

柽柳翻译起始因子(eIF-5A)基因的克隆及原核表达

杨传平 姜静 田梗 王玉成* 刘桂丰

东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040

提要 根据柽柳 cDNA 文库中获得的 eIF-5A 基因片段, 用 RACE 技术克隆出其全长 cDNA 序列。cDNA 长度为 799 bp, 编码 159 个氨基酸。将该 cDNA 序列克隆到原核表达载体 pET28a 中, 获得重组质粒 pET28a-eIF5A。不同浓度 NaCl 胁迫下大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (pET28a-eIF5A) 比 *E. coli* BL21 (pET28a) 有明显的抗盐性, 前者菌株存活率在 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 盐胁迫下是后者的 9.3 倍, 据此认为 *E. coli* BL21 (pET28a-eIF5A) 的耐盐性可能与 eIF-5A 基因的表达相关。该基因的 GenBank 登录号为 AY587771 (基因)、AAT01416 (蛋白)。

关键词 柽柳; RACE; eIF-5A; 原核表达; 耐盐

Cloning and Expression of Translation Initiation Factor 5A (eIF-5A) Gene from *Tamarix androssowii*

YANG Chuan-Ping, JIANG Jing, TIAN Geng, WANG Yu-Cheng*, LIU Gui-Feng

College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract Based on the partial sequence of eIF-5A gene acquired from *Tamarix androssowii* cDNA library, the full length cDNA sequence of eIF-5A was isolated using RACE technology. The cDNA sequence was 799 bp in length and encoded a deduced amino acid sequence of 159 residues. The gene was cloned into pET28a-vector and the recombination vector was named pET28a-eIF5A. The salt-tolerance experiment showed *Escherichia coli* BL21 (pET28a-eIF5A) had more salt-resistance ability than *E. coli* BL21 (pET28a) at different NaCl concentrations and the former was 9.3 times in survival rate to the later under the stress of $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl. This indicated that the high ability of salt-tolerance of *E. coli* BL21 (pET28a-eIF5A) might be related to the expression of eIF-5A gene. The eIF-5A gene was accepted by GenBank, the accession numbers are AY587771 (gene) and AAT01416 (protein).

Key words *Tamarix androssowii*; RACE; eIF-5A; prokaryotic expression; salt-tolerance

真核翻译起始因子 5A (eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A) 是目前发现的惟一的一个含 hypusine 残基的蛋白质, 是 eIF-5A 翻译后第 49 位的赖氨酸被修饰成为 hypusine 的特殊蛋白质^[1~3]。每一成熟的 eIF-5A 仅含 1 个 hypusine 残基, 且 eIF-5A 的 hypusine 修饰是其发挥功能、细胞存活和增殖所必需的^[4]。eIF-5A 在真核细胞的无细胞系统内可以刺激蛋白质合成的起始, 促进第 1 个肽键的形成^[5~7], eIF-5A 与细胞生长、分化以及增殖有关^[8]。Chou 等^[9]研究水稻的两种 eIF-5A 基因发现, 它们的表达受盐、重金属等的诱导, 据此认为它们与环境胁迫相关。

本文根据从 NaHCO_3 胁迫后的柽柳 (*Tamarix androssowii*) cDNA 文库中获得的柽柳 eIF-5A 部分 cDNA 序列, 采用 RACE 技术克隆获得 eIF-5A 的全长 cDNA, 构建了 eIF-5A 基因的原核表达载

体, 并在大肠杆菌中高效表达, 现报道如下。

材料与方法

将盆栽柽柳 (*Tamarix androssowii*) 用 $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaHCO_3 溶液浇灌, 进行胁迫处理, 在胁迫 60 h 后取柽柳的叶片及嫩茎作为实验试材。

cDNA 文库构建试剂盒为 ZAP-cDNA® Synthesis Kit 和 ZAP-cDNA® Gigapack III® Gold Cloning Kit (Stratagene 公司产品), RACE 克隆试剂盒为 Smart™ RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences), pMD18-T 载体购自宝生物工程大连

收稿 2004-11-17 修定 2005-03-15

资助 国家重点基础研究发展规划 (“973” 项目 (G1999016000) 和国家转基因植物研究与产业化专项 (JY03A1802)。
*通讯作者 (E-mail: wangyucheng1029@yahoo.com.cn, Tel: 0451-82191627)。

