

用质粒作底物测定核糖体失活蛋白酶活性的新方法

王洪涛^{1,3)} 张绍铃^{1)*} 刘望夷^{2)*}

⁽¹⁾南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ⁽²⁾中国科学院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031;

⁽³⁾河南大学生命科学学院, 开封 475001)

摘要 植物核糖体失活蛋白 (ribosome-inactivating protein, RIP) 是一类能作用于核糖体最大 RNA 的独特蛋白质.它是研究蛋白质生物合成中核糖体 RNA 结构与功能的有力工具.利用 RIP 能在 DNA 中脱去一些腺嘌呤碱基使超螺旋 DNA 解旋的特点, 分别以常用的质粒 PUC18、PUC19 和 PBR322 DNA 为底物, 建立了测定 RIP 酶活性的一种新方法, 其灵敏度是 50 ng (天花粉蛋白) 和 5 ng (还原型的辛纳毒蛋白), 酶催化反应的时间是 60 min. 这个新方法具有方便、快捷、灵敏的特点, 避免了常用方法中制备核糖体、提取 RNA 的仪器和技术条件的限制, 检测的时间由原来的几天缩短到约 120 min, 大大地降低了检测的费用, 为广泛和深入地研究 RIP 提供了有利的条件.

关键词 核糖体失活蛋白(RIP), 超螺旋质粒 DNA, 凝胶电泳
学科分类号 Q5, Q7, Q81

蓖麻毒蛋白(ricin)和相思子毒蛋白(abrin)是人们最早研究的 2 种核糖体失活蛋白(ribosome-inactivating protein, RIP).它们分别来源于蓖麻(*Ricinus communis*)和相思树(*Abrus precatorius*)的种子.在 RIP 的研究历史中, 一个十分重要的进展是 1987 年 Endo 等^[1,2]阐明了它们的作用机制, 即它们的 A 链都具有 RNA N-糖苷酶活性.当它们作用于真核生物的核糖体时, 能专一地除去核糖体最大 RNA 上一个保守的腺嘌呤碱基使核糖体失活. RIP 在医药和农业实践中也得到了广泛的应用.近年来, 人们又陆续报道了 RIP 的一些新活性: 当有较高浓度的 RIP 存在时, 它对 28 S rRNA 有多个脱腺嘌呤位点, 一些 RIP 还能脱去各种不同的 RNA, 甚至 DNA 的腺嘌呤碱基.因此, 提出了 RIP 是多核苷酸: 腺苷糖苷酶的新名称^[3].

1991 年, Li 等^[4]首先报道了一个 RIP——天花粉蛋白(trichosanthin, TCS)具有解旋超螺旋 DNA 的活性.其次, 1994 年, Ling 等^[5]报道 1 个 I 型 RIP: Luffin, 2 个 II 型 RIP, 蓖麻毒蛋白和辛纳毒蛋白(cinnamomin), 均有使超螺旋 DNA 解旋为缺刻(nicked)和线状(linear) DNA 的活性. Roncuzzi 等^[6]报道了几个单链 RIP (dianthin 30, saporin 6 和 gelonin)与超螺旋 DNA 等摩尔保温时也具有这种

活性.

RIP 在植物中广泛存在, 有些含量还很高^[7]. 尽管对 RIP 的酶活性及其失活核糖体机理方面已作了较为深入的研究, RIP 在植物细胞内的生理功能还研究得较少. Liu 等^[8]认为, 辛纳毒蛋白在樟树种子中是一种储存蛋白, 它为胚芽的生长提供营养物质.

常用测定 RIP 酶活性的方法, 需有超速离心机制备核糖体, 酶催化反应后需要提取和进行凝胶电泳分析 RNA, 花费时间较多, 操作非常麻烦, 大大限制了对 RIP 的研究和应用. Ling 等^[9]曾利用放射性同位素标记建立了一种测定 RIP 酶活性的方法, 但是这种方法要求实验室具备做放射性同位素实验的条件, 同时也需要相应的防护设备和技术.

