

草鱼 *eIF-5A* 的克隆、组织表达和进化分析

王军花,陈 琼,马梅生,王丽坤,胡成钰

(南昌大学 生命科学与食品工程学院,江西 南昌 330031)

【摘要】 **【目的】**克隆和鉴定草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的 *eIF-5A* 基因,并分析其组织表达和适应性进化。**【方法】**在克隆草鱼 *eIF-5A* 全长 cDNA 的基础上,利用 ORF finder、SMART 等在线软件对草鱼 *eIF-5A* 的分子特征进行分析,并利用 PAML 3.15 软件包中的密码子替换模型检测 *eIF-5A* 的分子适应性进化;RT-PCR 分析 *eIF-5A* 在草鱼心、脑、肌肉、鳃、脾、肝、肠、肾等组织中的本底表达和 Poly I:C 诱导表达。**【结果】**草鱼 *eIF-5A* 全长 cDNA 为 2 249 bp,其中包含 5'非编码区 41 bp,3'非编码区 1 743 bp;最大开放阅读框为 465 bp,编码 1 个由 155 个氨基酸残基组成的蛋白质;草鱼 *eIF-5A* 分子质量为 16.856 ku,等电点 pI 为 5.18,N 端含有 *eIF-5A* 家族共有的羧基赖氨酸,C 端包含一段富含亮氨酸的结构域。草鱼 *eIF-5A* 与人及其他动物具有较高的同源性,只有少数氨基酸残基发生替换;适应性进化分析也表明,*eIF-5A* 不但具有结构的保守性,还具有功能的保守性;*eIF-5A* 在草鱼心、脑、肌肉、鳃、脾、肝、肠、肾等组织中恒量表达,并且其表达不因 Poly I:C 的诱导而发生变化。**【结论】***eIF-5A* 是一类与细胞分裂和分化密切相关的蛋白质,在生物体中具有多种剪切体,提示 *eIF-5A* 对维持细胞生存非常重要;鉴定的草鱼 *eIF-5A* 为 *eIF-5A1*,而非 *eIF-5A2*。

【关键词】 真核翻译起始因子 5A(*eIF-5A*);基因克隆;基因表达;草鱼;Poly I:C

【中图分类号】 Q785;S965.112

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)08-0048-07

Cloning, tissue-specific expression and evolution of grass carp *eIF-5A* gene

WANG Jun-hua, CHEN Qiong, MA Mei-sheng, WANG Li-kun, HU Cheng-yu

(College of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031, China)

Abstract: **【Objective】** The *eIF-5A* gene was cloned and identified in *Ctenopharyngodon idella*. The tissue-specific expression and adaptive evolution of grass carp *eIF-5A* gene was analyzed. **【Method】** After the full length cDNA of *eIF-5A* had been cloned from grass carp, the molecule characterization of grass carp *eIF-5A* was predicted by ORF finder, SMART on-line softwares and so on. The adaptive evolution of the *eIF-5A* had been studied by codon substitution model in PAML 3.15 software package. The background expression and Poly I:C induced expression of *eIF-5A* in heart, brain, muscle, gill, spleen, liver, intestine and kidney of grass carp were detected by RT-PCR. **【Result】** The full length cDNA sequence of grass carp *eIF-5A* was 2 249 bp, which contained a 5' untranslated region of 41 bp and a 3' untranslated region of 1 743 bp. The open reading frame was 465 bp, which could code a 155 amino acid polypeptide with a molecular mass of 16.856 ku and pI 5.18. Grass carp *eIF-5A* contained the unusual basic amino acid hypusine that conserved in *eIF-5A* family at the N-terminal region and a leucine-rich stretch at the C-terminal region. Only several amino acid residues were substituted, the amino acid sequence shared identity with *eIF-5A* from human and other species. Adaptive evolution analysis also indicated that *eIF-5A* was not only

* [收稿日期] 2008-11-18

[基金项目] 江西省重点科技攻关项目(20061B0260301)

[作者简介] 王军花(1974—),女,江西吉安人,在职硕士研究生,主要从事微生物学研究。王军花、陈琼同等贡献。

[通信作者] 胡成钰(1964—),男,江西南昌人,教授,博士,博士生导师,主要从事细胞生物学研究。E-mail: hucy2008@21cn.com

conserved in structure but also in function. *eIF-5A* was constantly expressed among the heart, brain, muscle, gill, spleen, liver, intestine, kidney of grass carp, as well as by Poly I:C infected. 【Conclusion】 *eIF-5A* is related to cell division and differentiation. The various *eIF-5A* forms suggest that they are extremely important to cell. According to the above results, the grass carp *eIF-5A* identified is *eIF-5A1* rather than *eIF-5A2*.