(有限)公司, 高保真 pfu Taq 酶、 T_4 DNA 连接酶、限制性内切酶均购自 Promega 公司, 引物由上海生工生物技术服务公司合成。

构建 cDNA 文库和 eIF-5A 基因的 5' RACE 克隆 取柞柳 cDNA 文库的克隆进行随机测序, 获得 eIF-5A 基因的 EST 序列 (GenBank 登录号: CF199076)。该克隆经测定, 其序列 3' 完整, 而 5' 约缺编码的 90 个氨基酸的碱基序列。根据该序列设计 RACE 引物: 5' GTGCCACCAGTCTCAGT-CAGAAGACTC 3', 进行 eIF-5A cDNA 的全长克隆。5' RACE 的 PCR 反应体系按试剂盒说明书进行。

eIF-5A 基因测序与序列分析 以 RACE 的 PCR 扩增的产物进行琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段, 将回收 DNA 片段与 pMD18-T 克隆载体连接, 以连接产物 pMD-eIF5A 重组质粒转化大肠杆菌 JM109, 在含 X-gal 和 IPTG 的氨苄青霉素的 LB 固体培养基上过夜培养, 根据蓝白斑选择阳性克隆, 随机挑取 4 个阳性克隆, 提取质粒。以质粒为模板, 用 pMD18-T 两端的引物 M13 和 M13-47 进行 PCR 鉴定插入片段的大小, 将插入片段与预期片段大小相符合的克隆测序。测序由上海博亚(现为英骏)生物技术有限公司完成。

用 NCBI 的 b12seq 程序进行序列的拼接, 拼接后应用 ORF 查找程序 (ORF FOUNDER) 寻找其开放读码框, 将开放读码区的推导氨基酸序列用 BLASTP 程序进行氨基酸序列相似性比较, 并预测其保守区。选取与柞柳 eIF-5A 同源性较高的 9 种植物的 eIF-5A 氨基酸序列, 用 CLUSTALX (1.8) 的多序列比较程序 (Do complete alignment) 进行多序列比较, 用蛋白质家族预测程序 (www.pfam.wustl.edu) 中的 DNA 搜索程序 (DNA search) 进行蛋白家族预测。

分析 NaHCO₃ 胁迫前后的 eIF-5A 基因差异表达 分别将经 NaHCO₃ 胁迫的柞柳和正常生长的柞柳 (对照) 总 RNA 1 μ g 反转录成 cDNA 后, 分别稀释成 100 μ L, 用作 PCR 模板。以 eIF5A 的编码区两端序列为引物, P1 为: 5' TGTCTGACGAGGAGCACCATTTC 3', P2 为: 5' TTA CT TGGGACCAA-TGTCCTTGAG 3'。PCR 反应体系为: 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L、200 μ mol \cdot L⁻¹ dNTP、1.2 U ExTaq、

eIF-5A、引物 P1 和 P2 各 1 μ mol \cdot L⁻¹、2 μ L 反转录产物。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 中预变性 1 min; 94 $^{\circ}$ C 中 30 s, 56 $^{\circ}$ C 中 30 s, 72 $^{\circ}$ C 中 1 min, 29 个循环; 72 $^{\circ}$ C 中保温 7 min。PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

构建重组 pET28a-eIF5A 原核表达载体 取根据 eIF-5A 基因的 cDNA 序列, 在开放读码框两端分别设计上游引物和下游引物, 上游引物引入 BamHI 酶切位点, 下游引物引入 SacI 酶切位点。

上游引物 (P3) 为: 5' CTAGAGGATCC (BamHI) ATGTCTGACGAGGAGCACCATTTC 3', 下游引物 (P4) 为: 5' CCCGGGAGCTC (SacI) TTA-CTTGGGACCAAATGTCCTTGAG 3', 用 pMD-eIF5A 质粒作模板进行 PCR 扩增, 在 20 μ L 反应体系中加入: 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L、P3 和 P4 各 50 pmol \cdot L⁻¹、dNTP 200 μ mol \cdot L⁻¹、高保真 pfu Taq 酶 1 U、模板 60 ng。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 中预变性 5 min、94 $^{\circ}$ C 中变性 45 s, 66 $^{\circ}$ C 中退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 中延伸 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 中保温 7 min。基因的 PCR 产物和 pET28a 载体分别进行 BamHI 和 SacI 双酶切、回收纯化。用 T_4 DNA 连接酶对两者进行连接, 连接产物转化至宿主菌 *E. coli* BL21, 将构建的重组质粒命名为 pET28a-eIF5A。经 PCR 和酶切法对重组质粒进行筛选鉴定, 并对重组质粒进行测序。

