

## 银鲫两个蛋白合成相关基因全长 cDNA 的克隆及其特征分析

刘 军 石耀华 尹 隽 桂建芳

(中国科学院水生生物研究所;淡水生态与生物技术国家重点实验室,武汉 430072)

**摘要:**通过构建雌核发育银鲫心跳期 SMART cDNA 质粒文库并从文库中随机挑选克隆测序,克隆得到银鲫翻译起始因子 3 亚单位 2(GTIF3-S2)和翻译延伸因子 1 亚单位  $\alpha$ (GEF-1 $\alpha$ )基因全长 cDNA。银鲫翻译起始因子 3 亚单位 2 基因 cDNA 全长 1280bp,开放阅读框位于 117—1091bp 之间,编码 325 个氨基酸。其推断的氨基酸序列存在三个 WD 结构域。该基因在鱼类中为首次报道。银鲫翻译延伸因子 1 亚单位  $\alpha$  基因 cDNA 全长 1784bp,开放阅读框位于 82—1467bp 之间,编码 462 个氨基酸。RT-PCR 表明,这两个基因在成熟卵母细胞和胚胎发育早期可以检测到少量的转录产物,在胚胎发育期间从原肠期开始转录,并随着发育进程逐渐增强。成鱼组织中除精巢表达较弱外,其他组织都表达较强。同源分析比较表明,TIF3-S2 和 EF-1 $\alpha$  在物种进化过程中具有高度的进化保守性,在物种间的同源性很高。因此,作者认为,这两个基因是研究物种间系统发育的优良对象。

**关键词:** 银鲫;起始因子;延伸因子;基因克隆;表达特征

**中图分类号:** Q173 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)05-0512-009

蛋白质合成是细胞活动的重要生物学过程,它在核糖体上进行,是生物遗传信息传递的最后步骤。蛋白质生物合成分为起始、延伸和终止三个阶段,合成的每一步都是在多种相关蛋白因子作用下完成的<sup>[1]</sup>。由于蛋白质的生物合成是生活细胞最基本的生命活动之一,与此相关的因子在物种进化过程中应具有高度的保守性,并可能调节个体的胚胎发育。克隆编码这些因子基因的全长 cDNA、研究它们在胚胎发育过程中以及成体组织的表达特性是进一步揭示其生物学功能的基础。

银鲫 (*Carassius auratus gibelio* Bloch) 是一种可进行雌核发育生殖的天然多倍体鱼类<sup>[1,2]</sup>,但与其他雌核发育物种相比有两个显著的特点:一是其天然群体中存在 5%—20% 的雄性个体<sup>[3,4]</sup>;二是已发现它有针对性对银鲫雄鱼同源精子和其他鱼类的异源精子不同的生殖应答方式<sup>[5-7]</sup>。因此,银鲫被认为是鱼类进化遗传学和发育生物学研究的良好对象<sup>[8,9]</sup>。

通过构建雌核发育银鲫心跳期 SMART cDNA 质粒文库,并在对 SMART cDNA 质粒文库随机测序获得

大量 cDNA 全长序列的基础上,克隆到银鲫翻译起始因子 3(TIF3)亚单位 2 和翻译延伸因子 1 亚单位  $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )全长 cDNA,接着对它们在银鲫胚胎发育以及银鲫成鱼组织中的表达特征进行了研究,并比较分析了它们在物种间的进化保守性。现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 银鲫及其胚胎** 雌核发育银鲫取自水生所大桥试验基地。按文献报道的方法对实验鱼进行人工催产并诱导雌核发育<sup>[10]</sup>。取不同发育时期的胚胎进行实验。各种组织,包括脑、心、肝、脾、肾、卵巢和精巢均取自一龄鱼。

**1.2 总 RNA 的提取和 mRNA 的纯化** 用三氟乙酸铯盐(CsTFA)密度梯度超速离心提取总 RNA,用生物素标记的寡聚(dT)探针和链亲合素包裹的磁珠纯化 mRNA,步骤详见 RNA Extraction Kit (Pharmacia) 和 PolyAtract mRNA Isolation System(Promega)操作手册。

**1.3 SMART cDNA 合成及 SMART cDNA 质粒文库的构建** 按 Clontech SMART PCR Synthesis Kit 合成了银鲫心跳期 SMART cDNA。将银鲫心跳期

收稿日期:2003-03-18;修订日期:2003-04-22

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30130240);中国科学院知识创新工程重要方向项目(KSCX2-SW-303);中国科学院水生生物研究所知识创新工程领域前沿项目(220309)资助

作者简介:刘 军(1967—),男,湖北南漳县人;博士研究生;研究方向:鱼类发育遗传学

通讯作者:桂建芳,E-mail: jfgui@ihb.ac.cn, Fax: +86-27-87875132

SMART cDNA 连接到 pGEM-T 载体 (Promega), 并将连接产物转化大肠杆菌 JM109, 在 X-gal/IPTG 琼脂平板上挑取白色菌落, 从而得到银鲫心跳期 SMART cDNA 质粒文库。

**1.4 RT-PCR 分析基因在不同胚胎发育时期和成鱼组织的表达** 用 SV Total RNA Isolation System (Promega) 提取银鲫不同胚胎发育时期和不同组织总 RNA, 用 Super Script II 逆转录酶 (GIBCO) 和随机引物 (5' NNNNN-C3', N = G, A, T, C) 合成单链 cDNA。用基因的正向引物和反向引物进行 PCR, 以

