

四种植物 25S rRNA sarcin/ricin 结构域甲基化核苷的分析*

王嘉福, 周 惠, 陈月琴, 屈良鹄

(中山大学生物工程研究中心//基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 应用不同浓度的 dNTP 逆转录反应, 分析了苦瓜、丝瓜、蓖麻和水稻的 25S rRNA sarcin/ricin 区域中的甲基化核苷, 发现了这 4 种植物 25S rRNA 的第 3 023、2 966 和 2 962 位的腺嘌呤、胸腺嘧啶和腺嘌呤是 2'-O-甲基化核苷; 在丝瓜和苦瓜 25S rRNA 的第 2 992、2 990 位的胞嘧啶和鸟嘌呤是葫芦科植物所特有的两个 2'-O-甲基化核苷; 第 2 944 位点的尿嘧啶是苦瓜、丝瓜、蓖麻和水稻的一个碱基甲基化核苷; 而且, 植物 25S rRNA 第 3 023 位甲基化腺嘌呤核苷刚好位于 sarcin/ricin 结构域的茎环上, 与核糖体失活蛋白切割位点相距仅 5 个核苷酸, 而在哺乳动物和酵母的 rRNA 相同位点上没有甲基化修饰的存在, 根据这一结果推测, RIPs 来源植物核糖体 RNA 的自我保护可能与这一位点的修饰有关。

关键词: 甲基化核苷; sarcin/ricin 结构域; 植物 rRNA

中图分类号: Q522+.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 02-0062-04

在高等植物中广泛存在一类能抑制真核细胞核糖体功能的毒蛋白—核糖体失活蛋白 (ribosome inactivating protein, RIP), 现已从 350 多种植物中发现 100 多种^[1,2]。RIP 具有 N-糖苷酶活性, 专一地水解 28S rRNA 第 4 324 位腺嘌呤碱基, 阻止核糖体与延伸因子 2 结合, 从而终止蛋白质合成^[2]。RIP 在 rRNA 上的作用位点是一个非常保守的茎环结构, 称为 α -sarcin/ricin loop (SRL), 也是延伸因子 2 的识别位点^[2]。RIP 具有特异的底物专一性, 不能失活原核细胞核糖体, 但能使自由的 rRNA 失活; 对酵母、哺乳动物等真核细胞的核糖体和裸露的 rRNA 都具有失活作用, 而且对核糖体的活性比裸露的 rRNA 高, 说明该类细胞核糖体蛋白不但不影响 RIP 与 rRNA 的结合, 反而促进 RIP 的糖苷酶活力^[2]。Zhang 等^[3]研究了辛纳毒素等 5 种 RIPs 的底物特异性, 发现它们不能失活自身的核糖体及 rRNA, 即使加入额外的核糖体因子 (S-100) 也不能促进毒素对自身核糖体的活性。这些结果表明, RIP 来源的植物核糖体 RNA 的 sarcin/ricin 区域可能发生了某些结构上的修饰或改变, 阻止了 RIP 的识别和催化。

真核细胞中, 甲基化是核糖体 RNA 最重要的转录后修饰, 除了少数几个是碱基甲基化外, 其余是核糖的 2'-O-甲基化, 这些修饰位置大部分位于

rRNA 的高度保守区。在酵母和哺乳动物中, 许多甲基化的位点是相同的^[4]。核糖体 RNA 中修饰核苷的作用, 迄今仍不清楚。目前许多研究推测 rRNA 修饰核苷可能与 rRNA 的识别、折叠等有关; 我们认为这些核苷可能还与 rRNA 自身保护有关。本研究通过测定和比较分析几种真核生物 25S/28S rRNA α -sarcin/ricin loop 区域的甲基化核苷, 探讨 rRNA 甲基化的作用。

