

镧离子对酵母 tRNA 圆二色谱的影响^{*}

涂华民 孟建新 杨燕生^{*} 龚孟濂

(中山大学化学与化学工程学院, 广州 510275)

摘要 采用圆二色谱 (CD) 方法对镧离子 (La^{3+}) 与转移核糖核酸 (tRNA) 的相互作用进行了研究. 结果显示 La^{3+} 可使酵母 tRNA 的 CD 谱峰向短波方向偏移 3 nm, 波峰位于 254 nm, 峰值减少 10%, 说明结合在 tRNA 分子上的 La^{3+} 引起 tRNA 分子构象的变化. La^{3+} 对氨酰化 tRNA 合成酶 (aaRS) 或 tRNA-aaRS 复合物的 CD 光谱基本上无影响, 说明 La^{3+} 对氨酰化反应活性的影响, 可能是通过改变 tRNA 分子构象所致.

关键词 转移核糖核酸, 镧离子, 圆二色谱, 生物大分子

分类号 Q 752

核酸在传递遗传信息和指导蛋白质生物合成中起着重要的作用. tRNA 则是将核酸遗传信息翻译成蛋白质一级结构的关键性生物大分子, 它和氨酰化 tRNA 合成酶 (aaRS), mRNA, rRNA 以及许多蛋白质合成因子都有关联, 对于研究各种生命现象如癌、异化、免疫等, 具有指导意义. 已采用多种方法与手段对金属离子与 tRNA 间的相互作用进行了研究, 如偏差电子密度图^[1], 电子自旋共振, 平衡透析, 荧光和 NMR^[2]等方法测定了 Mg^{2+} 及多胺等与酵母苯丙氨酸 tRNA (tRNA^{Phe}) 的结合反应. Mg^{2+} 对 tRNA 或 aaRS 分子 CD 光谱的影响, 证明当 tRNA 与 Mg^{2+} 结合后, tRNA 分子 CD 光谱发生了改变, 提示 tRNA 分子碱基对数目的增加和构象变化^[3,4].

稀土在农业中的应用, 使稀土已进入了人类生存的生态环境和生物链. 虽然有关稀土的毒性及作用机制研究早就引起了人们的关注, 然而稀土对人类的长期影响究竟如何, 尚未能达成共识. 人们迫切期望能够在分子和亚细胞水平上对此问题能够给出确切的答复. 本研究进行稀土对 tRNA 结构和功能影响的研究, 是为了探讨稀土对蛋白质生物合成过程中氨酰化反应的影响, 为稀土生物效应的研究开辟一个新领域.

1 材料和方法

1.1 材料

酵母 tRNA^{Phe} , aaRS 和 Chelex-100 均购自美国 Sigma 化学公司; Tris (纯度 > 99.95%) 为进口分装, 使用前经重结晶处理; 酵母 tRNA 购自上海东风生化试剂厂; La_2O_3 (纯度为

^{*} 国家攀登计划 (29671034), 国家教委博士点基金, 中国科学院长春应用化学所和马灿安教育基金资助项目

收稿日期: 1997-03-11 涂华民, 男, 33 岁, 博士研究生, 讲师

99.5%) 为珠江冶炼厂产品; 其余试剂为分析纯或生化试剂. tRNA 的脱镁处理参照文献 [2] 的方法进行.

1.2 方法

取 1.0 mL 酵母 tRNA 与 10 mmol/L 的 Tris-HCl 和 20 mmol/L KCl (pH 7.7) 的缓冲溶液相混合, 再加入计算量的 LaCl_3 , 17°C 下采用 J-500 C 型 CD 光谱仪 (JASCO, 5 mm 测量杯) 测量不同条件下, tRNA 分子 CD 光谱的变化.

将 0.5 mL 酵母 tRNA 与定量的 aaRS 混合, 同上述条件测 tRNA-aaRS 复合物和 aaRS 的 CD 光谱.

CD 光谱的实验结果以椭圆率 $[\theta] / (^\circ) \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ 表示^[3], $\theta = \Delta A / c(\text{tRNA}) \times L$, ΔA 为左与右圆偏振光吸收的差, L 为测定杯的光路长度 (cm).

2 结果

按照上述方法, 在 $c(\text{tRNA})$ 为 $2 \mu\text{mol/L}$ 下, 测定了 tRNA 的 CD 光谱 (没有对波长进行校正). CD 光谱具有以下特征: 在 200~230 nm 波长范围内有 1 个向下的负峰, 峰值在 205 nm 左右, 该负峰的研究较少, 而且可能对 tRNA 分子 CD 光谱研究的意义不大, 因此不作详细研究; 在 230~290 nm 波长范围内有 1 个向上的正峰, 对圆偏振光的最大吸收在 257 nm, 它是具有 L 结构 tRNA 分子的特征峰; 在 290~320 nm 波长范围有 1 个较小的负峰, 峰值在约 300 nm 处. 该谱带对热变性特别敏感, 一般将之归属于 RNA 几何形状中核苷碱基 π^* 的转变, 说明该带主要受 tRNA 三级结构变化的影响.

