

刘子记, 申龙斌, 朱 婕, 等. 苦瓜  $\alpha$ -苦瓜素基因克隆与单倍型分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(5): 1117-1123.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.05.024

## 苦瓜 $\alpha$ -苦瓜素基因克隆与单倍型分析

刘子记<sup>1</sup>, 申龙斌<sup>1</sup>, 朱 婕<sup>2</sup>, 牛 玉<sup>1</sup>, 杨 衍<sup>1</sup>

(1. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部华南作物基因资源与种质创制重点开放实验室, 海南 儋州 571737; 2. 海南大学热带农林学院, 海南 海口 570228)

**摘要:** 为了揭示苦瓜  $\alpha$ -苦瓜素基因的完整结构及单倍型, 本研究以 35 份苦瓜初级核心种质为材料, 克隆  $\alpha$ -苦瓜素基因, 结果显示,  $\alpha$ -苦瓜素基因全长 993 bp, 包括 60 bp 的 5'-UTR, 72 bp 的 3'-UTR, 861 bp 的 ORF, 无内含子序列, 编码 286 个氨基酸,  $\alpha$ -苦瓜素蛋白含有 RIP 蛋白保守结构域。系统进化分析结果表明, 除苦瓜 RIP P16094.2 外,  $\alpha$ -苦瓜素蛋白与胶苦瓜 3MRW\_A 的亲缘关系最近, 而与苦瓜 MAP30 蛋白的亲缘关系较远。通过比较 35 份苦瓜种质资源  $\alpha$ -苦瓜素基因序列, 共发现 5 个 SNP 位点, 5 个 SNP 位点均位于编码区。SNP 分组发现, 35 份苦瓜种质资源  $\alpha$ -苦瓜素基因共存在 5 种单倍型。5 种单倍型编码的氨基酸序列比对显示, 共存在 1 个氨基酸变异位点, 氨基酸变异位点对应于第 5 个 SNP 位点, 第 1、第 2、第 3、第 4 SNP 位点并未引起氨基酸的改变。该结果为进一步研究  $\alpha$ -苦瓜素基因表达调控机制和不同单倍型编码蛋白功能差异奠定了基础。

**关键词:** 苦瓜;  $\alpha$ -苦瓜素基因; 克隆; 单倍型

**中图分类号:** S642.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)05-1117-07

## The cloning and haplotype analysis of $\alpha$ -momorcharin from bitter gourd

LIU Zi-ji<sup>1</sup>, SHEN Long-bin<sup>1</sup>, ZHU Jie<sup>2</sup>, NIU Yu<sup>1</sup>, YANG Yan<sup>1</sup>

(1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture, Danzhou 571737, China; 2. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract:** In order to reveal the whole gene structure and haplotype of  $\alpha$ -momorcharin, 35 primary core germplasm of bitter gourd were used as materials, and the  $\alpha$ -momorcharin gene was cloned. The results showed that  $\alpha$ -momorcharin gene was 993 bp in length, including 60 bp 5'-UTR, 72 bp 3'-UTR, and 861 bp ORF, with no intron, encoding 286 amino acids.  $\alpha$ -momorcharin protein contained a conserved domain of RIP protein. Phylogenetic analysis showed that in addition to P16094.2, the relationship between  $\alpha$ -momorcharin and 3MRW\_A of *Momordica balsamina* was closest, but the relationship between  $\alpha$ -momorcharin and MAP30 was far. Five SNP loci were found by comparing the  $\alpha$ -momorcharin gene sequences of 35 bitter gourd germplasm. All of the five SNP loci were located in the coding region. Five haplotypes were found through SNP grouping in 35 bitter gourd germplasm. One amino acid mutation was found according to comparing the amino acid se-

quences encoded by the five haplotypes, which was corresponding to the 5 th SNP loci, the 1 st, 2 nd, 3 rd and 4 th SNP loci did not cause amino acid changes. The results provides a basis for further study on the regulation mechanism of  $\alpha$ -momorcharin gene expression and the function difference of proteins encoded by different haplotypes.

