

tRNA^{Trp}的种属特异性元件*

陈 莉 金由辛** 王德宝

(中国科学院上海生物化学研究所分子生物学国家重点实验室,上海 200031)

黄敏婵 薛 红 王子晖

(香港科技大学生化系,香港)

摘要 通过同源性比较原核、古核和真核生物 tRNA^{Trp}的核苷酸序列表明 tRNA^{Trp}的种属特异性元件可能存在于氨基酸接受茎、D 茎、反密码茎以及识别位碱基等处。设计并完成了 tRNA^{Trp}的突变,体外转录及原核、真核两种不同来源的色氨酸 tRNA 合成酶对 tRNA^{Trp}及其突变体的测活以确定 tRNA^{Trp}的种属特异性元件,进一步揭示 tRNA^{Trp}及其合成酶之间的精确识别和共进化过程。原核野生型 tRNA^{Trp}其接受茎突变成真核相应的核苷酸后失去了被原核色氨酸 tRNA 合成酶氨酰化的活力,却被赋予了真核合成酶的氨酰化活力。反密码茎、D 茎对于氨酰化活力则影响细微。结果表明 tRNA^{Trp}的种属特异性元件主要位于接受茎部位,即氨基酸接受茎和识别位碱基处。研究结果对于 tRNA 进化及药物的设计具有重要的意义。

关键词 种属特异性元件 tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎 识别位碱基

氨酰 tRNA 合成酶对于 tRNA 的识别错综复杂。因为所有的 tRNA 都具有惊人相似的高级结构,而细胞中每一种氨酰 tRNA 合成酶必须从众多 tRNA 分子中鉴别出它自己的同工 tRNA。因此鉴定 tRNA 分子上对于有效氨酰化起决定性作用的一系列核苷酸即成为近 20 年来研究的焦点。

一些 tRNA 分子,如 tRNA^{Ala}可以被不同种属来源的合成酶氨酰化。另一些则不能交叉识别。原核来源的色氨酸 tRNA 合成酶不能够识别真核的 tRNA^{Trp},反之,真核来源的色氨酸 tRNA 合成酶也不能识别原核的 tRNA^{Trp}。91 种 tRNA^{Trp}基因的同源比较表明原核 tRNA^{Trp}和真核 tRNA^{Trp}之间存在着 A1G-U72C, G5C-C68G, A9G, U11C-A24G, G29U-C41A, U31A-A39U 和 G73A 等的差异^[1]。为了研究 tRNA^{Trp}的种属特异性元件,我们构建了含有朝向真核突变的 tRNA^{Trp}基因的质粒,并对进化过程中这些位点在种属特异性方面的作用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 引物

针对 5'端合成了两类引物。引物 1 为 5'通用引物,用于加 T7 启动子,使转录从 +1 位

1999-04-06 收稿,1999-07-05 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号:39770172)和中国科学院重大项目基金资助项目

** 联系人

即 tRNA^{Tp}基因起始;引物 2 为 5' 特异引物,用于 PCR 扩增时连接 T7 启动子与 tRNA^{Tp}基因. 3' 引物为特异引物,两次 PCR 中 3' 引物相同. 引物序列见表 1.

表 1 用于扩增野生型 tRNA^{Tp}及其突变体基因的引物^{a)}

引物	序列	用途
引物 1(5'引物)	5'-CTG GCC AAG TCG GCC TCT AAT ACG ACT CAC TAT A	第 2 次 PCR 5'通用引物
引物 2(5'引物)	5'-CTC TAA TAC GAC TCA CTA TAA GGG GCA TAG CIT AAC G	扩增 pWWT 和 pWM2
引物 2(5'引物)	5'-CTC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG CCA TGG TTT AAC	扩增 pWM1 和 pWM3
3'引物	5'-TCC CAA GCT TCC TGG CAG GGG CAG TAG	扩增 pWWT 和 pWM2
3'引物	5'-TCC CAA GCT TCC TGG TGG GGC CAG TAG	扩增 pWM1 和 pWM3

