



大肠杆菌 tRNA^{Sec} 关键核苷酸位点

王晓晓^{1#}, 孙世博^{1#}, 张意慈¹, 张楠^{1,2}, 陈继红¹, 徐卫平³, 马强², 许建强^{1*}

¹大连理工大学生命科学与药学学院, 盘锦产业技术研究院, 辽宁 盘锦 124221

²中国检验检疫科学研究院, 北京 100176

³大连理工大学海洋科学与技术学院, 工业生态与环境工程教育部重点实验室, 辽宁 盘锦 124221

摘要: 在原核生物中, 硒蛋白合成需要 tRNA^{Sec} (SelC)与硒代半胱氨酸合成(Sec synthase, SelA)、硒代半胱氨酸特异性延伸因子(Sec-specific elongation factor, SelB)之间相互作用。【目的】基于大肠杆菌掺硒机器, 寻找 tRNA^{Sec} 骨架上关键核苷酸位点, 为解决硒蛋白目前面临的掺硒效率较低、产量低的问题提供新思路。【方法】以大鼠细胞质型硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase 1, TrxR1)为掺硒模式蛋白为定点突变 tRNA^{Sec}, 转化至 BL21 (DE3) *gor*-获得阳性重组菌株(携带 pET-TRSter/pSUABC'), 用于表达大鼠硒蛋白 TrxR1, 然后使用 2',5' ADP-Sepharose 亲和层析和凝胶过滤两步法分离纯化 TrxR1, 最后利用经典硒依赖型 DTNB 还原反应测定 TrxR1 的酶活, 分析关键核苷酸位点, 评价掺硒效率。【结果】在存在 SECIS 元件的前提下, 当 SelA、SelB、tRNA^{Sec} 共表达时, 与野生型相比, 携带突变型 tRNA^{Sec} 所共表达的 TrxR1 酶活力呈现不同程度的降低, 其中 *E. coli* tRNA^{Sec} 的 G18、G19 这两个位点的所有的 TrxR1 酶活远低于野生型(<10%); 然而, a26 和 b7 的酶活相对较高。【结论】*E. coli* tRNA^{Sec} 骨架上 G18 和 G19 位点对于维持 tRNA 稳定性和灵活性发挥了关键作用, 位点突变引起 tRNA 结构变化会影响 tRNA^{Sec} 与掺硒元件的互作, 因此有望通过改造 tRNA 核苷酸位点来提高硒蛋白的掺硒效率。

关键词: 大肠杆菌, 硒代半胱氨酸, 硒蛋白, 硒代半胱氨酸特异性 tRNA^{Sec}, 细胞质型硫氧还蛋白还原酶

硒蛋白(selenoprotein)广泛分布于自然界生物细胞生长与细胞增殖等^[1-2]。硒蛋白所含的硒代半胱氨酸(selenocysteine, Sec)是第 21 种氨基酸, 由

基金项目: 国家自然科学基金(31670767); 中央高校基本科研业务费(DUT17JC36, DUT17RC(4)27); 大连理工大学盘锦产业技术研究院研发项目(PJYJY-002-862011)

#共同第一作者。

*通信作者。Tel: +86-427-2631418; E-mail: Jianqiang.Xu@dlut.edu.cn

收稿日期: 2019-10-20; 修回日期: 2019-11-17; 网络出版日期: 2019-11-26

终止密码子 UGA 编码, 具有低 pKa 值、高亲核性和高级性的性质, 通常作为硒酶(selenoenzyme)的活性中心^[3-4]。原核生物体内不存在硒代半胱氨酸合成酶, 而是沿着“丝氨酸途径”进行硒蛋白的合成^[5]。如图 1 所示, 首先 SerRS 催化 tRNA^{Sec} 生成 Ser-tRNA^{Sec}, 然后 SelA 催化 Ser-tRNA^{Sec} 形成 Sec-tRNA^{Sec}, 随后 SelB 识别并结合 Sec-tRNA^{Sec} 和硒代半胱氨酸插入序列(selenocysteine insertion sequence, SECIS)元件, 最终将 Sec 掺入到多肽链中^[6]。

然而, 全长硒蛋白生物合成受到多因素限制。首先, 释放因子 RF2 竞争性地影响 SelB 与 UGA 的识别与结合, 限制了掺硒效率。其次, SerRS 影响 SelA 与 tRNA^{Sec} 结合效率, 也会影响硒蛋白的品质^[7]。再次, 硒蛋白合成需要一个紧跟 UGA、位于 3'-UTR 的 SECIS 掺硒元件, 其与 SelB 可以发生特异性结合^[8]。此外, 不依赖 SECIS 元件合成硒蛋白成为一些学者关注和研究的一个方向。Aldag 等^[9]构建的 tRNA^{UTu} 突变体能够识别 EF-Tu, 减少了 Sec 掺入限制, 但 Ser 等氨基酸的掺杂比例增加(35%–45%)^[10]。后来, 人们又构建了 tRNA^{UTuX} 和 tRNA^{UTuT6} 突变体, 掺硒效率并未获得较大提升, 但是含硒蛋白产率却降低了^[11]。

掺硒效率低和含硒蛋白产量低仍旧是当前研究难题, 我们亟需寻找到硒蛋白高效生物合成的新方法和新途径。

tRNA^{Sec} 具有独特的二级结构, 与多种元件相互作用, 是掺硒机制中的核心元件^[12-13]。与常规 tRNA 受体臂 + TΨC 臂“7+5”结构不同, 细菌 tRNA^{Sec} 为保守的“8+5”二级结构。常规 tRNA 的 D 臂由 3–4 bp (base pair, bp) 的 D 茎和 7–12 nt (nucleotide, nt) 的 D 环组成, 而细菌 tRNA^{Sec} D 臂是由 6 bp 的 D 茎和 4 nt 的 D 环构成^[14]。Aquifex aeolicus SelA 与 Thermoanaerobacter tengcongensis tRNA^{Sec} 复合体晶体结构显示, SelA 与 tRNA^{Sec} 的 D 臂和受体-TΨC 环结合^[15]。Aquifex aeolicus SelB 与 Sec-tRNA^{Sec} 的复合体晶体结构显示, SelB 与 tRNA^{Sec} 的 T 臂结合^[16]。即沿着丝氨酸途径合成硒蛋白将阻止 tRNA^{Sec} 与 EF-Tu 结合, 减少 Ser 掺入到 Sec 中, 促进原核生物产生高品质的硒蛋白。因此, 我们可以从改造 tRNA 的 D 臂或 T 臂入手, 找出 tRNA 关键核苷酸位点。荧光各向异性结合测定结果表明, E. coli tRNA^{Sec} 能够与 E. coli SelA、SelB 结合^[16-17]。由于缺乏 E. coli tRNA^{Sec} 与 SelA (或 SelB) 的完整的晶体结构, tRNA^{Sec} 与它们之间

