

rithms and the worst is the maximum base pairing. Finally, the difference between two methods of minimum free energy was analysed.

Key words RNA secondary structure, prediction, comparison

单链核糖体失活蛋白的核糖核酸酶活性*

陈红 华陵 王悦 赵晁 颜茂恭 董贻诚

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

余明琨 姚启智

(中国科学技术大学研究生院, 北京 100039)

摘要 以芹菜 4.5 S RNA 为底物, 在 pH5.0 的条件下, 5 种纯核糖体失活蛋白: 天花粉蛋白、苦瓜子蛋白、肥皂草蛋白、丝瓜素毒蛋白和多花白树毒蛋白均显示出核糖核酸酶活性, 放射自显影图显示出它们对 RNA 分子中的各种碱基具有不同的敏感性。

关键词 核糖体失活蛋白, 核糖核酸酶活性, 天花粉蛋白

天花粉蛋白属于核糖体失活蛋白, 在中国作为抗早孕药物已在临床使用多年^[1]. 由于天花粉蛋白能抑制 HIV-1 病毒在受感染的巨噬细胞和 T 淋巴细胞内的复制, 在美国作为艾滋病的治疗药物已进入临床试验阶段^[2,3]. 天花粉蛋白在体外还有广谱的抗病毒作用^[4]. 由于核糖体失活蛋白具有广泛的应用前景, 引起了人们的极大兴趣, 不断出现有关这类蛋白的一些新性能的报告. 1991 年 Li 等^[5]报道在常规酶切反应条件下, 天花粉蛋白 (trichosanthin) 能够使超螺旋双链 DNA 解旋并断裂为缺口环状和线状 DNA, 1992 年刘望夷等^[6]报道樟树毒蛋白 (cinnamomin 及 camphorin) 也有此切割 DNA 的活性. 我们对天花粉蛋白的结构与功能的深入研究过程中, 也发现了这一类核糖体失活蛋白还具有一些新的性能. 当它们与 5'-AMP 作用时, 可生成腺苷及腺嘌呤两种产物, 即表现出磷酸酯酶及糖苷酶两种活性^[7]. 本文主要报道天花粉蛋白及其他核糖体失活蛋白的核糖核酸酶活性的实验结果.

1 材料和方法

1.1 核糖体失活蛋白

自制天花粉蛋白 (trichosanthin, TCS) 自栝楼根中抽提, 经饱和硫酸铵沉淀, DEAE-Cellulose、CM-Sepharose Cl-6B 及 Sephacryl S 100 (HR) 柱分离后获得. M_r 为 27 000, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯.

商品结晶纯天花粉蛋白 (JS TCS) 购自上海金山药厂, 批号 8904, 9201, 900407, 9010.

苦瓜子蛋白 (momordin, α -momorcharin, α -MMC) 自苦瓜子内抽提, 方法同自制天花粉蛋白.

肥皂草蛋白 (saporin, Cat No. S 9896), 丝瓜素毒蛋白 (luffin, Cat No. L 7146) 和多花白树毒蛋白 (gelonin, Cat No. G 2394) 均为 Sigma 产品.

*国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1995-11-14, 修回日期: 1996-01-15

1.2 核糖核酸酶活性测定

核糖核酸酶活性以芹菜 4.5 S RNA 为底物进行测试. 芹菜 4.5 S RNA 的制备, 按文献方法 [8].

1.3 核糖体失活蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳

核糖体失活蛋白 ($1 \mu\text{g}$) 与底物芹菜 4.5 S RNA ($5'$ - ^{32}P 标记), 在 pH 5.0 的 25 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中, 总体积 $5 \mu\text{l}$, 于 55°C 反应 15 min, 反应完加等体积的上样缓冲液 (50 mmol/L Tris- H_3BO_3 pH 8.3, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 脲, 0.05% 的二甲苯青及 0.05% 溴酚蓝), 进行 10% 聚丙烯酰胺-7 mol/L 脲 (胶厚 0.5 mm) 凝胶电泳, 并分别以 4 种 RNA 水解酶 (RNase T_1 、 U_2 、phy M 和 *B. cereus*) 部分水解的样品及栝楼核糖核酸酶 (RNase TCS) 部分水解的样品为对照, 一起进行电泳, 电泳条件为 2000 V, 3 h, 约 55°C .

