

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(3):316–321; 4 March 2010
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

原生动物八肋游仆虫 cDNA 文库的构建

柴宝峰¹, 郝艳琴¹, 李毳², 申泉¹, 梁爱华¹

(¹ 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西大学生物技术研究所, 太原 030006)

(² 山西财经大学环境经济学院, 太原 030006)

摘要: 细胞内蛋白质合成过程是一个由多种蛋白质相互作用参与调节的开放系统, 形成了复杂的 mRNA 代谢和蛋白质翻译为核心的基因表达调控的网络和信号转导途径。【目的】为了获得更多参与调节蛋白质合成终止过程的蛋白质种类和功能信息, 进一步了解其中的网络和信号转导途径, 本研究构建了原生动物八肋游仆虫的 cDNA 文库。【方法】构建过程严格遵循 Clontech 公司的 BD Matchmaker™ Library Construction & Screening kit 提供的方案进行文库构建和筛选。【结果】首次得到了可用于筛选功能基因的原生动物纤毛虫的 cDNA 文库, 文库滴度为 2.437×10^7 cfu/mL。利用第二类肽链释放因子为诱饵, 筛选得到了一些可能与之相互作用的蛋白质, 其中包括一个可能编码 RNA 解旋酶的基因序列。该文库为进一步筛选和研究八肋游仆虫功能基因提供了便利的平台。

关键词: cDNA 文库; 肽链释放因子; 原生动物; 八肋游仆虫

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0316-06

原生动物八肋游仆虫是一类单细胞真核生物, 通用终止密码子 UGA 在该细胞内蛋白质合成过程中编码半胱氨酸, 只有 UAA 和 UAG 作为终止密码子^[1–4]。其终止密码子使用的特殊性说明其蛋白质合成终止机制存在一定的典型特征, 尤其是第一类肽链释放因子识别终止密码子的机制与高等真核生物存在一定的差异^[5–7]。目前为止, 真核生物蛋白质合成新生肽链释放机制还不清楚, 尤其这一过程中哪些蛋白质因子与肽链释放因子协同作用仍然是分子细胞生物学领域研究的一个热点问题^[8–9]。另外, 在真核细胞中存在一个无义 mRNA 降解途径 (nonsense mediated mRNA decay, NMD)^[10–11], 该途径作为一种保护机制, 清除细胞内含有提前终止密码子的 mRNA, 避免截短型蛋白质在细胞内的积累对细胞造成伤害^[12–13]。NMD 途径的引发依赖于细胞质中第一轮蛋白质的翻译过程, 当核糖体翻译遇到基因阅读框内的提前终止的密码子时, 肽链释放

因子首先与定位于核糖体上的终止密码子结合, 招募与 NMD 途径有关的其它因子, 如 UPF1, UPF2, UPF3 等, 其中 UPF1 可以直接与第二类肽链释放因子相互作用^[12, 14]。说明肽链释放因子一定程度上决定细胞质中 mRNA 代谢降解过程的启动, 同时还有一系列蛋白质因子^[14–15], 包括核酸酶都参与了这一过程^[16]。但是, NMD 途径在高等真核生物和酵母中的机制存在一定的差异^[12]。在原生动物贾第虫 (*Giardia*) 中发现了一些与 NMD 途径有关的蛋白质因子, 推测其 NMD 途径与高等真核生物中的机制也不完全一致^[17]。八肋游仆虫是一种进化上比较高等的原生动物, 其中是否也存在 NMD 途径呢? 肽链释放因子在其中又扮演一种什么角色呢? 通过对蛋白质相互作用关系的研究, 尤其是通过文库筛选参与 NMD 途径的蛋白质因子, 是了解该生物细胞中 NMD 途径发生机制有效手段。目前为止, 八肋游仆虫是基因阅读框内终止密码子含量最少的一

基金项目: 国家自然科学基金 (30770294, 30940043); 山西省自然科学基金 (2009011040-1); 山西省留学归国基金 (200846)