**Key words:** bitter gourd;  $\alpha$ -momorcharin gene; cloning; haplotype

收稿日期: 2017-05-09

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1630032014019、1630032015015、1630032016019); 国家自然科学基金项目(31601758)

作者简介: 刘子记(1982-), 男, 山东菏泽人, 博士, 副研究员, 研究方向: 蔬菜分子生物学及遗传育种。(E-mail) liuziji1982@163.com

通讯作者: 杨 衍, (E-mail) catasvegetable@126.com

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 又名锦荔枝、赖葡萄, 为葫芦科 (Cucurbitaceae) 苦瓜属一年生草质藤本植物。《本草纲目》中记载“苦瓜苦寒、无毒、除邪热、解劳乏、清心明目、益气壮阳”。大量研究结果表明, 苦瓜含有多种活性成分, 具有降血糖<sup>[1]</sup>、抗癌<sup>[2]</sup>、抗病毒<sup>[3]</sup>、增强免疫力<sup>[4]</sup>等多种功效。

核糖体失活蛋白 (Ribosome inactivating proteins, RIP) 是一类主要存在于植物中具有 RNA *N*-糖苷酶活性的毒蛋白, 能够破坏延伸因子与核糖体的结合, 将蛋白质的生物合成抑制在延伸阶段<sup>[5]</sup>。RIP 包括 I、II、III 型, I 型 RIP 由分子量约为 30 000 的单肽链蛋白组成; II 型 RIP 由一个类似 I 型 RIP 的酶活性 A 链和一个稍大的凝聚素 B 链组成<sup>[6]</sup>; III 型 RIP 并不常见, 仅在玉米和大麦中发现<sup>[7]</sup>。近年来, 研究者从苦瓜中成功分离出了多种具有药用价值的化合物, 包括  $\alpha$ -苦瓜素、 $\beta$ -苦瓜素、 $\gamma$ -苦瓜素、 $\delta$ -苦瓜素和 MAP30 等, 这些小分子蛋白均属于 I 型 RIP<sup>[8]</sup>。其中  $\alpha$ -苦瓜素最早是由 Ng 等<sup>[9]</sup>从苦瓜籽中分离出的一种分子量为 30 000 的 I 型 RIP, 表现出多样的生物活性, 作为具有开发价值的蛋白质,  $\alpha$ -苦瓜素抗肿瘤、抗病毒和抗真菌的活性受到研究者的关注。Ng 等<sup>[10]</sup>的研究结果表明  $\alpha$ -苦瓜素具有抗绒毛癌和 S180 肉瘤的活性。蔡秀清<sup>[11]</sup>的研究结果证实重组表达  $\alpha$ -苦瓜素对增殖表皮癌细胞有明显的生长抑制效应。Pan 等<sup>[12]</sup>的研究结果表明  $\alpha$ -苦瓜素具有预防和治疗鼻咽癌的功效。Manoharan 等<sup>[13]</sup>研究发现  $\alpha$ -苦瓜素具有抗黑色素瘤和神经胶质瘤的活性。Zheng 等<sup>[14]</sup>的研究结果表明  $\alpha$ -苦瓜素具有抗 HIV 的活性。李双杰等<sup>[15]</sup>的研究结果表明  $\alpha$ -苦瓜素能抑制急性柯萨奇 B3 病毒复制。魏周玲等<sup>[16]</sup>的研究结果证实异源表达  $\alpha$ -苦瓜素能够显著抑制烟草花叶病毒, 激活植物防卫反应, 且对植物细胞无明显毒性。Qian 等<sup>[17]</sup>研究发现重组表达  $\alpha$ -苦瓜素蛋白可以增强水稻对稻瘟病菌的抗性。Wang 等<sup>[18]</sup>研究结果表明重组表达  $\alpha$ -苦瓜素具有抑制绿脓杆菌的活性。王书珍<sup>[19]</sup>的研究结果证实重组表达  $\alpha$ -苦瓜素对尖镰孢、腐皮镰孢和铜绿脓杆菌的生长有较强的抑制作用。

以往研究多集中在重组表达  $\alpha$ -苦瓜素蛋白及其生物活性方面, 而对其完整基因结构和单倍型分析的研究鲜有报道。本研究拟通过 NCBI 数据库获得  $\alpha$ -苦瓜素基因编码序列, 通过与苦瓜基因组序列

进行比对寻找目标区域, 在目标区域两侧设计引物, 获取完整的  $\alpha$ -苦瓜素基因序列, 分析基因结构及编码蛋白结构; 通过同源比对构建系统进化树, 分析  $\alpha$ -苦瓜素蛋白与其他 RIP 蛋白的亲缘关系; 比较不同苦瓜种质资源  $\alpha$ -苦瓜素基因序列, 分析  $\alpha$ -苦瓜素基因单倍型, 并对不同单倍型编码的蛋白质序列进行分析, 以期研究  $\alpha$ -苦瓜素基因表达调控机制和不同单倍型编码蛋白功能差异提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试苦瓜材料共 35 份, 来源于苦瓜初级核心种质库<sup>[20]</sup>, 其中 3 份 (种质编号: Y5、Y7、Y16) 来自日本, 3 份 (种质编号: Y39、Y43、Y50) 来自中国广东, 1 份 (种质编号: Y58) 来自中国江西, 5 份 (种质编号: Y60、Y66、Y69、Y72、Y77) 来自中国海南, 4 份 (种质编号: Y83、Y85、Y87、Y90) 来自泰国, 3 份 (种质编号: Y96、Y100、Y101) 来自中国云南, 1 份 (种质编号: Y108) 来自中国湖南, 4 份 (种质编号: Y112、Y113、Y115、Y121) 来自中国广西, 5 份 (种质编号: Y122、Y124、Y131、Y134、Y139) 来自中国福建, 3 份 (种质编号: Y140、Y141、Y144) 来自斯里兰卡, 3 份 (种质编号: Y146、Y147、Y153) 来自印度。不同苦瓜种质资源农艺性状遗传多样性及核心种质亲缘关系分析结果见文献<sup>[21]</sup>。试验于 2016 年 9 月初在中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所试验基地进行, 将供试苦瓜种子用 50 °C 温水处理 30 min, 常温浸种 12 h 后, 播种于营养钵中, 按照常规方法管理。待苦瓜长至 3 叶 1 心时, 摘取叶片贮于 -20 °C 冰箱备用。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用改良的 CTAB 法<sup>[22]</sup>提取待测苦瓜材料的基因组 DNA。

