

TPA Stimulates the Synthesis of $\alpha_5\beta_1$ Integrin. HE Jian Yu, FANG Xin Chu, CAO Li Huan, ZHA Xi Liang (*Department of Biochemistry, Shanghai Medical University, Ministry of Public Health Key Laboratory of Glycoconjugates Research, Shanghai 200032, China*).

Abstract TPA is a potential tumor promotor and an activator of protein kinase C (PKC). TPA can activate PKC as a substituter of DG in a very low concentration, thus causing a serial of changes of cells' function. Observing the change in adhesion of NIH3T3 cell after using 100 nmol/L TPA to act on NIH3T3 cell, it was discovered that TPA increase NIH3T3 cell adhesion to Fn by increasing synthesis of integrin α_5 、 β_1 subunits. Further study on the content of integrin α_5 、 β_1 subunits ——the major receptor of Fn on the cells' surface showed that after the TPA acts on cell for 24 hours, the content of integrin α_5 、 β_1 subunits increased 52.3% and 51.6%

respectively. To analyze the total content of N-oligosaccharides and its constituent proportion after TPA acts on cell, ^3H -mannose incorporation into N-oligosaccharides and lectins chromatography were used. The result has no difference from that of control. It can be said that increasing adhesion is induced increasing the syntheses the content of α_5 and β_1 subunits of the cells. The PKC inhibitor Sphingosine was added during TPA acting on cell, it was found that both the α_5 and β_1 content and the adhesion of cells to Fn recovered to the control level. It proved that increasing $\alpha_5\beta_1$ synthesis thus increasing adhesion of cell to Fn by TPA is mediated by PKC. Besides the inhibitor of tyrosine protein kinase also can block the action of TPA increasing the content of $\alpha_5\beta_1$ integrin syntheses.

Key words integrin, cell adhesion, protein kinase C, TPA

营养成分与培养时间对极端嗜盐菌紫膜合成的影响*

迪丽拜尔·托乎提 惠寿年 徐晓晶

(新疆师范大学生物系, 乌鲁木齐 830053)

周培瑾

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 紫膜是极端嗜盐菌细胞的一大特征, 它是一个简单而精巧的光能转换器. 它的生物合成过程与选用培养基的营养成分、培养时间有关, 实验结果表明紫膜生物合成的最适培养基为合成培养基 (SM) 最适合成时间为 7 d.

关键词 营养成分, 培养时间, 紫膜, 生物合成

学科分类号 Q936

视紫红质 (rhodopsin) 是蛋白质和视黄醛 (retinal) 的结合体, 是动物成视过程的物质基础. 1971 年, Oesterhelt 和 Stoekenins 研究发现, 嗜盐杆菌 (halophilic bacteria) 中存在着一种和视紫红质很相似的蛋白质, 这种被称作细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin, bR) 的光敏感蛋白质存在于嗜盐菌的细胞膜中, 也是蛋白质和视黄醛组成的, 由于这种蛋白质颜色呈紫色, 因此也称紫膜 (purple membrane)^[1]. 这项研究结果引起了人们的极大兴趣, 此后紫膜的研究取得了许多进展, 其中包括它的结构与功能、基因调控等.

紫膜是一种光驱动的质子泵, 它吸收光子, 把膜内的 H⁺ 质子泵到膜外, 从而形成一种跨膜的 H⁺ 质子电化学梯度, 这种化学能可以催化产生 ATP, 即将化学能转化成生物能量, 也就是说, 由光驱动形成化学能, 在质子泵的结构中将化学能转化成生物能量^[2]. 所以有人形象地描述说, bR 在细菌的生命活动中, 扮演着一个光能电池的角色.

与此同时, 对 bR 结构的研究也取得了很大的进展. 早期研究一般认为, bR 是紫膜中唯一的一

* 国家自然科学基金资助项目 (39760004).

收稿日期: 1998-11-16, 修回日期: 1999-03-18

种蛋白质, 其分子质量 (M) 为 26.0 ku^[3], 是由 248 个氨基酸组成的, 这些氨基酸序列已被测定, 后来的研究发现, 紫膜中还有一种 M 为 27.0 ku 的蛋白质, 这种蛋白质在 bR 的 N 端增加了 13 个氨基酸, 被称作细菌视紫红质前体 (the precursor of bR, Pre-bR). bR 基因测序的结果说明: bR 的基因编码 bR 的 N 端有 13 个额外氨基酸, 成熟 bR 的 248 个氨基酸, bR 的 C 端有一个额外的天冬氨酸, 整个基因没有插入序列. 对 bR 的三维结构表明, bR 以 α 螺旋的方式横跨膜折叠 7 次^[4].