1 材料与方法

1.1 植物总 RNA 的制备

新鲜丝瓜 *Luffa cylindrica*、苦瓜 *Momordica charantia* 购自农贸市场; 籼稻 *Oryza sativa* 由本室提供, 避光发芽, 取黄化苗; 蓖麻 *Ricinus communis* 种子购自种子分公司, 常规发芽, 取叶片或茎。取 1 g 植物组织, 用液氮冷冻研磨成粉, 再用异硫氰酸胍法^[5,6]提取总 RNA。

1.2 寡核苷酸引物及标记

寡核苷酸引物由上海 Sangon 公司合成, 序列为:

SRF1: 5'-GTTACCACAGGGATAACTGG3'

SRR2: 5'-CCAAGCGCGATGACCAATTG3'

引物 SRF1 和 SRR2 用于扩增 25S 核糖体 DNA 片段; 引物 SRR2 以 [γ -³²P] ATP (购自北京亚辉公司)

* 收稿日期: 2002-06-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970171)

作者简介: 王嘉福 (1962 年生), 男, 博士研究生; 通讯联系人: 屈良鹄; E-mail: lsbr04@zsu.edu.cn

标记 5'末端, 按分子克隆手册^[7]操作, 用于逆转录分析和甲基化核苷的精确定位。

1.3 逆转录分析

逆转录反应的体积为 20 μ L, 含 6 μ g 总 RNA, 20 ng 5'-³²P 标记的引物, 按不同的 dNTP 浓度分别加入 10 mmol/L dNTP; 将反应液混匀后, 65 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冷至 42 $^{\circ}$ C 保温 10 min, 加入 200 单位 M-MLV 逆转录酶 (Promega) 42 $^{\circ}$ C 延伸反应 30 min。为了精确定位甲基化核苷的位置, 以引物 SRF1 和 SRR2 扩增蓖麻 rDNA 序列, 然后克隆进 pGEM-T 载体上, 质粒 DNA 的插入片段用 ³²P 标记的 SRR2 引物测序, 用作相对分子质量标志, 逆转录产物和相对分子质量标志用 8 mol/L 尿素 $\rho = 10\%$ 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析^[8]。

2 结果与讨论

2.1 逆转录反应中 dNTP 浓度的影响

本文采用 0.005, 0.5, 1 和 1.5 mmol/L 4 种不同浓度的 dNTP, 以 ³²P 标记的 SRR2 引物对苦瓜和丝瓜总 RNA 进行逆转录分析, 结果表明 (图 1), 在 5 μ mol/L 的 dNTP 浓度下, 苦瓜和丝瓜 25S rRNA-sarcin/ricin 区域及上游中具有 2'-O-核糖甲基化核苷位点对逆转录酶具有阻碍作用, 形成明显的逆转录停顿点; 在 0.5 mmol/L 高浓度 dNTP 下逆转录时, 无明显的停顿现象, 而在 1 mmol/L 和 1.5 mmol/L 高浓度 dNTP 下逆转录时, 形成明显的逆转录停顿点。因此, 本研究采用 5 μ mol/L 低浓度的 dNTP 和 0.5 mmol/L 高浓度的 dNTP 分析植物中 25S rRNA 的 sarcin/ricin 区域 2'-O-甲基化位点较为合适。

2.2 植物中 sarcin/ricin 区域甲基化位点的鉴定

以引物 SRF1 和 SRR2 扩增的蓖麻 rDNA 序列为分子量对照, 5 μ mol/L 和 0.5 mmol/L 的 dNTP 逆转录分析苦瓜、丝瓜、蓖麻和水稻中 sarcin/ricin 区域甲基化位点, 结果表明 (图 2), 在 dNTP 的浓度为 5 μ mol/L 时, 这 4 种植物 25S rRNA 的第 3 023、2 966 和 2 962 位的腺嘌呤、胸腺嘧啶和腺嘌呤处形成明显的逆转录停顿点, 而在 0.5 mmol/L 高浓度 dNTP 下逆转录时, 上述 3 个位点无明显的停顿现象, 说明这 3 个位点分别是一个甲基化核苷。到目前为止, 在酵母 *S. cerevisiae* 和哺乳动物 25S 和 28S rRNA 上相对应的位点的核苷酸没有被甲基化; 在丝瓜和苦瓜 25S rRNA 的第 2 992、2 990 的胞嘧啶和鸟嘌呤具有 2 个非常突出的逆转录停顿点, 而在蓖麻和水稻的 rRNA 中没有出现, 说明这 2 个甲基化核苷是葫芦科植物所特有的; 在苦瓜、丝瓜、蓖麻和水稻的第 2944 位点的尿嘧啶处, 低浓度和高