a)下划线部分为设计的酶切位点 *Sfi* I 和 *Hind* III,黑体部分为 *Bst* O I 位点

1.2 构建 pWM1, pWM2, pWM3 和 U11C-A24G

pWM1, pWM2 和 pWM3 三种 tDNA 序列同表 2 中 tRNA 序列,但所有核苷酸为脱氧核苷酸,且 U 被 T 取代. 构建质粒所需 tDNA 及引物均在本实验室合成. 构建程序参照文献[2]进行. 第 1 次 PCR 采用引物 2 及 3'引物,扩增片段长度为 106 bp. PCR 反应条件为 94℃, 1 min, 54℃, 45 s; 72℃, 30 s; 33 个循环; 72℃延伸 10 min. 第 2 次 PCR 以第 1 次 PCR 的产物为模板,采用引物 1 及 3'引物,扩增片段长度为 120 bp. PCR 反应条件为 94℃, 1 min; 72℃, 45 s; 33 个循环; 72℃延伸 10 min. 两次 PCR 后的产物经低熔点凝胶纯化,克隆到 pGEM-T 载体(Promega)中. 测序(Promega T7 DNA 聚合酶测序系统)鉴定含 tRNA^{Tp}基因的正确克隆. 少量制备该质粒经 *Sfi* I 和 *Hind* III 双酶切后亚克隆到 pGEM-9Zf(-) (Promega)载体的相应位点. U11C-A24G 由人工全合成的双链 tDNA^{Tp}基因(含有 T7 启动子和 *Sfi* I, *Hind* III, *Bst* O I 酶切位点)经退火后直接克隆到 pGEM-9Zf(-)载体中去.

1.3 tRNA^{Tp}的体外转录

50 μL 转录体系中含 10 μg 经 *Bst* O I 酶切线性化含 tRNA^{Tp}基因的质粒, 40 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.0), 15 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L DTT, 500 mg/L BSA (不含核酸酶), 1.5 mmol/L NTPs, 40 u RNasin (Promega), 200 u T7 RNA 聚合酶(Ampharmacia). 该反应物在 37℃保温 2 h, 然后加入 10 u DNase I, 37℃再保温 30 min. 12%变性聚丙烯酰胺凝胶回收转录产物.

1.4 B. subtilis 色氨酰 tRNA 合成酶与鼠肝氨酰 tRNA 合成酶粗酶的制备

E. coli 高表达的 *B. subtilis* 色氨酰 tRNA 合成酶的纯化见文献[3]. 鼠肝氨酰 tRNA 合成酶粗酶的制备为取 3 只大白鼠(2 个月, 约 150 g)肝脏共 14.41 g, 用 9 g/L NaCl 洗涤 2 次, 于缓冲液 A(0.34 mol/L 蔗糖, 0.002 mol/L MgOAc)中进行组织匀浆破碎. 2 300 r/min 4℃离心除去组织碎片后, 上清在 4℃ 42 000 r/min 超离心 2 h 去除悬浮物. 随后上清进行硫酸铵分级沉淀, 饱和度 45% ~ 55% 的酶粗提物重悬于 1 mL 缓冲液 B(0.3 mol/L KCl, 0.02 mol/L Tris-Cl pH = 7.5, 0.001 mol/L MgOAc, 0.001 mol/L β-巯基乙醇)经 DEAE-纤维素柱层析(10 cm × 20 cm), 用缓冲液 B 洗脱, 将所得含酶活力的峰收集, 对缓冲液 C(0.02 mol/L Tris-Cl pH = 7.5, 0.001 mol/L MgOAc, 0.001 mol/L β-巯基乙醇)透析, 最终对缓冲液 D (50% 甘油, 0.02 mol/L Tris-Cl pH = 7.5, 0.001 mol/L MgOAc, 0.001 mol/L β-巯基乙醇)透析后 -20℃冻存.

1.5 测定体外转录的 tRNA^{Tp}色氨酰化活力

tRNA^{Tp}色氨酰化反应条件基本与文献[3]相同. 滤纸片先用 1 g/L 色氨酸溶液浸泡过夜以竞争性地降低本底, 临用前烘干. 取 10 μL tRNA^{Tp}色氨酰化反应液点样, 用 100 mL 冰预冷

50 g/L TCA(含 0.5% 色氨酸)洗涤 3 次,再用 10 mL 95% 乙醇及无水乙醚各洗涤一次. 滤纸干燥后在 Wallac 1490 液闪计数器上对 $[^3\text{H}]$ -tryptophan (Ampharmacia)计数.

