

经验, 在第一轮筛选时, 洗到每张膜的信号刚好接近背景信号时即应停止, 而在第二、三轮筛选时, 为了防止非特异性的结合, 洗膜的时间和次数要足够。

目前, 我们正在分析第7号阳性克隆的 cDNA 序列, 由于 HBsAg PIP 是一个未知的蛋白质, 下一步我们将进行蛋白质的表达和功能分析。

### 参 考 文 献

- 1 Draper D E. Protein-RNA recognition. *Annu Rev Biochem*, 1995, **64**: 593~ 620
- 2 Huang Z M, Zang W Q, Yen T S. Cellular proteins that bind to the Hepatitis B Virus posttranscriptional regulatory element. *Virology*, 1996, **217**: 573~ 581
- 3 Banerjee R, Echeverri A, Dasgupta A. Poliovirus encoded 2C polypeptide specifically binds to the 3'-terminal sequences of viral negative-strand RNA. *J Virol*, 1997, **71** (12): 9570~ 9578
- 4 Asundi V, Tyler B, Dreher K. Detection of large cDNA inserts within crude  $\lambda$ gt11 lysates: a rapid and sensitive method. *BioTechniques*, 1990, **9** (5): 578~ 580
- 5 Huang Z M, Yen T S. Hepatitis B Virus RNA element that facilitates accumulation of surface gene transcripts in the cytoplasm. *J Virol*, 1994, **68** (5): 3193~ 3199
- 6 Gagnol A, Jeang K T. Expression cloning of genes encoding RNA-binding proteins. *Methods in Molecular Genetics*, 1994, **4**: 18~ 28
- 7 Gagnol A, Buckler-white A, Berkhout B, *et al.* Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science*, 1991, **251** (5001): 1597~ 1600
- 8 Constantoulakis P, Campbell M, Felber B K, *et al.* Inhibition of Rev-mediated HIV-1 expression by an RNA binding protein encoded by the interferon-inducible 9~ 27 gene. *Science*, 1993, **259** (5009): 1314~ 1318
- 9 Johnston D St, Brown N H, Gall J G, *et al.* A conserved double-stranded RNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992,

**89** (22): 10979~ 10983

- 10 Wilson S A, Brown E C, Kingsman A J, *et al.* Trip: a novel double stranded RNA binding protein which interacts with the leucine rich repeat of flightless I. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (15): 3460~ 3467

**Isolation of Expression Clones of Genes Encoding HBsAg Posttranscriptional Regulatory Proteins with Northwestern Blot.** DENG Qing-Li, HUANG Zhi-Ming, SHAO Jing (*Medical Research Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China*); HUANG Zhi-Qing (*Laboratory of Gastroenterology, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China*).

**Abstract** Northwestern Blot has been used for isolation of cDNAs encoding proteins interacting with HBsAg posttranscriptional regulatory element (PRE). One expression cDNA clone which showed specially binding to PRE was isolated from  $\lambda$ gt11 cDNA expression library prepared with human hepatoma cell line HepG2. The size of this PRE-interacting protein (PIP) clone was identified to be about 1 kb by PCR and digestion with restriction endonuclease *EcoR* I. The results showed that Northwestern blot with some modifications is a useful method for isolation of expression clones of genes encoding RNA-binding proteins.

**Key words** Northwestern blot, hepatitis B virus surface antigen, posttranscriptional regulatory element, PRE-interacting proteins

## 利用 RNO 脱色反应检测类囊体中的单线态氧\*

徐志防<sup>1)</sup> 罗广华 王爱国 陈贻竹

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

**摘要** 光敏剂 RB 在光照射下与  $O_2$  反应产生  $^1O_2$ ,  $^1O_2$  与组氨酸或咪唑反应的中间产物使 RNO 发生氧化, 导致 RNO 在 440 nm 处吸光度减小, 此即为 RNO 脱色反应. RNO 脱色反应随着光照时间的增加而增大, 表明 RB 受

\* 国家自然科学基金 (39670072) 和广东省自然科学基金 (960471) 资助项目.