Key words: *eIF-5A*; gene cloning; gene expression; grass carp; Poly I:C

真核翻译起始因子(eukaryotic translation initiation factor)是一类参与真核细胞蛋白质翻译的物质,目前已发现有 20 余种成员,分属于 *eIF-1*、*eIF-2*、*eIF-3*、*eIF-4*、*eIF-5*、*eIF-6* 等多个家族。真核翻译起始因子一般各自包含多个亚基,并以复合物的形式发挥作用^[1]。*eIF-5* 是三磷酸鸟苷(GTP)酶激活蛋白,在翻译起始时激活 *eIF-2* 的 GTP 酶活性,使 *eIF-2*·GTP 水解为二磷酸鸟苷(GDP)结合的 *eIF-2*。*eIF-5* 有 *eIF-5A*、*eIF-5B* 亚基,其中,*eIF-5A* 能调节蛋白质的翻译,参与 mRNA 的降解^[2-3],并与细胞周期 G1/S 转化及细胞增殖、分化和凋亡密切相关^[4-6]。*eIF-5A* 是迄今惟一 1 个含羟腐胺赖氨酸(hypusine)残基的蛋白质。Park^[5] 研究发现,羧腐胺赖氨酸的合成速率(或者说合成时间)与细胞的分裂进程紧密相关。反之,用亚精胺和脱氧羧腐胺赖氨酸合酶(DHS)抑制剂或一些金属螯合物抑制脱氧羧腐胺赖氨酸羧化酶的功能,可以使哺乳动物细胞停止分化,细胞周期停留在 G1/S 转化期^[7-9]。由此推测,*eIF-5A* 在细胞分裂增殖过程中有重要作用。

迄今为止,虽然已鉴定了人及多种动物的 *eIF-5A* 及其剪切体(isoform)基因,但对鱼类 *eIF-5A* 及其功能了解甚少,仅在已完成了全基因组测序的斑马鱼(*Danio rerio*)中,报道了 *eIF-5A* 序列。为此,本研究在克隆草鱼 *eIF-5A* 基因(EU916931)的基础上,对其分子特征、组织表达特性和适应性进化进行了分析,所获结果将为日后进行鱼类 *eIF-5A* 功能研究及进一步了解基因表达调控提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

草鱼肝肾 cDNA 文库(载体为 pBluescript II SK,宿主菌为 DH5 α)由南昌大学鱼类分子免疫学实验室保存;草鱼由江西省水产科学研究所提供,体质量约 20 g,于流水实验槽中暂养 7 d 后,备用。

SV Total RNA Isolation system 总 RNA 抽提试剂盒为 Promega 生物技术有限公司产品, M-

MLV 反转录酶、*Taq* 酶为宝生物工程有限公司产品,引物合成、测序由上海生物工程有限公司完成。

1.2 草鱼 *eIF-5A* 基因的克隆

采用 pBluescript II SK 载体上的通用引物:T3 (5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAA-3')和 T7(5'-TAA TAC GAC TCA CTA TA-3'),对已筛选的 510 个克隆进行测序,其中编号为 YG003_H10 的克隆经生物信息学分析,确定为草鱼 *eIF-5A* 全长 cDNA。

反应体系为 25 μ L:水 18.75 μ L,10 $\times$ PCR 反应缓冲液 2.5 μ L,2.5 mmol/L dNTP 1 μ L,10 μ mol/mL 上、下游引物各 0.5 μ L,菌液 1.5 μ L,*Taq* 酶 0.25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,59 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.3 草鱼 *eIF-5A* 的分子特征

采用 ORF finder、SMART 等在线软件对草鱼 *eIF-5A* 开放阅读框推译,初步确定其分子特征。

1.4 草鱼 *eIF-5A* 的组织表达特性

在草鱼左右胸鳍下肌肉注射 Poly I:C (1 mg/mL)50 μ L/尾,诱导 3 d,以注射同量 5 g/L 生理盐水的草鱼为对照。提取对照组和经 Poly I:C 诱导后的草鱼肝、肠、肾、脾、心、肌肉、鳃、脑组织总 RNA,反转录得到 cDNA。

根据草鱼 *eIF-5A* 基因序列设计特异性引物:*eIF-5AU* (5'-AGG GGT TCC TCT CTC TTA TGA TG-3')和 *eIF-5AL* (5'-GCA GCC CAG TCT CTC TTC CTA TT-3'),扩增目的片段长度为 196 bp。以 β actin 为内参,引物序列为:F (5'-GGA CTC ATC GTA CTC CTG CTT G-3')和 R (5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GC-3')。PCR 检测 β actin 的转录水平并平衡不同模板 cDNA 的浓度。

反应体系为 25 μ L:水 19.25 μ L,10 $\times$ PCR 反应缓冲液 2.5 μ L,2.5 mmol/L dNTP 1 μ L,10 μ mol/mL 上、下游引物各 0.5 μ L,cDNA 1 μ L,*Taq* 酶 0.25 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94

℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,28 个循环;72 ℃延伸 10 min。

1.5 草鱼 eIF-5A 的同源性分析

在 GenBank 中检索人、小鼠等物种的 *eIF-5A* 基因,经核对文献确认,下载氨基酸序列和核苷酸序列。氨基酸序列经 Clustal W 软件(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)排序比对分析同源性。

1.6 草鱼 *eIF-5A* 的分子适应性进化分析

经 Clustal W 软件排序后,文件经 EMBOSS win 软件(<http://emboss.sourceforge.net/>)的 tralign 程序转换成相应的核苷酸序列排布;然后用 PHYLIPY 软件包(<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>)中最大似然法(ML)构建进化树,自展重复设为 1 000 次。根据序列对位排列和系统树结果,运行 PAML 3.15 (<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>)软件包中的 CODEML 程序^[10],检测 *eIF-5A* 基因的正选择,并寻找正选择作用位点。

2 结果与分析

2.1 草鱼 *eIF-5A* 基因的克隆

在草鱼肝肾 cDNA 文库中,编号为 YG003_H10 的克隆分子长度大于 2 000 bp,对其测序,序列经完整开放阅读框查找和 Blast 比对后,鉴定为草鱼

eIF-5A 全长 cDNA (EU916931)(图 1)。

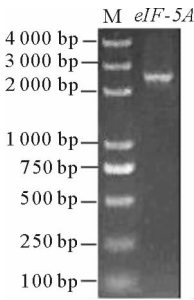


图 1 草鱼 *eIF-5A* 基因的克隆
M. DL2000 plus;*eIF-5A*. 草鱼真核翻译起始因子 5A 基因
Fig.1 Cloning of grass carp *eIF-5A* gene
M. DL2000 plus;*eIF-5A*. Eukaryotic translation initiation factor gene of grass carp

2.2 草鱼 *eIF-5A* 的分子特征

草鱼 *eIF-5A* 全长为 2 249 bp,其中含有 5'非翻译区 41 bp,3'非翻译区 1 743 bp。开放阅读框由 465 bp 组成,编码 1 个由 155 个氨基酸组成的蛋白质(图 2),分子质量为 16.856 ku,等电点 pI 为 5.18。该蛋白质 N 端第 49~56 氨基酸残基位点(TGKHGHAK)为所有 eIF-5A 家族所共有的保守区;第 51 的“K”经亚精胺依赖性翻译后修饰,为该家族成员特有的羧腐胺赖氨酸^[11];另在蛋白质 C 端包含一段富含亮氨酸的结构域。

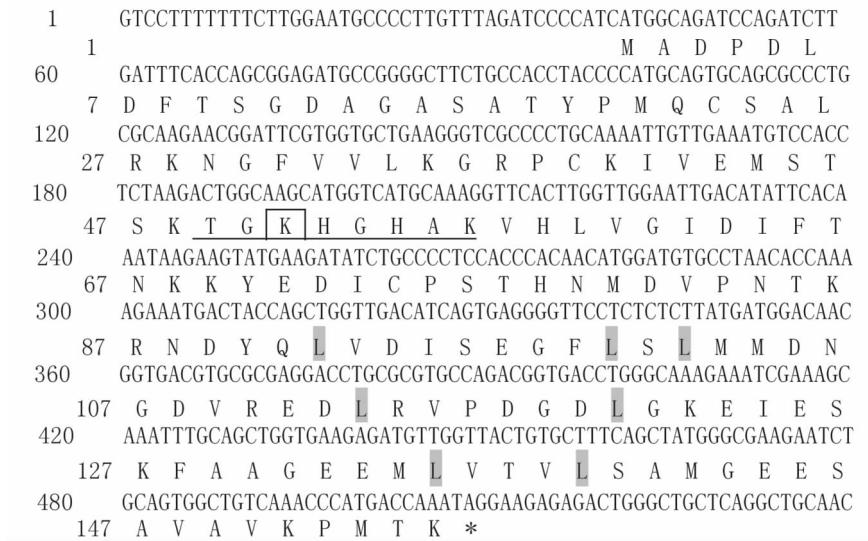


图 2 草鱼 *eIF-5A* 及其推测的氨基酸序列
下划线标示保守区⁴⁹TGKHGHAK⁵⁶;实体框标示⁵¹K 为羧腐胺赖氨酸修饰的位点;阴影标示 C 端富含的亮氨酸

Fig.2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of grass carp *eIF-5A*

The ⁴⁹TGKHGHAK⁵⁶ sequence denoted by underlines is conserved domain;Real line frames denote deoxyhypusine modification site ⁵¹K;
Leucine-rich stretch at the C-terminal region denoted by shadows

