

HOU Xun (*State Key Laboratory of Transient Optics and Technology, Xi'an Institute of Optics and Precision Mechanics, The Chinese Academy of Sciences, Xi'an 710068, China*); HU Kunsheng, WANG Aojin (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*).

Abstract Because of the structural similarity to rhodopsin, bacteriorhodopsin is characterized by some visual response properties. With electrophoresis method, oriented purple membrane films are deposited on stainless steel electrode to construct a photoreceptor with the structure of

stainless steel/ purple membrane/ gel/ copper electrode. As illuminated by modulated light, the photoreceptor gives rise to a differential response. The dependencies of the photoreceptor's photovoltages on the modulating frequency and the incident light power are measured. The analogy between the bacteriorhodopsin's response to modulated light and the visual flash and brightness are compared and discussed.

Key words bacteriorhodopsin, purple membrane, photoreceptor

运用原子力显微镜研究核糖体 RNA 的二级结构*

吴晓华 刘望夷¹⁾

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

徐磊 李民乾

(中国科学院上海原子核研究所, 上海 201800)

摘要 通过反复冻融的方法使核糖体在低温下瓦解, 制备了 rRNA, 不经抽提、变性和染色处理就能使 rRNA 在云母表面上较好地分散。用原子力显微镜对其进行观察, 发现 rRNA 分子呈多分支的棒状结构, 且有很好的规律性。根据 RNAs 的大小和形状可将其分为三种, 它们分别与计算机所预测的 28S-5.8S、18S、5S rRNA 的二级结构相似。我们得到的 28S-5.8S、18S、5.8S、5S rRNAs 的结构信息, 支持基于热力学考虑推测的 rRNAs 的二级结构。

关键词 核糖体 RNA, 二级结构, 原子力显微镜

核糖体 RNA 在蛋白质合成中起重要的作用^[1], 而核糖体蛋白主要通过诱导或稳定 rRNA 上功能位点的构象来促进 rRNA 表现功能^[2]。实验结果已证明 rRNA 的许多位点与蛋白质合成的重要反应密切相关。现已测定了多种核糖体中的 rRNA 全序列, 遗传比较及计算机预测的结果表明所有原核与真核生物 rRNA 都能折叠成相似的二级结构^[3~5]。这些结果也提示 rRNA 可能在蛋白质合成中起重要作用。

rRNA 在核糖体中的重要作用包括以下几个方面: a. 在核糖体的两个亚基结合中 rRNA

起着重要的作用, 18S rRNA 的中央结构域与亚基的结合关系密切, 28S rRNA 的 I 和 V 结构域也与亚基结合有关^[6]。b. rRNA 与 mRNA 的相互作用, 对于大肠杆菌 16S rRNA 的功能研究得最清楚的就是它对翻译起始密码子的识别。它是通过 mRNA 的 SD 序列与 16S rRNA 的 3' 端的 SD 互补序列的相互作用来实现的。目前, 真核细胞 mRNA 与 rRNA 的相互作用

* 国家自然科学基金 (39230080) 和中国科学院上海生命科学研究中心基金 (9511) 资助项目。

¹⁾ 通讯联系人。

收稿日期: 1996-07-15, 修回日期: 1996-11-07

机理尚不清楚. c. rRNA 与 tRNA 的相互作用, 我们可以把核糖体看成一个多肽合成的复杂酶体系, 其底物便是氨酰 tRNA. 核糖体 RNA 与氨酰 tRNA 的结合与解码过程, 也就是核糖体对底物识别和结合; 肽键的形成与肽酰 tRNA 转位也都是核糖体催化的结果. 所以, 了解核糖体这两个过程的机理是揭开蛋白质生物合成之谜的关键. rRNA 与 tRNA 的相互作用与解码密切相关, 大量的研究表明 rRNA 中某些保守的碱基是核糖体解码的关键区域^[7]. d. 不论是在真核或原核生物的核糖体中, GTPase 活性、肽基转移酶的功能都与 rRNA 密切相关, 现在有证据表明 rRNA 的 III 结构域与 GTPase 活性密切相关^[8,9]. 核糖体 RNA 中“R/S 结构域”的发现使我们认识到 rRNA 在蛋白质合成中的重要性. 核糖体失活蛋白只要修饰 28S rRNA 的“R/S 结构域”中的一个核苷酸或切断一个磷酸二酯键就会使核糖体合成蛋白质的能力受到极大的抑制. 这充分说明了 rRNA 在蛋白质合成的重要性.

