

人线粒体 tRNA^{Leu(UUR)} 基因氧化损伤与修复研究*

汪振诚 王学敏** 缪明永 焦炳华

(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 人 mtDNA 比核 DNA 更易受到自由基的氧化损伤, 这些损伤可以被线粒体内的 DNA 修复机制所修复, 损伤与修复是决定突变是否产生的两个重要因素. 为了确定氧化损伤与损伤后修复对 mtDNA 突变的具体影响, 采用四氧嘧啶处理 LO₂ 细胞, 这种试剂进入细胞后, 经氧化还原反应生成的自由基与线粒体自身代谢产生的自由基类似, 然后观察自由基对细胞 mtDNA 的氧化损伤与损伤后 DNA 修复的动力学变化. 由于线粒体的正常功能为修复机制所必需, 采用 MTT 细胞活力实验检测不同浓度四氧嘧啶处理下线粒体酶活力, 发现 9 mmol/L 四氧嘧啶培养细胞 1 h 后, 线粒体琥珀酸脱氢酶功能在撤去药物后 0, 2, 8 和 24 h 时间点均无明显变化. 提取各组细胞的 mtDNA, 用 *Endo* III 和 *Fgp* 两种酶切除受氧化损伤的核苷酸, 然后用碱性琼脂糖凝胶电泳分离大小不等的 mtDNA, 进行 DNA 印迹实验, 地高辛-抗体-碱性磷酸酶系统显色, 检测完整与断裂的 mtDNA 量, 利用 Poisson 公式 ($s = -\ln P_0/P$, P_0 为未断裂链光密度值, P 为所有链光密度值总和) 计算一个 mtDNA 分子的平均损伤频率, 结果显示, 9 mmol/L 四氧嘧啶处理细胞 1 h, 链平均损伤频率由对照的 0.11 个/分子增加至 5.60 个/分子, 明显增加了 mtDNA 上核苷酸的氧化损伤, 除去药物后 8 h, 绝大部分损伤可被修复, 损伤频率减至 0.40 个/分子, 除去药物后 24 h 核苷酸的氧化损伤恢复至正常水平. 采用接头介导 PCR (LM-PCR) 检测 *MTTL1* 基因区域内单个核苷酸的损伤与修复动力学. 这种方法可以检测各组 mtDNA 上 *MTTL1* 基因 75 bp 区域内单个核苷酸损伤的部位及频率. 结果显示, 人 *MTTL1* 基因存在 20 个易受氧化损伤的核苷酸热点, 经与相应区域内文献报道的 16 个突变热点比较, 有 12 个热点部位重合, 而修复未显示热点部位或区域. 结果提示, 自由基对核苷酸的选择性氧化损伤是决定 mtDNA 点突变发生及发生部位的主要原因.

关键词 线粒体 DNA, tRNA^{Leu(UUR)}, 突变, 人线粒体亮氨酸 tRNA 合成酶, A3243G, 体外转录, 基因表达

学科分类号 Q522^{+.1}

人线粒体 DNA (mtDNA) 突变可导致多种疾病的发生, 如 Leber 遗传性视神经病变 (LHON), 线粒体脑肌病伴乳酸酸中毒及中风样发作综合征 (MELAS), 肌阵挛性癫痫和不规则红纤维病 (MERRF), Leigh's 综合症和并发色素性视网膜炎 (NARP) 等等均可由 mtDNA 突变引起^[1-4], 近年来还发现某些肿瘤也与 mtDNA 突变有关^[5]. 与核 DNA 不同之处是, 人体每个细胞含有数百至数千分子的 mtDNA, 突变型 mtDNA 与野生型 mtDNA 可共存于同一细胞, 即使 mtDNA 突变类型相同, 但突变 mtDNA 所占比率不同, 疾病的临床表现也有很大的差别, 这使突变致病机理研究变得十分困难. 因而, 认识 mtDNA 突变产生的原因, 预防突变的发生, 对线粒体疾病的研究具有重要意义.

不同类型的 mtDNA 突变, 其产生机制并不相同. 目前认为, mtDNA 缺失突变主要来源于复制过程中 DNA 聚合酶的滑动错配, 由于 mtDNA 上具有大量的重复序列, 在复制过程中, DNA 聚合酶 γ 可能从一段序列滑动至另一段重复序列, 导致中间

序列的缺失. 然而, 对 mtDNA 点突变原因的研究并没有较一致的看法, 目前认为, mtDNA 点突变可能由以下两种原因引起: 一是突变位点容易被外源因素损伤, 由于损伤过多, 难以被线粒体完全修复; 另一种则是修复机制不健全, 某类型某部位的损伤不易修复. 因此, 研究 mtDNA 损伤与修复过程, 对进一步探讨 mtDNA 点突变的机制具有重要意义.

目前认为, 致 mtDNA 损伤的主要原因是氧自由基, 线粒体是细胞氧自由基产生的主要部位, 研究表明, 人体内 95% 的氧供线粒体呼吸链进行氧化磷酸化产生 ATP, 即使在生理条件下, 这部分氧也会有少许渗漏而生成 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ 等多种氧自由基^[6]. 同时, 线粒体呼吸链还会产生其他

* 国家自然科学基金资助项目资助 (面上项目 39730120).

