

水稻线粒体 tRNA^{Trp} 的种属特异性氨酰化

金晓玲^{①③} 陶志坚^① 贾捷^② 何新霞^{①*} 金由辛^{②*}

(^① 浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004; ^② 中国科学院上海生命科学研究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 200033; ^③ 中南林学院环艺学院, 长沙 410004. * 联系人, E-mail: yxjin@sibs.ac.cn, jhxhx@zjnu.cn)

摘要 为了研究原核生物和真核生物(细胞质)色氨酰 tRNA 合成酶(TrpRS)对线粒体 tRNA^{Trp} 识别的种属特异性, 构建了 7 个水稻线粒体 tRNA^{Trp} 三位点(G73, U72, A68)的单点或多点突变的突变体. 这些突变基因, 经体外转录后分别用枯草杆菌(*B. subtilis*)和人色氨酰 tRNA 合成酶(TrpRS)进行氨酰化反应, 并测定它们的动力学常数. 结果表明, 与野生型水稻线粒体 tRNA^{Trp} 相比, 7 个突变体的转录产物被 *B. subtilis* TrpRS 氨酰化的活力分别降低了 53.33%~99.79%, 被人 TrpRS 氨酰化的活力却分别提高了 4~330 倍, 其中以 MPH7(水稻线粒体 tRNA^{Trp} 的三碱基(G73, U72 和 C68)全部突变为人 tRNA^{Trp} 的三碱基序列)的氨酰化活力改变最大. 实验结果证明, 与真核生物和原核生物细胞质 tRNA^{Trp} 的种族特异性类似, 水稻线粒体 tRNA^{Trp} 的种属特异性元件也主要处于氨基酸接受茎的识别位碱基、第一和第五对碱基对, 亦即识别位碱基 G73, 氨基酸接受茎上的两个碱基对 G1/U72 和 U5/A68. 本研究为线粒体 tRNA^{Trp} 起源于真细菌的推论提供了实验依据.

关键词 种属特异性氨酰化 色氨酸 tRNA 色氨酰 tRNA 合成酶 水稻 线粒体

蛋白质合成的精确性对于所有生物体的生存都是必须的. 氨酰 tRNA 合成酶催化相应 tRNA 分子的氨酰化反应是蛋白质合成忠实性的分子基础^[1]. 近年来, 在 20 种氨酰化系统中, 鉴定出大量 tRNA 分子的识别元件、特异的功能基团和细微的结构特征, 这对揭示氨酰 tRNA 合成酶与 tRNA 分子识别的机理起了重要作用^[2,3]. 研究表明, 识别位碱基(N73)在对应于多种氨基酸的 RNA 操作密码中有关键作用^[4,5], 但它在各个种属之间并不是严格保守的. 例如, 在甘氨酸系统中, 真核和古核来源的 tRNA^{Gly} 识别位碱基是 A73, 而原核来源的 tRNA^{Gly} 识别位碱基是 U73^[6]. 同时, 大肠杆菌甘氨酸 tRNA 合成酶和人甘氨酸 tRNA 合成酶不能交叉识别它们对应的 tRNA^{Gly}^[7]. 这些事实都表明, 真核和古核的 RNA 操作密码与原核的不同, 而这种不同是不同种属来源的 tRNA 分子不能交叉识别的主要原因. 深入研究各种氨酰 tRNA 合成酶的种族特异性, 不仅有其重要的理论意义, 也将有助于新药靶的发现.

已有研究表明, 枯草杆菌色氨酰 tRNA 合成酶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). 人(细胞质) tRNA^{Trp} 的个性元件是识别位碱基 A73 和反密码子(主要个性元件); G1/C72, U5/G68(次要个性元件)^[8].

由此可见, 除反密码子外, 其他的个性元件主要位于 tRNA^{Trp} 的氨基酸接受茎上. 此外, 真细菌和真核 tRNA^{Trp} 的氨酰化反应也存在种属特异性, 它们是 G73A, A1G/U72C 和 G5U/C68G^[8]. Xu 等人^[9]的另一研究发现, *B. subtilis* 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, 但在真核(细胞质)的 tRNA^{Trp} 中, 这 3 个碱基对在其氨酰化识别中并不重要.