银鲫的  $\alpha$ -tubulin 基因作为对照。

## 2 结果

### 2.1 银鲫翻译起始因子 3 亚单位 2 全长 cDNA 的克隆

从银鲫心跳期 SMART cDNA 质粒文库随机挑选克隆测序, 其中一个克隆的推断氨基酸序列与其他物种的翻译起始因子有较高的同源性, 被称为银鲫翻译起始因子 3 亚单位 2 (gibel carp translation initiation factor 3 subunit 2, GTIF3-S2)。

图 1 是 GTIF3-S2 全长 cDNA 及其推断的氨基酸

```

1      ACGCGGGGTCGTTTATAACCGGGAGCAGTTGAGCACGCGTACGGCGCGCTGTTGTT
57     TTCCTACGGCAGATTTAAATATAATTTCTGTTATATTCTGTCGATACAAAACCGGAGATA
117    ATGAGACCGATTCTGCTCCAGGGCCAGGAGGTCATCACCCAGATCAAATACAACAGG
      M R P I L L Q G H E R S I T Q I K Y N R
177    GAAGGAGATCTCTTGTCTCAGTAGCCAAGAATCCAATTGCGAATGTGTGGTACTCGGTC
      E G D L L F S V A K N P I A N V W Y S V
237    AATGGAGAAAGGCTCGGCACCTTACAATGGACACACGGGGGCCGTCTGGTGTGTGGATGTC
      N G E R L G T Y N G H T G A V W C V D V
297    GACTGGGACACCAAGAACGTATTGACGGGATCTGCTGATAACAGCTGCAGGCTCTGGGAC
      D W D T K N V L T G S A D N S C R L W D
357    TCGAGACAGGAAAGCAGCTGGCTCTGCTGGAGACGAACTCGGGCGGTGAGGACGTGTGGC
      C E T G K Q L A L L E T N S A V R T C G
317    TTTGACTTCAGTGGGAACATCATATGTTCTCCACAGACAAGCAGATGGGCTACCAGTGC
      F D F S G N I I M F S T D K Q M G Y Q C
477    TTTCTCAACTATTTTGACCTGCGAGACCCCAACAGATCGAGGACAACCAGCCGTATCTG
      F L N Y F D L R D P Q Q I E D N Q P Y L
537    TCTGTGCCCTGCAATGAGTCAAAGATCACCAGCGCTGTGTGGGGTCCACTGGGAGAGTTT
      S V P C N E S K I T S A V W G P L G E F
597    GTGATTGCCGACATGAGAATGGAGAAATTAACCAGTTCAGTGCTAAGTCAGGGGAGATT
      V I A G H E N G E I N Q F S A K S G E I
657    TTGAAGACTGCAAAGGAGCACACAAAACAGATCAATGACATCCAGTCGTCTGTGGATCTC
      L K T A K E H T K Q I N D I Q S S V D L
717    ACCATGCTCATCAGTGCCTCCAAGGACTGTACAGCCAAGATGTTCCGACTCCACAAGCCTC
      T M L I S A S K D C T A K M F D S T S L
777    GAGCACATCAAAAACCTTCAAGACGGAGCGACCGTTAACTCCGCCCATCTCGCCATC
      E H I K T F K T E R P V N S A A I S P I
837    ATGGACCATGTGGTGATGGGAGGTGGTCAGGAGGCCATGGAAGTCACAACCACCTCTACG
      M D H V V M G G G Q E A M E V T T T S T
897    AGGATCGGTAAATTCGAGGCCAGGTTCCTCCATGCAGCTTATGAAGAGGAGTTTGGCCGC
      R I G K F E A R F F H A A Y E E F G R
957    GTGAAGGGACACTTCGGCCCAATTAACCTGCGTGGCCTTCCACCCAGATGGGAAAAGTTAC
      V K G H F G P I N C V A F H P D G K S Y
1017   AGCAGTGGAGGAGAGGATGGTTACACCCGAATTCATTACTTTGATCCCCAGTATTTTGAT
      S S G G E D G Y T R I H Y F D P Q Y F D
1077   TTTGAGCTCGAGGCGTAATAACCAAGGACAGATCATCATCTGAACACAATAGTAACACCTG
      F E L E A STOP
1137   ATCCACTTCACAAGGCTGAACATGGAGGTTGTGTTATACAGTGATCTTCATACAAATATT
1197   GCATTTAACTGATATATAATGAATGGAACATTATGAATAAACTGGGTTTGAGCCAAAAA
1257   AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 GTIF3-S2 全长 cDNA 及其推断的氨基酸序列, 多聚腺苷酸加尾信号用黑体字母标出。三个 WD 结构域用下划线标出

Fig.1 GTIF3-S2 full length cDNA and its deduced amino acid sequence. The poly(A+) signal is marked in bold. Three WD domains are underlined

序列。它全长 1280bp, 开放阅读框位于 117—1091bp 之间, 编码 325 个氨基酸。3' 端有多聚腺苷酸加尾信号和多聚腺苷酸尾。3' 非编码区较短, 仅 189bp。其推断的氨基酸序列存在三个 WD 结构域。Blastx 表明, 该基因推断的氨基酸序列与鼠、人的翻译起始因

子 3 亚单位 2 同源性较高, 分别为 84% 和 83%。

### 2.2 银鲫翻译延伸因子 1 亚单位 $\alpha$ 全长 cDNA 的克隆

从 SMART cDNA 质粒文库随机挑选克隆测序, 其中一个克隆的推断氨基酸序列与其他物种的翻译延伸因子 1 亚单位  $\alpha$  有很高的同源性, 被称为银鲫

翻译延伸因子1亚单位 $\alpha$ (gibel carp translation elongation factor 1 alpha, GEF-1 $\alpha$ )。

图2是 GEF-1 $\alpha$  的全长 cDNA 及其推断的氨基酸序列。它全长 1784bp, 开放阅读框位于 82—1467bp 之间, 编码 462 个氨基酸。CD-search 表明, 该蛋白分为三个区域, 5—240 位氨基酸为 GTP 结合

结构域(GTP binding domain), 内含一个 P-loop 结构, 251—327 位氨基酸为 aa-tRNA 结合区, 333—442 位氨基酸为 C-端结构域, 该结构域也参与 aa-tRNA 的结合。GEF-1 $\alpha$  推断的氨基酸序列与金鱼、斑马鱼同源基因的氨基酸序列同源性分别高达 99% 和 98%, 与两栖类爪蟾略低, 为 92%。

