

放射性同位素标记测定 RNA N-糖苷酶活性的新方法*

王喜萍** 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

王鸣歧

(复旦大学病毒研究室)

关键词 RNA N-糖苷酶, 放射性同位素标记

核糖体失活蛋白 (ribosome-inactivating protein, RIP) 是一类抑制真核细胞蛋白质生物合成的毒蛋白^[1]。近几年发现, 有相当一部分 RIP 的作用机制属于 RNA N-糖苷酶(RNA N-Glycosidase), 如蓖麻毒蛋白 A 链(ricin A-chain) 及一些单链 RIP。它们能专一水解大鼠核糖体 28 S RNA 的第 4324 位腺苷酸的 C-N 糖苷键, 释放一个腺嘌呤碱基^[2,3], 在相应的核糖 C1 位上留下一个醛基。

目前检测 RNA N-糖苷酶活性的方法步骤烦琐, 为了研究这种酶结构与功能的关系, 需要建立一种快速、灵敏的测定其活性的方法。我们以 RNA N-糖苷酶作用的机制为根据, 用放射性同位素试剂标记经 RNA N-糖苷酶作用后 28 S rRNA 上产生的醛基, 由此测定 RNA N-糖苷酶的活性。具体方法如下:

将大鼠核糖体悬浮于缓冲液 (25mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 25mmol/L KCl, 5mmol/L MgCl₂) 中, 用蓖麻毒蛋白 A 链 (5ng) 或天花粉毒蛋白 (trichosanthin, 20ng) 分别处理大鼠核糖体 (3 OD₂₆₀, 100 μ l), 37°C 水浴保温 15 min; 用 SDS, 酚及氯仿等抽提, 经 95% 乙醇沉淀, 得到较纯的 rRNA。取 5 μ g rRNA, 加入 0.05 μ Ci [³H]-NaBH₄, 25°C, 黑暗中放置 1h; 或加入 0.2 μ Ci [³H]-Ala, 45°C 保温 1.5h; 反应在磷酸缓冲液 (0.01mol/L, pH4.5) 中进行。反应后, 加入 30 倍体积的 5% 三氯醋酸 (含 1mol/L NaCl), 冰浴放置 10min, 然后抽滤到玻璃纤维膜上, 依次用冷的 5% 三氯醋酸、重蒸

水、95% 乙醇抽滤洗涤。将玻璃纤维膜烘干后, 置于闪烁剂 PPO/POPOP 甲苯溶液 (0.5% PPO, 0.05% POPOP) 中计数。

我们用焦碳酸二乙酯 (DEP) 处理 rRNA, 在 rRNA 上产生醛基, 通过 [³H]-NaBH₄ 还原或与 [³H]-Ala 亲核加成等亦能检测出 RNA 上的醛基 (表 1)。

表 1 [³H]-NaBH₄ 对蓖麻毒蛋白 A 链等修饰的 rRNA 的标记

加入 [³ H]- NaBH ₄	参入同位素量 (CPM)			
	对照	DEP 处理	蓖麻毒蛋白 A 链处理	天花粉毒 蛋白处理
0.05 μ Ci	3187	10367	9096	8797
0.10 μ Ci	6024	21272	13582	14801

另外, 我们还探索了用 [¹²⁵I]-碘代酪氨酸酰肼标记 rRNA 上产生的醛基。

这一方法的建立, 为研究 RNA N-糖苷酶提供了一种快速、灵敏的测活手段, 同时也为这种酶的作用机制提供了一个新的实验证据。天花粉毒蛋白作用于核糖体也能在 rRNA 上产生醛基, 说明它也是一种 RNA N-糖苷酶。

参 考 文 献

- 1 董焄, 刘望夷. 细胞生物学杂志, 1990; 12: 58
- 2 Endo Y *et al.* J Biol Chem, 1987; 262: 5908
- 3 Endo Y, Tsurugi K. J Biol Chem, 1987; 262: 8128

[本文于 1990 年 8 月 21 日收到]

* 中国科学院重大课题基金资助项目。

** 复旦大学病毒研究室硕士研究生。