

# 鲫鱼 PKR-like $Z\alpha$ 与 $d(GC)_{13}$ 质粒的结合及其适应性进化

陶敏 吴初新 杨攀 胡成钰\*

(南昌大学生命科学学院, 南昌 330031)

**摘要**  $Z\alpha$  是一类能特异性识别与结合左旋 DNA (Z-DNA) 的蛋白质结构域, 分布于不同物种的多种蛋白质中, 其结构保守并分化自一个共同的祖先 Z- 结构域。适应性进化分析显示  $Z\alpha$  没有经历正达尔文选择, 表明与其结构对应  $Z\alpha$  的功能相当保守。凝胶阻滞试验表明原核表达的鲫鱼 PKR-like  $Z\alpha$  多肽 (CaPZ $\alpha$ ) 不与 pMD18-T 质粒结合, 却能与包含  $d(GC)_{13}$  的重组质粒 pMD18-T/ $(GC)_{13}$  结合。同时, 与 ADAR1  $Z\alpha$  相比, CaPZ $\alpha$  与  $d(GC)_{13}$  质粒的结合能力较弱, 即 CaPZ $\alpha$ 1 和 CaPZ $\alpha$ 2 子域单独不能结合  $d(GC)_{13}$  质粒。这表明  $Z\alpha$  功能虽然没有异化, 但有很大的不同。实验结果还表明负超螺旋和  $d(GC)_n$  可能都是正常生理条件下, DNA 形成潜在 Z-DNA 必不可少的因素。定点突变试验证实 38N 与 60W 两个氨基酸位点对于 CaPZ $\alpha$  结合 Z-DNA 非常关键。

**关键词** PKR-like;  $Z\alpha$ ;  $d(GC)_n$ ; 适应性进化; Z-DNA 结合蛋白

$Z\alpha$  结构域首先在 ADAR1 (adenosine deaminases acting on dsRNA) 中得到鉴定<sup>[1]</sup>, 为一类能特异性识别并结合左旋 DNA (Z-DNA) 的蛋白质结构域。目前, 已在人类、哺乳类、鱼类和病毒中报道了多种包含  $Z\alpha$  结构域的蛋白质, 统称为 Z-DNA 结合蛋白 (Z-DNA binding protein, ZBP)。包括 ADAR1、ZBP-1<sup>[2]</sup>、痘类病毒 E3L<sup>[3]</sup>、鱼类 PKR-like (PKZ)<sup>[4,5]</sup>。 $Z\alpha$  无论在一级结构还是高级结构上都相当保守, Athanasiadis 等<sup>[6]</sup>认为它们可能来源于一个共同的祖先 Z 结构域, 这个结构域的复制最终形成了两个结构域谱系 ( $Z\alpha$ 1,  $Z\alpha$ 2), 每个都负责一个单独的功能。

鲫鱼 PKR-like (CaPKR-like) 在 C 端是与哺乳类 PKR 同源的激酶催化区, 而 N 端为  $Z\alpha$  结构域 ( $Z\alpha$ 1,  $Z\alpha$ 2)<sup>[4]</sup>。因此, CaPKR-like 同时具有干扰素系统中两种重要的效应蛋白 PKR 和 ADAR1 的结构特征。为了解 CaPKR-like  $Z\alpha$  的功能, 本文利用凝胶阻滞分析了 CaPKR-like  $Z\alpha$  多肽 (CaPZ $\alpha$ ) 与核酸分子的亲和性。结果显示 CaPZ $\alpha$  能有效结合  $d(GC)_{13}$  重组质粒, 而改变 38N 与 60W 两个氨基酸位点会影响 CaPZ $\alpha$  对核酸的结合活性。

适应性进化分析是一种基于统计学和遗传学知识的生物信息学探索。基于最大似然法的密码子替换模型是一种较严格的参数估计方法, 能检测不同位点承受的选择压力, 异义/同义替换速率比值 ( $dN/dS$ )

$=1$ 、 $<1$  和  $>1$  分别表示中性进化、负选择和正选择作用 (即适应性进化)<sup>[7]</sup>。分子进化中正选择的出现, 意味着该基因或蛋白质在进化中可能衍生出新的结构或功能<sup>[8]</sup>。在此, 利用该模型分析来自于不同 ZBP 的  $Z\alpha$  结构域的适应性进化。结果显示,  $Z\alpha$  结构域没有受到正选择作用, 而且序列上大多数位点可能处于中型或负选择状态, 呈现出高度的进化保守性。