```

1                               ACGCGGGGCTCTTTCTGTTAC
22  CTGGCAAAGGGGAGCAGCAGCTTCTGAGGAGTGATCTTTTCGATCTTGAACCGATCAATC
82  ATGGGAAAGGAAAAGACCCACATCAACATCGTGGTTATTGGCCACGTCGACTCCGGAAAG
    M G K E K T H I N I V V I G H V D S G K
142  TCCACCACCAGCCGCTTTGATCTACAAATGCGGTGGAATCGACAGGAGAACCATCGAG
    S T T T G H L I Y K C G G I D R R T I E
202  AAGTTCGAGAAGGAAGCTGCCGAGATGGGCAAGGGCTCCTTCAAGTATGCCTGGGTGTTG
    K F E K E A A E M G K G S F K Y A W V L
262  GACAACTGAAGGCTGAGCGTGAACGTGGTATCACCATCGACATTGCTCTCTGAAATTT
    D K L K A E R E R G I T I D I A L W K F
322  GAGACCAGCAAGTACTACGTACCATCATTTGATGCCCTGGGCACAGACTTCATCAAG
    E T S K Y Y V T I I D A P G H R D F I K
382  AACATGATCACTGGTACTTCTCAGGCTGACTGTGCCGTGCTGATTGTTGCCGGTGGTGT
    N M I T G T S Q A D C A V L I V A G G V
442  GGTGAGTTTGAAGGCTGGTATCTCGAAGAACGGACAGACCCGCGAGCATGCCCTCCTGGCT
    G E F E A G I S K N G Q T R E H A L L A
502  TTCACCTGGGAGTCAAACAGCTTATTGTTGGAGTCAACAAGATGGACTCCACCGAGCCC
    F T L G V K Q L I V G V N K M D S T E P
562  CCTTACAGCCAGGCTCGTTTTGAGGAAATCACCAAGGAAGTCAGTGCTTACATCAAGAAG
    P Y S Q A R F E E I T K E V S A Y I K K
622  ATCGGTACAACCCTGCCAGTGTTCGCTCCCAATTTCTGGATGGCATGGGGACAAC
    I G Y N P A S V A F V P I S G W H G D N
682  ATGCTGGAGGCCAGCTCAAATATGGGCTGGTTC AAGGGATGGAAGATTGAGCGCAAGGAG
    M L E A S S N M G W F K G W K I E R K E
742  GGTAAATGCAAGTGGTGTCACTCTTCTTGATGCCCTGGATGCCATTTTGGCCCTAGCCGT
    G N A S G V T L L D A L D A I L P P S R
802  CCCACTGACAAGCCCCTCGTCTGCCACTTCAGGATGTCTACAAAATTGGAGGTATTGGA
    P T D K P L R L P L Q D V Y K I G G I G
862  ACTGTGCCCGTGGGCCGTGTGGAGACTGGCGTCTCAAGCCTGGTATGGTTGTGACCTTT
    T V P V G R V E T G V L K P G M V V T F
922  GCCCCTGCCAACTTGACCACTGAGGTGAAGTCTGTTGAGATGCACCATGAATCTCTTGCT
    A P A N L T T E V K S V E M H H E S L A
982  GAGGCCACTCCTGGTGACAACGTTGGCTTCAACGTTAAGAAGTGTCTGTCAAGGATC
    E A T P G D N V G F N V K N V S V K D I
1042  CGCCGTGGTAACGTGGCTGGAGACAGCAAGAACGACCCCTATGGAGGCCGGCAGCTTC
    R R G N V A G D S K N D P P M E A G S F
1102  AACGCTCAGGTCATCCTGAACCACCTGGTCCAGATCTCTCAGGGCTATGCCCCAGTG
    N A Q V I I L N H P G Q I S Q G I A P V
1162  CTGGACTGCCCACTGCTCACATCGCCTGCAAGTTTGTGAGCTCAAGGAGAAGATTGAT
    L D C H T A H I A C K F A E L K E K I D
1222  CGTCGTTCTGGCAAGAAGCTTGAGGACAACCCCAAGGCTCTCAAATCTGGAGATGCTGCC
    R R S G K K L E D N P K A L K S G D A A
1282  ATTGTTGAAATGATCCCTGGCAAGCCCATGTGTGTGGAGAGCTTCTACCTACCCCT
    I V E M I P G K P M C V E S F S T Y P P
1342  CTTGGTTCGCTTTGCTGTTTCGTGACATGAGGCAGACCGTAGCTGTTGGTGTCAAGAGC
    L G R F A V R D M R Q T V A V G V I K S
1402  GTTGAGAAGAAAGTTGGTGGTTCTGGCAAGGTCACGAAGTCCGCACAGAAGGCTGCCAAG
    V E K K V G G S G K V T K S A Q K A A K
1462  ACCAAGTGAAATTCCTTTCATCACACTGTTCCAAAGGTTGTGGTACGTTCTTCCCAACCT
    T K STOP
1522  CGTGGAAATTTCTCTAAACCTGGGCACTCTACTTAAGGACTGGCTAATGCTGATTAACC
1582  CATCGAAGAAATTTTCGAGGAAAGGAAACCAACTTGGATTTAAGTGTGGCTCCACTTAT
1642  TGACTGATAGTGCCTCTTTTCAGTTATTAATTTGTGTTAATGGTTTAGAACTGCACCTGT
1702  TTCCACAGTAAAATTTGAAAGAAGCTGCTGAATAAGAACTAATAAAAAGTCCCAAAA
1762  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图2 GEF-1 $\alpha$  全长 cDNA 及其推断的氨基酸序列, 多聚腺苷酸加尾信号用黑体字母标出

