



研究报告

Letter

毛白杨真核细胞翻译起始因子5A基因(*PtoeIF5A4*)的克隆与表达分析

张利姣^{1,2*} 张杰伟^{1*} 陈亚娟¹ 管阳¹ 王宏芝^{1**} 魏建华^{1**}

1 北京市农林科学院 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097; 2 首都师范大学, 北京 100048

*同等贡献作者

**通讯作者, wanghongzhi@baafs.net.cn; weijianhua@baafs.net.cn

摘要 真核细胞翻译起始因子5A(eIF5A)是目前已知的唯一一种含有羧腐胺赖氨酸残基的蛋白质,其在细胞的生长和增殖方面具有重要作用。但eIF5A各异形体的生物学功能尚不明晰。本研究从毛白杨(*Populus tomentosa*)中克隆了一个eIF5A的全长编码区序列,并根据同源性分析将其命名为*PtoeIF5A4*(GenBank 登录号: HQ529482),其编码区与毛果杨(*Populus trichocarpa*) *PtreIF5A4*的编码区在核酸水平的序列相似性为99%。*PtoeIF5A4*的编码区全长483 bp,共编码160个氨基酸,编码蛋白的预测分子量约为17.5 kD,等电点为5.76。表达分析结果表明,该基因在根、茎及叶中均表达,在茎中的表达量最高,而且随生长时间的增长,*PtoeIF5A4*在茎中表达量逐渐上升,生长12个月的杨树茎次生木质部中*PtoeIF5A4*的表达水平是移栽1个月的4倍,且在12个月后趋于稳定,推测*PtoeIF5A4*在林木次生生长中起关键作用。

关键词 毛白杨, *PtoeIF5A4*, 次生生长

Cloning and Expression Analysis of the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A Gene(*PtoeIF5A4*) in *Populus tomentosa*

ZHANG Li-Jiao^{1,2*} ZHANG Jie-Wei^{1*} CHEN Ya-Juan¹ GUAN Yang¹ WANG Hong-Zhi^{1**} WEI Jian-Hua^{1**}

1 Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097; 2 China Capital Normal University, Beijing 100048, China

* The authors who contribute equally

** Corresponding author, wanghongzhi@baafs.net.cn; weijianhua@baafs.net.cn

Abstract The eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is the only cellular protein that contains the unique polyamine-derived amino acid, hypusine. Genetic and pharmacological evidences suggest that eIF5A is essential for cell survival and proliferation. However, the precise function of eIF5A is still unclear. In the present study, We isolated the full length *PtoeIF5A4* (GenBank Accession number: HQ529482) CDS from white poplar based on bio-information analysis. Sequence analysis showed that the sequence of *PtoeIF5A4* shared 99% identity with the sequence of *Populus trichocarpa*. The completed ORF of *PtoeIF5A4* was 483 bp and encoding 160 amino acid residues with a calculated molecular mass of 17.5 kD and a pI of 5.76. Real-time PCR results showed that *PtoeIF5A4* expressed in various organs in poplar, especially in the stem. The expression of *PtoeIF5A4* increased with growth time until one year. The expression of *PtoeIF5A4* in 1 year *P. tomentosa* tree stem secondary xylem was 4 times than that of in 1 month. These results demonstrate that *PtoeIF5A4* may

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30972392), 国家高技术研究发展计划(863)项目(No. 2011AA100201)和国家重点基础研究发展规划(973)项目(No. 2012CB114501)

收稿日期: 2013-02-20 接受日期: 2013-04-08

play an important role in growth and development of trees secondary growth.

Keywords *Populus tomentosa*, *PtoeIF5A4*, Secondary development

真核细胞翻译起始因子 5A(eukaryotic translation initiation factor 5A, eIF5A)是迄今为止发现的唯一一种含有羧腐胺赖氨酸残基的蛋白,在生物界广泛存在且高度保守(Duguay et al., 2007)。羧腐胺赖氨酸是在 eIF5A 翻译后经两步酶促反应在特定的赖氨酸残基上加工修饰而成(Park et al., 2010)。研究表明,羧腐胺基对 eIF5A 的生物学活性是必须的(Park et al., 2010; Lee et al., 2011)。eIF5A 最初被认为在蛋白翻译起始起重要作用,因而命名为真核细胞翻译起始因子(Benne and Hershey, 1978),但最近的研究推测 eIF5A 在蛋白延伸过程中发挥着重要作用(Zanelli and Valentini, 2007; Gregio et al., 2009; Saini et al., 2009; Li et al., 2010; Dias et al., 2012)。关于 eIF5A 确切生物学功能的研究在植物中较少,且远未明确。已有的研究表明,其与植物的发育及抗逆性有关(Chou et al., 2004; Wang et al., 2012)。在烟草中,抑制 eIF5A 和其翻译后修饰关键基因 DHS 的表达,可延缓叶片的衰老(Duguay et al., 2007),抑制次生木质部的生长(Wang et al., 2003, 2005; Liu et al., 2008),并且增强植物的抗逆性(Wang et al., 2012; Duguay et al., 2007; Xu et al., 2011)。拟南芥中存在三个不同的 *eIF5A* 基因成员,其中 *AtelIF5A3* 主要在细胞分裂活跃的种子中表达,过表达 *AtelIF5A3* 的拟南芥转基因植株出现并生叶,且种子变大,推测 *AtelIF5A3* 参与拟南芥的生长发育过程(Ma et al., 2010)。Wang 等(2012)研究发现在杨树中过表达柞柳 *TaelIF5A1* 基因,转基因植株在正常的生长条件下与野生型类似,但是在高盐条件下,转基因杨树的株高和底面直径均比野生型高;且在山梨醇、CuSO₄、CdCl₂ 等非生物胁迫下,转基因杨树均表现明显的抗性(Wang et al., 2012)。

