酵母线粒体细胞色素 b 基因突变的定位和内含子的功能

齐 义 鹏

（武汉大学病毒研究所）

酵母线粒体 DNA（mt-DNA）的细胞色素 b(cob) 基因是由 6 个编码区(外显子)和 5 个非编码区(间隔顺序或内含子)组成的镶嵌结构[1-4]。长约 6.5kb，但成熟的 mRNA 只有 2.1 kb，包括全部 6 个外显子而无内含子[3]。间隔顺序不仅是真核基因的普遍特点，最近发现[5]，原核基因也有内含子。其功能容易被忽视，因此研究内含子的功能具有普遍意义。

许多研究者指出[1-3,6,7]，cob 基因的内含子突变，不仅使酵母失去了表达细胞色素 b 的能力，细胞色素 c 氧化酶亚基 I 基因(OXi 3)也不能转录。这种既影响 cob 基因，又影响 OXi 3 基因的现象称为 box 现象[1,2]。

切去内含子连接外显子的加工过程称为 mRNA 的拼接。一种特殊蛋白质——成熟酶调控着 mRNA 的拼接过程[3,7-9]。目前认为，内含子 2[10]特别是内含子 4[3,7,8]是成熟酶的编码区。本文是作者在美国俄亥俄州立大学进修期间研究工作的一部分。作者测定了 mt-DNA cob 基因突变位点的碱基变化，证明了内含子的重要生理功能。

一、材料和方法

菌种和 DNA 的分离 野生型啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由美国俄亥俄州立大学遗传系保存并提供。用 Alexander 等[12]叙述的方法，以氯化锰作诱变剂由野生型得到突变菌株 cob45，cob71，cob54。突变株由半乳糖静置培养，野生型用甘油振荡培养[12]。按文献[11]测定其遗传表型和分离线粒体，按文献[13]分离纯化 mt-DNA。

mt-DNA 的限制性消化 以限制酶 EcoRI 消化突变株 cob54；用 Bcl I 和 Bgl II 双酶消化突变株 cob45 和 cob71。在 0.7% 琼脂糖凝胶上电泳。分别回收 EcoRI-6 号带和 BclI/BglII-9 号带。用 Thuring 等[14]的冰冻-融化法分离纯化 DNA 片段。

mt-DNA 片段的克隆 片段 EcoRI-6 和 BclI/BglII-9 再次用 HpaII 消化。以噬菌体 M13mp8 和 M13mp9 作克隆载体，经 EcoRI 和 AccI 消化后用于 EcoRI/HpaII 片段的克隆；经 BclI 和 AccI 消化后用于 BclI/HpaII 片段的克隆。按 Messing 的方法[15]转染大肠杆菌 JM103。

DNA 序列分析 从平板中挑取 M13 阳性(无色)噬菌斑、制备 SS-DNA 模板。按 Sanger 的 ddXTP 链终止法[16]测定野生型和突变菌株的 DNA 顺序。

本文 1985 年 10 月 11 日收到。

二、结　果

酵母突变株和野生型的表型不同. 当以半乳糖作碳源时，突变株以发酵方式生长；以甘油作碳源不能生长[4]. 突变菌株的培养和分析结果见表 1.

表 1　酵母突变菌株的生长和表型

菌　株	碳　源		oxi3	cob
	甘　油	半乳糖		
野生型	+++	+++	+++	+++
突变株 cob45	−	+++	−	−
突变株 cob71	−	+++	−	−
突变株 cob54	−	+++	−	−