本文报道的工作, 是以常见的质粒 DNA 为底物, 根据 RIP 脱去一些腺嘌呤碱基后的超螺旋 DNA 能解旋为缺刻和线状 DNA, 进一步在苯胺作用下, 降解为小片段的原理, 建立了一种测定 RIP

* 通讯联系人.

张绍铃. Tel: 025-84396580, E-mail: nnzsl@njau.edu.cn

刘望夷. Tel: 021-54921238, E-mail: wylu@sibs.ac.cn

收稿日期: 2007-02-05, 接受日期: 2007-04-29

酶活性的新方法. 该方法既避免了提取制备核糖体、检测 RNA 所需设备和技术的限制, 又可以大大缩短测定的时间, 也避免了使用放射性同位素的污染. 所用的质粒 DNA 和其他化学药品和仪器都容易得到, 使测定酶活性的方法简单化, 有利于广泛和深入地开展对 RIP 的研究.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 DNA 和 RIP. 质粒 PUC18、PUC19 和 PBR322 DNA 为 Fermentas 公司产品; 使用的 RIP 有 2 种: 天花粉蛋白由上海生物化学与细胞生物学研究所聂惠玲研究员惠赠; 辛纳毒蛋白是从香樟树 (*Cinnamomum camphora*) 种子的提取液中, 采用 Sepharose 4B 柱亲和层析, 乳糖洗脱, 得到的冻干粉^[10].

1.1.2 主要试剂. 琼脂糖为 Serva 进口分装, 其余药品均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 辛纳毒蛋白的还原. 辛纳毒蛋白是 II 型 RIP, 其 A- 和 B- 链间由一对二硫键连接, 测定酶活性前, 必须用 DTT 打开二硫键. 取辛纳毒蛋白冻干粉 (1.0 mg) 溶解于适量的缓冲液 A (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L DTT, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂) 中, 再加入 5 mmol/L DTT, 于 37℃ 保温 30 min, 以打开辛纳毒蛋白分子内的二硫键, A- 链和 B- 链未经分离, 于 -20℃ 的冰箱中保存备用.

1.2.2 用质粒 PUC18 DNA 为底物测定 RIP 的酶活性. 取质粒 PUC18 DNA (0.5 μg) 分别与不同浓度的天花粉蛋白或辛纳毒蛋白在 20 μl 缓冲液 A 中, 37℃ 保温 60 min 后, 加入 2 倍体积的 95% 乙醇, 沉淀 DNA 分子, 离心取沉淀, 溶于 20 μl 水中, 加入 2 μl 新鲜配制的酸性苯胺溶液 B (0.2 mol/L, pH 4.5, 苯胺: 冰乙酸: 水 = 1:1:35, 体积比), 60℃ 避光保温 15 min, 经乙醇沉淀和洗涤后, 真空抽干除去沉淀中残留的乙醇, 再加入适量的缓冲液 A 溶解, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析.

1.2.3 保温时间对 RIP 作用于 PUC18 DNA 的影响. 取质粒 PUC18 DNA (5.0 μg) 溶于 40 μl 缓冲液 A, 加入 5 μg 天花粉蛋白, 37℃ 保温, 开始时立即取样 4 μl 记为 0 时样品, 以后分别在保温 5、10、15、20、30、45、60、120 min 时取样. 立即加入 1 μl 1.0% 的 SDS 终止反应, 取出的样品放入

-20℃ 冰箱中保存待分析. 待取样过程全部结束后, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析.

1.2.4 检测 RIP 的灵敏度. 取质粒 PUC18 DNA (0.5 μg) 与不同量的天花粉蛋白 (2.0、1.0、0.5、0.1 和 0.05 μg) 在 20 μl 缓冲液 A 中于 37℃ 保温 60 min 后, 加入 1 μl 的 1.0% SDS 终止反应, 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析.