不同植物中存在不同数量的 *eIF5A* 基因。依据已经测序完成的毛果杨(Tuskan et al., 2006)序列,通过生物信息学分析,推测杨树中含有 4 个不同的 *eIF5A* 基因。关于杨树中 *eIF5A* 功能的深入研究尚未见报道。毛白杨是我国特有的重要乡土树种,因其生长迅速、材质优良已广泛应用于制浆造纸业、建筑业、纺织业等行业。本研究选取毛白杨为材料,采用同源克隆的策略,分离了一个 *eIF5A*

基因,通过与美洲黑杨的相关基因(Ma et al., 2010)进行蛋白同源性比对,将本研究得到的基因命名为 *PtoeIF5A4*。进一步的表达分析表明 *PtoeIF5A4* 在杨树的次生生长中起关键作用。

1 结果与分析

1.1 毛白杨 *PtoeIF5A4* 基因的克隆及序列分析

以毛白杨幼苗总 cDNA 为模板,经 3'RACE 和巢式 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳检测显示:分别在 800 bp 和 500 bp 处出现一条特异的条带(图 1),与预期的目标条带大小一致。测序结果显示 *PtoeIF5A4* 基因编码区全长 483 bp,3'端非翻译区为终止密码子后 286 bp,共编码 160 个氨基酸,预测编码蛋白分子量约为 17.5 kD,等电点为 5.76(图 2)。DNAMAN 软件分析结果显示,*PtoeIF5A4* 同毛果杨 *PtreIF5A4* 编码区序列相比,在核酸水平上相似性为 99%,蛋白水平上相似性为 98.75%。

为研究 *PtoeIF5A4* 与其他物种 eIF5A 的同源性关系,从 NCBI 网站上获取其他物种 28 个 eIF5A 氨基酸序列,分别为:月季 RceIF5A1(EF177192), RceIF5A2(DQ345329);柞柳 TaeIF5A1(AY587771), TaeIF5A2(JQ040803), TaeIF5A3(JQ040804), TaeIF5A4(JQ040805);美洲黑杨 PdeIF5A1(FJ032302), PdeIF5A2(FJ032303), PdeIF5A3

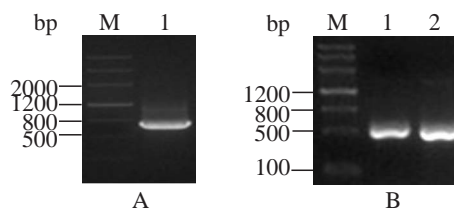


图 1 毛白杨 *PtoeIF5A4* 基因的扩增

Figure 1 Cloning of *PtoeIF5A4* gene

A. 杨树 *PtoeIF5A4* 基因 3'端非翻译区扩增。M: DNA marker; 1: 3'RACE 扩增 *PtoeIF5A4* 基因 3'端非翻译区。B. 杨树 *PtoeIF5A4* 基因的扩增。M: DNA marker; 1, 2: PCR 扩增 *PtoeIF5A4* 基因编码区

A. Amplification of 3' terminal of *PtoeIF5A4* gene. M: DNA marker; 1: Amplification of 3' terminal of *PtoeIF5A4* gene by 3' RACE. B. Cloning of *PtoeIF5A4* gene. M: DNA marker; 1, 2: Amplification of the coding region of *PtoeIF5A4* gene by PCR

```

1   ATGTCGACGAGGAGCACCCTTTGAATCAAAGGCTGATGCAGGAGCCTCCAAGACTTACCCTCAGCAAGCTGGT
1   M S D E E H H F E S K A D A G A S K T Y P Q Q A G
76  ACTATCCGCAAGAATGGCTATATAGTCATCAAGAACCCTGCTTGGCAAGGTTGTTGAGGTTTCCACCTCAAAGACA
26  T I R K N G Y I V I K N R P C K V V E V S T S K T
151 GGCAAGCATGGACATGCTAAGTGCCACTTTGTGGGGATTGATATATTTAATGGGAAAAAGCTAGAAGATATTGTT
51  G K H G H A K C H F V G I D I F N G K K L E D I V
226 CCTTCATCTCACAACGTGATGTTCCCCATGTTAATCGTACTGATTATCAGCTGATTGATATCTCTGAAGATGGC
76  P S S H N C D V P H V N R T D Y Q L I D I S E D G
301 TTTGTGAGTCTTTTGGACTGAAAATGGAAATACCAAGGATGATCTGAGGCTTCCCACCGATGATAATCTGCTTACT
101 F V S L L T E N G N T K D D L R L P T D D N L L T
376 CCGATTAAGATGGGTTTGGTGAAGGAAAGGACCTTGTGGTGACTGTCAATGTCTGCCATGGGAGAGGGGCAGATC
126 P I K D G F G E G K D L V V T V M S A M G E G Q I
451 TGTGCCCTTAAGGACATTGGTCCAAAAAATTGAATATGATGCTATAGCAGCAGCTATAGCTGATGGCAAAGCGAG
151 C A L K D I G P K N *
526 TTTTATGTTGCTAACAAGTATTTTTATCCACTATGCATGTGTACAACAACTTATAAGACAGTATTTTAGATATG
601 TCATTAAGACTCGCAAGGCATGTCATGGGGTGAAGAGGACACAGGAGATGCTTATTCCTGATGAAGGGAACT
676 AGTGTTTTCAGCAGGATGGAATTTATATATATTTCTACTTCACATTTGTCTGAGCTACTTAAAAATAAATAAAGG
751 TTTGTGCTCAACCCTTTTC
    
```

