

盐生盐杆菌在不同营养条件下紫膜蛋白形成的差异*

辛化伟 阎章才 周培瑾¹

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

提 要 用四种培养基培养产生紫膜极端嗜盐菌盐生盐杆菌(*Halobacterium halobium*)菌株 R1, 通过超速离心和蔗糖密度梯度纯化紫膜, SDS-PAGE 后用考马斯亮蓝染色的结果显示其合成的紫膜蛋白的形式有所差异。从蛋白胨培养基上获得的紫膜有三条蛋白带, 分子量约 26~27.5kD, 而从复合培养基、合成培养基和人工海水培养基上获得的紫膜, 仅呈现一条蛋白带, 分子量约 26kD, 即蛋白胨培养基上的成熟紫膜蛋白形式。Western Blotting 的结果证明, 在以上四种培养基上获得的纯化紫膜经 SDS-PAGE 后考马斯亮蓝染色的条带确系紫膜蛋白, 但还存在含量低于考马斯亮蓝染色灵敏度的紫膜蛋白带, 从复合培养基、合成培养基和人工海水培养基所得紫膜在 28kD 左右有一条浅带, 但从蛋白胨培养基所得紫膜无此带; 四种培养基所得紫膜在 23.5kD 左右都有一条浅带。可见, 培养基营养成分的差别影响了紫膜蛋白的存在形式。

关键词 极端嗜盐菌, 紫膜, 前体加工

分类号 Q936 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)03-0220-25

极端嗜盐菌是古细菌(包括产甲烷菌、极端嗜盐菌和极端嗜热菌)的一个类群, 生活在高盐(约 2~5mol/L NaCl)的自然或人工环境中, 如盐湖、盐碱湖、晒盐场等地域。在极端嗜盐古细菌的细胞膜上, 具有一类特殊的色素蛋白——视黄醛蛋白, 现已发现四种具有不同功能的视黄醛蛋白, 即细胞视紫红质(Bacteriorhodopsin, bR)、氯视紫红质(Halorhodopsin, hR)、感光视紫红质 I (Sensory rhodopsin, sR-I) 或慢视紫红质(Slow rhodopsin), 及感光视紫红质 II (sR II) 或避光视紫红质(Phoborhodopsin)^[1~3]。对盐生盐杆菌(*Halobacterium halobium*)细菌视紫红质 bR 的研究最透彻, 现已确知, 由三个 bR 分子构成的三聚体可在细胞膜上形成一个刚性的二维六边形的稳定特征结构, 即紫膜^[4]。紫膜在光照条件下, 可以吸收光能, 将质子从细胞内转运到胞外, 产生跨膜电势, 用以合成 ATP, 即它具有光驱质子泵的功能。紫膜的结构相当稳定, 是嗜盐菌中不依赖盐而稳定存在的蛋白复合体形式之一(另一个是气泡)。紫膜中的唯一蛋白组份只有 bR 一种, 成熟的紫膜蛋白约 26kD, 由 248 个氨基酸组成, 形成 7 个跨膜 α -螺旋, 定位于细胞膜上, N 末端位于细胞外, C 末端在细胞质中, 视黄醛分子与 216 位的赖氨酸通过 ω -氨基形成席夫碱(Shiffs base)与紫膜蛋白相连接。嗜盐菌在一定诱导条件下(光照、限制供氧量等), bR 合成量远高于其它的膜蛋白, 以致细胞膜的 50% 以上都是紫膜。早期的研究发现(成熟)紫膜蛋白是经前体形式(Pre-bR)再转化而成^[5], 比较成熟紫膜蛋白的氨基酸序列^[6,7]和紫膜蛋白全基因序列^[8]可知, Pre-bR 较成熟紫膜蛋白在 N 末端多 13 个氨基酸,

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39870014)

¹微生物资源前期开发国家重点实验室

收稿日期:1997-12-05, 修回日期:1998-06-23

另外 Pre-bR 的 C 末端的一个天冬氨酸在成熟蛋白分子中也被切除。进一步研究发现,在蛋白胨培养基上合成的紫膜蛋白在电泳图谱上可呈现三种形式,除了 pBO(“bR 前体”)和 mBO(成熟 bR),还有一种分子量居于其间的蛋白分子形式^[9]。甚至有人提出存在更多种紫膜蛋白形式^[10]。上述紫膜均来自蛋白胨培养基上培养的菌体。本文研究了在不同营养条件下紫膜蛋白形成的差异。