eIF-5A 基因在 *E. coli* BL21 中的诱导表达 取重组质粒 pET28a-eIF5A 转化表达宿主菌 *E. coli* BL21 感受态细胞。在 Kan^r 平板上挑取单菌落, 接种于 LB/Kan 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜培养, 次日按 1% 比例接种到 LB/Kan 培养基中, 培养至 $A_{600}=0.5$ 时, 加诱导剂 IPTG 至终浓度分别为 0.1、0.5 和 1.0 mmol \cdot L⁻¹ 诱导 4 h。4 000 \times g 离心 5 min 收集菌体, 用 4% 的 SDS 溶液处理 4 min, 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 12 000 \times g 离心 10 min, 取上清溶液进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测蛋白的表达, 用 UVP 凝胶成像系统分析目的蛋白含量。

重组菌 BL21 (pET28a-eIF5A) 的耐盐性分析 取 BL21 (pET28a-eIF5A) 过夜培养物, 按 1% 比例接种到 LB/Kan 液体培养基中, 培养至 $A_{600}=0.5$ 时, 加诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol \cdot L⁻¹, 继续培养 4 h, 用于耐盐实验, 同时以 BL21 (pET28a)

菌株作为对照。取上述培养物于无菌试管中, 每支试管中加 5 mL, 再加入无菌 NaCl 溶液, 使管中的 NaCl 终浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mol·L⁻¹, 37°C 振荡培养 1 h 后, 以 1:10 000 稀释后, 各取 100 μL 涂 LB 平板。每个处理均设置 3 个重复, 37°C 过夜培养并统计菌落数, 按公式: 菌株存活率 = (加 NaCl 的培养基中菌落数 / 未加 NaCl 的培养基中菌落数) × 100% 计算各处理的菌株存活率。

结果与讨论

1 桉柳 cDNA 文库的建立及 eIF-5A 基因的克隆

获得的桉柳初始 cDNA 文库滴度为 5.7 × 10⁵, 其插入片段的大小在 0.3~3.0 kb 之间, 对扩增后的文库克隆进行随机测序, 获得了 1 个长度为 482 bp 的 eIF-5A 基因部分序列。BLASTX 分析表明,

该序列与水稻 (*Oryza sativa*) 和橡胶 (*Hevea brasiliensis*) 的 eIF-5A 的 E 值分别为 5e-63 和 1e-62, 说明序列相似性非常高。因此, 推断该序列为 eIF-5A 的部分序列。

通过 5' RACE PCR 获得了 1 个长 440 bp 的特定性扩增条带, 对其进行测序, BLASTX 分析显示该序列为 eIF-5A 基因片段, 应用 NCBI 的 b12seq 程序将 5' RACE 获得的序列与文库中获得 eIF-5A 序列进行拼接, 获得该基因完整的 cDNA 序列。用 NCBI 网站的 ORF FOUNDER 寻找其开放读码框。最终获得长度为 799 bp 的完整 cDNA 序列, 编码 159 个氨基酸 (图 1)。