浓度的 dNTP 逆转录时均不能通过这一位点, 对逆转录酶具有强烈的阻碍作用, 形成明显的逆转录停顿点, 通过 rRNA 同源序列的比较分析发现, 在人和酵母 28S 和 25S rRNA 上相同位点的尿嘧啶为碱基甲基化, 因此, 本研究结果表明, 植物中这一位点也是碱基甲基化。

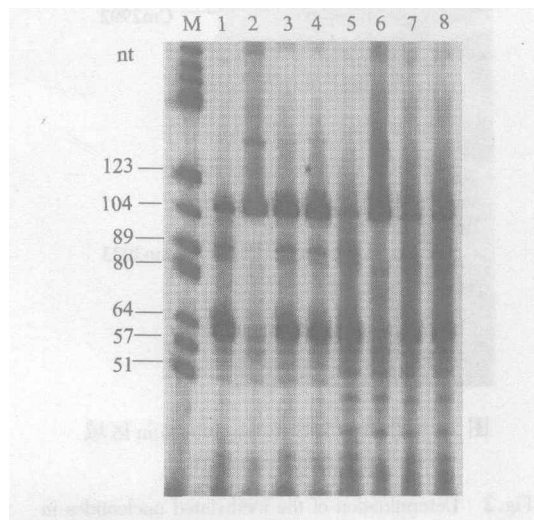


图1 不同 dNTP 浓度对逆转录反应的影响

Fig.1 Primer extension at different dNTP

concentration from two plants

M: marker; 1, 2, 3, 4: 苦瓜; 5, 6, 7, 8: 丝瓜;

c(dNTP)/(mmol·L⁻¹): 1, 5 为 0.005; 2, 6 为 0.5;

3, 7 为 1.0; 4, 8 为 1.5

通过比较植物、动物和酵母 25S/28S 核糖体 RNA sarcin/ricin 结构域的甲基化状态 (图 3), 发现蓖麻、丝瓜、苦瓜和水稻的 25S rRNA 第 3 023 位腺嘌呤甲基化核苷刚好位于 sarcin/ricin 结构域的茎环结构上, 与核糖体失活蛋白切割位点相距仅 5 个核苷酸, 而在哺乳动物和酵母的 rRNA 相同位点上没有甲基化修饰的存在^[4], 也没有发现指导这个位点 2'-O-核糖甲基化修饰的反义 snoRNA。

真核生物核糖体 RNA 的甲基化修饰大部分位于核糖体 RNA 高度保守的区域^[4], 从酵母、植物到哺乳动物, 有许多甲基化的位点是处于相同的位置, 这些修饰可能具有一种系统发育上的保守功能。研究表明^[4], 甲基化的核苷具有较强的疏水特性, 2'-O-甲基化的区域对碱抵抗, 对于 rRNA 的折叠、识别和稳定具有重要作用。董贻诚等^[1]通过计算机模型分析天花粉蛋白与底物类似物 GAGA 相互作用的机理, 根据天花粉蛋白的结构模型, 天花粉蛋白的活性部位是一口袋状, E160 和 R163 位于活性部位口袋的底部, 口袋的直径约 100 μ m, RIP 对 rRNA 4 324 位的专一性主要是由于 4 324 位前后骨