生物体内主要存在 3 种类型的 tRNA, 即原核生物 tRNA、真核生物(细胞质)tRNA 和细胞器 tRNA. 目前, 对于原核生物 tRNA^{Trp}, 真核生物(细胞质) tRNA^{Trp} 的种属特异性元件的研究已经比较清楚, 但对于细胞器 tRNA^{Trp} 的种属特异性元件的研究很少. 线粒体 tRNA 是一类细胞器 tRNA, 它的结构既不同于真核生物(细胞质)的 tRNA^{Trp}, 也不同于原核生物的 tRNA^{Trp}. 检索已知细胞器 tRNA^{Trp} 的序列发现, 大部分已知细胞器 tRNA^{Trp} 序列来自植物的线粒体与叶绿体, 并且叶绿体和线粒体 tRNA^{Trp} 的氨基酸接受茎序列有明显的保守性. 为了了解线粒体 tRNA^{Trp} 在与色氨酰 tRNA 合成酶识别中的种属特异性, 本研究设计了水稻线粒体 tRNA^{Trp} 单点和多点突变的 7 个突变体, 并用枯草杆菌和人的色氨酰 tRNA 合成酶(TrpRS)来测定它们的氨酰化活力, 以了解线粒体 tRNA^{Trp} 与不同种族 TrpRS 的识别特性, 研究线粒体 tRNA^{Trp}

的种属特异性元件, 并研究这些位点在种属特异性进化过程中的功能.

1 材料和方法

(i) 质粒和试剂. 用于高表达枯草杆菌色氨酸 tRNA 合成酶的质粒 pKSW1^[5]由香港科技大学薛红博士惠赠. 人色氨酸 tRNA 合成酶的高表达质粒 pET24a(+)-HTrpRS 由上海生命科学研究院分子生物学重点实验室构建^[10]. T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 BstO I 和 RiboMAX Large Scale RNA Production System-T7 购自 Promega (Madison, WI). L-[5-³H] Tryptophan 购自 Amersham Pharmacia 公司(Piscataway, NJ). L-Tryptophan 购自 Gibco BRL 公司(Gaithersburg, MD). Ni-NTA-agarose 购自 Qiagen 公司(Chatsworth, CA).

(ii) 引物和模版. 5'端引物为通用引物, 用于在 tRNA 基因前加上 T 7 启动子, 使得转录从 +1 位(表 1 中用斜体标出), 亦即从 tRNA^{Trp} 基因第一位起始. 3'引物为特异引物, 以导入不同的突变(表 1 中突变位点的 6 核苷酸序列均用黑斜体标出). 该序列中与模板 3'端序列反向互补的部分用下横线标出. 所有 3'引物中均含限制性内切核酸酶 BstO I (该酶剪切后的模板, 刚好使转录终止在 CCA 末端处, 获得成熟的 tRNA 末端)和 HindIII 酶切位点. 模板为 tDNA^{Trp}, 即 tRNA^{Trp} 结构基因的正义链(序列来自 tRNA 序列库, ID 为 DW4460, <http://www.staff.uni-bayreuth.de/~btc914/search/index.html>)中的 10~66 位. 该序列中与 5'引物同源部分以及与 3'引物反向互补部分同样用下横线标出. 引物和模板的序列见表 1. 所有模板和引物 DNA 均由本课题组合成. 含野生型人 tRNA^{Trp} 基因的质粒由本室提供.

(iii) 含线粒体 tRNA^{Trp} 突变基因的质粒构建. 各种线粒体 tRNA^{Trp} 突变基因的质粒构建程序参照 Sampson 和 Uhlenbeck 的报道^[11]. 以表 1 中的模板序列作为 PCR 模板, 用 5'引物和引物 1 进行 PCR, 所得产物即为 MPH1 突变 tRNA^{Trp} 基因. 其他突变体以相同的 PCR 方法用不同的引物构建. 50 μL 反应体积含两种引物各 0.4 μmol/L, 模板 1 nmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 1 U(TaKaRa). PCR 反应条件为: 94℃, 1 min, 60℃, 45 s, 72℃, 30 s; 33 个循环; 72℃延伸 10 min. 扩增片段长度为 109 bp. PCR 产物经低熔点琼脂糖凝胶纯化回收, 克隆到 pGEM-T 载体(Promega 公司)(有 Sfi I 酶切位点)中. DNA 序列经测序验证(Eppendorf 公司, MasterCycler Gradient). 用质粒抽提试剂盒小量制备鉴定正确的质粒, 经 Sfi I 和 Hind III 双酶切后亚克隆到 pGEM-9Zf (-)载体中. 图 1 是线粒体和人的 2 种野生型 tRNA^{Trp} (图 1(a)和(i)) 和 7 种突变体(图 1(b)~(h))的二级结构示意图.