1.2.2  $\alpha$ -苦瓜素基因组序列分离 根据 GenBank  $\alpha$ -苦瓜素编码序列 X57682.1 比对苦瓜基因组序列<sup>[23]</sup>, 该编码序列对应于 Scaffold\_175, 为了获得完整的  $\alpha$ -苦瓜素基因组序列, 利用软件 Primer 5.0 在编码序列的两侧设计引物 (表 1), 获取编码序列在内的 1 kb 左右的序列。以苦瓜材料 Y5 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 采用离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (Omega gel extraction kit, 美国) 回收目的条带, 将目的条带连接到北京全式金生物技

术有限公司的 pEASY-T5 载体上, 转化感受态细胞 Trans1-T1, 筛选出阳性克隆, 委托广州英韦创津生

物科技有限公司测序。

表 1 扩增  $\alpha$ -苦瓜素基因引物序列

Table 1 The primer sequence used for amplifying  $\alpha$ -momorcharin

引物名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
AlphaTD1	GCAAAGCCATGAGGGT	AAGGGAAATAAAACAC
AlphaTD2	GCGGTACAACATGAGA	GTTGTAGTTGCTACCTC
AlphaTD3	TCCAAAAGCAAAGCCATGAGGG	TGATAAAGGGAAATAAAACACACTT

PCR 反应体系为 20  $\mu$ l, 其中包括 12  $\mu$ l Premix *Taq*<sup>TM</sup> (宝生物工程有限公司产品), 1  $\mu$ mol/L 引物, 150 ng 模板 DNA。扩增程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 终延伸 10 min, PCR 产物于 10  $^{\circ}$ C 保存。20  $\mu$ l 扩增产物与 3  $\mu$ l 上样缓冲液、2  $\mu$ l UltraPower DNA 染料混合经 1.5% 琼脂糖凝胶于 110 V 电泳 30 min, 显色进行带型统计。

1.2.3  $\alpha$ -苦瓜素基因生物信息学分析 利用在线软件 FGENESH (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenes&group=programs&subgroup=gfind>) 和 GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) 分析  $\alpha$ -苦瓜素基因结构。利用在线软件 ProtParam、ProtScale、SignalP4.1、TMHMM、JPRED4、PSIPRED、InterPro 分析  $\alpha$ -苦瓜素基因编码蛋白的氨基酸序列、亲疏水性、信号肽、跨膜结构等。根据  $\alpha$ -苦瓜素蛋白序列在线进行 Blastp 同源性搜索, 获得与  $\alpha$ -苦瓜素相似度较高的其他物种的蛋白序列, 采用 MEGA6.06 软件基于邻近相连法绘制系统进化树, 并进行 Bootstrap 检测, 系统树分支的置信度, 采用重复抽样分析方法, 重复抽样次数为

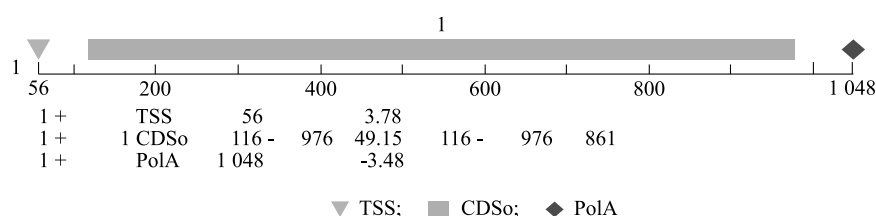
1 000 次。

1.2.4  $\alpha$ -苦瓜素基因单倍型分析 以不同苦瓜种质基因组 DNA 为模板, 扩增  $\alpha$ -苦瓜素基因, 目的片段经回收、连接、转化、测序, 采用 BioEdit 软件进行多序列比对、分组, 分析  $\alpha$ -苦瓜素基因单倍型。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\alpha$ -苦瓜素基因全长的克隆