1.2.5 不同的质粒 PUC19 DNA 或 PBR322 DNA 为底物测 RIP 的酶活性. 分别取 2 种质粒 PUC19 或 PBR322 DNA (皆为 0.5 μg) 与不同量的辛纳毒蛋白一起保温, 重复上面的实验操作, 目的是重复和进一步验证 RIP 对不同质粒 DNA 作用的差异.

2 结 果

2.1 用质粒 PUC18 DNA 为底物测定天花粉蛋白的酶活性

天花粉蛋白能脱去超螺旋 DNA 分子中 A+T 含量丰富区域的、局部单链结构位置上的腺嘌呤碱基, 脱去腺嘌呤后 DNA 的磷酸二酯键十分脆弱, 超螺旋结构所产生的张力就容易使 DNA 链断裂^[5, 11, 12]. 天花粉蛋白对质粒 PUC18 DNA 降解的结果见图 1. 实验结果显示: 超螺旋 DNA 在天花粉蛋白的作用下, 脱去一些嘌呤碱基后转变为缺刻和线状的 DNA (图 1-2), 经酸性苯胺处理, 脱腺嘌呤的 DNA 在脱腺嘌呤处断裂, 被完全降解成小片段而逸出凝胶 (图 1-3). 纯的 RIP 与质粒 DNA 保温, 电泳分析中, 出现缺刻和线状 DNA 就可以测定 RIP 的酶活性. 如果测定粗提取液中 RIP 的酶活性, 必需经过酸性苯胺处理, 再经凝胶电泳确认质粒 DNA 转变为小的 DNA 片段 (一般皆逸出凝胶), 才能确定提取液内是否含有 RIP, 因为粗提取液内存在的核酸降解酶也能使超螺旋 DNA 变成缺刻和线状 DNA.

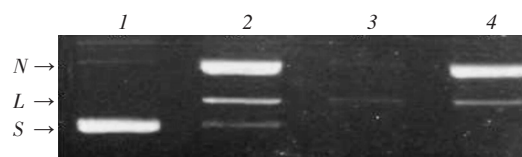


Fig. 1 Assaying enzymatic activity of trichosanthin on plasmid PUC18 DNA

1: Plasmid PUC18 DNA (0.5 μg) was a control. 2: Plasmid PUC18 DNA (0.5 μg) was incubated with 0.5 μg of trichosanthin at 37℃ for 60 min. 3: Plasmid PUC18 DNA (0.5 μg) was incubated with 0.5 μg of trichosanthin at 37℃ for 60 min, and then treated with 2 μl of acidic aniline at 60℃ for 15 min. 4: Plasmid PUC18 DNA (0.5 μg) alone was incubated at 37℃ for 60 min, and then treated with 2 μl acidic aniline at 60℃ for 15 min. N: Nicked DNA; L: Linear DNA; S: Supercoiled DNA.

2.2 用质粒 PUC18 DNA 为底物测定天花粉蛋白酶活性的灵敏度

天花粉蛋白降解质粒 PUC18 DNA 的结果见图 2. 实验结果显示: 天花粉蛋白最低的检出量是 50 ng (图 2-6). 从图 2 中的样品 2 到 6, 随着天花粉蛋白量的逐渐减少, 质粒 DNA 的缺刻和线状形式的量也在相应地降低, 当天花粉蛋白的加入量低于 50 ng 时, 凝胶上出现的缺刻和线状 DNA 不易被观察到. 比较图 2a 和 b 可以看出, 苯胺处理前后的灵敏度变化趋势是一致的. 应该指出, 浓度高的天花粉蛋白, 能在多个位点脱去超螺旋 DNA 上的腺嘌呤碱基^[9]. 由于超螺旋结构本身所产生的张力, 使 DNA 链在部分脱去腺嘌呤碱基的位点处断裂, 超螺旋 DNA 解旋为缺刻和线状 DNA^[5, 11, 12], 在酸性苯胺的进一步作用下, 脱腺嘌呤的 DNA 被完全降解成小片段而逸出凝胶 (图 2b-2, 3 和 4). 随着天花粉蛋白浓度的降低, 脱去 DNA 上的腺嘌呤碱基的位点亦相应减少, 超螺旋 DNA 仅能解旋为缺刻和线状 DNA, 在酸性苯胺的进一步作用下, 脱腺嘌呤的 DNA 被完全降解成小片段的量较少, 大部分的 DNA 仍然以缺刻和线状 DNA 的形式出现在凝胶上 (图 2b-5 和 6).