(iv) tRNA^{Trp} 的体外转录. 所有的 tRNA^{Trp} 突变体均用其突变基因由体外转录方法制备^[10]. 50 μL 转录体系中含 10 μg 经 BstO I 酶切线性化的 tRNA^{Trp} 基因转录模板, 40 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 15 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L DTT, 500 mmol/LBSA (无核酸酶), 1.5 mmol/L NTPs, 40 U RNasin (Promega)和 200 U T7 RNA 聚合酶(Ampharmacia). 反应体系在 37℃保温 2 h 后加入 10 U DNase, 37℃再保温 30 min 以水解 DNA 模板. 转录产物经 10%聚丙烯酰胺变性胶电泳纯化. 在进行氨酰化反应之前, 转录产物于 70℃加热 2 min, 缓慢退火至室温, 使 tRNA^{Trp} 形成正确的高级结构.

(v) 酶的纯化和活力测定. 枯草杆菌色氨酸 tRNA 合成酶和人色氨酸 tRNA 合成酶的纯化参照文

表 1 用于扩增的水稻线粒体 tRNA^{Trp} 和突变体的引物和模板

	序列(5'→3') ^{a)}	作用
5'引物	CTCTAATACGACTCACTATA ACGCTCTTAGTTCAGTTCGGTAGAACGTG	PCR 5'通用引物
标准 3'引物	TCCCAAGCTTCCTGG CACGCTCTGTAGGATTGAACCTACGACA	野生稻线粒体 tRNA ^{Trp} 扩增引物
引物 1 (3'引物)	TCCCAAGCTTCCTGG TACGCTCTGTAGGATTGAACCTACGACA	MPH1 扩增引物
引物 2 (3'引物)	TCCCAAGCTTCCTGG CAGCCTCTGTAGGATTGAACCTACGACA	MPH2 扩增引物
引物 3 (3'引物)	TCCCAAGCTTCCTGG CACGCTCTGTAGGATTGAACCTACGACA	MPH3 扩增引物
引物 4 (3'引物)	TCCCAAGCTTCCTGG TGCGCTCTGTAGGATTGAACCTACGACA	MPH4 扩增引物
引物 5 (3'引物)	TCCCAAGCTTCCTGG TACGCTCTGTAGGATTGAACCTACGACA	MPH5 扩增引物
引物 6 (3'引物)	TCCCAAGCTTCCTGG CAGCCTCTGTAGGATTGAACCTACGACA	MPH6 扩增引物
引物 7 (3'引物)	TCCCAAGCTTCCTGG TGCGCTCTGTAGGATTGAACCTACGACA	MPH7 扩增引物
模板	GTTTCAGTTCGGTAGAACGTGGGTCTCCAAAACCAATGTCGTAGGTT- CAAATCCTAC	PCR