图2 毛白杨*PtoeIF5A4*基因序列及其预测的氨基酸序列

Figure 2 The nucleotide acid sequence and amino acid sequence for *PtoeIF5A4* gene

(FJ032304), *PdeIF5A4*(FJ032305); 毛白杨 *PtoeIF5A1*(HQ529479), *PtoeIF5A2*(HQ529480), *PtoeIF5A3*(HQ529481); 拟南芥 *AteIF5A1*(NM_101261), *AteIF5A2*(NM_102425), *AteIF5A3*(NM_105608); 水稻 *OseIF5A1* (AF094773), *OseIF5A2* (AJ312906); 番茄 *SleIF5A1* (AF296083), *SleIF5A2* (AF296084), *SleIF5A3*(AF296085), *SleIF5A4* (AF296086); 玉米 *ZmeIF5A* (NM_001112080); 马铃薯 *SteIF5A1* (AB004827), *SteIF5A2* (AB004823), *SteIF5A3* (AB004824), *SteIF5A4* (AB004825), *SteIF5A5* (AB004826)。进化树分析结果表明 *PtoeIF5A4* 与毛白杨 *eIF5A* 家族中其他成员及美洲黑杨中的 *PdeIF5A* 各成员高度同源(图3)。进化树的分析结果还表明,同种或近源种中不同 *eIF5A* 成员的同源性较高,如美洲黑杨与毛白杨同属杨柳科杨属,其中4个不同成员间高度同源;同属茄科但不同属的马铃薯与番茄中的不同 *eIF5A* 成员高度同源;拟南芥及桤柳中的各 *eIF5A* 成员间也呈现相同的现象。各 *eIF5A* 成员具有各自的生物学功能,但是从进化树分析结果推测,承担相同或相似生物学功能的 *eIF5A* 在亲缘关系较远的物种间的同源性低于同种或亲缘关系较近的物种中各 *eIF5A* 成员间的同源性。

1.2 毛白杨 *PtoeIF5A4* 基因在不同胁迫下表达差异性分析

为了研究毛白杨 *PtoeIF5A4* 是否与逆境胁迫响应有关,本研究选取6个月的温室盆栽毛白杨幼苗,分别经过干旱、ABA、NaCl和低温处理后(处理时间见材料与方法),检测 *PtoeIF5A4* 的表达水平。在干旱处理后1 h, *PtoeIF5A4* 表达出现下调,在3 h出现最低值,约为未处理时的50%,随后又出现上升趋势,在12 h基本稳定,约为未处理时的70%(图4A);经ABA处理1 h后, *PtoeIF5A4* 表达量略有下降,趋势与干旱处理类似,在3 h出现最低值,约为未处理的46%(图4B);经NaCl处理1 h后, *PtoeIF5A4* 表达量略有下降,在6 h达到最高值,约为对照的1.5倍,此后有略微下降(图4C);而经过低温处理后1 h, *PtoeIF5A4* 表达量出现轻微下调,随后出现上调趋势,在24 h达到最高值,约为对照的1.4倍(图4D)。上述结果中,虽然 *PtoeIF5A4* 的表达水平在不同逆境胁迫下呈现不同的变化趋势,但是变化幅度总体较小,尚难以推测该基因是否响应逆境胁迫。