作者简介: 柴宝峰 (1967–), 男, 山西闻喜人, 教授, 博士生导师, 遗传学博士学位。研究方向为分子细胞生物学。E-mail: bfcchai@sxu.edu.cn

收稿日期: 2009-10-06; **修回日期:** 2009-12-02

类纤毛虫^[18],基于此,本研究首次构建了纤毛虫八肋游仆虫的 cDNA 表达文库,用第二类肽链释放因子为诱饵蛋白对文库进行筛选,得到了一些编码与之相互作用的蛋白质的基因序列。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料:八肋游仆虫(*Euplotes octocarinatus*)由德国明斯特大学 K. Heckman 教授惠赠,用绿绿藻虫(*Chlorogonium elongatum*)喂食培养^[19]。酵母双杂交文库构建所需酵母菌株和质粒均包括在购自 Clontech 公司的 BD Matchmaker™ Library Construction & Screening kit (MLCSK)试剂盒中。

1.1.2 主要试剂和仪器: RNA 提取试剂盒 TRIzol™ 购自 Invitrogen 公司(美国);酵母培养基 YPDA 购自上海 Sangon;SD 培养基和各种氨基酸购自北京欣经科公司;聚乙二醇(PEG)购自 Sigma 公司;T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、β-半乳糖苷酶和其它生化试剂均购自 TaKaRa 公司(大连);核酸蛋白浓度测定仪(Eppendorf Biophotometer)购自德国 Eppendorf 公司;酵母破碎仪和玻璃珠购自 BIOSPEC PRODUCT 公司(美国)。

1.2 实验方法

除特殊说明外,构建过程中的反转录体系、PCR 扩增体系和酶切体系完全按照试剂盒提供的方案(PT3529-1, PT3281-1)进行。

提取八肋游仆虫总 RNA,检测 RNA 浓度和纯度;用 MLCSK 试剂盒中提供的试剂和方法进行 RNA 的反转录,得到大核 cDNA;用 BD CHROMA SPIN TE-400 柱子筛选分子量 >200 bp ds cDNA;将纯化的 ds cDNA 与经 *Sma* I 酶切线性化的 pGADT7-

Rec 载体共转化酵母菌株 AH109,使 ds cDNA 与 pGADT7-Rec 在酵母细胞中重组连接;用 SD/-Leu 平板筛选转化子,通过稀释转化液涂板(1:10,1:100,1:1000,1:10000),计算转化效率. 平板 30℃ 培养 3 天,将平板在 4℃ 冷藏 3-4 h 后,在每个平板上加 5 mL 冷藏的培养液(YPD 与 25% 无水乙醇混合),用灭过菌的玻璃棒在平板上涡旋使细胞溶于液体中,将所有液体收集到三角瓶中混匀,共约 450 mL 菌液。用血球计数器测定细胞的密度,计算文库滴度,将混合细胞液分装到 1 mL 的小 EP 管中,存于 -80℃ 超低温冰箱,待用。

文库筛选:构建含有第二类肽链释放因子的重组诱饵质粒 pGBKT7-eRF3,转化酵母菌株 Y187。文库宿主菌与 Y187/pGBKT7-eRF3 进行接合。30℃,30-50 r/min 轻摇 20-24 h 后镜检,如果出现接合体则继续杂交四小时以上,接合完成后,将此杂交菌液倒入离心管中 1000 ×g ×10 min 离心,并用 0.5 × YPDA/Kan (YPD + 30 mg/L adenine hemisulfate + 50 μg/mL kanamycin)冲洗培养瓶 2 次并离心,最后将沉淀重悬于 10 mL 0.5 × YPDA/Kan 中。杂交菌用 SD/-Leu/-Trp/-His 和 SD/-Leu/-Trp/His/-Ade(200 mm 平板)固体培养基分别进行初级和严谨筛选。进行 β-半乳糖苷酶活性分析(PT3024-1),筛选阳性克隆。挑取单克隆,破菌,转化大肠杆菌 DH5α,用含有 Ampicillin 的平板筛选含有文库质粒的阳性克隆,提取质粒,用含有锚定(杂交)序列的引物扩增,确定质粒中片段的大小,阳性质粒送公司测序。

