

文章编号: 0427-7104(2010)03-0273-07

月季 *eIF5A* 基因的表达提高毕氏酵母 高温和氧化胁迫的抗性

徐健遥^{1,2}, 蒋昌华^{1,2,3}, 石金磊^{1,2}, 明 凤^{1,2}

(1. 复旦大学 遗传学研究所, 上海 200433; 2. 复旦大学 植物学研究所, 上海 200433;

3. 上海植物园, 上海 200231)

摘 要: 对月季 (*Rosa chinensis*) 真核起始因子 5A 基因 (*RceIF5A*) 进行洋葱表皮亚细胞定位, 结果显示 *RceIF5A* 主要定位于细胞质中. 经 Southern 杂交分析得出该基因在月季基因组中为单拷贝. 用 RT-PCR 方法研究该基因在多种非生物胁迫下的表达模式, 初步推断该基因与高温、氧化和渗透胁迫有关. 将该基因转入真核模式生物毕氏酵母 (*Pichia pastoris*) SMD1168 中, 通过各种胁迫处理及生长势测定分析, 证明该基因的表达能够提高宿主菌的高温 and 氧化胁迫抗性.

关键词: *eIF5A*; 月季; 毕氏酵母; 高温抗性; 氧化胁迫; 胁迫抗性

中图分类号: Q 78

文献标志码: A

真核起始因子 5A (*eIF5A*) 是真核生物中目前发现的唯一一种含有特殊氨基酸残基 hypusine 的高度保守性蛋白质^[1]. 该 hypusine 残基是通过翻译后的两步修饰而成^[2], 参与这两步修饰的酶分别是 deoxyhypusine synthase (DHS) (EC 2.5.1.46) 和 deoxyhypusine hydroxylase (DHH) (EC 1.14.99.29)^[3]. 成熟的 *eIF5A* 是经过 hypusine 残基翻译后修饰才起作用^[4].

eIF5A 最早在哺乳动物的血红细胞中被发现, 因其能在体外实验中促进翻译起始阶段第一个肽键的形成, 因而被命名为翻译起始因子^[5]. 然而近期的研究发现 *eIF5A* 在细胞内其实主要参与翻译的延伸过程⁶⁻⁷. *eIF5A* 虽然在真核细胞中高度保守且组成型表达, 然而有研究表明敲除 *eIF5A* 基因的细胞的蛋白合成量仍能占同类正常细胞蛋白合成量的 70%^[8], 这说明 *eIF5A* 并非所有蛋白合成过程所必需的因子, 可能只在某些特殊代谢途径中合成蛋白时所需. 此外, *eIF5A* 还被发现作为一种核质穿梭蛋白从核内向胞质中转运某些特殊 mRNAs 并参与其翻译过程^[9-11].

在植物中, 已经克隆出 *eIF5A* 基因的物种有紫花苜蓿^[12]、烟草^[13]、玉米^[14-15]、番茄^[16]、水稻^[16-18] 和拟南芥^[19]. Wang 等人发现抑制拟南芥和番茄的 DHS 基因的表达能延缓植物的衰老^[19-20], 这意味着 *eIF5A* 有可能参与了植物细胞的程序性死亡途径. 拟南芥中已知有 3 个 *eIF5A* 同源基因^[19, 21], *AteIF5A-1* 被证明参与植物木质部的发育过程^[22], *AteIF5A-2* 则在细胞的生长发育及程序性死亡过程中均发挥关键作用²³⁻²⁴. 然而, 虽然 *eIF5A* 已经被证明参与翻译延伸, mRNA 转运以及细胞的生长发育和程序性死亡, 但在高等植物中, 对其生理生化功能的研究报道仍然甚少.

月季 (*Rosa chinensis*) 是蔷薇科的双子叶植物, 是目前世界上最重要的园艺和观赏性植物之一. 它不仅具有商业价值, 还有药用价值^[25]. 然而, 大多数月季品种的生长均易受不良环境影响, 如高温、干旱、化学物质胁迫等. 在这些胁迫环境下月季容易不开花而进入休眠期. 因此对于提高该类植物抗胁迫能力的研究具有重要的意义.

本实验室前期通过将 2 个不同胁迫抗性的月季品种 (“曼哈姆宫殿” 和 “新十全十美”) 进行高温处理并

收稿日期: 2009-12-14

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2008AA10Z116); 上海市科技启明星计划资助项目 (08QH14003); 上海市科委重点科技攻关资助项目 (08391910400)

作者简介: 徐健遥 (1986—), 男, 硕士研究生; 明 凤, 女, 副教授, 通讯联系人, E-mail: fming@fudan.edu.cn.