a) 黑斜体表示突变位点的 6 核苷酸序列

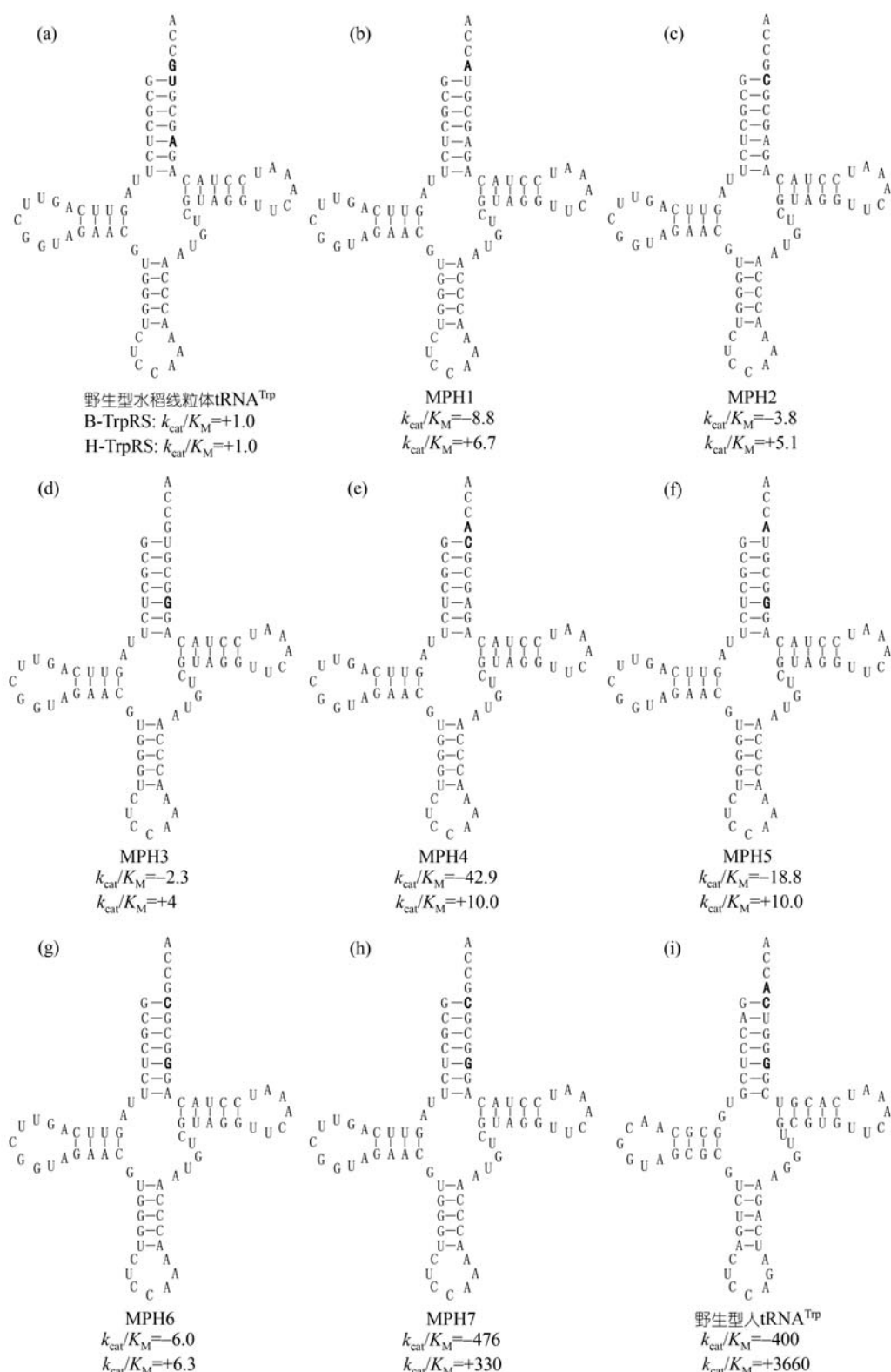


图 1 野生型水稻线粒体 tRNA^{Trp}, 人 tRNA^{Trp} 和 7 个突变体的二级结构及氨酰化反应动力学参数
突变体的突变位点和它们野生型 tRNA^{Trp} 的相应位点用粗黑体表示. 假设野生型水稻线粒体 tRNA^{Trp} 被其 TrpRS 催化的 k_{cat}/K_M 为 1.0.
分析用的 tRNA^{Trp} 浓度从 0.1 到 20 $\mu\text{mol/L}$, 酶的浓度为 3 或 4 nmol/L. B-TrpRS 和 H-TrpRS 分别为 *B. subtilis* 和人的 TrpRS

献[10,12]. 枯草杆菌色氨酰 tRNA 合成酶的氨酰化活力测定在 22℃ 进行, 50 μL 反应混和物中含有 4 mmol/L ATP, 1 mmol/L DTT, 1 μCi L-[5-³H]色氨酸, 40 mmol/L 醋酸镁, 140 mmol/L Tris-HCl(pH 7.8), 0.02 μmol/L 体外转录的人 tRNA^{Trp}[13]. 人色氨酰 tRNA 合成酶的氨酰化活力测定在 30℃ 进行, 50 μL 反应混和物中含 4 mmol/L ATP, 0.8 mmol/L DTT, 1 μCi L-[5-³H]色氨酸, 8 mmol/L MgCl₂, 80 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 0.02 μmol/L 体外转录的人 tRNA^{Trp}. 滤纸片先用 5 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^{Trp} 色氨酰化反应液点样, 用 100 mL 冰预冷的 50 g/L TCA(含 5 g/L 色氨酸)洗涤 3 次, 再用 10 mL 95%乙醇及无水乙醚各洗涤一次, 滤纸用红外干燥后在 Wallac 1490 液闪计数器(Pharmacia)上对 [³H]-tryptophan 计数. 一个氨酰化活力单位定义为在标准反应条件下, 每分钟氨酰化 1 pmol tRNA^{Trp} 所需的酶量. 动力学常数通过 Lineweaver-Burk 作图得到.