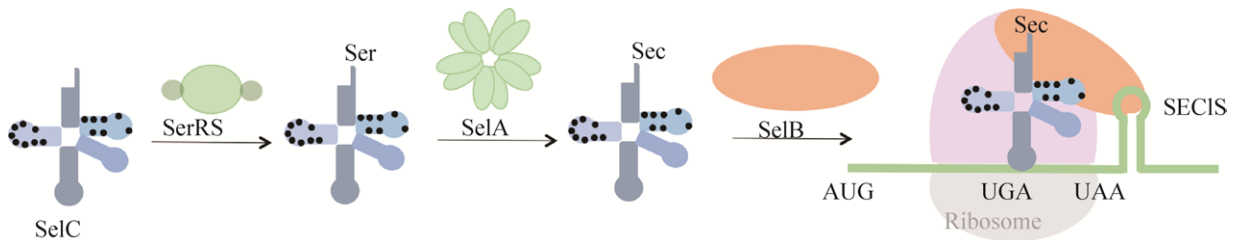


图 1. 原核生物掺硒机制示意图

Figure 1. Schematic diagram of the Sec insertion mechanism in prokaryotes. Sec-specific tRNA^{Sec} interacts with different factors such as SerRS, SelA and SelB accordingly. In the presence of bacterial SECIS element, tRNA^{Sec} ultimately carries Sec to the small subunit of ribosome to incorporate Sec into growing polypeptides and eventually forms selenoproteins. In this study, we aimed to search for key nucleotide sites on E. coli tRNA^{Sec} scaffold.

具体的核苷酸结合位点并不清楚,这将给寻找掺硒效率高的硒蛋白带来困难。

为了解 tRNA^{Sec} 与 SelA、SelB 间的相互作用及分子机制,在本研究中,我们利用定点突变技术构建 tRNA^{Sec} 突变体。首先筛选出可能的位置,包括 tRNA^{Sec} 的 D 臂和 T 臂;其次,选取 *E. coli* tRNA^{Sec} D 臂上的 G18、U20、A21 以及 T 臂上的 U63、G64、U65 核苷酸位点进行多点突变,并对 G18 和 G19 位点进行单点突变;然后以大鼠硒蛋白 TrxR1 为模型,通过 DTNB 反应检测 TrxR1 活性^[18]。最后对酶活相对较高的突变体进行纯化,验证 TrxR1 酶活稳定性。TrxR1 催化是一种高度硒依赖型反应,通过评估 TrxR1 活性,反映掺硒效率。我们初步探究了维持 *E. coli* tRNA^{Sec} 整体结构的关键核苷酸位点,这将完善大肠杆菌掺硒系统,为合成高活力硒蛋白提供有益参考,进一步推动了哺乳动物硒蛋白在癌症治疗等方面的研究^[19-20]。

1 材料和方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 菌株与质粒: 大肠杆菌 DH5 α 菌株来自本实验室,大肠杆菌 BL21 (DE3) *gor*-(基因组上已敲除谷胱甘肽还原酶基因,四环素抗性)由瑞典卡罗林斯卡医学院 Arne Holmgren 教授馈赠, pCDF-SelC (携带 *E. coli selC* 基因,链霉素抗性)质粒、pET-TRSter (携带大鼠野生型 TrxR1 基因,卡那抗性)质粒、pSUABC (携带 *selA*、*selB* 和 *selC* 基因,氯霉素抗性)均由瑞典卡罗林斯卡医学院 Elias Arnér 教授馈赠,由本实验室保藏并开展研究。

1.1.2 主要试剂: 基因操作试剂盒如 Gene JET Gel

Extraction Kit、Gene JET PCR Purification Kit、Gene JET Miniprep Kit、限制性内切酶(包括 Restriction Enzyme *Eco31 I*、*Dpn I*、*Acc65 I*、*Xba I*)以及 T4 连接酶均购自 Thermo Fisher Scientific 公司。DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司(大连 TaKaRa 公司)。Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。酶活底物 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 购自 Sigma-Aldrich 公司(USA)。

1.1.3 主要仪器: Biometra 三单元及 96 孔 Professional Thermocycler PCR 仪购自德国 Analytik JENA 公司。多功能酶标仪 SYNERGY H1 购自美国 BioTek 公司。紫外分光光度计 UV5 BIO 购自瑞士 Mettler Toledo 公司。ÄKTA Start workstation、2',5' ADP-SepharoseTM 4B 和 HiPrep 16/60 SephacrylTM S-300 High Resolution 购自 GE 公司生命科学部门(GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden)。Amicon[®]Ultra-15mL 超滤离心管(30 kDa)购自 Merck-Millipore 公司(USA)。

1.2 构建 tRNA^{Sec} 突变体和 pSUABC' 表达质粒

根据 pCDF-SelC 基因序列设计引物(表 1),在 *selC* 基因上引入定点突变^[21-22]。以 pCDF-SelC 质粒为模板,进行反向 PCR,用 *Dpn I*/*Eco31 I* 双酶切 PCR 产物,采用 T4 DNA 连接酶进行自连,获得重组质粒 pCDF-SelC', DNA 测序结果验证了在相应的位点上引入了预期突变。利用 *Acc65 I*/*Xba I* 双酶切 pCDF-SelC' 以及 pSUABC, 分别切胶回收 400 bp、7000 bp 左右处片段,用 T4 DNA ligase 连接,获得 pSUABC' 重组表达质粒。引物合成和 DNA 序列测定委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