Fig.2 GEF-1 $\alpha$  full length cDNA and its deduced amino acid sequence. The poly (A+) signal is shown in bold

## 2.3 GTIF3-S2、GEF-1 $\alpha$ 在银鲫胚胎发育和成鱼组织的表达分析

RT-PCR 表明,GTIF3-S2 在胚胎发育中呈现差异表达。在成熟卵母细胞和胚胎发育早期可以检测到少量表达产物,在胚胎发育期间从原肠期开始转录,并随着发育进程逐渐增强(图 3)。成鱼组织中除精巢表达较弱外,其他组织都表达较强(图 4)。

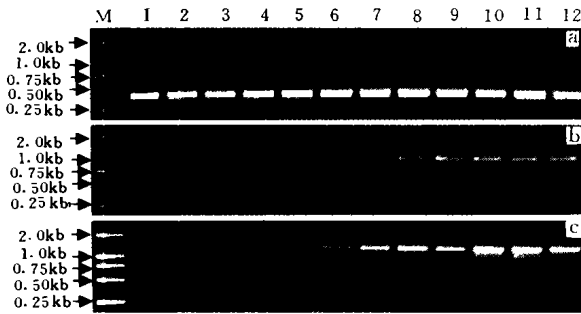


图 3 RT-PCR 检测 GTIF3-S2、GEF-1 $\alpha$  在银鲫卵子和胚胎不同发育时期的表达。注:以银鲫  $\alpha$ -tubulin 的扩增产物作对照。M DNA 标准分子量 DL 2000。a  $\alpha$ -tubulin, b GTIF3-S2, c GEF-1 $\alpha$  1 卵子,2 受精 40min,3 多胞期,4 桑椹期,5 囊胚期,6 原肠期,7 神经胚期,8 尾芽期,9 肌效期,10 心跳期,11 出苗前期,12 出苗期

Fig.3 RT-PCR analysis of GTIF3-S2 and GEF-1 $\alpha$  expression in gibel carp eggs and embryos at different stages. Notes: gibel carp  $\alpha$ -tubulin is used as contrast. M DL 2000 molecular weight marker. a  $\alpha$ -tubulin, b GTIF3-S2, c GEF-1 $\alpha$ ; 1 eggs,2 40 minutes after fertilization, 3 multiple-cellular stage. 4 morula, 5 blastula, 6 gastrula, 7 neurula, 8 tail bud, 9 muscle contraction, 10 heart beating, 11 hatching, 12 larvae

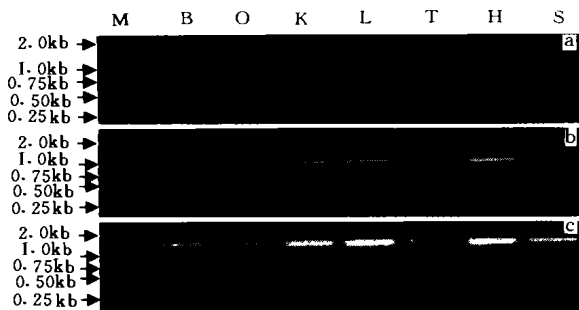


图 4 RT-PCR 检测银鲫 GTIF3-S2、GEF-1 $\alpha$  在不同成鱼组织的表达。注:a 银鲫  $\alpha$ -tubulin, b GTIF3-S2, c GEF-1 $\alpha$  M DL2000 molecular weight marker. B 脑, O 卵巢, K 肾脏, L 肝脏, T 精巢, H 心脏, S 脾脏