1.3 核苷酸引物

表 1 所示的寡核苷酸引物分别用于第一链 cDNA 反转录合成、长程 PCR 扩增双链 cDNA 以及含诱饵蛋白基因的重组质粒的构建等。

表 1

Table 1 Primers used in this study		
Primer names	Sequence of oligonucleotides (5'→3')	Purpose
CDS III Primer	ATTCTAGAGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T)30VN*	Synthesis first-strand cDNA
BD SMART III™ Oligo	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGG	
5' PCR primer	TTCCACCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGG	
3' PCR primer	GTATCGATGCCACCCCTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACA	Amplification of ds cDNA
PeRF3B	GTCACGGATCCGAATGGACAAGAACTCAGAT	Construction of recombinant plasmid pGBKT7-eRF3
PeRF3P	AGCTCCTGCAGTTATAAAATTTTATGAGC	Amplifying the gene from positive plasmids
Psmart _{III}	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCA	
Pcds _{III}	AGATGGTGCACGATGCACAGTTGAA	
PeRF1NheI	CGACTGCTAGCATGTCAATAATTGATAGT	Amplification of the eRF1 gene from ds cDNA
PeRF1XhoI	GACCGCTCGAGTTATATGAAATCTTCATC	
PeRF3-2	TGCGTAGAGTCCGGGAAGCAAT	Amplification of the eRF3 fragment (474 bp) from ds cDNA together with PeRF3 B above
PeRF3-3	GGAAAGGTATTGAGATATAAAC	Amplification of the eRF3 fragment (222 bp) from ds cDNA together with PeRF3P above

* N = A, G, C, or T; V = A, G, or C; Restriction sites were underlined.

2 结果和讨论

2.1 文库的构建

2.1.1 八肋游仆虫总 RNA 的提取:将八肋游仆虫进行适当的饥饿处理, 去除培养基中的绿藻,

5000 × g离心收集。用 TRIzol™ 试剂盒及其提供的方法提取总 RNA。如图 1-A 所示,3 条电泳条带分别代表 5S, 18S, 26S rRNA。定量分光光度计测定 RNA 总浓度为 1262.3 μg/mL, 纯度 ($OD_{260/280}$) 为 2.05,符合文库构建的要求。

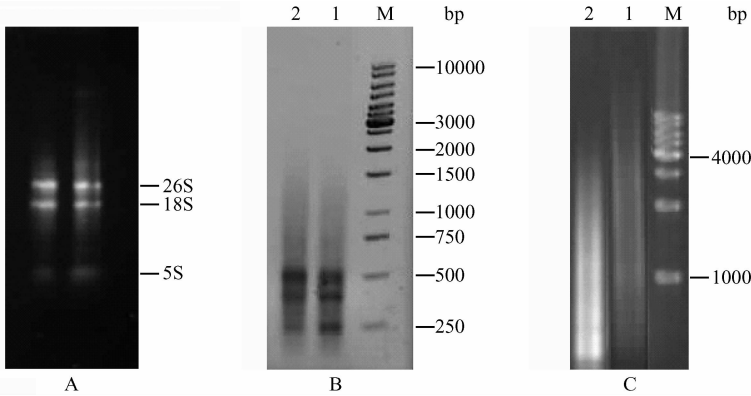


图 1 八肋游仆虫总 RNA 及反转录产物电泳分析

Fig. 1 Agarose gel analysis of total RNA and product of RT-PCR. A: Total RNA extracted from *E. octocarinatus*, indicating the 26S, 18S and 5S rRNA; B: First strand cDNA generated from reverse transcription PCR. Lane 1 and 2 indicate using 1 μL and 3 μL volume of total RNA as templates, respectively; C: Product of purified ds cDNA amplified by Long Distance PCR. Lane 1: product of ds cDNA from Human Placenta; Lane 2: product of ds cDNA from *E. octocarinatus*.