表 1. 定点突变所用的引物
Table 1. Primers for site-directed mutagenesis

Primer	Sequence (5'→3') ¹	Purpose ²
F05A	GCGGTCTCGTCTCCAGTGAGGCGGCTGGACTTC	Forward primer for g18a mutant
F05U	GCGGTCTCGTCTCCTGTGAGGCGGCTGGACTTC	Forward primer for g18u mutant
F05C	GCGGTCTCGTCTCCCGTGAGGCGGCTGGACTTC	Forward primer for g18c mutant
F07A	GCGGTCTCGTCTCCGATGAGGCGGCTGGACTTC	Forward primer for g19a mutant
F07U	GCGGTCTCGTCTCCGTTGAGGCGGCTGGACTTC	Forward primer for g19u mutant
F07C	GCGGTCTCGTCTCCGCTGAGGCGGCTGGACTTC	Forward primer for g19c mutant
F17	GCGGTCTCGTCTCCNGNGNGGCGGCTGGACTTC	Forward primer for rma mutants
F18	GCGGTCTCGACTCCNNGATCTCCGCCAAAATGC	Forward primer for rmb mutants
R05	GCGGTCTCGGAGACGACGATCTTCCGCGCC	Reverse primer for g18, g19, and rma mutants
R08	GCGGTCTCGGAGTCGAACCTGCCCGGGAC	Reverse primer for rmb mutants
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Forward primer for sequencing
T7TER	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	Reverse primer for sequencing

This table lists the primers used for introducing mutations at the D arm or T arm of *E. coli* tRNA^{Sec} (*selC* gene product) scaffold, using the wild type pCDF-SelC plasmid as template. ¹ Restriction cleavage sites (*Eco31* I) in primer sequences were underlined. N is a degenerate base (A/C/G/U). ² RMA were mutants constructed by introducing degenerate base N at G18, U20 or A21 sites of *E. coli* tRNA^{Sec}. And RMB indicates mutants constructed by introducing N at U63, G64 or U65 sites of *E. coli* tRNA^{Sec}.

1.3 TrxR1 蛋白的表达与纯化

将 pSUABC'质粒转化到 BL21 (DE3) *gor-* (含 pET-TRSter 质粒)感受态中, 涂布于 TCK 抗性固体 LB 平板上, 平板含 50 μg/mL 卡那霉素(Kana, K)、34 μg/mL 氯霉素(Chl, C)、15 μg/mL 四环素(Tet, T)。37 °C 过夜培养, 之后挑取生长状态良好的圆形单菌落至 5 mL 含 TCK 抗性的新鲜液体 LB 培养基中, 于 37 °C、220 r/min 振荡培养 12 h。按 1%的接种量将菌液接种到 24 孔板(含 3 mL 的 TCK 抗性 LB 液体培养基)、100 mL 锥形瓶(含 20 mL 的 TCK 抗性 LB 液体培养基)或 1 L 锥形瓶(含 200 mL 的 TCK 抗性 LB 液体培养基), 于 37 °C、220 r/min 振荡培养至对数生长末期($OD_{600nm} \approx 2.4$)。依次加入 0.5 mmol/L IPTG、5 μmol/L selenite、100 mg/L L-cysteine(勿要同时加入), 于 24 °C、220 r/min 继续振荡培养 24 h。4000 r/min 离心 20 min, 收集菌体, 用 TE buffer (pH 7.5) (50 mmol/L Tris-HCl+20 mmol/L EDTA)重悬, 待用^[23]。

1.4 TrxR1 蛋白的分离纯化

向重悬液中加入溶菌酶(50 mg/mL)至终浓度为 1 mg/mL, 混匀, 反复冻融 3 次后, 超声破碎。4°C、13000 r/min 离心 20 min 后, 取上清, 经 0.45 μm 无菌滤膜过滤后, 上样至 2',5' ADP-Sepharose 亲和层析柱纯化(利用 24 孔板表达的 TrxR1 不进行纯化)。纯化后的样品利用超滤管将其浓缩至 3 mL, 于 4 °C、13000 r/min 离心 20 min, 取 2 mL 上清上样到凝胶过滤柱, 用含有 0.15 mol/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)平衡后进行连续线性梯度洗脱。蛋白凝胶过滤与 ÄKTA StartTM 蛋白纯化工作站联用, 通过监测 UV 280 nm (蛋白质吸光度)自动收集洗脱峰, 每管收集 4 mL, 对自动收集的组分测定其在 463 nm 处吸光度值, TrxR1 蛋白样品于 4 °C 保存^[24]。

1.5 TrxR1 蛋白浓度的测定

利用 Bradford 法在 96 孔板测定蛋白浓度, 每

个标准品和样品设置 3 个孔平行测定, 以牛血清蛋白作为标准蛋白, 测定波长设置在 595 nm。将 500 μL TE buffer (空白)或纯酶放入石英比色皿中, 利用紫外分光光度计测定 OD_{463} 处的 FAD 吸光度值, 以此来计算 TrxR1 纯酶浓度, 其中, FAD 的摩尔吸光系数为 $11300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。

1.6 SDS-PAGE

将蛋白样品与 5 \times SDS Loading Buffer 混合, 后者含有 250 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)、10% SDS (M/V)、5% β -巯基乙醇(V/V)、50% 甘油(V/V)和 0.5% 溴酚蓝(M/V)。混合样品在 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min, 之后离心, 上样, 进行 10%还原型 SDS-PAGE 凝胶电泳, 凝胶用考马斯亮蓝 R250 染色显示蛋白条带, 使用凝胶系统记录电泳结果。

1.7 TrxR1 酶活力测试

在 96 孔酶标板中加入 5 μL TrxR1, 随后加入 195 μL DTNB 反应液, DTNB 反应液包括 2.5 mmol/L DTNB、300 $\mu\text{mol/L}$ NADPH、50 mmol/L TE Buffer (pH 7.5)。使用 BioTek 酶标仪在 412 nm 下连续监测 96 孔酶标板中 TNB 的生成量, 选取反应初始阶段线性部分, 根据线段斜率进行酶活力计算^[6]。本文中, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, TrxR1 催化还原 DTNB, 我们把每分钟消耗 1 $\mu\text{mol/L}$ TNB 定义为 1 个酶活

单位(U), 体积活力表述为 U/mL 蛋白, 比活力表述为 U/mg 蛋白。其中, TNB 的摩尔吸光系数为 $13600 \text{ mol}/(\text{L}\cdot\text{cm})$ 。所有酶促反应均在室温(25 $^{\circ}\text{C}$)条件下测试, 读数间隔 10, 总时长 3 min, 以未加酶的反应液为空白对照, 至少重复 3 次测量, 使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行分析。

