

研究快报

天花粉蛋白在真核细胞核糖体 28S RNA 上的作用位点*

张劲松 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

关键词 天花粉蛋白, RNA N-糖苷酶, RNA 序列分析

天花粉蛋白(trichosanthin)是一种核糖体失活蛋白^[1]。在临床上用于妊娠引产,近来发现它还具有抗艾滋病病毒(HIV)的功能。我们在前文^[2]中报告,从经过天花粉蛋白处理的大鼠肝核糖体抽得的 rRNA,再用苯胺作用,经凝胶电泳分离出一条约 500 核苷酸长的条带,该条带的位置与蓖麻毒蛋白 A 链处理核糖体产生的条带相同,从而证明天花粉蛋白的作用机制和蓖麻毒蛋白 A 链一样,属于 RNA N-糖苷酶型。本文进一步报告另外四个证据证明天花粉蛋白和蓖麻毒蛋白 A 链在真核细胞核糖体上具有相同的作用位点,即 28S rRNA 第 4324 位腺苷酸的 N-C 糖苷键,并以水解方式释放一个腺嘌呤碱基。这些结果在国内外尚无报道。

(1) 通过 RNA 序列分析确定作用位点。分别用天花粉蛋白和蓖麻毒蛋白 A 链处理大鼠肝核糖体,酚/SDS 法抽提 rRNA,苯胺处理 rRNA,5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化苯胺作用后产生的约 500 核苷酸长的片段。用 [γ -³²P]-ATP 和 T4 多核苷酸激酶标记该片段的 5' 端,酶法测定其 5' 端的核苷酸序列。结果表明天花粉蛋白和蓖麻毒蛋白 A 链产生的这一片段具有相同的 5' 端序列。而蓖麻毒蛋白 A 链的作用位点及大鼠肝 28S rRNA 的序列都是已知的,从而证明天花粉蛋白作用于 28S rRNA 第 4324 位腺苷酸的 N-C 糖苷键。

(2) 我们定量鉴定了天花粉蛋白处理核糖体所释放的腺嘌呤碱基。天花粉蛋白处理大鼠肝核糖体后加入 1 倍体积的酒精沉淀大分子物质,用离子交换柱层析分离上清液中的碱基,再

用硅胶薄板层析分析,结果表明天花粉蛋白处理的样品中含有腺嘌呤碱基。为了定量测定腺嘌呤碱基,用双波长扫描仪对腺嘌呤斑点进行光密度扫描,并以 [8-³H]-腺嘌呤作为内标准物质计算腺嘌呤的回收率,结果表明天花粉蛋白从 1 mol 核糖体中释放 1 mol 腺嘌呤碱基。

(3) 在 [³²P]-KH₂PO₄ 存在的情况下用天花粉蛋白处理核糖体的结果表明,28S rRNA 中没有磷酸的参入,证明天花粉蛋白是通过水解而不是磷酸解方式作用于 N-C 糖苷键的。

(4) 我们实验室在建立测定 RNA N-糖苷酶活力新方法的过程中,成功地用 [³H]-NaBH₄ 和 [³H]-丙氨酸对天花粉蛋白作用大鼠肝核糖体后抽提的 rRNA 进行了标记^[3]。这一结果证明天花粉蛋白除去 28S rRNA 第 4324 位的腺嘌呤碱基后,在核糖的 C₁ 位上出现了一个醛基,也说明天花粉蛋白的作用方式是水解而不是磷酸解。

用不同量的天花粉蛋白处理大鼠核糖体的结果表明,天花粉蛋白的糖苷酶活力大约比蓖麻毒蛋白 A 链低 10 倍。

参 考 文 献

- 1 董稿,刘望夷. 细胞生物学杂志, 1990;12:58
- 2 张劲松,刘望夷. 生物化学和生物物理进展, 1991; 18: 51
- 3 王喜萍,刘望夷,王鸣岐. 生物化学和生物物理进展, 1990; 17:461

* 中国科学院重大课题资助项目。

收稿日期: 1991-10-31