

水稻线粒体 tRNA^{Trp} 突变体的克隆和 氨酰化活力鉴定*

金晓玲¹⁾ 巩菊芳^{2)**} 刘雪梅¹⁾ 王晓红¹⁾ 张日清³⁾

¹⁾中南林业科技大学环境艺术设计学院, 长沙 410004; ²⁾浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004;

³⁾中南林业科技大学资源与环境学院, 长沙 410004)

摘要 为了研究 tRNA^{Trp} 的氨基酸接受茎中除两对半碱基以外的特异性元件, 设计并完成了 4 种水稻线粒体 tRNA^{Trp} 向枯草杆菌 tRNA^{Trp} 的突变体 (MPB0, G1A 和 U5G/A68C; MPB1, C2G/G71C; MPB2, C4G/G69C; MPB3, C2G/G71C 和 C4G/G69C), 体外转录并用枯草杆菌和人这两种不同种属来源的色氨酸 tRNA 合成酶(TrpRS)测定了这些 tRNA^{Trp} 分子的氨酰化活力(K_{cat}/K_M)。结果表明, 这些突变体具有被枯草杆菌 TrpRS 氨酰化的能力, 与野生型水稻线粒体 tRNA^{Trp} 相比, MPB0 被枯草杆菌 TrpRS 氨酰化的活力提高了 5 倍, MPB1 和 MPB2 被枯草杆菌 TrpRS 氨酰化的活力分别提高了 40 和 53 倍, MPB3 则提高了 140 倍, 为野生型枯草杆菌 tRNA^{Trp} 的 34%, 而人色氨酸 tRNA 合成酶氨酰化这 4 个突变体的活力都很微弱。揭示了水稻线粒体 tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎上的 2 个碱基对 C2/G71 和 C4/G69 的突变, 对枯草杆菌 TrpRS 的识别起重要作用, 由此推测, 接受茎上的 2 个碱基对 C2/G71 和 C4/G69 也是线粒体 tRNA^{Trp} 重要的特异性元件。

关键词 水稻线粒体 tRNA^{Trp}, 色氨酸 tRNA 合成酶, 氨酰化活力, 突变体

学科分类号 Q71, Q52

对于细胞的各种不同生化功能而言, 从基因把遗传信息正确翻译为蛋白质是至关重要的。在翻译过程中, 氨酰 tRNA 合成酶负责为各种 tRNA 分子选择相应的氨基酸, 这对遗传信息的正确翻译起到了关键作用。同一生物体内含有很多种 tRNA, 虽然它们各自接受不同的氨基酸, 但它们均具有相似的高级结构。氨酰 tRNA 合成酶必须从众多的 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^[1~3]。

已有研究表明, 枯草杆菌(*B. subtilis*)色氨酸 tRNA 合成酶(TrpRS)识别的个性元件是识别位碱基 G73 和反密码子(主要个性元件, 即影响较大的元件), A1/U72、G5/C68 和 A9(次要个性元件, 即影响较小的元件)^[4]。Xu 等^[5]的另一研究发现, 枯草杆菌色氨酸 tRNA (tRNA^{Trp}) 接受茎的 3 个碱基对 (G2/C71, G3/C70 和 G4/C69) 被证明为新的种属特异性元件。说明枯草杆菌 tRNA^{Trp} 的个性元件主要集中在氨基酸接受茎上。

但是, 对线粒体 tRNA^{Trp} 的相关研究报道很少。何新霞等^[6]的研究表明, 水稻线粒体 tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎两对半碱基即 G73, G1-U72, U5-A68 向枯草杆菌 tRNA^{Trp} 转变的突变体被枯草杆菌 TrpRS 氨酰化活力虽然有了一些提高, 是野生型水稻线粒体 tRNA^{Trp} 的 5 倍, 但与枯草杆菌 tRNA^{Trp} 的氨酰化活力相比, 差异甚殊, 这预示着在水稻线粒体 tRNA^{Trp} 中存在着其他更重要个性元件, 它们起着抵抗枯草杆菌 TrpRS 识别的决定作用。金晓玲等^[7]在此基础上, 构建了 7 个水稻线粒体 tRNA^{Trp} 三位点(G73, U72, A68)向人 tRNA^{Trp} 的 单点或多点突变的突变体, 以研究原核生物和真核生物(细胞质) TrpRS 对线粒体 tRNA^{Trp} 识别的种属特异性。结果表明, 识别位碱基 G73, 氨基酸接受