1.8 掺硒效率测试的统计方法

本研究中显示的所有实验数据均为 3–5 个独立实验的平均值 \pm 标准偏差(mean \pm SD)。数据采用 GraphPad Prism version 7.0 软件(GraphPad 软件, San Diego, USA)进行分析。

2 结果和分析

2.1 构建 *E. coli* tRNA^{Sec} 突变体

为了确定 tRNA^{Sec} 不同位点的突变对酶活的影响, 我们进行 tRNA^{Sec} 突变体的构建, 突变位点详见表 2。首先, 在 *selC* 基因的“G18、U20、A21”和“U63、G64、U65”位点处, 分别使用简并引物引入碱基突变, 得到了 16 个多点突变体。然后对大肠杆菌 tRNA^{Sec} 的 G18 和 G19 位点进行其他 3 个碱基的单点突变, 共产生 G18A、G18U、G18C、G19A、G19U 和 G19C 这 6 个单点突变体。最后,

表 2. *E. coli* tRNA^{Sec} 多点突变

Table 2. Multipoint mutations of *E. coli* tRNA^{Sec}

Mutant	Mutation sites	Mutant	Mutation sites
RMA1	U20C; A21G	RMA26	U20A; A21G
RMA5	G18U; A21U	RMA28	G18A; A21G
RMA6	G18U; U20C	RMA29	G18A; U20A; A21G
RMA11	C16G; G20A; Δ U20	RMB1	U63C; G64A
RMA18	G18C; U20A; A21C	RMB2	U63C; G64A; U65C
RMA22	G18C; U20C; A21G	RMB7	G64U; U65C
RMA24	G18U; U20C; A21G	RMB11	U63G; U65G
RMA25	G18A; U20C	RMB12	U63G; G64C; U65G

Numbers denote the position of mutation on the *Escherichia coli* tRNA^{Sec} scaffold. A, U, G, C represent for adenine, uracil, guanine, and cytosine. “ Δ ” means deletion.

我们构建了22个pCDF-SelC'和pSUABC'重组质粒。

2.2 *E. coli* tRNA^{Sec}的核苷酸位点改变对 TrxR1 酶活的影响

原核生物 tRNA^{Sec} 是掺硒系统的重要因子,与

SelA 和 SelB 分别发生相互作用,如图 1 所示。我们推测改变大肠杆菌 tRNA^{Sec} 可能会改变掺硒效率。为了分析这些 tRNA 突变体的特性,在 SECIS 元件存在的情况下,我们先利用 22 个 selC 突变株共表

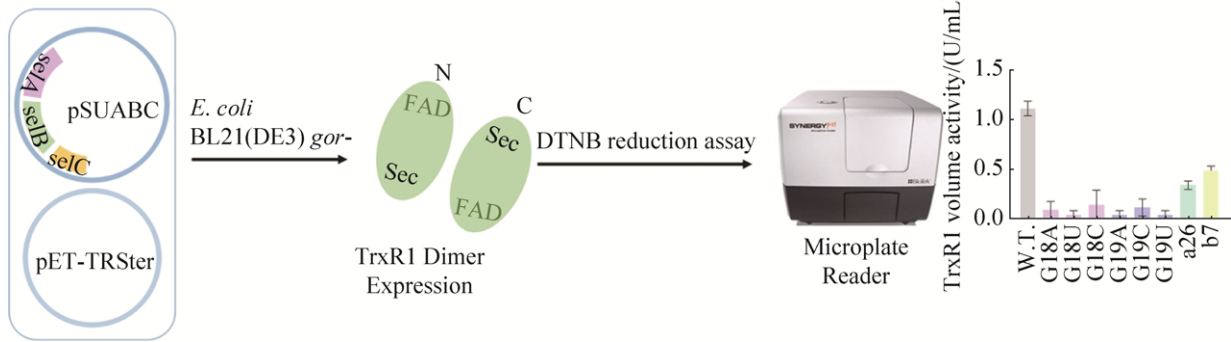


图 2. TrxR1 蛋白表达、纯化与酶活检测

Figure 2. Technical schematics of TrxR1 production: protein expression, purification and enzyme activity detection. Firstly, the pSUABC' plasmids carrying the tRNA^{Sec} mutants (*selC'* genes) were transformed into BL21 (DE)3 *gor-* (pET-TRSter) strain. TrxR1 were obtained and further analyzed by DTNB reduction assay using an enzyme-labeling microplate reader. Finally, the mutants with higher enzyme activities were identified by the data analysis.

达 TrxR1,也就是将 pSUABC'转化到 BL21 (DE3) *gor-*(含 pET-TRSter 质粒)感受态中,在 24 深孔板中表达 TrxR1,然后通过 DTNB 反应检测 TrxR1 粗酶的体积活力(图 2)。从考马斯亮蓝染色分析可以看出,55 kDa 处有明显的亚基条带,TrxR1 获得表达。

从图 3 可以看出,突变体 tRNA 的均低于野生型 tRNA 共表达的 TrxR1 酶活。与其他突变体相比,a26 和 b7 的酶活相对较高。结果表明,改变大肠杆菌 tRNA^{Sec} 核苷酸位点能够调节 TrxR1 酶活,这将有利于获得潜在的高活性硒蛋白。而有关 G18 和 G19 位点的所有单点突变体,它们共表达的 TrxR1 酶活均低于野生型的 10% (表 3)。tRNA^{Sec} 上的 G18 和 G19 位点的突变导致硒蛋白酶活丧失,可能是大肠杆菌 tRNA^{Sec} 重要位点,关系到掺硒效率,可以进一步研究。

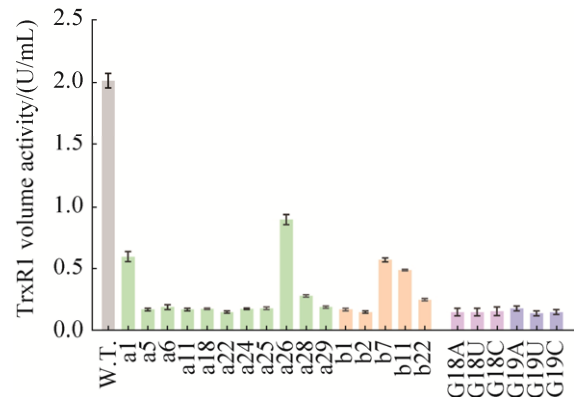


图 3. 使用 tRNA^{Sec} 突变体制备并纯化的 TrxR1 进行酶活分析(24 深孔板)

Figure 3. Enzyme activity analysis of TrxR1 produced with site-directed mutant tRNA^{Sec} (cultured in the 24 deep-well plates). All the samples were induced by IPTG at a final concentration of 0.5 mmol/L and cultured in the 24 deep-well plates. The TrxR1 crude enzyme activities were measured by the DTNB assay, and the results are shown in Table 2. Data are expressed as mean±SD. W.T. means wild-type TrxR1. "a" represents carrying RMA tRNA^{Sec} mutants co-expressing TrxR1. Similarly, "b" denotes carrying RMB tRNA^{Sec} mutants co-expressing TrxR1.