## 1 材料与方法

### 1.1 $Z\alpha$ 系统发生

在 GenBank 检索 ZBP 家族序列及其编码序列, 病毒的 E3L 不含有  $Z\alpha$ 2, 因此这里不将 E3L 序列列入分析群。蛋白质序列经 ClustalX 2.0 (<http://bips.u-strasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/>) 排布后, 用 EMBOSSwin 5.0.0 (<http://emboss.sourceforge.net/>) 的 tranalign 程序转换成相应的 DNA 序列排布, 再用 PHYLIP 3.67 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) 的 dnaml 程序确定系统发生树 (Phylogeny), Bootstrap 自展重复 1 000 次。

收稿日期: 2008-01-07 接受日期: 2008-04-10  
国家自然科学基金资助项目 (No.30560116)

\* 通讯作者。Tel: 0791-8785566, E-mail: hucy2008@21cn.com

## 1.2 Z $\alpha$ 适应性进化分析

利用检测正选择的最大似然法模型, 运行PAML 3.15 (<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>) 的 codeml 程序, 检测 Z $\alpha$  结构域的正选择并寻找受到正选择作用的密码子位点。模型的统计学分析包括两个方面: 第一, 检验基因在进化过程中是否受到正选择, 即应用似然比检验(likelihood ratio test, LRT)检测序列上是否有一些位点的  $\omega > 1$ 。第二, 得到模型估计的参数后, 进行后验概率(posterior probability)检验, 即用贝叶斯方法计算位点最可能属于哪一种位点类型。对于  $\omega$  估计值大于 1 的位点, 当后验概率大于 0.95 时, 该位点就很可能来自于  $\omega > 1$  的位点类型, 即认为这是一个正选择位点。

## 1.3 CaPZ $\alpha$ 定点突变

根据 CaPKR-like 与人 ADAR1 的 Z $\alpha$  结构域比对结果, 设计两套 PCR 定点突变引物(表 1)。

以载有 CaPZ $\alpha$  cDNA 片段的 pET32a 质粒作为模板, 使用两条突变引物和高保真 Pfu DNA 聚合酶引导 DNA 合成, 两条引物中均具有与质粒 DNA 不同链相同的起始位点和终止位点, 含有需要的一个单核苷酸突变。PCR 体系为: 10  $\mu$ l 5 $\times$  引物缓冲液; 2.0  $\mu$ l 质粒 DNA; 0.5  $\mu$ l 100 mmol/L F 引物; 0.5  $\mu$ l 100 mmol/L R 引物; 1.25  $\mu$ l 10 mmol/L dNTP mix; 加水至 50  $\mu$ l; 再加 2.5 U Pfu DNA 聚合酶; 混匀。PCR 程序为: (95  $^{\circ}$ C, 10 min) + (95  $^{\circ}$ C, 30 s; 55  $^{\circ}$ C, 1 min; 68  $^{\circ}$ C, 13 min; 12 循环) + (94  $^{\circ}$ C, 1 min; 55  $^{\circ}$ C, 1 min; 72  $^{\circ}$ C, 10 min)。反应产物加 10 U Dpn I 酶, 37  $^{\circ}$ C 温育 1.5 h 消化野生型质粒, 选择得到突变体。PCR 分别将 Z $\alpha$  cDNA 上第 38 位密码子 AAC(N) 和第 60 位密码子 TGG(W) 突变为 GCC(A) 和 GCG(A)。

突变质粒先转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  稳定扩大, 测序验证, 然后再转化表达宿主菌 BL21(DE3), 得到 N38A

和 W60A 突变体, 经 IPTG 诱导表达。

## 1.4 蛋白质表达与纯化

按照文献<sup>[9]</sup>所述方法原核表达并纯化 CaPZ $\alpha$ 1 (包含 Z $\alpha$ 1)、CaPZ $\alpha$ 2 (包含 Z $\alpha$ 2) 和 CaPZ $\alpha$  (包含 Z $\alpha$ 1, Z $\alpha$ 2) 多肽以及 CaPZ $\alpha$ 38N (N38A)、CaPZ $\alpha$ 60W (W60A) 多肽。