提取蛋白进行双向电泳分析,发现抗性品种“曼哈姆宫殿”在高温处理后其 eIF5A 的蛋白表达量显著上升^[26],而非抗性品种“新十全十美”则无诱导表达,因此推测 eIF5A 与高温等胁迫响应相关,于是克隆出该基因并在大肠杆菌中做原核表达证明其确实能提高重组菌的温度抗性^[27].本文则进一步研究该基因与各种胁迫的关系,证明该基因不但与温度胁迫相关,而且还与氧化和渗透胁迫有关.并且通过将该基因转到真核模式生物毕氏酵母(*Pichia pastoris*)中,在真核生物水平验证了 eIF5A 与胁迫的关系,为后期真正在植物和酵母中的研究及应用奠定基础.

1 材料与方法

1.1 洋葱表皮细胞瞬时表达实验

将前期克隆到的月季 *RceIF5A* 基因(Genbank 收录号 EF177192)ORF(开放阅读框)通过 PCR 的方法在 5'-端和 3'-端分别接上限制性内切酶酶切位点 *Sac*I 和 *Nco*I,然后连入 pC35SGFP 载体.取洋葱(*Allium cepa*)内表皮,切成方形小块(1 cm²左右),内表面向上平铺于 MS 培养基上(1×MS,3%蔗糖,2.5%琼脂粉,pH 5.8),放置 4 h 以备基因枪转化.制备基因枪子弹:5 μg 含目的基因的质粒 DNA,3 mg 钨粒(φ1.0 μm),50 μL 2.5 mol/L CaCl₂,20 μL 0.1 mol/L 亚精胺,混匀后用 70%乙醇洗涤,最后以无水乙醇重悬备用.基因枪转化后,将 MS 平皿于 28℃放置 12 h,再用细胞核染料 DAPI(1 mg/mL 4,6-diamidino-2-phenylindole)染色 5 min 后显微观察.基因枪型号: PDS-1000/He system (Scientz, 中国宁波).荧光显微镜型号: Olympus TH4-200(日本),摄图软件: Olympus Micro DPmanager.

1.2 Southern 杂交实验

CTAB 法提取月季(“曼哈姆宫殿”)基因组 DNA.各取 15 μg 基因组 DNA 分别用限制性内切酶 *Hind*III(*RceIF5A* ORF 序列中有此酶切位点)和 *Bgl*III(*RceIF5A* ORF 序列中无此酶切位点)做单酶切,酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离,然后转移至 Hybond-N⁺膜进行 Southern 杂交,探针为 *RceIF5A* 基因的 ORF 全长序列.探针标记、杂交及检测方法参照 Gene Images Random Prime Labeling (Amersham)试剂盒说明完成.

1.3 月季胁迫处理和 RT-PCR 实验

将月季(“曼哈姆宫殿”)组培苗移入土中培养一个月,然后经各种胁迫处理 3 h 后取叶片提总 RNA(“Plant RN Aout”试剂盒, TianDZ, 中国)用于 RT-PCR 实验.其中胁迫处理包括: 38℃高温胁迫,20 mmol/L H₂O₂, 500 mmol/L mannitol, 20% PEG-8000, 200 mmol/L NaCl, 30 mmol/L LiCl, 50 μmol/L CdCl₂.以上胁迫均用相应的溶液倒灌处理 3 h.用于逆转录的试剂盒为 PrimeScriptTM RT Reagent Kit (TaKaRa, 中国大连).用于 PCR 的 *RceIF5A* 基因特异引物: 5'-TGAGGCTTCCAACCGATGA-3'(位于 ORF 区域)和 5'-TGGTCCAGACAGTAAACAGAA-3'(位于 3'-UTR 区域);对照的月季 *ACTIN* 基因(*RcACTIN*)引物: 5'-TCTGGCATCATACCTTCTACA-3'和 5'-GGATGGCTGGAAGAGGAC-3'.PCR 反应体系均为 20 μL,程序均为: 94℃4 min, (94℃30 s, 55℃30 s, 72℃30 s)×28 个循环, 72℃7 min. PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶电泳分析.

1.4 载体构建及酵母细胞的转化

将月季 *RceIF5A* 基因 ORF 通过 PCR 的方法在 5'-端和 3'-端分别接上限制性内切酶酶切位点 *Bam*HI 和 *Not*I,与同样经 *Bam*HI、*Not*I 双酶切的酵母表达载体 pPIC3.5K(含甲醇诱导表达启动子)连接,目的片段插入甲醇诱导表达启动子的下游,构建成 pPIC3.5K-eIF5A 重组质粒.

通过酵母同源重组方法分别将线性化的 pPIC3.5K-eIF5A 和 pPIC3.5K 整合到毕氏酵母(*Pichia pastoris*)SMD1168.电击转化参数为: 1 500 V、25 μF、250 Ω.通过含 G418(终浓度为 3 g/L)的 YEPD 培养基进行筛选,并经基因组 PCR 鉴定后,获得含目的基因的毕氏酵母 SMD1168 阳性菌落.将筛选到的阳性重组子重新在无抗性的 YEPD 板上划线保种,长出菌落用于后续实验.