540 ATGCTACACTTTAACAAATCTCTTGCATTTGTTTTTTGGTTTTATTGTGACCAAAGCT
600 ATGGCCTTCACAAACAACCTCACATTTTTGTTGTGATTGTATTCCTTTTTTCTCCTCCCA
660 ATACTGTGCTNGGACTTGTGCGGTCAGTTGGCATTCTCTCGGTAAGAAGTTATTATTG
720 TCAGTGTTTACCCCTCGACCTCCCCATTCCACTTTTTTTTTTTTTTTCTCCCCT
780 CAAGTTTTACCAGTTACATTCTGAATGTTAAATAATGGGATCCATTTTTCATTTTTTG
840 TATTCTGAATTTCTTAATAGTAACTAGTGTGCAGGATTATGCAACATGTTGCGAAGAG
900 AGGAAACCCCAACTGACACTGAACCTTATTTTTTCTCTCCCTCTGTGGGTGCCATA
960 CTCTTACTTTTCTCCTTACATAATCAATGCCATTGCTGGCACTATGGTAAATTTCTCTCA
1020 ATTGAATGCCTTTTTCCCCCTCCCAAAGTGAGATGCACACTGGTAGTTGGCACTTCCTT
1080 GTTCTTGCAGTACTTTGAGTACCTTCTCAAGTAAAAACCGCTATGACCAAGAAATAAACT
1140 CCAGTGAAATGTCCTCTTAAATGCCAGTCTCTAATTGTACAGAAGTAGAAAGGATGTGAT
1200 GGCCATGTGCGAATACCTCTGTAACCAATATAGCAGCCAGCTTGATTTTGGCTGTCAGT
1260 GATGACATTAAATAAAGTGTGAAGCCTGTATTTGTCTCCAGGTAGGCTCTTATCAGAAT
1320 GCCCCAGAATGAGCTCAGGCTCTTAAGGACTGAATCTTTCATGCGAGTTCTAATCTTCCT
1380 TTGTTCACTCGAGGCTTTGTCACCTGACTGGAGAGAGCAAAAAATAAAACCTAATAGA
1440 TTACCTTTTCATTATTATTTTTTATTTTTTATGAAGCACTTCATCAGTACTGAAAGA
1500 AGTTCCTGAATGCTGGTTAAGGTGCCGCTTCATATATACAGCTGATTTTCTTTTGGTAA
1560 TATTTAACGTGAGCNTCTTTANTTTCTCAGTCTCTGGAGAATGAATACCCTTGTTTAAA
1620 AGTTACTTAGTCTAACCTGTCCGGTCATTTGGGACGACTTCATTACTAAGGTACAGATA
1680 TTATACTTTATTCAGAAAGTGTCTGTTTGAAGTATGATTTTGGTACATCACCTAAGT
1740 GTTCAGTAGCACAACATGCGATGTTTATGTTCTTGAAGTAAAGACAGTACAATAATATACA
1800 TTCATGTGTATATATTATGTGTATTCCTTAATGTCTGTTGTATGGTTTTAAATGCTAAAT
1860 TTAAGGTTTAAGAAGTATATAAATGGCATGGGACATAATTTAGAAAGTGAGGACATGG
1920 ACCATAACTGGGAAGGAAAGACAAAGCTTTGTTGGGTGGGCTGCCAAATCCTCTGCATG
1980 GGTGGAGCCAAACGCTCATTTCCCACTCATGGCTGGATGCCAGACAACACTGACTCAAT
2040 GAAAGTGTGCACTTAAGTCTTGAGACATGTGGCATTGCAGTATATTCAAACACACAAA
2100 CTTTCATCAATCAACTGGCTCCTAGTGAGCGCTTCTCATATGTTCAAGTATGTATTTACA
2160 TGAATTTTCAAATGGATTAATTTCAAATTTTGTCTGTCGTAGCTGAGTGACATTAAAA
2220 ATTTAACCAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA

续图 2 草鱼 *eIF-5A* 及其推测的氨基酸序列

下划线标示保守区⁴⁹ TGKHHGAK⁵⁶; 实体框标示⁵¹ K 为羧腐胺赖氨酸修饰的位点; 阴影标示 C 端富含的亮氨酸

Continue Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of grass carp *eIF-5A*

The ⁴⁹ TGKHHGAK⁵⁶ sequence denoted by underlines is conserved domain; Real line frames denote deoxyhypusine modification site ⁵¹ K; Leucine-rich stretch at the C-terminal region denoted by shadows