1.3 毛白杨 *PtoeIF5A4* 基因的组织表达特异性分析

为研究 *PtoeIF5A4* 是否在毛白杨的生长发育过

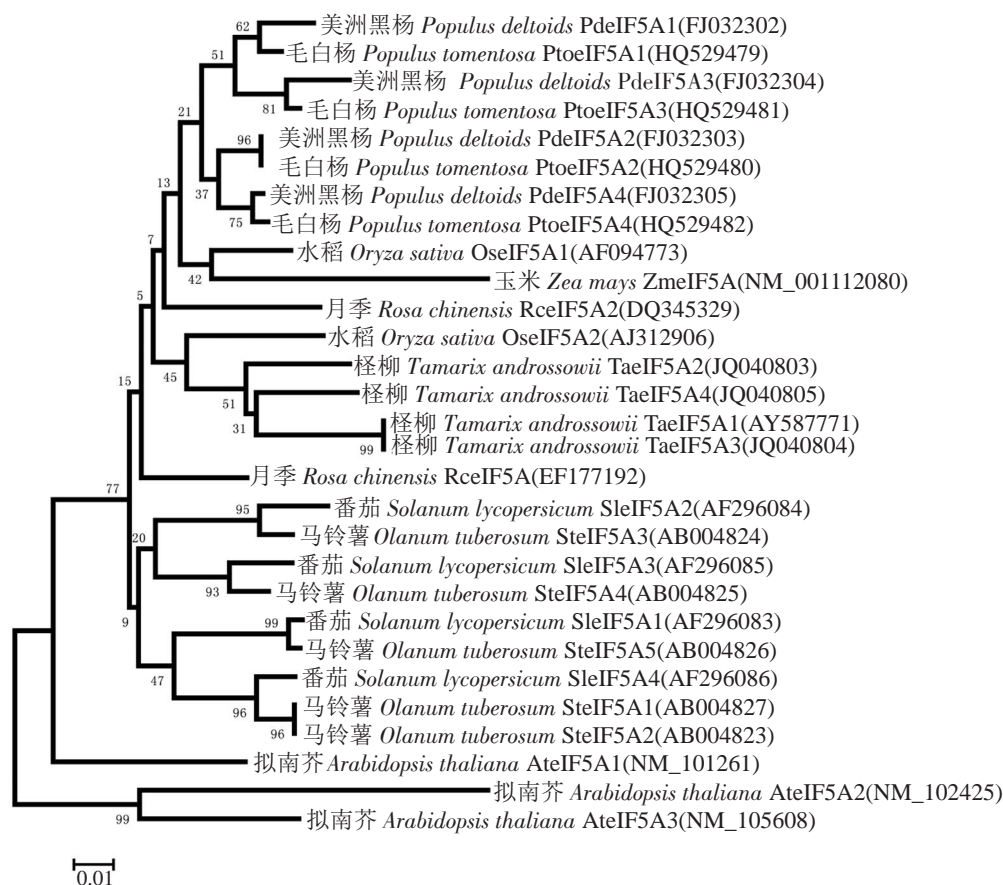


图 3 基于 *eIF5As* 基因编码蛋白质序列构建的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree based on the eukaryotic translation initiation factor 5A proteins coded by *eIF5As*

程中起重要作用,本研究实验选取6个月盆栽毛白杨幼苗的幼根、茎的次生木质部和叶片为材料,检测 *PtoeIF5A4* 基因在各个部位的表达量。结果显示在6个月盆栽毛白杨中 *PtoeIF5A4* 在茎的次生木质部中表达量最高,约是幼根表达量的2倍,叶片的1.3倍(图5)。

1.4 *PtoeIF5A4* 基因在毛白杨不同生长时期的表达差异分析

由于 *PtoeIF5A4* 在茎的次生木质部中的表达量最高,为进一步推测其在不同发育时期的功能,本研究以1、2、3、4、12和24个月的毛白杨为材料,分别取其距离地面三分之一处的茎,提取其RNA,经反转录cDNA后,Real-time PCR检测不同生长时期 *PtoeIF5A4* 的表达水平。结果表明,随着生长时间的延长, *PtoeIF5A4* 的表达量逐渐上升,在3和4个月时表达量约为1个月毛白杨幼苗的2倍,在12和24个月生毛白杨中, *PtoeIF5A4* 的表达量趋于稳定,约为1个月毛白杨幼苗的4倍(图6)。由于杨树茎

的发育生长直接与木材形成的次生长有关,根据本研究结果推测 *PtoeIF5A4* 可能在林木的次生长过程中起重要作用。

2 讨论

eIF5A 在真菌及动植物体内普遍存在,高度保守。研究表明其可能通过影响部分蛋白质的翻译,进而在不同生物中与一些非常重要的生物学性状密切相关,如人体癌症发生、促进动植物细胞增殖、细胞衰老和死亡以及植物发育生长及环境胁迫应答等(Feng et al., 2007; Dias et al., 2008; Kaiser et al., 2012)。现有研究报道及根据基因组序列分析表明,不同植物中 *eIF5A* 家族的成员数各有不同,如拟南芥3个,水稻3个,美洲黑杨4个,柽柳有4个,番茄4个,马铃薯5个。在生物学功能方面,不同的 *eIF5A* 不尽相同。以研究较为深入的拟南芥为例, *AteIF5A1* 主要在衰老的组织中表达,参与次生木质部的形成, *AteIF5A1* 过表达的转基因拟南芥木质部增大(Liu et al., 2008); *AteIF5A2* 主要在受机