1.5 重组酵母的生长曲线制作及各种胁迫处理实验

分别挑取 YEPD 平板上生长的酵母重组子菌落(转 *RaeIF5A* 基因及空载),在 5 mL BMGY 液体培养基中,28℃250 r/min 摇菌过夜至 OD₆₀₀(上海菁华科技仪器公司 721 型可见光分光光度计测定)在 0.8~1.2 之间(约 10⁷ mL⁻¹).4 500 r/min 离心沉淀 5 min,去上清,菌体用等体积的 BMMY 液体培养基重悬.将重悬菌液

加到 50 mL BMMY(含 0.5% 甲醇, 诱导 pPIC3.5K-eIF5A 表达目的基因)中, 调 OD_{600} 至 0.05.

高温胁迫处理的生长势评价: 在 28 °C(正常温度)和 37 °C(高温胁迫)条件下分别诱导培养, 在 0~30h 过程中每 2 h 取 3 mL 菌液检测 OD_{600} 值. 28 °C 诱导 20 h 的菌液用于酵母的胁迫处理实验.

将 28 °C 诱导 20 h 的菌液取 1 mL, 按 10 的倍数逐级稀释 5 级, 然后从每级的稀释菌液中吸取 10 μ L 在 YEPD 培养基上点样. 培养基分别含以下胁迫物质(800 mmol/L NaCl, 600 mmol/L LiCl, 300 mmol/L CdCl₂), 28 °C 培养 3 d 后观察生长状况, 以检测两个菌株对不同胁迫的抗性, 胁迫浓度参考文献[28] .

2 结 果

2.1 月季 *RceIF5A* 的亚细胞定位分析

已有报道证明 eIF5A 参与核质穿梭过程^[9], 因此对其在亚细胞水平的定位研究有助于分析其在代谢途径中的功能. 本实验通过将月季 *RceIF5A* 基因序列插入植物表达载体 pC35SGFP 中构建成带有绿色荧光蛋白(GFP)的融合蛋白表达载体, 并通过基因枪的方法将载体打入洋葱表皮细胞进行瞬时表达分析. 如图 1(彩图见封 2)所示, 含有 pC35SGFP 空载的洋葱表皮细胞内(EV-GFP)的绿色荧光均匀分布于整个细胞中, 而含有 pC35SGFP-eIF5A 重组载体的洋葱表皮细胞经 DAPI 核染色后再观察荧光, 发现细胞内(RceIF5A-GFP)的绿色荧光并未出现在细胞核内, 而是分布在核外的某一区域. 由于经过 DAPI 液体染料染色, 整个洋葱表皮细胞的轮廓没有转空载细胞(EV-GFP)那么明显, 但仍可初步判断该基因在细胞内主要还是定位于细胞质中, 进一步推测该基因可能主要参与细胞质中的代谢途径.

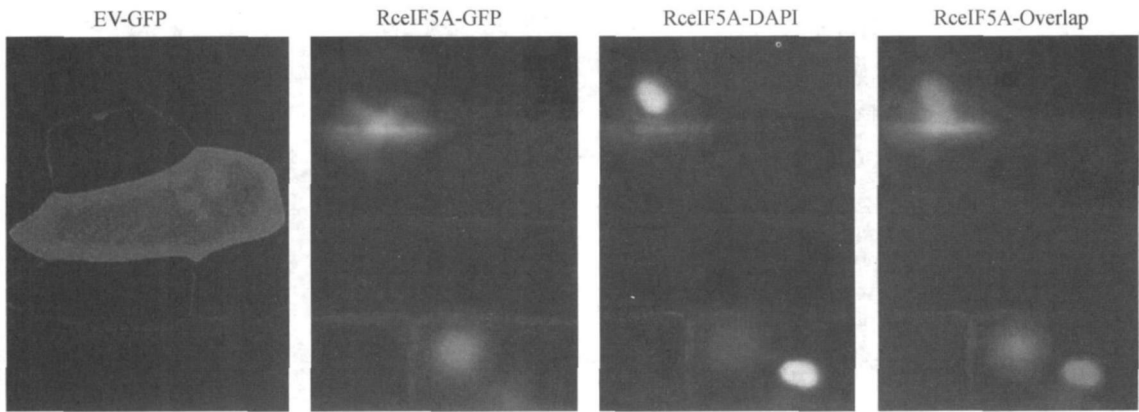


图 1 月季 *RceIF5A* 基因的洋葱表皮亚细胞定位

Fig.1 Subcellular localization of *RceIF5A* in onion epidermal cells

2.2 月季 *RceIF5A* 基因的拷贝数分析

前期已有研究说明 eIF5A 是一类高度保守性蛋白质, 但不同物种中其同源基因的数量及相应的拷贝数不同. 因此本实验中通过 Southern 杂交的方法分析该 *RceIF5A* 在月季基因组中的拷贝数情况. 如图 2 所示, 月季基因组 DNA 分别用限制性内切酶 *Hind* III(*RceIF5A* ORF 序列中有此酶切位点)和 *Bgl* II (*RceIF5A* ORF 序列中无此酶切位点)做单酶切后与探针杂交, 杂交结果显示 *Bgl* II 酶切泳道只有单一条带, *Hind* II 酶切泳道则有两个条带, 这说明该 *RceIF5A* 在基因组中为单拷贝基因.

