

- 10 Treacy M N, He X, Rosenfeld M G. *Nature*, 1991; **350**: 577
- 11 Voss J, Wilson L, Rosenfeld M G. *Genes Dev*, 1991; **5**: 1309
- 12 Gerster T, Roeder R G. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; **85**: 6347
- 13 Scott M P, Carroll S B. *Cell*, 1987; **51**: 689
- 14 He X, Gorrero R, Simmons D M *et al.* *Mol Cell Biol*, 1991; **3**: 1739
- 15 Li S, Greshaw E B, Rawson E J *et al.* *Nature*, 1990; **347**: 528
- 16 Finney M, Ruvkun G. *Cell*, 1990; **63**: 895
- 17 Fox S R, Jong M T C, Casanova J *et al.* *Mol Endocrinol*, 1990; **4**: 1069

横纹肌肌原纤维的第三肌丝——肌联蛋白*

陈 明

(中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

摘要 实验研究证明, 在动物横纹肌肌原纤维中, 除包含有粗肌丝、细肌丝外, 还有纤肌丝的存在。肌联蛋白(肌巨蛋白)是具有挠性的线状蛋白质, 分子量为 3000 000, 长度约为 0.9 μ m。跨越肌原纤维的 M-线和 Z-线, 形成纤肌丝。其生理功能是在粗肌丝装配中具有分子模板作用, 并将粗肌丝稳定于肌原纤维肌小节中央以及可参与肌球蛋白活性的调节。

关键词 肌联蛋白(肌巨蛋白), 纤肌丝, 肌原纤维, 横纹肌

肌肉收缩是动物运动并赖以生存的重要前提。肌肉细胞是怎样构筑的? 肌肉收缩是如何发生的? 早在 50 年代, Huxley 和 Niedergerke 以及 Huxley 和 Hanson 提出了著名的滑行肌丝模型(sliding filament model)。迄今为止, 普遍认为肌肉肌原纤维是由粗肌丝(肌球蛋白丝)和细肌丝(肌动蛋白丝)有规律地排列所形成, 肌肉的收缩与舒张是两组肌丝依赖 ATP 水解所释放的自由能而发生相对滑动的结果^[1-3]。

1 横纹肌肌原纤维中存在第三肌丝——纤肌丝

用高浓度的碘化钾(0.6mol/L)溶液处理肌原纤维, 可以溶去肌球蛋白丝的肌动蛋白丝, 然而肌原纤维仍可维持着整齐的构架, 且具有一定的张力。这种失去肌动蛋白和肌球蛋白而不解体的肌原纤维, 称为“幻影肌原纤维”(ghost myofibril; Huxley 和 Hanson 1954 年)。日本学者 Natori (1954 年) 也发现机械去

膜的肌肉细胞继续保留着“弹性”, 并且指出这种“弹性”与连接于肌膜的胶原纤维成分无关, 而是源自存在于肌肉细胞内的“内弹性结构”。这表明在肌肉细胞内, 除含粗肌丝和细肌丝外, 尚存在与肌肉细胞纵向相平行的结构以维持肌原纤维的形态和肌肉细胞的张力。事实上, 在以后的电子显微镜学的研究中, 终于在经过拉长的肌肉细胞内, 可以观察到一种新的超细肌丝, 它将粗肌丝与 Z-线联接起来。对此, 不同学者给以不同的名称, 如 C-肌丝、S-肌丝、T-肌丝、端肌丝、缝隙肌丝、弹性肌丝、第三肌丝或纤肌丝(fine filament)^[4,5]。最近, Funatsu 等^[6]利用胶溶蛋白(gelsolin)和高浓度醋酸钾分别选择性地溶解肌肉细胞中的肌动蛋白丝和肌球蛋白丝, 藉冰冻蚀刻复型技术, 在电子显微镜下更清楚地显示了纤肌丝的存在。纤肌丝与肌肉细胞纵向相平行, 跨越肌原纤维的 M-线与 Z-线, 直径仅约为 4nm。

