

布氏锥虫苯丙氨酰-tRNA 合成酶在大肠杆菌中的克隆、表达、纯化及活性测定

姚璎, 杲光伟, 李大伟

上海交通大学药学院, 上海 200240

摘要: 苯丙氨酰-tRNA 合成酶是布氏锥虫蛋白合成过程中的一类重要酶, 以其为靶点的抑制剂可能发展成为新一代的抗锥虫药物, 但此前并没有分离锥虫苯丙氨酸-tRNA 合成酶的报道。本研究用大肠杆菌成功克隆表达并纯化了布氏锥虫苯丙氨酰-tRNA 合成酶并进行了活性测定。首先通过 PCR 方法从布氏锥虫细胞基因组中分别扩增出苯丙氨酰-tRNA 合成酶的 α 亚基、 β 亚基的基因, 依次克隆入 pCOLADuet 共表达载体, 然后在大肠杆菌 BL21 (DE3) RIPL 中进行了成功表达, 并采用 Ni-Bind 亲和层析对其进行了纯化, 最后用免疫印迹进行了鉴定。此外还采用放射性同位素方法进行了酶活性测定, 这为下一步进行布氏锥虫苯丙氨酰-tRNA 合成酶抑制物的设计和体外筛选奠定了良好的基础。

关键词: 布氏锥虫, 苯丙氨酰-tRNA 合成酶, 原核表达, 纯化, 酶活测定

Cloning, expression, purification and activity assay of *Trypanosoma brucei* phenylalanyl-tRNA synthetase in *Escherichia coli*

Ying Yao, Guangwei Gao, and Dawei Li

School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Phenylalanyl-tRNA synthetase is a key enzyme for protein synthesis in *Trypanosoma*. Its validation as an inhibition target will enable the development of a new generation of anti-*Trypanosoma* drugs. However, little is known about the isolation of the *Trypanosoma* Phenylalanyl-tRNA synthetase. Here we report the cloning, expression, purification and activity assay of Phenylalanyl-tRNA synthetase from *Trypanosoma brucei* in *Escherichia coli* host. We co-cloned the α -subunit and β -subunit of Phenylalanyl-tRNA synthetase from *Trypanosoma brucei* genomic DNA into the co-expression vector pCOLADuet. We successfully expressed the *Trypanosoma brucei* Phenylalanyl-tRNA synthetase in *E. coli* host, purified the whole enzyme by Ni-Hind affinity column and verified it by Western blotting. In addition, we tested its enzymatic activity by isotope labeling. The whole work laid a solid foundation for in vitro the screening and optimization of *Trypanosoma brucei* phenylalanyl-tRNA synthetase inhibitors.

Keywords: *Trypanosoma brucei*, phenylalanyl-tRNA synthetase, prokaryotic expression, purification, enzyme activity assay

布氏锥虫是一种在撒哈拉以南非洲地区所特有的寄生虫, 当侵入寄主后会引发非洲锥虫病或昏睡病, 每年都会引起非常严重的死亡率和令人震惊的社会和经济后果^[1]。目前市场上存在的治疗热带

Received: August 7, 2009; Accepted: November 2, 2009

Corresponding author: Dawei Li. Tel: +86-21-34204744; Fax: +86-21-34205436; E-mail: daweil@sjtu.edu.cn

寄生虫的药物多数有药物毒性、抗药性等导致的疗效有限问题; 由于这些疾病主要影响世界贫困地区的贫困人口, 长久以来很难成为医药企业关注的目标市场。但如今的筹资情况发生了很大的变化, 世界卫生组织 (WHO) 疟疾新药研发 (DNDi) 等机构以及一些慈善机构已经高度重视热带寄生虫病, 并且加大了在这方面的支持^[2-3]。

近年来, 生物化学的大力发展, 以及锥虫基因组序列的陆续破解, 为寻找新的药物作用靶点提供了很好的基础。氨酰 tRNA 合成酶 (AaRS) 作为蛋白质生物合成过程中的一类关键酶, 成为了抗锥虫药物的重要靶点^[4]。然而在抗锥虫药物方面, 以 AaRS 为靶点的药物还鲜有报道, 目前国内外尚未看到任何有关以布氏锥虫苯丙氨酰 tRNA 合成酶 (PheRS) 为靶标的筛选方法的建立。