2 eIF-5A 基因的保守区查找及蛋白家族预测

对获得的基因推导氨基酸序列用 BLASTP 程序查找蛋白保守区的结果表明, 其含有 eIF-5A 蛋白的保守序列 (图 2), 说明该基因属于 eIF-5A 家

```

2   ctt tgg cgt gac cgt tca att tta cta ctc cag acc cct ctc cga   46
47   gag aga aga ttc aga atc atg tct gac gag gag cac cat ttc gaa   91
                                     M S D E E H H F E   9
92   tca aag gcc gac gcc ggg gct tcc aaa act ttt cct caa cag gct   136
10   S K A D A G A S K T F P Q A   24
137  ggt acc att cgt aaa aat ggt cac atc gtc atc aag aac cgt ccc   181
25   G T I R K N G H I V I K N R P   39
182  tgc aag gtc gtt gag gtc tct acc tgc aag act ggc aag cac ggg   226
40   C K V V E V S T S K T G K H G   54
227  cat gcc aag tgt cac ttt gtt ggt att gac atc ttc act ggc aag   271
55   H A K C H F V G I D I F T G K   69
272  aag ctt gag gat att gtt cca tca tct cac aac tgt gat gtc cct   316
70   K L E D I V P S S H N C D V P   84
317  cat gtt acc cgt acc gac tat cag ctc atc gat atc tct gaa gat   361
85   H V T R T D Y Q L I D I S E D   99
362  ggt ttt gtg agt ctt ctg act gag act ggt ggc acc aaa gat gat   406
100  G F V S L L T E T G G T K D D   114
407  ctc aga ctt ccc tcc gat gaa act cta ttg acc cag atc aag gat   451
115  L R L P S D E T L L T Q I K D   129
452  ggc ttt gcc gaa gga aag gac ctt att gtg tcc gtc atg tgt gct   496
130  G F A E G K D L I V S V M C A   144
497  atg ggg gaa gag cag att tgt gcc ctc aag gac att ggt ccc aag   541
145  M G E E Q I C A L K D I G F K   159
542  taa aaa aag cta tgg agg atg gtt aaa tta cac tgc agg tgg ttc   586
160  *
587  gtg ctc ttc ctc tgc agt taa gtg aag ctg ctg gat tca acc tgt   631
632  ggg aaa tgt gct aaa att tag aca ggg ttg gaa ttg gag acc cta   676
677  tat ctt gtt tca tgt ttt tct ttt tcc atc ctt ttg ggt aga acc   721
722  cga ctc tga tat gct gtt tcc gat att ttc ggt tga tta ctt tac   766
767  cga agc tct tgt taa ttt tta aag tca aaa gtt   799

```

图1 桉柳 eIF-5A 全长 cDNA 序列及由此推导的氨基酸序列

Fig. 1 The full length of cDNA sequence and deduced amino acid sequences of eIF-5A from *T. androssowii*



图2 eIF-5A 基因推导的氨基酸序列的保守区预测

Fig. 2 Search for conserved domains in deduced amino acid sequence of eIF-5A gene

```

蛋白 eIF-5A          DNA [+] 未知的查询序列          129.83
eIF-5A              1 NVKRREYQLLDIQEDGFLSLMDLESGETKEDLKLPEGDNLGKEIEGLFE
                    V R++YQL+DI+EDGF+SL+++ G TK+DL+LP ++ L+ I+++F+
                    HVIRTDYQLIDISEDGFVSLLTE-TGGTKDDLRLPSDETLTQIKDGFA
未知的查询序列      317 cgacagtcacagatgggtgaccag aggaaggcacctggactacaaggte
                    atcgcaaatatcaagttgttca cggcaaatgtccaacttcataagtc
                    ttctcctgcctctatttggttgt ttccattcatccatagcgctctc

eIF-5A              50 EGKGDLLVSVISANGEEAIVRVK
                    EGK DL VSV+ ANGEE+I++ K
                    EGK-DLIVSVMCANGEEQICALK
未知的查询序列      461 gga gcagtgatgagggcatgca
                    aga atttcttgctgaaatgcta
                    aag ctgcccgttgaggttccg
    
```

图3 Pfam中的蛋白质搜索程序对eIF-5A基因的蛋白家族预测
 Fig. 3 Predict of protein family of eIF-5A gene using protein search procedure of Pfam

