

# 文昌鱼核糖核蛋白体结构与 功能的研究

## I. 文昌鱼 tRNA 和 5SRNA\* 的制备

商金宝 刘望夷 秦士良\*\* 蔡菊娥

(中国科学院上海生物化学研究所)

### 摘 要

本文报导了从厦门白氏文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri Gray*) 中制备 tRNA 和 5S RNA 的方法。将文昌鱼洗净, 用搅碎机破碎, 然后用苯酚法提取小分子 RNA。RNA 粗制品经 DEAE-纤维素 DE22、DEAE-Sephadex A-50 和 Sephadex G-100 柱层析分离纯化, 分别得到 tRNA 和 5S RNA。再用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进一步纯化。测定了 tRNA 接受甘氨酸、丙氨酸和酪氨酸的活力分别为 6.3%、5.2% 和 21%—25%。

tRNA 的主要生物功能是携带与转移氨基酸参与蛋白质生物合成, 并对基因表达进行调节控制。5S RNA 是核糖核蛋白体的一个组分, 在蛋白质生物合成中具有重要的功能, 也是研究生物进化比较理想的一种生物大分子。自 Hoagland 等 (1957) 发现 tRNA 及 Tissieres 等 (1959) 发现核糖核蛋白体 RNA 后, 科学工作者便广泛地开展了对 tRNA 和 5SRNA 结构与功能的研究。

文昌鱼是一种处于脊椎动物与无脊椎动物之间过渡类型的脊索动物, 属脊索动物门的头索亚门, 最接近脊椎动物亚门。因此对它进行深入的生化学研究, 在探索生物进化方面有较强的学术意义。本文报告从文昌鱼中制备 tRNA 和 5S RNA 以及 tRNA 接受氨基酸活力的初步结果。

### 材 料 和 方 法

文昌鱼从厦门购买。DEAE 纤维素为英国 Whatman 产品。DEAE-Sephadex A-50,

\* tRNA 为转移核糖核酸; 5S RNA 为核糖核蛋白体 5S RNA

本文 1982 年 2 月 18 日收到。

\*\* 北京师范大学生物系生化教研室进修教师。

Sephadex G—100为瑞典Pharmacia产品。 $^3\text{H}$ -甘氨酸,  $^3\text{H}$ -丙氨酸,  $^3\text{H}$ -酪氨酸为上海原子核所产品。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ 为英国Amersham产品。丙烯酰胺为上海试剂二厂产品。苯酚为上海试剂一厂产品。大肠杆菌  $T_4$  RNA连接酶为本所核酸室制备。大肠杆菌  $T_4$  多核苷酸激酶为中国科学院生物物理所产品。酵母tRNA为本所东风生化试剂厂产品。

小分子RNA的制备参照 Hiroyuki Komiya 等 (1980) 的方法略加修改。图 1 为制备流程图。缓冲液 I 为  $0.02\text{M}$  tris-HCl pH7.5,  $0.005\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0.1\text{M}$  NaCl,  $0.1\%$  皂土。 $^{32}\text{pCp}$ 的制备参照李其琛等 (1979) 的方法。

纯化方法,

1. DEAE-纤维素DE 22柱层析 (2厘米 $\times$ 35厘米); 用 $0.01\text{M}$  tris-HCl, pH7.5,  $0.1\text{M}$  NaCl平衡。RNA上柱量为2257 A260单位, 用 $0.1\text{M}$ 到 $1\text{M}$  NaCl直线梯度洗脱, 流速为1毫升/分钟, 得到小分子RNA 904 A260单位 (图2)。

2. DEAE-SephadexA-50柱层析 (1厘米 $\times$ 50厘米); 用 $0.02\text{M}$  tris-HCl, pH7.5,  $0.375\text{M}$  NaCl,  $0.008\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ 平衡。RNA上柱量为656 A260单位, 用 $0.375\text{M}$  NaCl含 $0.008\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ 到 $0.525\text{M}$  NaCl含 $0.016\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ 直线梯度洗脱, 流速为1毫升/3分钟, 得到tRNA 76 A260单位, 5S RNA 38.5 A260单位 (图3)。