研究 rRNA 结构与功能的关系是目前核糖体结构与功能研究中最受重视的工作. 目前主要的研究方法是用化学试剂或酶作为探针研究 rRNA 的局部结构, 通过计算机预测 rRNA 的二级结构. 由于目前使用的方法的限制, rRNA 的结构研究面临困难. 原子力显微镜 (atomic force microscope, AFM) 是新近发展起来的一种高分辨率显微镜, AFM 被用来观测了多种核酸结构, 如超螺旋、环状、线状 DNA^[10,11]. 它在研究核酸方面的广泛应用显示了它在研究核酸结构上的潜力. 本研究的目的尝试用 AFM 来研究 rRNA 的高级结构.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物: 成年雄性大鼠每只 150 g 左右, 由上海实验动物中心提供.

1.1.2 试剂: 嘌呤霉素购自 Sigma 公司; 其他化学试剂均属市场购得分析纯试剂. 云母片从 Unimica 获得, 实验前自己撕揭. 缓冲溶液

A: 20 mmol/L Tris-HCl, 400 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl₂, 20 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 巯基乙醇, pH 7.6.

1.2 方法

1.2.1 AFM 样品的制备: 鼠肝 80S 核糖体的制备是根据 Spedding 等^[12]的方法. 所有的核糖体制品在缓冲溶液 A 中 -80℃ 下保存.

80S 核糖体的悬浮液 (100 A₂₆₀ 单位/ml) 用缓冲溶液 A 稀释成浓度为 0.01 ~ 0.1 A₂₆₀ 单位/ml. 然后在 -20℃ 下冻结 30 min, 再取出在 4℃ 下缓慢解冻, 重复进行 3 次. 将一滴反复冻融后的溶液 (约 5 μl) 滴在刚揭开的云母片上, 用一小片封口膜 (parafilm) 将溶液展开, 然后用一束消毒的重蒸水冲洗云母表面, 再用一片滤纸将多余的水吸干. 在超净台上用空气流吹 10 min. 然后马上用 AFM 观测样品 (环境相对湿度 40% ~ 50%, 室温).

1.2.2 原子力显微镜: 用最新发展的原子力显微镜轻敲模式进行样品的观测. 在轻敲模式的工作状态下, 针尖以几百 kHz 高频率振动, 而针尖在样品上扫描速度较慢 (1 s 扫一行, 整幅图象需扫 4 min 左右). 这样当针尖在样品上扫描时就不会引起样品漂移和损伤. 用这种工作模式, 样品不必进行干燥及特殊处理, 而且使成像效率大大提高. 我们实验中所用的设备是 Nanoscope III [Digital Instrument (DI), Santa Barbara, CA]. 所用针尖是购自 [Digital Instrument (DI), Santa Barbara, CA]. 悬臂长度 125 μm, 振动频率为 300 kHz.

2 结果与讨论

我们用 AFM 得到了游离 rRNA 的三维结构图象. 这些图象在 AFM 轻敲模型下扫描 30 min 仍然未见变化. 图象的尺度测量用 Nanoscope III 的截面分析软件.

