

# tRNA 抑制子对转录因子 NKX2.5 提前终止密码子的通读

欧阳平<sup>1</sup>, 刘远航<sup>2</sup>, 黄志刚<sup>3</sup>, 齐小娟<sup>1</sup>, 倪倩<sup>1</sup>, 刘亚萍<sup>1</sup>, 宋仁生<sup>4</sup>, 李涛<sup>1</sup>, 吴柱国<sup>4</sup>

1. 广东医学院广东省医学分子诊断重点实验室, 东莞 523808;
2. 内蒙古呼和浩特市第一医院急诊科, 呼和浩特 010050;
3. 广东医学院公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室, 东莞 523808;
4. 广东医学院第二临床医学院, 东莞 523808

**摘要:** 人类 NKX2.5 基因(NK2 homeobox 5, NKX2.5)提前终止密码子(Premature termination codon, PTC)突变会引起房间隔缺损、房室传导阻滞等先天性心脏病。目前, 已报道的 NKX2.5 PTC 突变有 8 个(E109X、Q149X、Q170X、Q187X、Q198X、Y256X、Y259X 和 C264X)。为了检测 tRNA 抑制子是否对 PTC 突变诱导通读产生有功能的全长蛋白, 文章将 8 个 NKX2.5 PTC 突变克隆到 pcDNA3.1(-)载体, 将 NKX2.5 全长和 E109X、Q149X 及 C264X 克隆到 pEGFP-N1 载体, 形成 NKX2.5-EGFP 融合质粒。将 NKX2.5-EGFP 与对应的 tRNA 抑制子质粒分别或共转染后观察绿色荧光数量定性判断 tRNA 抑制子是否诱导通读。Western blotting 检测通读后全长蛋白和截短蛋白表达并计算通读效率。Real-time PCR 检测 NKX2.5 下游重要调控基因 Cx43 mRNA 的表达判断通读后蛋白功能。结果表明, 文章成功构建了 8 个基于 pcDNA3.1(-)的 NKX2.5 表达质粒、4 个基于 pEGFP-N1 的质粒; tRNA 抑制子 tRNA am 能有效通读 Q149X、Q170X、Q187X 和 Q198X, 且对后三者的通读效率均在 50% 以上; tRNA op 能有效通读 C264X, 通读效率约 50% 左右; tRNA oc 不能通读 NKX2.5 PTC 突变; 各通读后样本 Cx43 mRNA 相对表达量增加 7%~41.7%; tRNA am 和 tRNA op 能有效通读 NKX2.5 PTC 突变, 产生具有功能的全长蛋白, 但 tRNA 抑制子对细胞的其他影响还不明确, 有待于进一步观察。

**关键词:** tRNA 抑制子; NKX2.5; 提前终止密码子; 通读; 先天性心脏病

## Readthrough on transcription factor NKX2.5 premature stop codon by tRNA suppressors

Ping Ouyang<sup>1</sup>, Yuanhang Liu<sup>2</sup>, Zhigang Huang<sup>3</sup>, Xiaojuan Qi<sup>1</sup>, Qian Ni<sup>1</sup>, Yaping Liu<sup>1</sup>, Rensheng Song<sup>4</sup>, Tao Li<sup>1</sup>, Zhuguo Wu<sup>4</sup>

1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China;
2. Department of Emergency, Inner Mongolia Hohhot No.1 Hospital, Hohhot 010050, China;
3. Department of Epidemiology, School of Public Health, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China;
4. The Second Clinical Collage, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China

收稿日期: 2014-11-24; 修回日期: 2015-01-19

基金项目: 国家青年基金项目(编号: 81200082), 广东省医学科研基金项目(编号: B2012272)和广东医学院博士启动基金项目(编号: B2011019)资助

作者简介: 欧阳平, 博士, 助理研究员, 研究方向: 医学遗传学。E-mail: ouyang\_ping@126.com

通讯作者: 吴柱国, 博士, 教授/主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 临床心血管病学。E-mail: wugdmc@126.com

