

ties of B-type, L-type and T-type Ca^{2+} channels were recorded on cultured ventricular myocytes of neonatal Wistar rats by cell-attached patch clamp technique. T-2 toxin at dose of 10 mg/L significantly inhibited the activities of the three types of Ca^{2+} channels. The open time of Ca^{2+} channels was shortened and the open-state probability was decreased, whereas there were no significant variations in the amplitude of

ionic current flowing through the Ca^{2+} channels. Compared with verapamil and Bay K 8644, the effects of T-2 toxin on the Ca^{2+} channels were similar to the blockade effect of verapamil. It was suggested that the cytotoxic action of T-2 toxin may be due to the damages of cell membrane.

Key words fusarium toxin, T-2 toxin, cardiac cell, calcium channel, patch clamp technique

RNA 二级结构预测系统构建

李伍举 吴加金

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 运用下列 RNA 二级结构预测算法: 碱基最大配对方法、Zuker 极小化自由能方法、螺旋区最优堆积、螺旋区随机堆积和所有可能组合方法与基于一级螺旋区的 RNA 二级结构绘图技术, 构建了 RNA 二级结构预测系统 Rnafold. 另外, 通过随机选取 20 个 tRNA 序列, 从自由能和三叶草结构两个方面比较了前 4 种二级结构预测算法, 并运用 t 检验方法分析了自由能的统计学差别. 从三叶草结构来看, 以随机堆积方法最好, 其次是螺旋区最优堆积方法和 Zuker 算法, 以碱基最大配对方法最差. 最后, 分析了两种极小化自由能方法之间的差别.

关键词 RNA 二级结构, 预测, 比较

RNA (指 tRNA, rRNA, mRNA 和 SnRNA) 功能与其结构密切相关, 特别是, 目前已有大量证据表明: RNA 二级结构, 尤其是 SD 序列附近的二级结构与外源基因在原核系统中的表达水平有密切关系^[1], 因此研究 RNA 结构, 对理解 RNA 功能, 原核基因工程和与 RNA 有关的生命现象有着重要意义. 但是, RNA 分子具有降解快, 晶体难于获得等特点, 故需要发展 RNA 结构首先是二级结构的计算机预测.

目前, 也有一些 RNA 二级结构预测程序, 如 Pcgene 中的二级结构预测模块, Pcfold 预测系统等, 但这些程序预测方法单一, 都是基于 Zuker 算法^[2], 而且与绘图系统分开, 因此, 我们研制了 RNA 二级结构预测系统

Rnafold, 与 Pcgene, Pcfold 相比, 集多种预测算法与绘图技术于一体, 可接受多种序列输入方式. 另外, 还用统计学方法分析了这些算法之间的关系, 这不仅有助于分子生物学家选择恰当的方法来研究 RNA 的结构功能关系, 也对新算法的优劣提供了评价方法.

1 材料与方法

1.1 材料

所有数据均取自 EMBL 核酸序列库, 序列名称为 EMBL 代码, Salzer 与 Turner 自由能数据取自文献 [3]. 用 SAS 软件包^[4]作统计分析.

1.2 方法

本文用到的 RNA 二级结构预测方法与绘图技术, 简述如下:

1.2.1 Nussinov 的碱基最大配对算法^[5]: 设 $M(i, j)$ 表示子序列 S_{ij} 上的最大匹配碱基数, 其数值通过下列迭代公式求得:

$$M(i, j) = \begin{cases} M(i, k-1) + M(k+1, j-1) + 1 \\ (1 \text{ 表示 } j \text{ 与 } k \text{ 配对}) \\ M(i, j-1) \quad i \leq k < j \end{cases} \quad (1)$$

当 $M(i, j) \neq M(i, j-1)$ 时, $M(j, i) = K$, 当 $M(i, j) = M(i, j-1)$ 时, $M(j, i) = 0$, 由此, 可根据 M 的左下角信息回追二级结构, 整个过程只需一个矩阵.

1.2.2 Zuker 的极小自由能 RNA 二级结构预测^[2]: 设 $W(i, j)$ 为子序列 S_{ij} 形成的二级结构最小自由能, 此时不论 i 与 j 配对与否, $V(i, j)$ 是当 i 与 j 配对时 S_{ij} 形成的二级结构最小自由能. 整个算法分两步, 首先通过迭代法求矩阵 W 与 V , 然后运用递归法求二级结构.