Fig.4 Expression analysis of gibel carp GTIF3-S2 and GEF-1 $\alpha$  in different tissues by RT-PCR. Notes: a  $\alpha$ -tubulin, b GTIF3-S2, c GEF-1 $\alpha$  M DL2000 molecular weight marker. RT-PCR was performed using total RNA from different tissues of brain (B), oocytes (O), kidney (K), testis (T), liver (L), heart(H), spleen(S)

GEF-1 $\alpha$  在胚胎发育中的表达模式与 GTIF3-S2

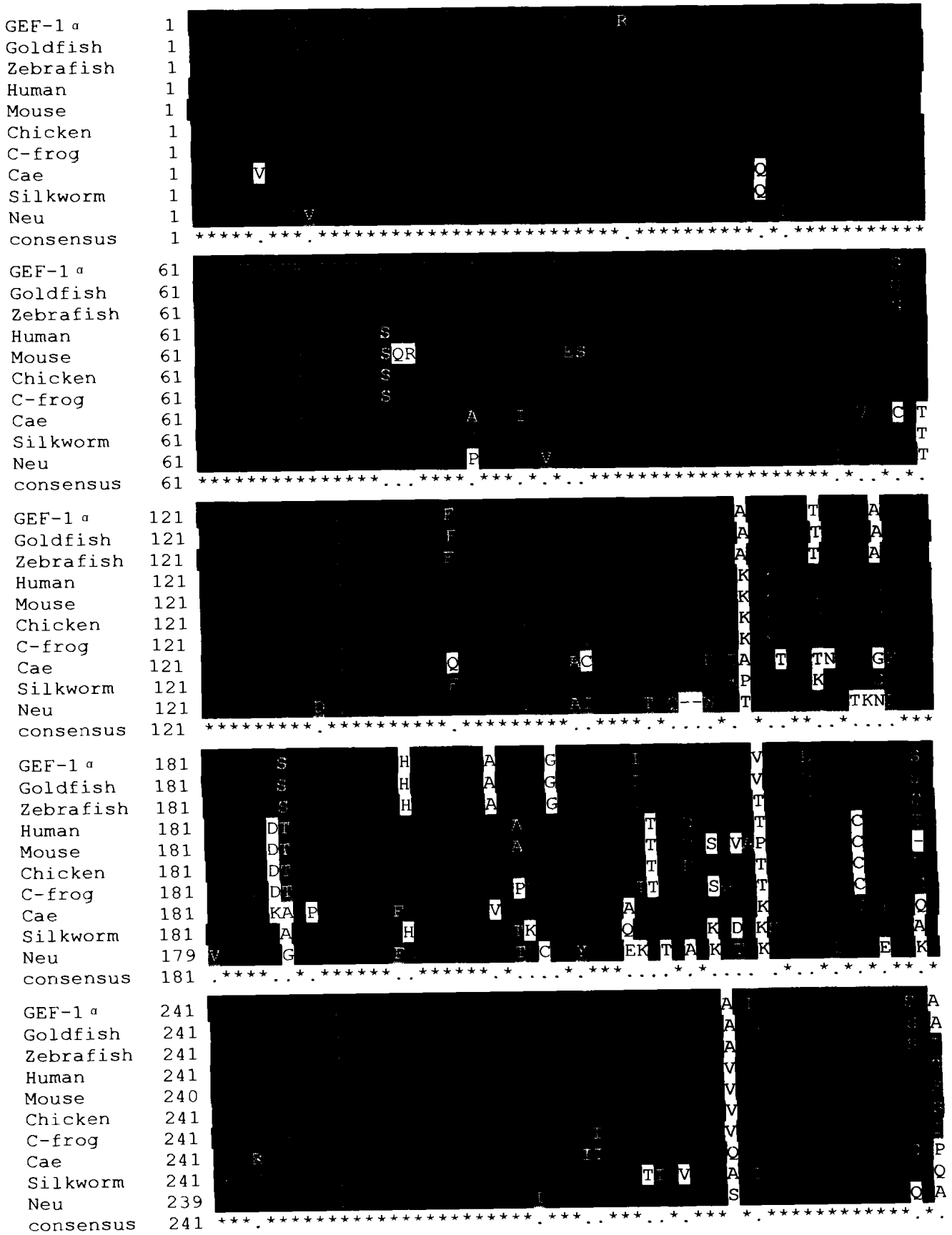
相似,在成熟卵母细胞和胚胎发育早期可以检测到少量表达产物,在胚胎发育期间从原肠期开始转录,并随着发育进程逐渐增强(图 3)。在成鱼组织也都表达,精巢表达也较弱(图 4)。

## 3 讨论

上述研究结果表明,GTIF3-S2 和 GEF-1 $\alpha$  在银鲫胚胎发育过程中是差异表达的,它们在成熟卵母细胞和胚胎发育早期都可以检测到少量的母源表达产物,在胚胎发育期间从原肠期开始转录,并随着发育进程逐渐增强。这种表达特征与它们的生理作用是一致的。因为在卵母细胞成熟期间,蛋白质合成仍没有停止,肯定需要蛋白合成翻译起始因子和延伸因子的参与,因而成熟卵子和早期胚胎中仍保留有一定的母源 mRNA。随着胚胎发育,胚胎结构与功能越来越复杂,需要合成新的蛋白来维持胚胎的发育进程和行使胚胎的生理功能。因此,如翻译起始因子和延伸因子等与蛋白质生物合成相关的基因在原肠期就开始转录表达。另外,组织 RT-PCR 表明,GTIF3-S2 和 GEF-1 $\alpha$  在成鱼精巢表达最弱,这与精巢特异的生理状态是一致的,因为大多数基因在精子中是不表达的,精子蛋白质含量较少,它的主要成分是 DNA<sup>[11]</sup>。与此相适应,在成熟精巢中,与蛋白质生物合成相关的成分也不需要大量表达。