2 结果

2.1 含 tRNA^{Trp} 突变基因质粒的构建

所构建 7 种含 tRNA^{Trp} 突变基因质粒的大小约 3.0 kb, 含有一个 T7 启动子, 控制 tRNA^{Trp} 基因的转录/这些质粒可以通过体内表达和体外转录, 以用于进一步研究. 它们分别是识别位碱基、构成氨基酸接受茎第一个碱基对的 72 位、构成氨基酸接受茎第 5 个碱基对的 68 位的 3 种单碱基突变体(MPH1, MPH2 和 MPH3). 由此 3 种单突变的不同组合而形成的 3 种双突变体(MPH4, MPH5, MPH6)和此 3 位点同时突变的突变体(MPH7). 这 3 个位点在原核生物与真核生物细胞质 tRNA^{Trp} 中, 均与种族特异性有关(图 1). 研究此 7 种突变体的种族特异性, 可了解线粒体 tRNA^{Trp} 与细胞质 tRNA^{Trp} 在种族特异性组成上的差异.

2.2 野生型水稻线粒体和人 tRNA^{Trp} 氨酰化反应的动力学参数

图 1 中给出了水稻线粒体和人的两种野生型 tRNA^{Trp}(图 1(a)和(i))的动力学常数的测试结果(相对于野生型水稻线粒体 tRNA^{Trp} 在 k_{cat}/K_M 值上的变化). 枯草杆菌色氨酰 tRNA 合成酶氨酰化野生型水稻线粒体 tRNA^{Trp} 的反应中, k_{cat} 为 1.33 s^{-1} , K_M 为 1.21 μmol/L ; 人色氨酰 tRNA 合成酶氨酰化水稻线粒体 tRNA^{Trp}

反应的 k_{cat} 为 $4.01 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, K_M 为 1.33 μmol/L . 结果表明, 人色氨酰 tRNA 合成酶催化水稻线粒体 tRNA^{Trp} 氨酰化反应的能力微弱, 与野生型人 tRNA^{Trp} 相比, k_{cat}/K_M 值下降了 99.97%. 人 tRNA^{Trp} 同样也是枯草杆菌色氨酰 tRNA 合成酶的一个很差的底物, 与野生型水稻线粒体 tRNA^{Trp} 相比, 活力降低了 99.75%.

2.3 水稻线粒体 tRNA^{Trp} 突变体的氨酰化反应动力学参数

图 1 中给出了水稻线粒体 7 种突变体的动力学常数和相对于野生型水稻线粒体 tRNA^{Trp} 的变化值(图 1(b)~(h)). 结果表明, 与野生型水稻线粒体 tRNA^{Trp} 相比, *B. subtilis* TrpRS 识别单点突变的突变体(MPH1, MPH2 和 MPH3)的活力分别降低了 88.67%, 73.67% 和 53.33%(图 1(b)~(d)); 识别双突变(MPH4, MPH5, MPH6)的能力降低更多, 分别降低了 97.67%, 94.77% 和 83.33%(图 1(e)~(g)); 识别三突变体(MPH7)的活性降低最多, 下降了 99.79%(图 1(i)); 同样与野生型水稻线粒体 tRNA^{Trp} 相比, *B. subtilis* TrpRS 识别人野生型 tRNA^{Trp} 的活性下降 99.75%. 这说明以 *B. subtilis* tRNA^{Trp} 为参照物, 水稻线粒体三突变体的种族特异性已被完全翻转, 亦即水稻线粒体 tRNA^{Trp} 的种族特异性处于这 3 个位点上. 与野生型水稻线粒体 tRNA^{Trp} 相比, 人 TrpRS 催化单点突变体 MPH1, MPH2 和 MPH3 的 k_{cat}/K_M 的活力却分别提高了 6.7, 5.1 和 4.0 倍; 识别双突变(MPH4, MPH5, MPH6)的 k_{cat}/K_M 值同样有很大的提高, 分别提高了 10.0, 10.0 和 6.7 倍; 识别三突变体(MPH7)的活性提高了 330 倍; 与野生型水稻线粒体 tRNA^{Trp} 相比, 人 TrpRS 识别人 tRNA^{Trp} 的活性提高了 3660 倍. 这说明以人 tRNA^{Trp} 为参照物, 水稻线粒体 tRNA^{Trp} 三突变体的种族特异性也已被基本翻转, 亦即水稻线粒体 tRNA^{Trp} 的种族特异性, 主要处于这 3 个位点上. 即线粒体 tRNA^{Trp} 其他位点的突变, 对其种族特异性的变化不会大于 12 倍 ($3660/330 < 12$). 也即其他位点突变可能引起的种族特异性改变, 将远小于上述 3 个位点突变所引起的改变(330 倍).