DOI: 10.16288/j.yczz.14-410

网络出版时间: 2015-3-12 10:40:57

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20150312.1040.001.html>

**Abstract:** Human *NKX2.5* (NK2 homeobox 5) premature stop codon (PTC) mutations cause congenital heart diseases such as atrial septal defect and atrioventricular block. At present, eight *NKX2.5* PTC mutations were reported as E109X, Q149X, Q170X, Q187X, Q198X, Y256X, Y259X and C264X. To observe the ability of tRNA suppressors to read through *NKX2.5* PTC mutations and produce functional full-length proteins, eight *NKX2.5* PTC mutations were cloned into pcDNA3.1(-) vectors and four fragments (wild-type *NKX2.5*, E109X, Q149X and C264X) were cloned in pEGFP-N1 vectors to acquire *NKX2.5*-EGFP fusing plasmids. After transfection of *NKX2.5*-EGFP with or without corresponding tRNA suppressor into HeLa cells, the quantity of EGFP was measured to confirm the readthrough ability of the PTCs. *NKX2.5* full-length and truncated protein expression levels were examined by Western blotting and the readthrough efficiency of tRNA suppressors on the PTCs was calculated respectively. The activity of *NKX2.5* full-length and truncated protein was confirmed on *NKX2.5* target gene-*Cx43* mRNA level measured by Real-time PCR. Three tRNA suppressors were used: tRNA am, tRNA oc and tRNA op. tRNA am could suppress UAG-containing PTCs Q149X, Q170X, Q187X, Q198X and the readthrough efficiency for the latter three was above 50%. tRNA op could suppress UGA-containing PTC C264X with ~50% readthrough efficiency. tRNA oc failed to read through *NKX2.5* PTC mutations. The relative *Cx43* mRNA level in all readthrough samples was increased to 7%–41.7%. In conclusion, tRNA am and tRNA op could suppress *NKX2.5* PTCs and induce functional protein expression. However, the effects of tRNA suppressors on cellular function are not clear yet, warranting further researches.

**Keywords:** tRNA suppressors; *NKX2.5*; premature stop codon (PTC); readthrough; congenital heart disease

先天性心脏病(Congenital heart disease, CHD)是胎儿时期心脏血管发育异常所致的畸形,其发病率约占出生活产婴儿的 1%,是新生儿致死致残的主要原因之一。先天性心脏病形成的原因很复杂,随着遗传学和分子生物学的发展,发现遗传因素在CHD的发生中影响重大,通过连锁分析、候选基因克隆等方法发现了很多与CHD发生相关的基因或位点,如心脏转录因子*NKX2.5* (NK2 homeobox 5, *NKX2.5*)就是与CHD相关的基因之一。*NKX2.5* 基因位于人类染色体 5q34,包含 2 个外显子,编码 324 个氨基酸,蛋白大小为 35 kDa。*NKX2.5* 蛋白具有 3 类结构域:TN、Homeodomain(HD)和NK结构域<sup>[1]</sup>。*NKX2.5* 在心脏发育早期以及成熟心脏的功能维护中起重要的作用<sup>[2]</sup>。在小鼠模型中,E7.5 时期*NKX2.5* 在心肌发生板的内胚层和中胚层细胞核中均有高表达。*NKX2.5*<sup>-/-</sup>的小鼠心脏环化受阻,约在E10.5 时期胚胎死亡<sup>[3]</sup>。人类*NKX2.5* 突变引起CHD,产生房间隔缺损(Atrial septal defect, ASD)、房室传导阻滞(Atrioventricular block, AVB)等心脏异常<sup>[4]</sup>。根据人类基因突变数据库(Human Gene Mutation Database, HGMD)报道,*NKX2.5* 提前终止密码子(Premature termination codon, PTC)突变约占已报道*NKX2.5* 突变总数的 14%,分别是E109X、Q149X、Q170X、

Q187X、Q198X、Y256X、Y259X和C264X<sup>[1,5-10]</sup>。尽管ASD可以通过外科手术修复,但AVB无法手术修复且随着年龄增加而严重,甚至发生猝死,所以对*NKX2.5* PTCs进行基因修复将有可能从根本上阻止以上症状发生。

PTC是指编码某一氨基酸的三联体密码经碱基替换后,变成不编码任何氨基酸的终止密码UAA、UAG或UGA,使翻译时多肽链在提前终止密码子处终止,形成比全长蛋白短的截短蛋白<sup>[11]</sup>。截短蛋白不仅影响蛋白功能,而且在细胞内聚集可能对细胞产生毒性<sup>[12]</sup>。PTC通读是指通过药物或其他方法使核糖体能够通读PTC,继续翻译直至正常的终止密码子,产生全长蛋白质。目前主要有药物诱导<sup>[13,14]</sup>和质粒介导的通读<sup>[15]</sup>,与药物诱导通读相比,质粒介导通读具有通读效率较高,且有可能通过基因重组,彻底修正突变。tRNA抑制子是具有通读能力的质粒之一,包含tRNA am、tRNA oc和tRNA op三类,分别通读UAG、UAA和UGA PTC突变<sup>[15]</sup>。tRNA抑制子具有很高的通读效率,目前研究发现能够抑制PTC的都是正常细胞的tRNA抑制子,tRNA抑制子是通读与之同源有意义密码子的必要因素,能够通过非传统的密码子-反密码子结合方式进行碱基配对,但是正常细胞中存在的tRNA抑制子较少。体外研究