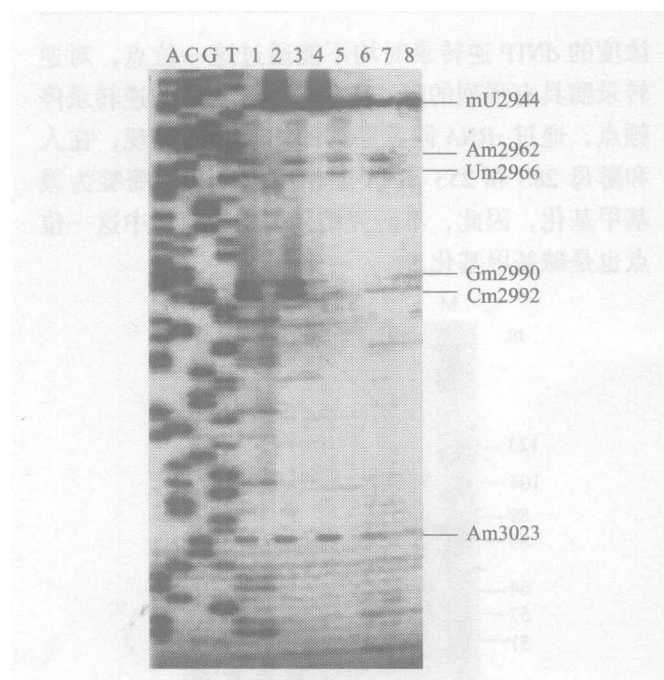


图 2 4 种植物 25S rRNA sarcin/ricin 区域
甲基化核苷的鉴定

Fig.2 Determination of the methylated nucleotides in
sarcin/ricin domain and its flanked sequences
of 25S rRNA from four plants

A, C, G, T: rDNA 序列 ladder;

1, 2: 苦瓜; 3, 4: 丝瓜; 5, 6: 水稻; 7, 8: 蓖麻;

$c(\text{dNTP})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$: 1, 3, 5, 7 为 0.005; 2, 4, 6, 8 为 0.5

架的特殊性, 主链骨架在 4 324 位形成急剧的转折, 使 4 324 位碱基突出于主链骨架外, 伸向 RIPs 的活性部位口袋, 与活性部位口袋底部的残基 E160 和 R163 相互作用, 当天花粉蛋白和 28S rRNA 接近时, 分子是带正电的 R163 侧链与 4 324 位上的碱基相互作用, 使 4 324 位糖苷键 $\text{C}_1' - \text{N}_9$ 发生了电子转移, 电子从 C_1' 向 N_9 移动, 使 C_1' 带正电, 带负电的 R160 侧链稳定带正电的 C_1' , 附近水分子通过亲核攻击使核糖断裂, 质子转移到碱基 N_9 上, OH 转移到核糖环 C_1' 上, 使 4 324 位碱基腺嘌呤被切下, 完成水解过程。根据这一分析, 我们可以推测, 在植物中, 由于 25S rRNA 中 sarcin/ricin 茎环上发生了某些化学修饰如甲基化核苷, 改变了这一区域的极性, 当 RIPs 和 25S rRNA 接近时, RIPs 被排斥, rRNA 中 sarcin/ricin 茎环结构不能进入核糖体失活蛋白的活性口袋内, 从而保护了自身的 rRNA 不被切割。

从蓖麻、丝瓜、苦瓜和水稻中都发现了相应的 RIPs, 在 25S rRNA sarcin/ricin 茎环结构上发生的甲基化修饰可能是 RIPs 来源的植物中的普遍现象。

