

碱基上的氨臂对 T_4 多核苷酸激酶催化的影响

张晓岚 陆长德 祁国荣

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

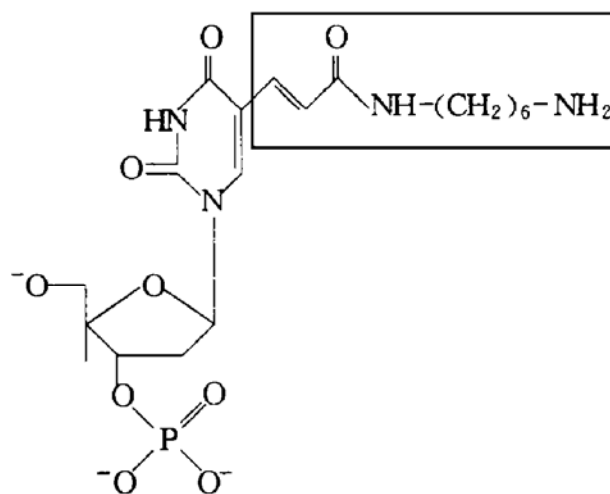
摘要 寡聚核苷酸内部和 5' 末端含有的氨臂修饰胸苷酸, 能够明显地影响 T_4 多核苷酸激酶催化的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的转移反应, 其转移效率为未修饰寡聚核苷酸的 50% 和 2%。这种修饰的寡聚核苷酸对 T_4 RNA 连接酶催化的反应没有影响。

关键词 T_4 多核苷酸激酶, 寡聚核苷酸, 氨臂, 5' 末端标记

T_4 多核苷酸激酶 (EC 2.7.1.78)——pset 基因的产物, 由 4 个相同的分子量为 34 ku 的多肽链组成——催化 ATP 的 γ -磷酸基团向 DNA、RNA、寡聚核苷酸和 3' -单核苷酸的 5' -OH 转移。其转移效率受各种因素的影响。我们在标记合成的寡聚核苷酸时, 发现寡聚核苷酸内部或 5' 端含有氨臂修饰的胸苷酸 (dT^*) 时, 对 T_4 多核苷酸激酶催化的 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 的转移反应具有明显的影响。本文对不同位置上带修饰碱基的寡聚核苷酸进行 5' 和 3' 末端同位素标记比较。结果表明, 5' 端及中间碱基上的氨臂会降低 T_4 多核苷酸激酶标记寡聚核苷酸的效率, 而不影响 T_4 RNA 连接酶的催化反应。

学工程公司。 T_4 多核苷酸激酶 (8000 U/ml) 购于华美公司。 T_4 RNA 连接酶购于 Biolabs 公司。 3' -CMP 为我所东风试剂厂产品。其他试剂均为分析纯或电泳纯产品。

寡聚核苷酸中氨臂修饰的胸苷酸残基 (dT^*) 的结构为:



在胸腺嘧啶的 5 位带有 1 个丙烯酰亚胺基己胺基团, 如方框内所示。

三种寡核苷酸为:

- I: 5' CGCAUGUUCUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAACAACAAG 3' / 38 mer
 II: 5' CGCAUGUUCUGAUGAGUCCGdT*GAGGACGAAACAACAAG 3' 38 mer
 III: 5' dT*CGCAUGUUCUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAAGCAGCAAG 3' 39 mer

1.2 方法

1.2.1 寡聚核苷酸 5' 末端标记: 反应体积为 5 μ l. 寡聚核苷酸 I, II, III 分别为 0.4 μ mol/L, IV 为 I 和 III 各 0.4 μ mol/L 的混合物, 50 mmol/L Tris-HCl pH7.6, 10 mmol/L $MgCl_2$, 5 mmol/L 二巯基苏糖醇, 0.1 mmol/L 亚精胺, 0.1 mmol/L EDTA pH8.0, [γ - ^{32}P] ATP 15 μ Ci, T_4 多核苷酸激酶 8 U, 37 $^{\circ}C$, 反应 1 h, 置 80 $^{\circ}C$ 水浴 2 min.

1.2.2 寡聚核苷酸 3' 末端的标记: 参照祁国荣等^[1]的方法.