* 浙江省自然科学基金资助项目(Y204417)。

** 通讯联系人。

Tel: 0579-82283136, E-mail: sky103@zjnu.cn

收稿日期: 2008-03-30, 接受日期: 2008-05-06

茎上的两个碱基对 G1/U72 和 U5/A68 是水稻线粒体 tRNA^{Trp} 的种属特异性元件。然而, 金晓玲等的研究结果还发现, 虽然突变体 MPH7 的氨基酸接受茎具有人 tRNA^{Trp} 的个性元件, 赋予了部分真核 tRNA^{Trp} 的特性, 但是, 它的氨酰化活力仍只有野生型人 tRNA^{Trp} 的 10%。这个事实预示着在线粒体 tRNA^{Trp} 中存在着除 G73, U72 和 A68 外的种属特异性元件。

线粒体 tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎的 2, 3, 4 三个碱基对是否与枯草杆菌 tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎的 2, 3, 4 三个碱基对类似, 是线粒体 tRNA^{Trp} 种属特异性元件并在枯草杆菌 TrpRS 的识别中起关键作用? 为了证明这一点, 我们设计了线粒体 tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎 2~71 和 4~69(3~70 碱基对相同) 单对或两对同时向枯草杆菌 tRNA^{Trp} 转变的 3 种突变体, 体外转录并用枯草杆菌和人这两种不同种属来源的色氨酰 tRNA 合成酶测定了这些突变体的氨酰化活力, 以检验线粒体 tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎中这两对碱基对在种属特异性氨酰化中的确切作用, 更好地揭示氨酰 tRNA 合成酶识别相应的 tRNA 分子的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

Escherichia coli JM109, PUC19 T-vector、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、T4 DNA 连接酶、*Bst* O I

限制性内切酶, RNase-free DNase 均购自 TaKaRa 公司, RiboMAXTM Large Scale RNA Production System-T7 购自 Promega 公司, L-[5-³H]色氨酸为 Amersham Pharmacia 公司产品。L-色氨酸购自 Gibco BRL 公司。用于构建含 tRNA^{Trp} 基因质粒的寡核苷酸由上海英骏公司合成。其他试剂皆为国产分析纯。*B. subtilis* TrpRS 和人 TrpRS 由中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所提供。

1.2 引物及含线粒体 tRNA 基因的质粒构建

针对突变体 MPB0, MPB1, MPB2, MPB3 的不同, 设计特异性引物 A, 引物 A 的 5'引物均带有 T7 启动子(TAATACGACTCACTATA, 表 1 中标有下划线), 3'引物则带有 *Bst* O I 酶切位点(CCTGG, 表 1 中标有下划线), 以水稻线粒体 tRNA^{Trp}(*Oryza sativa* mitochondria tRNA^{Trp})基因为模板进行 PCR 反应后, 连接到 T-vector PUC19, 再转化到感受态大肠杆菌(JM109), 将测序正确的 4 种大肠杆菌转化子分别摇菌, 提取质粒。引物 B 是与 PUC19 互补的 DNA 序列, 分别以各质粒为模板, 进行 PCR 反应, *Bst* O I 酶切, 形成 CCA 末端。各引物见表 1。

来源于水稻线粒体 (plasmid mitochondrial plant, MP) 以及基于 MP 的 4 种突变体 MPB0 (plasmid mitochondrial plant mutant), MPB1, MPB2 和 MPB3 的 tRNA 基因序列同图 1 中 tRNA 序列, 但所有核苷酸为脱氧核苷酸, 且 U 被 T 取代。

Table 1 Primers and template for amplification of *Oryza sativa* mitochondrial tRNA^{Trp} and its mutant genes