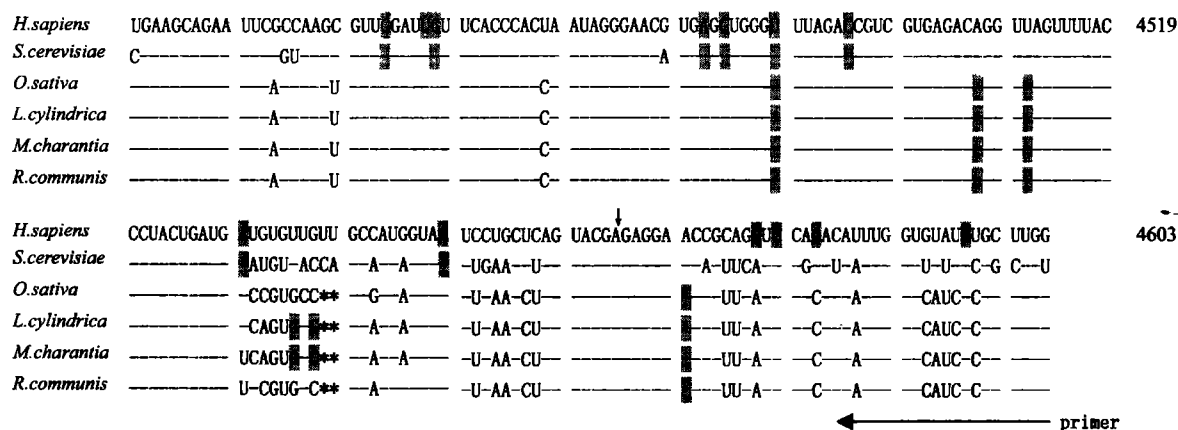


图 3 6 种真核生物 25S/28S rRNA sarcin/ricin 区域甲基化核苷的分析

Fig.3 Analysis of methylated nucleotides in sarcin/ricin loops of 25S/28S rRNA from 6 eukaryotic cells

阴影表示甲基化核苷, 小箭头表示 RIPs 切割位点

参考文献:

- [1] 董贻诚, 黄岳顺, 梁曦云, 等. 天花粉蛋白与底物类似物 GAGA 相互作用的计算机图象模拟[J]. 生物物理学报, 1994, 10(1): 13-18.
- [2] YAETA E, KUNIO T. The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain[J]. J Bio Chem, 1988, 263(18): 8735 -

8739.

- [3] ZHANG A H, TANG S, LIU W. Substrate-structure dependence of ribotoxins on cleaving RNA in *C. camphora* ribosome[J]. J Nat Toxins, 2001, 10(2): 119-125.
- [4] MADEN B E H, HYGHEA J M X. Eukaryotic ribosomal RNA: the recent excitement in the nucleotide modification problem[J]. Chromosoma, 1997, 105: 391-400.

- [5] 周惠, 屈良鸽, 杜延平, 等. 粟酒裂殖酵母 U6 snRNA 中一个新的甲基化核苷的鉴定[J]. 科学通报, 2000, 45(4): 402 - 406.
- [6] CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162: 732 - 735.
- [7] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold spring Harbor Press, 1989.
- [8] QU L H, MENG Q, ZHOU H, et al. Identification of novel snoRNA gene clusters from *Arabidopsis thaliana*[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(7): 1623 - 1630.

Determination of the Methylated Nucleotides in Sarcin/Ricin Domain and Its Flanked Sequences of 25S rRNA from Four Plants

WANG Jia-fu, ZHOU Hui, CHEN Yue-qin, QU Liang-hu

(Biotechnology Research Center//

Key Laboratory of Gene Engineering of the Ministry of Education,
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Using primer extension at different dNTP concentrations the methylated nucleotides in sarcin/ricin domains and its flanked sequences of 25S rRNA were analyzed and determined from *Oryza sativa*, *Momordica charantia*, *Luffa cylindrica* and *Ricinus communis*. A3023, U2966 and A2962 were 2'-O-ribose methylated nucleotides and U2944 was base methylation modification in 25S rRNA of those four plants. C2992 and G2990 were two sites of 2'-O-ribose methylation only found in *Momordica charantia* and *Luffa cylindrica*. Interestingly, A3023 was located at sarcin/ricin loop of plant 25S rRNA. However, the site was 5 nucleotides down stream from α -sarcin/ricin cleavage site and unmethylated in mammals and *S. cerevisiae* rRNAs. The results suggest that the methylation modification in sarcin/ricin loop of plant rRNAs prevent the recognition and hydrolysis from the ribosome inactivating proteins.

Key words: methylated nucleotides; sarcin/ricin loop; plant rRNA