** 通讯联系人.

Tel: 025-84361219, E-mail: wangzhencheng_@hotmail.com

收稿日期: 2004-03-23, 接受日期: 2004-06-28

自由基, 例如泛醌自由基和黄素半醌自由基等。通常情况下, 线粒体内自由基浓度高达 10^{-11} mol/L, 如此高浓度的自由基必然对 mtDNA 具有强烈的损伤作用。

鉴于此, 本实验采用四氧嘧啶 (alloxan) 处理培养的人 LO₂ 肝细胞, 这种试剂进入细胞后, 经氧化还原反应, 生成的氧自由基与线粒体自身代谢产生的氧自由基类似^[7], 这些氧自由基攻击 mtDNA, 产生多种氧化性核苷酸^[8]。检测人 mtDNA 中 tRNA^{Leu(UUR)} 基因 (*MTTL1*) 核苷酸受损情况, 并观察 24 h 内受损核苷酸的修复过程。通过与 mtDNA 上已报道的点突变位点分布进行对比分析, 了解自由基损伤及线粒体修复机制在 mtDNA 点突变中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

人 LO₂ 正常肝细胞株由上海长海医院中医科提供, 四氧嘧啶, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 购自 Sigma 公司, RPMI 1640 培养液购自 Gibco 公司, 核酸内切酶 *Endo* III 和 *Fgp* 购自 Trevigen 公司, *Bam* H I 购自华美公司, 寡核苷酸引物及 FAM 荧光标记寡核苷酸引物均由上海生物工程服务有限公司合成。

1.2 药物制备

配制 HBSS 溶液和柠檬酸缓冲液^[9], 适量四氧嘧啶溶于 HBSS + 1% 柠檬酸缓冲液制成浓度为 1 mol/L 的四氧嘧啶应用液, 适量 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 溶于 HBSS 制成 0.5 g/L MTT 应用液。

1.3 细胞培养

用含 15% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液接种人 LO₂ 肝细胞, 5% CO₂, 37℃ 条件下培养, 待细胞增殖并长满培养瓶表面后, 0.25% 的胰蛋白酶 37℃ 消化 10 min, 轻轻吹打使团状细胞分散, 以适当的密度传代培养。

1.4 细胞活力测定

经胰蛋白酶充分消化分散的 LO₂ 细胞, 计数后以 5×10^4 个/孔接种至 24 孔培养平板, 培养 48 h 后细胞贴壁, 将 24 孔分为 A、B、C、D 四组, 加入 1 mol/L 四氧嘧啶至终浓度分别为 0, 3, 6, 9, 12, 15 mmol/L, 培养 1 h, 吸去培养液并用 HBSS 轻洗细胞 3 次, 再加入新鲜培养液分别培养 0 h, 2 h, 8 h 或 24 h, 加入 1 ml MTT 应用液,

37℃ 温浴 1 h, 检测紫色 formazon 晶体的产生量^[10], 判断细胞活力变化。本实验重复 2 次。

1.5 mtDNA 链损伤与修复样品制备

1.5.1 细胞制备: 人 LO₂ 肝细胞, 传代后培养 2 天至贴壁, 9 mmol/L 四氧嘧啶培养 1 h, HBSS 轻洗 3 次, 加入新鲜培养液分别培养 0 h, 2 h, 8 h 或 24 h 后收获细胞。同时收获未经四氧嘧啶处理的细胞作为对照。

1.5.2 细胞总 DNA 提取: 生理盐水洗涤上述细胞 3 次, 加入细胞裂解液 (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 0.3 g/L 蛋白酶 K, pH 8.0) 震荡混匀 10 min, 37℃ 水浴 6 h, 加入 NaCl 至终浓度为 1 mol/L, 颠倒混匀 10 min, 加入等体积氯仿/异戊醇 (24:1) 混匀, 2 000 r/min 离心 6 min, 吸取上清后重复氯仿/异戊醇抽提, 小心将上清移入另一 eppendorf 管, 加入 1/10 体积 NH₄Ac, 2 体积无水乙醇, 混匀后 -20℃ 放置 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 70% 乙醇洗 DNA 沉淀, 冰冻干燥后溶于水, 加入 RNA 酶 (无 DNA 酶) 至终浓度为 2.0 mg/L, 37℃ 水浴 1 h, 重新抽提 DNA 并溶于水, 紫外分光光度计 260 nm 处定量。

1.5.3 DNA 酶切样品制备: 取 10 μg 细胞总 DNA, *Bam* H I 酶切, 氯仿/异戊醇抽提回收, *Endo* III 和 *Fgp* 双酶切 30 min 除去损伤碱基, 酶切条件参照 Trevigene 公司提供的方法。酶切结束后, 80℃ 水浴 15 min 使酶失活, 加入 NaOH 至终浓度为 0.1 mol/L, 37℃ 继续水浴 15 min 使 DNA 变性。准确定量 DNA 并用于 mtDNA 损伤的检测。