实验发现,人工合成的人类tRNA抑制子能在体外诱导β-珠蛋白含UAG的PTC通读<sup>[16]</sup>。在体外培养的细胞中同时转染tRNA抑制子和PTC表达质粒后发现全长蛋白产生<sup>[15]</sup>。本研究通过检测tRNA抑制子是否对NKX2.5 PTC突变诱导通读产生有功能的全长蛋白,从而为该突变导致的房室传导阻滞提供可能的治疗方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

pEGFP-N1、pcDNA3.1(-)和表达全长 NKX2.5 的质粒 WT-NKX2.5(连在 pcDNA3.1(-))为本实验室保存。3 种 tRNA 抑制子 tRNA-am、tRNA-oc 和 tRNA-op 由 Olivier Jean-Jean 教授惠赠,分别通读 UAG、UAA 和 UGA PTCs,且通读后取代氨基酸为人类丝氨酸。DNA 聚合酶、限制性内切酶、Real-time

PCR 试剂等购自大连宝生物。Lipofectamine 2000 脂质体、DMEM 高糖培养基、胎牛血清、细胞用青霉素-链霉素双抗和 TRizol 等均购自 Invitrogen 公司。高纯 DNA 质粒抽提试剂购自 Omega 公司。NKX2.5 抗体购自 Santa Cruz,GAPDH 抗体和二抗购自武汉博士德。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物设计与合成

全长 NKX2.5 克隆到 pEGFP-N1 的引物(F/Xho I 和/BamH I)、NKX2.5 PTC 各定点突变引物以及 Real-time PCR 使用的 *Cx43* 和 *GAPDH* 引物见表 1。引物由 Invitrogen 公司合成。

#### 1.2.2 质粒构建

NKX2.5-EGFP 质粒用于检测 tRNA 抑制子通读可行性的定性分析,WT-NKX2.5-EGFP 采用常规酶

表 1 本研究使用的引物序列

引物名称	引物序列(5' 3')	用途
F/Xho I	agat <b>CTCGAG</b> atgttccccagccctgctctc*	构建 WT-NKX2.5-EGFP 质粒
R/BamH I	cggt <b>GGATCC</b> ccccagctcgataccatcgag*	
F-Cx43	AGGAGTTCAATCACTTGCGC	检测 <i>Cx43</i> mRNA 表达
R-Cx43	GAGTTTGCTAAGGCGCTC	
F-GAPDH	AAGCCCATCACCATCTTCCAG	检测 <i>GAPDH</i> mRNA 表达
R-GAPDH	AGGGGCCATCCACAGTCTTCT	
E109X-F	CTAGAGCC <b>TAA</b> AAGAAAGAGCTGTGCGCGC	构建 E109X 和 E109X-EGFP 质粒
E109X-R	TTTCTTTTAGGCTCTAGGGTCTTGCTGG	
Q149X-F	GCAGGCG <b>TAG</b> GTCTATGAGCTGGAGCGGC	构建 Q149X 和 Q149X-EGFP 质粒
Q149X-R	CATAGACCTACGCCTGCGAGAAGAGCACG	
Q170X-F	GAACGCGACT <b>TAG</b> CTGGCCAGCGTGCTGAAAC	构建 Q170X 质粒
Q170X-R	GCCAGCTAGTCGCTTCGGGGGCCGA	
Q187X-F	CTGGTTC <b>TAG</b> AACCGGCGCTACAAGTGCAAG	构建 Q187X 质粒
Q187X-R	GCCGGTTCTAGAACCAGATCTTGACCTGCGTG	
Q198X-F	GCAGCGG <b>TAG</b> GACCAGACTCTGGAGCTGGTG	构建 Q198X 质粒
Q198X-R	TCTGGTCCTACCGCTGCCGCTTGCACTTG	
Y256X-F	CCCCGCC <b>TAA</b> CCGGGTACGGCGGCGCG	构建 Y256X 质粒
Y256X-R	AACCCGGTTAGGCGGGGTAGGCGTTATAACCG	
Y259X-F	CGGGT <b>TAA</b> GGCGGCGCGGCTGCAGC	构建 Y259X 质粒
Y259X-R	CGCGCCGCT <b>TAA</b> CCCGGATAGGCGGGGTAGGCG	
C264X-F	CGGCC <b>TGA</b> AGCCCTGGCTACAGCTGCACTGC	构建 C264X 和 C264X-EGFP 质粒
C264X-R	GCCAGGGCTCAGGCCGCGCCGCGTAAC	