从 NCBI 数据库中获得  $\alpha$ -苦瓜素基因相关片段 X57682.1, 通过与苦瓜基因组序列比对, 序列对应于 Scaffold\_175, 为了获得完整的  $\alpha$ -苦瓜素基因序列, 利用软件 Primer 5.0 在对应序列的两侧设计引物, 其中引物 AlphaTD3 能够在供试苦瓜材料 Y5 中成功扩增, PCR 扩增产物经回收、克隆、测序, 共获得 1 096 bp 的序列, 序列经 FGENESH 基因结构分析, 结果表明,  $\alpha$ -苦瓜素基因 cDNA 全长 993 bp (图 1), 包括 60 bp 的 5'-UTR, 72 bp 的 3'-UTR, 861 bp 的 ORF, 无内含子序列。为了提高分析的准确性, 本研究另外采用 GENSCAN 软件再次进行  $\alpha$ -苦瓜素基因结构分析, 其预测的  $\alpha$ -苦瓜素基因 CDS 序列及编码的氨基酸序列同 FGENESH 预测结果完全一致。



CDS 是编码序列; PolA 是多聚腺苷酸; TSS 转录起始位点。

图 1  $\alpha$ -苦瓜素基因结构

Fig.1 The structure of  $\alpha$ -momorcharin gene

## 2.2 $\alpha$ -苦瓜素基因编码氨基酸序列的生物信息学分析

经 FGESH 分析,  $\alpha$ -苦瓜素基因 (Y5) 编码 286 个氨基酸。ProtParam 软件分析结果表明,  $\alpha$ -苦瓜素蛋白分子式为  $C_{1422}H_{2252}N_{382}O_{419}S_4$ , 氮端为 Met, 相对分子质量为 31 532.07, 理论等电点 ( $pI$ ) 为 9.13, 负电荷残基 (Asp+Glu) 为 24 个, 正电荷残基 (Arg+Lys) 为 28 个, 脂肪系数为 101.64, 总平均亲水性为 0.016, 不稳定指数为 29.33, 属于稳定蛋白, 半衰期大于 10 h。经 ProtScale 软件分析, 8 个高分值峰 ( $Scale > 1.0$ ), 分别分布在 6~19、57~64、85~91、95~96、151~159、171~179、234~236、259~260 等区域, 这些区域属于高疏水性, 11 个低分值峰 ( $Scale < 0$ ), 分别分布在 30~39、45~55、77~81、103~113、116~149、182~204、211~220、222~227、229~232、241~251、267~282 等区域, 这些区域属于高亲水区域, 推测该蛋白为亲水性蛋白。SignalP4.1 分析结果表明  $\alpha$ -苦瓜素蛋白具有信号肽, 属于分泌蛋白, 切割位点位于第 23 和 24 氨基酸之间。采用 TargetP1.1 对  $\alpha$ -苦瓜素蛋白进行亚细胞定位预测, 结果显示  $\alpha$ -苦瓜素蛋白定位在分泌路径 ( $SP$  值为 0.934)。经 TMHMM 程序分析,  $\alpha$ -苦瓜素蛋白不含跨膜结构域。结合 JPRED4 和 PSIPRED 预测  $\alpha$ -苦瓜素蛋白二级结构显示,  $\alpha$ -苦瓜素蛋白包含有 13 处  $\alpha$ -螺旋, 12 处  $\beta$ -折叠, 3 处  $\beta$ -转角。该蛋白 24~265 区间具有核糖体失活蛋白结构域。经 UniProtKB 分析,  $\alpha$ -苦瓜素蛋白存在 1 个 RNA  $N$ -糖苷酶活性位

点, 位于第 183 位点。

## 2.3 $\alpha$ -苦瓜素蛋白系统进化树分析

$\alpha$ -苦瓜素 (Y5) 蛋白质序列经 NCBI 数据库比对, 结果表明, 与苦瓜 P16094.2 的序列相似度为 100%, 与胶苦瓜 (*Momordica balsamina*) 的 RIP (3MRW\_A) 相似度为 94%, 与苦瓜 MAP30 (AAB35194.2) 相似度为 53%, 与无棱丝瓜 (*Luffa aegyptiaca*)  $\beta$ -丝瓜素 (CAA44230.1) 相似度为 67%, 与无棱丝瓜 (*Luffa aegyptiaca*)  $\alpha$ -丝瓜素 (Q00465.1) 相似度为 70%, 与有棱丝瓜 (*Luffa acutangula*) RIP (P84530.2) 的相似度为 72%, 与栝楼 (*Trichosanthes kirilowii*) karasurin RIP (P24478.2) 相似度为 63%, 与栝楼天花粉蛋白 (TCS) (AAA34206.1) 的相似度为 64%, 与南瓜 (*Cucurbita moschata*) RIP (3BWH\_A) 的相似度为 59%, 与异株泻根 (*Bryonia dioica*) RIP (P33185.3) 的相似度为 67%。