2.3 *RceIF5A* 基因在月季中的表达模式分析

为全面了解月季 *RceIF5A* 与胁迫的关系, 本研究通过各种胁迫处理月季材料并抽提其叶片 RNA 进行 RT-PCR 分析. 如图 3(见第 276 页)所示, 在高温(38 °C)、氧化(H₂O₂)和渗透(Mannitol)这三种胁迫下, *RceIF5A* 的表达量明显上升, 在 PEG 模拟的干旱胁迫下表达量也略有

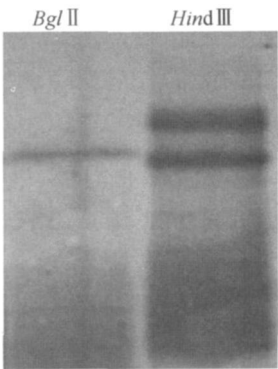


图 2 Southern 杂交分析 *RceIF5A* 基因在月季基因组中的拷贝数

Fig.2 Southern blot of *RceIF5A* in genome of *Rosa chinensis*

升高,但在盐胁迫(NaCl)、锂离子毒性胁迫(LiCl)以及重金属胁迫(CdCl₂)下,*RceIF5A* 的表达量并无明显变化.由此可初步判定 *RceIF5A* 主要与高温、氧化和渗透胁迫相关.

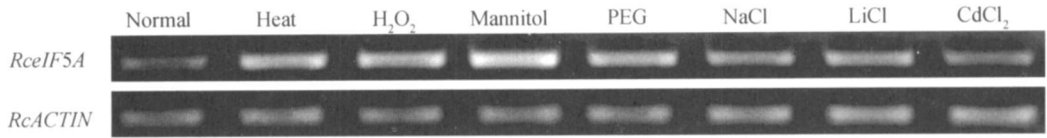


图 3 RT-PCR 分析 *RceIF5A* 基因在月季中的胁迫表达模式
Fig. 3 RT-PCR analysis of *RceIF5A* expression pattern in *Rosa chinensis*

2.4 异源表达 *RceIF5A* 基因提高酵母的耐热抗性

为检测外源 *eIF5A* 基因的表达会否影响酵母 SMD1168 的正常生长,本实验首先通过紫外分光光度计测量了正常环境下(28℃)SMD1168 细胞的生长曲线.如图 4 所示,在毕氏酵母最适生长温度 28℃下,转 pPIC3.5K 与转 pPIC3.5K-*eIF5A* 的菌株生长曲线均呈现“S”形.10 h 进入对数生长期,24 h 后生长趋于平稳期,两个转化酵母菌株的生长曲线几乎重叠,表明 *RceIF5A* 基因的表达积累并没有影响酵母 SMD1168 的正常生长.

为研究异源表达 *RceIF5A* 对酵母耐热抗性的影响,本实验将 2 个转化酵母菌株在高温胁迫(37℃)环境下培养并测其生长曲线.从图 4 中可看出在高温下 2 个转化菌株的生长情况均没有最适温度下那么好,这表现为同一测量时间的 OD₆₀₀ 相对较低.两菌株在 20 h 前的生长均较为缓慢,而 20 h 后则明显进入对数生长期.在对数生长期的初始阶段(22 h)转空载的菌株比转 *RceIF5A* 的菌株有更高的 OD₆₀₀ 值,而到达 24 h 后,转空载的菌株则生长速度下降,而转 *RceIF5A* 的菌株则仍然处于对数生长中期,表现为 24 h 后的 OD₆₀₀ 均高出转空载的菌株的 OD₆₀₀ 值.从上可知,异源表达 *RceIF5A* 能提高毕氏酵母 SMD1168 的耐热抗性.

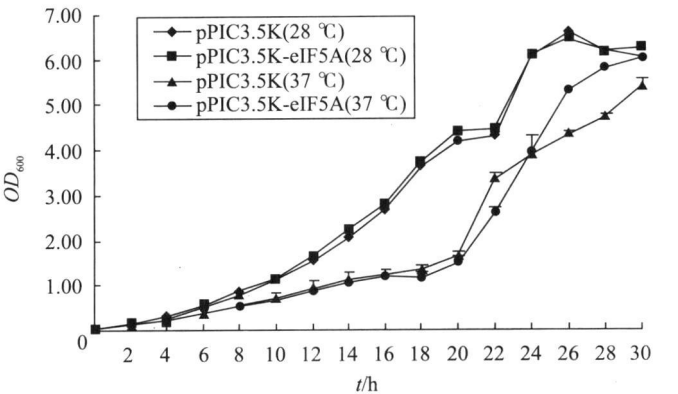


图 4 转基因毕氏酵母的生长曲线测定和高温胁迫分析
Fig. 4 The growth curve and heat stress analysis of recombinant *P. pastoris* SMD1168 strain