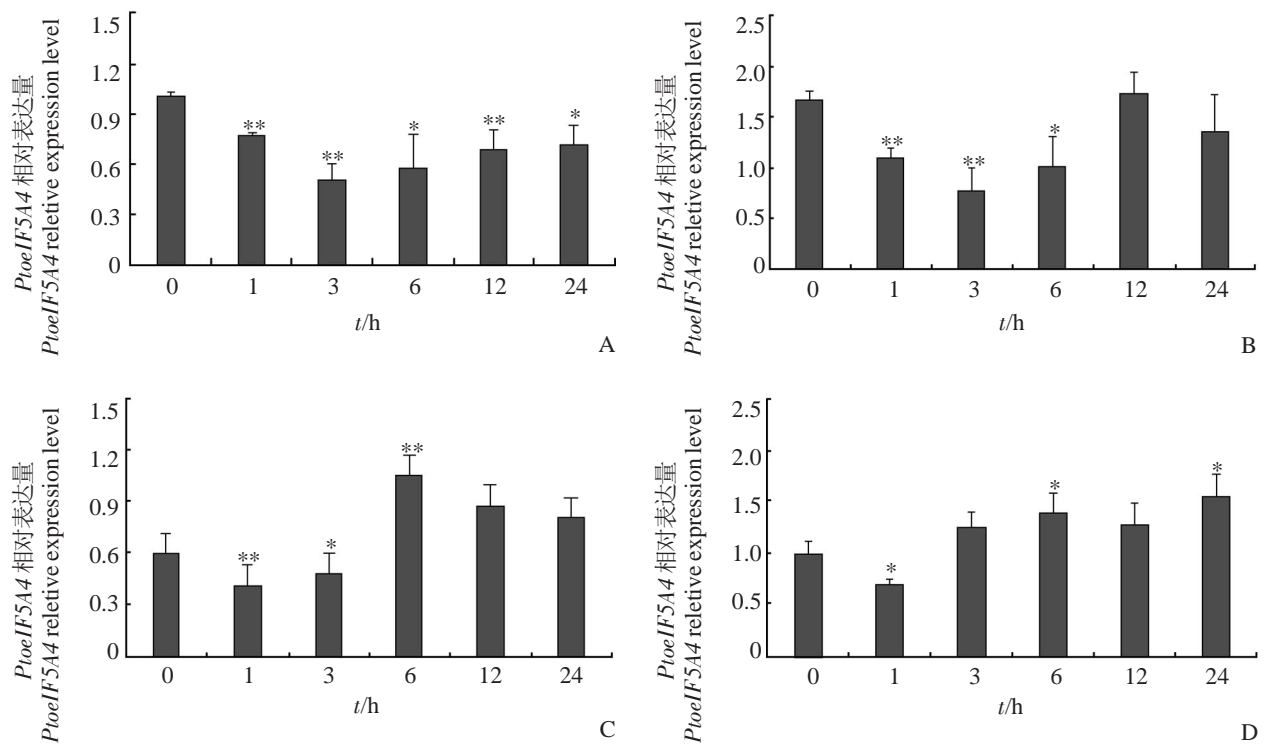


图4 毛白杨 *PtoeIF5A4* 基因在不同胁迫条件下的表达分析

Figure 4 Quantitative Real-time PCR analysis of *PtoeIF5A4* gene expression in different stresses

A: 干旱胁迫下 *PtoeIF5A4* 基因的表达; B: 200 μmol/L 脱落酸胁迫下 *PtoeIF5A4* 基因的表达; C: 300 mmol/L 氯化钠胁迫下 *PtoeIF5A4* 基因的表达; D: 低温胁迫下 *PtoeIF5A4* 基因的表达; 内参基因: *PtoActin9*; n=3, *: 差异性显著 ($P < 0.05$), **: 极显著性差异 ($P < 0.01$)

A: *PtoeIF5A4* gene expression under dehydration; B: *PtoeIF5A4* gene expression under 200 μmol/L ABA; C: *PtoeIF5A4* gene expression under 300 mmol/L NaCl; D: *PtoeIF5A4* gene expression under 4°C; the *Ptoactin9* was used as an internal reference. All assays were repeated three times, and all values were means of three replicates. Asterisk (*) indicates a difference at $P < 0.05$ level, Asterisks (**) each column indicate a significant difference at $P < 0.01$ level

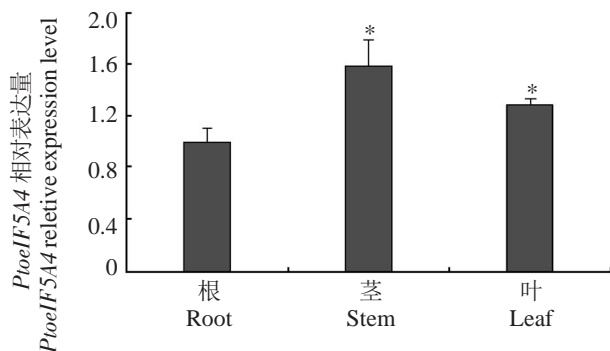


图5 毛白杨 *PtoeIF5A4* 基因组织特异性表达分析

Figure 5 Quantitative Real-time PCR analysis of *PtoeIF5A4* gene expression in various organs