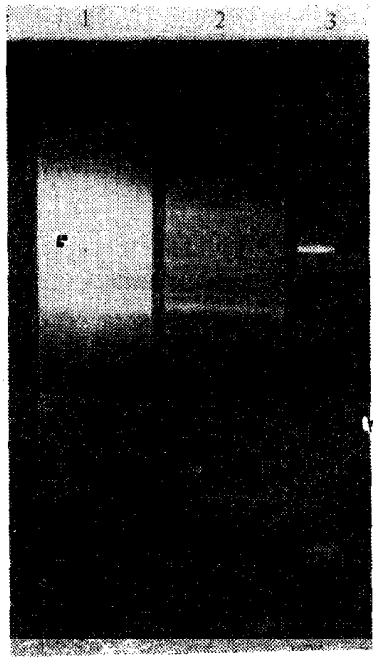

图 1　片段 BclI/BglII-9 的回收
mt-DNA 由突变株 cob45 (第 1 行)和 cob71 (第 2 行)制备. 以 BclI/BglII 消化，在 0.7% 琼脂糖上电泳. 以第 3 行的野生型的 BclI/BglII-9 作为片段回收的对照. 图中箭头显示所需要的片段已被切去

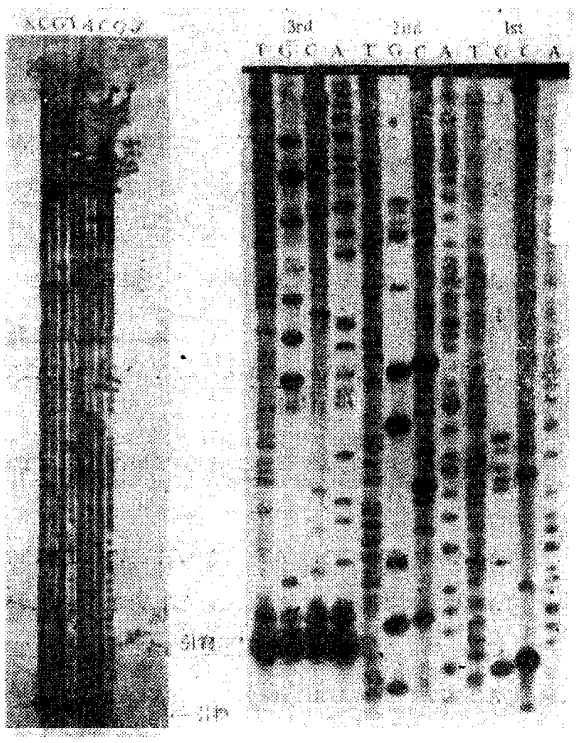

图 2　突变株 cob71 部分 DNA 顺序的放射自显影图谱
顺序分析用 Messing M13 克隆系统和 Sanger ddXTP 顺序法. 以 8%PAG 进行电泳. 左图，用长胶 (17×80cm)，加样两次；右图，用短胶 (34×40cm)，加样 3 次

表 1 说明，3 个突变株均不能氧化甘油，仅能发酵半乳糖，失去了产生细胞色素 c 氧化酶和细胞色素 b 的能力，表型为 mt-. 因此，如能确定 DNA 链上的突变位点、就能在分子水平上找到这些氧化表型丧失的直接原因. 根据某些作者[1,3,7,8]介绍的 mt-DNA 的限制性内切酶图谱，分离纯化了内含子 4，5 和外显子 5 的 DNA 片段(图 1)，并测定了它们的核苷酸顺序. 图 2 显示在长 (17 × 80cm) 和短 (34 × 40cm) 聚丙烯酰胺凝胶上突变菌株 DNA 顺序的一部分.