1 材料和方法

1.1 菌株

Halobacterium halobium 菌株 R1,来自于 DSM671,系可产紫膜的气泡缺陷突变体。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 蛋白胨培养基(PEPM):细菌蛋白胨(Oxford L37)10.0g/L,柠檬酸钠 3.0g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20.0 g/L, KCl 2.0 g/L, NaCl 250.0 g/L, pH7.0。

1.2.2 复合培养基(CM):水解酪蛋白(Difco)7.5 g/L,酵母提取物(Difco)10.0g/L,其它盐的成分同 PEPM。

1.2.3 合成培养基(SM):柠檬酸钠 0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20.0 g/L, KCl 1.0 g/L, KNO_3 0.1 g/L, KH_2PO_4 0.15 g/L, K_2HPO_4 0.15 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.71m g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0005m g/L, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2.3m g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.44m g/L, 甘油 1.0 g/L, NaCl 250.0 g/L, pH6.8(氨基酸成分详见 Handbook of microbiological Media, CRC press, 1993)。

1.2.4 人工海水培养基(RSWM):酵母提取物(Difco)5 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g/L, KCl 5.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 24.2 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 34.6 g/L, NaBr 0.66 g/L, NaHCO_3 0.17 g/L, NaCl 197 g/L, pH7.0。从复合培养基平板上挑取单菌落至复合培养基斜面, 37℃ 培养 7d 后,接入 50mL 流体复合培养基中, 37℃、250r/min 摇床、光照培养 3~5d,以 10%接种量接入 4 个盛有 100mL 合成培养基的 250mL 三角瓶中,相同条件下培养至菌液呈紫色,分别以 10%接种量接入盛有 1L 四种培养基的大三角瓶中, 37℃、130r/min 摇床、光照培养。

1.3 紫膜的分离和纯化

取一定培养时间的菌液经 15000g 离心 25min 收集菌体, 25% NaCl 溶液洗涤沉降的菌体后,用 10 mL 25% NaCl 溶液重悬菌体,加入 0.5 mg DNase I,于透析袋内 4℃ 蒸馏水中透析过夜。细菌裂解液以 50000g 15min 离心去除未裂解的细胞和较大的细胞碎片, 20000g 40min 离心沉降紫膜,将紫膜用 25% NaCl、0.1% NaCl、蒸馏水洗涤三次,每次洗涤后在相同条件下离心。最后用 0.5~1.0 mL 蒸馏水悬浮,铺在事先准备好的 1.3 mol/L (4.0 mL)→1.5 mol/L (6.5 mL)→60% (1.0 mL)蔗糖不连续梯度的离心管的最上层,每一管加入量 0.5 mL。100000g 离心 28 h,收集紫膜带(本实验室方法)。于蒸馏水中透析去除蔗糖, 20000 g 40min 离心收集纯化紫膜。

1.4 紫膜蛋白的 SDS-PAGE 和 Western Blotting

SDS-PAGE 按常规方法进行,用考马斯亮蓝染色。以合成培养基上获得的紫膜进行制备型 SDS-PAGE,切下单一的成熟紫膜蛋白带,注射兔子制备紫膜蛋白抗血清。West-

ern Blotting 按照 Amersham Life Science 公司提供的方法进行。

2 结果和讨论

2.1 紫膜蛋白的分离与纯化

分别收集 *Halobacterium halobium* 菌株 R1 在四种培养基上对数生长后期和稳定期的菌体,经透析、裂解细胞后,离心收集沉降在离心管底部的紫膜,经多次洗涤后紫膜呈紫色,洗涤上清液由红色或浅红色到几乎无色。进行蔗糖密度梯度离心,紫膜集中在离心管中部(PM),有时在紫膜带上方有一很浅的红膜带(RM)。收集中央紫膜作为纯化紫膜。

