

- 3 Kuhnl P, Spielmann W. A third common allele in the transferrin system, Tf^{C3}, detected by isoelectric focusing. *Hum Genet*, 1979, **50**: 193~ 198
- 4 Constands J, Kuhnl P, Viau M et al. A new procedure for the determination of Tf^C subtypes by isoelectric focusing. *Hum Genet*, 1980, **55**: 111~ 114
- 5 谭明, 吴梅筠. 成都地区汉族群体 Tf 亚型基因频率的调查. 遗传与疾病, 1988, **5**: 233~ 235
- 6 郭大伟, 郭景元. 广东地区人群血清转铁蛋白遗传多态现象及其法医学应用 初步探讨. 法医学杂志, 1989, **5**: 1~ 3
- 7 喻忠义, 黄力力, 许博博等. 血痕 Tf 亚型检测及北京地区基因频率分布调查. 中国法医学杂志, 1993, **8**: 77~ 79
- 8 Bjellqvist B, EK K, Righetti P G et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*, 1982, **6**: 317~ 319
- 9 郭尧君, 郭强. 目前最高分辨率的电泳——固相 pH 梯度等电聚焦. 生物化学与生物物理进展, 1994, **21**: 143~ 146
- 10 郭尧君, 郭强, 黄力力等. 用固相 pH 梯度等电聚焦分析 Gc 蛋白亚型. 生物化学与生物物理进展, 1994, **21**: 356~ 359
- 11 Yuasa I, Saneshige Y, Suenaga K et al. Transferrin variants in Japan and New Zealand. *Hum Hered*, 1987, **37**: 20~ 25
- 12 Kamboh M I, Kirk R L. Distribution of transferrin subtypes in Asian, Pacific and Australian Aboriginal Populations. *Hum Hered*, 1983, **33**: 237~ 243
- 13 Dykes D D, Defurio C M, Polesky H F. Transferrin subtypes in US Amerindians, Whites and Blacks using thir layer agarose gels. *Electrophoresis*, 1982, **3**: 162~ 164
- 14 Weidinger S, Cleve H, Schwarzfischer F et al. Transferrin subtypes and variants in Germany. *Hum Genet*, 1984, **66**: 356~ 360
- 15 Pascali V L, Ranalletta D, Auconi P. Improved typing of

- human serum transferrin by isoelectric focusing. *Hum Genet*, 1982, **61**: 39~ 41
- 16 Gorg A, Weser J, Westermeier R et al. Isoelectric focusing with immobilized pH gradients for the analysis of transferrin subtypes and variants. *Hum Genet*, 1983, **64**: 222~ 226

Subtyping of Transferrin and Distribution of Gene Frequencies. GUO Yaojun, LI Xinhui (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*); ZHU Haizhen, SHEN Ziwei (*Department of Biological Sciences and Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China*).

Abstract Six phenotypes TfC1, TfC2, TfC1C2, TfC1C3, TfC1Dchi and TfC2Dchi were detected by isoelectric focusing with immobilized pH gradients in pH 5.05~ 5.60. Tf^{C3} has never been revealed in the Han population before. The Gene frequencies are as follows: Tf^{C1} = 0.7420, Tf^{C2} = 0.2420, Tf^{C3} = 0.0027, Tf^{Dchi} = 0.0133. There is a good agreement between the observed and expected values corresponding to the Hardy-Weinberg equilibrium. The allele frequencies for Tf^{C1}, Tf^{C2} and Tf^{Dchi} are quite similar to those previously reported.

Key words transferrin, gene frequencies, immobilized pH gradients isoelectric focusing

产朊假丝酵母细胞壁 33 ku 蛋白的功能研究*

张西平 张楚瑜 王鄂生

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 通过胰蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶对产朊假丝酵母 *Candida utilis* 细胞壁的酶解, 发现一种分子质量为 33 ku 的酵母细胞壁主要结构蛋白。研究显示, 在细胞壁上这种蛋白质与细胞壁绝大多数蛋白质成分不同, 它不被胰蛋白酶水解, 但对枯草杆菌蛋白酶的作用敏感。33 ku 蛋白存在于酵母菌整个对数生长期的细胞壁中, 特别是在对数早期细胞壁中, 它是唯一的对胰蛋白酶作用不敏感的蛋白质成分。实验证明, 该蛋白质对维系酵母细胞壁骨架成分葡聚糖的相互连接和细胞壁的完整结构, 具有重要作用, 是一种重要的酵母细胞壁嵌合蛋白。