综上所述, 可以得出, 与真核或原核生物细胞质 tRNA^{Trp} 的情况相似^[8], 水稻线粒体 tRNA^{Trp} 的种族特异性元件, 主要处于该 tRNA^{Trp} 氨基酸接受茎上的 3 个位点, 即识别位碱基 G73, G1/U72 和 U5/A68(图 1).

3 讨论

用体外转录的方法制备的 tRNA 分子内均不含存在于天然 tRNA 分子中的修饰碱基, 尽管这两种不同来源的 tRNA 分子有所不同, 但体外转录的 tRNA 分子仍可以作为它们相应的氨酰 tRNA 合成酶的有效底物^[4,14]. 用枯草杆菌和人色氨酸 tRNA 合成酶, 以体外转录的枯草杆菌和人的 tRNA^{Trp} 作为底物, 测定它们的交叉氨酰化活力都有成功的报道^[5,8]. 由于天然的水稻线粒体 tRNA^{Trp} 仍未被纯化和检验氨酰化活力, 所以我们采取了体外转录的方法制备水稻线粒体 tRNA^{Trp}, 并用于氨酰化活力检测.

在本研究中, tRNA^{Trp} 的个性元件通过水稻线粒体 tRNA^{Trp} 的氨基酸接受茎向真核(人)方向的单点和多点突变相结合的方法得到进一步的证实. 尽管在枯草杆菌色氨酸 tRNA 合成酶氨酰化系统中, 反密码子碱基被认为是枯草杆菌色氨酸 tRNA 合成酶识别枯草杆菌 tRNA^{Trp} 的一个重要个性元件^[15], 但在本研究中并未将它包括在内, 这是因为反密码子碱基对所有 tRNA^{Trp} 分子来说均是相同的, 因此也就不可能对种属特异性氨酰化起作用.

Margulis 提出的连续内共生理论来解释线粒体的起源^[16], 在过去的 30 年里这一理论一直存在争议, 直到对核糖体 RNA 的排列顺序进行比较研究, 才首次阐明了 proteobacteria 是线粒体的原始祖先^[17]. 随后, 系统发育提供的证据进一步支持了这一假设^[18]. 通过对真细菌的色氨酸 tRNA 合成酶或真核的色氨酸 tRNA 合成酶催化线粒体 tRNA^{Trp} 的氨酰化活力的比较研究, Chen 等人^[19]认为, 线粒体 tRNA^{Trp} 属于真细菌的起源, 为线粒体的起源提供了直接的实验依据. Xu 等人^[8]发现, 人 tRNA^{Trp} 是枯草杆菌色氨酸 tRNA 合成酶的较差底物, 氨酰化反应的能力显著减弱. 类似脯氨酸 tRNA 合成酶系统, 人色氨酸 tRNA 合成酶催化水稻线粒体 tRNA^{Trp} 氨酰化反应也很弱^[19]. 何新霞等人^[20]研究了水稻线粒体 tRNA^{Trp} 的 3 个个性元件 G73, U72 和 A68 向枯草杆菌 tRNA^{Trp} 的个性元件 C73, G72 和 G68 的突变, 发现并不能明显提高它被枯草杆菌色氨酸 tRNA 合成酶的催化活力. 本研究发现, 当水稻线粒体 tRNA^{Trp} 的 3 个个性元件 G73, U72 和 A68 具有了真核(人) tRNA^{Trp} 的个性元件 A73, C72 和 G68 后, 它被人色氨酸 tRNA 合成酶的催化活力比野生型水稻线粒体提高了 330 倍, 而被枯草杆菌色氨酸 tRNA 合成酶的催化活力下降了

99.79%. 也就是说, 这 3 个个性元件向真核方向改变后, 赋予了该突变体部分真核 tRNA^{Trp} 的特性. 从这些实验数据我们推测, 三叶草结构中的氨基酸接受茎对 tRNA^{Trp} 的种属特异性氨酰化起重要作用. 本研究通过单点突变和多点突变相结合的方法, 进一步验证了这些个性元件. 这些实验数据进一步证实了线粒体 tRNA^{Trp} 属于真细菌起源的推论.