内参基因: *PtoActin9*; n=3; * 表示差异性显著 ($P < 0.05$)

The *Ptoactin9* was used as an internal reference. All assays were repeated three times, and all values were means of three replicates, Asterisk (*) indicates a difference at $P < 0.05$ level

械损伤的组织中高水平表达并通过影响细胞分裂、生长与死亡而调控植物生长发育 (Feng et al., 2007); 而 *AteIF5A3* 主要在细胞分裂活跃的种子中表达, *AteIF5A3* 过量表达的转基因拟南芥, 叶子变为并生叶, 种子变大, 推测其可能参与植物的生长与发育 (Ma et al., 2010)。由于 eIF5A 各成员在同一物种或亲缘关系较近的物种中高度同源, 其同源性高于可能承担相同或类似功能的 eIF5A 成员在不同物种中的同源性, 因此很难通过简单的同源性分析来推测不同 eIF5A 成员的生物学功能。表达特异性分析可能是寻找这些不同 eIF5A 功能差异线索的重要途径。

本研究对毛白杨 *PtoeIF5A4* 的组织表达特异分析表明, 其在根、茎及叶中均表达, 在茎中的表达水平最高。在不同胁迫处理下, *PtoeIF5A4* 的表达水

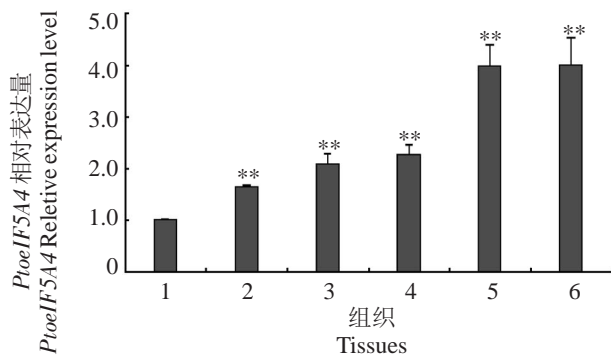


图6 毛白杨*PtoeIF5A4*基因在茎中不同生长时期的表达分析
Figure 6 Quantitative Real-time PCR analysis of *PtoeIF5A4* gene expression in the stem of different growth stages

1: 1个月盆栽毛白杨幼苗茎; 2: 2个月盆栽毛白杨幼苗茎; 3: 3个月盆栽毛白杨幼苗茎; 4: 4个月盆栽毛白杨幼苗茎; 5: 12个月田间毛白杨茎; 6: 24个月田间毛白杨茎; 内参基因: *Pto-Actin9*; n=3; **表示差异性显著($P < 0.05$)

1: One month stem of pot *P. tomentosa* seedling; 2: Two months stem of pot *P. tomentosa* seedling; 3: Three months stem of pot *P. tomentosa* seedling; 4: Four months stem of pot *P. tomentosa* seedling; 5: Twelve months stem secondary xylem of field *P. tomentosa* tree; 6: Twenty four months stem secondary xylem of field *P. tomentosa* tree; the *Ptoactin9* was used as an internal reference. All assays were repeated three times, and all values are means of three replicates. Asterisk (**) indicates a difference at $P < 0.05$ level

平呈现各自不同的变化趋势,但是变化幅度总体较小。Wang等(2012)在研究柞柳*TaeIF5A1*对胁迫的响应时发现其在对ABA、高盐 and 重金属处理时,*TaeIF5A1*表达量变化幅度在5倍以上(Wang et al., 2012),因此推测*PtoeIF5A4*可能未参与ABA、NaCl、干旱和低温胁迫的响应。因此,本研究的结果难以明确推测该基因在杨树中是否响应逆境胁迫。

茎的发育直接体现了林木植物的次生长与发育,而本研究结果表明*PtoeIF5A4*在茎中的表达水平最高,且其表达水平随时间的变化逐渐升高,生长12个月的杨树茎次生木质部中*PtoeIF5A4*的表达水平是移栽1个月的4倍,且在12个月后该基因表达水平趋于稳定。根据该结果可初步推测*PtoeIF5A4*可能在林木次生长中起关键作用。

3 材料与amp;方法

3.1 材料

实验材料的盆栽毛白杨(*Populus tomentosa* Carr. cv BJHR01)取自温室生长时间为1、2、3、4和6个月的幼苗;田间毛白杨取自苗圃生长时间为12和24个月的杨树。

3.2 试剂

植物总RNA提取试剂盒购自Tiangen公司; cDNA反转录试剂盒购自美国Invitrogen公司; Phusion高保真DNA聚合酶购自美国Thermo公司; pGEM-T Easy载体和DNA回收试剂盒购自美国Promega公司; 3'RACE试剂盒和SYB Green I荧光定量PCR试剂盒购自日本Takara公司。

3.3 毛白杨总RNA提取和cDNA的合成

取生长2个月盆栽毛白杨幼苗的幼根、茎和叶片为材料,按照Tiangen植物总RNA提取试剂盒的操作要求提取总RNA,电泳检测RNA完整性,然后使用Invitrogen公司的反转录试剂盒合成cDNA。

