

研究快报

天花粉蛋白的作用机制

——RNA N-糖苷酶型*

张劲松 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

关键词 天花粉蛋白, 核糖体失活蛋白, RNA N-糖苷酶

核糖体失活蛋白 (ribosome-inactivating protein, RIP) 是一类广泛分布于植物界的能抑制真核细胞核糖体功能的毒蛋白。其作用的分子机制有两类: (1) RNA 水解酶型, 如帚曲霉素(α -sarcin), 专一水解 28S rRNA 第 4325—4326 位之间的磷酸二酯键; (2) RNA N-糖苷酶 (RNA N-glycosidase) 型, 如蓖麻蛋白 A 链, 专一水解 28S rRNA 第 4324 位腺苷酸的腺嘌呤碱基与核糖之间的 N—C 糖苷键, 产生一个半缩醛基, 核糖的半缩醛式构象与醛式构象间存在动态平衡, 在苯胺作用下发生 β -消去反应, 释放出 3' 端一个约 500 核苷酸长的片段。Endo 等用凝胶电泳发现了这个片段, 并且进一步确定了蓖麻蛋白 A 链的作用位点, 鉴定了释放出来的腺嘌呤, 排除了磷酸解的可能性。由此他们证明了蓖麻蛋白 A 链是一种 RNA N-糖苷酶型的核糖体失活蛋白^[1,2]。

从 1987 年至今, 已经搞清楚二十余种 RIP 的作用机制属 RNA N-糖苷酶型^[3]。从栝楼 (*Trichosanthes kirilowii* Maxim) 的块根中抽提出的天花粉蛋白 (trichosanthin) 是我国中草药天花粉引产作用的有效成分。因为能抑制蛋白质的生物合成, 说明它可能是一种 RIP。本文报道我们参考 Endo 等研究蓖麻蛋白 A 链作用机制的方法, 经改进后证明天花粉蛋白具有与蓖麻蛋白 A 链相同的作用机制, 即 RNA N-糖苷酶型, 该结果在国内外尚无报道。在前

一篇报道中^[4], 我们实验室还成功地用 [3 H]-NaBH₄ 和 [3 H]-丙氨酸对天花粉蛋白作用于核糖体后抽得的 rRNA 进行了标记, 证明其中存在醛基, 这一结果可作为本文结论的一个旁证。

取大白鼠肝脏, 于缓冲液 (50 mmol/L tris-HCl, pH 7.4, 25 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂, 0.25 mol/L 蔗糖) 中匀浆若干次, 15000 g 离心半小时。于上清液中加入 1/9 体积新鲜配制的 5% 脱氧胆酸钠溶液 (溶于 0.03 mol/L tris-HCl, pH 8.2), 静置 10 min, 超离心 (105000g, 0°C, 2h) 后得核糖体 (沉淀), -80°C 保存。在缓冲液 (25 mmol/L tris-HCl, pH 7.6, 25 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂) 中, 用蓖麻蛋白 A 链, 天花粉蛋白 (18ng) 分别处理核糖体 (3 A₂₆₀ 单位, 100 μ l), 与对照一起于 37°C 保温 20 min, 用 SDS/酚法抽提 rRNA, 酒精沉淀。各取 RNA 5 μ g 溶于 20 μ l 新鲜配制的醋酸苯胺缓冲液 (1.0 mol/L, pH 4.5) 中, 于 60°C 避光保温 10 min。5 μ g 对照 rRNA 及 5 μ g 天花粉蛋白处理核糖体后的 rRNA 也同时保温。反应液用 0.3 mol/L 醋酸钠稀释, 酒精沉淀。沉淀用冷乙醇洗两次, 真空干燥后低温保存。

用 2.5% 丙烯酰胺-0.5% 琼脂糖复合凝胶
(下转第 55 页)

* 中国科学院重大课题资助项目。

近年来国外研究表明^[3-5],植物叶片的光声讯号可由两种不同的贡献构成。一种是光声效应引起的声压,另一种是叶片在调制光激励下进行周期性光合作用,引起周期性放氧,直接产生的声压。尤其在低调制频率(低于100 Hz)下,放氧对光声讯号的贡献不可忽视。这种贡献随着调制频率的提高而减弱。