## 1.5 构建 d(GC)<sub>13</sub> 重组质粒 pMD18-T/(GC)<sub>13</sub>

合成的 d(GC)<sub>13</sub> 序列(5'-GGATCCGCGCGC-GCGCGCGCGCGCGCGCGCGGATCCA-3')在退火缓冲液(10 mmol/L Tris, 50 mmol/L NaCl; 1 mmol/L EDTA, pH 7.6)中 95  $^{\circ}$ C 加热 2 min 后自然冷却, 形成在 3' 末端突出一个 A 的双链 DNA。按说明书连接到 pMD18-T 载体(TaKaRa)上。将得到的 d(GC)<sub>13</sub> 重组质粒转化到感受态 DH5 $\alpha$  细胞, 涂布 LB 平板, 蓝白斑筛选。挑取白斑克隆, 测序验证质粒上载有 d(GC)<sub>13</sub> 片段。构建 pMD18-T/(GC)<sub>13</sub> 重组质粒。

## 1.6 凝胶阻滞试验

蛋白质与 DNA 冰浴温育 30 min, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测(1 $\times$ TAE 缓冲液, 电压 5 V/cm), 电泳结束后 0.5  $\mu$ g/ml 溴化乙锭(EB)染色 15 min。凝胶阻滞试验中, 质粒浓度为 90.0  $\mu$ g/ml; 蛋白质浓度为 1.0 mg/ml。

## 2 结果

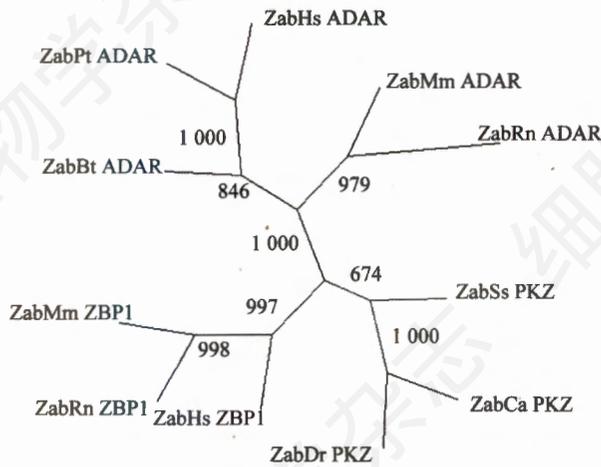
### 2.1 Z $\alpha$ 的系统发生

从系统发生树(图 1)来看, 3 种 ZBP 的 Z $\alpha$  结构域序列聚类明显。5 种哺乳类 ADAR1 处于一枝, 而 3 种鱼类 PKZ 与 3 种哺乳类 ZBP1 有更近源的进化关系。CaPKR-like 序列(ZabCa\_PKZ)和斑马鱼(ZabDr\_PKZ)具有很高的相似性(Bootstrap 值 1 000)。生成的系统发生树用作为适应性进化分析的一个数据来源。

表 1 N38A 与 W60A 的定点突变引物

名称	引物	突变目的
38DF	5'-GACAAATCCACCGTGACAGACATTGTACAAC-3'	N38D
38DR	5'-GTTGTACAAATGTCTGTACACGGTGGATTGTC-3'	N38D
38AF	5'-GACAAATCCACCGTGACAGACATTGTACAAC-3'	D38A
38AR	5'-GTTGTACAAATGTCTGTACACGGTGGATTGTC-3'	D38A
60GF	5'-GAAAAGCCTCCTGTTGGGATCTAATGGAGAAG-3'	W60G
60GR	5'-CTTCTCCATTAGATCCC AACAGGAGGCTTTTC-3'	W60G
60AF	5'-GAAAAGCCTCCTGTTGGGATCTAATGGAGAAG-3'	G60A
60AR	5'-CTTCTCCATTAGATCCC AACAGGAGGCTTTTC-3'	G60A

为提高突变的效率, 本文采用两轮 PCR 定点突变法。38DF+38DR 引物组合, 用以产生点突变 N38D。再以 N38D 模板, 用 38AF+38AR 引物组合产生点突变 D38A, 由此产生了点突变 N38A。60GF+60GR 引物组合, 用以产生点突变 W60G。再以 W60G 模板, 用 60AF+60AR 引物组合产生点突变 G60A, 由此产生了点突变 W60A。