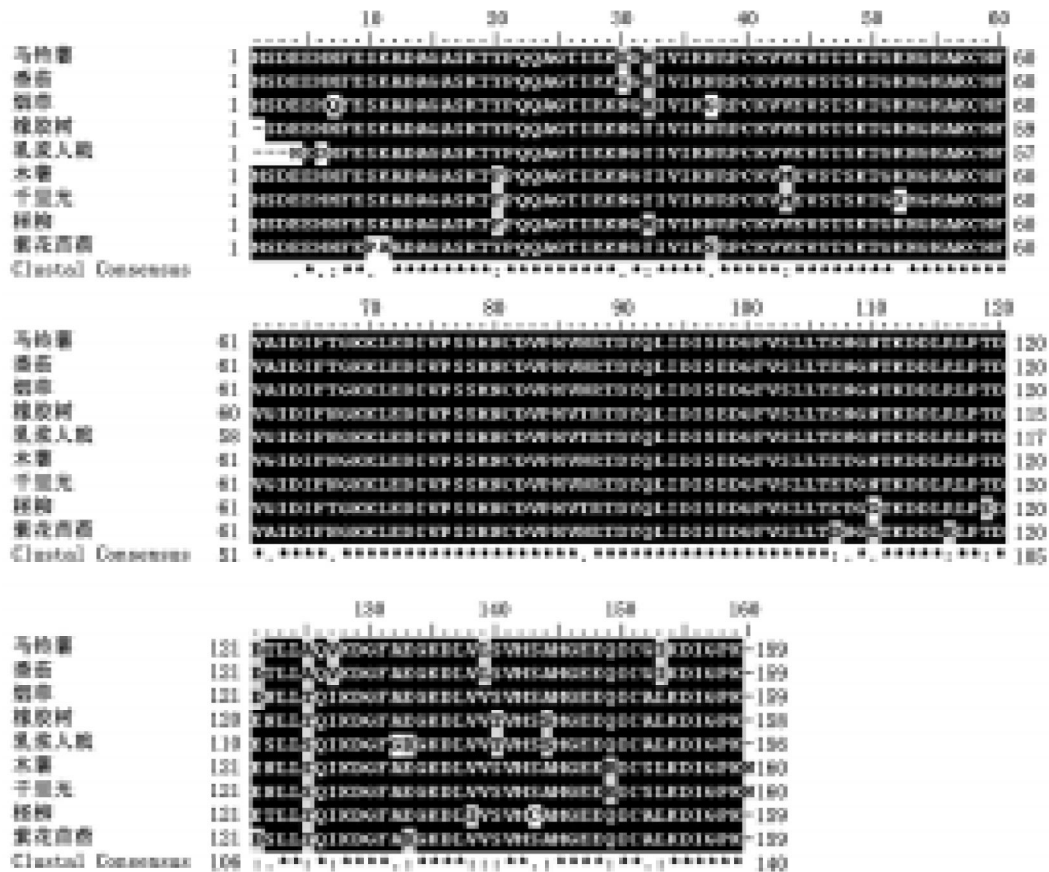


图4 9种植物的eIF-5A编码的氨基酸序列比对

Fig. 4 The amino acid sequence alignment of eIF-5A from 9 plants

柽柳(*Tamarix androssowii*) AY587771; 木薯(*Manihot esculenta*) AF266464; 橡胶树(*Hevea brasiliensis*) AF516357; 烟草(*Nicotiana plumbaginifolia*) CAA45104; 千里光(*Senecio vernalis*) AJ238624; 马铃薯(*Solanum tuberosum*) AB004826; 番茄(*Lycopersicon esculentum*) AF296083; 紫花苜蓿(*Medicago sativa*) AF416338; 乳浆大戟(*Euphorbia esula*) AF225297.

族基因。

用蛋白质家族预测程序(www.pfam.wustl.edu)中的DNA搜索程序(DNA search)对该基因的cDNA序列进行蛋白家族预测表明,该基因编码产物属于eIF-5A蛋白家族(图3)。

3 eIF-5A基因的序列分析

对该序列进行CLUSTALX分析的结果表明,该基因与GenBank中其他物种的eIF-5A基因序列相似性在88%~93%之间。选取与柞柳eIF-5A相近9个物种的eIF-5A序列,进行多序列比对分析,结果见图4。

4 NaHCO₃胁迫前后的eIF-5A基因差异表达

分别以NaHCO₃胁迫处理的柞柳和非胁迫处理的柞柳(对照)cDNA为模板,eIF-5A的编码区两端序列为引物进行PCR扩增,RT-PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,480 bp处的扩增谱带明显不同,经NaHCO₃胁迫的eIF-5A基因扩增亮度高于未作胁迫处理的扩增亮度(图5),表明胁迫前后该基因的表达存在差异。

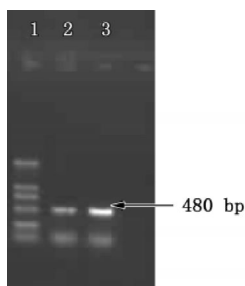


图5 NaHCO₃胁迫前后柞柳eIF-5A基因表达的RT-PCR电泳分析

Fig.5 Analysis of the expression of eIF-5A in *T. androssowii* before and after NaHCO₃ stress by RT-PCR methods

1: 分子量标准DL 2000(自上而下为2 000、1 500、750、500、250、100 bp); 2: 非胁迫处理RT-PCR产物; 3: 胁迫处理RT-PCR产物。

5 pET28a-eIF5A原核表达载体的鉴定及eIF-5A在*E. coli*中的表达

随机选取4个重组质粒pET28a-eIF5A进行PCR扩增,琼脂糖凝胶电泳检测,均获得480 bp的阳性谱带。进而对pET28a-eIF5A的插入序列测序表明,eIF-5A基因已经克隆到原核表达载体中。