苯丙氨酰 tRNA 合成酶 (PheRS) 是 AaRS 家族中最为复杂的酶之一, 由 $(\alpha\beta)_2$ 四聚体构成^[5]。由于其结构的复杂性使得长期以来活性 PheRS 的制备成为研究热点。本研究首次将布氏锥虫 PheRS 基因在大肠杆菌 BL21 (DE3) RIPL 中进行了成功克隆表达, 并用 Ni-Bind 亲和层析对蛋白进行了纯化, 用免疫印迹进行了验证, 还进行了酶活性测定的研究, 这为进一步以其为靶点进行酶抑制剂设计和体外筛选获得抗非洲锥虫病新药前体奠定了一定的基础。

1 实验材料

质粒和菌种: 表达载体 pCOLADuet 购自 Novagen 公司; 大肠杆菌 BL21 (DE3) RIPL 由本实验室保存。

酶与主要试剂、仪器: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶均购自 Fermentas 公司; IPTG 购自北京鼎国生物技术有限公司; 胶回收试剂盒和质粒纯化试剂盒均购自北京索莱宝生物技术有限公司; Ni-Bind 纯化系统购自 Novagen 公司; [¹⁴C] 亮氨酸购自 Perkin-Eilmer, 啤酒酵母 tRNA 购自 Roche, 其余试剂均为国产分析纯; 闪烁计数器购自 Bechman LS6500。

2 实验方法

2.1 9 种不同物种的 PheRS 氨基酸序列比对

从 NCBI 的 GenBank 数据库中调取布氏锥虫和其他物种的 PheRS 氨基酸序列, 用 Clustal W 软件来分析同源序列比对。

2.2 PheRS α 亚基、 β 亚基基因的获得和重组质粒 pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$ 的构建

根据已知的 PheRS 的 α 亚基、 β 亚基基因序列设计引物。 α 亚基的引物 F 为 5'-GAGCGAATTCTATGAGTACCATGGAG-3', 引物 R 为 5'-CGAAGCTTAAAACGCATTAGCTTTG-3' (下划线分别表示 EcoR I 和 Hind III 酶切位点)。 β 亚基的引物 F 为 5'-ATCAGATCTATGCCAACCCCTCGC-3', 引物 R 为 5'-ATACTCGAGTCACTGGGCAAACCTG-3' (下划线分别表示 Bgl II 和 Xho I 酶切位点)。采用上述引物以布氏锥虫的基因组为模板进行 PCR 扩增, 产物用 DNA 纯化试剂盒回收, 以 EcoR I-Hind III 酶切 α 亚基基因片段, 克隆入同样经 EcoR I-Hind III 酶切消化的 pCOLADuet 载体, 转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 分离获得重组质粒 pCOLADuet-PheRS α , 经酶切鉴定和测序正确后, 用于 β 亚基的克隆。以 Bgl II-Xho I 酶切 β 亚基基因片段, 克隆入同样经 Bgl II-Xho I 酶切消化的 pCOLADuet-PheRS α 载体, 经酶切及测序鉴定后构建正确的共表达载体 pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$ 用于蛋白表达。

2.3 重组菌的诱导表达优化

重组共表达质粒 pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$ 转化入 *E. coli* BL21 (DE3) RIPL 中, 在含卡那霉素 (30 μ g/mL) 的 LB 培养液中 37℃ 中过夜培养。次日以 1:1000 (*V/V*) 的比例接种于新鲜培养液中, 37℃ 培养至 A_{550} 为 0.6~0.8 时, 设定 IPTG 诱导浓度 0.01、0.025、0.05、1、1.25 mmol/L, 采用 37℃ 诱导 4 h 及 25℃ 过夜诱导两种方式来诱导重组菌的表达, 以确定最佳蛋白诱导条件。

2.4 重组蛋白的表达和纯化

4℃ 离心, 收集菌体, 超声破碎, 离心后收集上清液。上清液根据 Novagen 的 His-Bind purification kit 的操作手册进行亲和色谱纯化, 依次在添加柱材料的交换柱中加入 3 倍柱床体积的去离子水, 5 倍柱