1.6 DNA 印迹检测 mtDNA 链损伤

1.6.1 mtDNA 特异性探针制备: 合成 mtDNA 特异性引物, 轻链引物 L1 (np2973 ~ np2994), 5' TAG GGT TTA CGA CCT CGA TGT T 3', 重链引物 H1 (np3566 ~ np3545), 5' GTT CAT AGT AGA AGA GCG ATG G 3'。以细胞总 DNA 为模板进行 PCR, 回收 PCR 产物, 用 Roche 公司的随机引物标记试剂盒制备探针, 50 μl 标记反应体系含 PCR 回收产物 100 ng, 寡核苷酸随机引物 5 μl, DNA 稀释缓冲液 5 μl。沸水浴 10 min, 迅速冰浴后加入 5 μl dNTP 和 3 μl Klenow 酶, 37℃ 水浴 6 h。标记的探针沸水浴变性 10 min 后, 立即冰浴并保存于 -20℃。

1.6.2 DNA 印迹: 取 200 ng DNA 酶切样品, 按文献 [11] 制备碱性琼脂糖凝胶并上样电泳 (100 mV/cm, 40 min)。电泳结束后, 采用真空转

移方法将 DNA 转移至带正电的尼龙膜上, 转移条件为 70 kPa, 30 min, 转移结束后, 剥去凝胶, 将膜置于 0.5 mol/L Tris · HCl (pH 7.2)、1 mol/L NaCl 溶液中, 室温浸泡 15 min, 取出后吸干水份, $0.4 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ 强度紫外光 (254 nm) 照射 30 s, 将膜置杂交管中, 加入 10 ml 预杂交液 ($5 \times$ Denhardt'S 溶液, $6 \times \text{SSC}$, 0.5% SDS, 50% 甲酰胺, 0.1% 十二烷基肌氨酸钠) 42℃ 预杂交 2 h, 取上述 mtDNA 特异性探针 5 μl 加入, 42℃ 杂交过夜. 次日按文献 [12] 方法漂洗杂交膜, 加入 1:10 000 地高辛抗体复合物并最终显色. 天能 GIS 凝胶图像处理软件检测各组断裂链与未断裂链光密度值, mtDNA 链断裂的频率 (s) 按 Poisson 公式计算 ($s = -\ln P_0 / P$, P_0 为未断裂链光密度值, P 为所有链光密度值总和) [13].

1.7 接头介导 PCR 检测核苷酸链的损伤

接头介导 PCR (LM-PCR) 是研究较短区域内核苷酸损伤结果的有效方法, 其基本原理是, 利用特异性核酸内切酶切除受损碱基, 产生单链切口, 然后从某一固定位点向切口部位延伸 DNA 链, 延伸产物经 PCR 扩增后, 检测产物的长度可确定损伤核苷酸部位, 检测产物的量可确定相应损伤的发生频率. LM-PCR 检测 *MTTL1* 基因 (np3230 ~ np3304) 核苷酸损伤的过程见图 1.

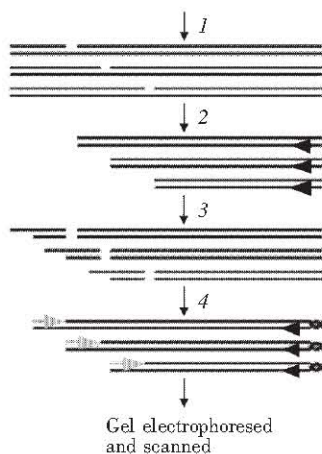


Fig. 1 Schematic procedure of ligation mediated PCR for detecting mtDNA oxidative damage

1: mtDNA cleavage by *Endo III* and *Fgp*; 2: First strand synthesis; 3: Ligation of linker; 4: PCR. $\leftarrow$: Primer L1; $-$: Linker; $-$: Linker primer; $\leftrightarrow$: End-labeled primer.

1.7.1 单链延伸: 以上述 DNA 酶切样品为延伸模板, 轻链引物 L1 为延伸引物. 20 μl 延伸反应体系

包括 1 μg DNA 模板, 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 引物 L1, 100 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, TaqDNA 聚合酶 2.5 U, $1 \times \text{PCR}$ 缓冲液. 反应过程为 95℃ 水浴 3 min, 60℃ 水浴 30 min.

1.7.2 接头制备: 合成两条寡核苷酸. Linker1, 5' GCG GTG ACT GGT ATC CAG TCG A 3'; Linker 2, 5' TCG ACT GGA T 3'. 经退火, 两条链可形成局部互补的双链接头. 接头制备过程为, 取 Linker1 (200 $\mu\text{mol/L}$) 和 Linker2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 各 10 μl 混匀, 95℃ 水浴 5 min, 70℃ 水浴 3 min 后缓慢冷却至 4℃.