2.5 异源表达 *RceIF5A* 基因提高酵母的氧化胁迫抗性

为进一步分析 *RceIF5A* 与其他胁迫的关系,本实验将 SMD1168 转化菌株经 0.5% 甲醇诱导表达 20 h 后按 10 倍逐级稀释 5 级,然后将菌液点在普通 YEPD 培养基和含有各种胁迫物质的 YEPD 培养基上,于 28℃ 培养 3 d 后拍照观察.如图 5 所示,在盐胁迫(NaCl)、锂离子毒性胁迫(LiCl)和重金属胁迫(CdCl₂)培养基上,两转化菌株的生长情况并无明显差异,然而在氧化胁迫(H₂O₂)培养基上,可明显看出转 *RceIF5A* 的 SMD1168 在 10³ 倍稀释处仍能长出菌落,而转空载的 SMD1168 则并未长出菌落,这说明异源表达 *RceIF5A* 能够提高毕氏酵母 SMD1168 的氧化胁迫抗性.这一结论验证了 *RceIF5A* 在氧化胁迫下高表达的结果(图 3).

3 讨 论

eIF5A 因其是真核生物中唯一一种含有特殊氨基酸残基 hypusine 的蛋白质而在结构和功能上均大大异于其他起始因子^[1].已有报道说明 *eIF5A* 是一类核质穿梭蛋白^[9-11],然而最近的报道发现,未经过翻译后 hypusine 修饰的 *eIF5A* 均匀分布于核内外,但成熟的 *eIF5A* 则主要定位于细胞质中^[29].而本研究中将月季 *RceIF5A* 在洋葱内表皮细胞做瞬时表达发现其主要定位于细胞质中,这从侧面说明 *RceIF5A* 可在外源物种中被翻译后修饰而形成成熟的 *eIF5A* 且发挥其功能.

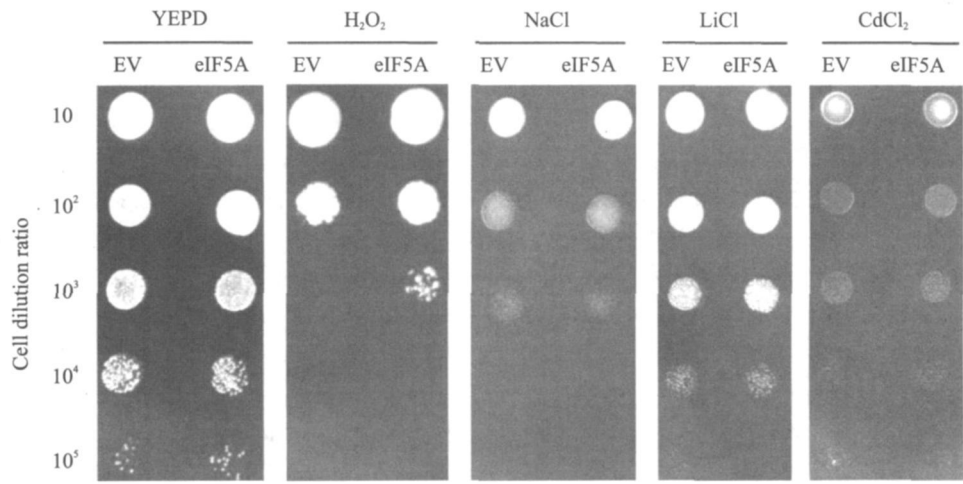


图 5 转基因毕氏酵母的非生物胁迫分析

Fig.5 Growth of recombinant SMD1168 strain under different abiotic stress

EV: 转空载体 pPIC3.5K 的酵母菌落;

eIF5A: 转重组载体 pPIC3.5K-eIF5A 的酵母菌落; 10~10⁵: 酵母菌液稀释倍数

先前已有研究报道水稻 *eIF5A* 基因受盐和重金属胁迫诱导高表达^[17], 初步说明 *eIF5A* 基因与非生物胁迫有关, 但并未进一步深入研究. 而本研究中月季 *RceIF5A* 基因则未在以上两种胁迫下高表达, 而是在高温、氧化和渗透三种胁迫下有更高的表达(图 3). 这说明虽然 *eIF5A* 是高度保守性蛋白, 但其功能仍存在物种间差异. 另一方面也说明该基因在体内参与多种非生物胁迫响应途径, 进一步论证了其在胞内的重要性.

