

人线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因 A3243G 点突变对其亮氨酰化活性的影响

汪振诚^{1,2}, 王学敏², 金由辛¹, 缪明永², 韩伟国¹, 焦炳华²

(1. 中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031;

2. 第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

摘要: 化学法合成人线粒体野生型与 A3243G 点突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 基因, 体外转录生成相应的 tRNA^{Leu(UUR)}, 表达并纯化人线粒体亮氨酰 tRNA 合成酶(mtLeuRS), 用 mtLeuRS 催化野生型与突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 与亮氨酸结合, 分别检测两种类型 tRNA^{Leu(UUR)} 的氨酰化动力学常数。结果表明, 野生型 tRNA^{Leu(UUR)} 的 K_m/K_{cat} 仅为突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 的 63.9%, A3243G 点突变使 tRNA^{Leu(UUR)} 接受亮氨酸的能力明显下降, 提示此为 A3243G 点突变致病机制之一。

关键词: 人线粒体 tRNA^{Leu(UUR)}; A3243G 点突变; 氨酰化; 体外转录; 人线粒体亮氨酰 tRNA 结合酶

中图分类号: Q522+.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2003)04-0383-05

Effects of A3243G Point Mutation on Aminoacylation of Human Mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)}

WANG Zhen-Cheng^{1,2}, WANG Xue-Min², JIN You-Xin¹,
MIAO Ming-Yong², HAN Wei-Guo¹, JIAO Bing-Hua²

(1. State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031, China;

2. Department of Basic Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Secondary Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: The wild-type and mutant-type human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} genes were synthesized and transcribed *in vitro* with T7 RNA polymerase. The kinetic parameters of human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase (mtLeuRS) were determined with wild-type and mutant-type human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} respectively. The results show that the value of K_m/K_{cat} of mtLeuRS for the mutant-type tRNA^{Leu(UUR)} is 63.9% as compared with the wild-type. Human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene A3243G point mutant can remarkably reduce its aminoacylation activity, suggesting it would be one of the mechanisms that the mutation could produce such clinical phenotypes.

Key words: human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)}; A3243G point mutant; aminoacylation; transcription *in vitro*; human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase

收稿日期: 2002-07-22; 修回日期: 2002-09-17

基金项目: 中国科学院重要方向项目资助(批准号: KSCX-2-2-04) 和国家自然科学基金资助项目(30171030)

作者简介: 汪振诚(1971-), 男, 汉族, 博士, 讲师, 研究方向: 人线粒体基因突变与疾病。电话: 021-25070881-8015

E-mail: wangzhencheng_@hotmail.com

通讯作者: 王学敏, 男, 教授, 博士生导师, 专业: 生化与分子生物学。Tel: 021-25070881-8005

金由辛, 男, 教授, 博士生导师, 专业: 生化与分子生物学。Tel: 021-64315030-5222

致谢: 感谢上海生化所王恩多教授赠送(U-14C)Leu。

线粒体是细胞内重要的细胞器,其主要功能是氧化磷酸化产生生命活动所需要的 ATP。线粒体含有自己的一套 DNA,可以编码 13 种多肽,2 种 rRNA 和 22 种 tRNA。线粒体基因突变会导致人体产生与能量代谢相关的疾病,在这些突变当中,tRNA 基因突变占 75% 以上^[1]。在 tRNA 基因突变中,人线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因 A3243G 点突变为最常见类型,携带突变的病人可表现为神经性耳聋、线粒体脑肌病伴乳酸性酸中毒及中风样发作综合征(MELAS 病)等多种症状^[2~4]。目前已有研究表明,在 MELAS 病人中,线粒体内 tRNA^{Leu(UUR)} 的表达量并没有下降^[5],提示该突变可能会影响 tRNA^{Leu(UUR)} 的生物学活性。