1.7.3 接头连接: 取上述单链延伸产物 5 μl 及接头 1 μl , T4 连接酶 4 U, $10 \times$ 连接缓冲液 2 μl , 加水至 20 μl , 室温过夜. 合成 FAM 荧光 (500 nm) 标记的轻链引物 L2 (nt2 998 ~ nt3 019), 5' TCA GGA CAT CCC GAT GGT GCA G 3', L2 为 L1 的内迁引物, 内迁距离 25 bp. 以 L2 和 Linker1 为一对引物进行 PCR 扩增, 50 μl 反应体系包括接头连接产物 2 μl , Linker1 和荧光标记引物 L2 均 0.8 $\mu\text{mol/L}$, 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, TaqDNA 聚合酶 2 U, $1 \times \text{PCR}$ 缓冲液. PCR 反应过程为: 95℃ 水浴 3 min; 94℃, 40 s, 55℃, 30 s, 72℃, 30 s, 16 个循环; 72℃, 1 min.

1.7.4 荧光扫描: 常规酚/氯仿/异戊醇回收 PCR 产物, 无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤后干燥. 测序胶电泳, 500 nm 荧光扫描.

2 结 果

2.1 细胞活力测定

为了研究生理条件下自由基对 mtDNA 的致突变作用, 采用的模型必须尽可能保证线粒体功能的完整性. MTT 实验是确定线粒体功能是否完整的重要实验, 线粒体内的琥珀酸脱氢酶分解 MTT, 产生紫色 formazon 结晶, 通过比较用药组与对照组 formazon 晶体产量, 比较细胞活力, 可评价药物对线粒体功能的毒性损伤作用. 表 1 结果显示, 使用小于 9 mmol 四氧嘧啶, 在所检测的 24 h 内 (撤药后 0 h, 2 h, 8 h, 24 h) 未观察到细胞活力的下降, 即 9 mmol 四氧嘧啶对细胞没有明显的毒性作用, 而 12 mmol 和 15 mmol 的药物量, 则在撤药后 24 h 观察到细胞活力有不同程度的下降. 据此, 我们在后续实验中, 均采用四氧嘧啶 9 mmol 作为诱导研究 mtDNA 损伤的条件.

Table 1 MTT cell viability

Treatment	c (alloxan) / (mmol · L ⁻¹)						%
	0	3	6	9	12	15	
A	100	100	95	95	60	40	
B	100	100	100	90	70	60	
C	100	90	100	95	80	60	
D	100	90	95	90	75	70	

A: Cells exposed to alloxan for 1 h; B: Cells exposed to alloxan for 1 h then allowed to repair for 2 h; C: Cells exposed to alloxan for 1 h then allowed to repair for 8 h; D: Cells exposed to alloxan for 1 h then allowed to repair for 24 h.

2.2 DNA 杂交检测 mtDNA 链损伤

人 LO₂ 肝细胞经四氧嘧啶处理，细胞线粒体内氧自由基产生增多，自由基攻击 mtDNA，导致 DNA 碱基发生氧化修饰。Endo III 和 Fgp 是从大肠杆菌细胞内分离出来的两种特异性核酸内切酶，能识别多种类型的氧化碱基，将异常碱基切除，产生单链缺口。有缺口的 mtDNA 经 BamH I 酶切和 NaOH 变性，会产生大大小小的 DNA 片段，而正常完整的 mtDNA，经上述处理后仅产生 16 569 bp 的单一片段，通过 DNA 印迹检测完整与断裂 mtDNA 的量，可确定 mtDNA 的损伤程度。图 2 显示了 DNA 印迹实验结果，与未用药组（正常对照）相比，4 个用药组（A、B、C、D）断裂 mtDNA 的量均较多，其中 A 组受损最为严重，损伤 mtDNA 占总 mtDNA 量的 94%，按 Poisson 公式

计算，平均每 1 分子 mtDNA 有 5.60 个断裂位点。B、C、D 组损伤 mtDNA 占总 mtDNA 的量分别为 65%，18% 和 15%，平均每分子 mtDNA 断裂位点为 2.10、0.40 和 0.16 个，正常对照组损伤 mtDNA 占总 mtDNA 量的 10%，每分子 mtDNA 断裂位点数仅为 0.11 个。结果表明，在使用四氧嘧啶后，mtDNA 链上的碱基产生大量的氧化修饰，同时这些氧化修饰能被线粒体的修复机制所清除，随着修复时间的延长，被修饰的异常碱基逐渐减少，至用药 24 h 后，mtDNA 基本恢复正常。

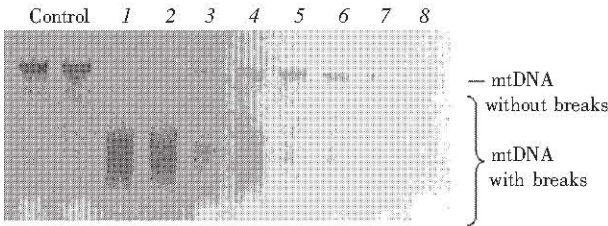


Fig. 2 Southern blot analysis of mtDNA oxidative damage Control: Cell exposed to HBSS + 1% citrate buffer for 1 h; 1, 2: Cells exposed to alloxan for 1 h; 3, 4: Cells exposed to alloxan for 1 h then allowed to repair for 2 h; 5, 6: Cells exposed to alloxan for 1 h then allowed to repair for 8 h; 7, 8: Cells exposed to alloxan for 1 h then allowed to repair for 24 h.