表 3. DTNB 还原检测分析
Table 3. DTNB reduction assay

Sample	Volume activity */(U/mL)	Sample	Volume activity */(U/mL)	Sample	Volume activity */(U/mL)
W.T.	2.00	W.T., -IPTG	0.10	a1	0.61
a5	0.18	a6	0.20	a11	0.18
a18	0.19	a22	0.16	a24	0.19
a25	0.19	a26	0.90	a28	0.29
a29	0.20	b1	0.18	b2	0.16
b7	0.58	b11	0.50	b22	0.26
G18A	0.16	G18U	0.16	G18C	0.17
G19A	0.19	G19U	0.15	G19C	0.16

This table summarized the enzyme activities (volume activities) of these TrxR1 produced with tRNA^{Sec} variants cultured in 24 deep-well plates. We resuspended *E. coli* BL21 (DE)3 *gor-* (pSUABC'/pET-TRSter) wet cell pellet with 2 mL TE buffer (pH 7.5). All samples were induced by adding 0.5 mmol/L IPTG, except "W.T.-IPTG" which meant without IPTG. * TrxR1 crude enzyme activities were determined by the standard DTNB reduction assay. Each group of data was measured three times and the average value was shown in the table.

2.3 确认 G18 和 G19 是大肠杆菌 tRNA^{Sec} 的关键位点

为了排除小体系表达蛋白的不稳定对结果造成影响, 我们先在 100 mL 摇瓶中表达 a26 和 b7、G18 和 G19 单点突变体, 然后利用 2',5' ADP-Sepharose 亲和层析纯化 TrxR1 蛋白, 同时检测 TrxR1 纯化前后的酶活。考马斯亮蓝染色分析显示, 纯化前(图 4-A)目标带明显, 纯化后(图 4-B)几乎只剩下目标带。

与野生型 tRNA^{Sec} 相比, 基于突变体 tRNA^{Sec} 的 TrxR1 经过表达、纯化, 硒蛋白产物的酶活性呈现不同程度的降低, 如图 5、表 4 所示, 其中 G18 和 G19 突变体的体积活力则更低, 减少到不足野生型的 30%。这些数据表明, 改变 G18 或 G19 位点不利于产生高活性的硒蛋白。tRNA 是一种柔性结构, 某些位点的改变可能会改变 tRNA 的整体结构, 导致 tRNA 减少和某些作用因子的相互作用, 从而降低掺硒效率, 影响硒蛋白的功能。

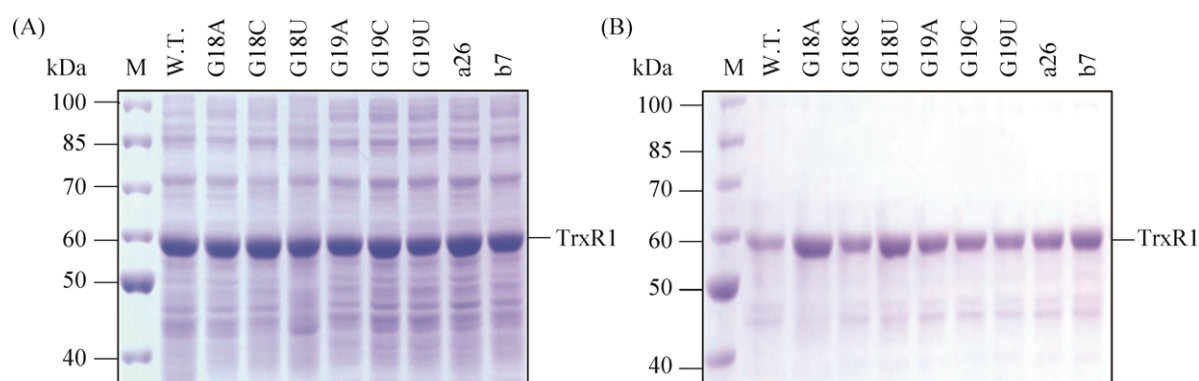


图 4. 使用 tRNA^{Sec} 突变体制备并纯化的 TrxR1 进行还原型 SDS-PAGE 分析

Figure 4. Reducing SDS-PAGE analysis of purified TrxR1 produced with tRNA^{Sec} variants. Rat TrxR1 were expressed by BL21 (DE)3 *gor-* (pSUABC'/pET-TRSter) strain, which were cultured in 100 mL shaking flask and further purified by 2',5' ADP-Sepharose affinity chromatography. The crude sample (A) and the purified protein (B) were run on 10 % SDS-PAGE gels. "M" stands for M_w protein maker.

表 5. TrxR1 蛋白产量与比活力总结

Table 5. The yields and specific activities for TrxR1

Mutation sites ^a	ADP Sepharose ^b			Sephacryl S-300 ^c			
	mg	U/mg ^d	U	mg	U/mg ^d	U	
W.T.	—	14.99	6.30	94.41	4.63	19.10	88.51
a26	U20A; A21G	8.18	4.21	34.43	1.85	8.60	15.90
b7	G64U; U65C	17.04	1.16	19.73	2.88	6.21	17.88
b1	U63C; G64A	23.17	0.41	9.55	2.2	1.01	2.21

All TrxR1 proteins produced with tRNA^{Sec} variants listed above were expressed in 1 L shaking flask and subsequently purified by affinity chromatography and gel filtration accordingly. ^a “—” means that there is no mutation in tRNA, and the others are the sites of the mutation in *E. coli* tRNA^{Sec}. ^b TrxR1 were purified by 2,5 ADP-Sepharose only. ^c TrxR1 were purified by 2,5 ADP-Sepharose and then concentrated and finally purified by gel filtration. ^d Specific activity were determined in the standard DTNB reduction assay.