利用 MEGA6.06 软件, 将  $\alpha$ -苦瓜素蛋白 (Y5) 与其他 10 种 RIP 蛋白进行系统发育树构建, 结果 (图 2) 表明,  $\alpha$ -苦瓜素 (Y5) 蛋白与苦瓜 P16094.2、胶苦瓜 3MRW\_A 核糖体失活蛋白聚为一组, 亲缘关系最近。栝楼 P24478.2 和 AAA34206.1, 丝瓜 CAA44230.1、Q00465.1 和 P84530.2 分别聚为一组, 这些 RIP 可能由种内基因重复产生。 $\alpha$ -苦瓜素蛋白 (Y5) 与苦瓜 AAB35194.2 蛋白的亲缘关系较远, 表明  $\alpha$ -苦瓜素蛋白与 MAP30 蛋白虽同属 RIP, 但分化时间较早。与 MAP30 相比, 栝楼天花粉蛋白 AAA34206.1 与  $\alpha$ -苦瓜素的亲缘关系较近。

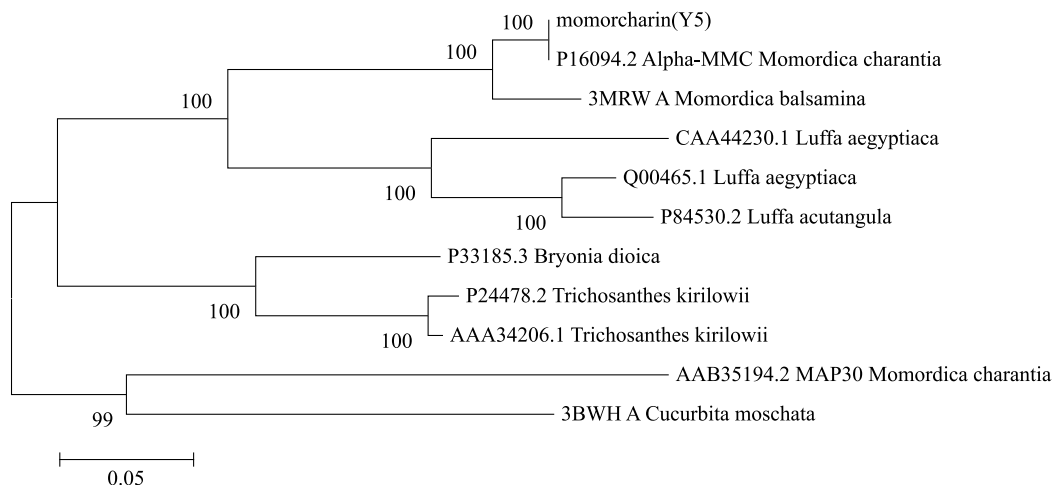


图 2 苦瓜  $\alpha$ -苦瓜素 (Y5) 与其他物种 RIP 蛋白的系统进化分析

Fig.2 Phylogenetic relationship among  $\alpha$ -momorcharin (Y5) and RIP proteins from other plants



2.4  $\alpha$ -苦瓜素基因单倍型分析

以 AlphaTD3 为引物, 以其余 34 份苦瓜种质基因组 DNA 为模板进行扩增, 回收目的片段进行测序, 以  $\alpha$ -苦瓜素(Y5)为参考序列进行比对, 在  $\alpha$ -苦瓜素基因组区域共发现 5 个 SNP 位点, 分别是+267 位点的 T/A, +306 位点的 C/A, +312 位点的 A/G, +840 位点的 A/C, +903 位点的 T/G, 5 个 SNP 位点均位于编码区(图 3)。通过 SNP 分组发现, 35 份苦瓜种质资源  $\alpha$ -苦瓜素基因共存在 5 种单倍型。其中 Y5、Y7、Y16、Y39、Y58 属于第一组; Y43、Y50、Y90、Y101、Y108、Y60、Y66 属于第二组; Y113、Y115、Y140、Y141、Y144、Y100、Y112、Y121、Y122、Y134 属于第三组; Y77、Y83、Y96、Y131、Y139、Y146、Y147、Y153 属于第四组, Y69、Y72、Y85、Y87、Y124 属于第五组, 第二组存在 1 个 SNP 位点, +267