2.3 草鱼 *eIF-5A* 的同源性分析

eIF-5A 的氨基酸序列高度保守。由图 3 可见, 草鱼 *eIF-5A* 与斑马鱼 (NP_998350) 的同源性为 97% (151/155 aa), 仅在第 10 位 (Thr→Ala)、第 86 位 (Thr→Ile)、第 128 位 (Ser→Asn) 存在差异; 与人 (NP_001961)、小鼠 (*Mus musculus*, NP_853613)、牛 (*Bos Taurus*, NP_001003658) 的同源性达 81% (126/155 aa), 与文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*, AAS68511) 的同源性达 69% (107/155 aa); 与其他动物相比, 鱼类 *eIF-5A* 有部分氨基酸发生替换, 在第 68 位氨基酸由 Gly 变成 Asn, 在第 99

位 Asp 变成 Glu。几乎所有的保守区域都位于 *eIF-5A* 的 N 端, 特别是被羧腐胺赖氨酸修饰的赖氨酸及其周围的 26 个氨基酸残基非常保守。

2.4 草鱼 *eIF-5A* 的组织表达特性

RT-PCR 检测草鱼 *eIF-5A* 在 8 种组织中的表达, 获得的目的条带约为 200 bp (图 4A, 图 4B), 与预期结果 (196 bp) 一致。以 *βactin* 为内参平衡 cDNA 的模板量, 结果见图 4C。图 4A 表明, 正常条件下, 草鱼 *eIF-5A* 在 8 种组织中具有广泛表达, 且表达量差异不大。经 Poly I:C 诱导后 (图 4B), *eIF-5A* 的表达水平较之正常条件下变化不明显。

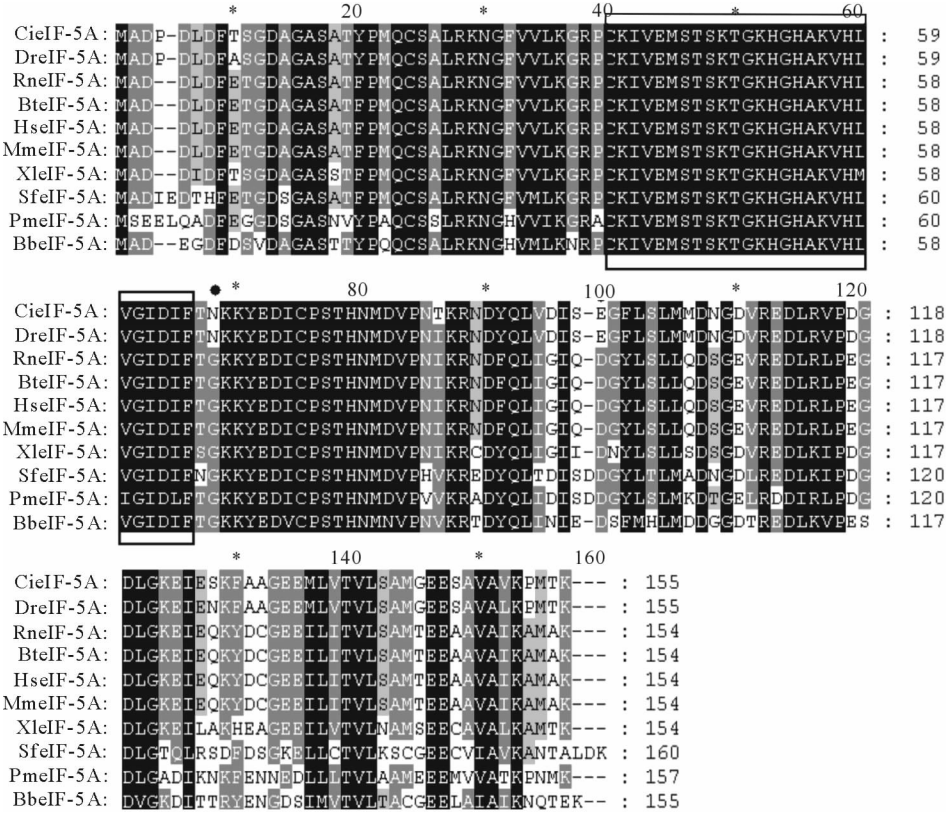


图 3 草鱼 eIF-5A 的同源性分析

黑色阴影表示完全保守的氨基酸位点;实线框标出羧腐胺赖氨酸所在的保守区;黑圆点标识与其他动物相比,鱼类 IF-5A 发生改变的氨基酸位点。CieIF-5A、DreIF-5A、RneIF-5A、BteIF-5A、HseIF-5A、MmeIF-5A、XleIF-5A、SfeIF-5A、PmeIF-5A 和 BbeIF-5A 分别代表草鱼 (EU916931)、斑马鱼 (NP_998350)、大鼠 (NP_001028853)、牛 (NP_001003658)、人 (NP_001961)、小鼠 (NP_853613)、非洲爪蟾 (NP_001080536)、夜蛾 (AAF13316)、对虾 (ABI30653)、文昌鱼 (AAS68511) 的 eIF-5A