eIF5A 是真核生物特有的蛋白因子, 因此本研究中选择真核模式生物毕氏酵母为宿主, 且因其在工业上极其重要的应用菌种, 具有应用潜力. 本研究将植物月季的 *RceIF5A* 基因同源重组到毕氏酵母 SMD1168 中, 发现外源基因的介入以及在体内的表达积累并未影响毕氏酵母的正常生长(图 4), 这为进一步的研究和应用奠定基础. 本研究发现在长时间高温胁迫条件下(24 h 后), 含有外源 *RceIF5A* 基因的酵母比未转入 *RceIF5A* 基因的酵母生长更好, 增长速度更快(图 4), 这说明该外源 *RceIF5A* 能够提高宿主酵母的高温抗性, 进一步说明其重要的工业应用价值. 然而在 20~24 h 之间, 转空载的酵母却短暂性地比转 *RceIF5A* 的酵母生长更快, 这可能是因为后者细胞内 *RceIF5A* 蛋白的大量积累而暂时消耗过多养分导致, 但从长时间(24 h 后)来看, 后者的生长情况明显好于前者.

从表达模式分析得出虽然 *RceIF5A* 基因与多种非生物胁迫相关, 但并不能说明其在胁迫响应途径中到底是“因”还是“果”, 因此本实验同样对转 *RceIF5A* 基因的毕氏酵母 SMD1168 对其他化学物质胁迫抗性进行了分析. 实验证明, 转 *RceIF5A* 基因酵母虽然不能提高宿主的盐和重金属胁迫抗性, 但能提高宿主的氧化胁迫抗性(图 5), 该结论说明 *RceIF5A* 在体内的胁迫响应途径中主要是起“因”的作用. 氧化胁迫是最常见的非生物胁迫之一, 环境中的多种因素均会对细胞造成胁迫影响而使胞内产生氧自由基, 这和 H_2O_2 引发的氧化胁迫是类似的, 因此转 *RceIF5A* 基因能提高毕氏酵母的氧化胁迫抗性同样具有着重大的应用价值.

综上, 本研究通过研究月季 *RceIF5A* 基因的表达模式, 并首次将其转到真核模式生物毕氏酵母中分析其功能, 发现该基因的表达不但可以提高宿主酵母菌株的高温抗性, 还可以提高宿主的氧化胁迫抗性, 这具有重要的应用价值, 同时也为后期在转基因月季等植物方面的研究奠定理论基础.

参考文献:

- [1] Gordon E D, Mora R, Meredith S C, *et al.* Eukaryotic initiation factor 4D, the hypusine-containing protein, is conserved among eukaryotes [J]. *J Biol Chem*, 1987, **262**(34): 16585-16589.
- [2] Park M H, Wolff E C, Folk J E. Hypusine: Its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation [J]. *Biofactors*, 1993, **4**(2): 95-104.
- [3] Hanauske-Abel H M, Park M H, Hanauske A R, *et al.* Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1221**(2): 115-124.
- [4] 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.
- [5] Kemper W M, Berry K W, Merrick W C. Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta [J]. *J Biol Chem*, 1976, **251**(18): 5551-5557.
- [6] Saini P, Eyler D E, Green R, *et al.* Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation [J]. *Nature*, 2009, **459**(7243): 118-121.
- [7] Gregio A P, Cano V P, Avaca J S, *et al.* eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **380**(4): 785-790.
- [8] Kang H A, Hershey J W. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**(6): 3934-3940.
- [9] Jiao D L, Chen K Y. Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging [J]. *J Cell Biochem*, 2002, **86**(3): 590-600.
- [10] Rosorius O, Reichart B, Kratzer F, *et al.* Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: Evidence for direct interaction with the export receptor CRM1 [J]. *J Cell Sci*, 1999, **112**(14): 2369-2380.
- [11] Elfgang C, Rosorius O, Hofer L, *et al.* Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(11): 6229-6234.
- [12] Pay A, Heberle-Bors E, Hirt H. Isolation and sequence determination of the plant homologue of the eukaryotic initiation factor 4D cDNA from alfalfa, *Medicago sativa* [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, **17**(4): 927-929.
- [13] Chamot D, Kuhlemeier C. Differential expression of genes encoding the hypusine-containing translation initiation factor, eIF-5A, in tobacco [J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**(4): 665-669.
- [14] Requejo R, Tena M. Maize response to acute arsenic toxicity as revealed by proteome analysis of plant shoots [J]. *Proteomics*, 2006, **6** (Sup. 1): S156-S162.
- [15] Dresselhaus T, Cordts S, Lorz H. A transcript encoding translation initiation factor eIF-5A is stored in unfertilized egg cells of maize [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, **39**(5): 1063-1071.
- [16] Wang T W, Wang D, Lu L, *et al.* Isolation and characterization of senescence-induced cDNAs encoding deoxyhypusine synthase and eucaryotic translation initiation factor 5A from tomato [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(20): 17541-17549.
- [17] Chou W C, Huang Y W, Tsay W S, *et al.* Expression of genes encoding the rice translation initiation factor, eIF5A, is involved in developmental and environmental responses [J]. *Physiol Plant*, 2004, **121**(1): 50-57.
- [18] Mehta A M, Saftner R A, Mehta R A, *et al.* Identification of posttranslationally modified 18-kilodalton protein from rice as eukaryotic translation initiation factor 5A [J]. *Plant Physiol*, 1994, **106**(4): 1413-1419.
- [19] Wang T W, Lu L, Zhang C G, *et al.* Pleiotropic effects of suppressing deoxyhypusine synthase expression in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, **52**(6): 1223-1235.
- [20] Duguay J, Jamal S, Liu Z, *et al.* Leaf-specific suppression of deoxyhypusine synthase in *Arabidopsis thaliana* enhances growth without negative pleiotropic effects [J]. *J Plant Physiol*, 2007, **164**(4):