2.2 SDS-PAGE 和 Western Blotting

将以上分离纯化紫膜或部分纯化的、未经蔗糖密度梯度离心的紫膜进行 SDS-PAGE,考马斯亮兰染色结果如图 1 所示。在蛋白胨培养基上,从处于不同培养时期的菌体获得的紫膜都呈现三条带(第 7、8 泳道分别是对数生长末期和稳定期紫膜蛋白的情形)。这三条带的大致分子量约 26~27.5kD,以 26kD 的蛋白带染色最深,27.5kD 和居于 26~27.5kD 之间的蛋白的量较低。随着培养时间的延长,27.5kD 蛋白的量相对于 26kD 和 26~27.5kD 间蛋白的量逐渐减少。但即使在稳定期继续培养 2~3d 后,三条带仍可清晰看出。如图 2 蛋白扫描图谱所示,以 26kD 蛋白带的吸光度作为参照基准,27.5kD、中间带和 26kD 三条蛋白带的相对含量可以用这三条带的吸光度比值粗略表示。计算结果表明,在对数生长末期和稳定期这三条带的蛋白含量的相应比值分别是

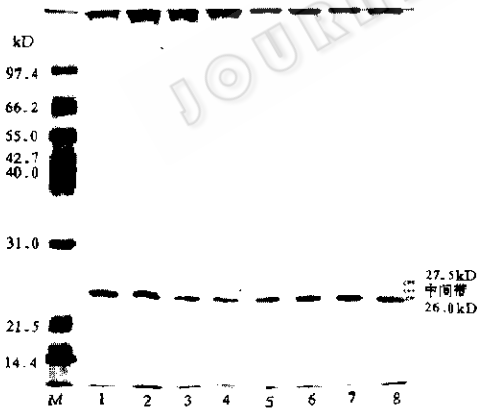


图 1 纯化或部分纯化紫膜蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 Coomassie-brilliant blue-stained SDS-PAGE of purified or partially purified purple membrane from four different media

M: Molecular weight marker; Purple membrane derived from media: 1, 2: RSWM; 3, 4: CM; 5, 6: SM and 7, 8: PEPM. 1, 3, 5, 7: Late logarithmic phase; 2, 4, 6, 8: Stationary phase.

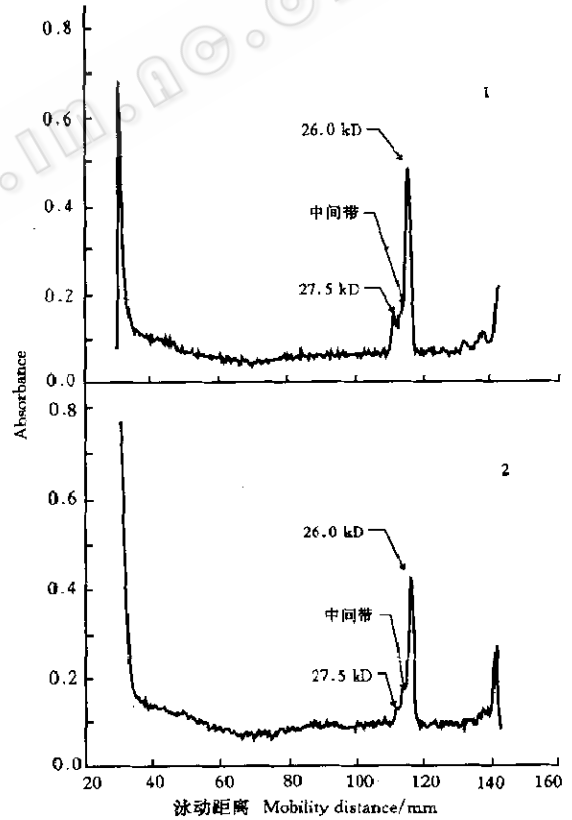


图 2 蛋白胨培养基所得紫膜蛋白 SDS-PAGE 的扫描图谱

Fig. 3 Scanning profile of SDS-PAGE of purple membrane derived from peptone medium 1: Late logarithmic phase; 2: Stationary phase