2.3 LM-PCR

LM-PCR 扩增 Endo III 和 Fgp 酶切的 MTTL1 基因，产物为大小不等的 DNA 片段，经测序胶电泳和荧光扫描，可确定受损核苷酸的部位与受损频率。本实验荧光扫描结果见图 3，结果显示，四氧

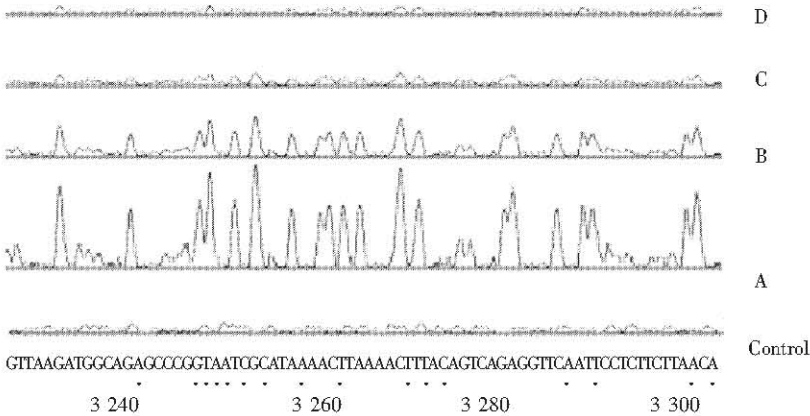


Fig. 3 LM-PCR analysis of oxidative damage at nucleotide resolution in MTTL1 gene Control: Cell exposed to HBSS + 1% citrate buffer for 1 h; A: Cells exposed to alloxan for 1 h; B: Cells exposed to alloxan for 1 h then allowed to repair for 2 h; C: Cells exposed to alloxan for 1 h then allowed to repair for 8 h; D: Cells exposed to alloxan for 1 h then allowed to repair for 24 h. *: Hot spots of nucleotide mutation in MTTL1 gene.

嘧啶处理1 h后(A组)的mtDNA样品,与对照组相比, *MTTL1* 基因区域内核苷酸受损大幅增加. 我们以峰的高度作为衡量受损频率的指标, 4种核苷酸受损频率占基因整个受损频率的比例分别为A: 36%, T: 31%, C: 21%, G: 12%, 对照相应区域内的核苷酸组成(A: 25, T: 21, C: 16, G: 13), 各种核苷酸对自由基的敏感性为T>A>C>G, 但敏感性差别并不明显. 这些损伤经修复后可逐渐恢复, 撤药后2 h(B组)40%被修复. 从A, B, C三组峰形来分析, 线粒体对各位点核苷酸的修复率没有明显差别, 显示修复对核苷酸没

有明显的选择性. 修复24 h后(D组)和对照组未见明显峰形, 即使将PCR增加至20个循环, 结果仍不理想(图未显示), 说明这两组氧化损伤很少. 从A组结果看, *MTTL1* 基因区域内存在核苷酸受损热点, 我们以最高的峰(np3256位点处)作为参照, 将超过其峰值50%的峰所对应的核苷酸定义为易受氧自由基攻击的热点核苷酸, 图3的结果表明, 3 235, 3 243, 3 250等20个位点处的核苷酸受损严重, 是自由基攻击的热点, 对比目前已发现的tRNA^{Leu(UUR)}点突变类型, 可见较多重合位点(表2).

Table 2 Hot spots of nucleotide mutation or of nucleotide oxidative damage in *MTTL1* gene

Nucleotide oxidative point			Nucleotide oxidative point			Nucleotide oxidative point		
position	damage	mutation	position	damage	mutation	position	damage	mutation
3 235	+	- -	3 260 *	+	+	3 282	+	- -
3 243 *	+	+	3 263	+	- -	3 283	+	- -
3 249	- -	+	3 264 *	+	+	3 288 *	+	+
3 250 *	+	+	3 265	+	- -	3 290	+	- -
3 251 *	+	+	3 267	+	- -	3 291 *	+	+
3 252	- -	+	3 271 *	+	+	3 301	+	- -
3 254 *	+	+	3 273 *	+	+	3 302 *	+	+
3 256 *	+	+	3 275	- -	+	3 303	- -	+

+: Hot spot (positive), - -: Hot spot (negative), *: Nucleotide position (np) as hot spot of both point mutation and oxidative damage.