2 结果与讨论

以芹菜 4.5 S RNA 为底物时, 在 pH 5.0, 自制的天花粉蛋白、金山药厂的两批结晶天花粉蛋白 (批号 8904 和 9010)、自制的苦瓜子蛋白、Sigma 产品肥皂草、丝瓜素及多花白树毒蛋白共 5 个品系, 7 个批次的单链核糖体失活蛋白, 均表现出明显的 RNase 活性 (图 1). RNase T_1 、 U_2 、phy M 和 *B. cereus* 4 种酶是酶法测定 RNA 多核苷酸序列的常用酶, 它们分别专一于 G、A、A+U 和 U+C 碱基, 从准确地确定 RNA 序列的需要出发, 希望所使用的酶对某种碱基具有特别的专一性. 所以各种植物毒蛋白的酶解图谱与上述 4 种酶的酶解图谱比较时 (图 2), 可以发现, a. 各种植物毒蛋白的活性并未显示对某种碱基具有特殊专一性 (像 RNase T_1 、 U_2). b. 但是也不像“阶梯”那样对 RNA 分子中每个碱基具有同等的酶解几率. 即它们对某种碱基或其前后碱基之间的某种顺序具有一定降解优势. c. 第 8 和 10 列样品 (trichosanthin 和 gelonin) 的降解图谱类似 phy M 的酶解图谱, 也许可以表明这

两种植物毒蛋白也具有在 A、U 碱基处断开 RNA 的核糖核酸酶活性. 另外从它们的各带的强弱来看, 两者之间又有差异. 总之, 实验中所用的各种植物毒蛋白具有不同的核糖核酸酶的活性, 对 RNA 分子中的各种碱基具有不同的底物特异性.



图 1 各种核糖体失活蛋白与底物 $5'$ - ^{32}P 标记芹菜 4.5 S RNA 反应产物的放射自显影图

1: $5'$ - ^{32}P 标记芹菜 4.5 S RNA (底物); 2: 底物经有限碱水解形成的谱带 (阶梯); 3: 天花粉蛋白产物谱带; 4: 苦瓜子蛋白产物谱带; 5: 多花白树毒蛋白产物谱带; 6: 肥皂草产物谱带; 7: 金山结晶天花粉批号 9010 产物谱带; 8: 金山结晶天花粉批号 8904 产物谱带; 9: 丝瓜素产物谱带; 10: 栝楼核糖核酸酶产物谱带.

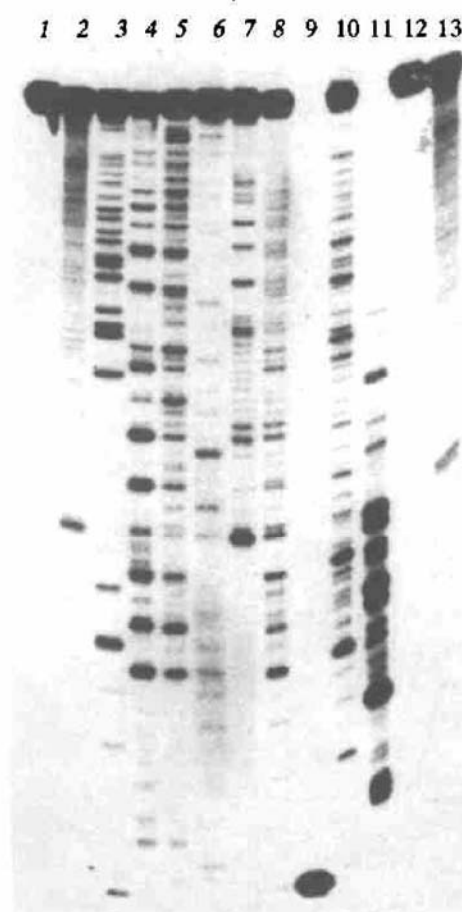


图2 各种核糖体失活蛋白同芹菜4.5 S RNA 反应与几种核糖核酸测序酶同芹菜4.5 S RNA 酶解反应后放射自显影图谱比较

1: 5'-³²P 标记芹菜4.5 S RNA (底物); 2: 底物经有限碱水解形成的谱带 (阶梯); 3: 核糖核酸酶 T1 产物谱带; 4: 核糖核酸酶 U2 产物谱带; 5: 核糖核酸酶 Phy M 产物谱带; 6: 核糖核酸酶 *B. Cereus* 产物谱带; 7: 栝楼核糖核酸酶产物谱带; 8: 天花粉蛋白产物谱带; 9: 苦瓜子蛋白产物谱带; 10: 多花白树毒蛋白产物谱带; 11: 肥皂草产物谱带; 12: 金山结晶天花粉批号 9010 产物谱带; 13: 阶梯。