Primer	Sequence	Purpose
Primer A for special amplification		
Primer0 (5'primer)	5' <u>CTCTAATACG ACTCACTATA</u> ACGCGCTTAGTTCAGTT	Primer for amplification of MPB0
Primer0 (3'primer)	5' GCCTGGCACCGCTGTAGGA	Primer for amplification of MPB0
Primer1 (5'primer)	5' <u>CTCTAATACGACTCACTATA</u> AGGGCTCTTAGTTCAGTT	Primer for amplification of MPB1
Primer1 (3'primer)	5' GCCTGGCAGGCGCTGTAGGA	Primer for amplification of MPB1
Primer2 (5'primer)	5' <u>CTCTAATACGACTCACTA</u> TAGCGGTCTTAGTTCAGTT	Primer for amplification of MPB2
Primer2 (3'primer)	5' GCCTGGCACGGGCTGTAGGA	Primer for amplification of MPB2
Primer3 (5'primer)	5' <u>CTCTA ATACGACTCACTATA</u> GGGTCTTAGTTCAGTT	Primer for amplification of MPB3
Primer3 (3'primer)	5' GCCTGGCAGGGGCTGTAGGA	Primer for amplification of MPB3
Primer B for PUC19		
Primer4 (5'primer)	5' CCAAGTCCA AGCTTGCA	5' Universal primer for PCR
Primer4 (3'primer)	5' TACGAATTCGAGCTCGGT	3' Universal primer for PCR
Template	5' GCGCTCTTAGTTCAGTTCGGTAGAACGTGGGTCTCCAA AACCCAATGTCGTAGGTTCAAATCCTACAGAGCGTGCCA	For PCR