本实验化学合成了人线粒体野生型与突变型 tRNA^{Leu} 基因,通过体外转录的方法生成相应的 tRNA^{Leu(UUR)} 分子。利用大肠杆菌表达的人线粒体亮氨酸 tRNA 合成酶(mtLeuRS)催化 tRNA^{Leu(UUR)} 与亮氨酸的特异性结合反应,观察 A3243G 点突变对 tRNA^{Leu(UUR)} 亮氨酸化活性的影响,为相关疾病机制的探讨乃至疾病的治疗提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大肠杆菌 BL21-codonPlus (DE3)-RIL; F⁻, ompT, hsdS(r_B⁻ m_B⁻)dcm + Tetr gal λ(DE3) end A Hte[argU ileY leuW Cam^r]购自 Stratagene 公司,人线粒体亮氨酸 tRNA 合成酶(mtLeuRS)表达载体 pET-24a(+)-mtLeuRS 重组质粒系自行构建,Ni-NTA 琼脂糖凝胶购自 Novagen 公司,Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶及各种限制性核酸内切酶购自 TaKaRa 公司,RiboMAX large-scale RNA production system-T7 购自 Promega 公司,Amershan 公司的 (U-¹⁴C)Leu 由上海生化所王恩多教授赠送,寡脱氧核苷酸由中科院上海生化所合成。

1.2 人线粒体 A3243G 突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 的制备

1.2.1 tRNA^{Leu(UUR)} 基因的克隆

化学合成人线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 野生型与突变型基因:GTT AAG ATG GCA GWG CCC GGT AAT CGC ATA AAA CTT AAA ACT TTA CAG TCA GAG GTT CAA TTC CTC TTC TTA ACA CCA(W=A 为野生型 tRNA^{Leu(UUR)} 基因;W=G 为突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 基因)。同时合成一对引物,上

游引物:CTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG TTA AGA TGG CAG,含有 T7 启动子;下游引物:AGC TTC CTG GTG TTA AGA AG,含有 BstOI 酶切位点(图 1)。以合成的基因为模板进行 PCR,其反应条件为:94℃ 1min,56℃ 1min,72℃ 1min,循环 35 次,最后 72℃ 保温 10min。PCR 产物用酚/氯仿抽提,乙醇/醋酸氨沉淀后,用 BstOI 于 60℃ 充分酶解 2h,以形成 CCA-OH 末端,同法进一步抽提沉淀后,溶于 Milipore 纯水中作为转录模板。

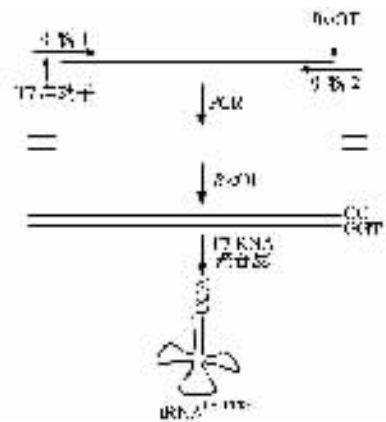


图 1 人线粒体野生型与突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 的制备示意图

Fig. 1 The procedure of human mitochondrial wild-type and mutant-type tRNA^{Leu(UUR)} preparation

1.2.2 T7 RNA 聚合酶体外转录

具体操作过程按 Promega 公司提供的方法进行,转录反应体系为:40mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0),15mmol/L MgCl₂,5mmol/L DTT,4mmol/L NTP,8mmol/L 5'-GMP,50nmol/L 模板 DNA,80U/μL T7RNA 聚合酶,37℃ 保温 3h,加入 DNase 继续 37℃ 保温 30min 以降解,乙醇醋酸氨沉淀后,10% 尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳,紫外灯下割胶纯化^[6]。

1.3 人线粒体亮氨酸-tRNA 合成酶(mtLeuRS)的表达与纯化

pET-24a(+)-mtLeuRS 表达质粒由我室自行构建,表达产生的酶蛋白去除了 N 端的信号肽,而 C 端则添加了 6-His 标签。将表达质粒转化入大肠杆菌 BL21CodonPlus-RIL,37℃ 过夜培养至饱和,按 1:50 比例转接于 1L 含 20μg/mL 氯霉素及 30μg/mL 卡那霉素的 2-YT 培养基中,37℃ 培养至对数生长期(A₆₀₀ 约为 0.6),加入 IPTG 至终浓度为