0.41:0.42:1.00 和 0.34:0.40:1.00, 显示出三种形式紫膜蛋白相对含量的变化。从合成培养基、人工海水培养基和复合培养基上对数生长末期和稳定期菌体获得的紫膜蛋白能被考马斯亮蓝染色的只有 26kD 一条带(1~6 泳道), 均未出现在蛋白胨培养基中三条带的情形。为了进一步验证 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色的结果, 对四种培养基稳定期所得紫膜蛋白 SDS-PAGE 作 Western Blotting 分析, 如图 3 所示。1) 蛋白胨培养基所得紫膜为 4 条带, 除了考马斯亮蓝染色的 27.5kD、中间带和 26.0kD 三条带外, 还有一条分子量较小的 23.5kD 蛋白带, 着色较浅; 2) 复合培养基、人工海水培养基和合成培养基所得紫膜都为三条带以 26.0kD 为主, 也有 23.5kD, 以及一条分子量较大的 28.0kD 蛋白带, 此 28kD 带在蛋白胨培养基上没有出现。在四种培养基上新出现的 23.5kD 和除蛋白胨培养基以外的三种培养基上新出现的 28.0kD 蛋白带在考马斯亮蓝染色图谱上没有显现出来, 可见其含量低于考马斯亮蓝检测蛋白的灵敏度。另外还发现, 从人工海水培养基上得到的粗膜和紫膜的 Western Blotting 结果不一样, 如图 4 所示, 蛋白胨培养基所得紫膜蛋



图 3 纯化或部分纯化紫膜蛋白电泳的 Western blotting
Fig. 3 Western blotting of purified or partially purified purple membrane derived from four different media
1. CM; 2. RSWM; 3. SM; 4. PEPM.

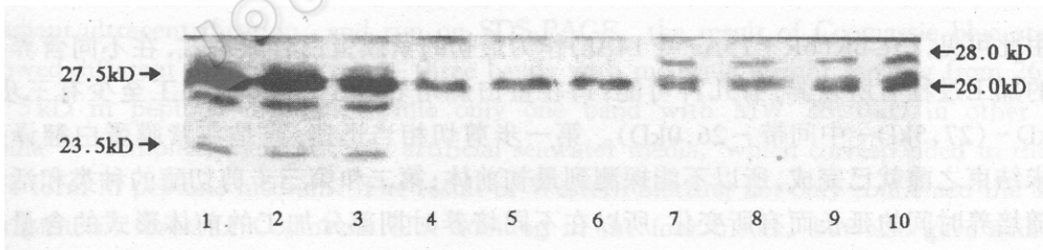


图 4 部分纯化紫膜和粗膜蛋白电泳的 Western blotting
Fig. 4 Western blotting of partially purified purple membrane or crude membrane
1~3: Partially purified purple membrane from medium PEPM; 4~6: Partially purified purple membrane from medium RSWM; 7~10: Crude membrane from RSWM.

白为三条(26.0~27.5kD) + 1 条(23.5kD), 人工海水培养基所得紫膜主要为 26.0kD 蛋白带(23.5kD 和 28.0kD 蛋白带着色较浅, 在此图几乎看不出), 而粗膜的蛋白带形为一条(28.0kD) + 2 条(26.0kD 左右) + 1 条(23.5kD)。在 26.0kD 左右出现的紧挨着的 2 条带比较特殊, 因为在人工海水培养基所得紫膜中没有出现这种情况。

3 讨论

自 20 世纪 70 年代 Oesterhelt & Stoeckenius 首先发现紫膜以来, 极端嗜盐菌的紫膜

作为一种特化的膜结构,其物理化学和光化学特征已被广泛研究,但对其生物合成与加工过程的研究不多。建立紫膜蛋白合成、加工的模式,将有助于我们对极端嗜盐菌基因表达、调控及其对表达产物的加工等作用机制的深入了解。

Dellweg 等测定了 mg^{2+} 饥饿及嗜盐菌菌体转变为球质体时新结合的紫膜蛋白的存在形式。在该条件下,新合成的紫膜蛋白仅以 27.0kD 紫膜蛋白前体形式(Pre-bR)存在,N-端测序结果与后来的基因序列测定结果相符合,Pre-bR 比成熟 bR 多 13 个氨基酸。Seehra^[11]的实验结果证实球质体仅合成 Pre-bR,前体加工过程被完全抑制,并且当补充 Mg^{2+} (将菌体重新加入蛋白胨培养基)、菌体再转为杆状并合成“成熟紫膜蛋白”时,Pre-bR 不能加工成为成熟 bR 形式。Wolfer 进一步发现,从蛋白胨培养基上获得的紫膜除了成熟蛋白的形式外,还有两条泳动慢、分子量稍大的蛋白带,他们认为分子量最大的蛋白带就是在球质体中合成的前体蛋白形式。Miercke 等用温和去污剂处理蛋白胨培养基所得紫膜,根据所获得的结果推测紫膜蛋白存在五种形式,分子量居于前体和成熟蛋白之间。另外,有许多人应用放射性同位素饲喂和脉冲示踪技术研究 bR 的合成过程,没有提到前体形式的问题,还有人甚至发现有分子量相差极大的情形^[12]。