野生型 tRNA^{Sec} 共表达的 TrxR1 比活力的一半, 为 8.6 U/mg; b7 为 6.21 U/mg; b1 比活力最低, 与之前结果较为一致, 说明深孔板筛选鉴定的方案是可行的, 即: 首先构建特异位点突变体, 利用 24 深孔板表达硒蛋白 TrxR1, 通过 DTNB 分析初步筛出酶活相对较高的 tRNA^{Sec} 突变, 最后利用亲和层析、凝胶过滤纯化对应的 TrxR1, 计算蛋白产量和比活力, 对初始预判进行反馈修订。

3 讨论

在原核生物系统中, tRNA 依次与 SerRS、SelA 和 SelB 相互作用, 获得 UGA 精准引导, 从而使 Sec 掺入多肽链中, 最终生成硒蛋白。当然, 少数情况下 UAG 密码子也可以编码 Sec 产生硒蛋白^[26]。但是, 终止密码子 UGA 或 UAG 都能与释放因子结合, 翻译过程终止, 从而形成删减化硒蛋白^[26-27]。提高掺硒效率、规避翻译终止是本研究主要目的。

在本研究中, 大肠杆菌 tRNA^{Sec} 的 G18 和 G19 位点的所有突变体生产酶活力远低于野生型的, 说明 G18 和 G19 位点可能是 *E. coli* tRNA^{Sec} 骨架上的关键核苷酸位点。2013 年, Yuzuru Itoh 等认为 *Thermoanaerobacter tengcongensis* tRNA^{Sec} 三级结构由 tRNA D 臂和 T 臂维持, 包括 G18:U55 bp,

Y16:Y59 (Y 是 C 或 U), U20:G19:C56 和 C15:G20a:G48 等碱基^[15]。通过 BLAST 比对原核 tRNA^{Sec} 序列, 也可以看出 tRNA^{Sec} D 臂上的 G18 和 G19 位点序列保守。由此推断, *E. coli* tRNA^{Sec} 骨架上的 G18、G19 位点可能是维持 tRNA 三级结构的关键核苷酸位点, 改变这两个位点, 不利于 tRNA 与 SelA 或 SelB 结合, 这或许为我们寻找掺硒效率高的硒蛋白提供了方向。这也说明了 *E. coli* tRNA^{Sec} 具有序列可变性, 一些关键核苷酸位点的改变, 可能使得 tRNA^{Sec} 减少和 SelA、SelB 相互作用的活性, 从而严重影响 TrxR1 发挥功能, 下一步通过进行蛋白质与核酸之间的相互作用来验证。与此结果类似, Tetsu M. Ishii 发现 tRNA^{Sec} 的 D 臂的 A14:U21 和 C15:G20 能够维持 tRNA 结构稳定性, 然而并不在 tRNA 功能中起特异性作用^[28]。我们发现改变 tRNA^{Sec} 可以影响掺硒效率, 进而发现 G18 和 G19 可能是大肠杆菌 tRNA^{Sec} 的关键核苷酸位点, 这为解决硒蛋白掺硒效率低、产量低提供了新思路。在后期研究中, 我们先筛选出高酶活的突变体, 然后对 TrxR1 功能进行性质表征。

定点突变是基于 PCR 技术向质粒目的 DNA 引入突变, 根据突变位点的数量, 可以分为单点突变和多点突变, 一般用于有效提升 DNA 所表达的目的蛋白的性质表征^[29]。然而, 目前人们并未

构建有完整的 *E. coli* tRNA^{Sec} 与 SelA、*E. coli* tRNA^{Sec} 与 SelB 晶体结构, 这将不利于研究 *E. coli* tRNA^{Sec} 对 TrxR1 掺硒效率的影响。在本研究中, 我们以大鼠 TrxR1 硒蛋白为模型, 通过对大肠杆菌 tRNA^{Sec} 中一些可能与 SelA/SelB 结合的位点进行定点突变, 寻找大肠杆菌 tRNA^{Sec} 的关键核苷酸位点。我们发现改变大肠杆菌 tRNA^{Sec} 的序列可以改变 TrxR1 硒蛋白的酶活。这与 Christian Baron 等^[16]的早期结果类似, 他们将 *E. coli* tRNA^{Sec} D 臂上的 G8、U9 和 U14 位点进行碱基替换, FDH_H、FDH_N 重组硒蛋白的比活力有所下降。这提示我们, 通过改造 tRNA 寻找高品质硒蛋白的方法是可行的。同理, 我们可以通过突变 SECIS 元件, 寻找目标硒蛋白, 目前在本实验室正在进行中。

在筛选方法上, 我们先利用 24 深孔板进行粗筛, 然后对酶活相对较高的 TrxR1 进行纯化。从后续的实验可以看出, 在 24 深孔板或 100 mL 锥形瓶中共表达 pSUABC' 突变体所表达的 TrxR1 酶活变化趋势一致, 这有效地减少了筛选的工作量。在之后的实验中, 我们将进一步扩大突变范围, 有望获得高品质硒蛋白。

在本研究中, 我们根据 RMA26 和 RMB7 突变体的序列信息及测序结果, 利用 Secmarker (<http://secmarker.org.cat>) 在线预测 tRNA^{Sec} 的二级结构^[25], 之后再利用 RNAComposer (<http://rnacomposer.ibch.poznan.pl/>) 在线预测 RMA26 和 RMB7 的空间结构, 结果如图 6 所示。RMA26 和 RMB7 分别在骨架上突变了 U20/A21 和 G64/U65,