位点的 T/A; 第三组共包括 2 个 SNP 位点, 分别是+267 位点的 T/A, +903 位点的 T/G; 第四组共包括 5 个 SNP, 分别是+267 位点的 T/A, +306 位点的 C/A, +312 位点的 A/G, +840 位点的 A/C, +903 位点的 T/G; 第五组共包括 4 个 SNP, 分别是+267 位点的 T/A, +312 位点的 A/G, +840 位点的 A/C, +903 位点的 T/G。其中来源于日本的资源均属于第一组, 来源于广西和斯里兰卡的资源均属于第三组, 来源于印度的资源均属于第四组。

以  $\alpha$ -苦瓜素(Y5)编码的蛋白质序列为参考, 对 5 种单倍型编码的蛋白质序列进行比对, 结果(图 4)显示, 共存在 1 个氨基酸变异位点, 为第 281 位 H/Q, 氨基酸变异位点对应于第 5 个 SNP 位点, 第 1、第 2、第 3、第 4 SNP 位点并未引起氨基酸的改变。

	270	280	290	300	310	840	900
Y5	GTTACTTACTAATGCATCTCTTCAATTACGACGAAAAACCATCACAG					ATACAGTTAT	CAACACATGGC
Y7	.....					.....	.....
Y16	.....					.....	.....
Y39	.....					.....	.....
Y58	.....					.....	.....
Y43	.A.....					.....	.....
Y50	.A.....					.....	.....
Y90	.A.....					.....	.....
Y101	.A.....					.....	.....
Y108	.A.....					.....	.....
Y60	.A.....					.....	.....
Y66	.A.....					.....	.....
Y113	.A.....					.....	.....G.....
Y115	.A.....					.....	.....G.....
Y140	.A.....					.....	.....G.....
Y141	.A.....					.....	.....G.....
Y144	.A.....					.....	.....G.....
Y100	.A.....					.....	.....G.....
Y112	.A.....					.....	.....G.....
Y121	.A.....					.....	.....G.....
Y122	.A.....					.....	.....G.....
Y134	.A.....					.....	.....G.....
Y77	.A.....				A.....G.....	C.....	.....G.....
Y83	.A.....				A.....G.....	C.....	.....G.....
Y96	.A.....				A.....G.....	C.....	.....G.....
Y131	.A.....				A.....G.....	C.....	.....G.....
Y139	.A.....				A.....G.....	C.....	.....G.....
Y146	.A.....				A.....G.....	C.....	.....G.....
Y147	.A.....				A.....G.....	C.....	.....G.....
Y153	.A.....				A.....G.....	C.....	.....G.....
Y69	.A.....				.....G.....	C.....	.....G.....
Y72	.A.....				.....G.....	C.....	.....G.....
Y85	.A.....				.....G.....	C.....	.....G.....
Y87	.A.....				.....G.....	C.....	.....G.....
Y124	.A.....				.....G.....	C.....	.....G.....

图 3 不同苦瓜种质  $\alpha$ -苦瓜素基因 SNP 分布  
Fig.3 The SNP distribution of  $\alpha$ -momorcharin gene in bitter gourd germplasm

3 讨论

苦瓜性味苦寒, 具有清心涤热、明目解毒之功效。 $\alpha$ -苦瓜素是从苦瓜籽中提取的蛋白, 属于 I 型 RIP<sup>[24]</sup>, 具有 N-糖苷酶<sup>[25]</sup>、RNA 水解酶<sup>[26]</sup>、DNA 水解酶<sup>[27]</sup>、免疫抑制<sup>[28]</sup>等活性, 具有显著的抗病毒<sup>[29]</sup>

和抗肿瘤<sup>[30]</sup>功效, 吸引了众多研究者的广泛关注和深入研究。

为了进一步明确  $\alpha$ -苦瓜素基因的完整结构, 本试验从苦瓜中克隆出全长  $\alpha$ -苦瓜素基因序列, 包括 60 bp 的 5'-UTR, 72 bp 的 3'-UTR, 861 bp 的 ORF, 以往研究多集中在编码区序列, 本研究获取的  $\alpha$ -苦

	10	20	30	40	260	270	280
Y5	MSRFSVLSEFLILAIIFLGGSIVKGDVSFRLSGADPRSYGMFIKDLF				VVTSTNIQLLLNTRNIAEGDNGDVSTTHGF		
Y43	.....				.....		
Y113	.....				.....Q-		
Y69	.....				.....Q-		
Y131	.....				.....Q-		

图 4 不同  $\alpha$ -苦瓜素基因单倍型编码蛋白质Fig.4 The protein sequence of  $\alpha$ -momorcharin with different haplotypes