3 讨 论

人mtDNA可编码两种携带亮氨酸的tRNA, 分别为tRNA^{Leu(UUR)}和tRNA^{Leu(CUN)}, 这两种tRNA识别的密码子不同, 在蛋白质生物合成体系中不能相互替代. 其中, 编码tRNA^{Leu(UUR)}的基因(*MTTL1*)全长75 bp(np3 230~np3 304), 基因编码产物识别的反密码子为UUA, UUG. 与mtDNA其他基因相比, *MTTL1* 基因点突变最能反映mtDNA点突变的特征: 一方面, *MTTL1* 基因区域突变种类多, 频率高, 截止2002年, 已发现的*MTTL1* 基因病理性点突变主要有16个位点, 21种类型(图4), 其中A3243G突变为常见突变; 另一方面, *MTTL1* 基因点突变可导致多种复杂的线粒体病, 如A3243G, A3252G, T3271C导致MELAS, C3303T, A3260G可导致肥大性心肌病等. 因而, 以*MTTL1* 基因作为靶基因研究氧自由基对mtDNA的致突变作用是有意义的.

本实验采用四氧嘧啶处理细胞, 保证实验结果客观准确的关键首先是药物的使用量, 如果用药量偏低, 则自由基产生少, 氧化受损的核苷酸少, 不利于结果的检测; 反之, 用药量过多, 细胞乃至线粒体结构或功能受损, 难以保证修复机制的正常进行, 同时, 过高的自由基会使靶基因区域内产生多个氧化核苷酸位点, 在后续的酶切和LM-PCR过程中, 离单链延伸引物近的位点会掩盖所有远端位点, 造成检测结果的偏差. 本实验采用9 mmol/L四氧嘧啶, 经MTT细胞活力实验证明对线粒体功能无明显影响. DNA印迹也显示, 在用药后各时间段提取的细胞, 其mtDNA断裂位点数都不超过5.60个/分子, 即在LM-PCR所检测的约600 bp范围内, 产生的氧化核苷酸数在1个以内.

*Endo III*与*Fgp*均是从大肠杆菌细胞内分离出的核酸内切酶, 这两种酶可识别并切割DNA分子中被氧化的核苷酸, 产生带5'-Pi末端的单链缺口^[14,15], 配合LM-PCR的使用, 可以高效地检测

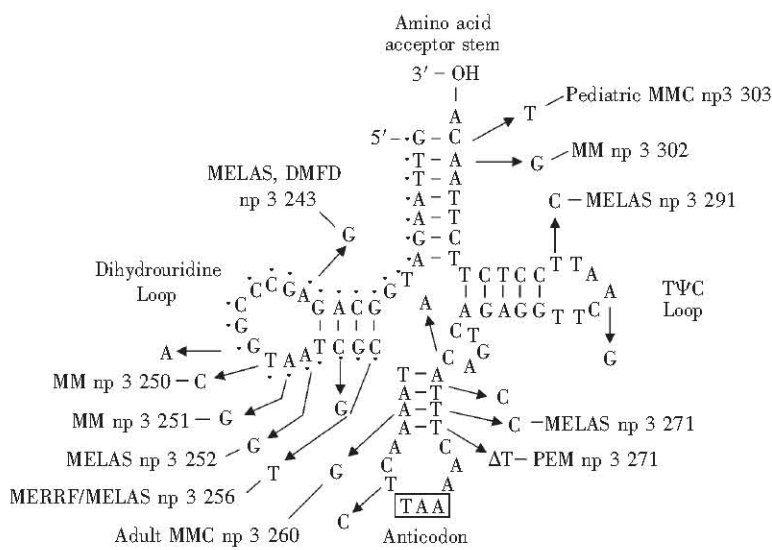


Fig. 4 Pathological mutations in tRNA^{Leu(UUR)}

<http://www.mitomap.org/MITOMAP/tRNAleu.pdf>

MTTL1 基因区域内受损核苷酸的位点与受损频率. 与常规 PCR 方法不同, LM-PCR 是 1989 年建立的一种单侧 PCR 技术, 原理在于, 从特定部位向核苷酸缺口处复制 DNA 链, 检测产物的长度, 以起始部位为坐标定位缺口, 产物的量则代表相应缺口链的丰度. LM-PCR 主要包括单链延伸, 接头连接, 常规 PCR 等步骤 (图 2), 为保证检测结果准确, 必须注意下列环节: a. 设计引物要有严格的特异性, 由于 mtDNA 含有数目极多的重复序列, 特异性差的引物无疑会产生大量的非特异性产物, 干扰缺口的定位和缺口链的定量. b. 寡核苷酸接头序列避免与 mtDNA 序列互补, 特别应避免与靶基因 *MTTL1* 序列互补, 这是因为常规 PCR 步骤需以接头序列为引物, 如接头引物特异性差, 同样会导致非特异性产物的产生. c. 接头末端均为 —OH, 以防止自身连接. 此外, 构成接头的两条链长短不同, 退火后一端为平末端, 另一端为黏性末端, 这样可保证单链延伸产物末端与接头的特异性高效连接.

LM-PCR 的终产物包括长度及丰度不等的一系列双链核苷酸, 这些核苷酸具有相同的起始点, 但终止部位不同. 为了检测这些产物, 可重新在起始点设计同位素标记引物, 经单链延伸后测序胶电泳, 杂交显影观察结果. 本实验首次采用荧光标记引物, 直接经测序仪电泳并荧光扫描, 可大大提高效率和实验结果的重复性.

