

研究快报

几种核糖体失活蛋白对超螺旋环状 DNA 的切割与解旋作用

凌俊 刘望夷 王德宝

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

关键词 核糖体失活蛋白, 超螺旋环状 DNA

天花粉蛋白 (trichosanthin) 是一种单链核糖体失活蛋白 (ribosome-inactivating protein, RIP), 它失活核糖体的机制属于 RNA N-糖苷酶型^[1]。最近 Li 等发现天花粉蛋白可作用于超螺旋环状 DNA, 将其切割与解旋成缺口及线状分子, 但并不作用于线状 DNA^[2]。为了探讨其它 RIP 是否也具有这种活性, 及其作用于 DNA 与 28S rRNA 的关系, 我们对蓖麻毒蛋白 (ricin), 蓖麻毒蛋白-A 链以及我们实验室从樟树种子分离到的两种新的 RIPs (Cinnamomin, Camphorin) 切割 DNA 的活性进行了研究。

分别以 pGEM-4Z, Bluescript M13 与 λ DNA 为超螺旋环状及线状 DNA 底物。Cinnamomin 为双链糖蛋白, Camphorin 则呈单链结构。将 1 μ g 的超螺旋 DNA 与不同浓度的 RIP (0.1, 0.5, 1, 3, 5 μ g/20 μ l) 在 25 $^{\circ}$ C 保温 1h, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析。Cinnamomin A-链, Camphorin 及蓖麻毒蛋白-A 链都表现出切割 DNA 的活性, 随着 RIP 量的增加, 超螺旋 DNA 逐渐减少, 缺口状 DNA 递增, 并进一步产生线状 DNA。定量比较表明, 它们的活性都较天花粉蛋白为高, 在 0.3 μ g 时即可产生线状 DNA, 而天花粉蛋白则需要 5 μ g。当我们将 Cinnamomin A-链及蓖麻毒蛋白 A-链的用量提高到 15 μ g 时, 竟出现了两条分子量很近的新条带, 而缺口 DNA 并未全部转化为线状 DNA。完整的蓖麻毒蛋白和

Cinnamomin 在离体状况下并不作用于 28S rRNA, 却能切割超螺旋 DNA, 但是其活性要比相应的 A-链低。将蓖麻毒蛋白加热失活, 其切割 DNA 的活性也同时丧失。这些都表明 RIP 切割超螺旋 DNA 存在着新的方式, 其作用机理与 RNA N-糖苷酶活性间存在一定的关系。以线状 λ DNA 为底物, RIP 均不表现活性。另外我们还观察到, 不同的解离条件对蓖麻毒蛋白 A-链切割 DNA 的活性有一定的影响。用 2-巯基乙醇及半乳糖解离的 A-链较单独用 2-巯基乙醇解离的活性为高。

RIP 切割超螺旋环状 DNA 的作用机理是否也存在着与 DNA 限制性内切酶相类似的专一性识别位点。我们对 RIP 处理过的 DNA 进行了几种内切酶图谱分析, 结果发现在 pGEM-4Z 的 PvuI, PvuII 酶切大片段中存在着一个 RIP 作用位点, 但与 BglII 的结果并不一致。这似乎暗示 DNA 一级结构不一定是 RIP 对 DNA 识别与作用的唯一因素, DNA 的拓扑构象可能起着更重要的作用。

参考文献

- 1 Zhang Jinsong, Liu Wangyi. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 1271
- 2 Li Mingxing *et al.* *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 6309