3. 从图3可见,140 Hz 斩波频率的叶片正、反面光声谱基本一致,光声讯号都来自叶片的表皮组织。光声谱表明,表皮对紫、红外光有强吸收,而对可见光的吸收很弱。因此表皮组织能透过可见光,从而使叶肉内的叶绿体充分地进行光合作用。表皮组织同时又强烈地吸收阳光中的紫、红外光,以保护叶肉内的组织免受其损害。

从图3还可看出,表皮组织光声谱在可见光范围有许多小峰,这些小峰与叶肉组织光声谱的峰位置相吻合,尤其是660nm处的峰。这可能表明,表皮组织中含有少量叶绿体。由于表皮组织主要由表皮细胞构成,表皮细胞不含叶绿体。但表皮上气孔周围的保卫细胞含有叶绿体。这些叶绿体的光合作用可导致气孔的关闭^[7]。由图3比较从叶片背面撕下的表皮光声谱和未损伤叶片的光声谱(两样品取自同片菜叶相邻近部位),两样品的光声谱基本一致。但在叶肉组织有强吸收的波段内存在明显的强度差别,撕下的表皮的光声讯号强度大于在体表

皮的光声讯号。这可能是由于背衬材料的不同所引起的。因为实验过程中,撕下的表皮直接放在光声池中,背衬材料是经抛光的池壁(金属铝)。铝对光有强反射。入射的可见光经表皮弱吸收后又经铝反射,再次被表皮样品吸收,而引起光声讯号增强。而在体表皮的背衬材料是叶肉,它是可见光的强吸收体。

由以上的结果可见,用锡灯作光源,在可见光范围内对植物系统进行研究是可行的。但由于锡灯的紫外和红外光强较弱,一般较难在这些范围开展工作。若将光源改成可调谐激光器或高功率氙灯,则能获得较满意的结果。

参 考 文 献

- 1 Rosencwaig A 著,王耀俊等译. 光声学和光声谱学. 北京: 科学出版社, 1986: 211—277
- 2 Vargas H, Miranda L C M. *Phys Reports*, 1988; 161 (2): 43
- 3 Poulet P, Cahen D, Malkin S. *Biochim Biophys Acta*, 1983; 724:433
- 4 Havaux M, Canaani O, Malkin S. *Plant Physiol*, 1986; 82: 827
- 5 Havaux M, Lorrain L, Leblanc R M. *FEBS Letters*, 1989; 250 (2): 395
- 6 Sybesma C 著,沈淑敏等译. 生物物理学引论. 北京: 科学出版社, 1979: 125—129
- 7 Bidwell R G S 著,刘富林译. 植物生理学,上册. 北京: 高教出版社, 1983: 270—273

[本文于1989年12月26日收到,

1990年4月14日修回]

(上接第51页)

电泳鉴定上述五种RNA样品,发现经天花粉蛋白处理、苯胺作用后的样品与经蓖麻蛋白A链处理、苯胺作用后的样品在相同位置上出现了一个新的、约500核苷酸长的RNA条带,其它样品都无此带。这两种样品的28S rRNA带也稍快于其它样品,其它rRNA带无显著差别。这些结果说明天花粉蛋白与蓖麻蛋白A链一样水解28S rRNA的一个糖苷键,再经苯胺作用导致28S rRNA断链,3'端片段产生约

500核苷酸长的RNA条带,5'端片段产生稍快于28S rRNA的条带。我们将进一步确定天花粉蛋白的作用位点,鉴定其释放的碱基种类。

参 考 文 献

- 1 Endo Y et al. *J Biol Chem*, 1987; 262: 5908
- 2 Endo Y, Tsurugi K. *J Biol Chem*, 1987; 262: 8128
- 3 董稿,刘望夷. 细胞生物学杂志, 1990; 12: 58
- 4 王喜萍等. 生物化学与生物物理进展, 1990; 17: 461

[本文于1990年9月25日收到, 11月14日修回]