同源分析比较表明,GTIF3-S2 和 GEF-1 $\alpha$  与其他物种的翻译起始因子和延伸因子在进化上具有高度的保守性,特别是 EF-1 $\alpha$  的保守性更强。GTIF3-S2 推断的氨基酸序列与家鼠、人、果蝇和裂殖酵母的翻译起始因子 3 亚单位 2 氨基酸序列的一致性分别为 84%、83%、60%和 49%(图 5)。GEF-1 $\alpha$  推断的氨基酸序列与金鱼、斑马鱼延伸生长因子 EF-1 $\alpha$  的一致性分别高达 99%和 98%;GEF-1 $\alpha$  与两栖类爪蟾、鸟类、鸡 EF-1 $\alpha$  的一致性均高达 91%;它与哺乳类人和鼠 EF-1 $\alpha$  的一致性为 90%;它与无脊椎动物家蚕、果蝇、线虫以及虾的一致性都在 85%左右;它与更低等的生物如粗糙链孢霉的 EF-1 $\alpha$  也有 82%的一致性(图 6)。延伸生长因子 EF-1 $\alpha$  高度的进化保守性在研究物种间亲缘关系方面很有价值,已有学者将延伸生长因子 EF-1 $\alpha$  用于种间亲缘关系研究<sup>[12-14]</sup>。因此,作者认为,在进化生物学方面,翻译起始因子和延伸因子是研究物种间系统发育的良好对象。