实验结果表明, 无论是自制高纯度的天花粉蛋白, 苦瓜子蛋白, 或金山药厂结晶纯的天花粉蛋白 (纯度鉴定见图3), 还是 Sigma 公司出售的3种单链核糖体失活蛋白肥皂草、丝瓜素毒蛋白及多花白树毒蛋白 (纯度鉴定见图4), 在我们现用的实验条件下均表现出明显的

核糖核酸水解酶活性.

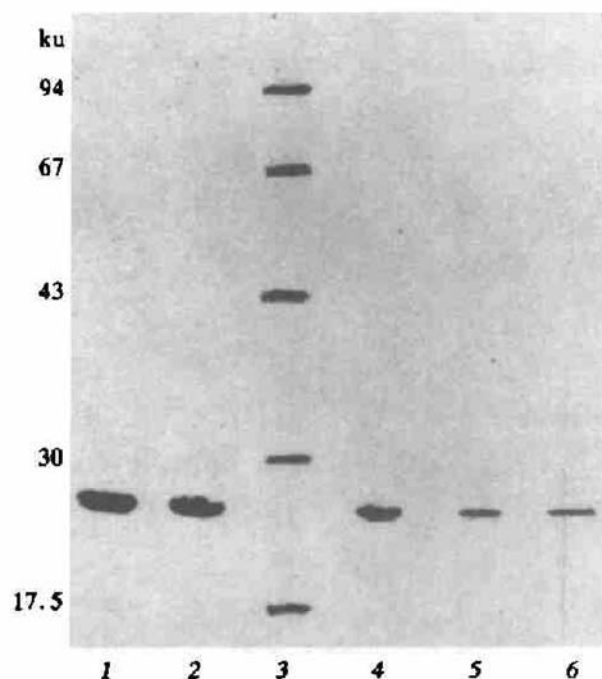


图3 天花粉蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图
1: 金山结晶天花粉批号 900407; 2: 金山结晶天花粉批号 9010; 3: 低分子质量标准自上至下: 94 ku、67 ku、43 ku、30 ku 和 17.5 ku; 4: 金山结晶天花粉批号 9201; 5: 自制天花粉蛋白; 6: 金山结晶天花粉批号 8904.

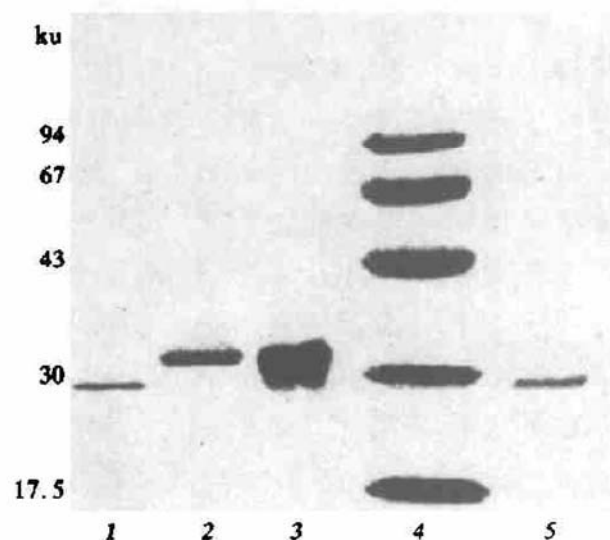


图4 核糖体失活蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图
1: 丝瓜素蛋白; 2: 多花白树毒蛋白; 3: 肥皂草蛋白; 4: 低分子质量标准同图3; 5: 苦瓜子蛋白。

我们曾从中药天花粉 (栝楼块根) 中分离纯化得到一种具有切 U 专一性的 RNase TCS, 它的等电点为 4.0, 分子质量为 24 ku^[9], 与具有核糖体失活蛋白功能的天花粉蛋白的理化