采用四氧嘧啶处理人 LO₂ 肝细胞 1 h, DNA 印迹结果显示, mtDNA 分子上氧化核苷酸明显增多, 由未用药时的 0.11 个/分子增至 5.60 个/分子, 撤药后 2 h, 氧化核苷酸数目迅速减少, 平均为 2.10 个/分子, 8 h 后进一步减少为 0.40 个/分子, 24 h 后, 氧化核苷酸数目基本恢复至正常水平, 仅为 0.16 个/分子, 这表明, 线粒体内 DNA 修复机制正发挥作用, 并且, 这种修复功能会由于 mtDNA 上核苷酸氧化受损加剧而增强.

图 3 显示 *MTTL1* 基因区域核苷酸在用药前和用药后各时限时的氧化损伤谱, 从损伤程度看, 用药 1 h 后, 氧化核苷酸明显增多, 撤药后逐渐减少, 24 h 后基本恢复正常, 与 mtDNA 整体情况一致. 具体分析各组结果, 发现受损核苷酸分布基本相同, 用药结束后的 A 组, 存在 20 个受损频率高的位点, 这提示, 不同核苷酸受自由基攻击的敏感性不同, 或者说, *MTTL1* 基因区域存在易受氧自由基攻击的热点核苷酸 (表 2). 从以后各时段检测结果看, 修复没有选择性, 即修复没有热点之分. 受损热点较其他部位更易残留氧化核苷酸.

表 2 同时总结了目前已发现的常见 *MTTL1* 基因点突变, 与自由基攻击的核苷酸热点比较, 发现在 16 个常见的点突变位点当中, 有 12 个是自由基攻击的热点, 如此之高的相关性足够令我们得出结论: 氧自由基对核苷酸的选择性氧化损伤是决定 *MTTL1* 基因乃至 mtDNA 点突变发生及发生部位的

主要原因。

3 235, 3 263 等 8 个位点是自由基攻击的热点, 但目前尚未报道有突变的存在。我们认为, 正常人群中应该存在这些突变热点, 只是这些位点处的突变可能对基因产物的结构和功能没有明显影响, 突变不会导致明显的临床表型, 这些个体可能不被抽样检测, 因此相应点突变也易被疏漏。

从修复进度看, 24 h 后所有被氧化的核苷酸基本被清除, 说明修复机制对防止突变的发生具有重要作用, 线粒体修复机制如果足以清除自由基等因素对 mtDNA 的损伤, 突变便不会发生。因而, 针对某一具体突变, 很难确定是该位点损伤严重还是修复缺陷所引起。但比较而言, 损伤是矛盾的主要方面, 是决定突变发生及发生部位的主要原因。

总之, 本实验我们采用分子生物学技术, 首次从分子水平证明, 氧自由基攻击 mtDNA 造成的氧化损伤是 mtDNA 点突变产生的主要原因。自由基攻击的热点核苷酸是 mtDNA 点突变的潜在高发位点。本实验同时也留下新的疑问, 既然 *MTTL1* 基因 (或者说 mtDNA) 序列存在多个点突变的热点部位, 为什么从单一个体往往只能检测到其中一种或数种突变? 猜想线粒体内应该还存在某种筛选机制, 这种机制可针对性除去突变 mtDNA 分子, 侥幸逃脱的突变才最终得以保存。显然, 彻底揭示 mtDNA 点突变的产生还需要更深入的实验研究。

参 考 文 献

- Wallace D C, Singh G, Lott M T, *et al.* Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 1988, **242** (4884): 1427 ~ 1430
- Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA^{Leu(UUR)} gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, 1990, **348**: 651 ~ 653
- Wallace D C. Mitochondrial DNA mutations and neuromuscular disease. *Human genetic disease. Trends in Genet*, 1989, **5**: 9 ~ 13
- Schon E A, Rizzuto R, Moraes C T, *et al.* A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science*, 1989, **244**: 346 ~ 349
- Bianchi M S, Bianchi N O, Bailliet G. Mitochondrial DNA mutations in normal and tumor tissues from breast cancer patients. *Cytogene Cell Genet*, 1995, **71** (1): 99 ~ 103
- Richter C. Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. *Mutat Res*, 1992, **275**: 249 ~ 255
- Driggers W J, Holmquist G P, LeDoux S P, *et al.* Mapping frequencies of endogenous oxidative damage and the kinetic response to oxidative stress in a region of rat mtDNA. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (21): 4362 ~ 4369
- Richter C. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int J Biochem Cell Biol*, 1995, **27** (7): 647 ~ 653
- Spector D L, Goldman R D, Leinwand L A. *Cell: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab (CSHL) Press, 1998. 23 ~ 24
- Barres B A, Hart I K, Coles H S R, *et al.* Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, 1992, **70**: 31 ~ 46
- Ausubel F, Brent R, Kingston R E, *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd. USA: John Wiley & Sons, Inc., 1995. 75 ~ 76
- 毛积芳, 冯伟华. 分子生物学实验技术. 上海: 第二军医大学生化与分子生物学教研室, 2000. 28 ~ 32
- Mao J F, Feng W H. *Protocols in Molecular Biology*. Shanghai: Department of Biochemistry and Molecular Biology of Second Military Medical University, 2000. 28 ~ 32
- Bohr V A, Okumoto D S. In: Hanawalt P C, Friedberg E C eds. *DNA Repair: A Laboratory Manual*. New York: Marcel Dekker, 1988, **3**: 347 ~ 366
- Tchou J, Kasai H, Shibutani S, *et al.* 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylate and its substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (11): 4690 ~ 4694
- Tchou J, Bodepudi V, Shibutani S, *et al.* Substrate specificity of Fgp protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. *J Biol Chem*, 1994, **269** (21): 15318 ~ 15324

