

研究快报

克木毒蛋白三种酶活性与色氨酸残基的关系*

秦 聆 凌 俊 阮康成 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 对一种新的核糖体失活蛋白——克木毒蛋白的研究表明, 该分子中仅含一个色氨酸, 此色氨酸与克木毒蛋白具有的三种酶活性有明显不同的关系。

关键词 克木毒蛋白, 色氨酸, 荧光

核糖体失活蛋白(RIP)是一类专一修饰真核或原核核糖体高分子量 rRNA 而抑制蛋白质合成的核毒素。到目前为止, 已发现有 110 余种^[1]。近来我们实验室从樟树种子中提取了两种新的 RIP, 并命名为克木毒蛋白(camphorin)和辛纳毒蛋白(cinnamomin)^[2]。我们最近研究发现 camphorin 具有三种酶活性^[3,4], 即 RNA N-糖苷酶, 依赖超螺旋构型的核酸内切酶及超氧化物歧化酶(SOD)活性。一种蛋白具有三种互不相关的酶活性是少见的。此外, 我们还发现 camphorin 分子中只含有一个色氨酸残基, 且此色氨酸残基与 camphorin 的三种酶活性有明显不同的关系, 现报道如下。

Camphorin 系根据我们以前报道的方法制备纯化, 得到的 camphorin 经 SDS 电泳后银染呈一条带。N-溴代丁二酰亚胺(NBS)购自金城试剂厂。所有试剂均为分析纯。

1 Camphorin 中色氨酸及其荧光特性

根据 Spande 等^[5]方法用 NBS 修饰 camphorin 的研究发现, 无论是在天然状态下(在 50mmol/L NaAc-HAc, pH 4.0 缓冲液中)还是在变性条件下(8mol/L 脲中), 每个 camphorin 分子只有 1 个色氨酸残基被 NBS 修饰, 因此可以认为 1 分子 camphorin 只含有 1 个色氨酸残基, 且此残基位于 camphorin 分子的表面。进一步对此色氨酸残基的荧光研究表明, 其量子产率为 0.024, 最大荧光发射峰在

340nm, 与在水溶液中的游离色氨酸的荧光峰(352nm)相比, 蓝移了 12nm, 表明该色氨酸残基的侧链吲哚环并未和溶剂直接接触, 而处在一个比较疏水的环境中。

2 色氨酸残基与三种酶活性间的关系

Camphorin 具有 RNA N-糖苷酶活性^[2]。当它作用于大鼠肝 80S 核糖体 15min 后, 利用苯酚/氯仿抽提总 rRNA, 并经酸性苯胺处理, 其反应混合物经 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定, 可观察到特征性的 RNA 片段(R 片段)。然而, 色氨酸残基被 NBS 修饰后的 camphorin 不能产生特征性的 R 片段, 说明它已不能作用于大鼠肝 80S 核糖体中的 28S RNA, 即完全丧失了 RNA N-糖苷酶活性, 表明色氨酸残基是 RNA N-糖苷酶活性所必需的。这一结果与以前对蓖麻毒蛋白 A 链研究的结果一致^[6]。

利用 1%琼脂糖凝胶电泳可以测定 camphorin 对超螺旋 DNA 的解旋与切割活性。天然的 camphorin 能够作用于超螺旋 DNA (如 pGM-4Z)^[4], 使之产生缺口状 DNA, 甚至还可以进一步切断 DNA 环, 形成线状 DNA。这三种 DNA 在琼脂糖凝胶中的迁移速度不同, 因此可以区分三种 DNA, 得到其相对比值, 由此可计算核酸内切酶的活性。当 camphorin 中的色氨酸被 NBS 修饰后, 琼脂糖凝胶电泳结

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1995-01-12, 修回日期: 1995-02-15

果表明,它依然能作用于超螺旋DNA,产生缺口状DNA,酶活性和未被修饰的相仿,暗示此色氨酸残基与此酶活性无关,但进一步酶切形成线状DNA的活性要低于天然的 camphorin,其中原因有待进一步的研究。

我们根据凝胶原位负染色法使用扫描技术测定了 camphorin 中色氨酸残基被修饰前后 SOD 活性的变化。结果表明,当色氨酸残基被修饰后, camphorin 的 SOD 活性损失约 40%,暗示色氨酸残基虽不是其 SOD 活力所必需,但对其活性有很大影响。

Camphorin 中唯一的色氨酸残基与其三种酶活性有上述如此不同的关系,暗示这三种酶活性中心可能在蛋白质分子中占据不同的部位。这是十分有意义的现象,进一步的详尽研究正在进行之中。

参 考 文 献

- 1 Stirpe F, Barbier L, Battelli M *et al.* Biotechnology, 1992; **10**: 405
- 2 Ling J, Liu W Y, Wang T P. Biochem Biophys Acta,

1995; (in press)

- 3 刘望夷, 凌 俊. 生命的化学, 1994; **14** (5): 1
- 4 Ling J, Liu W Y, Wang T P. FEBS Lett, 1994; **345**: 143
- 5 Spande T F, Witkop B. Methods in Enzymology, 1967; **11**: 495
- 6 Katzin B J, Collins E J, Robertus J D. Proteins, 1991; **10**: 251

Relationship Between the Three Enzymatic Activities of Camphorin and Its Single Tryptophan Residue. Qin Ling, Ling Jun, Ruan Kangcheng, Liu Wangyi (Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China).

Abstract Recent study indicated that camphorin, a new ribosome-inactivating protein (RIP), contained only one tryptophan residue. This single tryptophan residue had obviously different relation with the three enzymatic activities of camphorin.

Key words camphorin, tryptophan, fluorescence

(上接第 176 页)

- 8 Puleo P R, Guadagno P A, Roberts R *et al.* Clin Chem, 1989; **35**: 1452
- 9 Sirag E E, Gerchen G, Harm K. J Clin Chem Clin Biochem, 1986; **24**: 847
- 10 Morell R L, Carlson C J, Emilson B *et al.* Circulation, 1983; **67**: 1283
- 11 Wu A H B, Gorhet T G. Clin Chem, 1985; **31**: 1841
- 12 罗 玲, 杨振华. 中华医学检验杂志, 1990; **13** (1): 13
- 13 王 波, 王燕玲. 中华医学杂志, 1990; **70**: 401

Rapid Assay of Creatine Kinase Isoenzymes and Its Isoforms by Using Agarose Gel Electrophoresis. Wang Bo, Yang Zhenhua (Laboratory of Medicine, Beijing Hospital, Beijing 100730, China).

Abstract An agarose gel electrophoretic method for separating creatine kinase (CK) isoenzymes and its isoforms (CK-MB and CK-

MM isoforms) simultaneously was established. It is based on a suitable discontinuous buffer system. By passing a larger current through the gel under a lower applied voltage, the separating time was shortened to 30 min. The measurements of CK-MB%, CK-MB₁%, CK-MB₂%, CK-MM₁%, CK-MM₂%, CK-MM₃% can be completed within one hour. The method is sufficiently sensitive to detect the CK-MB isoenzyme and CK-MM isoforms at the concentration of lowest detection limit 2.2U/L and 32U/L respectively. Thus, this system can be used to rapidly, sensitively and precisely quantify the isoenzymes and isoforms of CK.

Key words CK-MB isoforms, CK-MM isoforms, CK-MB isoenzyme