*国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1993-06-13, 修回日期: 1993-11-12

现已肯定,在横纹肌肌原纤维中,除了存在人们早已熟悉的粗肌丝和细肌丝外,还应存在纤肌丝。

2 纤肌丝的生化本质——肌联蛋白

70年代中期,日本学者 Maruyama 致力于探索纤肌丝的生化本质。他们将脊椎动物骨骼肌肌原纤维经高浓度的 KI, LiBr 或者 KSCN 处理,可以溶解肌原纤维中的肌动蛋白和肌球蛋白,其残余物虽经稀酸、稀碱或者 8mol/L 脲处理而仍不能溶解。但其 1%SDS 的抽提液,在 SDS/聚丙烯酰胺凝胶电泳上却出现了两条蛋白染色带,一条是极高分子量的蛋白质,称为肌联蛋白(connectin);另一条是分子量为 42 000 的肌动蛋白(maruyama 等 1976 年)。与此同时,美籍华人王宽在进行骨骼肌肌动蛋白结合蛋白质的研究中,也意外地发现了肌原纤维的 SDS 抽提液,在 SDS/聚丙烯酰胺凝胶电泳上显示了分子量巨大的蛋白质,定名为肌巨蛋白(titin; Wang 等 1979 年)。他们各自利用该变性蛋白质进行了肌联蛋白(肌巨蛋白)的免疫荧光定位研究,观察到它存在于肌原纤维的 A-I 带连接区。后来,利用改变溶液的离子强度、pH 进行选择性地抽提和层析手段进一步获得纯化的肌联蛋白,藉免疫细胞化学观察到抗肌联蛋白抗体结合于纤肌丝,清楚地证实了肌联蛋白是它的构成成分^[5,7]。

脊椎动物横纹肌肌联蛋白在低浓度 SDS/聚丙烯酰胺凝胶电泳上呈现双染色带,即 α -肌联蛋白(肌巨蛋白 I)和 β -肌联蛋白(肌巨蛋白 II)。 β -肌联蛋白是 α -肌联蛋白的降解产物。 α -和 β -肌联蛋白的分子量分别为 3000 000 和 2000000,它们均含有丰富的 β 折叠结构,而未能检出 α 螺旋结构。氨基酸成分分析表明肌联蛋白是一个酸性蛋白质;并有较高含量的脯氨酸(28%),这与其缺乏 α 螺旋结构相符合^[8]。

在电子显微镜下,可见纯化的天然肌联蛋白是具有挠性的线状分子。高倍电镜照片显示肌联蛋白呈现串珠状结构,间距 4.3nm。只是

因为在纯化过程中受到内源性蛋白水解酶的作用会发生不同程度地降解而致分子的长度不一(0.6—1 μ m)。最近,由于使用酶抑制剂、缩短纯化时间和改进样品制备,在温和切变应力作用下,使线状肌联蛋白分子在云母片上伸展开来,经旋转投影,在电镜下观察到肌联蛋白分子的形状如细长的蝌蚪,由一个球状头部和一个细长杆部所组成,长约 0.9 μ m,杆部直径约 4nm。经 α -胰蛋白酶轻度水解,它在 SDS/聚丙烯酰胺凝胶电泳上显示出 3000 000, 190 000 和 165 000 三条染色带。抗 190 000 蛋白和抗 165 000 蛋白的抗体均结合于肌原纤维 M-线,但彼此不发生免疫交叉反应^[9]。