$W(i, j), V(i, j)$ 求法如下:

当 $j-i=4$ 时, $W(i, j), V(i, j)$ 赋初值;

当 $j-i>4$ 时, 若 i 与 j 不配对, $V(i, j)$ 赋较大初值 (如 1000), 当 i 与 j 配对时, 计算下列各值:

$$E1 = FH(i, j) \quad (2)$$

$$E2 = \min\{E(FL(i, j, i', j')) + V(i', j')\} \\ i < i' < j' < j \quad (3)$$

$$E3 = \min\{W(i+1, i') + W(i'+1, j-1)\} \\ i+1 < i' < j-2 \quad (4)$$

$$V(i, j) = \min\{E1, E2, E3\} \quad (5)$$

不论 i 与 j 配对与否, $W(i, j)$ 求法如下:

$$E4 = \min\{W(i, i') + W(i'+1, j)\} \\ i < i' < j-1 \quad (6)$$

$$W(i, j) = \min\{W(i+1, j), W(i, j-1), V(i, j), E4\} \quad (7)$$

然后反复增加 $j-i$ 值, 直到最后 $i=1$,

j = 序列长度, 便获得了填充的矩阵 V 与 W , 紧接着就进行回追, 在回追过程中, 矩阵 W 与 V 都要用到, 基于矩阵 W , 寻找多分枝环, 基于矩阵 V , 寻找分枝环的结构.

1.2.3 螺旋区组合类算法: 主要分两步, 首先找出所有可能的螺旋区, 主要方法有: 矩阵法^[6]、卷积法^[7]和定义法^[8], 其次, 对螺旋区进行组合, 以确立 RNA 二级结构. 螺旋区所有可能组合方法 (Pipas 算法) 就是从所有可能的相容性集合中, 找出最低自由能结构, 此法速度很慢, 为 2^N 量级, 而螺旋区最优堆积与随机堆积方法速度很快, 堆积原理为: 只需考虑螺旋区与当前结构之间的拓扑关系, 要求加进新螺旋区时, 必须使整体自由能降低; 但随机堆积方法克服了螺旋区排列对结构的影响, 通过反复堆积, 从而找出主导结构.

1.2.4 基于一级螺旋区的 RNA 二级结构绘图: 设 $H_k (S_k, E_k, L_k) (k=1, 2 \cdots n)$ 为区间 $[i, j] (1 \leq i < j \leq N)$ 上的 n 个螺旋区, 若这些螺旋区满足下列关系:

$$i \leq S_1 < E_1 < S_2 < E_2 \cdots < S_k < E_k < \cdots < S_n < E_n \leq j \quad (8)$$

则称这 n 个螺旋区为区间 $[i, j]$ 上的一级螺旋区. 根据 $[i, j]$ 上一级螺旋区数目和碱基 i 与 j 之间配对情况, 就可查明 $[i, j]$ 上一级子结构特点, 从而进行绘图与自由能计算. 详细情况见文献 [8].

2 RNA 二级结构预测系统构建与运行

基于上述方法, 采用 Turbo Pascal 6.0 程序设计语言, 设计了 RNA 二级结构预测系统 Rnafold, 主要模块见图 1, 系统运行时所需信息为: RNA 一级结构和能量积分系统, 输出形式有: 螺旋区列表, 圆形表示, 半圆形表示, 点阵表示和基于正多边形的字符, 线条或字符线条表示等. 利用该系统, 研究了许多序列的二级结构, 如图 2 为 Rnafold 系统中随机堆积模块预测出的酵母苯丙氨酸-tRNA 主导结构的二级结构图.

3.2 4种方法的比较

运用随机选取的 20 个 tRNA 序列作为样本, 分别用碱基最大配对方法、Zuker 算法、螺旋区最优堆积和随机堆积方法这 4 种方法预测结构, 其自由能和三叶草结构数目见表 1, 通过配对资料 t 检验分析, 结果表明 (在 0.01 水平上): 在 Salzer 或 Turner 积分系统下, 碱基最大配对方法与其余方法均存在统计学差别; 而在 Salzer 积分系统下, 后 3 种算法之间无统计学差别; 在 Turner 积分系统下, Zuker 极小化自由能方法与螺旋区最优堆积和随机堆积方法存在统计学差别, 而螺旋区最优堆积与随机方法无统计学差别。另外, 从三叶草结构数目可以看出, 以随机堆积方法最好, 其次是螺旋区最优堆积方法和 Zuker 算法, 以碱基最大配对方法最差。

3.3 两种最低自由能预测方法比较

Zuker 算法与 Pipas 算法均可用来求最小自由能结构, 但 Pipas 算法的运行速度很慢, 故未参与上述 4 种方法比较。在 Rnafold 系统调试过程中, 我们发现在多数情况下, 采用 Salzer 或 Turner 积分系统都给出等价的结果, 但确实有一些例外, 导致两种算法给出的结果并不一致, 究其原因, 主要有两个, 一个出现在 Pipas 算法中的螺旋区列表上, 为了增加算法的速度, 一般只考虑全长的螺旋区, 而对螺旋区内部的子螺旋区不予考虑, 从表 1 中删除, 而事实上, 在一些特殊情况下, 某些子螺旋区是可以加入到最低自由能结构中。另外, Zuker 算法是以单点匹配为基础, 而在求出的二级结构中必须将之过滤掉。因此, 在实际应用中, 若要求最小自由能结构, 对于较短的序列, 要用此两种方法分别来求, 从中取出较低的自由能结构, 而对于较长的序列 (70 bp 以上), 只有使用 Zuker 算法或随机堆积方法, 因为 Pipas 算法实在是太慢了。