床体积的交换缓冲液 (50 mmol/L 硫酸镍) 进行镍离子的交换, 6 倍柱床体积的结合缓冲液 (0.5 mol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9), 上清液过柱, 10 倍柱床体积的结合缓冲液, 6 倍柱床体积的洗涤缓冲液 (0.5 mol/L NaCl, 60 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9), 6 倍柱床体积洗脱缓冲液 (1 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9), 分管收集洗脱液。SDS-PAGE 分析洗脱结果后, 收集合并含酶部分, 经透析液 (1×PBS, 甘油 50% (V/V), β -巯基乙醇 5 mmol/L, pH 6.8) 过夜透析后, -20℃保存洗脱的蛋白用 8% 的 SDS-PAGE 电泳进行纯化效果的鉴定。

2.5 免疫印迹鉴定

诱导前的菌液、IPTG 诱导后的菌液、纯化的蛋白样品进行 SDS-PAGE 后, 4℃、300 mA、2 h 电转于硝酸纤维素膜上。将膜置于杂交袋中, 封闭液室温封闭 1 h。弃溶液后, 再加入用封闭液 1:5000 稀释的特异性抗 His 标签的单抗, 4℃过夜。以 TBS-T 洗膜 3 次后, 加入 HRP-山羊抗小鼠 IgG 抗体, 用封闭液 1:40 000 稀释, 室温孵育 1 h。TBS-T 洗膜 3 次后, 将膜用 ECL-Plus 处理后, 于暗室曝光到 X-胶片上, 显影 3 min, 定影 3 min。

2.6 PheRS 的酶活性分析

采用放射性同位素法, 以酶催化生成 [14 C]-Phe-tRNA 复合物的量来测定酶活力。在酶反应缓冲体系: 50 mmol/L (pH 7.8) HEPES-KOH, 5 mmol/L $MgCl_2$, 45 mmol/L KCl, 9 μ mol/L [14 C]-Phe (0.1 μ Ci/ μ L), 0.4 mg/mL 啤酒酵母 tRNA, 0.02% (W/V) BSA, 1 mmol/L DTT, 10% (V/V) DMSO, 苯丙氨酰 tRNA 合成酶 21 μ L (纯化后酶稀释 1000 倍)。上述物质混匀后, 加入终浓度为 2 mmol/L ATP 时反应起始, 混合物终体积为 70 μ L。37℃恒温反应, 在 20 min 内每间隔 5 min 各取 3 等份 20 μ L 反应液分别滴加到定性滤纸上, 并立即投入到 5% TCA 溶液 100 mL 中浸泡洗涤, 重复 3 次; 将取出的滤纸再投入到 95% 酒精中浸泡洗涤, 重复 3 次。滤纸置于红外灯下烘干, 闪烁计数仪测定^[6]。1 U 酶定义在上述最适反应条件下每分钟生成 1 nmol 产物 [14 C]-Phe-tRNA 时的酶量。根据李振权等^[7]介绍的以下公式计算每毫升

酶单位 (U/mL):

$$K = \frac{[^{14}\text{C}]\text{-Phe}(\text{nmol})}{t(\text{min}) \times (\text{CPM1} - \text{CPM3})} \times \frac{1000}{\text{酶体积}(\mu\text{L})}$$

$$\text{U/mL} = K \times (\text{CPM2} - \text{CPM3}) \times \text{稀释倍数}$$

公式中: CPM1 为 [14 C]-Phe 总放射量; CPM2 为加入酶反应后的 CPM 值; CPM3 为背景放射, 只加 [14 C]-Phe 不加酶的 CPM 值。

3 结果

3.1 不同物种的 PheRS 氨基酸序列比对

将布氏锥虫和目前已成功表达的几种物种的 PheRS, 主要是细胞质的 PheRS 进行了同源性分析, 图 1 是经 Clustal W 分析后的进化树结果。比较几种物种的 α 亚基和 β 亚基同源性, 发现 PheRS 明显分为真核生物类、原核生物类和古细菌类 3 种。无论从 α 亚基还是 β 亚基比较, 布氏锥虫的 PheRS 都与人源性及酵母类的 PheRS 同源性最高。由于人源性细胞质 PheRS 已成功表达, 这为同源性较高的布氏锥虫的 PheRS 克隆表达提供了很好的基础。

3.2 苯丙氨酰 tRNA 合成酶表达载体的构建

从 GenBank 中分别查出布氏锥虫 PheRS α 和 PheRS β 的基因分别为 1491 bp 和 1875 bp。以布氏锥虫的全基因组为模板, 采取了 PCR 扩增的方式获得 PheRS 的 α 亚基和 β 亚基的基因片段, 从图 2 可以看出扩增得到的目的基因片段大小与预期结果一致。