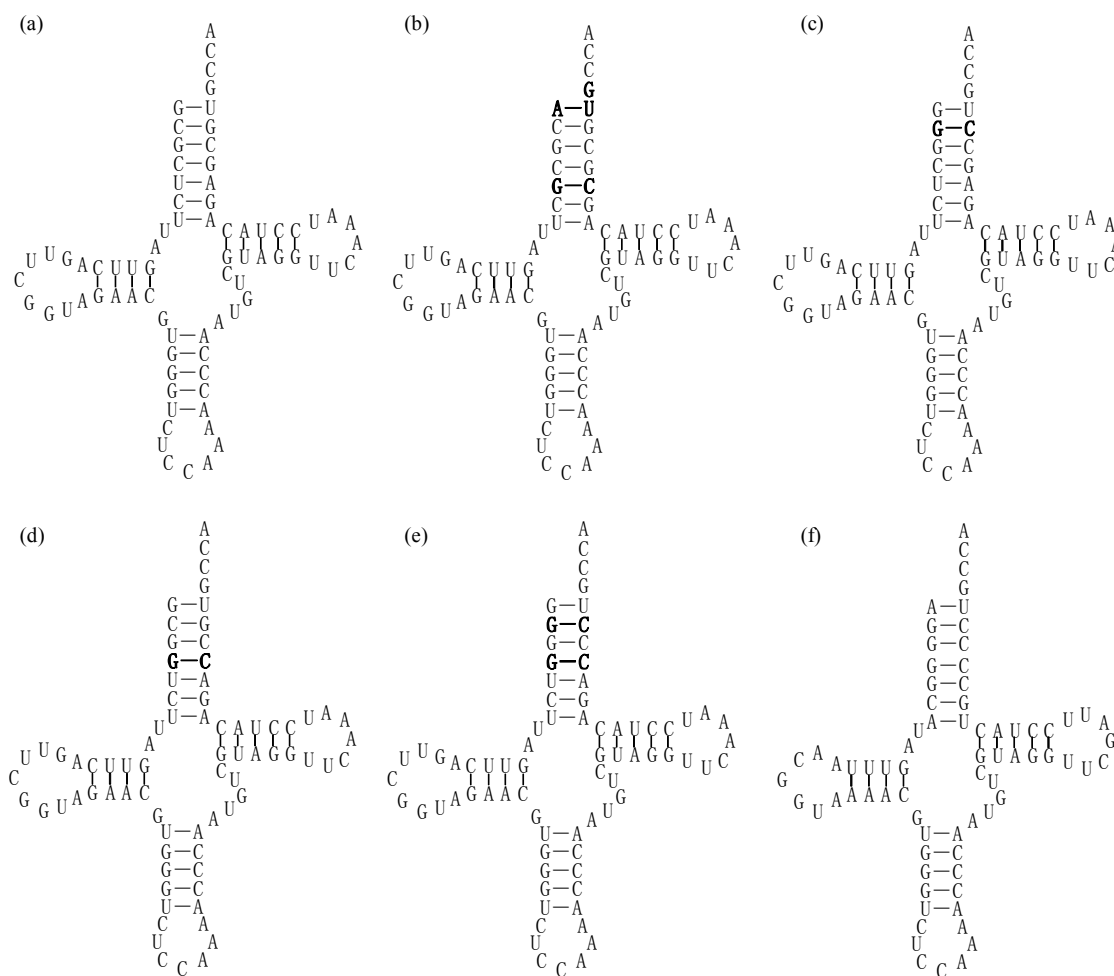


Fig. 1 Sequence and secondary structure of tRNA^{Trp} s

(a) Wild type *Oryza sativa* mitochondrial tRNA^{Trp}. (f) Wild-type *Bacillus subtilis* tRNA^{Trp}, and four mutants. (b) MPB0. (c) MPB1. (d) MPB2. (e) MPB3.

MP 由中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所提供, MPB0、MPB1、MPB2 和 MPB3 则通过两步 PCR 方法构建(图 2). 第 1 次 PCR 分别以 Primer A 为引物, 以 MP 为模板, 反应条件为: 94℃ 1 min, 55℃ 20 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min. 扩增片段长度为 100 bp. 第 2 次 PCR 以各测序正确的质粒为模板, 采用通用引物 B, 反应条件同上. 扩增片段长度为 170 bp.

1.3 模板 DNA 的制备和 tRNA 的体外转录

通过 PCR 从含有 tRNA 基因的质粒上扩增得到大量且纯的体外转录模板, 在 60℃, *Bst* O I 酶切 4 h 产生 GGT 末端, 用酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)抽提去蛋白质, 然后用乙醇、醋酸铵沉淀, 得到长度为 99 bp 的转录模板. 100 μl 转录体系中含有: 1 μg 经 *Bst* O I 酶切的含 tRNA^{Trp} 基因的转录模板, 40 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 15 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L DTT, 500 mg/L BSA, 1.5 mmol/L

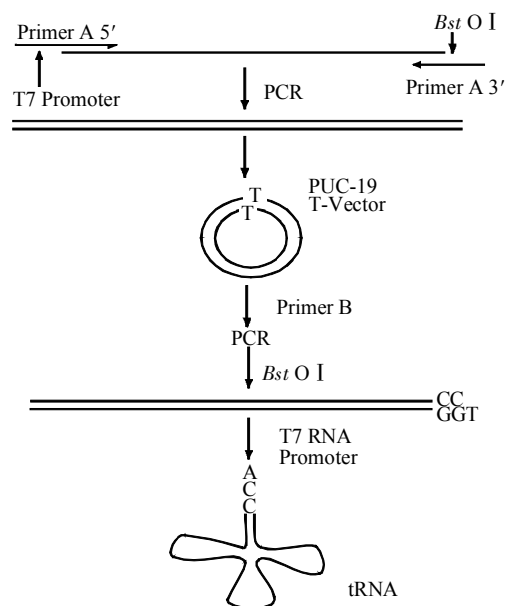


Fig. 2 The procedure of *O. sativa* mitochondrial mutant-type tRNA^{Trp}s preparation

NTPs, 40 U RNasin, 200 U T7 RNA 聚合酶. 该反应物在 37°C 保温 4 h. 然后加入 10 U DNase, 37°C 保温 30 min 以水解 DNA 模板. 转录产物经含 8 mol/L 尿素 -10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 紫外灯下割胶纯化^[8], 在进行氨酰化反应之前, 转录产物于 94°C 加热 2 min, 缓慢退火至室温, 以便使 tRNA^{Trp} 形成正确的高级结构.