Fig. 3 Homology analysis of grass carp eIF-5A

Black shadow indicated the fully conservative amino acids;Real line frames indicated the conservative domain that hypusine was in; Compared with other species,some amino acids have changed in fish eIF-5A denoted by black dot. CieIF-5A,DreIF-5A,RneIF-5A,BteIF-5A,HseIF-5A,MmeIF-5A,XleIF-5A,SfeIF-5A,PmeIF-5A and BbeIF-5A represent eIF-5A from *Ctenopharyngodon idella* (EU916931), *Danio rerio* (NP_998350),*Rattus norvegicus* (NP_001028853),*Bos taurus* (NP_001003658),*Homo sapiens* (NP_001961),*Mus musculus* (NP_853613),*Xenopus laevis* (NP_001084082),*Spodoptera frugiperda* (AAF13316),*Penaeus monodon* (ABI30653), *Branchiostoma belcheri* (AAS68511), respectively

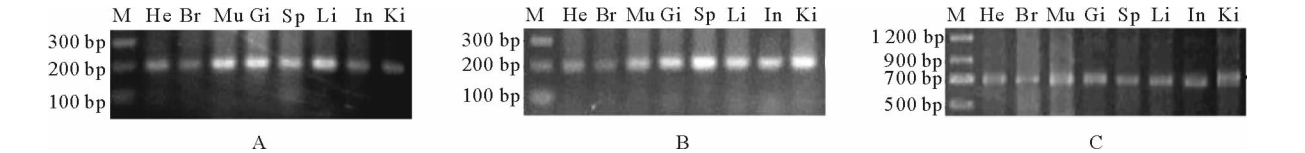


图 4 草鱼 eIF-5A 的组织表达特性

A. 本底表达组;B. Poly I:C 诱导组;C. β actin 内参
M. DL600(A, B),DL1200(C);He. 心;Br. 脑;Mu. 肌肉;Gi. 鳃;Sp. 脾;Li. 肝;In. 肠;Ki. 肾

Fig. 4 Tissue-specific expression of grass carp eIF-5A

A. eIF-5A was constitutively expressed at low levels;B. Expression of eIF-5A induced by Poly I:C;

C. Samples were normalized on the basis of β actin expressions

M. DL600(A,B), DL1200(C);He. Heart;Br. Brain;Mu. Muscle;Gi. Gill;Sp. Spleen;Li. Liver;In. Intestine;Ki. Kidney

2.5 草鱼 eIF-5A 的分子适应性进化分析

2.5.1 不同物种的 eIF-5A 同源序列系统发生树
从图 5 可以看出,人、牛、小鼠和大鼠 4 种哺乳类

动物的 eIF-5A 处于一枝,而人、小鼠和鸡的 eIF-5A2 位于另一相邻分枝上;文昌鱼与 4 种节肢动物的 eIF-5A 亲缘相近,处在同一枝上;草鱼和斑马鱼

的*eIF-5A* 具有很高的相似性 (Bootstrap 值为 1 000)。因此,*eIF-5A* 能很好地反映不同物种间的亲缘关系,为进行适应性进化分析提供了保证。

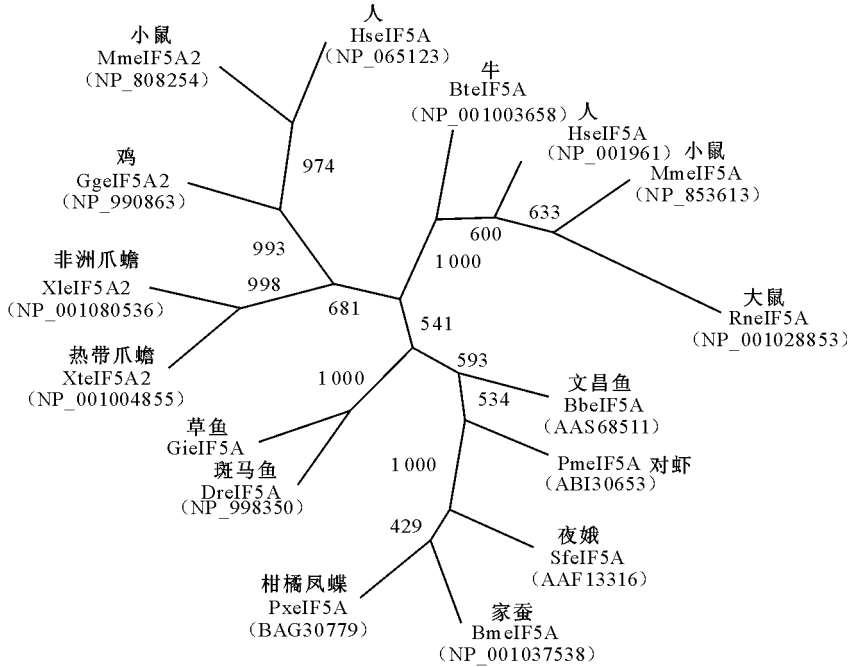


图 5 不同物种的*eIF-5A* 系统进化树

物种以及相关的 GenBank 登录号分别为人 HseIF-5A2 (NP_065123)、小鼠 MmeIF-5A2 (NP_808254)、鸡 GgeIF-5A2(NP_990863)、热带爪蟾 XteIF-5A (NP_001004855)、家蚕 BmeIF-5A (NP_001037538)、柑橘凤蝶 PxeIF-5A (BAG30779),其他物种说明同图 3。
分枝上的数字为 bootstrap 1 000 次的支持率,代表分歧度