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^[10,12,20]. 另外, 利用 tRNA 与合成酶的相互作用区域的识别特性, 亦即氨基酸接受茎及识别位碱基, 合理地设计 tRNA 类似物(接受茎和识别位碱基)有可能成为颇具潜力的治疗药物^[8,9].

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%(330/3660, 图 1). 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, 它限制了原核色氨酸 tRNA 合成酶对线粒体 tRNA^{Trp} 的识别. 在枯草杆菌 tRNA^{Trp} 的氨基酸接受茎中已有类似的现象被发现^[9]. 有关水稻线粒体 tRNA^{Trp} 中新的种属特异性元件研究有待进一步深入.

致谢 本工作为浙江省自然科学基金资助项目(批准号: 302103).

参 考 文 献

- Schimmel P. Aminoacyl-tRNA synthetases: General scheme of structure-functional relationships in the peptides and recognition of transfer RNAs. *Annu Rev Biochem*, 1987, 56: 125—158
- Mc Clain W H. Rules that govern tRNA identity in protein synthesis. *J Mol Biol*, 1993, 234: 257—280[DOI]
- Saks M E, Sampson J R, Abelson J N. The transfer RNA identity problem: A search for rules. *Science*, 1994, 263: 191—197
- Hou Y M. Discriminating among the discriminator bases of tRNAs. *Chem Biol*, 1997, 4: 93—96[DOI]
- Xue H, Shen W, Giegé R, et al. Identity elements of tRNA^{Trp}. *J Biol Chem*, 1993, 268: 9316—9322
- Sprinzi M, Horn C, Brown M, et al. Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26: 148—153[DOI]
- Shiba K, Schimmel P, Motegi H, et al. Human glycyl-tRNA synthetase wide divergence of primary structure from bacterial counterpart and species-specific aminoacylation. *J Biol Chem*, 1994, 269: 30049—30055
- Xu F, Chen X L, Xin L. Species: Specific differences in the opera-

- tional RNA code for aminoacylation of tRNA^{Trp}. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: 4125–4133[DOI]
- 9 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: 8087–8092[DOI]
- 10 Xu F, Jia J, Jin Y X, et al. High-level expression and single-step purification of human tryptophanyl-tRNA synthetase. *Protein Exp Purif*, 2001, 23: 296–300[DOI]
- 11 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: 1033–1038
- 12 Wen S, Chow K C, Wong J T. High-level expression of *Bacillus Subtilis* tryptophanyl-tRNA synthetase in *Escherichia coli*. *Biochem Cell Biol*, 1990, 68: 492–495
- 13 Xu Z, Love M L, Ma L Y. Tryptophanyl-tRNA synthetase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 1989, 264: 4304–4311
- 14 Crothers D M, Seno T, Söll D. Is there a discriminator site in transfer RNA? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69: 3063–3067
- 15 Eriani G, Delarue M, Poch O, et al. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, 347, 1990: 203–206[DOI]
- 16 Margulis L. *Symbiosis in Cell Evolution*. San Francisco: Freeman WH Company, 1981. 1–11
- 17 Hipps D, Shiba K, Henderson B, et al. Operational RNA code for amino acids: species-specific aminoacylation of minihelices switched by a single nucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 5550–5552
- 18 Yang D, Oyaizu Y, Oyaizu H, et al. Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 4443–4447
- 19 Chen L, Jin Y X, Wang D B. Mitochondrial tRNA^{Trp} imply a eubacterial origin. *Acta Biochem Biophys Sin*, 2000, 32: 100~104
- 20 He X X, Xu F, Chen L. Cloning and characterization of three mutants from *Oryza sativa* mitochondrial tRNA^{Trp}. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2001, 17: 453–457

(2005-11-21 收稿, 2006-01-23 接受)