2.1.2 反转录合成双链 cDNA:用两步法反转录 RNA。用 CDS III primer (Oligo dT) 为引物反转录第一链单链 cDNA(图 1-B), 引物中的锚序列(表 1 中该引物的斜体部分)加在单链 cDNA 的 3' 端; 以 BD SMART III™ Oligo 为引物, 第二次反转录, 用 RNase H 处理, 将另一个锚序列加至 ds cDNA 的 5' 端。以 3' PCR primer 和 5' PCR primer 为引物, 用长程 PCR 的方法扩增 ds cDNA。根据试剂盒说明书的方案 (PT3529-1), 不同起始浓度的总 RNA 在进行长程 PCR 时, 需要用不同的循环次数, 以保证既有足够的目的产物, 同时减少非特异扩增产物。本研究起始总 RNA 的浓度为 1.263 μg/μL, 设定反转录的循环次数应为 15 - 20 个循环。产物用 BD CHROMA SPIN TE-400 柱子进行纯化, 除去小于 200 bp 的小片段 DNA(图 1-C)。实验以人类胎盘总 RNA 的反转录过程和产物作为阳性对照。扩增产物两端的锚序列用于下一步与文库载体的杂交重组。反转录后得到的八肋游仆虫 ds cDNA 作为模板, 扩增已知基因 eRF1(全长 1400 bp) 和 eRF3 的 2 个片段(474 bp 和 222 bp), 得到特异的清晰条带(图 2-A)。说明得到的 ds cDNA 产物中 DNA 片段的长度和丰度基本可以满足下一步文库制备的需要。

2.1.3 基因重组法转化 AH109 构建文库:用纯化的 ds cDNA 与 Sma I 单酶切线性化的 pGADT7-Rec 文库载体共转化酵母菌株 AH109, 二者在细胞内发

生同源重组。用 SD/-Leu 平板筛选转化子, 共涂 92 个 200 mm 的平板。在 30℃ 培养 3 - 4 d, 用 YPD + 25% 无水乙醇混合收集平板上的转化子, 获得约 450 mL 的转化子。细胞计数器计数结果显示, 细胞密度为 6.975×10^7 cells/mL ($>2 \times 10^7$), 文库的滴度为 2.437×10^7 cfu/mL。

培养文库酵母菌株, 破菌提取质粒, 转化大肠杆菌 DH5α。挑取细菌单克隆, 扩增培养, 然后提取质粒进行鉴定。用含有锚序列的引物(表 1 中 Psmart III 和 Pcds III)进行 PCR 扩增, 结果显示文库载体中含有重组了的外源基因(如图 2-B)。

2.2 八肋游仆虫 eRF3 为诱饵蛋白筛选文库

2.2.1 含 eRF3 的重组诱饵菌株的构建:用引物 PeRF3B 和 PeRF3P 扩增八肋游仆虫第二类肽链释放因子基因 eRF3(2400 bp), 克隆至酵母双杂交载体 pGBKT7(图 2-C)。用重组质粒 pGBKT7-eRF3 转化酵母菌株 Y187, 用 SD/-Trp 平板筛选阳性克隆。挑取酵母阳性克隆, 扩增破菌, 转化大肠杆菌 DH5α, 用 Kanamycin 筛选克隆, 提取质粒, PCR 和酶切鉴定。证实诱饵菌株 Y187/pGBKT7-eRF3 构建成功。

2.2.2 eRF3 作为诱饵蛋白筛选文库:用 5 mL 诱饵菌株 Y187/pGBKT7-eRF3 与 1 mL 文库宿主菌进行接合培养, 30℃, 30 - 50 r/min 轻摇 20 - 24 h 后镜检, 出现接合体(图 3-A), 继续杂交 4 h, 接合完成,