1.4 体外转录的 tRNA^{Trp} 色氨酰化活力测定

具体操作过程按 Promega 公司提供的方法进行, *B. subtilis* TrpRS 的氨酰化反应条件为: 50 μ l 反应体系中含有: 140 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8), 40 mmol/L Mg(Ac)₂, 4 mmol/L ATP, 5 mmol/L DTT, 0.02~1 μ mol/L tRNA^{Trp}, 0.66 μ mol/L L-[5-³H] 色氨酸, 500 nmol/L 大肠杆菌高表达的 *B. subtilis* TrpRS. 人 TrpRS 的 tRNA^{Trp} 色氨酰化反应体系中含有: 80 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 8 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L ATP, 0.1~1.8 μ mol/L tRNA^{Trp}, 0.66 μ mol/L L-[5-³H] 色氨酸, 100 nmol/L 人 TrpRS. 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. 反应后取 20 μ l tRNA^{Trp} 色氨酰化反应液点样, 用 100 ml 冰预冷的 50 g/L TCA (含 0.05% 色氨酸) 洗涤 3 次, 再用 10 ml 95% 乙醇及无水乙醚各洗涤 1 次. 滤纸干燥后在 Wallac 1490 液闪计数器上对 [5-³H]- 色氨酸计数. 以反应体系中的底物浓度与对应的酶促反应速度为参数, Line-Burk 作图法计算 4 种突变体 tRNA^{Trp} 的动力学常数.

2 结果与分析

2.1 *Oryza sativa* mitochondria tRNA^{Trp} 突变体的制备

通过第一次 PCR 反应扩增, 将扩增产物乙醇沉淀回收, 连接到 T-vector PUC19, 质粒大小约 2.0 kb, 我们共构建了 4 种由 *Oryza sativa* mitochondria tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎向 *B. subtilis* 氨基酸接受茎突变的含有不同 tRNA^{Trp} 基因的质粒: (1)MPB0,

G1A, U5G/A68C 突变; (2)MPB1, 第 2 对碱基突变, 即 C2G/G71C; (3)MPB2, 第 4 对碱基突变, 即 C4G/G69C; (4)MPB3, 包括(2)和(3)的全部突变 (C2G/G71C 和 C4G/G69C)(图 1).

第 1 次 PCR 扩增得到了含有各突变体基因的 100 bp DNA 片段, 在 tRNA 基因上游为 T7 启动子, 下游为 *Bst* O I 酶切位点, 第 2 次用通用引物产物 PCR 扩增后, DNA 片段 170 bp, *Bst* O I 酶切后产生 99 bp 带有 5' GGT 的 DNA 片段经 2% 琼脂糖凝胶电泳检验, 目的条带清晰, 长度正确 (图 3). 以该 DNA 片段做模板转录得到 3' 端为 CCA-OH 结尾的各 *Oryza sativa* mitochondria tRNA^{Trp} 突变体.

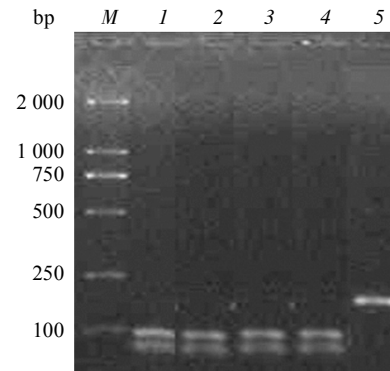


Fig. 3 The preparation of mutants from *O. sativa* mitochondria tRNA^{Trp}

1: PCR products of MPB0 gene digested by *Bst* O I; 2: PCR products of MPB1 gene digested by *Bst* O I; 3: PCR products of MPB2 gene digested by *Bst* O I; 4: PCR products of MPB3 gene digested by *Bst* O I; 5: PCR products of MPB0 gene; M: LD2000 DNA marker.