0.5 mmol/L, 继续 37°C 培养 4h, 5000r/min 离心 10min(4°C) 收获细菌。

将 1L 培养液中得到的 4g 左右菌体重悬于 8mL 裂解缓冲液中(50mmol/L NaH₂PO₄, pH8.0; 300mmol/L NaCl; 10mmol/L imidazole), 冰浴超声破碎。12000r/min 4°C 离心 15min 去除细胞碎片。上清中加入 3mL Ni-NTA 琼脂糖凝胶, 4°C 混匀装柱, 用裂解缓冲液及洗涤缓冲液(50mmol/L NaH₂PO₄, pH8.0; 300mmol/L NaCl; 20mmol/L imidazole) 先后洗柱, 使 OD₂₈₀ 稳定至基线不变。再经洗脱缓冲液(50mmol/L NaH₂PO₄, pH8.0; 300mmol/L NaCl; 100mmol/L imidazole) 洗脱, 收集含 6-His 标签的酶蛋白组分并用透析缓冲液(20mmol/L K₂HPO₄, pH6.8; 10mmol/L MgCl₂; 5mmol/L 2-巯基乙醇; 50% 甘油) 在 4°C 透析过夜。

1.4 人线粒体野生型与突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 氨酰化活性测定

按文献[7]测定 mtLeuRS 催化人线粒体野生型与突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 氨酰化活性, 20μL 总体积含 100mmol/L Tris-HCl (pH7.8), 30mmol/L KCl, 12mmol/L MgCl₂, 4mmol/L ATP, 0.1mmol/L EDTA, 0.5mmol/L DTT, 0.1mmol/L (U-¹⁴C) Leu, 100nmol/L mtLeuRS 和 5~25μmol/L tRNA^{Leu}, 37°C 充分反应 7min, 转移到直径 1.5cm 的圆滤纸片上, 放入冰冷的 10% 三氯乙酸 50mL 中固定 15min, 再用冰冷的 5% 的三氯乙酸洗涤 3 次, 以洗去未与 tRNA 结合的氨基酸, 再依次用 50mL 无水乙醇, 无水乙醚各洗涤 1 次, 使之脱水, 滤纸片干燥后分别装入含 5mL 闪烁液(0.5% PPO, 0.05% POPOP 的二甲苯溶液) 的闪烁杯内进行液闪计数。以反应体系中的底物浓度与对应的酶促反应速度为参数, Lineweaver-Burk 作图法计算两种 tRNA^{Leu(UUR)} 的动力学常数。

2 结 果

2.1 人线粒体亮氨酰 tRNA(tRNA^{Leu}) 的制备

以化学合成的人线粒体 tRNA^{Leu} 基因序列为模板, 用设计的引物对进行 PCR 扩增, 得到了含有 tRNA^{Leu(UUR)} 基因的 105 bp DNA 片段, 在 tRNA 基因上游为 T7 启动子, 下游为 BstOI 酶切位点, 用 BstOI 酶切后产生 98bp 带有 5'-GGT 的 DNA 片段(图 2)。

以该 DNA 片段做模板转录得到 3' 端为 CCA-OH 结尾的 tRNA^{Leu(UUR)}。转录产物可达模板量的

100 倍以上, 产物经 DNase 酶解模板 DNA, 10% 尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 割胶回收获得纯化的 tRNA^{Leu(UUR)}, 纯化的转录产物鉴定结果见 12% 尿素变性聚丙烯酰胺电泳后银染图(图 3)。

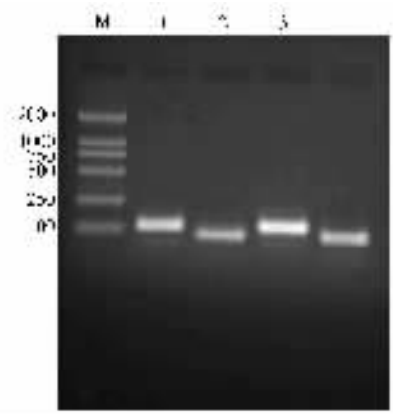


图 2 人线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因的制备

- 1: 野生型 PCR 产物; 2: 突变型 PCR 产物;
3: BstOI 酶切后野生型 PCR 产物;
4: BstOI 酶切后突变型 PCR 产物; M: LD2000 DNA Marker.