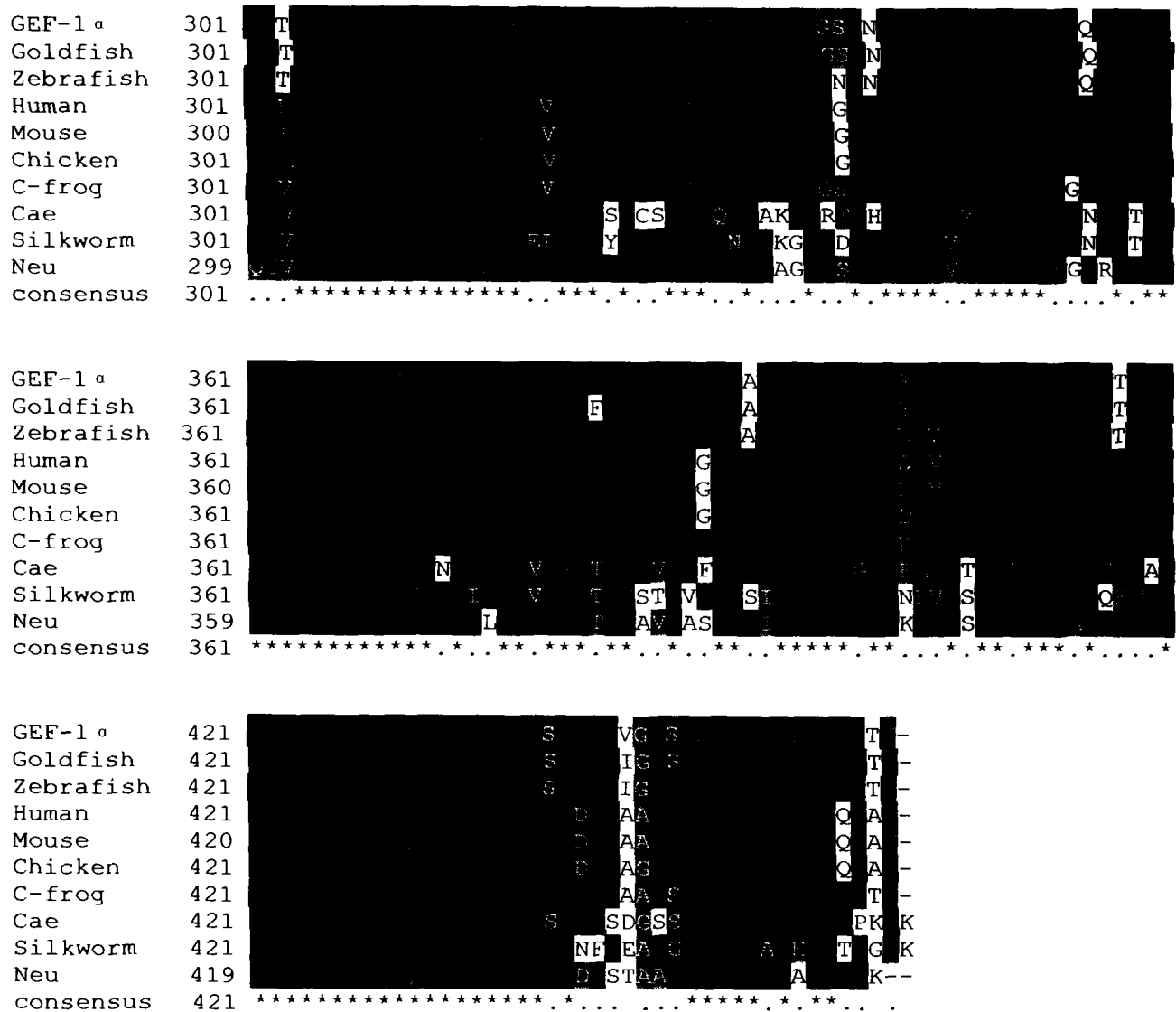


图 6 GEF-1α 与其他物种翻译延伸因子 1α 亚单位 (EF-1α) 的同源性比较。该图用 boxshade 生成。GEF-1α, Goldfish (AB056104. 1), zebrafish (X77689. 1), Human (BC018150. 1), Mouse (X13661.1), Chicken (I50226), C-frog (X55324.1), Cae (T16218), Silkworm (S35513) 和 Neu (D45873.1) 分别代表银鲫、金鱼、斑马鱼、人、鼠、鸡、爪蟾、线虫、家蚕和粗糙链孢霉相应的 EF-1α, 括号中的字符代表基因在 Genbank 的登录号

Fig.6 Amino acid sequence homology comparison of GEF-1α with EF-1α from other species. The figure is made by boxshade. GEF-1α, Goldfish (AB056104.1), Zebrafish (X77689.1), Human (BC018150.1), Mouse (X13661.1), Chicken (I50226), C-frog (X55324.1), Cae (T16218), Silkworm (S35513) and Neu (D45873.1) represent the corresponding translation elongation factor 1 α (EF-1α) of gibel carp, goldfish, zebrafish, human, mouse, chicken, African clawed frog, *Caenorhabditis elegans*, silkworm and *Neurospora crassa* respectively. The symbol in bracket represents the corresponding Genbank accession number

虽然许多物种延伸生长因子 EF-1α 都进行过研究,斑马鱼和金鱼等也有研究报道,但这些研究主要集中在其传统的功能,即参与蛋白生物合成方面。研究发现,EF-1α 基因表达是受发育调控的<sup>[15-17]</sup>,可能存在其他的功能,如参与细胞骨架重排的调节<sup>[18,19]</sup>;在蛋白质选择降解的泛素途径中起作用<sup>[20]</sup>;与钙调蛋白结合,进而影响钙信号传导途