性质相差甚远. 因此在分离纯化上是易于区分的. 从图3的电泳图谱也可看出各批号的TCS是相当纯的, 没有RNase TCS的条带. 当以芹菜4.5 S RNA为底物时, 两者所表现出的RNase专一性也有明显不同, 说明TCS的RNase活性确实是TCS本身所具有的, 而不是由于RNase TCS的沾污引起的. 1985年Obrig^[10]也曾报道过Ricin A链、商陆蛋白以及志贺毒蛋白(Shiga)能降解兔网质红细胞核糖体内的5 S和5.8 S RNA, 表现出明确的RNase活性, 但未引起人们的重视. 后来1987年Endo等^[11]提出Ricin A的作用机制是水解真核细胞核糖体大亚基28 S rRNA 4324位上的腺嘌呤碱基与核糖之间的N-C糖苷键, 阻遏了延长因子EF-2与之结合从而使核糖体失活. 那么使核糖体失活的N-糖苷酶活性与RNase活性二者之间有什么联系, 它们又有什么区别? 目前一般用无细胞蛋白质合成体系内能否抑制蛋白质合成来表示核糖体失活蛋白的N-糖苷酶活性. 当我们用RNase A及RNase B在无细胞蛋白质合成体系里做试验时, 它们都不能阻断蛋白质合成, 即RNase并不一定使完整核糖体内的rRNA降解失活, 证明使核糖体失活的N-糖苷酶活性和RNase之间是有区别的. TCS的RNase活性还表现在能与poly U、poly A等作用(未发表结果), 以及与AMP作用表现磷酸单酯酶的性能^[7]. 最近Barbieri等^[12]报道核糖体失活蛋白Saporin L1不仅作用于rRNA, 而且作用于poly A、DNA及多种RNA, 释放出腺嘌呤. Barbieri^[13]也曾报道PAP-R、Trichokirin及Saporin-6作用于鼠肝核糖体时, 并非只作用于4324位这一专一位点的腺嘌呤碱基, 而是可以释放出多于一个腺嘌呤碱基, 最多可达33个腺嘌呤碱基. 总之核糖体失活蛋白所表现出的多种性能的结构基础是什么? 是一个分子不同的部位具有不同的活性, 还是由于多种辅基或不同构象状态调控所致? 进一步搞清这些问题对全面认识核糖体失活蛋白的作用机制, 认识核糖体失活蛋白在植物自身中所起作用, 以及对于它的抗病毒抗

艾滋病应用方面有重大意义.

参 考 文 献

- 1 Acta Zoologica Sinica (Chinese), 1974; 22: 126
- 2 McGrath M S, Hwang K M, Caldwell S E *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 2844
- 3 Ferrari P, Trabaud M A, Rommain M *et al.* AIDS, 1991; 5: 865
- 4 杨新科, 陈章良, 段淑敏等. 病毒学报, 1990; 6 (3): 219
- 5 Li M X, Yeung H W, Pan L P *et al.* Nucleic Acids Res, 1991; 19: 6309
- 6 凌 俊, 刘望夷, 王德宝. 生物化学与生物物理进展, 1992; 19 (5): 366
- 7 陈 红, 王 悦, 颜茂恭等. 生物化学杂志, 1996; 12 (4): 125
- 8 蔡良琬主编. 核酸研究技术上册. 北京: 科学出版社, 1981: 194
- 9 华 陵, 赵 暴, 刘笑洋等. 生物物理学报, 1992; 8 (2): 351
- 10 Obrig T G, Moran T P, Colinas R J, Biochem Biophys Res Commun, 1985; 130 (2): 879
- 11 Endo Y, Mitsui K, Motizuki M *et al.* J Biol Chem, 1987; 262 (12): 5908
- 12 Barbieri L, Gorini P, Valbonesi P *et al.* Nature, 1994; 372: 624
- 13 Barbieri L, Ferreras J M, Barraco A *et al.* Biochem J, 1992; 286: 1

RNase Activity of Single Chain Ribosome-Inactivating Proteins. Chen Hong, Hua Ling, Wang Yuc, Zhao Kun, Yan Maogong, Dong Yicheng (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*); Yu Mingkun, Yao Qizhi (*Graduate School, University of Science and Technology of China, Beijing 100039, China*).

Abstract Five purified preparations of ribosome-inactivating proteins (RIPs), trichosanthin, momorcharin, saporin, luffin and gelonin were shown to exhibit ribonuclease activity, under pH 5.0, with celery 4.5 S RNA as substrates. The autoradiography showed that different RIPs had different base specificities on RNA molecules.

Key words ribosome-inactivating protein, ribonuclease activity, trichosanthin