Oxidative Damage and The Repair Response Under Oxidative Stress in *MTTL1* Gene of Human Mitochondrial DNA *

WANG Zhen-Cheng, WANG Xue-Min **, MIAO Ming-Yong, JIAO Bing-Hua

(Department of Basic Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology,

Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Mitochondrial DNA is more prone to suffering from extensive oxidative damage than nuclear DNA. Base-excision repair which is well established in mitochondria may be involved in the prevention of nucleotides from oxidative damage. It is necessary to consider which severe damage or inadequate repair mainly contributes to the mutations in mtDNA. Human LO₂ liver cells were exposed to 9 mmol/L alloxan for 1 h and then incubated in fresh

culture media for 0, 2, 8 and 24 h respectively. The frequencies of oxidative base damage in mtDNA were measured by a quantitative Southern blot coupled with digestion by the enzymes endonuclease III and formamidopyrimiding DNA glycosylase. Next, ligation-mediated PCR (LM-PCR) was performed to map damage to specific nucleotides along a ~100 bp fragment including *MTTL1* gene. The addition of alloxan to cultured human cells increased the rate of oxidative base damage and, by several fold, the lesion frequency in mtDNA. After removal of this DNA damaging agent from culture, the lesion frequency decreased to levels slightly higher than normal at 8h and returned to normal levels at 24 h. The result of LM-PCR showed 20 hot spots of *MTTL1* gene where nucleotides were receiving a majority of damage. The pattern of oxidative damage is like that of point mutation identified in this gene, suggesting the possibility that oxidative damage mainly contributes to the formation of the point mutation in *MTTL1* gene.

Key words mitochondrial DNA, tRNA^{Leu(UUR)}, mutation, point mutant, human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase, A3243G, transcription *in vitro*, gene expression, purification, PCR

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (NS-FC: 30171030).

** Corresponding author. Tel: 86-25-84361219, E-mail: wangzhencheng__@hotmail.com

Received: March 23, 2004 Accepted: June 28, 2004

科学出版社《现代生命科学基础丛书》专辑

高级植物分子生物学

葛莘 编著 2004 年 7 月出版 7-03-012478-2/Q.1337 定价: 75 元

本书论述了分子生物学与植物分子生物学简史、植物的基因组与基因组学、基因的结构、基因的表达与调控、基因的功能分析、植物细胞的信号转导、植物细胞的分化和器官发育、植物生物技术等内容,并附有植物学和分子生物学词汇。所有各章均先介绍基本知识和理论,然后讲述相关的专题。这些专题都是近年来植物分子生物学的重大突破,因此具有很高的科学意义和现实意义。同时,通过讲评经典的科学论文来达到能力培养的目的。本书图文并茂,适合作为大学高年级或研究生的教学参考书。

数量生态学

张金屯 著 2004 年 8 月出版 7-03-012475-8/Q.1334 定价: 48.00 元

数量生态学的内容十分丰富。本书内容涉及到数量生态学的各个方面,包括过去半个世纪来有关数量生态学的主要发展,全面介绍现代数量生态学理论和方法,特别注重介绍国际上最常用的和近年来发展的新方法。全书反映了数量生态学发展的概貌,同时也展现了我国在这一领域的研究成果。对于有关学科的科技工作者和研究生,本书的内容已基本能够满足需要。书中所讲的方法,除植物生态学外,可以普遍应用于生物学、农学、林学、地理学、医药、环境科学等学科领域。

反刍动物营养学

冯仰廉 主编 2004 年 8 月出版 7-03-013784-1/Q.1446 定价: 78.00 元

本书由国内反刍动物营养学领域的老中青专家编著,系统的总结了国内外在反刍动物营养研究的先进性和规律性成果。全书共 10 章,包括瘤胃微生物、瘤胃鱼瘤胃内容物的特性、能量与营养、蛋白质营养、碳水化合物营养、脂肪营养、矿物质营养、维生素营养、同位素示踪技术在反刍动物营养中的应用、反刍动物营养实验技术。内容充实而精练,理论联系实际,行文简洁流畅。可作为农业院校动物营养和饲料专业本科生和研究生的教材,还可供畜牧科技和畜牧管理人员参考。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)。邮购地址:100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社 科学分社

联系人:阮芯 联系电话:010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目, 010-64012501