形成双倍体。将此双倍体杂交菌离心,重悬于 10 mL YPDA 中。先用 SD/-Leu/-Trp/-His 进行初级筛选(图 3-B),共获得 200 个克隆。将 200 个克隆在 SD/-Leu/-Trp/His/-Ade 的平板上作进一步的严谨筛选(图 3-C),获得 36 个阳性克隆。进一步进行 β -半乳糖苷酶活性分析(PT3024-1)筛选阳性克隆(图 3-D),结果有 16 个克隆显深蓝色,其余克隆显

色较浅。显色深的克隆说明其中可能含有与 eRF3 相 互作用的目的蛋白质。为此,我们提取了该 16 个酵母克隆的质粒,转化大肠杆菌 DH5 α 进行扩增,用氨 苄青霉素筛选阳性克隆,提取质粒。用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切,锚定序列作为引物(表 1 中 Psmart $_{III}$ 和 Pcds $_{III}$)进行 PCR 扩增分析,结果显示,在筛选的阳性 质粒中均含有大小不等的 DNA 片段(图 4)。

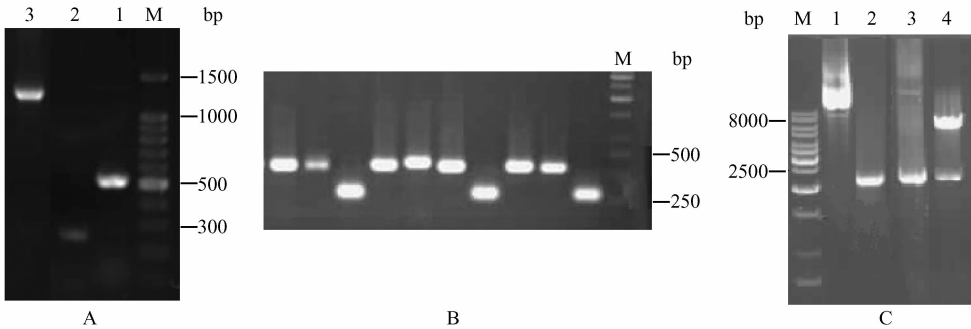


图 2 PCR 和酶切分析 ds cDNA 质量 (A)、文库中重组质粒所含的外源基因 (B) 及重组质粒 pGBKT7-eRF3 (C)

Fig. 2 Analysis of ds cDNA, genes in library plasmids and recombinant plasmid pGBKT7-eRF3 by using PCR and/or enzyme digestion.

A: Analysis of ds cDNA by amplifying the full length eRF1 and two fragments of eRF3 of *E. octocarinatus*. Lane 1 and 2 showed two fragments of eRF3 (474 bp and 222 bp), respectively; Lane 3 showed the full length eRF1; B: PCR analysis of recombinant plasmids from library yeast strains AH109/pGADT7-X. PCR products in different lanes were unknown gene fragments; C: Analysis of recombinant pGBKT7-eRF3 by PCR and enzyme digestion. Lane 1: recombinant plasmids; Lane 2: eRF3 gene amplified from genomic DNA of *Euplotes*; Lane 3: eRF3 gene amplified from recombinant plasmids; Lane 4: recombinant plasmid digested by enzymes *Bam*HI and *Pst* I.

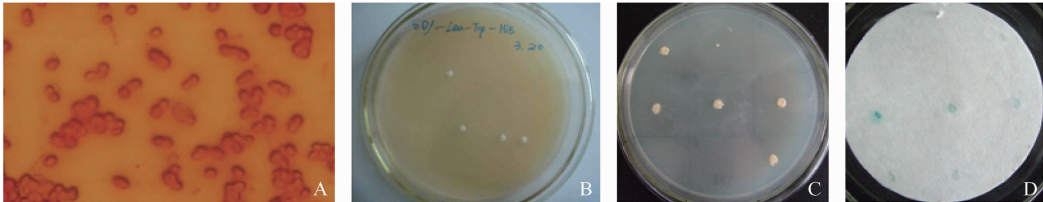


图 3 用八肋游仆虫 eRF3 为诱饵蛋白筛选构建的文库

Fig. 3 Screen of constructed cDNA Library by using *Euplotes* eRF3 as bait. A: Mating cells of library strain AH109/pGADT7-X and bait strain Y187/pGBKT7-eRF3; B: Primary screen of diploid cells on SD/-Leu/-Trp/-His plates; C: Stringent screen of primary screened diploid cells on SD/-Leu/-Trp/His/-Ade plates; D: β -galactosidase filter-lift assays of stringent screened clones.