2 结果

2.1 含 tRNA^{Trp}基因的质粒构建

通过两次 PCR 及 pGEM-T 载体的中介,将 tRNA^{Trp}及其突变体的基因最后克隆到 pGEM-9Zf(-)载体的 *Sfi* I 和 *Hind* III 位点中去. 重组质粒经由测序鉴定最终筛选出正确的克隆. 所构建的质粒大小约 3.0 kb,含有一个 T7 启动子控制 tRNA^{Trp}基因的转录,并可以进行体内表达和体外转录两种产物的活力测定(见图 1).

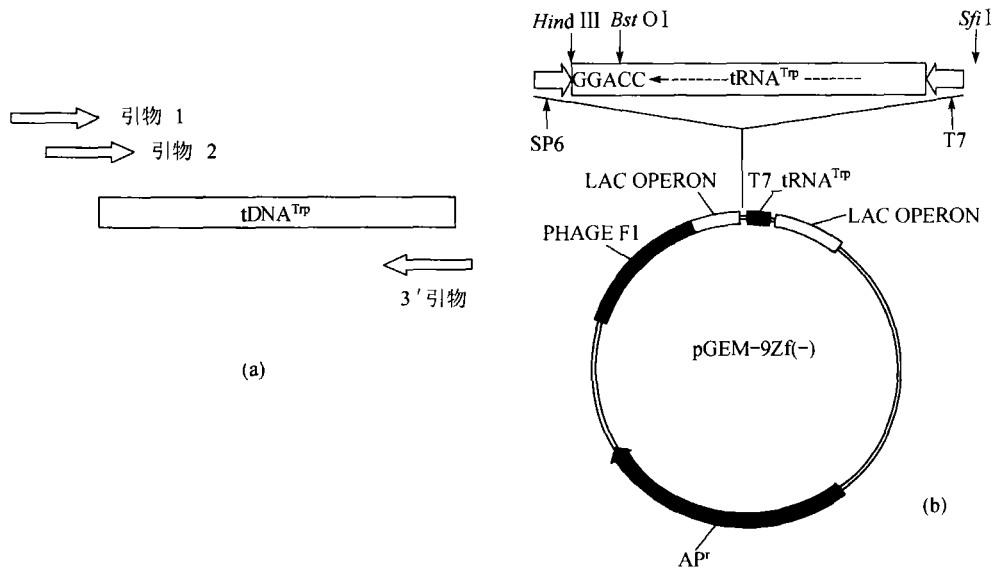


图 1 PCR 扩增 tRNA^{Trp}基因(a)和含 tRNA^{Trp}基因的 pGEM-9Zf(-)质粒构建图谱(b)

经与同源序列比较而获得的突变体为 4 种:(1)tRNA^{Trp}倒 L 型分子一条臂的突变即接受茎部位的突变(pWM1): A1G-U72C, G5C-C68G, A9G 和 G73A 突变体;(2)tRNA^{Trp}倒 L 型分子另一条臂的突变即反密码茎及 D 茎部位的突变(pWM2): U11C-A24G, G29U-C41A 和 U31A-A39U 突变体;(3)包括上述两种突变体的全部突变(pWM3);(4)单独进行了 D 茎 U11C-A24G 的突变(U11C-A24G)(见表 2).

2.2 原核及真核色氨酸 tRNA 合成酶对 tRNA^{Trp}及其突变体的活力测定

4 种突变体的体外转录产物用 *E. coli* 高效表达的 *B. subtilis* 色氨酸 tRNA 合成酶进行氨酰化活力测定. 结果表明 pWM1 和 pWM3, *B. subtilis* 野生型(pWWT)tRNA^{Trp}其氨基酸接受茎及识别位碱基朝向真核方向的突变体,显著丧失了被色氨酸氨酰化的活力. 而 D 茎和反密码茎突变体 pWM2 则与野生型的活力相当. D 茎的突变体 U11C-A24G 是枯草杆菌色氨酸 tRNA 合成酶的较差底物. 与此相应,在真核大白鼠肝粗酶测定中得到相反的变化. pWWT, pWM2 及 U11C-A24G 突变体均具有原核的氨基酸接受茎,均不能被真核粗酶有效地氨酰化;而 pWM1 和 pWM3 被移植了真核方向的氨基酸接受茎及识别位碱基,均被赋予了一定的真核色氨酸 tRNA

合成酶氨酰化活力(图2).

