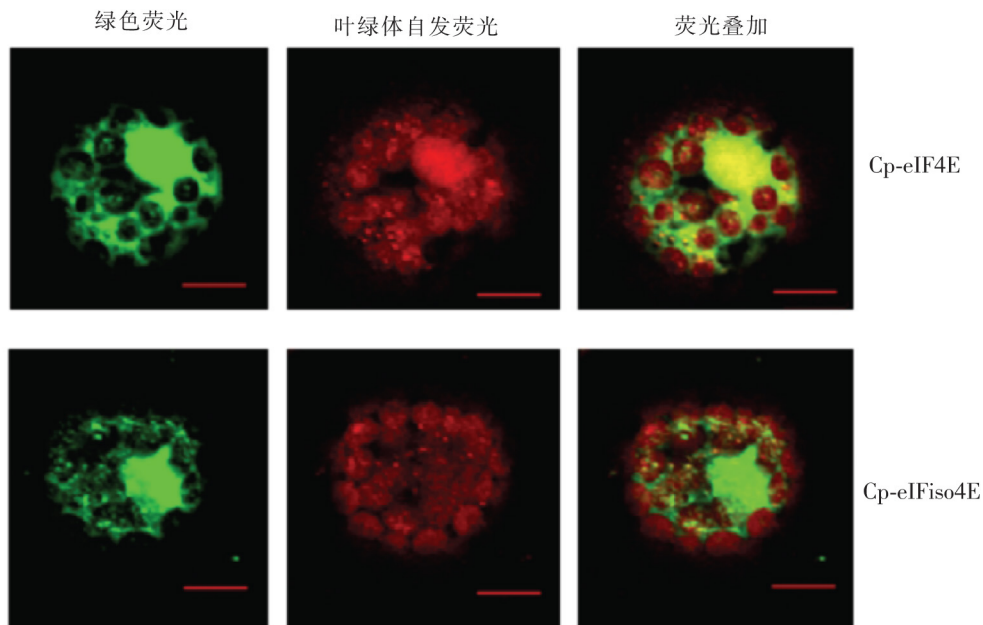


图 3 亚细胞定位检测

原生质体转化 18 h 后观测荧光。刻度尺为 10 μm

Fig. 3 The results of subcellular localization

The GFP fluorescence was observed at 18 h after transfection. Scale bars = 10 μm

3 讨 论

病毒的基因组很小,需要寄主因子的协助完成侵染,某种关键寄主因子的缺失或突变就能阻碍病毒

的侵染,介导对病毒的隐性抗性^[8]。目前已从自然界存在的抗病种质中定位了多种抗病位点,大多数编码 eIF4E 家族基因^[9-11]。eIF4E 家族基因突变引起的植物抗病性已在辣椒、豌豆、番茄、莴苣和甜瓜等多种植物中观测到。植物 eIF4E 家族成员包括 eIF4E 及其异构体 eIFiso4E,他们均可介导对病毒的隐性抗性,在病毒侵染过程中起关键作用,但不同种类的病毒对他们有不同的选择利用。笔者分析了番木瓜 eIF4E 家族成员的亚细胞定位情况,发现 Cp-eIF4E 和 Cp-eIFiso4E 蛋白均定位在细胞质和细胞核,而最近有研究发现花生的 eIF4E 和 eIFiso4E 蛋白也在细胞质和细胞核中都有表达^[12],与笔者的研究结果一致,表明 eIF4E 家族具有高度保守性。分布在细胞质中的 eIF4E 在蛋白质合成中起关键作用,而分布在细胞核中的 eIF4E 参与 mRNA 的核外运输^[3]。结果表明,PRSV 与 Cp-eIF4E 互作及功能的研究必须从番木瓜的细胞核和细胞质等 2 个方面去开展,这为进一步的研究明确了方向。研究结果为下一步深入探究番木瓜 eIF4E 家族与病毒的互作机制以及解析在病毒侵染中的功能奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Kang B C, Yeam I, Jahn M. Genetics of plant virus resistance [J]. Annu. Rev. Phytopathol 2005, 43: 581 – 621.
- [2] Nimchuk Z, Eulgem T, Holt BF, et al. Recognition and response in the plant immune system [J]. Annu. Rev. Genet 2003, 37: 579 – 609.
- [3] Wang A, Krishnaswamy S. Eukaryotic translation initiation factor 4E – mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement [J]. Mol Plant Pathol, 2012, 13: 795 – 803.
- [4] Sanfacon H. Plant translation factors and virus resistance [J]. Viruses, 2015, 7: 3392 – 3419.
- [5] Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, et al. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology [J]. Mol Plant Pathol, 2016, 17(7): 1140 – 1153.
- [6] Konecna E, Safarova D, Navratil M, et al. Geographical gradient of the eIF4E alleles conferring resistance to potyviruses in pea (*Pisum*) germplasm [J]. PLoS One, 2014, 9: e90394.
- [7] Gao L, Shen W, Yan P, et al. NIa-pro of papaya ringspot virus interacts with papaya methionine sulfoxide reductase B1 [J]. Virology, 2012, 434: 78 – 87.
- [8] Estevan J, Marena A, Callot C, et al. Specific requirement for translation initiation factor 4E or its isoform drives plant host susceptibility to Tobacco etch virus [J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 67.
- [9] Inhwa Y, Jason R, Daniel R, et al. Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants [J]. Plant Cell, 2007, 19: 2913 – 2928.
- [10] Nieto C, Morales M, Orjeda G, et al. An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon [J]. Plant J, 2006, 48: 452 – 462.
- [11] Stein N, Perovic D, Kumlehn J, et al. The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* L. [J]. Plant J, 2005, 42: 912 – 922.
- [12] Xu M, Xie H, Wu J, et al. Translation initiation factor eIF4E and eIFiso4E are both required for peanut stripe virus infection in peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 338.

Subcellular Localization of eIF4E Family Proteins in Papaya

XIONG Yue¹, SHEN Wentao², TUO Decai², LI Xiaoying², YAN Pu², ZHOU Peng^{1,2}

(1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: Eukaryotic translation initiation factor 4e (eIF4E) is a necessary factor for many viruses infecting plants. The plant expression vectors of *Cp-eIF4E* and *Cp-eIFiso4E* were constructed, fused with green fluorescent protein (GFP), and transformed into the protoplasts of tobacco leaf to study the subcellular localization of papaya eIF4E family. The results showed that Cp-eIF4E and Cp-eIFiso4E were expressed in the cytoplasm and nucleus. This study would lay a foundation for further study of the interactions between the papaya eIF4E family proteins and viruses, and their functions in virus infection.

Keywords: *Carica papaya*; eIF4E; eIFiso4E; subcellular localization