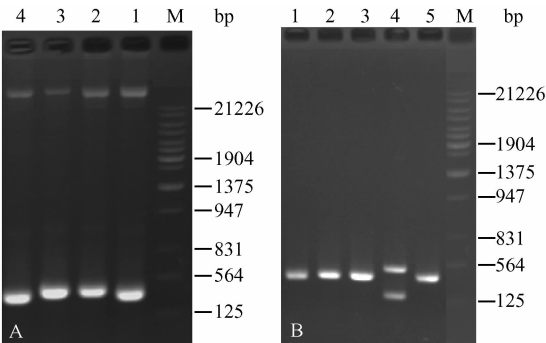


图 4 筛选到的阳性质粒进行酶切和 PCR 鉴定

Fig. 4 Enzyme digestion and PCR analysis of screened positive plasmids. DNA molecular weight marker (λ DNA/*Eoc*RI + *Hind*III). A. Lane 1-4: *Bam*HI and *Eco*RI digestion analysis of plasmids 4, 5, 6 and 7; B. Lane 1-5: PCR analysis of positive plasmids 4, 5, 6, 33 and 48.

2.2.3 阳性克隆中质粒的测序和序列分析:用第二类肽链释放因子为诱饵从构建的文库中筛到的阳性克隆中的质粒经过测序发现,6 号克隆的质粒中的基因有一个开放的阅读框。如图 5 所示,阴影部分为该基因的阅读框,在阅读框中有一个通用终止密码子 TGA,在原生动物纤毛虫八肋游仆虫细胞中,该密码子在基因中编码半胱氨酸。在基因的 3'端有非翻译区和多聚腺苷酸尾巴 (poly(A))。在 NCBI 网站比对查询显示,该核苷酸片段可能编码一类 RNA 解旋酶 (RNA helicase) 的一个结构域。进一步的酵母双杂交实验也证实,该基因所编码的蛋白质 (结构域) 与第二类肽链释放因子相互作用(图 6),图中分别用八肋游仆虫的两类肽链释放因子的相互作用作为阴性对照和阳性对照,两类肽链释放因子的相互作用关系已经得到证实^[20]。两者之间的相

相互作用关系说明 RNA 解旋酶在蛋白质翻译过程中可能与肽链释放因子协同作用,或者肽链释放因子参与蛋白质合成以外的 RNA 代谢过程,具体事实有待进一步的分析。

TACGACGTACCAGATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCCACCCAAGCAGTG
GTATCAACGCAGAGTGGCCATCAGGGTTTATATTGGATTAGTAAAACTGACAATACTAAA
TTGGAGGAAAGAGAAAACGACGATATTTAATTAGATATTCTCCTGAGATTAATAAATCAGT
AAAGCCAAACTCCACTTTAGAAAATTGATGTTCAACTATTTTCACCAAGGCTTCGCTGGAACAT
TTACATATACTCTTAGTCTTTTACATTATCAAAGAAAACCATTTGGAAGCGAATTTGAATTTA
CTTTAAATGTAAAAAGTGCTTGAATATCCAAGTCACATCATAGGAATGCCAAATCCTATTGGTA
TGCCAAGAATCGATAGAATGGAATGCTTAAAAGAATGCAAAAGAAAGTAGTAAATCTAAT
TGATGTGCAACAAAACCTTTAAAGAATTACTTATAATAGAGCAAGTTTCTTTGTAGAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAACATGTCGGCCGCCTCGGCCTCTAGAGGGTGGGCATCGATACGG
GATCCATCGAGCTCGAGCTGCAGATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCGCAAGTCACTT
CAACTGTGCATCGTGCACCATCTC