Fig. 5 Phylogeny of *eIF-5A* of different species

The species and GenBank accession numbers of corresponding sequences are *Homo sapiens* HseIF-5A2 (NP_065123), *Mus musculus* MmeIF-5A2 (NP_808254),*Gallus gallus* GgeIF-5A2 (NP_990863),*Xenopus tropicalis* XteIF-5A (NP_001004855),*Bombyx mori* BmeIF-5A (NP_001037538),*Papilio xuthus* PxeIF-5A (BAG30779),respectively. Other species see fig. 3

The numerals on branches stand for the support rate of bootstrap 1 000 times, indicate the difference degrees

2.5.2 *eIF-5A* 的正选择检验 经 PHYLIPY 软件 计密码子替换模型的参数 (表 1),比较模型 M0 与包计算得到系统发生树之后,用 CODEML 程序估 M3 对 *eIF-5A* 适应性进化的分析结果。

表 1 *eIF-5A* 正选择检验参数估计

Table 1 Estimates of parameters in *eIF-5A* by positive selective test

模型 Model	<i>P</i>	ln <i>L</i> (<i>l</i>)	2Δ <i>l</i>	参数估计 Estimates of parameters	正选择位点 Positively selected sites
M0	1	-3 595.347		$\omega = 0.033\ 5$	None
M3	5	-3 482.616	225.462**	$p_0 = 0.582\ p_1 = 0.354\ p_2 = 0.064$ $\omega_0 = 0.004\ \omega_1 = 0.056\ \omega_2 = 0.312$	None
M7	2	-3 486.645		$p = 0.310\ q = 5.999$	None
M8	4	-3 484.140	5.010	$p_0 = 0.993\ p = 0.339\ q = 7.977$ ($p_1 = 0.007$) $\omega = 1.000$	None

注:*P* 是模型的自由参数数目,ln*L*(*l*)是最大似然值的对数,2Δ*l* 是 M3 与 M0 及 M7 与 M8 间 ln*L*(*l*)之差的 2 倍。* 表示似然比检验极其显著, p_0 表示受到选择约束的位点比例, p_1 表示可能受到正选择的位点比例, p 和 q 是 M7 与 M8 中 β 分布 B(p, q)的参数, ω 指示正选择位点的参数。
Note:*P* is the number of freedom paremeters in the model. ln*L*(*l*) is the log-likelihood,2Δ*l* is twice the log-likelihood difference(M3&M0, M7&M8). ** stands significant at 1% level. p_0 and p_1 indicated the proportion of sites under selective constraint and under positive selection, respectively. Parameters p and q for the beta distribution B(p, q) are given under M7 and M8. ω indicated the parameters of positively selected sites.

由表 1 可知,最大似然值对数差的 2 倍 2Δ*l* = 225.462,而自由度 d. f. = 5 - 1 = 4 的 χ^2 分布值为 18.467 (0.1%显著水平);可见,对 *eIF-5A* 进行的似然比检验非常显著。模型 M3 指示正选择的参数

$\omega_1 = 0.056$, 模型 M8 指示正选择的参数 $\omega = 1.000$, 这些参数都不大于 1, 意味着 *eIF-5A* 中的氨基酸位点没有受到正选择作用, 而是处于中性进化或负进化状态。

模型 M3 的参数 $p_0 = 0.582$, 模型 M8 的参数 $p_0 = 0.993$, p_0 表示受到选择约束的位点的比例, 这说明 *eIF-5A* 上大多数位点受到选择约束。

3 讨 论

eIF-5A 是一类与细胞分裂和分化密切相关的蛋白质, 在生物体中具有多种 *eIF-5A* 剪切体, 提示其对维持细胞生存非常重要。已报道脊椎动物至少具有 2 个 *eIF-5A* 剪切体基因, 分别为 *eIF-5A* 或 *eIF-5A1* 和 *eIF-5A2*。尽管这些基因的核苷酸数目差别很大(1 089~5 537 bp), 但编码的蛋白质的分子质量均为 16~18 ku, 有很高的相似性, 如人 *eIF-5A1* 与 *eIF-5A2* 的同源性达到 84%^[12]。适应性进化分析也表明, 在 *eIF-5A* 上没有大于 1 的 ω 值, 并且在 M8 中, 受到选择约束的位点比例参数 p_0 高达 99.3%, 意味着与其结构保守性相对应, *eIF-5A* 在功能上也具有高度保守性。