到目前为止, 人们在对紫膜的生物合成研究中, 所有的培养基都只是蛋白胨 (peptone medium), 菌株为 *H. halobium* 或其突变株. 提纯的紫膜经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定, 出现以下几种情况:

a. 一般出现二条带, 其 M 分别为 26.0 ku, 27.0 ku. M 为 26.0 ku 是 bR 带; M 为 27.0 ku 的带是 Pre-bR 带^[5].

b. 出现三条带, M 分别为: 26.5 ku, 27.8 ku, 28.5 ku, 其中, 26.5 ku 是 bR 带; 27.8 ku 是一种修饰过的 Pre-bR, 在成熟的端带有一个额外的氨基酸; 28.5 ku 的带是 Pre-bR. 其解释为: Pre-bR 是分二步进行的^[6].

c. 四条甚至七条带, 多出的几条带被解释为 Pre-bR 是分几步合成的^[7].

d. 只有一条带, 其为, 其解释为在 bR 的生物合成过程中, 蛋白链提前成熟, 是因为水解加工的错误而产生这样一条特异带^[8].

本实验的目的是研究培养基中不同的营养成分及不同培养时间对紫膜的生物合成的影响.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *Halobacterium halobium* CCM2029.

1.1.2 培养基:

a. 复合培养基 (complex medium, CM)^[9]: Cosamino acids (Difco), 7.5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g/L; Yeatract (Difco), 10.0 g/L; 柠檬酸钠, 3.0 g/L; KCl, 2.0 g/L; NaCl, 250 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/L; 用 2 mol/L NaOH 调 pH=7.0.

b. 合成培养基 (synthetic medium, SM)^[10]: 每 100 ml 中含 DL-Ala, 43 mg; L-Arg, 40 mg; DL-Asp, 45 mg; L-Cys, 5 mg; L-Glu, 130 mg; Gly, 6 mg; DL-His, 30 mg; DL-I, 44 mg; L-Leu, 7 mg;

L-Lys, 85 mg; DL-Met, 37 mg; DL-Phe, 26 mg; L-Pro, 5 mg; DL-Val, 100 mg; KNO_3 , 10 mg; K_2HPO_4 , 5 mg; KH_2PO_4 , 5 mg; 柠檬酸钠, 50 mg; $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.23 mg; $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.7 mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.03 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.044 mg; NaCl, 25 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g; 甘油, 0.1 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 5 μg ; 所用的氨基酸多数购自 Sigma 公司 (Glu 和 Gly 为国产产品), 用 5 mol/L NaOH 调至 pH=7.0.

c. 蛋白胨培养基 (peotone medium, PM)^[11]: Bacteriological peptone L37 (Oxiod), 10 g/L; 柠檬酸钠, 3.0 g/L; KCl, 2.0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 g/L; NaCl, 250 g/L; 用 2 mol/L NaOH 调 pH=7.0.

d. 海水培养基 (seawater medium, SWM)^[12]: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.2 g/L; KCl, 5 g/L; MgSO_4 , 24.4 g/L; MgCl_2 , 34.6 g/L; NaBr, 0.66 g/L; NaCl, 19.5 g/L; NaHCO_3 , 0.17 g/L; 用 2 mol/L NaOH 调 pH=7.

1.2 方法

斜面菌种转移至盛 50 ml CM 的三角瓶中, 光照, 37 $^{\circ}\text{C}$, 250 r/min, 培养约 3 d, 当培养液开始发紫色时, 即以 10% 的接种量把菌液分别接入盛 100 ml SM 的四个三角瓶中, 相同条件培养, 菌液开始发紫时, 再以 10% 的接种量把菌液分别接入四个三角瓶中, 每个三角瓶分别盛上述一种培养基, 培养基的体积均为 1 L, 37 $^{\circ}\text{C}$, 光照, 90 r/min 条件下, 培养 4 d, 菌液 7000 r/min $\times$ 15 min 离心, 沉淀用 25% 水溶液洗涤, 再离心, 沉淀用 8 ml 左右的 25% NaCl 溶液溶解, 加入 2mg DNase (0.2 g/L DNase), 搅拌均匀, 装入透析袋中在蒸馏水中透析, 4 $^{\circ}\text{C}$, 搅拌, 过夜, 透析液 7 000 r/min $\times$ 5 min 离心, 上清液 50 000 g $\times$ 30 min 离心, 沉淀分别用 25% NaCl 水溶液, 0.1 mol/L NaCl 水溶液, 蒸馏水洗涤, 每次洗完后相同条件离心, 最后沉淀用 0.5~0.8 ml 蒸馏水悬浮, 按 4 ml 1.3 mol/L, 6.5 ml 1.5 mol/L, 1 ml 60% 的比例铺好蔗糖不连续梯度, 加入悬浮的样品液 0.5~0.8 ml, 100 000 g $\times$ 28 h 离心可见离心管中部有紫色带, 上部有红色带, 收集此紫色带, 4 $^{\circ}\text{C}$, 搅拌, 蒸馏水中透析一昼夜, 透析液 50 000 g $\times$ 30 min 离心, 沉淀即紫膜蛋白, 取适量沉淀, 用适量浓缩胶缓冲溶液稀释, 按浓缩胶缓冲液和样品缓冲液之比为 3:1 的比例加入样品缓冲

液, 加热 5 min, 即可进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 其中浓缩胶浓度为 3%, 分离胶浓度成为 11%. 当样品在浓缩胶内时, 电压为 60 V, 电流为 10 mA; 进入分离胶电压为 120 V, 电流为 16 mA, 电泳时间为 1.25 h 左右, 电泳结束取出胶板, 考马斯亮蓝染色 45 min, 脱色, 观察电泳结果.