Fig. 2 The preparation of human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene

- 1: PCR products of wild-type tRNA^{Leu(UUR)} gene;
2: PCR products of mutant-type tRNA^{Leu(UUR)} gene;
3: PCR products of wild-type tRNA^{Leu(UUR)} gene digested by BstOI; 4: PCR products of mutant-type tRNA^{Leu(UUR)} gene digested by BstOI;
M: LD2000 DNA Marker.

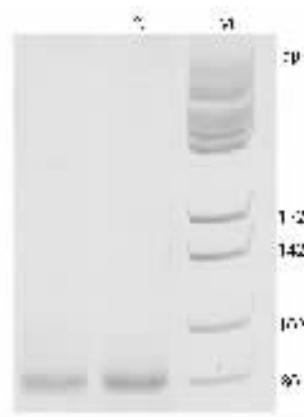


图 3 人线粒体野生型与突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 的尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析. 条带银染法显示

- 1: 野生型 tRNA^{Leu(UUR)}; 2: 突变型 tRNA^{Leu(UUR)};
M: pGEM-3Zf(+) DNA/HaeIII Markers.

Fig. 3 Urea-PAGE analysis of human tRNA^{Leu(UUR)} tRNA^{Leu(UUR)}

- 1: wild-type tRNA^{Leu(UUR)}; 2: mutant-type tRNA^{Leu(UUR)};
M: pGEM-3Zf(+) DNA/HaeIII Markers.

2.2 人线粒体 LeuRS 的表达与纯化

大肠杆菌 BL21-CodonPlus-RIL/pET-24a (+)-mtLeuRS 经 0.5mmol/L IPTG 诱导 4h 后 6000r/min 离心 10min, 菌体冰浴超声后离心以粗提细胞总蛋白, 粗提液与 3mL Ni²⁺-NTA 琼脂糖凝胶混合用于亲和层析。从 1L 细菌培养物中可得到约 5mg 的纯化蛋白, 凝胶扫描显示蛋白纯度在 95% 以上(图 4)。

2.3 人线粒体野生型与突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 氨酰化活性测定

按文献[7]介绍的方法检测人线粒体 LeuRS 催化相应的人线粒体野生型与突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 氨酰化的动力学常数, mtLeuRS 浓度为 100nmol/L, 在底物 tRNA^{Leu(UUR)} 浓度分别为 5~25μmol/L 的反应体系中, 检测产物¹⁴C-Leu-tRNA^{Leu(UUR)} 产生速度, 经 Lineweaver-Burk 作图法(图 5), 检测野生型与突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 的表观动力学常数 K_m 与 K_{cat}, 计算结果显示, 突变型 mtRNA^{Leu(UUR)} 的 K_{cat}/K_m 仅为野生型的 63.9%(表 1)。

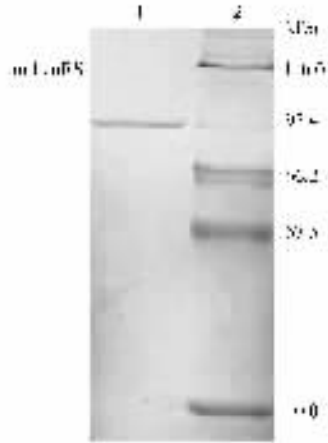


图 4 人 mtLeuRS 聚丙烯酰胺凝胶电泳
1: 纯化的 mtLeuRS-His₆; 2: 蛋白质分子质量标准。
Fig. 4 SDS-PAGE of human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase
1: purified human mitochondrial LeuRS-His₆; 2: protein standard markers.