内含子 4 的 575 个核苷酸顺序以及内含子 4，5 和外显子 5 的 709 个核苷酸顺序被测定

```
        660                                 680                                 700
GAATT  CCAAT  GCATT  CATAC  TTTAT  TTTTA  AAGAT  TTAGT  AACTG  TTTTC
EcoRl  Exon4
        710                                 730                                 750
TTATT  TATGT  TAATT  TTAGC  ATTAT  TTGTA  TTCTA  TTCAC  CTAAT  ACTTT
                                                        Hphl

        760                                 780                                 800
AGGTC  AAAAT  ATGGC  CTTAT  TATTA  ATTAC  ATATG  TAATT  AATAT  TTTAT
     Intron4        Haelll  Box9

        810                                 830                                 850
GTGCT  GTATG  CTGGA  AATGT  TTATT  TATTA  AATAT  CAATG  AAAAA  TTTAT
 GTT (M9s2/l)

        860                                 880                                 900
AATAA  AACTC  TATAT  TATTT  TATTA  TTCAA  AATAT  TTTAA  ATACA  AAACA
        910                                 930                                 950
ATTAA  ATAAT  TTCGT  ATTAA  AATTT  AATTG  AACAA  AGCAA  TATAA  TAAAA

        960                                 980                                 1000
TAAAT  ATTGT  AAGTG  ATTTA  TTTAA  TCCCA  ATAGA  GTAAA  ATATT  ATTAT

        1010                                1030                                1050
AAAGA  AGATA  ATCAG  CAGGT  AACCA  ATATA  AATTC  TTCTA  ATACT  CACTT
     Mboll

        1060                                1080                                1100
AACGA  GTAAT  AAAAA  GAATT  TATTA  GTAGA  TACTT  CAGAG  ACTAC  ACGCA
        Box9                                (S118)  TAG(-1)        (Cob54)CTC

        1110                                1130                                1150
CACTA  GAAAA  TAAAT  TTAAT  TATTT  ATTAA  ATATT  TTTAA  TATAA  AAAAA
        1160                                1180                                1200
ATAAA  TCAAA  TTATT  CTTAA  AAGAC  ATTAT  AGTAT  TTATA  AAGAT  AGTAA
        1210                                1230                                2080
TATTA  GATTT  AACCA  ATGAT  TGGCCGGT        ........        TGATCA  TTAA
        Box7            (Pz25) TAG  Haelll/Hpall                B0ll/Mbol

        2090                                2110                                2130
ACATG  ATTGA  AGAAA  TAATA  ATAGT  TTATG  AAATA  AGATA  GTGTA  ATATA
Intron4      Mboll      Box2

        2140                                2160                                2130
AATTT  TTATG  AAGAT  ATAGT  CCATT  TTATA  TTTAT  TATAA  AAGCA  TCCTG
             Mboll                              Exon5  Box2

        2190                                2210                                2230
ATAAC  TATAT  TCCTG  GTAAT  CCTTT  AGTAA  CACCA  GCATC  TATTG  ATATT
        (Cob71)  TCT(Cob45)                        (Cob71) TA  T  (Cob45)

        2240                                2260                                2280
AAAAA  TATTA  ATAAA  ATTAT  TATTA  TTTAA  TCTTA  TTTAT  TTTAT  ATAAA
        2290                                2310                                2330
AAAAA  TAAAT  AATAA  TTATT  AATAA  AAATA  TATTA  TTTAT  TTCTC  CTTTC
        2340                                2360                                2380
GGGGT  TATTT  ATATA  TATTC  CTTTA  TAATT  TATAT  TTAAT  ATATT  ATATT
        2390                                2410                                2430
AAATA  TATGA  AAAAT  TATAA  TAAAT  AAATT  AATTA  ATTAA  TAATA  AATAA
        2440                                2460                                2480
TAATA  AAAAG  TACAG  TAGCA  TTAAA  TATTC  TTAAG  TTTCC  GCTTT  GTGGG
Box2         Rsa 1    Intron5

        2490                                2510                                2530
AACTC  CCATA  AGGAG  TTTAA  TGATT  AAAAT  TGGTT  AATTG  TCAAG  AAAAT
        2540                                2560                                2580
CTAAG  GTATT  AATAA  ATAAA  TAATA  CTATG  ACAAC  TTGCA  GCGAA  GTTTA
 Ddel                                                Bbvsl/Fnu4H1

        2590                                2610                                2630
TATCA  TCTCT  ATATT  ATATA  TTAAT  ATATA  TATAT  AATAA  TAATA  ATAAT
        2640                                2660                                2680
ATTAA  TATAA  TATAA  GATAT  AAAAA  CGTTC  AACGA  CTAGA  AAGTG  AACTG
                                                                        Ddel
        2690                                2710                                2730
AGATA  GTAAT  ACCTT  TCCAC  GAAAA  CCAAT  TAATT  TATAA  ATTAT  TTTTA
        2740                                2760                        2775
AATAA  AGAAT  AGATT  ATTAA  TTTTT  TTTTA  TATAG  TACCG  GCCGG
                                                        Hpall/Hpall
                                                          Haelll
```