瓜素基因 5'-UTR 和 3'-UTR 区可为研究  $\alpha$ -苦瓜素基因的表达调控奠定基础。 $\alpha$ -苦瓜素蛋白结构分析发现, $\alpha$ -苦瓜素蛋白存在核糖体失活蛋白结构域和 1 个 RNA *N*-糖苷酶活性位点,进一步证明该蛋白属于核糖体失活蛋白。

将  $\alpha$ -苦瓜素蛋白(Y5)与其他 10 种 RIP 蛋白进行系统进化分析,结果表明,苦瓜  $\alpha$ -苦瓜素(Y5)蛋白与苦瓜 P16094.2、胶苦瓜 3MRW\_A 聚为一组,亲缘关系最近。其中 P16094.2 为已报导的  $\alpha$ -苦瓜素蛋白序列<sup>[31]</sup>, $\alpha$ -苦瓜素(Y5)与 P16094.2 的相似性达 100%,进一步验证了本研究克隆的基因为  $\alpha$ -苦瓜素基因。与葫芦科其他植物的 RIP 蛋白相比, $\alpha$ -苦瓜素(Y5)蛋白与丝瓜 RIP CAA44230.1、Q00465.1 和 P84530.2 的亲缘关系较近,而与苦瓜 MAP30 蛋白的亲缘关系较远。

通过分析 35 份苦瓜种质  $\alpha$ -苦瓜素基因序列,共发现 5 个 SNP 位点,5 个 SNP 均位于编码区,通过 SNP 分组发现,35 份苦瓜种质资源共存在 5 种单倍型。其中来源于日本的资源均属于第一组,来源于广西和斯里兰卡的资源均属于第三组,来源于印度的资源均属于第四组。该研究结果表明, $\alpha$ -苦瓜素基因 SNP 变异与来源地存在一定关系,但同样存在来源地相同,SNP 变异不同的情况,这可能是由于长期引种和人工选择的原因造成的。与以往发表的  $\alpha$ -苦瓜素部分基因序列(X57682.1<sup>[31]</sup>、HE582635.1、AY804217.1)相比,其中第 2、第 5 SNP 位点从未报道,第 1 SNP 位点在 X57682.1 和 AY804217.1 中存在,第 3 SNP 位点在 AY804217.1 中存在,第 4 SNP 位点在 AY804217.1 中存在。对  $\alpha$ -苦瓜素 5 种单倍型编码的蛋白质序列进行比对,结果显示,共存在 1 个氨基酸变异位点,氨基酸变异位点对应于第 5 SNP 位点。该氨基酸变异位点是否影响  $\alpha$ -苦瓜素蛋白的功能特性还有待于进一步研究。

## 参考文献:

- [1] YANG S J, CHOI J M, PARK S E, et al. Preventive effects of bitter melon (*Momordica charantia*) against insulin resistance and diabetes are associated with the inhibition of NF- $\kappa$ B and JNK pathways in high-fat-fed OLETF rats [J]. J Nutr Biochem, 2015, 26 (3): 234-240.
- [2] ZHANG C Z, FANG E F, ZHANG H T, et al. Momordica Charantia lectin exhibits antitumor activity towards hepatocellular carcinoma [J]. Invest New Drugs, 2015, 33(1): 1-11.
- [3] MCGRATH M S, HWANG K M, CALDWELL S E, et al. GLQ223: an inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(8): 2844-2848.
- [4] PANDA B C, MONDAL S, DEVI K S, et al. Pectic polysaccharide from the green fruits of Momordica charantia (Karela): structural characterization and study of immuno-enhancing and antioxidant properties [J]. Carbohydr Res, 2015, 401: 24-31.
- [5] STIRPE F, BARBIERI L, BATTELLI M G, et al. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects [J]. Nature Biotechnology, 1992, 10(4): 405-412.
- [6] GIBBS T, FERRERAS J M, ARIAS F J, et al. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome inactivating proteins in plants, fungi and bacteria [J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2004, 4(5): 461-476.
- [7] 李建国. 核糖体失活蛋白的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2005, 3(4): 566-570.
- [8] 孟尧, 姚兴川, 王殊睿, 等. 抗  $\alpha$ -苦瓜素单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 生物医学工程学报, 2011, 28(6): 1181-1184.
- [9] NG T B, WONG C M, LI W W, et al. Isolation and characterization of a galactose binding lectin with insulinomimetic activities [J]. Int J Pept Protein Res, 1986, 28(2): 163-172.
- [10] NG T B, LIU W K, SZE S F, et al. Action of alpha-momorcharin, a ribosome inactivating protein, on cultured tumor cell lines [J]. Gen Pharmacol, 1994, 25(1): 75-77.
- [11] 蔡秀清.  $\alpha$ -苦瓜素在毕赤酵母中表达及生物活性分析 [D]. 海口: 华南热带农业大学, 2005.
- [12] PAN W L, WONG J H, FANG E F, et al. Preferential cytotoxicity of the type I ribosome inactivating protein alpha-momorcharin on