<sup>1)</sup> 通讯联系人. Tel: (020) 87705626-406; E-mail: xuzf@scib.ac.cn

收稿日期: 1998-12-21, 修回日期: 1999-04-20

光照后使 $^1\text{O}_2$ 增加;随着组氨酸或咪唑浓度的增加,RNO脱色反应增大;咪唑在RNO脱色反应中的作用更明显。 $^1\text{O}_2$ 淬灭剂 $\text{NaN}_3$ 或DABCO存在时,RNO脱色反应降低.利用RNO脱色反应检测到莴苣类囊体在强光照下产生的 $^1\text{O}_2$ ,随着光强和照射时间增加,类囊体中 $^1\text{O}_2$ 的产生增加.

**关键词** RNO脱色反应,单线态氧,类囊体

**学科分类号** Q946

在光合作用光抑制中,单线态氧( $^1\text{O}_2$ )是引起光合作用量子效率下降的重要原因.叶绿素吸收过量光能,受激发形成三线态叶绿素( $^3\text{P680}$ ), $^3\text{P680}$ 与基态氧反应产生 $^1\text{O}_2$ <sup>[1]</sup>.由于 $^1\text{O}_2$ 在水溶液中的寿命极短<sup>[2]</sup>,因此在实验室中检测 $^1\text{O}_2$ 是比较困难的.目前检测 $^1\text{O}_2$ 的方法主要是电子顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)技术和化学发光法<sup>[3~6]</sup>,但是这两种方法要求专门的检测仪器,普通实验室一般不具备这类价格昂贵的实验仪器,并且不常用于植物体内 $^1\text{O}_2$ 的检测.在此介绍一种较为简单的检测 $^1\text{O}_2$ 的方法<sup>[7~9]</sup>,只需常规的分光光度计就能完成 $^1\text{O}_2$ 的检测过程.此方法主要是利用光敏剂玫瑰红(rose bengal, RB)受光照产生 $^1\text{O}_2$ <sup>[9]</sup>:

$\text{RB} + h\nu \xrightarrow{\quad} ^1\text{RB} \rightarrow ^3\text{RB} + \text{O}_2 \xrightarrow{\quad} \text{RB} + ^1\text{O}_2$ ,  
 $^1\text{O}_2$ 与组氨酸(His)反应产生中间产物 $[\text{HisO}_2]$ ,  
 $[\text{HisO}_2]$ 与对亚硝基二甲基苯胺(*p*-nitrosodimethylaniline, RNO)反应:

$[\text{HisO}_2] + \text{RNO} \xrightarrow{\quad} \text{RNO}_2 + \text{产物}$ ,

利用分光光度计在440 nm处测RNO吸光度的减少,即检测RNO的脱色程度,间接地获知RB产生 $^1\text{O}_2$ 的相对产量. $^1\text{O}_2$ 本身并不与RNO直接发生反应,如果没有RNO, $[\text{HisO}_2]$ 将形成最终产物 $\text{HisO}_2$ :

$^1\text{O}_2 + \text{His} \xrightarrow{\quad} [\text{HisO}_2] \xrightarrow{\quad} \text{HisO}_2$ .

实验中用咪唑(imidazole)代替His,观察到更明显的RNO脱色反应,利用此方法成功地检测到在光照下莴苣类囊体中产生的 $^1\text{O}_2$ .

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

类囊体制备材料用田间新鲜采摘的莴苣(*Lactuca sativa* L.)叶片.所用化学试剂如下:RNO、咪唑、玫瑰红为Aldrich公司产品,1,4-二氮杂二环(2,2,2)辛烷(1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane, DABCO)为Sigma公司产品,组氨酸、 $\text{NaN}_3$ 等为国产化学试剂(分析纯).

### 1.2 实验仪器

高速冷冻离心机、751G分光光度计、恒温循环水浴、石英卤灯(50 W)、磁力搅拌器等.

### 1.3 实验方法

**1.3.1 RNO脱色反应:**用于RNO脱色反应的混合液含RNO 50  $\mu\text{mol/L}$ , RB 3  $\mu\text{mol/L}$ , His 10  $\text{mmol/L}$ 或咪唑 10  $\text{mmol/L}$ .将反应液置于10 ml试管中,在559 nm光下(通过光透射RB溶液获得)分别照射0、5、10、15、20 min,光强1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,然后利用分光光度计在440 nm处测反应液的吸光度 $A_{440}$ .RNO脱色程度以 $\Delta A_{440}$ 值表示,即用暗对照 $A_{440}$ 值减去反应液光照后的 $A_{440}$ 值.反应液 $A_{440}$ 值减小,则 $\Delta A_{440}$ 值增大,表明RNO脱色程度增加.