在英国 Trinick^[10]和德国 Weber^[11]的实验室中,他们独立地制备了多种抗肌联蛋白的单克隆抗体,藉免疫电镜观察了这些抗体在脊椎动物横纹肌肌原纤维上的结合位点及其与 M-线的距离,发现它们分别散布于 M-线两侧直至 Z-线的整个区域内,呈现对称性分布。Whiting 等^[10]报导,在 A-带区域内,许多种单克隆抗体均有其特定的结合位点,它们各自与 M-线的距离恒定,不因肌小节长度不同而变化;但在 I-带区域内,虽然仅有一个单克隆抗体与之相结合,但其结合位点与 M-线的距离却随着肌小节长度的变化而不同。这些实验结果充分显示: a. 肌联蛋白是一个很大的线状分子,几乎可以跨越半个肌小节,自 M-线而达到 Z-线。 b. 牵拉肌肉以改变肌小节长度,则 I-带区域内唯一的单克隆抗体的结合位点与 M-线的距离会发生相应的变化,表明 I-带区域内的肌联蛋白分子的部分是具有弹性的,这与肌联蛋白具有丰富的 β 折叠结构是相符合的。 c. 在 A-带区域内的多个单克隆抗体的结合位点与 M-线的距离恒定,指示肌联蛋白分子的部分在该区域内实际上是与粗肌丝相结合的。Furst 等^[11]利用新的抗肌联蛋白单克隆抗体,观察到有的抗体在肌原纤维 A-带区域内的结合位点有周期性分布,其重复间距为 42—43nm。

最近,鸡、兔和人横纹肌的肌联蛋白的部

- 1711
- 13 Tan K O, Myers A M, Robson R M *et al.* Mol Biol Cell, 1992; **3**: A253
- 14 Takano-Ohmuro H, Nakauchi Y, Kimura S *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1992; **183**: 31
- 15 Maroto M, Vinos J, Marco R *et al.* J Mol Biol, 1992; **224**: 287
- 16 Benian G M, Kiff J E, Neckelmann N *et al.* Nature, 1989; **342**: 45
- 17 Hu D H, Matsuno A, Terakado K *et al.* J Muscle Res Cell Motil, 1990; **11**: 497
- 18 Nave R, Weber K. J Cell Sci, 1990; **95**: 535
- 19 Kimura S, Matsuura T, Ohtsuka S *et al.* J Muscle Res Cell Motil, 1992; **13**: 39
- 20 Flucher B E. Dev Biol, 1992; **154**: 245

以核多角体病毒为载体在家蚕中生产外源蛋白

张雨青

(苏州蚕桑专科学校, 苏州 215151)

摘要 以家蚕核多角体病毒 (BmNPV) 为载体, 在家蚕幼虫或家蚕培养细胞系中表达的外源基因越来越多, 其表达的产物已涉及到医用药物、医疗诊断、疫苗生产、生物防治等诸多领域。文章就 BmNPV 的特性及其基因组构造, 多角体蛋白基因的特性, 重组 BmNPV 的构建及其在家蚕幼虫体内和细胞系中的表达, BmNPV-家蚕表达系统的外源蛋白生产效率及其应用等各个方面作了全面、系统的综述。

关键词 家蚕, 家蚕核多角体病毒, 多角体蛋白基因, 基因表达, 重组病毒, 表达载体

近年来, 以昆虫杆状病毒作为表达载体已越来越受到人们的注意, 用这种杆状病毒为载体表达的外源基因已很多。所用的昆虫杆状病毒主要有苜蓿尺蠖多角体病毒 (AcNPV) 和家蚕核多角体病毒 (BmNPV)。与其他动物病毒表达系统相比, 这种鳞翅目昆虫 NPV 作为表达载体其优越性为: a. 这种杆状病毒有一环状双链的基因组; b. 杆状病毒对于脊椎动物和其他昆虫细胞是安全的; c. 有对这种病毒易感染的细胞系; d. 在强有力的多角体蛋白启动子转录控制下, 外源基因表达的水平高。而 BmNPV 表达系统比 AcNPV 更具魅力的原因在于应用家蚕幼虫的体内系统, 病毒易于增殖, 能大量生产外源蛋白。

1 家蚕核多角体病毒 (BmNPV)