- 408-420.
- [21] Thompson J E, Hopkins M T, Taylor C, *et al.* Regulation of senescence by eukaryotic translation initiation factor 5A: Implications for plant growth and development [J] . *Trends Plant Sci*, 2004, **9**(4): 174-179.
 - [22] Liu Z, Duguay J, Ma F, *et al.* Modulation of eukaryotic translation initiation factor 5A: expression alters xylem abundance in *Arabidopsis thaliana* [J] . *J Exp Bot*, 2008, **59**(4): 939-950.
 - [23] Hopkins M T, Lampi Y, Wang T W, *et al.* Eukaryotic translation initiation factor 5A is involved in pathogen-induced cell death and development of disease symptoms in *Arabidopsis thaliana* [J] . *Plant Physiol*, 2008, **148**(1): 479-489.
 - [24] Feng H, Chen Q, Feng J, *et al.* 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 [J] . *Plant Physiol*, 2007, **144**(3): 1531-1545.
 - [25] Gao Y, Chen Y. Advances in the study of the effects of danggui buxue decoction and its modified recipes on immunity and hematopoietic function [J] . *Chinese Medicion*, 2000, **23**(3): 177-180.
 - [26] 姜蕊, 胡永红, 蒋昌华, 等. 热胁迫下月季叶片蛋白双向电泳分析 [J] . 中国生物工程杂志, 2006, **26**(4): 91-94.
 - [27] 石金磊, 徐健遥, 蒋昌华, 等. 月季 *eIF5A* 基因的表达增强宿主大肠杆菌对高温和低温的耐性 [J] . 中国生物工程杂志, 2008, **28**(1): 18-24.
 - [28] Jiang C, Xu J, Zhang H, *et al.* A cytosolic class I small heat shock protein, RcHSP17. 8, of *Rosa chinensis* confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*, yeast and *Arabidopsis thaliana* [J] . *Plant Cell Environ*, 2009, **32**(8): 1046-1059.
 - [29] Lee S B, Park J H, Kaevel J, *et al.* The effect of hypusine modification on the intracellular localization of eIF5A [J] . *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **383**(4): 497-502.

Expression of *eIF5A* from *Rosa chinensis* Enhance Thermotolerance and Oxidative Stress Resistance of *Pichia pastoris*

XU Jian-yao^{1,2}, JIANG Chang-hua^{1,2,3}, SHI Jin-lei^{1,2}, MING Feng^{1,2}

(1. Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. Institute of Plant Science, Fudan University, Shanghai 200433, China;

3. Shanghai Botanical Garden, Shanghai 200231, China)

Abstract: Subcellular localization of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Rosa chinensis* (*RceIF5A*), showed that it expressed predominantly in the cytoplasm of onion epidermal cells. Southern blot result revealed that *RceIF5A* is only one copy in genome of *Rosa chinensis*. *RceIF5A* expression is up-regulated in *Rosa chinensis* under high temperature, oxidative and osmotic stress conditions. Recombinant *RceIF5A* was overexpressed in *Pichia pastoris* strain SMD1168 to study its possible function under stress conditions. The recombinant *P. pastoris* SMD1168 cells that accumulated *RceIF5A* showed improved viability under thermal and oxidative stress compared with the control cultures.

Keywords: *eIF5A*; *Rosa chinensis*; *Pichia pastoris*; thermotolerance; oxidative stress; resistance

论文中的彩图

1 徐健遥《月季 eIF5A 基因的表达提高毕氏酵母高温和氧化胁迫的抗性》一文图 1(第 275 页)

