

- function relationships. FEBS Lett, 1982, **48** (2): 179~191
- 5 Seehra J S, Khorana H G, *et al.* Bacteriorhodopsin precursor characterization and its integration into the purple membrane. J Biol Chem, 1984, **259** (7): 4187~4193
 - 6 Wolfer U, Dencher N A, Buldt G, *et al.* Bacteriorhodopsin precursor is processed in two steps. Eur J Biochem, 1988, **174** (1): 51~57
 - 7 Miercke L J W, Ross P E, Stroud R M, *et al.* Purification of bacteriorhodopsin and characterization of mature and partially processed forms. J Biol Chem, 1989, **264** (13): 7531~7535
 - 8 Sumper M, Herrmann G. Studies on the biosynthesis of bacteriorhodopsin, demonstration of the existence of protein species structurally related to bacteriorhodopsin. Eur J Biochem, 1978, **89** (1): 229~235
 - 9 Gochnauer M B, Kushner D J. Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria. Can J Microbiol, 1969, **15** (10): 1157~1165
 - 10 Onishi H M, Cance M E, Gibbons N E. A synthetic medium for extremely halophilic bacteria. Can J Microbiol, 1965, **11** (2): 365~373
 - 11 Stoeckenius W, Brown R. A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. J Cell Biol, 1967, **34** (1): 365~393
 - 12 Rodriguez Valera F, Ruiz Berraquero F, Ramos-Cormenzana A. Behaviour of mixed populations of halophilic bacteria in continuous cultures. Can J Microbiol, 1980, **26** (11): 1259~1263

The Effect of Nutrient Composition and Culturing Time on the Purple Membrane Synthesis of Halophilic Bacteria. DILBAR Tohty, HUI Shou Nian, XU Xiao-Jing (Department of Biology, Xinjiang Normal University, Urumqi 830053, China); ZHOU Pei-Jin (Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China).

Abstract "Purple membrane" is important feature of *Halobacteria*'s cell structure. It is a simple but ingeniously constructed photoelectric transducer. The process of its synthesis is greatly affected by the compositions of culture medium and the culturing time. The results showed that optimum culture medium of the purple membrane synthesis is synthetic medium and optimum culturing time is 7 days.

Key words nutrient compositions, culturing time, purple membrane, biosynthesis

类产碱假单胞菌杀虫蛋白的激光拉曼光谱研究*

罗霞 杨志荣¹⁾ 朱文 刘世贵

(四川大学草原生防工程国家实验室, 成都 610064)

摘要 类产碱假单胞菌是一种新发现的昆虫病原微生物, 其代谢产生的杀虫蛋白对蝗虫具有较强的毒杀作用, 经由杀虫蛋白的水和重水溶液的拉曼光谱, 按照 Lippert 的方法计算它的二级结构含量, β 折叠含量为 58%, 无规卷曲为 34%, 侧链 C—C—S—S—C—C 构型为反式-扭曲-反式。它的酪氨酸残基大部分暴露在分子表面, 小部分埋藏在疏水环境中。并讨论了杀虫蛋白结构有可能导致的杀虫机理。

关键词 类产碱假单胞菌, 杀虫蛋白, 拉曼光谱

学科分类号 Q433.5, Q502

类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) 是从自然罹病死亡的蝗虫体内分离到的一株病原菌^[1], 为一种新发现的昆虫病原微生物, 其代谢产生并分泌到胞外的一种杀虫蛋白, 对蝗虫具有较强的致死作用, 是细菌灭蝗剂的主要成分。张文等^[2]对该杀虫蛋白的分离、纯化及蛋白质理化性质作了进一步研究和报道。该杀虫蛋白只含一种亚基分子, 分子质量为 25.1 ku。但目前, 国内外尚未见到对此类杀虫蛋白的空间结构的研究报道, 因此为了更深入研究这种新发现的杀虫蛋白和