图 3 中是构建共表达质粒 pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$ 的图谱, 其中 α 亚基 N-端融合有 His 标签, 而 β 亚基 N-和 C-端均没有标签蛋白。图 4 是重组后的表达质粒的酶切图谱, 从 A 图中可以看出 pCOLADuet-PheRS α 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切, 获得载体片段 (3.7 kb) 与目的基因片段 (1.5 kb)。B 图中共表达质粒 pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$ 用 *Bam*HI 酶切, 获得片段 2.6 kb 和 4.4 kb, 酶切片段的大小与预期相符。

3.3 PheRS 蛋白的表达及纯化

重组表达质粒 pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$ 转化到 *E. coli* BL21 (DE3) RIPIL 中, 诱导优化的结果表明, 重组菌 *E. coli* [pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$] 在 0.01 mmol/L

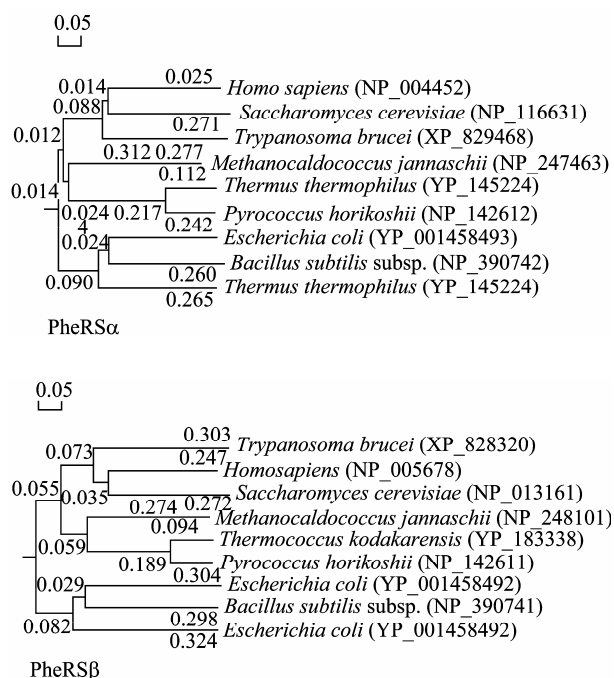


图1 已成功表达的 PheRS α 和 PheRS β 的进化树图谱

Fig. 1 Phylogenetic tree of PheRS α and PheRS β that has been expressed successfully. The phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-Joining method. Phenylalanyl-tRNA synthetase subunit alpha: *Homo sapiens* (NP_004452), *Saccharomyces cerevisiae* (NP_116631), *Trypanosoma brucei* (XP_829468), *Thermococcus kodakarensis* (YP_183334), *Pyrococcus horikoshii* (NP_142612), *Methanocaldococcus jannaschii* (NP_247463), *Escherichia coli* (YP_001458493), *Bacillus subtilis* subsp. (NP_390742), *Thermus thermophilus* (YP_145224), Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain, *Homo sapiens* (NP_005678), *Saccharomyces cerevisiae* (NP_013161), *Trypanosoma brucei* (XP_828320), *Thermococcus kodakarensis* (YP_183338), *Pyrococcus horikoshii* (NP_142611), *Methanocaldococcus jannaschii* (NP_248101), *Escherichia coli* (YP_001458492), *Bacillus subtilis* subsp. (NP_390741), *Thermus thermophilus* (YP_145225).

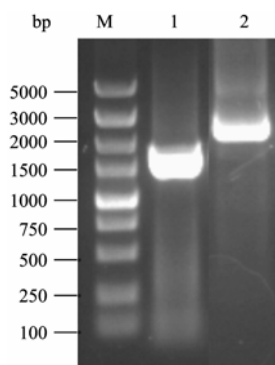


图2 锥虫 PheRS 基因的克隆

Fig. 2 Amplification of PheRS gene from *T. brucei* genomic DNA by PCR. M: DNA marker; 1: PheRS α gene fragment; 2: PheRS β gene fragment.