图5 第6号克隆中质粒的测序结果

Fig. 5 The sequence of gene in No. 6 clone encoding a putative protein interacting with eRF3. Double underline letters were homologous sequence in pGADT7 vector shared with SMART III and CDSIII primers; Shadowed letters were putative open reading frame, in which the overstriking underline TGA encodes cysteine in *E. octocarinatus*, and framed TAG and TAA were recognized as stop codons; Wave underline letters were HA tag for Co-IP test; Single underline letters were untranslated region in 3' end, including the poly(A) tail; Dashed underline letters were sequence in pGADT7 vector.

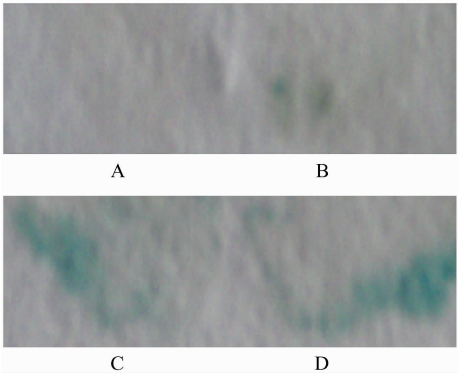


图6 酵母双杂交进一步证实 eRF3 与目的基因编码的 RNA 解旋酶(RHelix) 相互作用

Fig. 6 Confirmation of the interaction between eRF3 and putative RNA helicase protein by yeast two hybrid method; A: Negative control pGADT-eRF1/pGBKT7; B: Negative control pGADT/pGBKT-eRF3; C: Positive control pGADT-eRF1/pGBKT-eRF3; D: Sample pGBKT7-RHelix/ pGBKT-eRF3.

总之,本研究成功构建了原生动物八肋游仆虫的酵母双杂交 cDNA 文库,并用第二类肽链释放因子为诱饵蛋白,对文库进行筛选,筛选到的基因编码的蛋白质与第二类肽链释放因子相互作用。这种相互作用可能与 mRNA 的代谢有一定的关系,具体的细胞生物学功能有待进一步的分析。

参考文献

[1] Lekomtsev SA, Kolosov PM, Frolova L, et al. How translation termination factor eRF1 *Euplotes* does not recognise UGA stop codon. *Molecular Biology* (Mosk), 2007, 41(6):1014-1022.

[2] Meyer F, Schmidt HJ, Plumper E, et al. UGA is translated as cysteine in pheromone 3 of *Euplotes octocarinatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*,1991 , 88(9):3758-3761.

[3] Kervestin S, Frolova L, Kisselev L, et al. Stop codon recognition in ciliates; *Euplotes* release factor does not respond to reassigned UGA codon. *European Molecular Biology Organization Report*, 2001, 2(8):680-684.

[4] Kim OT, Sakurai A, Saito K, et al. Ciliates use both variant and universal genetic codes: Evidence of omnipotent eRF1s in the class Litostomatea. *Gene*, 2008, 417(1-2):51-58.

[5] Muramatsu T, Heckmann K, Kitanaka C, et al. Molecular mechanism of stop codon recognition by eRF1: a wobble hypothesis for peptide anticodons. *Federation of European Biochemical Societies Letter*, 2001, 488(3): 105-109.

[6] Salas-Marco J, Fan-Minogue H, Kallmeyer AK, et al. Distinct paths to stop codon reassignment by the variant-code organisms *Tetrahymena* and *Euplotes*. *Molecular Cell Biology*, 2006, 26(2):438-447.

[7] Lekomtsev SA, Kolosov PM, Yu L, et al. How Does *Euplotes* Translation Termination Factor eRF1 Fail to Recognize the UGA Stop Codon? *Molecular Biology*, 2007, 41(6):924-931.