再分别培养 6 d、7 d, 以研究不同培养时间对紫膜合成的影响.

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 用四种不同培养基成分培养 6 d 后, 形成紫膜的 SDS-PAGE 电泳图谱 (图 1).

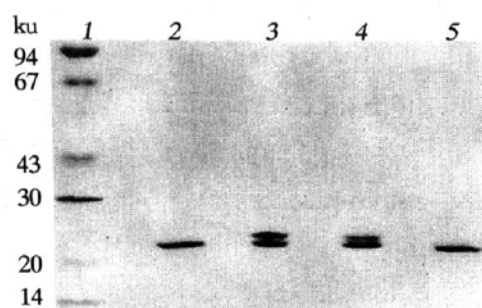


图 1 四种培养基培养 6 d 后形成紫膜的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱比较

1: 分子质量标准 (Pharmacia): 94 ku, 67 ku, 43 ku, 30 ku, 20 ku, 14 ku; 2: 经 CM 培养; 3: 经 SM 培养; 4: 经 PM 培养; 5: 经 SWM 培养.

2.1.2 用四种不同培养基成分培养 7 d 后, 形成紫膜的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱 (图 2).

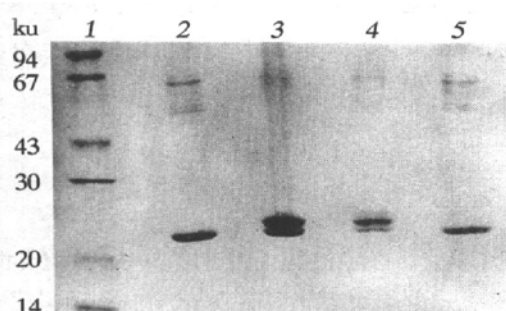


图 2 四种培养基培养 7 d 后形成紫膜的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱比较

1: 分子质量标准 (Pharmacia): 94 ku, 67 ku, 43 ku, 30 ku, 20 ku, 14 ku; 2: 经 CM 培养; 3: 经 SM 培养; 4: 经 PM 培养; 5: 经 SWM 培养.

2.1.3 用培养基培养 6 d 和 7 d 后, 紫膜合成情况电泳比较图谱 (图 3).

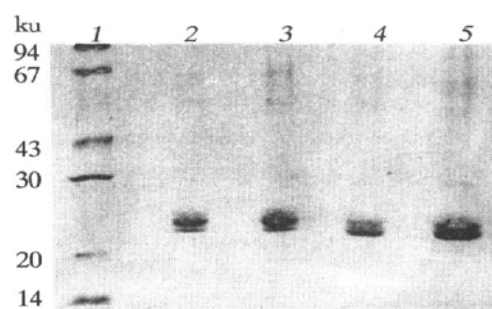


图 3 同种培养基 (PM) 培养不同时间后形成紫膜的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱比较

1: 分子质量标准 (Pharmacia): 94 ku, 67 ku, 43 ku, 30 ku, 20 ku, 14 ku; 2-3: 经 7 d 培养; 4-5: 经 6 d 培养.

2.2 讨论

2.2.1 不同营养成分, 培养时间对紫膜合成的影响 (表 1), 结果表明: a. 紫膜合成过程最适培养基为合成培养基 (SM). b. SM 培养基经 6 d、7 d 培养合成的紫膜出现均匀二条谱带其分子质量 (M) 分别为 26.0 ku 和 27.0 ku, 7 d 紫膜合成量比 6 d 合成两增加一倍以上. c. 紫膜合成最适培养时间为 7 d.

2.2.2 用 PM 培养基培养 6 d、7 d 后, 形成紫膜后的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱比较结果表明: a. 培养 6 d、7 d 后, 出现三条非均一的谱带, 其分子质量 (M) 分别为 26.5 ku, 27.8 ku, 28.5 ku. b. 培养 7 d 的表现在 27.8 ku 谱带含量成倍增加.

表 1 营养成分、培养时间对紫膜合成的影响

培养基成分	电泳 (紫膜条带)		紫膜合成量	
	6 d	7 d	6 d	7 d
CM	1	1	+	+
SM	2	2	+	++
PM	2	3	+	+
SWM	1	1	+	+

参 考 文 献

- Oesterhelt D, Stoekenius W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature New Biol*, 1971, **233** (39): 149~152
- Oesterhelt D, Tittor J. Two pupms, one principle: light-driven ion transport in halobacteria. *Trends Biochem Sci*, 1989, **14** (9): 57~61
- Bridger J, Walker I D. Photoreceptor protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*, molecular weight and retinal binding site. *Biochemistry*, 1976, **15** (4): 792~798
- Yu A Ovchinnikov. Rhodopsin and bacteriorhodopsin: structure

- 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