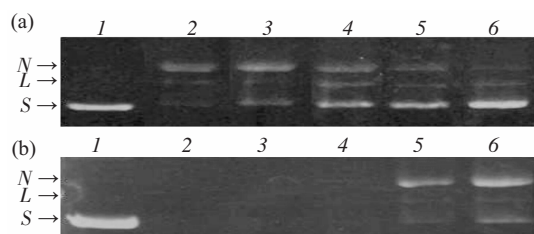


Fig. 2 The sensitivity of enzymatic activity of trichosanthin on plasmid PUC18 DNA

The sensitivity of enzymatic activity of trichosanthin on plasmid PUC18 DNA was assayed as follows: (a) 1: Plasmid PUC18 DNA (0.5 μ g) was a control. 2~6: Plasmid PUC 18 DNA (0.5 μ g) was incubated with 2.0, 1.0, 0.5, 0.1 and 0.05 μ g of trichosanthin, respectively, at 37°C for 60 min. (b) 1: Plasmid PUC18 DNA (0.5 μ g) was a control. 2~6: Plasmid PUC 18 DNA (0.5 μ g) was incubated with 2.0, 1.0, 0.5, 0.1 and 0.05 μ g of trichosanthin, respectively, at 37°C for 60 min, and then treated with 2 μ l acidic aniline at 60°C for 15 min.

2.3 天花粉蛋白降解质粒 PBR322 DNA 程度的时间变化

不同的保温时间, 天花粉蛋白降解质粒 PBR322 DNA 的结果见图 3. 结果显示: 随着天花粉蛋白降解质粒 DNA 时间的增加, 超螺旋 DNA 的含量在逐渐减少, 缺刻和线状结构 DNA 分子的

量逐渐增加, 120 min 后, 超螺旋 DNA 全部转变成缺刻和线状的 DNA. 测定活性时, 选取 60 min 为天花粉蛋白降解质粒 DNA 的时间 (图 3-8).

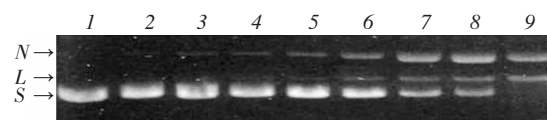


Fig. 3 Enzymatic activity of trichosanthin on plasmid PBR322 DNA with the change of time

1~9: Plasmid PBR322 DNA (0.5 μ g) was incubated with 0.5 μ g of trichosanthin, at 37°C for 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 and 120 min respectively.

2.4 用 2 种质粒 DNA 作底物测定辛纳毒蛋白的酶活性

质粒 PBR322 DNA 与不同量的辛纳毒蛋白在 37°C 保温 60 min 后, 经酸性苯胺 60°C 保温 15 min 处理的结果见图 4a. 实验结果与图 2 的结果相吻合. 当辛纳毒蛋白的浓度高时, 所表现出来的酶活性, 能在超螺旋 DNA 上多个位点脱去腺嘌呤碱基, 在酸性苯胺的进一步作用下, 脱腺嘌呤的 DNA 被完全降解成小片段而逸出凝胶 (图 4a-8). 当天花粉蛋白的浓度降低时, 脱去 DNA 上腺嘌呤碱基的位点亦相应减少, 超螺旋 DNA 仅能解旋为缺刻和线状