搞清杀虫机制, 从而更合理地应用于农业防虫、灭虫, 发展成为一种新型安全的细菌杀虫蛋白, 我们应用激光拉曼光谱仪详细研究类产碱假单胞菌杀虫蛋白的空间结构, 显然是有意义的。

* 国家自然科学基金资助项目 (39470042)。

¹⁾ 通讯联系人, 四川大学生命科学院, 成都 610064。

Tel: (028) 5412053。

收稿日期: 1998-12-07, 修回日期: 1999-06-28

1 材料与方法

1.1 材料

类产碱假单胞菌由本室从重庆歌乐山林场自然罹病死亡的黄脊竹蝗 (*ceracris, kiangsn*) 虫体内分离得到。

1.2 方法

1.2.1 杀虫蛋白的提取: 采用文献 [2] 的方法经 Sephadex G-100 和 DEAE-Sephadex A-50 两步柱层析分离得杀虫蛋白纯品, 纯度鉴定达到电泳纯。

1.2.2 光谱记录: 拉曼光谱由美国 Nicolet 公司 910 拉曼光谱仪测定, 光源为 Y: NdVO₄ 激光器,

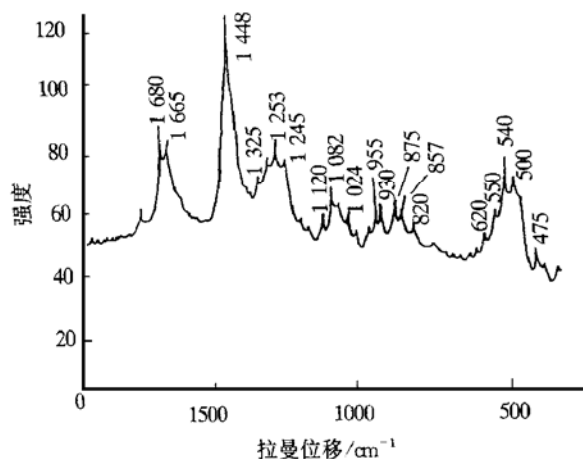


图1 杀虫蛋白的水溶液激光拉曼光谱图

波长为 1.064 μm , 分辨率为 8 cm^{-1} , 扫描 6 000 次, 杀虫蛋白溶液和重水溶液浓度均为 60 g/L, pH 为 7.2, 实验温度为 20 $^{\circ}\text{C}$ 。

二级结构的定量计算采用 Lippert 等^[3]提出的解线性方程组的方法, 所用有关参数来自文献 [3]。

2 结果与讨论

2.1 主链构象

图 1, 2 分别为杀虫蛋白的水溶液和重水溶液的拉曼光谱, 重要峰值^[4,5]列于表 1。

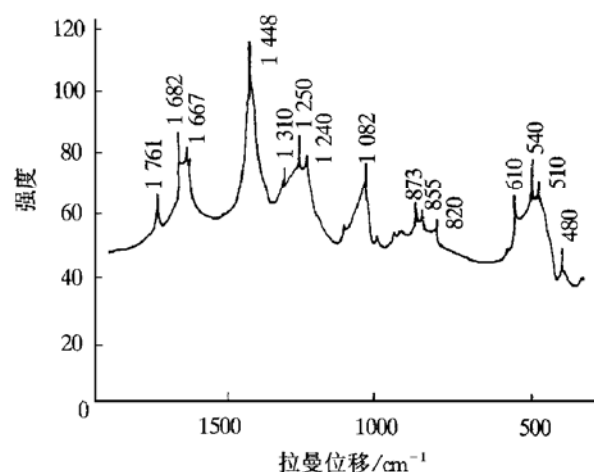


图2 杀虫蛋白的重水溶液的激光拉曼光谱图

表1 杀虫蛋白的水溶液和重水溶液的激光拉曼光谱谱线表

水溶液 $\Delta\nu/\text{cm}^{-1}$		归属	水溶液 $\Delta\nu/\text{cm}^{-1}$		归属
H ₂ O	D ₂ O		H ₂ O	D ₂ O	
1665	1682	酰胺 I	875	873	Trp
	1667	酰胺 I	857	855	Tyr
1448	1448	CH ₂ 弯曲振动	820	820	Tyr
1325	1310	V (C-NH ₂)	620	610	Phe
1253	1250	酰胺 III	550		Trp
1245	1246	酰胺 III	540	540	V [s s]
1210		t (NH ₂)	500	500	Trp
1082	1082	Phe	475	480	C (Coo ⁻)