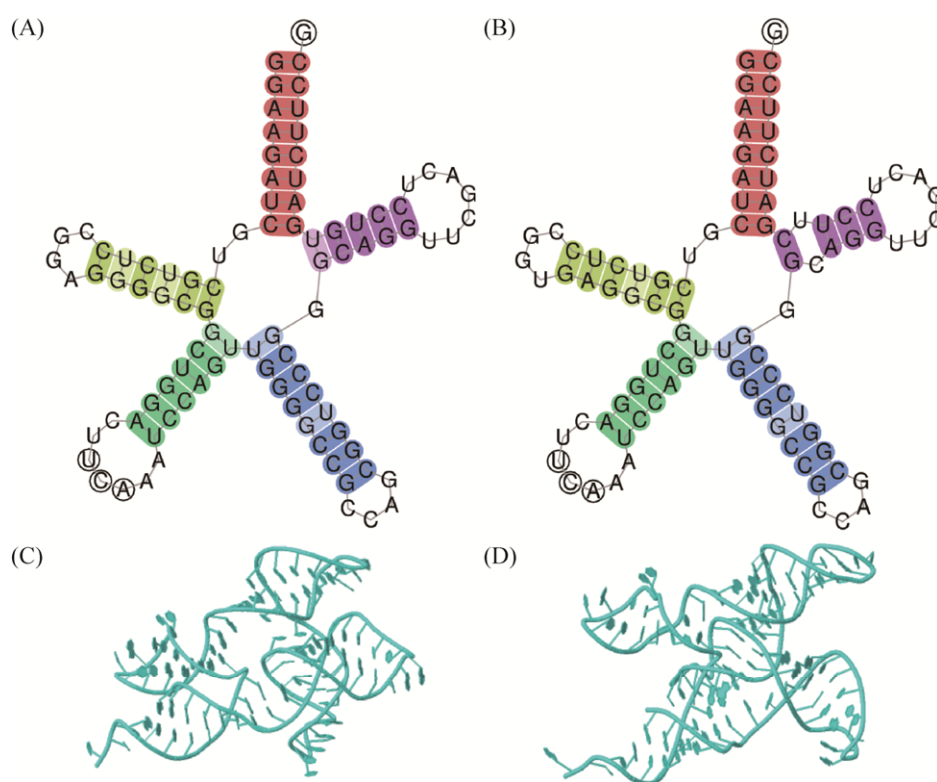


图 6. 本研究中部分 tRNA^{Sec} 突变体的二级结构和三级结构预测

Figure 6. Predicted secondary and tertiary structures of tRNA^{Sec} mutants in this study. (A) Predicted secondary structure of RMA26 (U20A&A21G). (B) Predicted secondary structure of RMB7 (G64U&U65C). (C) Predicted structure of RMA26 (U20A&A21G). (D) Predicted structure of RMB7 (G64U&U65C).

从图6可以看出,新产生的tRNA^{Sec}一级结构不同,导致它们的二级结构改变,在tRNA三级结构上造成差异,可能影响到与SelA和SelB的识别与结合,这对高效掺硒产生了影响。在后期研究中,我们将致力于筛选出高酶活的tRNA^{Sec}突变体,精细研究tRNA新序列结构与掺硒元件的互作对TrxR1掺硒效率的改善。

基于硒蛋白在大肠杆菌中的合成机制,我们在本研究中聚焦tRNA^{Sec}进行位点突变和结构改造。大肠杆菌tRNA^{Sec}的关键核苷酸位点参与调控Sec掺入及硒蛋白合成,这将揭示tRNA^{Sec}与SelA/SelB之间的相互识别和调控机制。同时,我们为工程化改造tRNA合成全长硒蛋白提供了新方法。必须指出的是,我们需要扩大定点突变的范围,以便于寻找到适宜的新型tRNA^{Sec}高活性的硒蛋白。本研究对优化大肠杆菌硒蛋白合成系统以获得高品质硒蛋白将提供有益参考。

参 考 文 献

- [1] Avery JC, Hoffmann PR. Selenium, selenoproteins, and immunity. *Nutrients*, 2018, 10(9): 1203.
- [2] Hatfield DL, Tsuji PA, Carlson BA, Gladyshev VN. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. *Trends in Biochemical Sciences*, 2014, 39(3): 112–120.
- [3] Mousa R, Dardashti RN, Metanis N. Selenium and selenocysteine in protein chemistry. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2017, 56(50): 15818–15827.
- [4] Gao YH, Zhang JL, Huang XD, Zhang GX. Glutathione peroxidase 1, selenoprotein K, and selenoprotein H may play important roles in chicken testes in response to selenium deficiency. *Biological Trace Element Research*, 2017, 179(2): 271–276.
- [5] Hoffman KS, Crnković A, Söll D. Versatility of synthetic tRNAs in genetic code expansion. *Genes*, 2018, 9(11): 537.
- [6] Xu JQ, Croitoru V, Rutishauser D, Cheng Q, Arnér ESJ. Wobble decoding by the *Escherichia coli* selenocysteine insertion machinery. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(21): 9800–9811.
- [7] Wang CY, Guo Y, Tian QN, Jia Q, Gao YZ, Zhang QF, Zhou C, Xie W. SerRS-tRNA^{Sec} complex structures reveal mechanism of the first step in selenocysteine biosynthesis. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(21): 10534–10545.
- [8] Fu X, Söll D, Sevostyanova A. Challenges of site-specific selenocysteine incorporation into proteins by *Escherichia coli*. *RNA Biology*, 2018, 15(4/5): 461–470.
- [9] Aldag C, Bröcker MJ, Hohn MJ, Prat L, Hammond G, Plummer A, Söll D. Rewiring translation for elongation factor Tu-dependent selenocysteine incorporation. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2013, 52(5): 1441–1445.
- [10] Fan ZL, Song J, Guan TC, Lv XX, Wei JY. Efficient expression of glutathione peroxidase with chimeric tRNA in amber-less *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*, 2018, 7(1): 249–257.
- [11] Müller C, Bröcker MJ, Prat L, Ip K, Chirathivat N, Feiock A, Veszprémi M, Söll D. A synthetic tRNA for EF-Tu mediated selenocysteine incorporation *in vivo* and *in vitro*. *FEBS Letters*, 2015, 589(17): 2194–2199.
- [12] Mukai T, Vargas-Rodriguez O, Englert M, Tripp HJ, Ivanova NN, Rubin EM, Kyrpides NC, Söll D. Transfer RNAs with novel cloverleaf structures. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(5): 2776–2785.
- [13] Sturchler C, Westhof E, Carbon P, Krol A. Unique secondary and tertiary structural features of the eucaryotic selenocysteine tRNA^{Sec}. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(5): 1073–1079.
- [14] Baron C, Westhof E, Böck A, Giegé R. Solution structure of selenocysteine-inserting tRNA^{Sec} from *Escherichia coli*: Comparison with canonical tRNA^{Ser}. *Journal of Molecular Biology*, 1993, 231(2): 274–292.
- [15] Itoh Y, Bröcker MJ, Sekine S, Hammond G, Suetsugu S, Söll D, Yokoyama S. Decameric SelA•tRNA^{Sec} ring structure