总之, 通过 20 个 tRNA 序列比较分析, 结果表明: Rnafold 系统设计合理, 运行结果可靠。但是, 必须指出: 本文的统计学结果是对 tRNA 这样长度的序列, 随着序列长度的增

加, 结论可能会有变化。目前, 我们以之为基础来研究原核系统中外源基因二级结构与表达水平之间关系, 并取得了初步结果。

参 考 文 献

- 1 Maarten H D S, Duin J V. Prog Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 7668
- 2 Zuker M. Nucl Acids Res, 1981; 9: 133
- 3 Zuker M. Meth Enzymol, 1989; 180: 262
- 4 胡良平, 周士波. 医学统计学与 SAS 应用技巧. 北京: 中国科学技术出版社, 1991: 31~35
- 5 Nussinov R, Jacobson A B. Prog Natl Acad Sci USA, 1980; 77: 6309
- 6 Pipas J M, McMahon J E. Prog Natl Acad Sci USA, 1975; 72: 2017
- 7 Benedetti G, Santis P D, Morosetti S. Nucl Acids Res, 1989; 17: 5149
- 8 李伍举, 吴加金. 军事医学科学院院刊, 1995; 19 (4): 293
- 9 Macdonell M T, Colwell R R. J Microbiol Methods, 1984; 3: 33

The Construction of RNA Secondary Structure Prediction System. Li Wuju, Wu Jiajin (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract The following algorithms of RNA secondary structure prediction: the maximum base pairing, Zuker's minimum free energy, the optimal stacking of helical regions, the random stacking of helical regions and all possible combinations and the RNA secondary structure drawing based on primary helical regions have been used to construct RNA secondary structure prediction system named Rnafold. In addition, the former four methods are compared through 20 tRNA sequences in the two aspects of free energy and cloverleaf structure. The statistical difference of free energy was analysed by t -test. From the point of view of cloveleaf structure, the method of random stacking is the best, the second are the optimal stacking and Zuker's algo-

rithms and the worst is the maximum base pairing. Finally, the difference between two methods of minimum free energy was analysed.

Key words RNA secondary structure, prediction, comparison

单链核糖体失活蛋白的核糖核酸酶活性*

陈红 华陵 王悦 赵晁 颜茂恭 董贻诚

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

余明琨 姚启智

(中国科学技术大学研究生院, 北京 100039)

摘要 以芹菜 4.5 S RNA 为底物, 在 pH5.0 的条件下, 5 种纯核糖体失活蛋白: 天花粉蛋白、苦瓜子蛋白、肥皂草蛋白、丝瓜素毒蛋白和多花白树毒蛋白均显示出核糖核酸酶活性, 放射自显影图显示出它们对 RNA 分子中的各种碱基具有不同的敏感性。

关键词 核糖体失活蛋白, 核糖核酸酶活性, 天花粉蛋白

天花粉蛋白属于核糖体失活蛋白, 在中国作为抗早孕药物已在临床使用多年^[1]. 由于天花粉蛋白能抑制 HIV-1 病毒在受感染的巨噬细胞和 T 淋巴细胞内的复制, 在美国作为艾滋病的治疗药物已进入临床试验阶段^[2,3]. 天花粉蛋白在体外还有广谱的抗病毒作用^[4]. 由于核糖体失活蛋白具有广泛的应用前景, 引起了人们的极大兴趣, 不断出现有关这类蛋白的一些新性能的报告. 1991 年 Li 等^[5]报道在常规酶切反应条件下, 天花粉蛋白 (trichosanthin) 能够使超螺旋双链 DNA 解旋并断裂为缺口环状和线状 DNA, 1992 年刘望夷等^[6]报道樟树毒蛋白 (cinnamomin 及 camphorin) 也有此切割 DNA 的活性. 我们对天花粉蛋白的结构与功能的深入研究过程中, 也发现了这一类核糖体失活蛋白还具有一些新的性能. 当它们与 5'-AMP 作用时, 可生成腺苷及腺嘌呤两种产物, 即表现出磷酸酯酶及糖苷酶两种活性^[7]. 本文主要报道天花粉蛋白及其他核糖体失活蛋白的核糖核酸酶活性的实验结果.

1 材料和方法

1.1 核糖体失活蛋白

自制天花粉蛋白 (trichosanthin, TCS) 自栝楼根中抽提, 经饱和硫酸铵沉淀, DEAE-Cellulose、CM-Sepharose Cl-6B 及 Sephacryl S 100 (HR) 柱分离后获得. M_r 为 27 000, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳纯.

商品结晶纯天花粉蛋白 (JS TCS) 购自上海金山药厂, 批号 8904, 9201, 900407, 9010.

苦瓜子蛋白 (momordin, α -momorcharin, α -MMC) 自苦瓜子内抽提, 方法同自制天花粉蛋白.

肥皂草蛋白 (saporin, Cat No. S 9896), 丝瓜素毒蛋白 (luffin, Cat No. L 7146) 和多花白树毒蛋白 (gelonin, Cat No. G 2394) 均为 Sigma 产品.

*国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1995-11-14, 修回日期: 1996-01-15