2.2 *B. subtilis* 及人 TrpRS 对催化 4 种突变体 tRNA^{Trp} 的动力学常数测定

4 种线粒体突变体 tRNA^{Trp} 进行体外转录, 转录产物经含 8 mol/L 尿素的 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化后进行色氨酰化活力测定. 图 1 是水稻线粒体、枯草杆菌和 4 种突变体 tRNA^{Trp} 的二级结构.

表 2 给出了 *B. subtilis* 色氨酰 tRNA 合成酶和

Table 2 Effect of wild-types on aminoacylation of tRNA^{Trp} transcripts by *B. subtilis* and human TrpRS

Variant	$K_M / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$K_{cat} / (\text{s}^{-1})$	$K_{cat} / K_M / (\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Change in efficiency (α -fold)
<i>B. subtilis</i> TrpRS				
Wt <i>B. subtilis</i> tRNA ^{Trp}	0.6	0.7	1.2	1
Wt <i>O. sativa</i> mitochondria tRNA ^{Trp}	1.33	4.01×10^{-3}	3.0×10^{-3}	-400
Human TrpRS				
Wt <i>O. sativa</i> mitochondria tRNA ^{Trp}	41.3	1.16×10^{-2}	3.0×10^{-4}	-3 660
Human tRNA ^{Trp}	1.21	1.33	1.10	1

人色氨酰 tRNA 合成酶催化野生型水稻线粒体(Wt *O. sativa mitochondria*)、野生型枯草杆菌 (Wt *Bacillus subtilis*) 和人(Human) tRNA^{Trp} 的动力学常数.

由表 2 可知, 在 *B. subtilis* 色氨酰 tRNA 合成酶氨酰化野生型 *Oryza sativa mitochondria* tRNA^{Trp} 的反应中, K_M 为 1.33 $\mu\text{mol/L}$. 氨酰化野生型 *B. subtilis* tRNA^{Trp} 的 K_M 为 0.6 $\mu\text{mol/L}$. 说明野生型 *Oryza sativa mitochondria* tRNA^{Trp} 被 *B. subtilis* 色氨酰 tRNA 合成酶氨酰化的活力约为野生型 *B. subtilis* tRNA^{Trp} 的 1/2. 但 *Oryza sativa mitochondria* tRNA^{Trp} 与野生型 *B. subtilis* tRNA^{Trp} 催化效率(K_{cat}/K_M) 却下降了 99.75%. 说明 *Oryza sativa mitochondria* tRNA^{Trp} 是 *B. subtilis* 色氨酰 tRNA 合成酶的一个较

差的底物.

同样地, 人色氨酰 tRNA 合成酶氨酰化 *Oryza sativa mitochondria* tRNA^{Trp} 反应的 K_M 为 41.3 $\mu\text{mol/L}$. 氨酰化人色氨酰 tRNA^{Trp} 反应的 K_M 为 1.21 $\mu\text{mol/L}$. 两者的 K_M 值相差较大. 而且, *Oryza sativa mitochondria* tRNA^{Trp} 与人 tRNA^{Trp} 催化效率(K_{cat}/K_M) 下降了 99.97%. 说明 *Oryza sativa mitochondria* tRNA^{Trp} 是人色氨酰 tRNA 合成酶的一个很差的底物.

采用 *B. subtilis* TrpRS 和人 TrpRS 对 4 种线粒体 tRNA^{Trp} 突变体的表征 K_{cat} 和 K_M 进行了测定. 4 个 *Oryza sativa mitochondria* tRNA^{Trp} 突变体被原核 (*B. subtilis*) 和真核(人)的色氨酰 tRNA 合成酶测定氨酰化活力 K_{cat}/K_M 变化值见表 3.