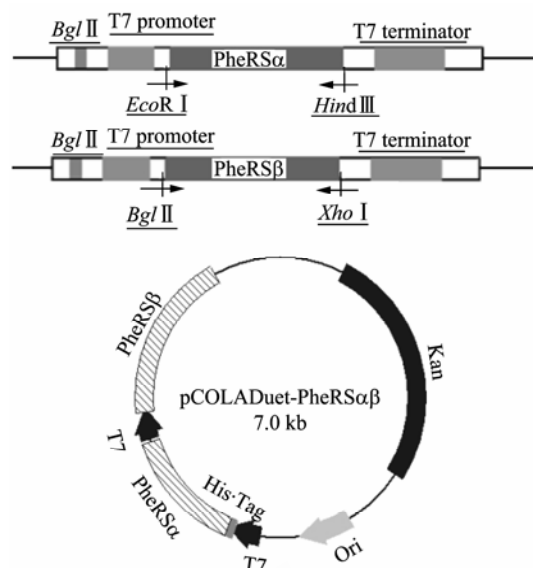


图3 重组质粒 pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$ 的示意图

Fig. 3 Schematic map of the recombinant plasmid pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$.

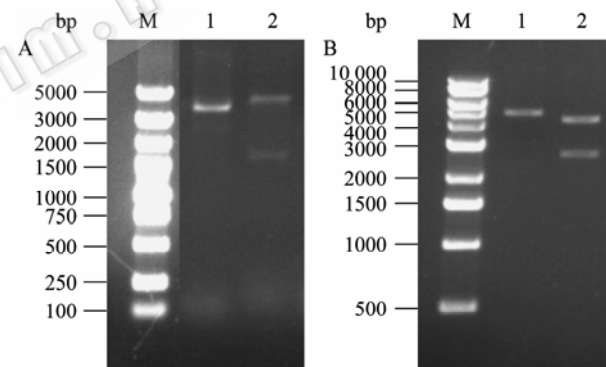


图4 重组表达质粒的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant expression plasmid by enzyme digestion. (A) Recombinant plasmid pCOLADuet-PheRS α . M: 5000 bp DNA marker; 1: pCOLADuet-PheRS α ; 2: pCOLADuet-PheRS α double digested with *EcoR* I/*Hind* III. (B) Recombinant plasmid pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$. M: 1 kb DNA marker; 1: pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$; 2: pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$ digested with *Bam* H I.

IPTG 诱导下诱导结果最明显。因此表明重组菌在 0.01 mmol/L IPTG 诱导下、25℃过夜诱导的条件最佳。在此最佳诱导条件下, 进行了蛋白的大量表达纯化, 图 5 结果显示 α 亚基 (55 kDa) 和 β 亚基 (72 kDa) 处均有诱导表达, 与预期值相符。菌体裂解后的上清, 采用 His-Bind 亲和色谱柱进行了纯化, SDS-PAGE 分析洗脱结果后, 从图 5 中可以看出,

通过亲和层析纯化后,可以得到高纯度的重组融合蛋白。经凝胶扫描分析,纯度可达 90%。

3.4 免疫印迹分析

为了进一步验证纯化后的目的蛋白,用免疫印迹对纯化的蛋白样品进行分析。因为融合蛋白中只有 α 亚基 N 端有 His-Tag, 因此用特异性抗 His 的一抗来进行进一步的鉴定时, 只能出现 α 亚基大小的条带。图 6 结果显示 M_r 在大约 55 kDa 处未诱导的菌液中没有条带, 在 IPTG 诱导后有条带出现, 纯化的蛋白样品中也有特异性反应条带, 进一步验证了目的蛋白的正确性。

3.5 酶活性分析

目前还未见任何关于以布氏锥虫 PheRS 为靶点的药物筛选方法的建立, 表达纯化得到的 PheRS 必需在保证其有活性的基础上, 才能进行后续的药物筛选工作。本实验主要用放射性同位素方法来测定酶活性, 图 7 是 20 μ L 反应体积中的酶活性曲线。

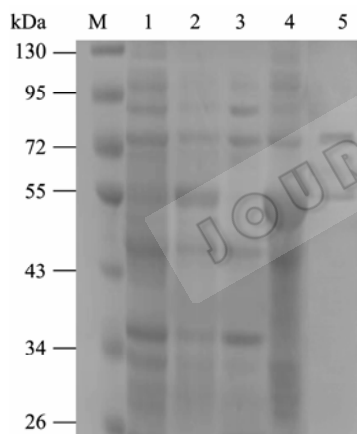


图 5 SDS-PAGE 分析纯化的融合蛋白

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the purified fusion protein. M: protein marker; 1: *E. coli* [pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$] uninduced; 2: *E. coli* [pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$] induced; 3: supernatant of induced *E. coli* [pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$]; 4: inclusion body of induced *E. coli* [pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$]; 5: co-purified α and β subunit.