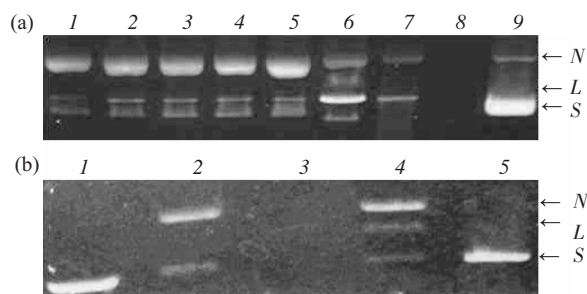


Fig. 4 Comparison of enzymatic activity of cinnamomin on two plasmids PBR322 and PUC19 DNA

(a) Enzymatic activity of cinnamomin on plasmid PBR322 DNA. 1~8: Plasmid PBR322 DNA (0.5 μ g) was incubated with 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 μ g of cinnamomin, respectively, at 37°C for 60 min, and then treated with 2 μ l acidic aniline at 60°C for 15 min. 9: Plasmid PBR322 DNA (0.5 μ g) was used as a control. (b) Enzymatic activity of cinnamomin on plasmid PUC19 DNA. 1: Plasmid PUC19 DNA (0.5 μ g) was treated with 2 μ l acidic aniline at 25°C. 2: Plasmid PUC19 DNA (0.5 μ g) was treated with 2 μ l acidic aniline at 60°C for 15 min. 3: Plasmid PUC19 DNA (0.5 μ g) was incubated with 0.5 μ g of cinnamomin at 37°C for 60 min, and then treated with 2 μ l acidic aniline at 60°C for 15 min. 4: Plasmid PUC19 DNA (0.5 μ g) was incubated with 0.5 μ g of cinnamomin at 37°C for 60 min. 5: Plasmid PUC19 DNA (0.5 μ g) was used as a control.

DNA, 在酸性苯胺进一步作用下, 脱腺嘌呤的 DNA 被完全降解成小片段的量在减少, 大部分的 DNA 仍然以缺刻和线状 DNA 的形式出现在凝胶上(图 4a-2, 3, 4, 5, 6 和 7). 以质粒 PBR322 DNA 为底物时, 辛纳毒蛋白的最低检出量可以达到 5 ng (图 4a-2). 当辛纳毒蛋白的量低于 1 ng 时, 由于酶的作用使缺刻和线状 DNA 增加的量不易被观察到. 用第 2 种质粒 (PUC19 DNA) 作底物测定辛纳毒蛋白酶活性的结果见图 4b. 实验结果与图 1 的结果一致. 以上的结果表明: 核糖体失活蛋白的酶活性, 可以用常见质粒 PUC18、PUC19 和 PBR322 DNA 作底物来测定. 值得说明的是, 在室温 (25℃) 情况下, 酸性苯胺对超螺旋 DNA 的影响较小(图 4b-1). 在 60℃ 保温时, 酸性苯胺对超螺旋 DNA 的破坏作用较大(图 4b-2), 也能使部分超螺旋 DNA 转变成缺刻和线状的 DNA.

3 讨 论

本文报道, 以常用质粒 DNA 为底物测定 RIP 酶(RNA N-糖苷酶)活性的新方法, 避免了制备核糖体需要超速离心机的设备以及提取和分析 RNA 时对仪器和技术的要求, 也避免了使用放射性同位素的污染. 这种新方法测定酶活性所需的时间, 由原来的几天, 缩短到约 120 min, 大大降低了测定 RIP 酶活性的综合成本, 有利于广泛地开展对核糖体失活蛋白的研究. 这个新方法测定 2 种 RIP 酶活性的最低检出量分别是 5 ng (还原型的辛纳毒蛋白) 和 50 ng (天花粉蛋白). 由于在该方法中使用了苯胺对脱腺嘌呤位点的磷酸二酯键的裂解作用, 使质粒 DNA 断裂成小的片段, 从而排除了测定粗制品中 RIP 酶活性时, 核酸酶对超螺旋 DNA 降解作用的干扰. 该测定方法的建立, 使测定 RIP 酶活性的工作能够在普通的生化实验室里完成. 对寻找新的 RIP 等研究有很好的促进作用.