K^+ (20 mmol/L) 存在与否对 tRNA 分子 CD 光谱无影响^[4], 因此本实验同样采用 10 mmol/L Tris-HCl 和 20 mmol/L K^+ (pH 7.7) 的缓冲溶液保持样品的 pH 和离子强度, 并将此条件下所测得的 θ 值视为空白对照, 计算 $\Delta\theta$ 值, $\Delta\theta = \theta(\text{La}^{3+}) - \theta(\text{空白})$.

加入 La^{3+} 对酵母 tRNA 分子 CD 光谱的影响见图 1. $x(\text{La}^{3+})$ 为 50% 时, 峰值向紫移了 3 nm, 最大正峰为 254 nm, 而且峰值降低了约 10%, $\Delta\theta = 1.75 \times 10^4 (^\circ) \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$.

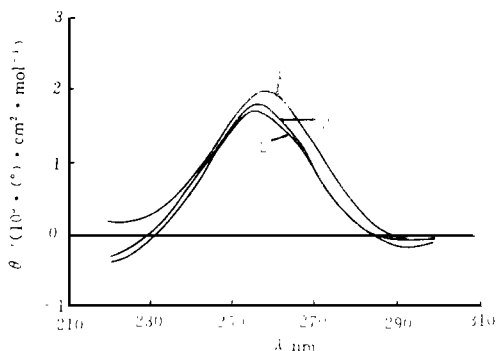


图 1 La^{3+} 对酵母 tRNA CD 光谱的影响

Fig. 1 Effect of La^{3+} on the CD spectrum of yeast tRNA

(1) $c(\text{K}^+) = 20 \text{ mmol/L}$; (2) $c(\text{La}^{3+}) = 2 \mu\text{mol/L}$;
(3) $c(\text{La}^{3+}) = 6 \mu\text{mol/L}$

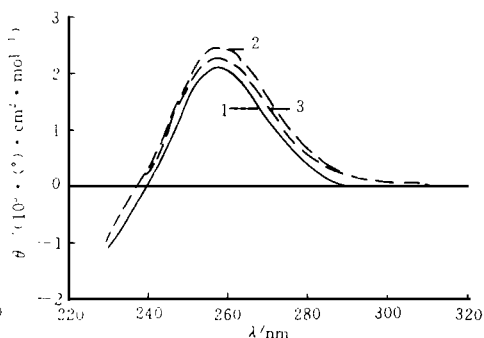


图 2 La^{3+} 对脱镁酵母 tRNA^{Phe} CD 光谱的影响

Fig. 2 Effect of CD spectrum of Mg^{2+} -free yeast tRNA^{Phe} by La^{3+}

(1) $c(\text{K}^+) = 20 \text{ mmol/L}$; (2) $c(\text{La}^{3+}) = 0.5 \mu\text{mol/L}$;
(3) $c(\text{La}^{3+}) = 2.5 \mu\text{mol/L}$

继续加入 La^{3+} , 最大峰值波长不变, 峰幅略有变化. 若加入大过量的 La^{3+} , 则引起红移效应, 峰值的降低更为明显.

La^{3+} 对脱 Mg^{2+} 酵母 tRNA^{Phe} 分子 CD 的影响见图 2. 加入 $i(\text{La}^{3+})$ 为 50% 的 La^{3+} 后, tRNA^{Phe} 分子 CD 光谱正峰增大约 17%, 继续滴加入 La^{3+} , 其峰有所降低, 当加入 $x(\text{La}^{3+})$ 为 83% 的 La^{3+} 后, 正峰峰值增加约为 7%.

La^{3+} 对酵母 tRNA-aaRS 复合物和 aaRS CD 光谱的影响见图 3. La^{3+} 对 aaRS 基本上无影响. 对 tRNA-aaRS 复合物的影响与对 tRNA 分子的相似, 可使正峰和峰值降低 20% 左右, 峰形稍有变化.

3 讨 论

La^{3+} 对酵母 tRNA 分子 CD 光谱峰幅的降低作用说明, La^{3+} 可减弱 tRNA 分子中电荷分布的不对称性, 这种作用可通过 La^{3+} 的正电荷与骨架磷酸根的负电荷相互作用达到, 也可由于配位 La^{3+} 引起 tRNA 分子构象的改变所致. 一般认为, tRNA 分子构象的转变能够造成 240~290 nm 波长范围内正二色带的红移^[5]. 大大过量的 La^{3+} (如 5 mmol/L) 引起 tRNA 分子构象与结构的改变, 结果导致 CD 谱正峰的红移. 稀土离子对 tRNA 分子熔融曲线和熔融温度 (T_m) 的测量表明, 5 mmol/L 的稀土离子可以造成 tRNA 分子的低色效应和反 T_m 现象, 这与 CD 测量结果相互印证. tRNA 分子构象状态的改变, 有可能对其氨酰化反应活性起到某种程度的抑制, 因为强配位稀土离子的结合常数达 $10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}^{[6]}$, 比强配位 Mg^{2+} 的结合常数要高出 2~3 个数量级, 这就有可能导致含稀土 tRNA 分子在关联 tRNA 合成酶作用下不能达到氨酰化反应所需的构象, 正如含锌 tRNA 分子不能发生氨酰化作用一样^[7].