图 1 所示是用苯酚抽提方法制备的 rRNA 的 AFM 图象. 用苯酚抽提方法制备的 rRNA, 即使是用很低浓度的溶液制样, rRNAs 也很容易在云母表面发生聚集, 形成无序的网状结构. 这可能是在制备 rRNA 的过程中, 反复抽

提使得 rRNA 的结构破坏, 在溶液中, 松散的 rRNA 分子间易缠绕形成无序的结构. 只有使用变性剂处理和高温加热的方法才能将它们分

开, 但它们的高级结构也就被破坏, 所以以前的研究方法不能直接得到 rRNA 的高级结构信息. 我们将核糖体稀释到很低的浓度,

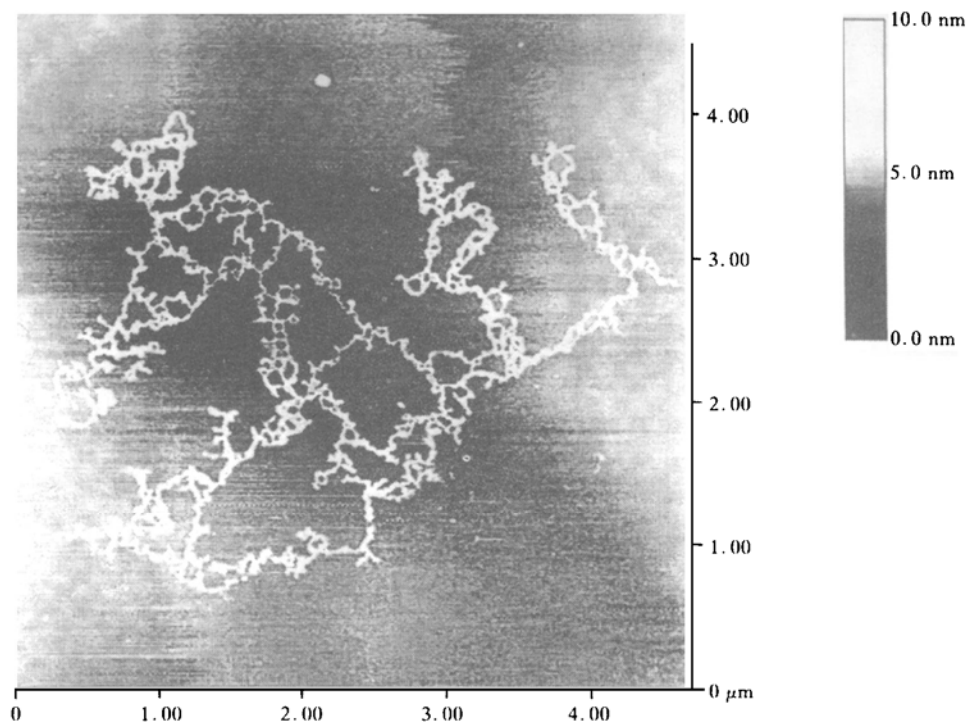


图 1 经苯酚-SDS 抽提的 rRNA 的 AFM 图象

图右边的黑白色带表示 Z 坐标 (高度) 的值, 最高处为 10 nm.

再用反复冻融的方法将核糖体逐渐瓦解. 然后将 rRNA 铺在云母表面, 用 AFM 观察得到了

大量分散良好的 rRNA 的 AFM 图象.

图 2 所示是核糖体在反复融冻瓦解后, rRNA 在云母表面的概貌图. AFM 图象中 rRNA 的链宽主要是由于 AFM 针尖的卷积效应所致. 根据图中所示的 rRNA 的形状及多种结构参数比较, rRNA 可分为三类, 且三种大小不同的 rRNA 的分子数量大致相当.

2.1 28S 和 5.8S rRNA

真核生物的 28S 与 5.8S rRNA 之间有 40 多个碱基能形成配对, 一般的处理不易将它们分开. 大鼠肝 28S rRNA 为含有约 4 800 核苷酸的单链 RNA. 按 A 型 RNA 计算 28S rRNA 在充分伸展时的长度应为 1 300 nm 左右. 图 3 中 rRNA 的形状呈多分支的棒状结构, 分子主干的长度 380 nm. 其形状和结构参数与用计算机推测方法所得到的 28S-5.8S rRNA 的结构