关键词 产朊假丝酵母, 细胞壁蛋白质, 蛋白酶酶解

* 国家自然科学基金资助项目 (39500074). 收稿日期: 1996-12-17, 修回日期: 1997-03-02

酵母细胞壁在细胞的代谢活动中具有重要的生物学功能，作为细胞与外界环境的中介，细胞壁构成细胞的骨架，调节细胞内外的物质运输，并参与细胞的免疫应答，细胞识别等一系列生物学过程。

细胞壁的主要成分包括葡聚糖，甘露聚糖，几丁质和蛋白质。葡聚糖是细胞壁的主要骨架成分，几丁质含量则随细胞种类及生长状态而有很大差异，甘露聚糖-蛋白质复合物填充在细胞壁葡聚糖骨架上，是细胞壁主要的功能分子，负责完成细胞壁的各种生理功能。

目前已知细胞壁含 30~40 种糖基化程度不同的蛋白质分子，其中一些蛋白质分子还具有酶活性，如转化酶，磷酸酶，葡聚糖酶。另一些蛋白质则作为细胞表面抗原决定簇，参与细胞免疫反应。其他绝大多数细胞壁蛋白则是细胞壁结构蛋白。

在酵母细胞壁蛋白质成分的结构与功能研究中，最常用的是裂解酶（ β -1, 3 葡聚糖酶）。它主要水解细胞壁的骨架成分葡聚糖，从而使蛋白质成分从细胞壁上游离出来，便于提取纯化和研究^[1~3]。巯基乙醇，尿素，脱氧胆酸钠，EDTA，SDS，Triton X-100 等试剂也常用于细胞壁蛋白质成分的分析研究^[1,4]。但有关蛋白酶在研究酵母细胞壁蛋白质成分等方面的作用则一直没有报道。本研究利用胰蛋白酶，枯草杆菌蛋白酶对酵母 *Candida utilis* 细胞壁的特殊降解作用，发现了一种特殊的细胞壁蛋白，并研究了这种蛋白质成分在细胞壁分子结构中的功能。

1 材料与方法

产朊假丝酵母 *Candida utilis* BKM Y-74 由俄罗斯科学院微生物生理与生化研究所（莫斯科）提供。

Candida utilis 培养基组成见文献 [5]，培养条件为 25℃，200 r/min。酵母生长情况通过在 540 nm 的光吸收值检测。聚偏二氟乙烯（polyvinylidene difluoride, PVDF）膜购自 Millipore。

酵母细胞壁制备：酵母培养至对数生长期早期。1 000 g 离心 10 min，并用 pH 7.4 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗两次。细胞悬浮物用 Vortex 加玻璃珠（直径 0.45~0.5 mm）在 1 000 r/min 振荡 30 s，冰浴 1 min，重复 4~6 次。于 1 000 g 离心 5 min，取上层白色细胞壁沉淀，用 1% NaCl，10% 葡萄糖和 pH 7.4 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗涤。细胞壁和没有破碎的细胞通过蔗糖梯度离心分离（1 000 g, 40% 蔗糖）。细胞壁样品的纯度在相差显微镜下检查^[1]。

细胞壁的蛋白酶酶解：细胞壁悬浮在 pH 7.4 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中与酶液共保温，在 540 nm 测定光吸收的变化。

细胞壁蛋白质的抽提：细胞壁及酶解后的细胞壁用 1% NaCl, pH 7.4 的 10 mmol/L Tris-HCl，洗数次再用 1% SDS 沸水浴抽提 5 min。

蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳根据 Laemmli 方法^[6]。

蛋白质 N 端序列测定：根据 Matsudaira 的方法^[7]，蛋白质聚丙烯酰胺电泳后，把凝胶浸在转移缓冲液（50 mmol/L 硼酸钠，pH 8.3, 20% 甲醇）中 30 min，同时将 PVDF 膜用甲醇浸泡处理后转入转移缓冲液保存。将 PVDF 膜平铺在数张转移液浸过的滤纸上，再将凝胶平铺在 PVDF 膜上，上面再放数张滤纸，在 0.5 A 电泳 1 h。将转移到 PVDF 膜上的蛋白质用考马斯亮蓝染色，切下蛋白带，并用甲醇脱色。根据 Edman 原理，用 Applied Biosystems model 475A 测定蛋白质 N 端序列。