表2 野生型枯草杆菌 tRNA^{Trp}及其突变体的序列比较^{a)}

tRNA ^{Trp}	tRNA ^{Trp} 基因
pWWT	<u>A</u> GGGGCAUAGUUUACGGUAGA <u>A</u> CA <u>G</u> AGGUCUCCAAA <u>A</u> CCUCCGG--
pWM1	<u>G</u> GGG <u>C</u> CAU <u>G</u> GUUUAACGGUAGA <u>A</u> CA <u>G</u> AGGUCUCCAAA <u>A</u> CCUCCGG--
pWM2	<u>A</u> CGGGCAUAGCUUAACGGUAGAG <u>C</u> GGGAUG <u>A</u> CUCCAAA <u>U</u> CAUCCGG--
pWM3	<u>G</u> GGG <u>C</u> CAU <u>G</u> CCUUAACGGUAGAG <u>C</u> GGGAUG <u>A</u> CUCCAAA <u>U</u> CAUCCGG--
U11C-A24G	<u>A</u> GGGGCAUAGCUUAACGGUAGAG <u>C</u> AGGUCUCCAAA <u>A</u> CCUCCGG--
pWWT	UGUGGGUCCGAUCCUACUGCC <u>C</u> CCUGCCA
pWM1	UGUGGGUCCGAUCCUACUGCC <u>C</u> CC <u>A</u> CCA
pWM2	UGUGGGUCCGAUCCUACUGCC <u>C</u> CCUGCCA
pWM3	UGUGGGUCCGAUCCUACUGCC <u>C</u> CC <u>A</u> CCA
U11C-A24G	UGUGGGUCCGAUCCUACUGCC <u>C</u> CCUGCCA

a) 黑体下划线部分为突变位点

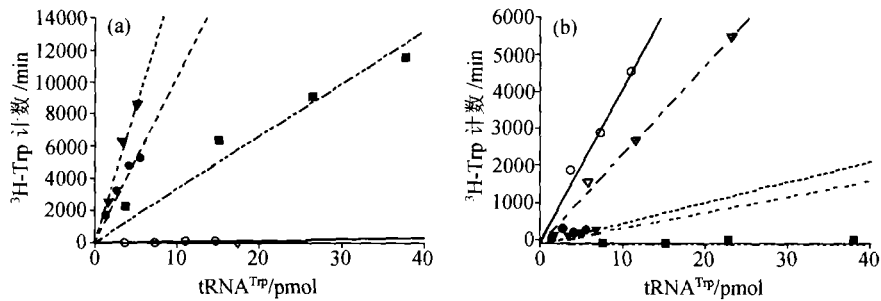


图2 野生型及其突变体的氨酰化测定

(a) 枯草杆菌色氨酸 tRNA 合成酶; (b) 鼠肝色氨酸 tRNA 合成酶粗酶, ●表示 pWWT, ○表示 pWM1, ▼表示 pWM2, ▽表示 pWM3, ■表示 U11C-A24G

2.3 原核色氨酸 tRNA 合成酶对 tRNA^{Trp}及其突变体的动力学常数测定

结果总结如表3. 我们比较了枯草杆菌色氨酸 tRNA 合成酶对各种突变体与野生型 tRNA 的氨酰化催化效率. 当采用原核色氨酸 tRNA 合成酶测定时, pWM2 尽管具有真核的 D 茎及反密码茎, 其与枯草杆菌合成酶之间的结合能力及最大反应速度与野生型处于相当的水平. 而 U11C-A24G 突变体的 V_{max} 较低一些, 有可能其结构出现了松散, 因而不能够与合成酶很好地结合.