图 3　mt-DNA cob 基因 intron 4 和 5 的部分顺序及突变位点

intron 4 的碱基顺序从 655到 1230;intron 4 和 5 的碱基顺序从 2071 到 2775. 图中标出了 8 个突变株的名称和突变后的碱基,以横线表明原有碱基. 在图中还用横线显示了 13 个限制酶的切割位点以及 box 区域

表 2　突变菌株细胞色素 b 基因的碱基变化

突变株	位　点	碱基变化	氨基酸变化
M9S 2/1**	box9(806)	GCT→GTT(TS)*	Ala→Val
S118**	box9(1098)	TCAG→TAG(FS*,−1)	无意突变
cob54	box9(1101)	CGC→CTC(TV)*	Arg→Leu
PZ25**	box7(1222)	TTG→TAG(TS)	终止突变
cob71	box2(2193)	CCT→TCT(TS)	Pro→Ser
cob71	box2(2220)	TCT→TAT(TV)	Ser→Tyr
cob45	box2(2193)	CCT→TCT(TS)	Pro→Ser
cob45	box2(2220)	TCT→TAT(TV)	Ser→Tyr

* TS: 转换；　TV: 颠换；　FS: 码组移动.

** 从文献 [3, 6] 引用的突变株，便于比较并说明突变的多样性.

出来(图 3).

从图 3 看出，突变菌株的核苷酸突变，定位在 9，7 和 2 三个 box 区. 图 4 显示了突变碱基的位点.

突变菌株 cob54 是一个单突变，位于 box9 的＋1101 个核苷酸处；cob71 和 cob45 是两个双突变菌株，位于 box 2 区域. 一个的突变碱基在＋2193；另一个在＋2220 个核苷酸处(表 2).

从表 2 看出，突变类型包括点突变和码组移动. 在表型方面，除显示一个氨基酸的改变外，还有无意突变和终止突变. 本文得到的 5 个突变均为转换和颠换式的点突变.

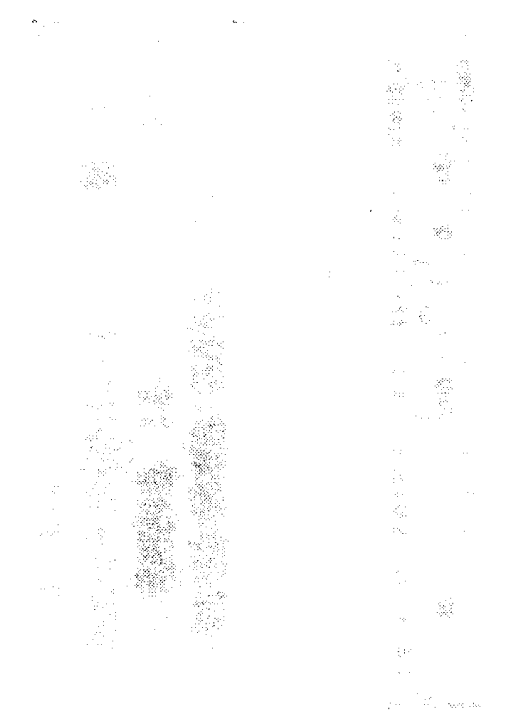

图 4　定位在 cob DNA 顺序图谱中的突变碱基

a. 突变株 cob54 的碱基变化是 CGC 到 CTC；
b. 突变株 cob71 的碱基变化是 CCT 到 TCT 和 TCT 到 TAT

三、讨　论

诱发突变是研究酵母线粒体 cob 基因内含子功能的有效措施，氯化锰是简便易行而无毒的诱变剂[1,4,6,9]. 由于几乎所有诱变剂都是剧毒的物质，因此，用氯化锰作诱变剂具有一定的实用价值.