图1 Z $\alpha$  系统发生树

11 个 Z $\alpha$  同源序列分别为 3 个 ZabZBP1 序列: 小鼠(ZabMm\_ZBP1, NP\_067369), 大鼠(ZabRn\_ZBP1, XP\_342595), 人(ZabHs\_ZBP1, NP\_110403); 3 个 ZabPKZ 序列: 鲫鱼(ZabCa\_PKZ, AAP49830), 斑马鱼(ZabDr\_PKZ, CAG25513), 鲑鱼(ZabSs\_PKZ, ABA64562); 5 个 ZabADAR1 序列: 猩猩(ZabPt\_ADAR1, XP\_513841), 人(ZabHs\_ADAR1, NP\_056656), 牛(ZabBt\_ADAR1, XP\_581374), 小鼠(ZabMm\_ADAR1, AAK16102), 大鼠(ZabRn\_ADAR1, NP\_112268)。分枝上的数字为 bootstrap 1 000 次的支持率, 代表分歧度。

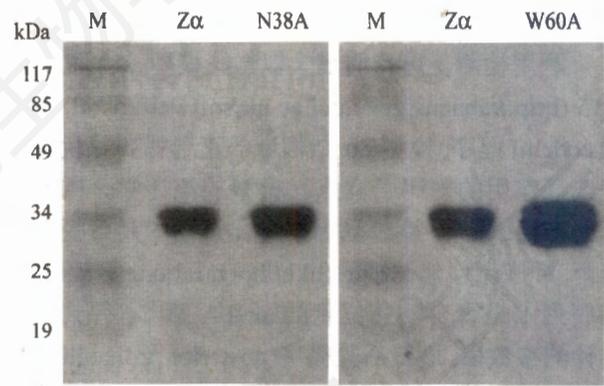
## 2.2 Z $\alpha$ 正选择分析

适应性进化分析的结果显示(表 2)。M3&M0 的  $\chi^2$  检验极显著(1%,  $df=5-1=4$ ,  $71.188 > 13.276$ ), M8&M7 的  $\chi^2$  检验也极显著(1%,  $df=4-2=2$ ,  $10.266 > 9.210$ ), 说明 M3 与 M8 的参数估计具有显著的统计学意义。模型 M3 指示正选择的参数  $\omega_1=0.933$ , 模型 M8 指示正选择的参数  $\omega=0.842$ 。这两个参数都小于 1, 意味着 Z $\alpha$  结构域序列上的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  $p_0=0.786$ , 模型 M8 的参数  $p_0=0.943$ , 表示受到选择约束的位点的比例, 说明 Z $\alpha$  结构域上大多数位点受到功能或结构上的选择约束, 以及序列在进化上的高度保守性。

表 2 Z $\alpha$  正选择检验参数估计

模型	P	lnL(l)	2 $\Delta$ l	参数估计	正选择位点
M0	1	-3 436.433		$\omega=0.283$	无
M3	5	-3 400.839	71.188**	$p_0=0.786$ , $p_1=0.110$ ( $p_2+p_3=0.105$ ), $\omega_0=0.040$ , $\omega_1=0.933$ , $\omega_2=0.301$	无
M7	2	-3 409.890		$p=0.975$ , $q=2.070$	无
M8	4	-3 404.757	10.266**	$p_0=0.943$ , $p_1=1.104$ , $q=2.753$ , $p_1=0.057$ , $\omega=0.842$	无

P 是模型的自由参数数目。lnL(l) 是最大似然值的对数, 2 $\Delta$ l 是 M3&M0 及 M8&M7 间 lnL(l) 之差的两倍。\*\* 表示似然比检验极显著。 $p_0$  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 和 M8 中  $\beta$  分布 B( $p, q$ ) 的参数。 $\omega$  指示正选择位点的参数。

图 2 CaPZ $\alpha$  的纯化

蛋白质由 15% SDS-PAGE 分离。M: marker。Z $\alpha$ : CaPZ $\alpha$ 。N38A: 突变蛋白质 CaPZ $\alpha$ 38N。W60A: 突变蛋白质 CaPZ $\alpha$ 60W。

## 2.3 CaPZ $\alpha$ 的纯化

原核表达的 CaPZ $\alpha$  及 CaPN38A 和 CaPW60A, 经 His-Bind Kit 纯化(图 2)。如图 2 所示纯化效果较好, 可以进行凝胶阻滞试验。