BmNPV 属无脊椎动物杆状病毒科 (Baculoviridae), 杆状病毒属 (*Baculovirus*) A 亚组。BmNPV 能形成包涵体, 即常称为多角体 (图 1)^[1]。这种包涵体的蛋白基质, 主要由占病毒

包涵体蛋白总量 95% 以上的多角体蛋白 (polyhedrin) 所组成。多角体蛋白分子量为 28576, 也称 p29 蛋白。当家蚕幼虫食下包埋有病毒粒子的多角体后, 被中肠的碱性消化液溶解, 从而释放出病毒粒子。尔后, 病毒粒子就迅速地吸附于肠壁细胞, 而侵入到蚕体腔内, 进入血淋巴, 扩散感染到其他细胞进行增殖。另外, 病毒粒子也可直接经皮肤感染。在感染末期, 被合成的继代病毒再被包埋到包涵体内, 直至蚕死亡。

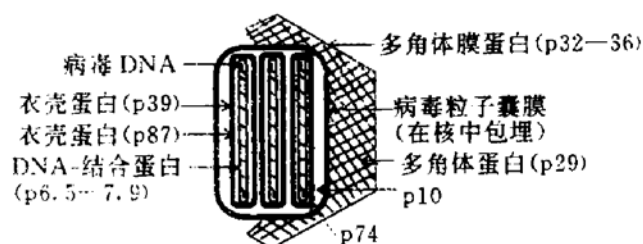


图 1 杆状病毒多角体的构造

system

The Fine Myofilament of Myofibril of Striated

Muscle: Connectin. Chen Ming. (Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 403—406

In the myofibril of striated muscle, there are three myofilaments: thick, thin, and fine myofilaments. Titin (connectin) is a giant elastic contractile protein, with molecular weight of 3000 kD and length of 0.9 μm , and forms fine myofilament extended from M-line to Z-line in the myofibril. It may play roles in maintaining thick myofilament in the middle of sarcomere, acting as molecular template for assembly of thick myofilament, and modulating the myosin activity.

Key words connectin (titin), fine myofilament, myofibril, striated muscle

Production of the Useful Protein in the Silkworm Using the *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus as a Expression Vector. Zhang Yuqing. (Suzhou Sericulture College, Suzhou 215151). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 406—410

More and more foreign genes have been expressed in the silkworm larvae or silkworm cell lines using the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) as a expression vector. The expressed products involve in many fields such as pharmaceuticals, medical diagnosis, vaccine production and biological control. The characteristics of BmNPV and its genome structure, characteristics of polyhedrin gene, construction of recombinant BmNPV and its expression in the silkworm larvae and cell line, and efficiency of production for the foreign gene products expressed in the silkworm-Bm-

NPV system and application of the expressed product were described systematically in the review.

Key words silkworm, *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, polyhedrin gene, gene expression, recombinant virus, expression vector

Structure and Pharmacology of V-ATPase. Cai Huiluo. (Institute of zoology, Academia Sinica, Beijing 100080). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 410—414

V-ATPases are present in large numbers of organelles including lysosomes, endosomes, golgi complex and several secretory granules in animal cell. The function of V-ATPase is to generate protonmotive force and to cause limited acidification of the internal space of vacuolar system and extracellular compartments at the expense of ATP. The acidification and the electrochemical H^+ gradient formed by V-ATPase serve an important function in endocytosis, exocytosis, membrane traffic and transport systems of cells. In the families of H^+ -ATPases, increasing attention is being given to V-ATPase, about which much has been learned in recent years.

Key words V-ATPase, electrochemical proton gradient $\Delta\mu\text{H}^+$, vacuolar system

Progress of Interferon-Stimulated Genes (ISGs) Research. Li Zhou, Fan Qixiu. (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 414—417

Interferon-stimulated genes (ISGs) is the central part of the research on interferon (IFN) function mechanism. After IFN binds to its receptor, through signal transducing in cyto-