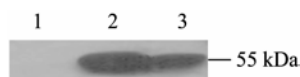


图 6 重组 PheRS 蛋白的免疫印迹分析

Fig. 6 Western blotting analysis for recombinant PheRS. 1: *E. coli* [pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$] uninduced; 2: *E. coli* [pCOLADuet-PheRS $\alpha\beta$] induced; 3: PheRS after purification (Only α subunit is shown for the lack of His-tag in β subunit).

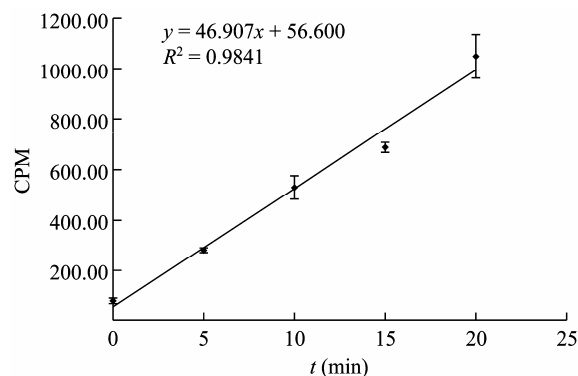


图 7 放射性同位素法测定 PheRS 的活性

Fig. 7 Activity of PheRS measured in radioisotope method.

本实验表达纯化后得到的酶可以根据单位时间内生成产物 [14 C]-Phe-tRNA 的量来检测其活性。70 μ L 总反应体积中 [14 C] 标记的苯丙氨酸 [14 C]-Phe 的 CPM₁ 值为 559440, 经 [14 C] 标记的产物 [14 C]-Phe-tRNA 产物的 CPM₂ 值为 3580, 背景放射 CPM₃ 为 80, 初始底物 [14 C]-Phe 为 0.4662×10^{-6} mmol, 纯化后的酶稀释 1000 倍。根据公式计算出提纯物每毫升酶单位 (U/mL) 为 7。

根据以上结论说明通过本实验的方法表达纯化出的酶具有活性, 因此可以将其作为化合物作用的靶标来筛选出抑制剂。

4 讨论

苯丙氨酰 tRNA 合成酶是 AaRS 中最复杂的一类酶。目前, 已经报道的 PheRS 的表达方法主要集中在以下几种方法: 例如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) PheRS 的表达是通过将 α 亚基和 β 亚基分别克隆入载体, 再亚克隆入单启动子操纵、双核糖体结合位点的双顺反子表达载体后共表达^[8]; 人源性线粒体 PheRS 直接克隆入表达载体后进行表达^[9-10]; 人源性细胞质 PheRS 的 α 亚基和 β 亚基分别克隆入有标签的表达载体, 共转化宿主菌进行表达^[11-12]。经同源性分析表明, 布氏锥虫的 PheRS 在同源性上与人源性 PheRS 最高, 因此本实验借鉴人源性细胞质 PheRS 的质粒构建方法, 在 α 亚基 N 端融合 His 标签, β 亚基 N 端和 C 端均没有融合标签; 此外, 采用了构建重组共表达载体的方

法代替了共转化, 简化了实验步骤。

原核生物 *Thermus thermophilus* PheRS 与同源 tRNA 复合物的晶体结构表明, 这个异源四聚体事实上由两个异源二聚体 ($\alpha\beta$) 组成, 而一个四聚体结合两个 tRNA^[13]。研究结果表明 $\alpha\beta$ 异源二聚体由 11 个结构域组成, 其中 A1~A3 属于 α 亚基, B1~B8 属于 β 亚基。 α 亚基的结构域具有催化模块, 一个螺旋-螺旋结构域直接参与 tRNA^{Phe} 结合的氨酰化反应; 而由一系列结构域组成的 β 亚基可能与其他蛋白一起发挥多重作用。整合入 β 亚基的“类催化”模块 (B6、B7 结构域)、“类 DNA 结合”结构域 (B1 和 B5)、“类 EMAPII”结构域 (B2, 类似于 AspRS 和 LysRS 的反密码子结合结构域)、“类 SH-3”结构域 (B4, 参与信号传导过程) 表明了 PheRS 酶的复杂的进化途径。细胞质 PheRS 在进化过程中, 虽然在原核、真核生物中有差异, 但也具有很高的保守性。在目前所有已知的物种中, 细胞质 PheRS 均以 $(\alpha\beta)_2$ 四聚体形式存在。这在体外研究 *T. Brucei* PheRS 的作用提供了依据。