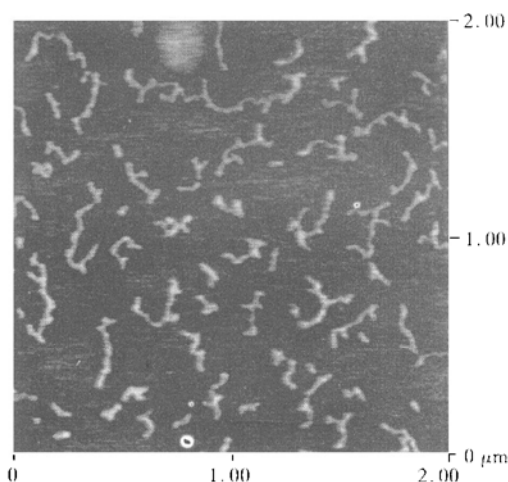


图 2 用反复冻融法制备的 rRNAs 的 AFM 概貌图

模型相似^[3]. 图 3 中的 rRNA 的表观宽度为 18~ 36nm, 链的高度为 1.0~ 2.4nm. 而双



图 3 单个 28S 5.8S rRNA 的 AFM 图象
扫描范围为 340 nm.

链的核酸链无论是 DNA 还是 RNA 在 AFM 图象中一般的表观高度为 0.6~ 1.2, 表观宽度为 12~ 20 nm. 这些数据表明部分 rRNA 形成了二级结构后进一步形成了高级结构, 这与它们的表观长度减少约两倍是相符合的.

2.2 18S rRNA

大鼠肝 18S rRNA 是含有近1 900核苷酸

的单链 RNA. 按 A 型 RNA 计算, 18S rRNA 在充分伸展时的长度应为 530 nm. 图 4 为 rRNA 的呈“十”形的结构. 分子主干的长度 200 nm 左右, 在主干上有分支. 其形状和结构参数与理论预测的 18S rRNA 的二级结构十分相似^[3]. 图 4 的 rRNA 的表观宽度为 18~ 22 nm, 链的高度为 1.0~ 2 nm. 这些数据表明有一部分 rRNA 在形成二级结构后进一步形成了高级结构, 这与它们的表观长度减少约 1.5 倍是相符合的.

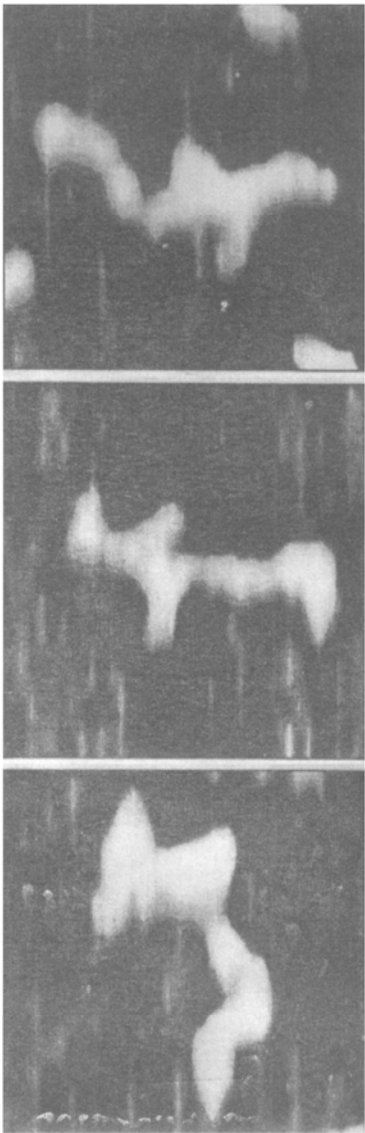


图 4 单个 18S rRNA 的 AFM 图象
扫描范围为 220 nm.

2.3 5S rRNA

大鼠肝 5S rRNA 为含有 120 核苷酸的单链 RNA, 被普遍接受的 5S rRNA 的二级结构模型为“Y”型结构. 图 5 为 5S rRNA 的 AFM 图象, 我们发现这一类 rRNA 分子形状呈“Y”型. 这些“Y”形的分子大小经过估算与 5S rRNA 的大小相当. 与其他生化方法和理论推测的 5S rRNA 结构基本符合.