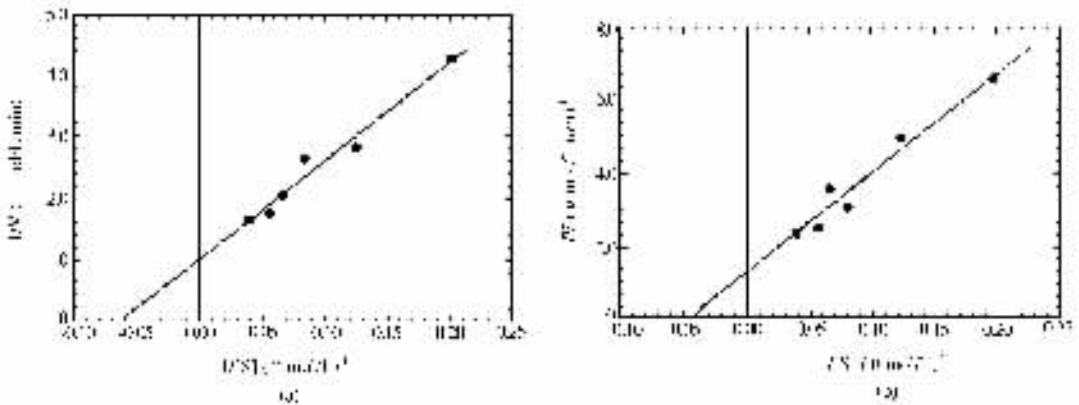


图 5 人线粒体 LeuRS 催化野生型与突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 亮氨酰化动力学常数测定
注: tRNA^{Leu(UUR)} 浓度在 5~25μmol/L 之间. 经 Lineweaver-Burk 作图法检测野生型与突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 的表观动力学常数 K_m 与 K_{cat}。

Fig. 5 Determination of kinetic parameters for the interaction of mtLeuRS with wild-type (a) and mutant-type(b) tRNA^{Leu(UUR)} in aminoacylation

Note: The concentration of tRNA^{Leu(UUR)} was varied between 5~25μmol/L. The data were analyzed on Lineweaver-Bark plots to give the K_m and V_{cat} values for the interaction of mtLeuRS with wild-type(a) and matant-type(b) tRNA^{Leu(UUR)}.

表 1 mtLeuRS 催化野生型与突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 亮氨酰化动力学常数

Table 1 The parameters for the interaction of mtLeuRS with wild-type and mutant-type tRNA^{Leu(UUR)} in aminoacylation

	K _m (μmol/L) ⁻¹	V _m (μmol/L·s) ⁻¹	K _{cat} (s ⁻¹)	K _{cat} /K _m (mmol/L·s) ⁻¹
野生型	16.7±0.98	0.0159±0.0011	0.159±0.007	9.52±0.35
突变型	21.7±1.33	0.0132±0.0013	0.132±0.005	6.08±0.30

3 讨 论

线粒体内多种蛋白质由核基因编码,但迄今尚未发现其中存在胞浆 tRNA,所有 tRNA 分子均由自身 DNA 转录产生。虽然人线粒体 DNA 可编码两种 tRNA^{Leu},但它们的反密码子不同,不能相互替代,任一 tRNA^{Leu} 功能缺陷,都必然影响线粒体内蛋白质的合成。人线粒体基因 nt3243 位点正对应于 tRNA^{Leu(UUR)} 分子 DHU 环的第一位碱基,有资料显示,该位点从海胆到均为保守的腺嘌呤^[8],提示这一碱基对 tRNA^{Leu(UUR)} 的活性具有重要意义。从空间构象来看,正常的 nt3243A 与氨基酸接受臂上的 T 碱基形成氢键^[9],对稳定 tRNA^{Leu(UUR)} 的三级结构具有关键作用。因此有理由认为,A3243G 点突变会严重影响 tRNA^{Leu(UUR)} 的生物学活性,最终导致疾病的发生。

为了检测人线粒体 A3243G 点突变对 tRNA^{Leu(UUR)} 接受亮氨酸活性的影响,我们化学合成野生型与突变型 tRNA^{Leu(UUR)} 基因,用 T7 RNA 聚合酶转录系统体外转录生成酶的底物 tRNA^{Leu(UUR)},T7 RNA 聚合酶转录系统由于操作简便,条件温和等特点,近年来在 RNA 研究领域有广泛应用^[10]。用这种方法制备的 tRNA 分子,并不含有天然 tRNA 分子中的修饰碱基,这种 RNA 能否识别相应的氨酰 tRNA 合成酶并结合氨基酸,从资料中看,不同的 tRNA 在这方面有不同的表现^[11],对于大肠杆菌 tRNA^{Ile} 分子而言,其反密码子第一位的碱基如未被正确修饰,则其接受异亮氨酸的活性大为降低;而人工合成的完全不含修饰核苷的 tRNA^{Asp} 与天然 tRNA^{Asp} 接受天冬氨酸的活性基本相同,更有趣的是,一个 tRNA^{Phe} 基因也能特意性地被氨基化。一般而言,修饰碱基对识别作用影响不大,体外转录方法制备的 tRNA 分子,仍可以作为相应的氨酰 tRNA 合成酶的有效底物^[12~14]。本实验用人线粒体 LeuRS,可催化体外转录的 tRNA^{Leu(UUR)} 接受亮氨酸,也证明这一结论。