Table 3 Effect of mutations on aminoacylation of tRNA^{Trp} transcripts by *B. subtilis* and human TrpRS

Variant	$K_M/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$K_{cat}/(\text{s}^{-1})$	$K_{cat}/K_M/(\text{s}^{-1}\cdot\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Change in efficiency (x -fold)
<i>B. subtilis</i> TrpRS				
Wt <i>O. sativa mitochondria</i>	1.33	4.01×10^{-3}	3.0×10^{-3}	1
MPB0	2.52	3.75×10^{-2}	1.50×10^{-2}	+5
MPB1	1.76	0.21	0.12	+40
MPB2	1.24	0.20	0.16	+53
MPB3	0.96	0.40	0.42	+140
Human TrpRS				
Wt <i>O. sativa Mitochondria</i>	41.3	1.16×10^{-2}	3.0×10^{-4}	1
MPB0	0.09	7.4×10^{-3}	8.1×10^{-5}	-3.7
MPB1	0.19	1.1×10^{-2}	6.0×10^{-5}	-5.0
MPB2	0.32	1.7×10^{-2}	5.3×10^{-5}	-5.7
MPB3	0.22	9.3×10^{-3}	4.2×10^{-5}	-7.1

由表 3 可知, 与野生型 *Oryza sativa mitochondria* tRNA^{Trp} 相比, *B. subtilis* TrpRS 识别突变体 MPB0 的活力提高了 5 倍, 单点突变体 MPB1、MPB2 的活力分别提高了 40、53 倍, 多点突变体 MPB3 的活力提高了 140 倍, 是 *B. subtilis* tRNA^{Trp}(图 2f)的 34%. 而人 TrpRS 催化突变体 MPB0、MPB1、MPB2 和 MPB3 的氨酰化活力 K_{cat}/K_M 与野生型 *Oryza sativa mitochondria* tRNA^{Trp} 相比变化不大, 分别下降了 73%、80%、82% 和 86%. 上述结果表明, 水稻线粒体 tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎上的 2 个碱基对 C2/G71 和 C4/G69 的突变, 对枯草杆菌 TrpRS 的识别起重要作用.

3 讨 论

现有的研究认为, 一部分 tRNA 的特异性主要位于三维结构倒 L 型结构的两端, 即氨基酸接受

茎和反密码茎. *B. subtilis* 和人细胞质 tRNA^{Trp} 的主要种属特异性元件均为 N73 识别子碱基, 次要种属特异性元件是氨基酸接受茎第 1 对碱基(N1/N72) 和第 5 对碱基(N5/N68)^[4,9]. 对线粒体 tRNA^{Trp} 系统, *Oryza sativa mitochondria* tRNA^{Trp} 识别子碱基 G73 和接受茎上的 U72, A68 亦为种属特异性元件^[7], 说明 tRNA 与 TrpRS 的识别方式很可能在进化过程中保留下来^[10-12].

Xu 等^[13]证明, 在 *B. subtilis* tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎中的 3 个 G : C 碱基对(G2 : C71, G3 : C70 和 G4 : C69)是 *B. subtilis* tRNA^{Trp} 分子有效氨酰化所必需的元件. 我们通过线粒体 tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎第 2 对和第 4 对向 *B. subtilis* tRNA^{Trp} 转变的 3 种突变体, 以探索线粒体 tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎中这 2 个碱基对在种属特异性氨酰化中的确切作用. 结果表明, 当线粒体 tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎第 2 对和第 4 对碱基向 *B. subtilis* tRNA^{Trp} 转变时, *B. subtilis*

色氨酸 TrpRS 对其氨酰化活力提高 140 倍, 达到了野生型 *B. subtilis* tRNA^{Trp} 氨酰化活力的 34%, 提示这 2 个碱基对在 *Oryza sativa* mitochondria tRNA^{Trp} 与 TrpRS 的识别中起重要作用. 因此, 与原核生物细胞质 tRNA^{Trp} 的情况相似^[5], *Oryza sativa* mitochondria tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎的 C2/G71 和 C4/G69 这 2 个碱基对是 *Oryza sativa* mitochondria tRNA^{Trp} 的种属特异性元件.