PheRS 由 $(\alpha\beta)_2$ 异源四聚体构成, 其活性位点主要位于 α 亚基, tRNA 结合位点分布在 α 亚基和 β 亚基上, 二者结构完整时 PheRS 才能发挥其催化作用^[14]。因此用同位素进行酶活性测定时是 α 亚基和 β 亚基形成的复合物的活性。用免疫印迹验证纯化出的蛋白时, 选用抗 α 亚基 N 端 His 标签的抗体, 因此只显示一条带。在蛋白表达纯化时的结果显示在 55 kDa (α 亚基) 和 72 kDa (β 亚基) 处均有目的蛋白出现, 并且在酶活性测定时通过放射性同位素方法测出了提纯物每毫升酶单位 (U/mL) 为 7。本研究首次成功表达纯化得到了布氏锥虫亮氨酸-tRNA 合成酶, 并对其进行了活性测定, 这为以苯丙氨酰 tRNA 合成酶为靶点进行抗寄生虫药物筛选, 为下一步构建苯丙氨酰-tRNA 合成酶药物筛选模型, 进而筛选对酶有抑制活性的化合物奠定了良好的基础。

REFERENCES

[1] Molyneux DH, Hotez PJ, Fenwick A, *et al.* "Rapid-impact interventions": how a policy of integrated control for Africa's neglected tropical diseases could benefit the poor.

PLoS Med, 2005, 2(11): 1064–1070.

- [2] Renslo AR, McKerrow JH. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. *Nat Chem Biol*, 2006, 2(12): 701–710.
- [3] Geary TG, Thompson DP. Development of antiparasitic drugs in the 21st century. *Vet Parasitol*, 2003, 115(2): 167–184.
- [4] Pink R, Hudson A, Mouries MA, *et al.* Opportunities and challenges in antiparasitic drug discover. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(9): 727–740.
- [5] Mosyak L, Reshetnikova L, Goldgur Y, *et al.* Structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*. *Nat Struct Mol Biol*, 1995, 2(7): 537–547.
- [6] Ling JQ, Yadavalli SS, Ibba M. Phenylalanyl-tRNA synthetase editing defects result in efficient mistranslation of phenylalanine codons astyrosine. *RNA*, 2007, 13(11): 1881–1886.
- [7] Li ZQ, Pan QC, Chen JJ, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma Clinical and Experimental Research. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 1983: 99–121. 李振权, 潘启超, 陈剑经, 等. 鼻咽癌临床与实验研究. 广州: 广东科技出版社, 1983: 99–121.
- [8] Savopoulos JW, Hibbs M, Jones EJ, *et al.* Identification, cloning and expression of a functional phenylalanyl-tRNA synthetase (pheRS) from *Staphylococcus aureus*. *Protein Expres Purif*, 2001, 21(3): 470–484.
- [9] Bullard JM, Cai YC, Demeler B, *et al.* Expression and characterization of a human mitochondria phenylalanyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol*, 1999, 288(4): 567–577.
- [10] Levin I, Kessler N, Moor N, *et al.* Purification, crystallization and preliminary X-ray characterization of a human mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase. *Acta Cryst*, 2007, 63(9): 761–764.
- [11] Finarov I, Moor N, Kessler N, *et al.* Crystallization and X-ray analysis of human cytoplasmic phenylalanyl-tRNA synthetase. *Acta Cryst*, 2009, 65(2): 93–97.
- [12] Moor N, Linshiz G, Safo M. Cloning and expression of human phenylalanyl-tRNA synthetase in *Escherichia coli*: comparative study of purified recombinant enzymes. *Protein Expres Purif*, 2002, 24(2): 260–267.
- [13] Goldgur Y, Mosyak L, Reshetnikova L, *et al.* The crystal structure of phenylalanine-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* complexed with cognate tRNA^{Phe}. *Structure*, 1997, 5(1): 59–68.
- [14] Roy H, Ling JQ, Alfonzo J, *et al.* Loss of editing activity during the evolution of mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem*, 2005, 280(28): 38186–38192.