径<sup>[21]</sup>等。因此,对 GEF-1α 有进一步研究的必要。IF3 为最复杂的翻译起始因子,其功能也了解最少。已经从哺乳类细胞、小麦胚芽、拟南芥、酵母中纯化出 eIF3<sup>[22]</sup>,鼠<sup>[25]</sup>、人<sup>[25]</sup>、酵母<sup>[25]</sup>、以及果蝇等 eIF3 亚单位 2 基因全长 cDNA 已经克隆,但未见鱼类蛋白翻译起始因子的报道。作为最先报道的鱼类翻译起始因子,GITF3-S2 值得进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] Clark B F C, Thirup S, Kjeldgaard M, *et al.* Structural information for explaining the molecular mechanism of protein biosynthesis [J]. *FEBS Letters*, 1999, **452**: 41—46
- [2] Zhou L, Gui J F. Karyotypic diversity in polyploid gibel carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch [J]. *Genetica*, 2002, **115**: 223—232
- [3] Jiang Y G, Liang S C, Chen B D, *et al.* Biological effect of heterologous sperm on gynogenetic offspring in *Carassius auratus gibelio* [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 1983, **8**(1): 1—13. [蒋一珪, 梁绍昌, 陈本德等. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应. 水生生物学报, 1983, **8**(1): 1—13]
- [4] Jiang Y G, Liang S C, Chen B D, *et al.* Artificial and natural gynogenesis in carp [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 1982, **7**(4): 471—477. [蒋一珪, 梁绍昌, 陈本德等. 鲫鱼的人工和天然雌核发育. 水生生物学报, 1982, **7**(4): 471—477]
- [5] Gui J F, Liang S C, Zhu L F, *et al.* Discovery of multiple tetraploids in artificially propagated populations of allogynogenetic silver crucian carp and their breeding potentialities [J]. *Chinese Sci. Bull.*, 1993, **38**: 327—331. [桂建芳, 梁绍昌, 朱蓝菲等. 异育银鲫人工繁育群体中复合四倍体的发现及其育种潜力. 科学通报, 1993, **38**: 327—331]
- [6] Gui J F, Liang S C, Zhu L F, *et al.* Discovery of two different responsive modes of eggs of artificially propagated multiple tetraploids allogynogenetic silver crucian carp on male parent sperms and maternal sperms [J]. *Chinese Sci. Bull.*, 1992, **37**(11): 1030—1033. [桂建芳, 梁绍昌, 朱蓝菲等. 人工复合四倍体异育银鲫卵子应答父本种精子和母本种精子两种不同发育方式的发现. 科学通报, 1992, **37**(11): 1030—1033]
- [7] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) [J]. *J Mol Evol*, 2000, **51**: 498—506
- [8] Gui J F. Retrospect and prospects of studies on the mechanism of natural gynogenesis in silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Bull Nat Nat Sci Found China*, 1997, **11**(1): 11—16. [桂建芳. 天然雌核发育机理研究的回顾与展望. 中国科学基金, 1997, **11**(1): 11—16]
- [9] Xin J, Wen J J, Chen B, Gui J F. Differential gene expression in fully-grown oocytes between gynogenetic and gonochoristic crucian carps [J]. *Gene*, 2001, **271**: 109—116
- [10] Wu Q J, Gui J F. Fish genetics and breeding engineering [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999. [吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程. 上海: 上海科学技术出版社, 1999]
- [11] Twyman R M. Instant Notes in Developmental Biology. London: BIOS Scientific Publishers Limited, 2002
- [12] Moriya S, Ohkuma M, Kudo T. phylogenetic position of symbiotic protist *Dinenympha* [correction of *Dinemypha*] *exilis* in the hindgut of the termite *Reticulitermes speratus* inferred from the protein phylogeny of elongation factor 1 alpha [J]. *Gene*, 1998, **210**: 221—227
- [13] Kamaishi T, Hashimoto T, Nakamura Y, *et al.* Protein phylogeny of translation elongation factor EF-1 alpha suggests microsporidians are extremely ancient eukaryotes [J]. *J Mol Evol*, 1996, **42**: 257—263
- [14] Shearer G Jr. Cloning and analysis of cDNA encoding an elongation factor 1 alpha from the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* [J]. *Gene*, 1995, **161**: 119—123
- [15] Hovemann B, Richter S, Walldorf U, *et al.* Two genes encode related cytoplasmic elongation factors 1 $\alpha$ (EF1- $\alpha$ ) in *Drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1998, **16**: 3175—3194
- [16] Mita K, Morimyo M, Ito K, *et al.* Comprehensive cloning of *Schizosaccharomyces pombe* genes encoding translation elongation factor [J]. *Gene*, 1997, **187**: 259—266
- [17] Dje M K, Mazabraud A, Viel A, *et al.* Three genes under different developmental control encode elongation factor 1 alpha in *Xenopus laevis* [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**: 3489—3493
- [18] Shiina N, Gotoh Y and Iwanatsu A. Microtubule severing by elongation factor 1 alpha [J]. *Science*, 1994, **266**: 282—285
- [19] Condeelis J. Elongation factor 1 alpha, translation and the cytoskeleton [J]. *Trends in Biochem. Sci.*, 1995, **20**: 169—170
- [20] Gonen H, Smith C E, Siegel N R, *et al.* Protein synthesis elongation factor EF1- $\alpha$  is essential for ubiquitin-dependent degradation of certain N-acetylated proteins and may be substituted for by bacterial elongation factor EF-Tu [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**: 7648—7652
- [21] Gao D, L Z F, Murphy T, *et al.* Structure and transcription of the gene for translation elongation factor 1 subunit alpha of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, **1350**: 1—5
- [22] Burks E A, Bezerra P P, Le H, *et al.* Plant initiation factor 3 subunit composition resembles mammalian initiation factor 3 and has a novel subunit [J]. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**: 2122—2131
- [23] Carninci P and Hayashizaki Y. High-efficiency full-length cDNA cloning [J]. *Meth. Enzymol.*, 1999, **303**: 19—44
- [24] Chen R H, Miettinen P J, Maruoka E M, *et al.* A WD-domain protein that is associated with and phosphorylated by the type II TGF-beta receptor [J]. *Nature*, 1995, **377**: 548—552
- [25] Wood V, Gwilliam R, Rajandream M A, *et al.* The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *Nature*, 2002, **415**: 871—880



## CLONING AND CHARACTERIZATION OF FULL LENGTH cDNAs OF TWO GENES RELATED TO PROTEIN BIOSYNTHESIS IN GYNOGENETIC GIBEL CARP

LIU Jun, SHI Yao-Hua, YIN Juan and GUI Jian-Fang

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology; Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

**Abstract:** The SMART cDNA plasmid library was constructed from heartbeat stage embryos of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). Randomly selected clones from the library were sequenced and their homologies were analyzed. The full length cDNAs of two genes related to protein biosynthesis were obtained from the sequenced clones. One gene, gibel carp translation initiation factor 3 subunit 2, was named GTIF3-S2. It is 1280 bp in length and has an open reading frame of 975 nucleotide acids for encoding 325 amino acids. The deduced amino acid sequence has three WD domains. The gibel carp GTIF3-S2 was first reported fish translation initiation factor 3 subunit 2. Another gene, gibel carp translation elongation factor 1 $\alpha$ , was named GEF-1 $\alpha$ . It is 1784 bp in length and has an open reading frame of 1386 nucleotide acids encoding 462 amino acids. The open reading frame is between 82—1467 bp. RT-PCR analysis showed that the maternal mRNAs of the two genes were detected in matured eggs and in early developmental embryos. In embryonic development, the two genes began to transcribe from gastrula stage, and their expressions became stronger as the embryos developed. The two genes were detected to express strongly in most of the examined tissues of gibel carp, but weaker expressions were found in testis. Homology analysis indicated that there exists high evolutionary conservation in gibel carp GTIF3-S2 and GEF-1 $\alpha$ . among different species, from animals to plants. Therefore, we conclude that gibel carp GTIF3-S2 and GEF-1 $\alpha$ . are two excellent target genes for studies on evolutionary genetics and systematics among species.

**Key words:** Gibel carp; Translation initiation factor; Translation elongation factor; Gene cloning; Expressional characterization