细胞壁总糖测定按 Dubois 等的方法^[8]。

细胞壁电镜照片制作：细胞壁样品用 pH 7.2 的 0.2 mol/L 二甲砷酸缓冲液洗两次，并用 5% 戊二醛，5% 二甲亚砜的缓冲液固定 2 h，然后用 2% 四氧化锇复固定 6 h。用浓度递增的乙醇（30%，50%，70%，80%，90%，100%）脱水后，2% 醋酸铀乙醇溶液染色 1 h。包埋使用 araldite，在明胶中聚合 4 d。柠檬酸铅复染 40 min^[9]。超薄切片机使用

LKB-4800. 用电子显微镜 HU-IIF (Hitachi) 观察并拍摄。

细胞壁酶解碎片的电镜照片的制备：细胞壁酶解后，1 000 g 离心 10 min，取上清，滴在铜网上晾干，用 pH 6.5 的 1% 磷钨酸染色 2 min，用电子显微镜 HU-IIF (Hitachi) 观察并拍摄。

2 结 果

2.1 细胞壁的酶解

细胞壁蛋白质组成如图 1 所示。对数生长期早期的细胞壁与胰蛋白酶保温后，绝大多数细胞壁蛋白质的含量都显著降低或全部都被除去，只能检测到一种分子质量为 33 ku 的蛋白质，而在对数生长中、晚期的细胞壁上，除 33 ku 蛋白质，还可检测到一种分子质量为 116 ku 的蛋白质以及其他几种微量蛋白质成分。而当细胞壁与枯草杆菌蛋白酶保温后，不论对数早期还是中、晚期的细胞壁上都检测不到蛋白质成分（图 1）。

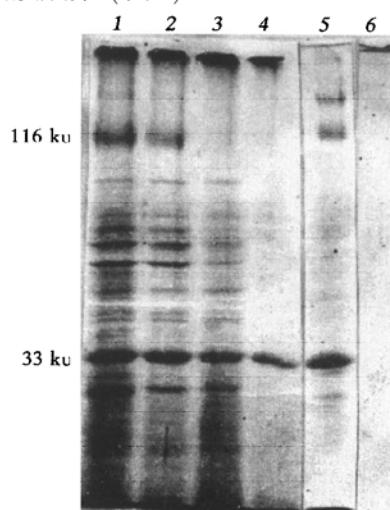


图 1 *Candida utilis* 细胞壁蛋白组成的

SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (10%) 电泳

1：对数晚期细胞壁；2：对数中期细胞壁；3：对数早期细胞壁；4：胰蛋白酶酶解后的对数早期细胞壁；5：胰蛋白酶酶解后的对数中(晚)期细胞壁；6：枯草杆菌蛋白酶水解后的细胞壁。

为研究 33 ku 蛋白质的性质，以下实验均以对数早期细胞壁为研究对象。图 2 所示为细胞壁的酶解曲线。由图 2 可见，当细胞壁与胰蛋白酶保温后，光吸收值降低不明显（约 10%），而当细胞壁与枯草杆菌蛋白酶保温后，光吸收值降低约 40%。进一步延长保温时间，光吸收值并不降低。

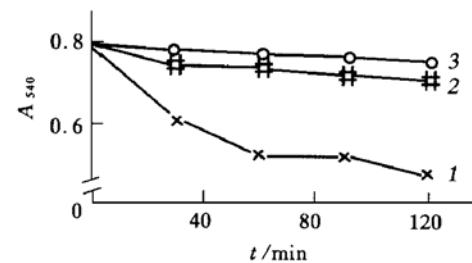


图 2 *Candida utilis* 细胞壁样品与枯草杆菌蛋白酶
(1) 和胰蛋白酶 (2) 保温后，光吸收值的变化
3：对照样品。

2.2 细胞壁酶解前后总糖含量的变化

细胞壁与胰蛋白酶保温后，细胞壁总糖含量降低 26%，而当细胞壁与枯草杆菌蛋白酶保温后，细胞壁总糖含量降低 38%。即 33 ku 蛋白质固定着细胞壁上能被蛋白酶酶解游离下来的多糖的 1/3 (表 1)。

表 1 *Candida utilis* 细胞壁与不同蛋白酶保温后细胞壁总糖含量的变化

	对照	胰蛋白酶	枯草杆菌蛋白酶
细胞壁上多糖/%	100	73 ± 3	62 ± 3
上清中多糖/%	0	26 ± 2	38 ± 2

2.3 细胞壁酶解前后的电镜照片

Candida utilis 细胞壁分为两层，即外层电子致密层，主要是甘露糖-蛋白质成分，和内层电子疏松层，主要是葡聚糖（图 3）。当细胞壁与胰蛋白酶保温后，细胞壁的外观没有明显的变化，只是电子致密层略变薄，在酶解上清中只观察到小的细胞壁碎片（图 3）。而当细胞壁与枯草杆菌蛋白酶保温后，电镜照片显示，细胞壁的完整结构受到破坏特别是电子疏