拉曼光谱中酰胺 I 和酰胺 III 谱带对蛋白质的主链构象是灵敏的, 蛋白质的主链构象主要根据酰胺基团的振动频率来进行分析判断, 由文献 [6] 所提供的对应关系为表 2 所示。在杀虫蛋白的拉曼谱中, 酰胺 I 谱带为一宽带, 强主峰位于 1665 cm^{-1} 和 1680 cm^{-1} , 酰胺 III 带存在较强的 1245 cm^{-1} 谱

峰, 可以判断杀虫蛋白二级结构可能主要由 β 折叠和无规则卷曲组成。而 1654 和 1285 cm^{-1} 附近的峰值很弱, 表明它的 α 螺旋很少。

利用 Lippert 等^[3]建立的定量计算二级结构的方法, 对杀虫蛋白的二级结构中 α 螺旋, β 折叠和无规卷曲进行定量计算, 量取图 1 水溶液谱的

1 240 cm^{-1} 和图 2 重水溶液谱的 1 632 cm^{-1} 、1 660 cm^{-1} 峰高与系统中作为内标的 1 448 cm^{-1} 带的强度比值 (表 3), 代入线性方程中求解, 得到 α 螺旋 8%, β 折叠 58%, 无规卷曲 34%.

表 2 激光拉曼光谱中蛋白质的酰胺基团振动频率归属表

	酰胺 I	酰胺 III
α 螺旋	(1 654 $\pm$ 5) cm^{-1} 强	(1 285 $\pm$ 15) cm^{-1} 弱
β 折叠	(1 670 $\pm$ 5) cm^{-1} 强	(1 235 $\pm$ 10) cm^{-1} 强
无规则卷曲	(1 665 $\pm$ 5) cm^{-1} 强	(1 246 $\pm$ 5) cm^{-1} 强

表 3 杀虫蛋白和聚-L-赖氨酸的三种构象的 1 240、1 632、1 660 cm^{-1} 带对其 1 448 cm^{-1} 带的强度比值

	水溶液 1 240 cm^{-1}	重水溶液	
		1 632 cm^{-1}	1 660 cm^{-1}
聚-L-赖氨酸, α 螺旋 ¹⁾	0.00	0.80	0.55
聚-L-赖氨酸, β 折叠 ¹⁾	1.20	0.72	0.88
聚-L-赖氨酸, 无规卷曲 ¹⁾	0.60	0.08	0.78
杀虫蛋白	0.70	0.40	0.64

¹⁾ 数据取自文献 [3].

Lippert 的方法把 β 回折归入无规卷曲内, 近期研究表明, 可从无规卷曲内分出 β 回折结构, 对于 β 回折酰胺 I 通常出现在 1 665~1 675 cm^{-1} , 酰胺 III 出现在 1 255~1 300 cm^{-1} [7], 由于杀虫蛋白在 1 253 cm^{-1} 处有强峰, 此频率高于 β 折叠和无规卷曲的频率, 应属于 β 回折或 α 螺旋, 根据计算结果知它的 α 螺旋很少, 所以杀虫蛋白含有大量的 β 回折结构.

通过以上的定性分析和定量计算, 可知杀虫蛋白主要由 β 折叠和无规卷曲组成, 后者含有丰富的 β 回折结构

2.2 S—S 键空间结构

拉曼光谱带的 500~700 cm^{-1} 范围反映了含有 S—S 和 C—C 的伸缩振动, 其中 C—C—S—S—C—C 键存在三种构型, 可由 S—S 链的振动频率加以判断, 510 cm^{-1} 谱带为扭曲-扭曲-扭曲构型, 525 cm^{-1} 谱带为扭曲-扭曲-反式构型, 540 cm^{-1} 谱带为反式-扭曲-反式结构 [8]. 我们测定杀虫蛋白的振动频率出现在 540 cm^{-1} , 因此杀虫蛋白中所含的两个半胱氨酸侧链形成的二硫桥的 C—C—S—S—C—C 链为反

式-扭曲-反式构型.