参 考 文 献 (References):

[1] Schon E A, Bonilla E, DiMauro S. Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 1997, 29, 131~149.
 [2] XIANG Kun-San, LU Hui-Juan, WU Song-Hua, *et al*. Genetic diagnosis of a subtype mellitus-diabetes mellitus with mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} gene mutation[J]. *Chinese Journal of*

Medical, 1995, 75(4): 216~219.

项坤三, 陆惠娟, 吴松华, 等. 线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因突变糖尿病的基因诊断[J]. *中华医学杂志*, 1995, 75(4): 216~219.

- [3] LI Wei-Min, HAN Dong-Yi, YUAN Hui-Jun, *et al*. Screening for mitochondrial DNA mutation in two pedigrees with nonsyndromic inherited sensorineural hearing loss[J]. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 2002, 19, (1): 64~67.
 李为民, 韩东一, 袁慧军, 等. 非综合症型遗传性耳聋两家系线粒体基因突变分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2002, 19(1): 64~67.
 [4] Hanna M G, Nelson I P, Morgan-Hughes J A, *et al*. MELAS: a new disease associated mitochondrial DNA mutation and evidence for further genetic heterogeneity[J]. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 1998, 65 (4): 512~517.
 [5] Moraes C T, Ricci E, Bonilla W, *et al*. The mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} mutation in mitochondrail encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode (MELAS): genetic, biochemical and morphological correlations in skeletal muscle[J]. *Am J Hum Genet*, 1992, 50: 934~939.
 [6] Sambrook J, E F Fritsch, T Maniatis. "Molecular cloning: a laboratory manual"[M]. Science publishing house, 1992, 551~555.
 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 科学出版社, 1992, 551~555.
 [7] LI Y, Wang E D, WANG Y L, *et al*. The clone, expression and purity of *E. coli* tRNA^{Leu} gene[J]. *Science in China(C)*, 1998, 28 (3): 193~198.
 李 勇, 王恩多, 王应睐, 等. 大肠杆菌 tRNA^{Leu} 的基因克隆高效表达和纯化[J]. *中国科学(C 辑)*, 1998, 28(3): 193~198.
 [8] Anderson S, De Bruijn M H, Coulson A R, *et al*. Complete sequence and organization of the human mitochondrial DNA conversed features of the mammalian mitochondrial genome[J]. *J Mol Biol*, 1982, 156(4): 683~717.
 [9] Rich A, RajBhandary U I. Transfer RNA: molecular structure, sequence, and properties[J]. *Annu Rev Biochem*, 1976, 45: 805~860.
 [10] Sakes M E, Sampson J R, Albelson J N. The transfer RNA identity problem: a search for rules[J]. *Science*, 1994, 263: 191~197.
 [11] WANG D B, LIU W Y. tRNA-construction, function and synthesis[M]. Zhejiang Science & Technical Publishing House, 1995, 141~144.
 王德宝, 刘望夷, 著. 转移核糖核酸—结构功能与合成[M]. 浙江科学技术出版社, 1995, 141~144.
 [12] Jahn M, Rogers M J, Sill D. Anticodon and acceptor stem nucleotides in tRNA(Gln) are major recognition elements for *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase[J]. *Nature*, 1991, 352: 258~260.
 [13] Ptz J, Puglisi J D, Florentz C, *et al*. Identity elements for specific aminoacylation of yeast tRNA(Asp) by cognate aspartyl-tRNA synthetase[J]. *Science*, 1991, 252: 1696~1699.
 [14] Sampson J R, Uhlenbeck O C. Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed *in Vitro* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 1033~1037.