- human nasopharyngeal carcinoma cells under normoxia and hypoxia [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 89(3): 329-339.
- [13] MANOHARAN G, JAISWAL S R, SINGH J. Effect of  $\alpha$ ,  $\beta$  momorcharin on viability, caspase activity, cytochrome c release and on cytosolic calcium levels in different cancer cell lines [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 388(1/2): 233-240.
- [14] ZHENG Y T, BEN K L, JIN S W. Alpha-momorcharin inhibits HIV-1 replication in acutely but not chronically infected T-lymphocytes [J]. *Pharmacologica Sinica*, 1999, 20(3): 239-243.
- [15] 李双杰, 王 佐, 邓 晖, 等. 苦瓜素对柯萨奇 B3 病毒核糖核酸的作用及其机制[J]. *实用儿科临床杂志*, 2004, 19(7): 548-550.
- [16] 魏周玲, 彭浩然, 潘 琪, 等. 核糖体失活蛋白 ( $\alpha$ -MC) 亚细胞定位及对 TMV 的抑制作用[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(5): 840-848.
- [17] QIAN Q, HUANG L, YI R, et al. Enhanced resistance to blast fungus in rice (*Oryza sativa* L.) by expressing the ribosome-inactivating protein  $\alpha$ -momorcharin [J]. *Plant Sci*, 2014, 217/218: 1-7.
- [18] WANG S, ZHANG Y, LIU H, et al. Molecular cloning and functional analysis of a recombinant ribosome-inactivating protein ( $\alpha$ -momorcharin) from *Momordica charantia* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 96(4): 939-950.
- [19] 王书珍. 重组核糖体失活蛋白  $\alpha$ -苦瓜素的生物学活性分析 [D]. 武汉: 武汉大学, 2013.
- [20] 刘子记, 牛 玉, 朱 婕, 等. 苦瓜核心种质资源构建方法的比较[J]. *华南农业大学学报*, 2017, 38(1): 31-37.
- [21] LIU Z J, NIU Y, ZHU J, et al. Study on genetic diversity of agronomic traits and genetic relationships among core collections of bitter gourd[J]. *Agricultural Science & Technology*, 2016, 17(5): 1134-1138.
- [22] 刘子记, 牛 玉, 杨 衍. 热研一号油绿苦瓜种子纯度的 SSR 鉴定[J]. *热带作物学报*, 2013, 34(11): 2179-2182.
- [23] URASAKI N, TAKAGI H, NATSUME S, et al. Draft genome sequence of bitter gourd (*Momordica charantia*), a vegetable and medicinal plant in tropical and subtropical regions [J]. *DNA Res*, 2017, 24(1): 51-58.
- [24] WANG H X, NG T B. Ribosome inactivating protein and lectin from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds: sequence comparison with related proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 253(1): 143-146.
- [25] FONG W P, POON Y T, WONG T M, et al. A highly efficient procedure for purifying the ribosome-inactivating proteins  $\alpha$ - and  $\beta$ -momorcharins from *Momordica charantia* seeds, N-terminal sequence comparison and establishment of their N-glycosidase activity [J]. *Life Sci*, 1996, 59(11): 901-909.
- [26] MOCK J W, NG T B, WONG R N, et al. Demonstration of ribonuclease activity in the plant ribosome-inactivating proteins  $\alpha$ - and  $\beta$ -momorcharins [J]. *Life Sci*, 1996, 59(22): 1853-1859.
- [27] WANG S, ZHENG Y, YAN J, et al.  $\alpha$ -momorcharin: a ribosome-inactivating protein from *Momordica charantia*, possessing DNA cleavage properties [J]. *Protein Pept Lett*, 2013, 20(11): 1257-1263.
- [28] LEUNG S O, YEUNG H W, LEUNG K N. The immunosuppressive activities of two abortifacient proteins isolated from the seeds of bitter melon (*Momordica charantia*) [J]. *Immunopharmacology*, 1987, 13(3): 159-171.
- [29] MENG Y, LIN S, LIU S, et al. A novel method for simultaneous production of two ribosome-inactivating proteins,  $\alpha$ -MMC and MAP30, from *Momordica charantia* L. [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9: e101998.
- [30] BIAN X, SHEN F, CHEN Y, et al. PEGylation of  $\alpha$ -momorcharin: synthesis and characterization of novel anti-tumor conjugates with therapeutic potential [J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(7): 883-890.
- [31] HO W K, LIU S C, SHAW P C, et al. Cloning of the cDNA of  $\alpha$ -momorcharin: a ribosome inactivating protein [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1088(2): 311-314.

(责任编辑: 陈海霞)