表3 不同来源色氨酸 tRNA 合成酶对枯草杆菌 tRNA^{Trp}及其4种突变体的动力学常数测定

氨酰 tRNA 合成酶	枯草杆菌色氨酸 tRNA 合成酶		鼠肝色氨酸 tRNA 合成酶粗酶
	$K_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$V_{max}/\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	$^3\text{H-Trp}$ 计数/ tRNA^{Trp}
pWWT	0.57	7.4×10^5	37.9
pWM1	—	—	359.9
pWM2	0.64	5.1×10^5	28.8
pWM3	—	—	229.3
U11C-A24G	0.77	3.9×10^5	1.8

a) 为每 pmol tRNA^{Trp}的计数

3 讨论

本文采用两步 PCR 法构建各种 tRNA^{Trp}基因,在大量构建 tRNA 基因时,可以节约基因构建的成本。

我们的研究表明了 tRNA^{Trp}的种属特异性元件主要集中在氨基酸接受茎和 3' 端第 4 个碱基即识别位碱基上。已有文献报道了 tRNA^{Trp}的部分个性元件,即主要个性元件 G73,反密码子 CCA,次要个性元件 A1-U72, G5-C68 和 A9^[1]。比较可以得知, tRNA 的种属特异性元件与部分的个性元件一致。值得注意的是, CCA 反密码子不在其中,暗示了反密码子在进化中的绝对保守性。同源性比较揭示了原核、真核来源的 tRNA^{Trp}在进化过程中主要差异位点有 16 个,但影响原核、真核氨酰 tRNA 合成酶识别的位点仅 9 个。因而有可能在进化过程中 tRNA 中的核苷酸突变是自发的,随机发生的。只有影响到生物功能的位点,才可能通过酶的突变来恢复 tRNA 的高活力,而不影响活力的位点则以中性突变保留了下来。

众所周知,形成三级结构的很多氢键与 tRNA 中的不变核苷酸密切相关。D 茎和反密码茎在三级结构中处于相邻位置,与可变环一起通过疏水作用相互堆积而共同稳定 tRNA 倒 L 型结构另一端的构型。U11-A24 正处于不变和半不变核苷酸的位置,因而仅 U11C-A24G,即按照半不变核苷酸进行的嘌呤碱基间或嘧啶碱基间的置换,有可能引起构象的细微改变,从而对 tRNA 及其合成酶的相互识别产生一定的影响。而 D 茎及反密码茎向真核方向的共同突变则有可能产生一种弥补效应而削弱了这种影响。另外,尽管 pWM3 更倾向于真核 tRNA,它被鼠肝粗酶色氨酰化的活力却并没有超过 pWM2。有可能也是因为 U11A-A24G 松散了 tRNA^{Trp}的三级结构。对此有待进一步的研究。

tRNA 是古老而具有多功能的分子。tRNA 及其类似物中含有生命早期的痕迹,因而系统地研究 tRNA 个性元件就有可能推测出遗传密码的起源及进化途径^[4~7]。另外,针对 tRNA 与合成酶的相互作用区域,亦即氨基酸接受茎及识别位碱基,合理地设计 tRNA 类似物,有可能成为颇具潜力的治疗药物^[8,9]。有望设计出靶向病原体 tRNA 的新型抑制剂,阻断 tRNA 与大分子的结合。

参 考 文 献

- 1 Xue H, Shen W, Giege R, et al. Identity elements of tRNA^{Trp}. *J Biol Chem*, 1993, 268: 9316
- 2 Sampson J R, Uhlenbeck O C. Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 1033
- 3 Xu Z J, Love M L, Ma L Y Y, et al. Tryptophanyl-tRNA synthetase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 1989, 264: 4304
- 4 Schimmel P, Giege R, Morast D, et al. An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 8763
- 5 Dick T P, Schamel W W A. Molecular evolution of transfer RNA from two precursor hairpins: implications for the origin of protein synthesis. *J Mol Evol*, 1995, 41: 1
- 6 Schimmel P, Poupalan L R. Transfer RNA: From minihelix to genetic code. *Cell*, 1995, 81: 983
- 7 Giulio M D. On the origin of the transfer RNA molecule. *J Theor Biol*, 1992, 159: 199
- 8 Higgs D, Schimmel P. Cell growth inhibition by sequence-specific RNA minihelices. *EMBO J*, 1995, 14: 4050
- 9 Giege R, Frugier M, Rudinger J. tRNA mimics. *Curr Opin Struct Biol*, 1998, 8: 286