**1.3.2 不同浓度的His或咪唑对RNO脱色反应的影响:**改变反应液中底物His或咪唑的浓度,从0~0.01  $\text{mol/L}$ 变化.含不同浓度His或咪唑的反应液分为两组:一组在1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光强下照射5 min,另一组为暗对照.比较两组反应液 $A_{440}$ 值的变化,以底物His或咪唑浓度为横坐标作 $\Delta A_{440}$ 变化曲线图.

**1.3.3  $^1\text{O}_2$ 淬灭剂对RNO脱色反应的影响:**在RNO脱色反应液中分别加入不同浓度的 $^1\text{O}_2$ 淬灭剂 $\text{NaN}_3$ 和DABCO,浓度从0~0.1  $\text{mol/L}$ 变化.反应液分为两组:一组在1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光强下照射5 min,另一组为暗对照.比较两组反应液 $A_{440}$ 值的变化,以淬灭剂浓度为横坐标作 $\Delta A_{440}$ 变化曲线图.

### 1.4 类囊体分离制备

用莴苣叶片制备类囊体,制备方法参照文献[10].

### 1.5 类囊体中 $^1\text{O}_2$ 的检测

取1 ml悬浮的类囊体加到反应杯中,然后加入RNO和咪唑,反应液中RNO和咪唑浓度同方法1.3.1.另取1 ml悬浮的类囊体加入RNO,但不加咪唑.类囊体叶绿素含量通过Arnon方法测定.将这两组含类囊体的反应液在1500  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光强下分别照射2、4、6、8、

10 min 或在  $100\ 500\ 1\ 000\ 1\ 500\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  的光强下照射 10 min, 通恒温循环水保持反应液温度为  $25\ ^\circ\text{C}$ , 同时连续搅拌反应液. 反应完毕后将反应液离心 ( $2000\times g$ ) 20 min, 取上清液稀释后测  $A_{440}$  值, 比较两组类囊体反应液  $A_{440}$  值的变化, 计算出类囊体中  $^1\text{O}_2$  的产量和产率.

## 2 结果与讨论

### 2.1 RNO 脱色反应

RB 在光照下与  $\text{O}_2$  发生反应, 使  $\text{O}_2$  的电子自旋方向从平行转变为相反, 并且只占用一个轨道, 形成  $^1\text{O}_2$ .  $^1\text{O}_2$  与 His 或咪唑反应的中间产物使 RNO 氧化, 导致 RNO 的脱色. RB 受光照射时间越长,  $^1\text{O}_2$  产生越多, RNO 脱色程度越大, 表现为  $\Delta A_{440}$  随光照射时间增加而增大 (图 1). 比较 His 和咪唑在 RNO 脱色反应中的作用, 咪唑使 RNO 脱色程度更明显.

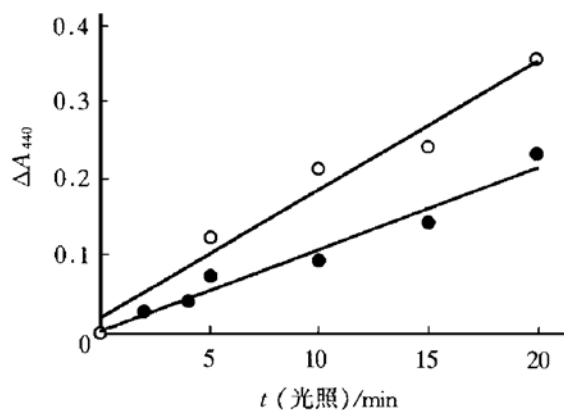


图 1 RNO 脱色反应

●—●: His + RNO + RB; ○—○: 咪唑 + RNO + RB.

### 2.2 不同浓度的 His 和咪唑对 RNO 脱色反应的影响

随着 His 或咪唑浓度的增加, RNO 被氧化的程度加大. 当 His 或咪唑浓度为  $0.01\ \text{mol/L}$  时,  $\Delta A_{440}$  明显增大, 而咪唑使 RNO 脱色反应更明显 (图 2).