## 2.4 Z $\alpha$ 与质粒 DNA 的结合

凝胶阻滞试验分析了 5 种纯化多肽 PZ $\alpha$ 1、PZ $\alpha$ 2、PZ $\alpha$ 、PZ $\alpha$ 38N、PZ $\alpha$ 60W 与 pMD18-T/(GC)<sub>13</sub> 和 pMD18-T 质粒的亲性(图 3)。

PZ $\alpha$ 1、PZ $\alpha$ 2、PZ $\alpha$ 1+PZ $\alpha$ 2 (PZ $\alpha$ 1 与 PZ $\alpha$ 2 的混合物)都不对 pMD18-T/(GC)<sub>13</sub> 迁移产生阻滞效应, 说明单独的 PZ $\alpha$ 1 和 PZ $\alpha$ 2 子域不能结合 pMD18-T/(GC)<sub>13</sub> (图 3)。而 PZ $\alpha$  对 pMD18-T/(GC)<sub>13</sub> 产生明显的阻滞效应, 且随着 PZ $\alpha$  浓度的增加, DNA 的阻滞效应越明显。在相同条件下, 任何形式的 PZ $\alpha$  多肽均不能结合 pMD18-T。

PZ $\alpha$ 38N 和 PZ $\alpha$ 60W 不能结合 pMD18-T/(GC)<sub>13</sub>。

## 2.5 负超螺旋影响 Z $\alpha$ 结合质粒 DNA

在电泳体系中加入 EB 后, CaPZ $\alpha$  及 CaPZ $\alpha$ 38N、CaPZ $\alpha$ 60W 突变蛋白均对 pMD18-T/(GC)<sub>13</sub> 无阻滞效应(图 4), 且随着蛋白质含量(4、8  $\mu$ l)的增加, 质粒 DNA 的迁移率无明显变化。

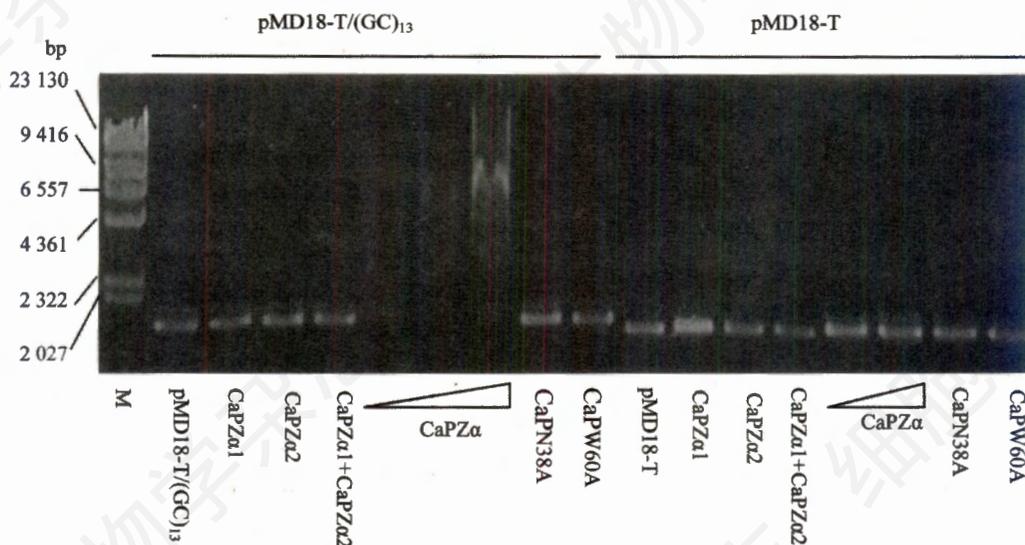


图3  $PZ\alpha$  与  $pMD18-T/(GC)_{13}$  和  $pMD18-T$  质粒的结合

1.0% 琼脂糖凝胶,  $1\times TAE$  缓冲液,  $5 V/cm$ , 凝胶中不加 EB, 电泳后在  $0.5 \mu g/ml$  EB 中染色 15 min。10  $\mu l$  体系, 8  $\mu l$  1.0 mg/ml 蛋白质和 2  $\mu l$  90.0  $\mu g/ml$  DNA。