重组转化菌BL21(pET28a-eIF5A)经IPTG诱

导表达后,SDS-PAGE电泳显示,在分子量17 kD左右处有特异的条带出现,未经IPTG诱导的BL21(pET28a-eIF5A)只见非常浅的条带,而BL21(pET28a)则无此条带。经过UVP凝胶成像系统分析的结果表明,所表达的融合蛋白分子量为17.3 kD,表达量约占总蛋白的53%,不同诱导剂浓度对表达无明显影响(图6)。

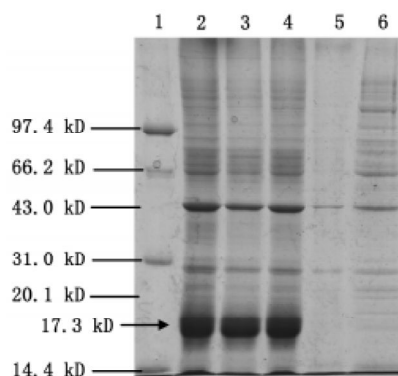


图6 pET28a-eIF5A在*E. coli* BL21中表达的SDS-PAGE分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of pET28a-eIF5A expressing in *E. coli* BL21

1: 标准分子量蛋白; 2: BL21(pET28a-eIF5A)经1.0 mmol·L⁻¹ IPTG诱导; 3: BL21(pET28a-eIF5A)经0.5 mmol·L⁻¹ IPTG诱导; 4: BL21(pET28a-eIF5A)经0.1 mmol·L⁻¹ IPTG诱导; 5: 经0.5 mmol·L⁻¹ IPTG诱导BL21(pET28a); 6: 未经IPTG诱导的BL21(pET28a-eIF5A)。

6 重组菌BL21(pET28a-eIF5A)的耐盐性分析

重组菌BL21(pET28a-eIF5A)和对照BL21(pET28a)在不同浓度NaCl平板上培养的结果表明,重组菌BL21(pET28a-eIF5A)比对照BL21(pET28a)具有一定的耐盐能力,当NaCl浓度达到

表1 不同NaCl浓度下*E. coli*菌株存活率

Table 1 The survival rate of *E. coli* under different concentrations of salt stress

NaCl浓度/ mol·L ⁻¹	菌株存活率/%	
	BL21 (pET28a-eIF5A)	BL21 (pET28a)
0	100.00	100.00
0.4	59.37	31.47
0.6	38.00	9.48
0.8	9.08	4.98
1.0	0.31	0.03

1.0 mol·L⁻¹时,重组菌BL21 (pET28a-eIF5A)的存活率明显高于对照BL21 (pET28a)菌株,约是对照的9.3倍。由表1可见, eIF-5A基因的表达增强了宿主菌的抗盐能力,从而也初步证明该基因可赋予宿主菌一定的耐盐能力。

参考文献

- 1 Park MH, Wolff EC, Folk JE. Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *Biofactors*, 1993, 4(2): 95~104
- 2 Joe YA, Wolff EC, Park MH. Cloning and expression of human deoxyhypusine synthase cDNA. Structure-function studies with the recombinant enzyme and mutant proteins. *J Biol Chem*, 1995, 270(38): 22386~22392
- 3 Chen KY, Jeo DL. Chemistry of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A in biological systems. *J Chin Chem Soc*, 1999, 46(2): 727~734
- 4 Schnier J, Schwelberger HG, Smit-McBride Z et al. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(6): 3105~3114
- 5 Kemper WM, Berry KW, Merrick WC. Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Ba and M2Bb. *J Biol Chem*, 1976, 251(18): 5551~5557
- 6 Benne R, Brown-Luedi ML, Hershey JM. Purification and characterization of protein synthesis initiation factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D, and eIF-5 from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem*, 1978, 253(9): 3070~3077
- 7 Merrick WC. Purification of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *Methods Enzymol*, 1979, 60: 101~108
- 8 Caraglia M, Marra M, Giuberti G et al. The role of eukaryotic initiation factor 5A in the control of cell proliferation and apoptosis. *Amino Acids*, 2001, 20(3): 91~104
- 9 Chou WC, Huang YW, Tsay WS et al. Expression of genes encoding the rice translation initiation factor, eIF5A, is involved in developmental and environmental responses. *Physiol Plant*, 2004, 121(1): 50~57