3. Sephadex G—100柱层析 (1厘米 $\times$ 100厘米); 用 $0.02\text{M}$  tris-HCl, pH7.5平衡, 5S RNA上柱量为37 A260单位。用含有 $0.1\text{M}$  kcl的平衡液洗脱, 流速为1毫升/3分钟, 得到5S RNA 27 A260单位 (图4)。

4. 最后再进一步用含有7M尿素的12%聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化tRNA和5S RNA。将tRNA及5S RNA区域带从胶上洗脱下来, 分别得到14和5 A260单位。冷冻干燥, 低温保存备用。

## 结果和讨论

1. tRNA和5S RNA的鉴定; 用大肠杆菌  $T_4$  RNA连接酶将  $^{32}\text{pCp}$ 分别连到tRNA及5S RNA的3'末端上, 得到 tRNA- $^{32}\text{pCp}$ 及5S RNA- $^{32}\text{pCp}$ 。用含7M尿素的12%聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定, 在凝胶上tRNA和5S RNA都是均一的一条带。图5为tRNA- $^{32}\text{pCp}$ 及5S RNA- $^{32}\text{pCp}$ 的放射性自显影图谱。

2. tRNA有携带氨基酸的活力。本文用 $^3\text{H}$ -氨基酸测定了文昌鱼tRNA接受氨基酸的活力 (表1)。结果表明文昌鱼tRNA接受甘氨酸和丙氨酸的活力比酵母tRNA的略高。原因之一可能是文昌鱼tRNA经过凝胶电泳纯化, 而酵母tRNA未经同样方法纯化, 纯度较差所引起的。值得注意的是文昌鱼tRNA接受酪氨酸的活力明显地比酵母tRNA高, 这就不仅仅是纯度的原因。在蛋白质合成过程中, 氨基酸的活化及连结到tRNA 3'端上不仅与相应的氨基酸种类有关, 而且还依赖于氨酰基tRNA合成酶和tRNA的来源。这种种族差异性在有些情况下是很明显的。例如, Rendi 和 Ochoa (1962) 报告大肠杆菌氨酰基tRNA合成酶不能将亮氨酸连接到酵母或大鼠肝脏的tRNA 3'端上, 反之亦然。Clark

和 Eyzaguirre (1962) 以及 Berg 等 (1961) 曾指出过这种种族差异性表现在酪氨酸和甲硫氨酸的参入情况。由于种族差异参入相差很大, 低的只有 1%, 而高的可高达 25%。本文用的是大白鼠肝脏氨酰基 tRNA 合成酶, 文昌鱼 RNA 接受酪氨酸的活力明显地比酵母 tRNA 高是否由于 tRNA 和氨酰基 tRNA 合成酶来源的种类差异? 还有待进一步研究。有关种族差异的研究情况 Jacobson (1971) 曾作了详细的综述。

3. 文昌鱼在生物进化中处于脊椎动物与无脊椎动物之间, 它是研究生物进化的一个很好的材料。我国科学工作者对文昌鱼的生物学和生物化学的研究做了不少工作。童第周等 (1958) 对文昌鱼的胚胎发育进行了系统的研究。邹永水和龚祖坝 (1978) 研究了文昌鱼的副肌球蛋白的纤维。颜思旭等 (1980) 研究了文昌鱼的碱性磷酸酶。我们拟对文昌鱼的核糖核蛋白体的结构与功能进行研究。