实验中还发现在不同浓度 La^{3+} 的作用下, tRNA 分子 CD 光谱的峰值变化并非总是降低或升高, 而是在一定的范围内有升降变化, 这可能是由于 La^{3+} 的配位作用引起 tRNA 分子构象的改变, 造成 tRNA 分子不对称性或分子中电荷密度不对称性的降低或消减, 使 CD 谱峰幅降低; 而 La^{3+} 的配位又可使 tRNA 分子内形成更多的碱基对, 导致 CD 谱峰幅的增大, 这对稳定 tRNA 分子三级结构具有特殊意义.

La^{3+} 对 aaRS 或 tRNA-aaRS 复合物 CD 光谱的影响不甚明显, 说明 La^{3+} 对氨酰化反应的影响可能主要是在实验条件下 La^{3+} 没有置换 aaRS 活性部位所结合的金属离子或没有作用在活性部位附近而引起构象变化, 因而酶分子的 CD 光谱几乎不受加入 La^{3+} 的影响. 有关稀土对酶分子的活性及氨酰化反应的影响研究正在进行之中.

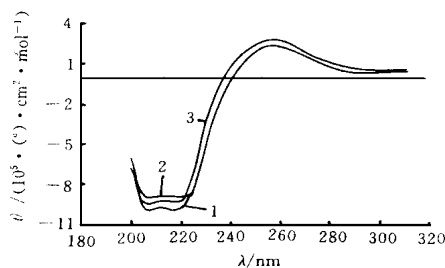


图 3 La^{3+} 对 tRNA-aaRS 复合物 CD 光谱的影响

Fig. 3 Effect of La^{3+} on the CD spectrum of tRNA-aaRS complex

(1) $c(\text{K}^+) = 20 \text{ mmol/L}$; (2) $c(\text{La}^{3+}) = 4 \mu\text{mol/L}$;
(3) $c(\text{La}^{3+}) = 8 \mu\text{mol/L}$

参 考 文 献

- 1 Quigley G J, Teeter M M, Rich A. Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75 (1): 64~ 68
- 2 Reid S S, Cowan J A. Biostructural chemistry of magnesium ion: characterization of the weak binding sites on tRNA^{Phe} (yeast). Implications for conformational change and activity. *Biochemistry*, 1990, 29 6025~ 6032
- 3 Beresten S, Sheinker V, Favorova O, et al. Mutual conformational changes of tryptophanyl-tRNA synthetase and tRNA^{Trp} in the course of their specific interaction. *Eur J Biochem*, 1983, 136 559 ~ 570
- 4 彭朝晖, Igarashi K, 苏成芝. 精胺和 Mg^{2+} 对 tRNA^{Phe} 圆二色谱的影响. *生物化学杂志*, 1994, 10 159~ 163
- 5 Willick G E, Kay C M. Circular dichroism study of the interaction of glutamyl-tRNA synthetase with tRNA^{Glu}. *Biochemistry*, 1976, 15 (19): 4347~ 4352
- 6 Wolfson J M, Kearns D S. Europium as a fluorescent probe of metal binding sites on transfer ribonucleic acid (I). *J Am Chem Soc*, 1974, 96 3653~ 3654
- 7 Svensson L. Methionyl-tRNA synthetase (I). *Biochim Biophys Acta*, 1967, 146 (1): 239~ 252

Effects of Lanthanum(III) Ions on Circular Dichroism Spectrum of Yeast tRNA

Tu Huamin Meng Jianxin Yang Yansheng* Gong Menglian*

Abstract The interaction of Lanthanum (III) ion (La^{3+}) with yeast tRNA was studied by circular dichroism (CD) spectrum. The results show that the peak position of yeast tRNA was slightly shifted towards short wavelength by 3 nm in the presence of $2 \mu\text{mol/L } La^{3+}$, i. e. from 257~ 254 nm; and the amplitude of positive peak at 254 nm was decreased by about 10%. The conformational change of yeast tRNA was caused by the binding of La^{3+} to tRNA. La^{3+} did not change the CD spectra of either yeast aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS) or tRNA-aaRS complex, which suggests that the effects of La^{3+} on the aminoacylation reaction activity may mainly be due to the conformational change of tRNA.

Keywords transfer ribonucleic acid, lanthanum ion, circular dichroism spectrum, biological macromolecule

* School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275