松层，即葡聚糖骨架结构也受到了破坏（图3），电子致密层也被破坏，同时在酶解上清液

中发现较大的细胞壁碎片（图3）。

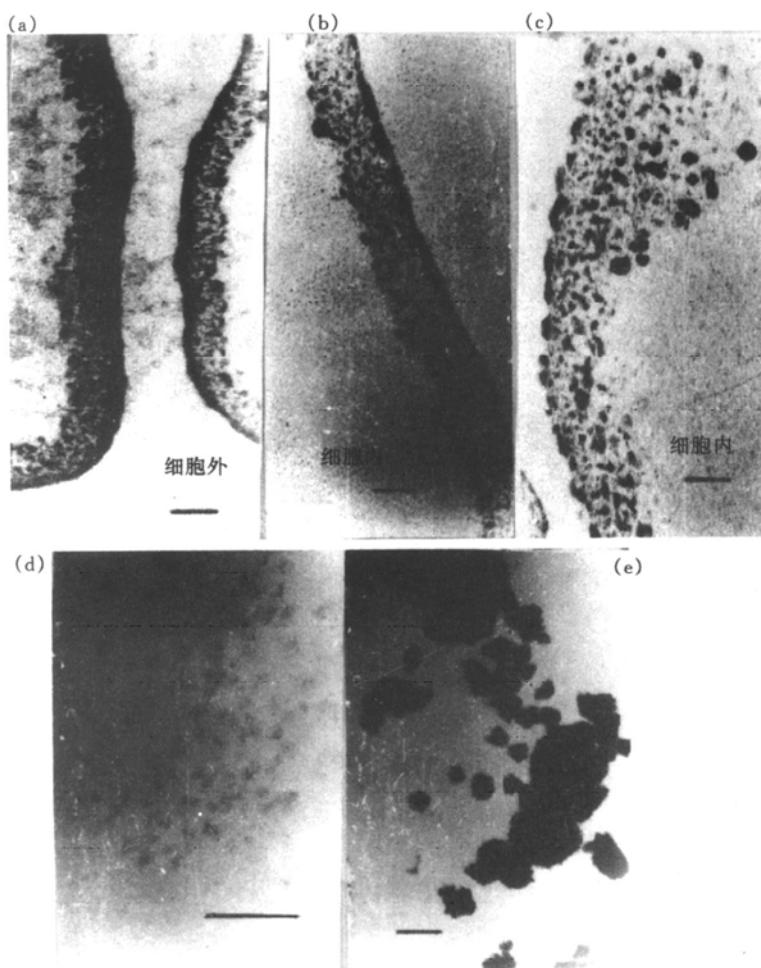


图3 *Candida utilis* 细胞壁与不同蛋白酶保温后，细胞壁和细胞壁水解上清液中细胞壁碎片的电镜照片

图中标尺代表 150 nm. (a) 对照样品：完整细胞壁；(b) 胰蛋白酶水解后的细胞壁；(c) 枯草杆菌蛋白酶水解后的细胞壁；(d) 胰蛋白酶水解后上清中的细胞壁碎片；(e) 枯草杆菌蛋白酶水解后上清中的细胞壁碎片。

2.4 33 ku 蛋白的 N 端序列

蛋白质序列测定表明（图4），33 ku 蛋白的 N 端序列与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 细胞壁葡聚糖酶的 N 端序列有很大的同源性^[10]。根据研究，酿酒酵母细胞壁葡聚糖酶的分子质量约为 31 ku，具有 β -1, 3-葡聚糖内切酶活性^[11]，而不具有 β -1, 3-葡聚糖外切酶活性^[10]。

(a) Val-Gly-Asp-Leu-Ala-Phe-Asn-Leu-Gly-Val-Gln-Ser-Ala-Gly
(b) Ile-Gly-Glu-Leu-Ala-Phe-Asn-Leu-Gly-Val-Lys-Asn-Asn-Asp-Gly

图4 *Candida utilis* 细胞壁 33 ku 蛋白质的 N 端序列
(a) 与 *Saccharomyces cerevisiae* 细胞壁 β -1, 3-葡聚糖酶 N 端序列 (b) 的比较