注: \*大写加粗的为酶切位点;粗体下划线指 PTC 所在位置。

切连接方法构建,其他质粒采用定点突变的方法构建。PCR 反应体系和程序参照试剂盒说明书进行。各 PTC 突变构建质粒以突变位点所在氨基酸位置命名,克隆到 pcDNA3.1(-)的质粒依次命名为 E109X、Q149X、Q170X、Q187X、Q198X、Y256X、Y259X 和 C264X,分别表达截短蛋白分子量约为 11、16、18、20、22、28、28.4 和 29 kDa,通读后 NKX2.5 全长蛋白约为 35 kDa。克隆到 pEGFP-N1 的质粒命名为 E109X-EGFP、Q149X-EGFP 和 C264X-EGFP,分别表达截短蛋白分子量约为 11、16 和 29 kDa,通读后 NKX2.5-EGFP 全长蛋白分子量约为 62 kDa。所有质粒均经过双向测序验证。

### 1.2.3 细胞转染

HeLa 细胞培养和转染按照常规方法进行。6 孔板转染时每孔转染量如下: NKX2.5 表达质粒或空载体 2  $\mu$ g;共转染实验时, E109X、Y256X 和 Y259X 分别与 tRNA<sup>oc</sup> 共转染, Q149X、Q170X、Q187X 和 Q198X 分别与 tRNA<sup>am</sup> 共转染, C264X 与 tRNA<sup>op</sup> 共转染, 突变表达质粒与 tRNA 抑制子各 2  $\mu$ g。每组平行做 3 个复孔。

### 1.2.4 通读效率

tRNA 抑制子的通读效率根据 Western blotting 结果进行如下计算来评估: tRNA 抑制子的通读效率 = “全长蛋白/(全长蛋白+截短蛋白)×100%”。

### 1.2.5 Real-time PCR

Cx43 是一个间隙蛋白,在细胞通讯中发挥重要作用。Cx43 是 NKX2.5 的重要下游基因<sup>[17,18]</sup>,拟通过检测 Cx43 mRNA 表达变化判断通读后蛋白活性。根据 Western blotting 结果可知 tRNA 抑制子能通读 5 个 (Q149X、Q170X、Q187X、Q198X 和 C264X) NKX2.5 PTC 突变,进一步的通读后蛋白功能实验分成两组: 组 1, 分别转染 WT-NKX2.5、Q149X、Q170X、Q187X、Q198X 和 C264X; 组 2, WT-NKX2.5、Q149X、Q170X、Q187X 和 Q198X 分别与 tRNA<sup>am</sup> 共转染, WT-NKX2.5、C264X 分别与 tRNA<sup>op</sup> 共转染。另设计非转染空白对照、pcDNA3.1(-)空载体对照和单转 tRNA 抑制子对照,每样本做 3 个平行复孔。细胞收集、总 RNA 提取和 RNA 反转录按常规方法,分别用 Cx43 和 GAPDH 引物扩增进行半定量实验,每样本平行做 3 个复孔。

### 1.2.6 统计学方法

通读前后 Cx43 mRNA 的变化采用配对 *t* 检验分析,  $P < 0.05$  为数据有显著意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 tRNA 抑制子诱导 NKX2.5-EGFP 通读表达全长蛋白

单独转染 E109X-EGFP、Q149X-EGFP 和 C64X-EGFP 的细胞未观察到绿色荧光。在 tRNA 抑制子共转后, Q149X-EGFP 和 C64X-EGFP 组观察到较强的绿色荧光, E109X-EGFP 无荧光产生(图 1)。进一步通过 Western blotting 检测单转和 tRNA 抑制子共转染后样本的蛋白表达情况。WT-NKX2.5-EGFP、E109X-EGFP、Q149X-EGFP 和 C264X-EGFP 表达蛋白分子量分别在 62、11、16 和 29 kDa 左右。Western blotting 结果(图 2)显示, E109X-EGFP、Q149X-EGFP 和 C264X-EGFP 均检测不到全长蛋白, C264X 可检测到截短蛋白表达。转染 tRNA 抑制子后, Q149X-EGFP 和 C264X-EGFP 可检测到全长蛋白表达,且 C264X-EGFP 可同时检测到截短蛋白,但 E109X-EGFP 未检测到蛋白。此外,所有样本均未检测到大于 62 kDa 的蛋白。这些结果说明 tRNA<sup>am</sup> 能有效通读 UAG PTC, tRNA<sup>op</sup> 能高效通读 UGA PTC, 且两者均能在 EGFP 正常终止密码子处终止,但 tRNA<sup>oc</sup> 不能通读 UAA PTC。