2.3 侧链环境

蛋白质的某些残基随环境改变而变化, 这从其侧链光谱带的一些特征谱线可反映出来.

2.3.1 酪氨酸残基存在的环境: 820 cm^{-1} 和 857 cm^{-1} 带是酪氨酸残基的环振动带, 是由环呼吸振动和面外弯曲振动倍频之间的 Fermi 共振产生的, 蛋白质中酪氨酸所处的环境从这对谱带的强度比可以反映出来, 当其强度比为 0.3~0.5 时, 表示酪氨酸残基“埋藏”在疏水环境并在其 OH 基和负电荷受体之间形成强氢键, 当强度比为 1.25~1.40 时, 则指示酪氨酸残基全部暴露于溶剂中. 对该样品, 测得 $I_{857}:I_{820}=1.11$, 故根据这对谱带强度比值及下方程式, 可计算“埋藏”和“暴露”的酪氨酸残基 [9].

$$0.5Nb + 1.25Nc = I_{857}:I_{820}$$

$$Nb + Nc = 1$$

式中 Nb 和 Nc 分别为“埋藏”和“暴露”的摩尔数

计算结果表明: 样品中的 10 个酪氨酸残基有 8 个暴露在分子表面, 2 个埋藏在疏水环境中.

2.3.2 色氨酸残基的环境: 色氨酸的吲哚环振动可显示许多带, 正如表 1 所列. 其中 1 356 cm^{-1} 带的强度受环境的影响, 当色氨酸埋藏在分子内部时, 该带则锐而强, 当它暴露在分子表面时, 不存在此带, 谱图上 1 356 cm^{-1} 处未见锐峰揭示该蛋白质的色氨酸主要暴露在分子表面.

从样品的拉曼光谱还可知, 620 cm^{-1} 和 1 082 cm^{-1} 归属于苯丙氨酸残基.

综上所述, 激光拉曼光谱在研究生物大分子空间结构上作为一种较新的技术, 在测定蛋白质的 β 折叠含量、二硫键构型以及某些侧链氨基酸残基的环境等方面有其独特优点, 因而在研究蛋白质结构上有着重要位置. 类产碱假单胞菌杀虫蛋白是该实验室从蝗虫病原菌的分泌物中首次分离提纯得到的, 它属于一种细胞外毒素, 且国内外均未见对此类毒素构象研究方面的报道, 因此确定该蛋白质的分子结构对了解它的杀虫机理, 发展农业生产具有重要意义. 目前, 我们正在对该蛋白质的杀虫机理作详细研究, 主要是依据对它空间结构的分析, 我们知道它的芳香性侧链主要分布在分子表面, 因而推测有可能形成一个疏水区, 并与分子表面的亲水区形成镶嵌, 这一疏水-亲水镶嵌结构有利于该杀虫蛋白与蝗虫胃、肠等处的表皮细胞受体完全结