3 讨 论

细胞壁大部分蛋白质都是细胞壁表面蛋白质，它们或位于细胞壁外表面或细胞壁内表

面。以往的实验多以裂解酶或去污剂等破坏细胞壁的结构，从细胞壁上提取蛋白质成分^[1~4]，但得到结果并不能证明蛋白质分子在细胞壁上的定位。本研究结果表明，绝大部分细胞壁蛋白质都被胰蛋白酶水解，而 33 ku 蛋白质则由于细胞壁多糖的保护作用，不易被水解，当细胞壁与枯草杆菌蛋白酶保温后，由于该酶的作用位点的广泛性，因此细胞壁所有蛋白质，包括 33 ku 蛋白质都被水解。而提纯的 33 ku 蛋白质则可被胰蛋白酶降解（待发）。因此 33 ku 蛋白质可能部分位于葡聚糖骨架中，或嵌合在葡聚糖骨架中，而且胰蛋白酶的作用位点很可能隐藏在细胞壁骨架内，因此该蛋白质表现出对胰蛋白酶不敏感。

根据 Herreo 等^[2]的研究，在酵母中 *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces nuxii*, *Hansenula wingei*, *Saccharomycopsis lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia scolyti*, *Candida albicans* 细胞壁用裂解酶处理后，从细胞壁上游离出来的蛋白质成分主要是分子质量大于 100 ku 的分子，除此而外，随种的不同还有一种分子质量为 31.5~34 ku 的蛋白质。Gil 等^[12] 以 *Saccharomyces cerevisiae* 细胞壁 33 ku 蛋白质为抗原制备抗体，在 *Candida albicans*, *Candida guilliermondii* 中均有交叉反应。由此可以推断，虽然在不同种中分子质量有差异，但这种 31.5~34 ku 的细胞壁蛋白质是酵母细胞壁共有的特征性蛋白。Aguilar 等^[13] 报道，以培养 24 h 的 *Candida albicans* 的菌丝体液体培养物为抗原制备抗体，可吸附在酵母态的 *Candida albicans* 细胞壁上。研究结果显示这些抗体可以识别分子质量为 21、33、44 ku 的细胞壁蛋白质。这表明 33 ku 蛋白质存在于不同生长状态的酵母细胞壁中，并且它很可能是酵母细胞壁必需的一种重要结构成分。

Elorza 等^[14]发现，酵母 *Candida albicans* 原生质体在 28℃ 温浴后，可以观察到分子质量为 29、30、34 ku 的蛋白质与一些高分子质量蛋白质 (> 100 ku) 从原生质体中分泌出

来，并且推测这些蛋白质与细胞壁的再生有关。Klebl 等^[10]的工作显示，β-1, 3-葡聚糖酶对酵母细胞壁葡聚糖和几丁质有特异的吸附性。*Candida utilis* 33 ku 蛋白质的 N 端序列与 *Saccharomyces cerevisiae* 细胞壁 β-1, 3-葡聚糖内切酶 N 端有很大的同源性。在 *Candida utilis* 中，从细胞壁上提纯的 33 ku 蛋白质也可检测到微弱的 β-1, 3-葡聚糖内切酶活性（待发表）。因此估计 33 ku 蛋白质所具有的 β-1, 3-葡聚糖内切酶活性与细胞壁形态变化中细胞壁骨架的断裂与延伸有关。

电镜研究结果表明，细胞壁经胰蛋白酶处理后，虽然细胞壁绝大部分蛋白都被水解，在细胞壁上主要仅有一种蛋白质，即 33 ku 蛋白质，但细胞壁的结构基本没有变化；而经枯草杆菌蛋白酶处理后，所有的细胞壁蛋白均被水解，细胞壁的完整骨架结构被破坏，细胞壁变得更松散，同时在水解上清液中有较大的细胞壁碎片。因此 33 ku 蛋白质可能以某种方式起着连接和固定部分细胞壁骨架成分葡聚糖的作用。当 33 ku 蛋白质被枯草杆菌蛋白酶水解后，这些葡聚糖骨架成分也随之被游离出来。这进一步证实了上述的推论，即 33 ku 蛋白质是一种细胞壁嵌合蛋白。

酵母细胞壁嵌合蛋白大多通过 β-1, 6-糖苷键与细胞壁骨架连接，用 SDS 等去污剂不能从细胞壁上抽提出来，但可用 β-1, 3-葡聚糖酶将它们水解下来^[15]。在 *Saccharomyces cerevisiae* 细胞壁上目前已确定的细胞壁嵌合蛋白包括 205、145、80、55 ku 四种。33 ku 蛋白质与这些蛋白质不同，它可被 SDS 抽提出来。因此 33 ku 蛋白质可能以一种完全不同的，或非共价的方式嵌合在细胞壁上。