1.2.3 寡聚核苷酸标记结果的分析: 分别吸取 3 μ l 5' 和 3' 末端标记的寡聚核苷酸反应混合液, 用含有 7 mol/L 尿素的 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析. 电泳后, 凝胶放射自显影, 然后割取寡聚核苷酸条带, 测定放射性强度.

2 结果和讨论

本实验对 3 种寡聚核苷酸进行 5' 末端标记, 发现当丙烯酰亚氨基己胺基团修饰的胸苷酸 (以下简称氨基修饰胸苷) 在寡聚核苷酸的中部 (II) 时, 其同位素标记强度其计数率为 8807, 低于未修饰的寡聚核苷酸 (I, 标记强度其计数率为 15 038); 当修饰胸苷在 5' 末端 (III) 时, 标记强度其计数率仅为 352, 基本不能产生 γ -磷酸的转移; 混合物的标记 (IV) 强度为 14 491, 与 I 基本相同, 说明带 5' 修饰胸苷的寡聚核苷酸 (III) 的存在并不影响 I 的标记 (图 1); 对 4 种寡聚核苷酸的 3' 末端进行标记, 其标记强度 (计数率) 差别不大 (I: 8540, II: 7433, III: 6070, IV: 7110. 自显影照片未给出).

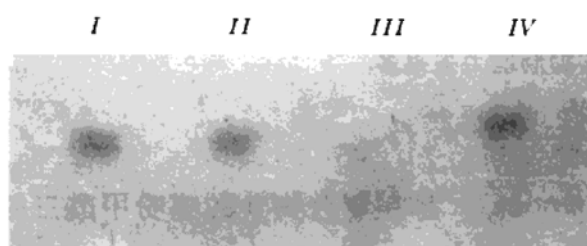


图 1 寡聚核苷酸的 5' 末端标记

以前的研究分析了不同分子作为 T_4 多核苷酸激酶底物的磷酸转移效率, 表明 5' 末端核苷酸的 3' -磷酸基团和戊糖均与 T_4 多核苷酸激酶有相互作用, 因而影响其活性. 对碱基是否也参与作用, 看法不尽相同. 有许多实验表明, 用庞大的碱基修饰基团如氨基保护基团苯并芘, 对甲氧苯甲酰等对寡聚核苷酸的 5' 末端核苷酸或所有的核苷酸进行修饰后, 并不影响 T_4 多核苷酸激酶的转磷酸作用^[2,3]. 但 4 种不同的 3' -单核苷酸对 T_4 多核苷酸激酶具有不同的 K_m 值^[4]. 碱基的芳香族结构被破坏后也影响 T_4 多核苷酸激酶的活性^[5]. Winfeld 等^[6]第一次发现 T_4 多核苷酸激酶不能作用于链内或链间形成的胸腺嘧啶二聚体及其 5' -核苷酸类似物. 对于寡聚核苷酸某一位点的碱基进行化学修饰来研究 T_4 多核苷酸激酶的活性还未见报道. 从我们的实验结果可看出碱基上氨基修饰对 T_4 多核苷酸激酶的作用有一定的影响. 从图 1 的结果可初步推测, 寡聚核苷酸经氨基修饰后, 降低了 T_4 多核苷酸激酶对它的亲和性, 作为对照的用 T_4 RNA 连接酶催化的 3' 连接反应却没有受 5' 端胸苷氨基修饰基团或中间的胸苷氨基修饰基团的影响. 但 5' 带氨基修饰胸苷的寡聚核苷酸的存在并不影响 T_4 多核苷酸激酶对其他底物的磷酸化速率. 因而这一抑制作用不是由于 5' 胸苷修饰基团 (丙烯酰亚氨基己胺) 对 T_4 多核苷酸激酶亲合性增高, 与酶形成稳定结合而影响了磷酸转移反应, 而可能是这一基团的存在影响了 T_4 多核苷酸激酶与 5' 核苷酸残基的戊糖及 3' 磷酸的相互作用. 在离 5' 端 20 个核苷酸远的修饰胸苷对于 5' 端的标记也产生一些影响 (II), 则可能是这个分子通过分子内碱基配对形成分子折叠后, 胸苷上的丙烯酰亚氨基己胺基团与寡聚核苷酸的 5' 端比较靠近, 从而影响了 T_4 多核苷酸激酶与 5' 端核苷酸残基的相互作用, 丙烯酰亚氨基己胺基团对 T_4 多核苷酸激酶与 5' 核苷酸残基相互的影响, 可能主要是空间位阻作用, 也可能存在静电相互作用.