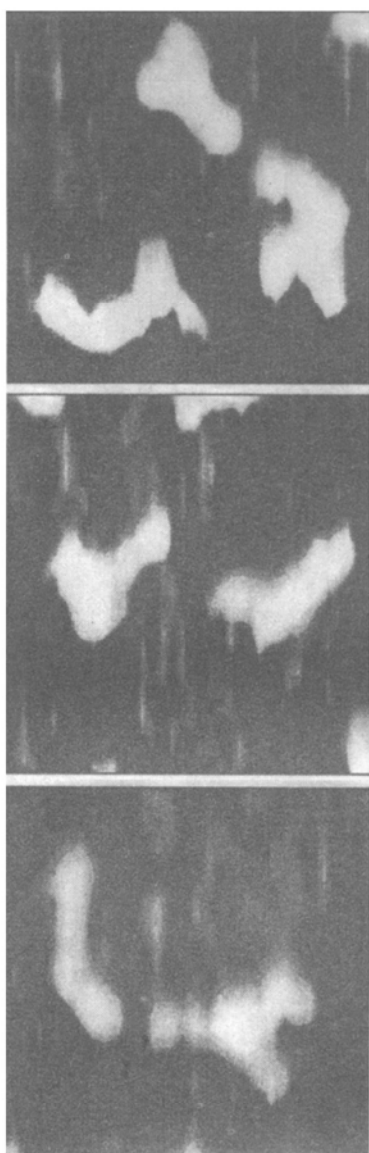


图 5 单个 5S rRNA 的 AFM 图象
扫描范围为 200 nm.

由于 rRNA 是单链 RNA, 分子结构又不

稳定. 用苯酚抽提的方法得到的 RNA 在云母上极易缠绕在一起形成无序的网状结构. 我们建立的方法不需对 rRNA 作特殊处理就可使 rRNA 在云母上分散良好, 能得到 rRNA 的高级结构的信息. 从 AFM 的图象来分析 rRNA 的二级甚至高级结构, 可以了解 rRNA 在较接近生理状态下的结构信息. 尽管 AFM 所得到的结果与理论预测的 rRNA 的二级结构比较符合, 但由于 rRNA 的结构十分复杂; 而我们所得到的 rRNA 未经严格去除蛋白的步骤, 因此 rRNA 上可能还结合有核糖体蛋白. 另一方面目前 rRNA 的 AFM 图象的分辨率还不能分辨出更为细致的结构. 还值得进一步提高 AFM 的分辨率. 但本研究的结果对基于热力学所推测的 rRNA 二级结构结果提供了有力支持, 同时为尽快全面地阐明 rRNA 的结构开辟了新的研究途径.

参 考 文 献

- 1 Noller H F, Woese C R. Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science*, 1981, **212** (4493): 403~ 411
- 2 Woese C R. Just to stories and rube goldberg machines: speculations on the origin of the protein synthetic machinery. In: Chambliss G ed. *Ribosomes*. Baltimore: University Park Press, 1980. 357~ 373
- 3 Chan Y L, Gutell R, Noller H F *et al.* The nucleotide sequence of a rat 18S ribosomal ribonucleic acid gene and a proposal for the secondary structure of 18S ribosomal ribonucleic acid. *J Biol Chem*, 1984, **259** (1): 224~ 230
- 4 Chan Y L, Olvera J, Wool I G. The structure of rat 28S ribosomal ribonucleic acid inferred from the sequence of nucleotides in a gene. *Nucleic Acids Res*, 1983, **11** (22): 7819~ 7831
- 5 Hadjiolov A A, Georgiev O I, Nosikov V V *et al.* Primary and secondary structure of rat 28S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 1984, **12** (8): 3677~ 3693
- 6 Holmberg L, Melander Y, Nygard O. Probing the conformational changes in 5.8S, 18S and 28S rRNA upon association of derived subunits into complete 80S ribosome. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**: 2776
- 7 Noller H F. tRNA-rRNA interactions and peptidyl transferase. *FASEB J*, 1993, **7** (1): 87~ 89
- 8 Steiner G, Kuechler E, Barta A. Photoaffinity labelling of the peptidyl transferase centre reveals two different position for the A- and P-sites in domain V of 23S rRNA. *EMBO J*, 1988, **7** (12): 3949~ 3955
- 9 Marconi R T, Hill W E. Evidence for a tRNA/rRNA interaction site within the peptidyl transferase center of the *Escherichia Coli* ribosome. *Biochemistry*, 1989, **28** (2):