3.4 *PtoeIF5A4*基因的克隆

使用Takara公司3'RACE试剂盒进行3'RACE扩增*PtoeIF5A4*的3'UTR序列。采用同源克隆的策略,通过已公开的毛果杨序列信息分析获取*PtoeIF5A4*基因的序列,根据此序列分别在5'和3'端非翻译区设计引物,以2个月毛白杨幼苗总cDNA为模板克隆*PtoeIF5A4*基因,先以外侧引物进行扩增:

F: 5'-TGTCCTCTTCTGTCTCGAG-3';

R: 5'-TCCATGACATGCCTTGCG-3'。

PCR扩增体积为20 μ L: 5 \times Phusion HF Buffer (Mg^{2+}) 4.0 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 1.6 μ L, 2 U/ μ L Phusion DNA聚合酶0.1 μ L, 10 μ mol/L上、下游引物各1.0 μ L, DNA模板2.0 μ L, ddH₂O 10.3 μ L。PCR扩增条件为: 98 $^{\circ}$ C预变性30 s, 98 $^{\circ}$ C变性10 s, 55 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸50 s, 72 $^{\circ}$ C总延伸10 min, 30个循环;第一轮PCR结束后,将PCR产物按照DNA回收试剂盒纯化回收,然后以纯化的DNA为模板,使用内侧引物(F: 5'-CGAGAGAGAACCGAACCAAC- 3'; R: 5'-GTTGTACACAACGCATAGTGG- 3')进行第二轮PCR, PCR扩增体积为20 μ L: 5 \times Phusion HF Buffer (Mg^{2+}) 4.0 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 1.6 μ L, 2 U/ μ L Phusion DNA聚合酶0.1 μ L, 0.1 μ L, 10 μ mol/L上、

下游引物各 1.0 μL , DNA 模板 2.0 μL , ddH₂O 12.3 μL 。PCR 扩增条件为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 总延伸 10 min, 30 个循环。1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 溴化乙锭染色, 紫外凝胶成像仪观察照相。克隆出的片段连接到 T 载体上, 测序委托上海英骏生物技术公司完成。

3.5 毛白杨 *PtoeIF5A4* 的生物信息学分析

用 NCBI 数据库中的 blast 软件进行序列比对。用 ProtParam 程序预测蛋白质的分子量和等电点。用 DNAMAN 和 ClustalW 软件进行同源序列比对, 采用 MEGA4.0 软件中的邻接法(Neighbor-joining)构建进化树, 通过 Bootstrap 作置信度检, 次数为 1000 次。

3.6 实时荧光定量 PCR 检测 *PtoeIF5A4* 在胁迫处理下表达特异性

取 6 个月的温室盆栽毛白杨幼苗分别进行 ABA (200 $\mu\text{mol/L}$)、NaCl (300 mmol/L)、低温(4 $^{\circ}\text{C}$) 和干旱处理(Chen et al., 2009), 每个处理 3 次重复且每次取 5 株, 分别在 0、1、3、6、12 和 24 h 取成熟叶片提取 RNA。选取毛白杨 *PtoActin9* 基因做为内参基因, 参照毛果杨 *PtrActin9* 基因的序列, 利用 Primer3 设计 *PtoeIF5A4* (3'端非翻译区)和 *PtoActin9* 基因的特异性引物:

PtoActin9F: 5'-TTGCTGACCGTATGAGCAAG-3';

PtoActin9R: 5'-AATCCACATCTGCTGGAAGG-3'.

PtoeIF5A4F: 5'-TGTCATGGGGGTGGAAGAGGACACAG-3';

PtoeIF5A4R: 5'-AAGTAGCTCAGACAAATGTGAAG-3'.

以经不同处理的毛白杨叶片的 cDNA 为模板, 使用 ABI 公司 StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 仪进行实时定量反应。每次试验各种处理均设 3 个重复, 实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL : RT 产物 1.0 μL , 2 \times Premix 10 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 0.4 μL , Rox 0.4 μL , ddH₂O 7.8 μL 。方法参照 Takara 公司荧光定量试剂盒说明书, 反应条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 1 min, 40 个循环, 根据每个反应得到的 Ct 值, 利用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 相对定量法计算 *PtoeIF5A4* 的相对表达量。

3.7 实时荧光定量 PCR 检测 *PtoeIF5A4* 组织表达特异性分析

取生长 6 个月的温室盆栽毛白杨幼苗的幼根、

茎(将茎杆的树皮剥掉, 刮取次生木质部)和成熟叶片为材料, 分别提取 RNA, 经反转录 cDNA 后, Real-time PCR 检测 *PtoeIF5A4* 在毛白杨的各个组织中的表达情况, 具体方法同 3.6(胁迫处理)。

3.8 实时荧光定量 PCR 检测 *PtoeIF5A4* 不同生长阶段表达特异性分析

取 1、2、3 和 4 个月的盆栽毛白杨幼苗的和 12 和 24 个月的田间毛白杨为材料, 分别取其距离地面三分之一处的茎, 其中 12 和 24 个月的茎的取材方法同 3.7, 分别提取 RNA, 经反转录 cDNA 后, Real-time PCR 分析 *PtoeIF5A4* 在不同发育时期茎中的表达情况。