### 2.2 tRNA 抑制子通读 NKX2.5 PTC 突变

为进一步确定 tRNA 抑制子对 NKX2.5-EGFP 的定性实验结果,本文将 8 个 NKX2.5 表达质粒 E109X、Q149X、Q170X、Q187X、Q198X、Y256X、Y259X 和 C264X 进行单转染、与对应 tRNA 抑制子共转染后检测蛋白表达。结果显示, Q170X、Q187X、Q198X、Y256X、Y259X 和 C264X 表达蛋白大小与预期一致(图 3A)。共转 tRNA 抑制子后, Q170X、Q187X 和 Q198X 检测到了全长蛋白、截短蛋白和比全长更大的非特异性蛋白; Q149X 检测到全长蛋白(图 3B),表明 tRNA<sup>am</sup> 能高效通读 UAG 类 PTC, 检测到大于 35 kDa 的蛋白提示可能存在通读过 NKX2.5 正常终止密码子的“过通读”现象。C264X 检测到了全长蛋白和截短蛋白(图 3B),说明 tRNA<sup>op</sup> 能诱导 UGA

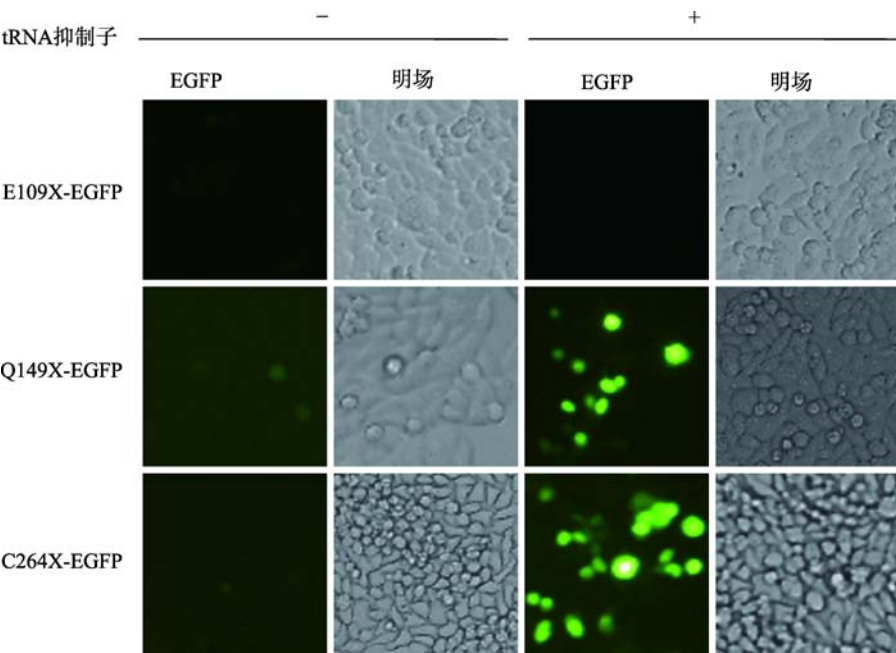


图 1 tRNA 抑制子通读 NKX2.5-EGFP 融合质粒

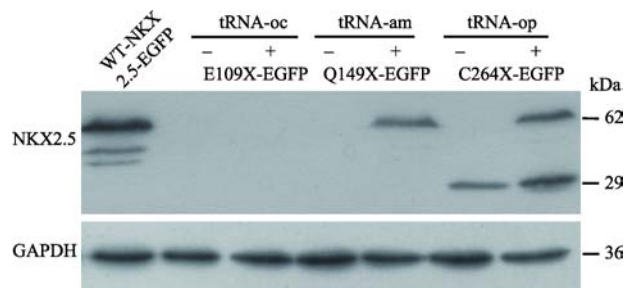


图 2 Western blotting 检测 NKX2.5-EGFP 蛋白

类 PTC 通读, 并且无过通读。E109X、Y256X 和 Y259X 均未见全长蛋白, 这与 E109X-EGFP 的定性实验结果一致, 说明 tRNA oc 不能诱导 UAA 类 PTC 的通读。tRNA oc 的通读效率为 0; tRNA am 对 Q170X、Q187X 和 Q198X 的通读效率均在 50% 以上, 对 Q149X 的通读效率因为截短蛋白的未能检出而无法正确评估; tRNA op 的通读效率约为 50%。

2.3 Cx43 mRNA 表达变化

用突变表达质粒与 WT-NKX2.5 中 Cx43 mRNA 表达量比值 ( % ) 来评估通读后蛋白活性。单转染 Q149X、Q170X、Q187X、Q198X 和 C264X 的比值分别是 32%、37.7%、38.3%、31%和 21.7%, 共转染 tRNA 抑制子后分别为 46%、46.7%、45.3%、72.7%和 37.7%。Cx43 mRNA 相对表达量上调了 7%~41.7% ,