合,产生毒性,对蝗虫产生致死作用,而成为一种安全的细菌杀虫蛋白。

参 考 文 献

- 1 刘世贵,朱文,杨志荣,等.一株蝗虫病原菌的分离鉴定.微生物学报 (Liu S G, Zhu W, YANG Z R, *et al.* Acta Microbiologica Sinica), 1995, **35** (2): 90~ 96
- 2 张文,杨志荣,朱文,等.类产碱假单胞菌杀虫物质的分离纯化和鉴定.微生物学报 (Zhang W, Yang Z R, Zhu W, *et al.* Acta Microbiologica Sinica), 1998, **38** (1): 57~ 62
- 3 Lippert J L, *et al.* Determination of the secondary structure of proteins by laser Raman spectroscopy. J Am Chem Soc, 1976, **98**: 7075~ 7080
- 4 Chen M C, Lord R C, Mendelsohn R. laser-excited raman spectroscopy of biomolecules. V conformational changes associated with the chemical denaturation of lysozyme. J Am Chem Soc, 1974, **96** (10): 3038~ 3042
- 5 Suh J S, Moskovits M. Surface-enhanced raman spectroscopy of amino acids and nucleotide bases adsorbed on silver. J Am Chem Soc, 1986, **108** (15): 4711~ 4718
- 6 朱克莉,姜淑仙,练永宁.天然酶与变性酶的拉曼光谱研究.生物物理学报 (Zhu K L, Jiang S X, Lian Y N. Acta Biophysica Sinica), 1988, **4** (1): 34~ 38
- 7 孙永泰,桂璐璐,林政炯.中华眼镜蛇细胞毒素溶液构象的激光拉曼光谱研究.生物物理学报 (Sun Y T, Gui L L, Lin Z Q. Acta Biophysica Sinica), 1987, **3** (2): 135~ 140
- 8 Sugeta H, Go A, Miyazawa T. Vibrational spectra and molecular conformations of dialkyl disulfides. Bulletin of the Chemical Society

of Japan, 1973, **46** (11): 3407~ 3411

- 9 Craig W S, Gaber B P. Laser raman scattering from an enzyme of well documented structure, human carbonic anhydrase b. J Am Chem Soc, 1977, **99** (12): 4130~ 4133

Studies on Structure of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* Insecticidal Protein. LUO Xia, YANG Zhi-Rong, ZHU Wen, LIU Shi-Gui (National Laboratory for Grass Land Biological Control, Sichuan University, Chengdu 610064, China).

Abstract *Pseudomonas pseudoalcaligenes* insecticidal protein was isolated and purified successfully. Amino acid composition analysis showed that it is an acid protein. Laser Raman spectra of the insecticidal protein have been obtained and analysed. It is found that protein of the sample contains predominantly β -sheet content. The majority of tyrosyl residues are exposed and a few are buried in the protein of the sample. The sample has trans-linkage configuration of C—C—S—S—C—C

Key words *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, insecticidal protein, Raman spectroscopy

正常人眼的多焦视诱发电位特征

余敏忠

(卫生部眼科学实验室, 中山医科大学中山眼科中心, 广州 510060)

摘要 研究 31 只正常眼视野中央 8.6 度的多焦 (多刺激野) 视诱发电位 (multifocal visual evoked potential, MVEP) 在视野各部位的特征。观察到平均反应密度随离心度增加而减少, 并且在下半视野比在上半视野相应部位高; 在上半视野, MVEP 波形的极性反转发生率较高。MVEP 在视野中的改变反映了视网膜和大脑视皮层解剖特征及其拓扑投射关系。

关键词 多焦视诱发电位, 视野, 离心度

学科分类号 R770.4

视诱发电位 (visual evoked potential, VEP) 可反映视觉系统的功能状况, 已广泛应用于科研和临床诊断中。然而, 常规的 VEP 用一个大刺激野的图象或闪光刺激大范围的视网膜, 因而不能分别反映视野内各个小区的视功能, 对非中心部位的微小病灶不敏感。局部 VEP 可反映视野内指定小区的视功能, 但由于刺激野较小, 需要叠加的次数较多。如果把视野分成许多小区逐个测量局部 VEP,

则所需时间太长而难以应用, 另外, 由于视觉系统状态会随时间变化, 这样测得的各个小区局部 VEP 难以相互比较。

近年来, Sutter 等^[1]发明了一种多焦 (多刺激野) 视网膜电图技术。它采用伪随机序列控制同时分别刺激视网膜多个不同部位, 用一个通道常规电

Tel: (020) 87330394; E-mail: yumz@163.net

收稿日期: 1999-01-05, 修回日期: 1999-05-12