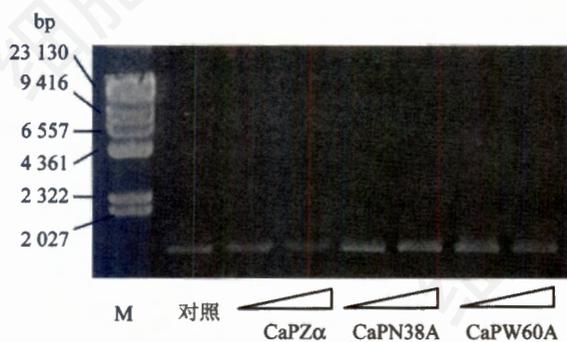


图4 负超螺旋对  $CaPZ\alpha$  结合质粒 DNA 的影响

1.0% 琼脂糖凝胶,  $1\times TAE$  缓冲液,  $5 V/cm$ , 凝胶加入 1.0  $\mu g/ml$  EB。M: marker。对照: 不加蛋白质的  $pMD18-T/(GC)_{13}$ 。

### 3 讨论

分析基因或蛋白质的适应性进化, 有利于进一步了解其功能和演化规律。基于最大似然法的密码子替换模型可以很好地获得符合数据的真实解释, 已成为检测适应性进化一种常规可靠的手段<sup>[10-12]</sup>。本文用密码子替换模型分析  $Z\alpha$  结构域的适应性进化(表 2), 发现  $Z\alpha$  在进化过程中没有受到正选择作用( $\omega < 1$ ), 且受到选择约束的位点比例  $p_0$  高达 78.6% (M3) 或 94.3% (M8), 说明蛋白质序列上大多数氨基酸位点处于保守的负选择压力之下,  $Z\alpha$  结构域呈现高度的进化保守性。因此, 不同来源的  $Z\alpha$  在功能上有极大的同一性。

在基因组中, RNA 聚合酶作用于基因时所产生的负超螺旋易使附近的 B-DNA 转变为 Z-DNA。虽

然负超螺旋似乎是形成 Z-DNA 的充分条件, 但形成 Z-DNA 的区域其核苷酸有强烈的偏好性, 即交替排列的嘌呤 - 嘧啶区域在负超螺旋条件下能形成 Z-DNA。而与  $d(A-T)$  等序列相比, 交替的  $d(C-G)$  序列最容易形成 Z-DNA<sup>[13]</sup>。电泳或 2D 电泳均显示质粒常态下多呈现为负超螺旋, 因此插入在热力学上易于形成 Z-DNA 的  $d(GC)_n$  序列的重组质粒能于体外形成 Z-DNA 构象<sup>[14]</sup>。本文据此构建了含有  $d(GC)_{13}$  片段的  $pMD18-T/(GC)_{13}$  质粒。不过, Herbert 等<sup>[15]</sup>认为形成 Z-DNA 可能不需要负超螺旋, 只需  $d(GC)_n$  序列, 他发现体外发夹结构  $d[(CG)_3T_3(CG)_3]$  中的  $d(GC)_3$  能形成 Z-DNA, 并能与  $Z\alpha$  结合而趋于稳定。

为验证  $Z\alpha$  结构域与 DNA 负超螺旋、 $d(GC)_n$  及 Z-DNA 的关系, 本文设计了  $pMD18-T/(GC)_{13}$  质粒凝胶阻滞试验和 EB 干扰试验。当琼脂糖凝胶中不加 EB, 电泳后再用 EB 染色时, 结果显示包含  $CaPZ\alpha 1$  和  $CaPZ\alpha 2$  两个亚结构域的  $CaPZ\alpha$  不能与  $pMD18-T$  结合, 但却能与  $pMD18-T/(GC)_{13}$  结合(图 3), 并表现与  $Z\alpha_{ADAR1}$  相同的结合特性<sup>[16]</sup>。随着蛋白质浓度的增加, 对质粒 DNA 的凝胶阻滞效果越明显, 这说明  $CaPZ\alpha$  可能是结合  $pMD18-T/(GC)_{13}$  中插入的  $d(GC)_{13}$  序列片段。而其他条件相同, 琼脂糖凝胶中含有 1.0  $\mu g/ml$  EB 时,  $CaPZ\alpha$  则不能对  $pMD18-T/(GC)_{13}$  产生阻滞效应(图 4), 这可能是 EB 消除了质粒 DNA 的负超螺旋<sup>[17,18]</sup>, 从而降低  $CaPZ\alpha$  与 DNA 的结合活性。结果暗示: DNA 负超螺旋和  $d(GC)_n$  可能都是正常生