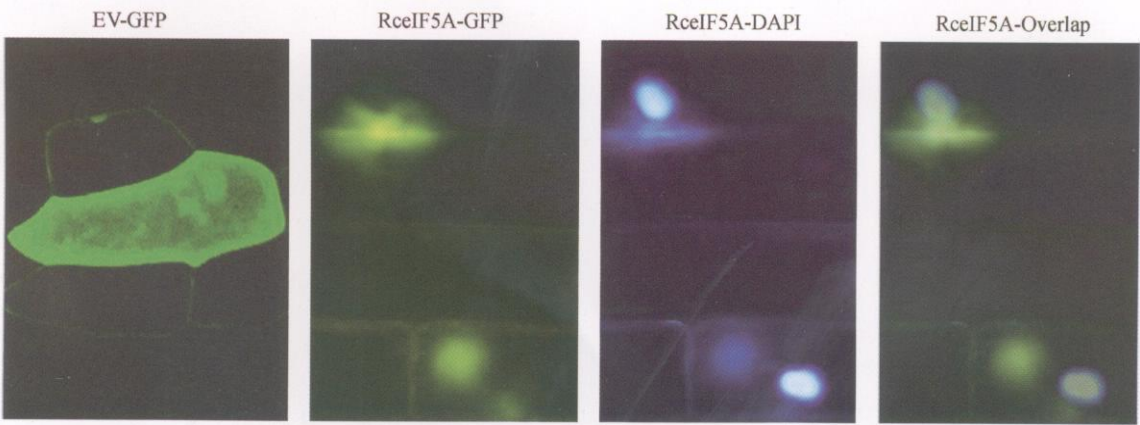


图 1 月季 *RceIF5A* 基因的洋葱表皮亚细胞定位
Fig. 1 Subcellular localization of *RceIF5A* in onion epidermal cells

2 夏志强《马尔尼菲青霉环腺苷酸依赖性蛋白激酶基因的功能研究》一文图 2(第 283 页),图 5(第 284 页)

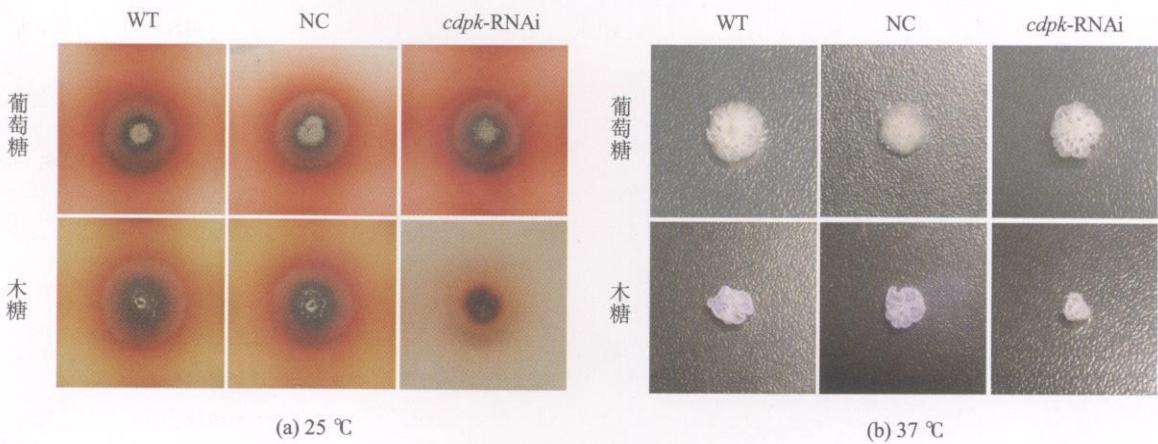


图 2 在固体培养基上 *cdpk* 基因沉默后菌落的表型变化
Fig. 2 The change of *P. marneffei* colony diameter on solid medium after *cdpk* RNA interference
WT: 野生型; NC: 阴性对照; *cdpk*-RNAi: RNA 干扰菌株

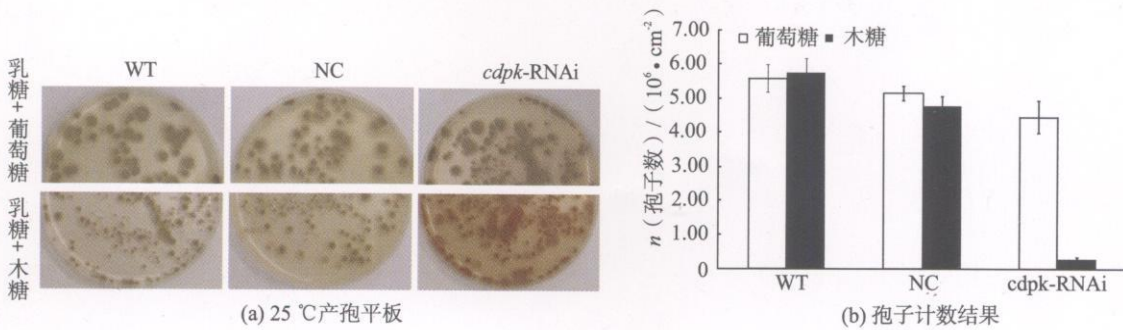


图 5 25 °C时 *cdpk* 基因对孢子的产生是必需的
Fig. 5 The *cdpk* gene is essential for sporulation at 25 °C
WT: 野生型; NC: 阴性对照; *cdpk*-RNAi: RNA 干扰菌株