其中 Q198X 增加 41.7% , 其余突变活性增加在 7%~16% ( 图 4 ) , 且通读前后 Cx43 mRNA 差别具有统计学意义 (  $P<0.05$  ) , 表明 tRNA 抑制子通读后的蛋白均具有活性。

3 讨论

NKX2.5-EGFP通读后高效表达绿色荧光蛋白及 Western blotting结果证明, tRNA抑制子tRNA am和 tRNA op均能高效通读NKX2.5 对应的PTC突变。从对正常终止密码子有无影响而言, 本研究发现tRNA op优于tRNA am。tRNA op不能通读EGFP和NKX2.5 的正常终止密码, 然而tRNA am在正常终止密码子处终止的能力与基因有关。tRNA am不影响EGFP正常终止密码子(图 2), 但对NKX2.5 Q170X、Q187X和Q198X , 通读后产生了极少量比NKX2.5 全长更大的蛋白 , 说明tRNA am存在少量的“过通读”(图 3B)。从通读效率来看, tRNA am比tRNA op通读效率高, 前者对NKX2.5 Q170X、Q187X和Q198X的通读效率均大于 50% , 后者对C264X的通读效率为 50%左右。另外, tRNA oc不能通读E109X、Y256X和Y259X , 该结果与前人报道的一致, 可能因为UAA是三类终止密码子中最强的终止信号, 很难通过<sup>[19]</sup>。