利用氯化锰诱变酵母，Hanson 等[6]测定了 cob 基因内含子 4 的 3 个突变株；Anziano 等[9]测定了内含子 4 的 5 个突变株. 到目前为止，被研究的突变株约有200多个[1]. 本文测定的 3 个突变株都是 cob 基因内含子的点突变. 基因中一个核苷酸的变化引起蛋白质中一个氨基酸的改变，使得酵母由氧化型变成发酵型 ($mt^+ \rightarrow mt^-$)，说明内含子在 *cob* 和 *oxi3* 基因表达中的重要作用.

一般认为，内含子编码了一种特殊蛋白质——成熟酶，它是 mRNA 加工中切去内含子连接外显子成为成熟 mRNA 的重要成分. cob 基因内含子 4 的 box9，7，2 区域突变，都将导致拼接现象的消失. 因而，它们是成熟酶的编码区. 目前，cob 基因内

含子 4 的研究工作最多[3,6-9]. 然而，Lazowska 等[11]指出，内含子 2 也能编码切去它自身的成熟酶. 对内含子 3 和 5 的研究报道很少. 由于 box 2 位于内含子 4，5 两部分，显然，内含子 5 突变也应得到 mt- 表型. 本文得到的 5 个点突变，很可能其中一个在内含子 4 的 box9，为内含子 4 的拼接功能提供了又一个证据. 其余 4 个点突变，大概在内含子 5 序列中. 因而，内含子5在 cob 基因和 oxi3 基因转录产物的加工和翻译中也可能有一定功能.

致谢：作者感谢美国俄亥俄州立大学遗传系 Dr P. Perlman, M. Haldi, P. Anziano, M. Lamb, E. Clines 和 H. Conrad 等的指导和帮助.

参 考 文 献

[1] Alexander, N. J. and Perlman, P. S. et al., *Cell*, **20**(1980), 199—206.
[2] Gilbert, W., *Nature*, **271**(1978), 501.
[3] Lamb, M. R. et al., *J. Biol. Chem.*, **258**(1983), 3: 1991—1999.
[4] Cech, t. R., *Cell*, **34**(1983), 713—716.
[5] Kaine, B. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**(1983), 3309—3312.
[6] Hanson, D. K. et al., *J. Biol. Chem.*, **254**(1979), 7: 2480—2490.
[7] Mahler, H. R. et al., in *Mitochondrial Genes* (Eds. Slonimski et al.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982, 185—199.
[8] Claisse, M. et al., *Mol. Gen. Genet.*, **177**(1980), 375—387.
[9] Anziano, P. Q. et al., *Cell*, **30**(1982), 925—932.
[10] Carignani, G. et al., *Cell*, **35**(1983), 733—742.
[11] Lazowska, J. et al., *Cell*, **22**(1980), 333—348.
[12] Alexander, N. J. et al., *J. Biol. Chem.*, **254**(1979), 2471—2479.
[13] Hudspheth, M. et al., *Biochem. Biophys. Acta*, **610**(1980), 221—228.
[14] Thuring, R. W. et al., *Anal. Biochem.*, **66**(1975), 213—220.
[15] Messing, J., in *Genetic Engineering*, vol. 4(Eds. Setlow and Hollaender), Plenum Publishing Coorporation, New York, 1982, 19—34.
[16] Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74(1977), 5463.