### 2.3 $^1\text{O}_2$ 淬灭剂对 RNO 脱色反应的影响

为说明 RNO 的脱色反应是  $^1\text{O}_2$  引发的, 在反应液中加入  $^1\text{O}_2$  淬灭剂, 观察 RNO 脱色反应的变化.  $\text{NaN}_3$  和 DABCO 能淬灭  $^1\text{O}_2$ , 随着  $\text{NaN}_3$  和 DABCO 浓度的增加,  $\Delta A_{440}$  减小, 当  $\text{NaN}_3$  浓度为  $0.001\ \text{mol/L}$  时,  $\Delta A_{440}$  降到最小 (图 3), 在  $0.001\sim 0.1\ \text{mol/L}$  时,  $\Delta A_{440}$  却呈上升趋势, 这可能是由于  $\text{NaN}_3$  浓度过高影响了反应液中 RNO

在  $440\ \text{nm}$  的光吸收, 并不表明 RNO 被氧化的程度增加, 因为这样高浓度的淬灭剂存在时,  $^1\text{O}_2$  很快会被清除. DABCO 在  $0.001\sim 0.1\ \text{mol/L}$  时能有效地淬灭  $^1\text{O}_2$ , 使  $\Delta A_{440}$  明显减小.

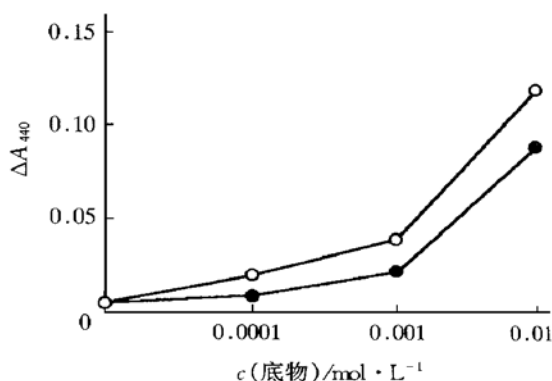


图 2 底物浓度对 RNO 脱色反应的影响

●—●: His + RNO + RB; ○—○: 咪唑 + RNO + RB.

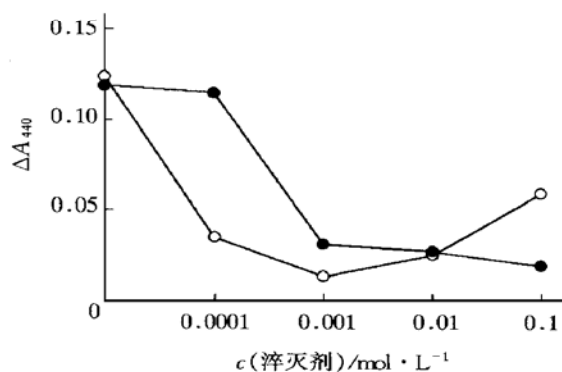


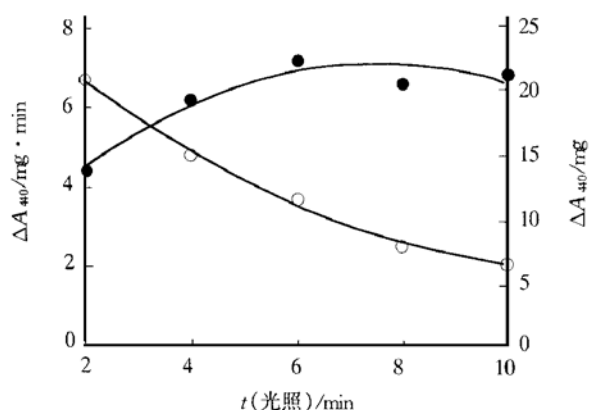
图 3  $^1\text{O}_2$  淬灭剂对 RNO 脱色反应的影响

○—○:  $\text{NaN}_3$ ; ●—●: DABCO.