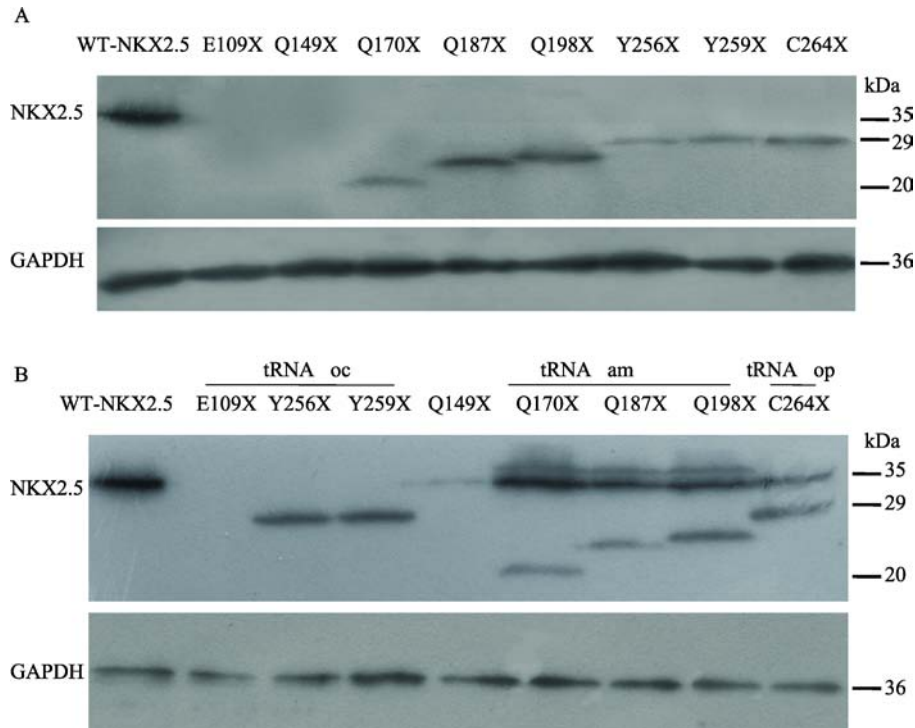


图 3 tRNA 抑制子高效诱导截短突变表达全长蛋白

A: 8 个 NKX2.5 提前终止突变表达质粒单转时蛋白表达; B: 8 个 NKX2.5 提前终止突变表达质粒与对应 tRNA 抑制子共转染后蛋白表达。

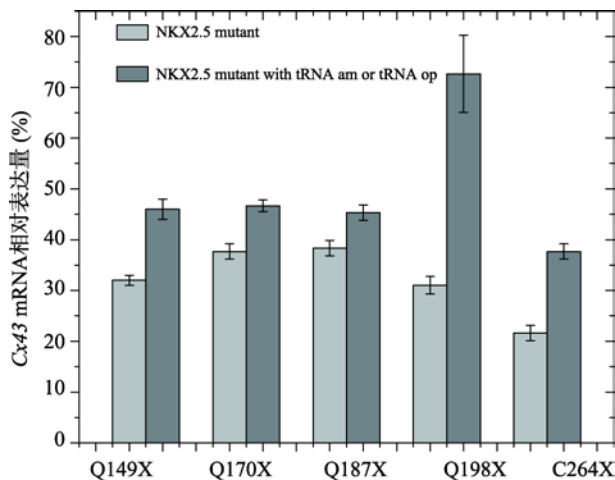


图 4 tRNA 抑制子通读前后 *Cx43* mRNA 相对表达量变化  
WT-NKX2.5 的活性定义为 100%。

tRNA抑制子通读后能营救部分NKX2.5 蛋白功能。人类心脏转录因子NKX2.5 具有 3 个重要的功能域: TN结构域(10~21 位氨基酸)、Homeobox结构域(139~197 位氨基酸)和NK结构域(210~233 位氨基酸)<sup>[4]</sup>, 其中Homeobox结构域保守性最强, 与转录活性有关。tRNA抑制子能有效通读NKX2.5 已报道的 5

个PTCs, 其中有 3 个(Q149X、Q170X和Q187X)位于Homeobox结构域, 另外两个突变(Q198X和C264X)不在结构域中。本研究中心tRNA抑制子通读后原PTC位点处氨基酸都将被人类丝氨酸取代, 因此, 理论上通读后Q198X和C264X的蛋白功能应更接近野生蛋白, 而Q149X、Q170X和Q187X蛋白功能可能由于被取代位点十分保守而受到较大影响。Kasahara等<sup>[12]</sup>报道NKX2.5 蛋白过表达抑制*Cx43* 基因表达, 而本研究结果表明外部转染的野生型NKX2.5 较突变明显促进*Cx43* 的基因表达, 究其原因, 本研究采用的是非心肌细胞背景的HeLa细胞, 而其他研究是在心肌细胞系或转基因鼠中进行<sup>[18]</sup>。tRNA抑制子通读NKX2.5 突变后可以部分恢复NKX2.5 的活性, 促进*Cx43* 的基因表达。已通读的 5 个蛋白中Q198X *Cx43* mRNA相对表达量最高, 蛋白功能恢复最理想, 由通读前的 31%增加至 72.7%, 增幅为 41.7%; C264X由 21.7%增加至 37.7%, 增幅 16%, Q149X、Q170X和Q187X增加 7%~14%。