参 考 文 献

- 1 Endo Y, Mitsui K, Motizuk M, *et al.* The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes—the site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem*, 1987, **262** (12): 5908~5912
- 2 Endo Y, Tsurugi K. RNA N-glycosidase activity of ricin A chain—mechanism of action of the toxic lectin on eukaryotic ribosome. *J Biol Chem*, 1987, **262** (17): 8128~8130
- 3 Barbieri L, Gorini P, Vallbonesi P, *et al.* Unexpected activity of saporins. *Nature*, 1994, **372** (6507): 624
- 4 Li M X, Yeung H W, Pan L P, *et al.* Trichosanthin, a potent HIV-1 inhibitor, can cleave supercoiled DNA *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19** (22): 6309~6312
- 5 Ling J, Liu W Y, Wang P T. Cleavage of supercoiled double-stranded DNA by several ribosome-inactivating proteins *in vitro*. *FEBS Lett*, 1994, **345** (2~3): 143~146
- 6 Roncuzzi L, Gasperi-Campani A. DNA-nuclease activity of the single-chain ribosome-inactivating proteins dianthin 30, saporin 6 and gelonin. *FEBS Lett*, 1996, **392** (1): 16~20
- 7 Stirpe F, Barbieri L, Battelli M G, *et al.* Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology*, 1992, **10** (4): 405~412
- 8 Liu R S, Wei G Q, Yang Q, *et al.* Cinnamomin, a type II ribosome-inactivating protein, is a storage protein in the seed of the camphor tree (*Cinnamomum camphora*). *Biochem J*, 2002, **362** (3): 659~663
- 9 Ling J, Liu W Y, Wang T P. Radioassay for RNA N-glycosidase with tritium-labeled sodium borohydride or amino acid. *Bioorganic Chemistry*, 1994, **22** (4): 395~404
- 10 Li X D, Chen W F, Liu W Y, *et al.* Large-scale preparation of two new ribosome-inactivating proteins-cinnamomin and camphorin from the seeds of *Cinnamomum camphora*. *Protein Exp Purif*, 1997, **10** (1): 27~31
- 11 Barbieri L, Valbonesi P, Bonora E, *et al.* Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (3): 518~522
- 12 Panayotatos N, Wells R D. Cruciform structures in supercoiled DNA. *Nature*, 1981, **289** (5797): 466~470

A Novel Method for Assaying Enzymatic Activity of Ribosome-inactivating Protein Using Plasmid DNA as Substrate

WANG Hong-Tao^{1,3)}, ZHANG Shao-Ling^{1)*}, LIU Wang-Yi^{2)*}

¹⁾ College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

²⁾ Institute of Biochemistry and Cell Biology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

³⁾ College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475001, China)

Abstract A novel method for assaying the enzymatic activity of ribosome-inactivating proteins (RIPs) has been developed. The principle of the method is based on that RIP can remove some adenine bases from double-stranded supercoiled DNA molecules, subsequently, the deadenylated DNA was cleaved into nicked and linear form. After treatment with acidic aniline, the deadenylated DNA was degraded into many small fragments, and run out of the gel. The enzymatic activities of two RIPs (trichosanthin and cinnamomin) were tested using this method, the limit of sensitivity is about 50 ng (trichosanthin) and 5 ng (reduced cinnamomin). It should be emphasized that the merit of this method is to avoid the preparation of ribosome.

Key words ribosome-inactivating protein(RIP), double-stranded supercoiled DNA, gel electrophoresis

*Corresponding author .

ZHANG Shao-Ling. Tel: 86-25-84396580, E-mail: nnzsl@njau.edu.cn

LIU Wang-Yi. Tel: 86-21-54921238, E-mail: wylu@sibs.ac.cn

Received: February 5, 2007 Accepted: April 29, 2007