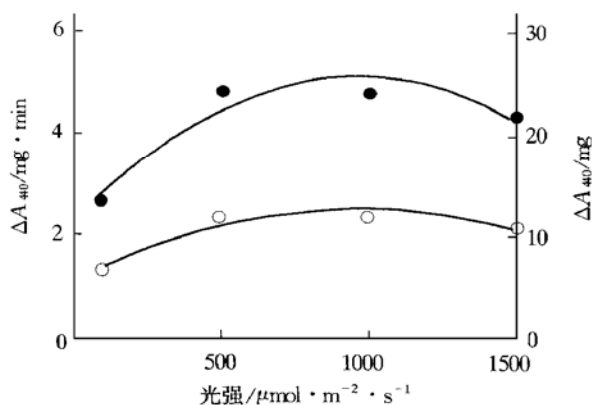
### 2.4 光照下类囊体中 $^1\text{O}_2$ 的产生

图 4 表明类囊体在强光下照射时间越长,  $^1\text{O}_2$  产生得越多, 但从一定时间内的  $^1\text{O}_2$  产率来看, 在光照射初期  $^1\text{O}_2$  产率最大, 以后逐渐降低, 这与用 EPR 检测光抑制类囊体中产生  $^1\text{O}_2$  的结果是一致的, 即光抑制发生初期  $^1\text{O}_2$  的产率明显增加<sup>[4]</sup>. 随着光强增加, 类囊体中  $^1\text{O}_2$  的产量和产率增加, 在光强为  $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  时达到较高水平 (图 5).

尽管目前还不能直接定量检测  $^1\text{O}_2$ , 但是通过 RNO 脱色反应, 能够较清楚地观察到光照下类囊体中  $^1\text{O}_2$  的产生, 同时计算出不同条件下  $^1\text{O}_2$  的相对产量. 由此看出 RNO 脱色反应是一种较适用于植物体内检测  $^1\text{O}_2$  有效而又灵敏的方法.

图4 强光下类囊体中 $^1\text{O}_2$ 的产生

○—○: 产率; ●—●: 产量.

图5 光强对类囊体中产生 $^1\text{O}_2$ 的影响

○—○: 产率; ●—●: 产量.

## 参 考 文 献

- 1 Schöner S, Krause G H. Protective systems against active oxygen species in spinach: response to cold acclimation in excess light. *Planta*, 1990, **180** (3): 383~ 389
- 2 Foote C S, Shook F C, Abakerli R B. Characterization of singlet oxygen. *Methods Enzymol*, 1984, **105**: 36~ 47
- 3 Lion Y, Delmelle M, van de Vorst A. New method of detecting singlet oxygen production. *Nature*, 1976, **263** (5576): 442~ 443
- 4 Hideg É, Spetea C, Vass I. Singlet oxygen production in thylakoid membranes during photoinhibition as detected by EPR spectroscopy. *Photosynth Res*, 1994, **39** (2): 191~ 199
- 5 Cadenas E, Sies H. Detecting singlet oxygen by low-level chemiluminescence. In: Greenwald R A ed. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, Florida: CRC Press,

1985. 191~ 195

- 6 Nakano M. Determination of superoxide radical and singlet oxygen based on chemiluminescence of luciferin analogs. *Methods Enzymol*, 1990, **186**: 585~ 591
- 7 Kraljic I, El Mohsni S. A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions. *Photochem Photobiol*, 1978, **28** (5): 577~ 581
- 8 Telfer A, Bishop S M, Phillips D, *et al.* Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. *J Biol Chem*, 1994, **269** (18): 13244~ 13253
- 9 Perez H D. Polymer-bound rose bengal as a singlet oxygen generating system. In: Greenwald R A ed. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1985. 111~ 113
- 10 Miyake C, Asada K. Ferredoxin-dependent photoreduction of the monodehydroascorbate radical in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiol*, 1994, **35** (4): 539~ 549

**Detection of Singlet Oxygen by the Bleaching of RNO in Thylakoids.** XU Zhi-Fang, LUO Guang-Hua, WANG Ai-Guo, CHEN Yi-Zhu ( *South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China* ).

**Abstract** Photosensitizer rose bengal (RB) reacts with  $\text{O}_2$  to generate singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) under illumination.  $^1\text{O}_2$  reacts with histidine or imidazole to form intermediate products which oxidize RNO. The reaction causes optical absorption of RNO at 440 nm to decrease. It is named the bleaching of RNO. Bleaching of RNO is increased with the increasing of RB illuminated time, which shows that the production of  $^1\text{O}_2$  has grown in the reaction. Bleaching of RNO is promoted by the rising of the concentration of histidine or imidazole. Imidazole plays more evident role in the reaction than histidine does. Bleaching of RNO is decreased by the presence of  $^1\text{O}_2$  quencher  $\text{NaN}_3$  or DABCO.  $^1\text{O}_2$  in lettuce thylakoids has been detected by the reaction in strong light. The production of  $^1\text{O}_2$  grows with the increasing of light intensity and illuminated time in lettuce thylakoids.

**Key words** bleaching of RNO, singlet oxygen, thylakoids