图 1 文昌鱼小分子 RNA 的制备流程图

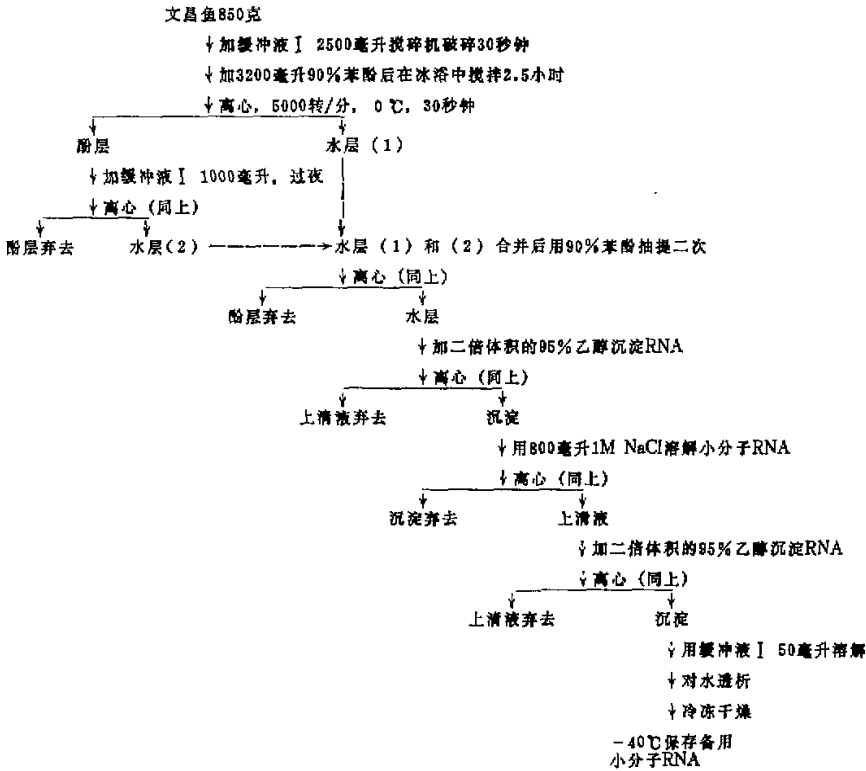


表1 酵母tRNA和文昌鱼tRNA接受氨基酸的活力

样品	接受氨基酸活力 (%)		
	甘氨酸	丙氨酸	酪氨酸
酵母tRNA	3.5	2.6	8
文昌鱼tRNA	6.3	5.2	21—25

## 参 考 文 献

- 李其樑等 1979 一种新的标记核糖核酸3'末端的方法。生物化学与生物物理学报, 11 (4): 319—324。
- 邹永水和龚祖坝 1978 文昌鱼副肌球蛋白纤维及其细微结构。生物化学与生物物理学报, 10 (4): 375—380。
- 童第周等 1958 文昌鱼卵子分裂球的发育能力的研究。实验生物学报, 6: 57—90。
- 颜思旭等 1980 文昌鱼碱性磷酸酶的研究。厦门大学学报 (自然科学版), (3): 64—72。
- Berg, P., et al. 1961 The enzymic synthesis of amino acyl derivatives of ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 236:1726—1734.
- Clark, J. M. Jr., & Eyzaguirre, J. 1962 Tyrosine activation and transfer to soluble ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 237:3698—3702.
- Hiroyuki Komiya, et al. 1980 Nucleotide sequence of 5S RNA ribosomal RNA from *Lingula anatina*. *J. Biochem.*, 88:1449—1456.
- Hoagland, M. B. et al. 1957 Intermediate reaction in protein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 24:215—217.
- Jacobson, K. B. 1971 Reaction of aminoacyl-tRNA synthetases with heterologous tRNA's. *Progr. Nucleic acid Res. and Mol. Biol.*, 11:461—488.
- Rendi, R. & Ochoa, S. 1962 Species specificity in activation and transfer of leucine from carrier ribonucleic acid to ribosomes. *J. Biol. Chem.*, 237: 3707—3710.
- Tissieres, A. et al., 1959 Ribonucleoprotein particles from *Escherichia coli* *J. Mol. Biol.*, 1:221—223

## STUDIES ON THE STRUCTURE AND FUNCTION OF AMPHIOXUS RIBOSOMES

### I. ISOLATION OF AMPHIOXUS tRNAs AND 5S RNAs

Shang Jinbao, Liu Wanyi, Qin Shiliang and Cai Jue

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica*)

This article reports the method for preparing tRNA and 5S RNA from amphioxus (*Branchiostoma belcheri* Gray). Whole tissues of frozen amphioxus were homogenized in buffer I with a Waring blender at 0°C for 30s, then the lowmolecular-weight RNAs were extracted by the phenol method. By means of column chromatography of DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex A-50 and Sephadex G-100, tRNAs and 5S RNAs were obtained separately. They were further purified by electrophoresis on polyacrylamide gel. The accepting activity of amphioxus tRNA was determined; glycine, 6.3%, alanine, 5.2% and tyrosine, 21%—25%.