参考文献

- Benne R and Hershey J W, 1978. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 253 (9): 3078~3087
- Chen J H, Xia X L and Yin W L, 2009. Expression profiling and functional characterization of a *DREB2*-type gene from *Populus euphratica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378(3): 483~487
- Chou W C, Huang Y W, Tsay W S, Chiang T Y, Huang D D and Huang H J, 2004. Expression of genes encoding the rice translation initiation factor, eIF5A, is involved in developmental and environmental responses. *Physiologia Plantarum*, 121(1): 50~57
- Dias C A, Cano V S, Rangel S M, Apponi L H, Frigieri M C, Muniz J R, Garcia W, Park M H, Garratt R C, Zanelli C F and Valentini S R, 2008. Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. *FEBS Journal*, 275(8): 1874~1888
- Dias C A, Gregio A P, Rossi D, Galvao F C, Watanabe T F, Park M H, Valentini S R and Zanelli C F, 2012. eIF5A interacts functionally with eEF2. *Amino Acids*, 42(2~3): 697~702
- Duguay J, Jamal S, Liu Z, Wang T W and Thompson J E, 2007. Leaf specific suppression of deoxyhypusine synthase in *Arabidopsis thaliana* enhances growth without negative pleiotropic effects. *Journal of Plant Physiology*, 164(4): 408~420
- Feng H, Chen Q, Feng J, Zhang J, Yang X and Zuo J, 2007.

- Functional characterization of the *Arabidopsis* eukaryotic translation initiation factor 5a-2 that plays a crucial role in plant growth and development by regulating cell division, cell growth, and cell death. *Plant Physiology*, 144(3): 1531~1545
- Gregio A P, Cano V P, Avaca J S, Valentini S R and Zanelli C F, 2009. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 380(4): 785~790
- Jao D L and Chen K Y, 2006. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(3): 583~598
- Kaiser A, 2012. Translational control of eIF5A in various diseases. *Amino Acids*, 42(2-3): 679~684
- Lee S B, Park J H, Folk J E, Deck, J A, Pegg, A E, Sokabe, M, Fraser, C S and Park, M H, 2011. Inactivation of eukaryotic initiation factor 5A(eIF5A) by specific acetylation of its hypusine residue by spermidine/spermine acetyltransferase 1 (SSAT1). *Biochemistry Journal*, 433(1): 205~213
- Li C H, Ohn T, Ivanov P, Tisdale S and Anderson P, 2010. eIF5A promotes translation elongation, polysome disassembly and stress granule assembly. *PLoS One*, 5(4): e9942
- Liu Z, Duguay J, Ma F, Wang T W, Tshin R, Hopkins M T, McNamara L and Thompson J E, 2008. Modulation of eIF5A1 expression alters xylem abundance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 59(4): 939~950
- Ma F, Liu Z, Wang T, Hopkins M T, Peterson C and Thompson J E, 2010. *Arabidopsis* eIF5A3 influences growth and the response to osmotic and nutrient stress. *Plant, Cell and Environment*, 33,(10): 1682~1696
- Ma Y, Miura E, Ham B K, Cheng H W, Lee Y J, Lucas W J, 2010. Pumpkin eIF5A isoforms interact with components of the translational machinery in the cucurbit sieve tube system. *Plant Journal*, 64(3): 536~550
- Park M H, Nishimura K, Zanelli C F and Valentini S R, 2010. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids*, 38(2): 491~500
- Saini P, Eylar D E, Green R and Dever T E, 2009. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature*, 459(7243): 118~121
- Tuskan G A, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, et al., 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313(5793): 1596~1604
- Wang L, Xu C, Wang C and Wang Y, 2012. Characterization of a eukaryotic translation initiation factor 5A homolog from *Tamarix androssowii* involved in plant abiotic stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 118(1): 1471~2229
- Wang T W, Lu L, Zhang C G, Taylor C and Thompson J E, 2003. Pleiotropic effects of suppressing deoxyhypusine synthase expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 52(6): 1223~1235
- Wang T W, Zhang C G, Wu W, Nowack L M, Madey E and Thompson J E, 2005. Antisense suppression of deoxyhypusine synthase in tomato delays fruit softening and alters growth and development. *Plant Physiology*, 138(3): 1372~1382
- Xu J, Zhang B, Jiang C and Ming F, 2011. RceIF5A, encoding an eukaryotic translation initiation factor 5A in *Rosa chinensis*, can enhance thermotolerance, oxidative and osmotic stress resistance of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 75(1-2): 167~178
- Zanelli C F and Valentini S R, 2007. Is there a role for eIF5A in translation?. *Amino Acids*, 33(2): 351~358
- Zanelli C F, Maragno A L, Gregio A P, Komili S, Pandolfi J R, Mestriner C A, Lustrri W R and Valentini S R, 2006. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 348(4): 1358~1366