- reveals mechanism of bacterial selenocysteine formation. *Science*, 2013, 340(6128): 75–78.
- [16] Itoh Y, Sekine SI, Yokoyama S. Crystal structure of the full-length bacterial selenocysteine-specific elongation factor SelB. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(18): 9028–9038.
- [17] Tormay P, Sawers A, Böck A. Role of stoichiometry between mRNA, translation factor SelB and selenocysteyl-tRNA in selenoprotein synthesis. *Molecular Microbiology*, 1996, 21(6): 1253–1259.
- [18] Arnér ESJ. Recombinant expression of mammalian selenocysteine-containing thioredoxin reductase and other selenoproteins in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*, 2002, 347: 226–235.
- [19] Prast-Nielsen S, Dexheimer TS, Schultz L, Stafford WC, Cheng Q, Xu JQ, Jadhav A, Arnér ESJ, Simeonov A. Inhibition of thioredoxin reductase 1 by porphyrins and other small molecules identified by a high-throughput screening assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, 50(9): 1114–1123.
- [20] Peng XX, Xu JQ, Arnér ESJ. Thiophosphate and selenite conversely modulate cell death induced by glutathione depletion or cisplatin: effects related to activity and Sec contents of thioredoxin reductase. *Biochemical Journal*, 2012, 447(1): 167–174.
- [21] Dominy CN, Andrews DW. Site-directed mutagenesis by inverse PCR//Casali N, Preston A. *E. coli* Plasmid Vectors. Totowa, NJ: Humana Press, 2003: 209–223.
- [22] Hsieh PC, Vaisvila R. Protein engineering: single or multiple site-directed mutagenesis//Samuelson JC. *Enzyme Engineering: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2013: 173–186.
- [23] Xu JQ, Arnér ESJ. Pyrroloquinoline quinone modulates the kinetic parameters of the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase 1 and is an inhibitor of glutathione reductase. *Biochemical Pharmacology*, 2012, 83(6): 815–820.
- [24] Xu JQ, Cheng Q, Arnér ESJ. Details in the catalytic mechanism of mammalian thioredoxin reductase 1 revealed using point mutations and juglone-coupled enzyme activities. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 94: 110–120.
- [25] Santesmasses D, Mariotti M, Guigó R. Computational identification of the selenocysteine tRNA (tRNA^{Sec}) in genomes. *PLoS Computational Biology*, 2017, 13(2): e1005383.
- [26] Turanov AA, Xu XM, Carlson BA, Yoo MH, Gladyshev VN, Hatfield DL. Biosynthesis of selenocysteine, the 21st amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis. *Advances in Nutrition*, 2011, 2(2): 122–128.
- [27] Carlson BA, Lee BJ, Tsuji PA, Tobe R, Park JM, Schweizer U, Gladyshev VN, Hatfield DL. Selenocysteine tRNA^{[Ser]Sec}: From nonsense suppressor tRNA to the quintessential constituent in selenoprotein biosynthesis//Hatfield DL, Schweizer U, Tsuji PA, Gladyshev VN. *Selenium*. Cham: Springer, 2016: 3–12.
- [28] Ishii TM, Kotlova N, Tapsoba F, Steinberg SV. The long D-stem of the selenocysteine tRNA provides resilience at the expense of maximal function. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(19): 13337–13344.
- [29] Ling MM, Robinson BH. Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Analytical Biochemistry*, 1997, 254(2): 157–178.

Key nucleotide sites of *Escherichia coli* tRNA^{Sec}

Xiaoxiao Wang^{1#}, Shibo Sun^{1#}, Yici Zhang¹, Nan Zhang^{1,2}, Jihong Chen¹, Weiping Xu³, Qiang Ma², Jianqiang Xu^{1*}

¹ School of Life and Pharmaceutical Sciences (LPS), Panjin Institute of Industrial Technology, Dalian University of Technology, Panjin 124221, Liaoning Province, China

² Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China

³ School of Ocean Science and Technology (OST) and Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering (MOE), Dalian University of Technology, Panjin 124221, Liaoning Province, China

Abstract: In prokaryotes, selenoprotein synthesis requires the interaction between selenocysteine (Sec)-specific tRNA^{Sec} (SelC) and selenocysteinyl tRNA synthase (SelA) or Sec-specific elongation factor (SelB). **[Objective]** Based on the Sec insertion machinery in *Escherichia coli*, we aimed at finding key sites of tRNA^{Sec} scaffold and providing a new way to solve the problems of low Sec insertion efficiency and low yield of selenoprotein. **[Methods]** We used rat cytoplasmic thioredoxin reductase (thioredoxin reductase 1, TrxR1) as a model selenoprotein. First, we constructed tRNA^{Sec} by site-directed mutagenesis, and transformed them to BL21 (DE3) *gor-* to obtain a positive recombinant strain (carrying pET-TRSter⁺/pSUABC), which was used to express rat cytoplasmic thioredoxin reductase 1 (TrxR1). Then TrxR1 was purified using 2',5'-ADP Sepharose affinity chromatography and gel filtration. The enzyme activities of TrxR1 were determined by the classical Se-dependent DTNB reduction assay to analyze the key nucleotide sites and evaluate the Sec incorporation efficiency. **[Results]** When tRNA^{Sec} co-expressed with SelA and SelB in the presence of the bacterial SECIS element, the activities of TrxR1 decreased at varying degrees compared with wild type. Among them, the enzyme activities of all G18 and G19 mutants were much lower than that of wild type (<10%). However, the enzymatic activities of a26 and b7 were relatively high. **[Conclusion]** G18 and G19 nucleotide sites of *E. coli* tRNA^{Sec} may play a vital role in maintaining the stability and flexibility of tRNA^{Sec}. Site-directed mutations of tRNA^{Sec} causing the conformational change may affect the interaction between tRNA^{Sec} and Sec elements. Thus, it is possible to improve the Sec insertion efficiency via proper modification on tRNA nucleotide sites.

Keywords: *Escherichia coli*, selenocysteine (Sec), selenoprotein, Sec incorporation tRNA^{Sec}, cytoplasmic thioredoxin reductase (TrxR1)

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31670767), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (DUT17JC36, DUT17RC(4)27) and by the Research and Development Program of Panjin Institute of Industrial Technology (DUT) (PJYJY-002-862011)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Tel: +86-427-2631418; E-mail: Jianqiang.Xu@dlut.edu.cn

Received: 20 October 2019; Revised: 17 November 2019; Published online: 26 November 2019