参 考 文 献

- 1 Elorza M V, Murgui A, Sentandreu R. Dimorphism in *Candida albicans*: contribution of mannosugars to the architecture of yeast and mycelial cell walls. J Gen Microbiol, 1985, 131: 2209~ 2216
- 2 Herreo E, Sanz P, Sentandreu R. Cell wall proteins liberated by zymolyase from several ascomycetous and imperfect yeasts. J Gen Microbiol, 1987, 133: 2895~ 2903

- 3 van der Vaart J M, Caro L H P, Chapman J W et al. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1995, **177** (11): 3104~3110
- 4 Gil M L, Casanova M, Martinez J P. Changes in the cell wall glycoprotein composition of *Candida albicans* associated to the inhibition of germ tube formation by EDTA. *Arch Microbiol*, 1994, **161**: 489~494
- 5 Ermacova S A, Mansurova S E, Lobakova E S et al. Accumulation of pyrophosphate and other energy rich phosphorus compounds under various conditions of yeast growth. *Arch Microbiol*, 1981, **128**: 394~397
- 6 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680~685
- 7 Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted into polyvinylidene difluoride membrane. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 10035~10038
- 8 Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 1956, **28**: 350~357
- 9 Zubatov A S, Rainina E J. A cytochemical study of the localization of acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* at different growth phases. *Histochem J*, 1979, **11**: 299~310
- 10 Klebl F, Tanner W. Molecular cloning of a cell wall exo- β -1, 3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 1989, **171** (11): 6259~6264
- 11 Vladimir M, Klebl F, Tanner W. Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* BGL2 gene product, a cell wall endo- β -1, 3-glucanase. *J Bacteriol*, 1993, **175** (7): 2102~2106
- 12 Gil M L, Casanova M, Martinez J P et al. Antigenic cell wall mannoproteins in *Candida albicans* isolates and in other *Candida* species. *J Gen Microbiol*, 1991, **137**: 1053~1061
- 13 Aguiar J M, Baquero F, Jones J M. *Candida albicans* extracellular antigens released into a synthetic culture medium: characterization and serological response in rabbits. *J Gen Microbiol*, 1993, **139**: 3005~3010
- 14 Elorza M V, Marcilla A, Sentandreu R. Wall mannoproteins of the yeast and mycelial cells of *Candida albicans*: nature of the yeast and mycelial cells of *Candida albicans*: nature of the

- the glycosidic bonds and polydispersity of their mannan moieties. *J Gen Microbiol*, 1988, **134**: 2393~2403
- 15 Van Berkel M A A, Caro L H P, Montijn R C et al. Glycosylation of chimeric proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 1994, **349**: 135~138

Study on the Function of 33 ku Cell Wall Protein of *Candida utilis*. ZHANG Xiping, ZHANG Chuyu, WANG Esheng (College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China).

Abstract By means of proteolysis with trypsin and subtilisin, in the cell wall of *Candida utilis*, a major structural cell wall protein with molecular mass of 33 ku was found. The 33 ku protein was quite different from most of the other cell wall proteins in *Candida utilis*. In cell wall it was not hydrolysed by trypsin, but was sensitive to subtilisin. The 33 ku protein was found to exist in cell wall of all logarithmic growth phases. Especially in early logarithmic growth phase, it was proved to be the only protein that was not sensitive to trypsin. The result demonstrated that this protein was important for connection of cell wall skeleton components—glucan, and for the intact structure of cell wall. It was an important integral cell wall protein.

Key words *Candida utilis*, cell wall protein, proteolysis

外源基因在蛙神经元中的表达*

夏另朝 李金照 陈燕 邱蓉 张瑛 邓巍

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 含 β -半乳糖苷酶基因的真核表达载体 DNA, 直接注射到视神经切断或正常的黑斑蛙的视网膜中。注射 2 周后, 观察到蛙视网膜神经细胞仍然有转染基因表达, 这种基因转染对神经元的类型没有选择性。被转染神经元主要局限于注射点周围。蛙视神经切断后, 被外源基因转染的细胞分布区域略广于视神经未切断的情况。

* 中国科学院视觉信息加工开放实验室资助项目。收稿日期: 1996-12-13, 修回日期: 1997-03-10