893~ 899

10 Hansma H G, Hoh J H. Biomolecular imaging with the atomic force microscope. *Ann Rev Biophys Biomol Struct*, 1994, **23**: 115~ 139

11 Bustamante C, Erie D A, Keller D. Biochemical and structural applications of scanning force microscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 1994, **4** (5): 750~ 760

12 Spedding G, Chapter 1. Isolation and analysis of ribosomes from prokaryotes, eukaryotes, and organelles. In: Spedding G ed. *Ribosomes and protein synthesis: a practical approach*. Oxford: IRL press, 1990. 1~ 29

Secondary Structure of Rat Ribosomal RNAs Studied by Atomic Force Microscope. WU Xiaohua, LIU Wangyi (*Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*); XU Lei, LI Minqian (*Shanghai Institute of Nuclear Research, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China*).

Abstract Rat liver ribosomal RNAs on surfaces of mica were imaged by atomic force microscope

(AFM) under ambient condition. A number of images of 28S-5.8S、18S、5S rRNAs were obtained directly. The rRNAs were prepared by thawing the solution of low concentration of ribosomes repeatedly to crumble the ribosomes. The rRNAs were scattered on surface of mica very well. The rRNAs prepared by this method were always in three forms when they were scattered on surface of mica. The structures of the three forms of rRNAs were consistent with the established models by computer for 28S-5.8S、18S、5S rRNAs respectively. The result supports the models of the secondary structures of rRNAs considered by the thermodynamic principle. It is demonstrated that AFM could provide valuable three-dimensional information of rRNAs.

Key words ribosomal RNA, secondary structure, atomic force microscope

藻胆蛋白复合物的合成及其分子内能量传递*

赵继全 赵井泉 杨紫萱 张建平 蒋丽金¹⁾

(中国科学院感光化学研究所, 北京 100101)

摘要 通过偶联剂 3- (2-吡啶联巯基) 丙酸 N-羧基琥珀亚胺酯 (SPDP) 及改变配料比, 合成了两个 R-藻红蛋白 (R-PE) 与 C-藻蓝蛋白 (C-PC) 的复合物 A 和 B. 利用吸收光谱确定了分子内 R-PE 与 C-PC 的摩尔比为 6: 1 和 2: 1. 通过荧光光谱, 观察到能量传递现象, 并计算出能量传递效率为 63% 和 88%. 证明分子内能量传递效率很高. 二硫苏糖醇 (DTT) 还原连接 R-PE 与 C-PC 的二硫桥键后, 能量传递被阻断. 这一现象进一步证明复合物中存在分子内能量传递.

关键词 藻胆蛋白, 藻红蛋白, 藻蓝蛋白, 能量传递, 蛋白复合物

藻胆蛋白是一组同源捕光色素蛋白, 它们都带有开链的四吡咯环. 它们是红藻和蓝藻的主要捕光组分, 在活体中构成藻胆体连结在光合作用膜上, 并将吸收的光能传递至 PS II 反应中心^[1]. 通常条件下存在以下几种不同光谱特征的藻胆蛋白: 藻红蛋白 ($\lambda_{\max}$ =

565 nm), 藻蓝蛋白 ($\lambda_{\max}$ = 620 nm)、变藻蓝蛋白 ($\lambda_{\max}$ = 650 nm). 能量传递由藻红蛋白 → 藻蓝蛋白 → 变藻蓝蛋白 → 反应中心. 这些藻

* 国家自然科学基金资助 (39670065).
¹⁾ 通讯联系人.
收稿日期: 1996-07-16, 修回日期: 1996-10-15