目前, 虽然 T_4 多核苷酸激酶基因 (pset) 全

序列已经研究清楚,但底物结合位点仍不确定^[7].我们的结果对于研究 T_4 多核苷酸激酶的作用机制可以提供一些有用的信息.近来带氨基的寡聚核苷酸应用越来越广泛,而用同位素进行标记是有用的测定方法.因此,研究氨基对于寡核苷酸 5' 或 3' 标记的影响也具有实际的意义.

参 考 文 献

- 1 祁国荣,曹功杰,竺来发等. 中山大学学报, 1985; 2: 65
- 2 Van de Sande J H, Bilsker M. Biochemistry, 1973; 12: 5056
- 3 Reddy M V, Randerath K. Carcinogenesis, 1986; 12: 1543
- 4 Lillehaug J R, Kleppe K. Biochemistry, 1975; 14: 1221
- 5 Weinfeld M, Soderlind K M, Buchko G W. Nucleic Acid Res, 1993; 21: 621
- 6 Weinfeld M, Liuzzi M, Paterson M. J Biol Chem, 1989; 264: 6364
- 7 Medgley C A, Murray N E. EMBO J, 1985; 4: 2695

Influence of the Amino-Space Modification of

a Base in an Oligonucleotide on the Activity of T_4 Polynucleotide Kinase. Zhang Xiaolan, Lu Changde, Qi Guorong (Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract It was found that the presence of an amino-space modifying thymidine in an oligonucleotide interfered the transfer reaction of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP by T_4 polynucleotide kinase. When this modified thymidine located in the middle of oligonucleotide, 50% activity of T_4 polynucleotide kinase was inhibited. When this modified thymidine located at the 5'-terminus, only 2% activity remained. Comparatively, those modifications did not affect the activity of T_4 RNA ligase.

Key words T_4 polynucleotide kinase, oligonucleotide, amino-space, 5'-terminus labeling

苯并噻唑醌类化合物对呼吸链酶系的抑制作用*

吕 斌 刘翠华

(华中师范大学有机合成研究所, 武汉 430070)

尚贺勇 徐建兴

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 合成了 2-氯-5-正十二硫烷基-6-甲基-4, 7-苯并噻唑醌 (2-Cl-DMMDBT) 和 2-氯-5-正丁烷基-6-甲基-4, 7-苯并噻唑醌 (2-Cl-BAMDBT) 两种化合物, 研究了它们对线粒体呼吸链酶系的抑制作用. 结果表明: 2-Cl-DMMDBT 和 2-Cl-BAMDBT 对琥珀酸氧化酶及泛醌氧化酶的电子传递活性均表现一定的抑制作用, 而对细胞色素氧化酶无作用, 说明二者的抑制作用发生在泛醌反应区. 二者对 NADH 氧化酶的抑制行为略有不同, 2-Cl-DMMDBT 是一个逐渐加强的过程, 最终可致酶活性完全抑制, 而 2-Cl-BAMDBT 则表现为瞬间抑制. 比较了 2-Cl-DMMDBT 和 2-Cl-BAMDBT 对琥珀酸氧化酶的抑制能力, 长侧链的 2-Cl-DMMDBT 比短侧链的 2-Cl-BAMDBT 抑制能力强很多.

关键词 呼吸链, 抑制剂, 苯并噻唑醌

呼吸链抑制剂是研究呼吸链电子传递机制的分子工具, 已知的呼吸链抑制剂多为酶专一性单位点抑制剂, 如抑制复合物 I 的鱼藤酮

(rotenone), 抑制复合物 II 的噻吩甲酰三氟丙

* 国家自然科学基金和湖北省自然科学基金共同资助.
收稿日期: 1994-12-20, 修回日期: 1995-03-02