理条件下形成潜在 Z-DNA 必不可少的因素, 而 CaPZ $\alpha$  能结合 Z-DNA。

Z $\alpha$  结构域和核酸的识别与结合是特异性的, 人 Z $\alpha_{\text{ADAR1}}$  的 169K、170K、173N、174R、177Y、191T、192P、193P 和 195W 等 9 个氨基酸位点参与结合 Z-DNA 骨架, 其中 173N 和 195W 通过水分子介导而与 Z-DNA 接触<sup>[19]</sup>。本文选取 CaPZ $\alpha$  上与人 173N 和 195W 相对应的 38N 与 60W 位点定点突变。凝胶阻滞试验显示这两个位点突变使 CaPZ $\alpha$  对 pMD18-T/(GC)<sub>13</sub> 失去阻滞效应(图 3), 并且两个点突变对核酸结合活性的缺失同样严重。结果表明 38N 和 60W 这两个氨基酸残基对 CaPZ $\alpha$  与 DNA 的结合活性可能非常重要。

#### 参考文献(References)

- [1] Herbert A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 8421
- [2] Fu Y *et al.* *Gene*, 1999, **240**: 157
- [3] Kim YG *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 6974
- [4] Hu CY *et al.* *Fish Shellfish Immunol*, 2004, **17**: 353
- [5] Rothenburg S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 1602
- [6] Athanasiadis A *et al.* *J Mol Biol*, 2005, **351**: 496
- [7] Nielsen R *et al.* *Genetics*, 1998, **148**: 929
- [8] Yang Z *et al.* *Mol Biol Evol*, 2000, **17**: 32
- [9] 胡成钰等. *动物学研究*, 2005, **26**: 237
- [10] Yang Z *et al.* *Mol Biol Evol*, 2002, **19**: 49
- [11] 张文娟等. *科学通报*, 2006, **51**: 1894
- [12] 陶 敏等. *遗传*, 2007, **29**: 1519
- [13] Ho PS *et al.* *EMBO J*, 1986, **5**: 2737
- [14] Lushnikov AY *et al.* *Nucleic Acids Res*, 2004, **32**: 4704
- [15] Herbert A *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**: 3486
- [16] Schwartz T *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 2899
- [17] Brahm S *et al.* *Eur J Biochem*, 1989, **184**: 297
- [18] 卢圣栋主编. *现代分子生物学实验技术*, 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004, 80
- [19] Schwartz T *et al.* *Science*, 1999, **284**: 1841

## Binding of the Z $\alpha$ from *Carassius auratus* PKR-like to d(GC)<sub>13</sub> Plasmid and Its Analysis of Adaptive Evolution

Min Tao, Chu-Xin Wu, Pan Yang, Cheng-Yu Hu\*

(College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

**Abstract** The Z $\alpha$  domain from several proteins of species could recognize and bind to Z-DNA. The structure of Z $\alpha$  domain was conserved and diverged from a common ancestor. Z $\alpha$  was highly functional conserved during the evolution by adaptive evolutionary analysis. Therefore, the Z $\alpha$  was not in the positive selection pressure. The peptides, CaPZ $\alpha$ , CaPN38A and CaPW60A were expressed by a prokaryotic expression system and purified by affinity chromatography. CaPZ $\alpha$  has the ability to bind to pMD18-T/(GC)<sub>13</sub> instead of pMD18-T by the gel band shift assay. The binding of the CaPZ $\alpha$  to (GC)<sub>13</sub> is weaker than ADAR1 Z $\alpha$ , because the CaPZ $\alpha$ 1 or CaPZ $\alpha$ 2 can not bind to pMD18-T/(GC)<sub>13</sub>. Though the function of the Z $\alpha$  doesn't vary, these are different. The negative supercoil and d(GC)<sub>n</sub> maybe the necessary factors for DNA to form Z-DNA conformation. The site directed mutagenesis proved that the two amino acid sites, 38N and 60W, are important for CaPZ $\alpha$  binding to DNA.

**Key words** PKR-like; Z $\alpha$ ; d(GC)<sub>n</sub>; adaptive evolution; Z-DNA binding protein

Received: January 7, 2008 Accepted: April 10, 2008

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30560116)

\*Corresponding author. Tel: 86-791-8785566, E-mail: hucy2008@21cn.com