相比药物诱导的PTC通读, tRNA抑制子的通读高效性是较高的, 如已报道的氨基糖苷类抗生素庆

大霉素的通读效率为 12% 左右, 明星小分子 PTC124 孤儿药物的通读效率为 20%<sup>[20]</sup>, 而 tRNA<sup>am</sup> 对 NKX2.5 UAG 的通读效率大于 50%, tRNA<sup>op</sup> 对 NKX2.5 UGA 的通读效率也达到了 50%<sup>[15]</sup>。tRNA 抑制子通读的另一个优点是取代氨基酸明确, 药物通读是通过降低核糖复合体的保真性, 被取代氨基酸可能是任意的, 因此可能产生无活性、甚至有毒性的蛋白。因此可针对特定的 PTC 突变设计 tRNA 抑制子, 使之通读后恢复成“原始的”氨基酸序列, 通读后蛋白与野生型蛋白一致。然而 tRNA 抑制子通读也存在不足, 有报道称 tRNA 抑制子存在过通读问题<sup>[21]</sup>, 这点与本研究结果一致, 解决办法有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science*, 1998, 281(5373): 108–111. [\[DOI\]](#)
- [2] Kasahara H, Bartunkova S, Schinke M, Tanaka M, Izumo S. Cardiac and extracardiac expression of Csx/Nkx2.5 homeodomain protein. *Circ Res*, 1998, 82(9): 936–946. [\[DOI\]](#)
- [3] Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev*, 1995, 9(13): 1654–1666. [\[DOI\]](#)
- [4] Ouyang P, Saarel E, Bai Y, Luo C, Lv Q, Xu Y, Wang F, Fan C, Younoszai A, Chen Q, Tu X, Wang QK. A de novo mutation in NKX2.5 associated with atrial septal defects, ventricular noncompaction, syncope and sudden death. *Clin Chim Acta*, 2011, 412(1–2): 170–175. [\[DOI\]](#)
- [5] Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest*, 1999, 104(4): 375–381. [\[DOI\]](#)
- [6] Pabst S, Wollnik B, Rohmann E, Hintz Y, Glänzer K, Vetter H, Nickenig G, Grohé C. A novel stop mutation truncating critical regions of the cardiac transcription factor NKX2-5 in a large family with autosomal dominant inherited congenital heart disease. *Clin Res Cardiol*, 2008, 97(1): 39–42. [\[DOI\]](#)
- [7] Gutierrez-Roelens I, De Roy L, Ovaert C, Sluysmans T, Devriendt K, Brunner HG, Vikkula M. A novel CSX/NKX2-5 mutation causes autosomal-dominant AV block: are atrial fibrillation and syncope part of the phenotype? *Eur J Hum Genet*, 2006, 14(12): 1313–1316. [\[DOI\]](#)
- [8] Hosoda T, Komuro I, Shiojima I, Hiroi Y, Harada M, Murakawa Y, Hirata Y, Yazaki Y. Familial atrial septal defect and atrioventricular conduction disturbance associated with a point mutation in the cardiac homeobox gene CSX/NKX2-5 in a Japanese patient. *Jpn Circ J*, 1999, 63(5): 425–426. [\[DOI\]](#)
- [9] Ikeda Y, Hiroi Y, Hosoda T, Utsunomiya T, Matsuo S, Ito T, Inoue J, Sumiyoshi T, Takano H, Nagai R, Komuro I. Novel point mutation in the cardiac transcription factor CSX/NKX2.5 associated with congenital heart disease. *Circ J*, 2002, 66(6): 561–563. [\[DOI\]](#)
- [10] Inga A, Reamon-Buettner SM, Borlak J, Resnick MA. Functional dissection of sequence-specific NKX2-5 DNA binding domain mutations associated with human heart septation defects using a yeast-based system. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(14): 1965–1975. [\[DOI\]](#)
- [11] Gesteland RF, Wolfner M, Grisafi P, Fink G, Botstein D, Roth JR. Yeast suppressors of UAA and UAG nonsense codons work efficiently in vitro via tRNA. *Cell*, 1976, 7(3): 381–390. [\[DOI\]](#)
- [12] Linde L, Kerem B. Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet*, 2008, 24(11): 552–563. [\[DOI\]](#)
- [13] Wang D, Belakhov V, Kandasamy J, Baasov T, Li SC, Li YT, Bedwell DM, Keeling KM. The designer aminoglycoside NB84 significantly reduces glycosaminoglycan accumulation associated with MPS I-H in the Idua-W392X mouse. *Mol Genet Metab*, 2012, 105(1): 116–125. [\[DOI\]](#)
- [14] Bushby K, Finkel R, Wong B, Barohn R, Campbell C, Comi GP, Connolly AM, Day JW, Flanigan KM, Goemans N, Jones KJ, Mercuri E, Quinlivan R, Renfro JB, Russman B, Ryan MM, Tulinius M, Voit T, Moore SA, Lee Sweeney H, Abresch RT, Coleman KL, Eagle M, Florence J, Gappmaier E, Glanzman AM, Henricson E, Barth J, Elfving GL, Reha A, Spiegel RJ, O'donnell MW, Peltz SW, McDonald CM; PTC124-GD-007-DMD STUDY GROUP. Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve*, 2014, 50(4): 477–487. [\[DOI\]](#)
- [15] Diop D, Chauvin C, Jean-Jean O. Aminoglycosides and other factors promoting stop codon readthrough in human cells. *C R Biol*, 2007, 330(1): 71–79. [\[DOI\]](#)
- [16] Chang JC, Temple GF, Trecartin RF, Kan YW. Suppression of the nonsense mutation in homozygous  $\beta^0$  thalassemia. *Nature*, 1979, 281(5732): 602–603. [\[DOI\]](#)
- [17] Kasahara H, Ueyama T, Wakimoto H, Liu MK, Maguire CT, Converso KL, Kang PM, Manning WJ, Lawitts J, Paul DL, Berul CI, Izumo S. Nkx2.5 homeoprotein regulates expression of gap junction protein connexin 43 and sarcomere organization in postnatal cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35(3): 243–256. [\[DOI\]](#)
- [18] Boogerd KJ, Wong LY, Christoffels VM, Klarenbeek M, Ruijter JM, Moorman AFM, Barnett P. Msx1 and Msx2 are functional interacting partners of T-box factors in the regulation of Connexin43. *Cardiovasc Res*, 2008, 78: 485–493. [\[DOI\]](#)
- [19] Blanchet S, Cornu D, Argenti M, Namy O. New insights into the incorporation of natural suppressor tRNAs at stop codons in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(15): 10061–10072. [\[DOI\]](#)
- [20] Schwarz N, Carr AJ, Lane A, Moeller F, Chen LL, Aguilà M, Nommiste B, Muthiah MN, Kanuga N, Wolfrum U, Nagel-Wolfrum K, da Cruz L, Coffey PJ, Cheetham ME, Hardcastle AJ. Translational read-through of the RP2 Arg120stop mutation in patient iPSC-derived retinal pigment epithelium cells. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(4): 972–986. [\[DOI\]](#)
- [21] Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene*, 2013, 525(2): 162–169. [\[DOI\]](#)