参 考 文 献

- Bonnefond L, Giegé R, Rudinger-Thirion J. Evolution of the tRNA^{Tyr}/TyrRS aminoacylation systems. *Biochimie*, 2005, **87**(9~10): 873~883
- Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. Oxidative stress-responsive intracellular regulation specific for the angiostatic form of human tryptophanyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, 2005, **44**(1): 225~232
- Jia J, Chen X L, Guo L T, *et al.* Residues Lys-149 and Glu-153 switch the aminoacylation of tRNA(Trp) in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 2004, **279**(40): 41960~41965
- Xue H, Shen W, Giegé R, *et al.* Identity elements of tRNA^{Trp}. *J Biol Chem*, 1993, **268**(13): 9316~9322
- Xu F, Jiang G, Li W. Three G•C base pairs required for the efficient aminoacylation of tRNA^{Trp} by tryptophanyl-tRNA synthetase from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 2002, **41**(25): 8087~8092
- 何新霞, 徐 丰, 陈 莉, 等. 3 种水稻线粒体 tRNA^{Trp} 突变体的克隆和活力鉴定. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **17**(4): 453~457
He X X, Xu F, Chen L, *et al.* *Chin J Biochem and Mol Biol*, 2001, **17**(4): 453~457
- 金晓玲, 陶志坚, 贾 捷, 等. 水稻线粒体 tRNA^{Trp} 的种属特异性氨酰化. *科学通报*, 2006, **51**(7): 112~117
Jin X L, Tao Z J, Jia J, *et al.* *Chin Science Bulletin*, 2006, **51**(7): 112~117
- Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 551~555
- Chen L, Jin Y X, Wang D B. Species-specific identity elements of tRNA^{Trp}. *Prog Natl Sci*, 2000, **10**(3): 192~197
- Xu F, Chen X L, Li X, *et al.* Species-specific differences in the operational RNA code for aminoacylation of tRNA^{Trp}. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(20): 4125~4133
- Bénédicté Sohm, Magali Frugier, Hervé Brulé, *et al.* Towards understanding human mitochondrial leucine aminoacylation identity. *J Mol Biol*, 2003, **328**(5): 995~1010
- Bonnefond L, Fender A, Rudinger-Thirion J, *et al.* Toward the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS. *Biochemistry*, 2005, **44**(12): 4805~4816
- Xu F, Chen L, Liu Q S, *et al.* Immobilized tryptophanyl tRNA synthetase from *Bacillus subtilis*. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2000, **32**(1): 74~76

Cloning and Aminoacyl Activity of Mutants From *Oryza sativa* Mitochondria tRNA^{Trp}*

JIN Xiao-Ling¹⁾, GONG Ju-Fang^{2)**}, LIU Xue-Mei¹⁾, WANG Xiao-Hong¹⁾, ZHANG Ri-Qing³⁾

¹⁾School of Environment and Art Design, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China;

²⁾College of Chemistry and Biology, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China;

³⁾School of Resources and Environment, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract Four mutants from *Oryza sativa* mitochondria tRNA^{Trp} toward *B. subtilis* tRNA^{Trp} were constructed and transcribed *in vitro* with T7 RNA polymerase. The kinetic parameters (K_{cat}/K_M) of *B. subtilis* tryptophanyl-tRNA synthetase (TrpRS) and human TrpRS were determined with four mutant-type tRNA^{Trp}s. Results showed that for reaction with *B. subtilis* TrpRS, C2/G71 and C4/G69 mutations each induced a comparable 40-fold and 53-fold of activity to *Oryza sativa* mitochondria tRNA^{Trp} respectively. Notably, when the C2/G71 and C4/G69 mutations were introduced together into *B. subtilis* tRNA^{Trp}, a 140-fold of reaction rate resulted, the catalytic efficiency was 34 percent as that of wild-type *B. subtilis* tRNA^{Trp}, but these four mutants resulted in a weak aminoacylation efficiency by human TrpRS, and the change was little. Clearly, the results indicate that C2/G71 and C4/G69 bases in the acceptor stem are important species-specific elements of *Oryza sativa* mitochondria tRNA^{Trp}, since which are significant to the aminoacyl activity.

Key words *Oryza sativa* mitochondria tRNA^{Trp}, tryptophanyl-tRNA synthetase (TrpRS), aminoacyl activity, mutant

*This work was supported by a grant from Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Y204417).

**Corresponding author. Tel: 86-579-82283136, E-mail: sky103@zjnu.cn

Received: March 30, 2008 Accepted: May 6, 2008