同样, 在斑马鱼中报道了 2 个 *eIF-5A* 基因, 分别为 BC056297 (1 945 bp) 和 NM213185 (1 301 bp), 这 2 个序列非常相似, 只是前者在 3' 非翻译区多出约 600 bp。斑马鱼的这 2 个序列与其他脊椎动物的 *eIF-5A1* 和 *eIF-5A2* 的关系还有待进一步研究。本研究获得的草鱼 *eIF-5A* 基因为 2 249 bp, 虽然比斑马鱼 BC056297 和 NM213185 大很多, 但编码的蛋白质非常相似。同时, 草鱼 *eIF-5A* 的大小介于其他脊椎动物 *eIF-5A1* 和 *eIF-5A2* 之间, 并与鸡 *eIF-5A1* (Q09121) 和 *eIF-5A2* (NM205532) 的同源性为 81.54% 和 79.31% (结果未列出)。

除基因大小外, *eIF-5A* 或 *eIF-5A1* 与 *eIF-5A2* 的最大差别可能在于表达特性上。研究表明, *eIF-5A1* 在人细胞中属于恒量表达, 而 *eIF-5A2* 在人正常细胞中表达量很低, 仅在卵巢癌和结肠癌细胞中检测到高水平表达^[12-13]。同样, Western blot 显示, *eIF-5A* 在小鼠不同组织中的分布没有大的差异^[14]; Northern blot 分析也发现, *eIF-5A* 在人的许多组织中恒定表达^[15]。因此, *eIF-5A1* 或 *eIF-5A* 的表达为组成型表达, 而 *eIF-5A2* 的表达是受一些特殊因素(细胞分裂等)刺激或诱导的表达。在一些特殊情况下, *eIF-5A1* 和 *eIF-5A2* 表达的相互叠加可以

在细胞内促进大量蛋白质的翻译。与小鼠和人的 *eIF-5A* 相似, 草鱼 *eIF-5A* 在心、脑、肌肉、鳃、脾、肝、肠、肾等组织中均有强烈的本底表达, 而且经 Poly I:C 诱导后, 其在各组织中的表达并没有明显上调。因此, 本文鉴定的草鱼 *eIF-5A* 为 *eIF-5A1*, 而非 *eIF-5A2*。

[参考文献]

- [1] Kapp L D, Lorsch J R. The molecular mechanics of eukaryotic translation [J]. Annu Rev Biochem, 2004, 73: 657-704.
- [2] Park M H. The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (*eIF-4D*). Purification of *eIF-4D* and its precursors and comparison of their activities [J]. J Biol Chem, 1989, 264(31): 18531-18535.
- [3] Liu Y P, Nemeroff M, Yan Y P, et al. Interaction of eukaryotic initiation factor 5A with the human immunodeficiency virus type 1 Rev response element RNA and U6 snRNA requires deoxyhypusine or hypusine modification [J]. Neuro-Signals, 1997, 6(3): 166-174.
- [4] 靳宝锋, 何 昆, 胡美茹, 等. 真核起始因子 5A 与细胞周期 G1/S 调控的研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2003, 11(4): 325-328.
Jin B F, He K, Hu M R, et al. The effect of *eIF-5A* on the G1/S in cell cycle regulation [J]. Journal of Experimental Hematology, 2003, 11(4): 325-328. (in Chinese)
- [5] Park M H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (*eIF-5A*) [J]. J Biochem, 2006, 139(2): 161-169.
- [6] Caraglia M, Tagliaferri P, Budillon A, et al. Post-translational modifications of eukaryotic initiation factor-5A (*eIF-5A*) as a new target for anti-cancer therapy [J]. Adv Exp Med Biol, 1999, 472: 187-198.
- [7] Chen Z P, Yan Y P, Ding Q J, et al. Effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells [J]. Cancer Lett, 1996, 105(2): 233-239.
- [8] Tome M E, Gerner E W. Hypusine modification in eukaryotic initiation factor 5A in rodent cells selected for resistance to growth inhibition by ornithine decarboxylase-inhibiting drugs [J]. Biochem J, 1996, 320(Pt 1): 55-60.
- [9] Nishimura K, Ohki Y, Fukuchi-Shimogori T, et al. Inhibition of cell growth through inactivation of eukaryotic translation initiation factor 5A (*eIF-5A*) by deoxyspergualin [J]. Biochem J, 2002, 363(Pt 3): 761-768.
- [10] Yang Z, Nielsen R. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models [J]. Mol Biol Evol, 2000, 17(1): 32-43.

(下转第 62 页)