[8] Fan-Minogue H, Du M, Pisarev AV, et al. Distinct eRF3 requirements suggest alternate eRF1 conformations mediate peptide release during eukaryotic translation termination. *Molecular Cell*, 2008, 30(5):599-609.

[9] Cheng Z, Saito K, Pisarev AV, et al. Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes Development*, 2009, 23(9):1106-1118.

- [10] Maquat LE. NMD in mammalian cells: A history. Maquat LE. In: *Nonsense-Mediated mRNA Decay*. Georgetown, Texas: Landes Bioscience, 2006: 45-58.
- [11] van Hoof A, Green PJ. NMD in plants. In: *Nonsense-Mediated mRNA Decay*. Edited by Maquat LE. Georgetown, Texas: Landes Bioscience; 2006: 167-172.
- [12] Brogna S, Wen J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16(2):107-113.
- [13] Wen J, Brogna S. Nonsense-mediated mRNA decay. *Biochemical Society Transaction*, 2008, 36 (Pt 3):514-516.
- [14] Ivanov PV, Gehring NH, Kunz JB, et al. Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *European Molecular Biology Organization Journal*, 2008, 27(5):736-747.
- [15] Yamashita A, Kashima I, Ohno S. Role of SMG-1-mediated phosphorylation of Upf1 in NMD. In: *Nonsense-Mediated mRNA Decay*. Edited by Maquat LE. Georgetown, Texas: Landes Bioscience; 2006:85-95.
- [16] Mitchell P, Tollervey D. An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3' -> 5' degradation. *Molecular Cell*, 2003, 11(5):1405-1413.
- [17] Chen YH, Su LH, Sun CH. Incomplete nonsense-mediated mRNA decay in *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology*, 2008, 38(11):1305-1317.
- [18] Schmidt HJ BW, Teckentrup W, Heckmann K. A comparative study of RNAs from four ciliate groups and mollusk and data on their poly (A) + RNA in vitro translation. *European Journal of Protistology*, 1991, 27: 434-351.
- [19] Schulze Dieckhoff H, Freiburg M, Heckmann K. The isolation of gamones 3 and 4 of *Euplotes octocarinatus*. *European Journal of Biochemistry*, 1987, 168 (1): 89-94.
- [20] Chai BF, Song L, Fu YJ, et al. Interaction of two classes of release factors from *Euplotes octocarinatus*. *Journal of Genetics & Genomics*, 2004, 31(5):460-467.

Construction of cDNA library of protozoan ciliates *Euplotes octocarinatus*

Baofeng Chai^{*}, Yanqin Hao¹, Cui Li², Quan Shen, Aihua Liang

(¹Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of The Ministry of Education, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

(²Faculty of Environment and Economics, Shanxi University of Finance and Economics, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The protein biosynthesis in cells is an open process cooperatively regulated by many protein factors and enzymes, which form a complicated protein network and signal transduction pathway for mRNA metabolism and protein translation. [**Objective**] To provide a platform for studying on the function of proteins involving in process of translation termination and the relationship among these proteins in ciliates. [**Methods**] We constructed the cDNA library of protozoan ciliates *Euplotes octocarinatus* strictly following the procedure of BD MatchmakerTM Library Construction & Screening kit from Clontech. [**Results**] We obtained a cDNA library of ciliates *Euplotes*, the titer of which was about 2.437×10^7 cfu/mL, which could suffice for functional gene screen. By using the class II polypeptide release factor (eRF3) as bait protein, we obtained some putative genes, including a partial cDNA putatively encoding RNA helicase. [**Conclusion**] This library will provide a convenient platform for identifying the functional genes in ciliates.

Keywords: cDNA library; polypeptide release factor; protozoan; *Euplotes octocarinatus*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Grants from the National Natural Scientific Foundation of China (30770294, 30940043), the Natural Scientific foundation of Shanxi (2009011040-1) and the Scientific Research Foundation for Returned Scholar, Shanxi, China (200846)

^{*} Corresponding author. E-mail: bfcchai@sxu.edu.cn

Received: 6 October 2009/Revised: 2 December 2009