在本工作中,蛋白胨培养基所得紫膜经 SDS-PAGE,用考马斯亮兰染色的结果与 Wolfer 的结果相近,有三条分子量相近的蛋白带,但结合 Western Blotting 的结果看来,紫膜蛋白的最初合成前体 Pre-bR 可能不是蛋白胨培养基上的 27.5kD 蛋白带,而更可能是其他培养基上所得紫膜的 28.0kD 蛋白带。这是因为从基因序列上人们已经确定了紫膜蛋白最初前体的形式是 bR + 13Aa (或 14Aa),计算其分子量约 27.8~27.9kD,与 28kD 最为接近。Western blotting 结果证实 28.0kD 蛋白确系紫膜蛋白成分,而且人们至今还没有发现紫膜蛋白存在糖基化影响电泳迁移率的修饰作用。可能是由于在蛋白胨培养基上 Pre-bR 的第一步加工相当迅速,或发生在紫膜蛋白的翻译过程完成之前,以至不能探测到。

由此可见,Pre-bR(bR + 13Aa 或 14Aa)作为最初的紫膜蛋白合成形式,在不同营养条件下的加工过程有所差异,有几种可能:1)在蛋白胨培养基上,前体的加工至少有三步:28.0kD - (27.5kD - 中间带 - 26.0kD)。第一步剪切相当迅速,或是在紫膜蛋白翻译过程尚未结束之前就已完成,所以不能探测到最初前体;第二和第三步剪切酶的种类和活性可能随培养时间的延长而有所变化,所以在不同培养时期部分加工的前体形式的含量有所差异,随培养时间的延长 27.5kD 和中间蛋白带的含量逐渐减少。2)在合成培养基、复合培养基和人工海水培养基上,前体的加工可能是第一和第二步完成的。在合成培养基和复合培养基上可能是直接由前体剪切形成成熟蛋白,而且从考马斯亮蓝染色图谱上看不到前体带,说明其加工效率相当高。在人工海水培养基上,前体的加工可能分两步进行,在 Pre-bR 和成熟 bR 之间还有一中间形式,但它与蛋白胨培养基中的中间形式情形不同,在蛋白胨培养基上的中间形式可以在紫膜中探测到,而此中间形式在纯化紫膜中没有,说明这种形式可以整合到膜上,但不能参与到紫膜中,需经过进一步加工才能组合形成紫膜,但也不排除这是一种不正确的切割形式的可能性。3)23.5kD 蛋白形式比较特殊,可能是 bR 蛋白翻译过程暂时终止,或是成熟 bR 进一步切割的结果。如是前者,也许与视黄醛分子的结合有关,尚需进一步实验验证。Pre-bR 的前导序列的生物学功能至今

还未完全阐明, 其被切割的复杂性也非常特殊, 可能存在一类特殊的肽酶, 专门识别其前导序列并加以切割。进一步的研究工作可以从设法寻找和分离特定的加工酶入手。

参 考 文 献

- [1] Stoeckenius W, Bogomolni R A. *Ann Rev Biochem*, 1982, **52**:587~616.
- [2] Oesterhelt D, Tittor J. *Trends Biochem Sci*, 1989, **14**:57~61.
- [3] Spudich J L. *J Bacteriol*, 1993, **175**:7755~7761.
- [4] Oesterhelt D, Stoeckenius W. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973, **70**:2853~2857.
- [5] Dellweg H G, Sumper M. *FEBS Lett*, 1980, **116**:303~306.
- [6] Khorana H G, Gerber G T, Herlihy W C *et al*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**:5054~5050.
- [7] Ovchinnikov Y A, Abdulaev N G, Feigina M Y *et al*. *FEBS Lett*, 1979, **100**:219~224.
- [8] Dunn R, McCoy J M, Simsek M *et al*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**:6744~6748.
- [9] Wolfer U, Dencher N A, Buldt G *et al*. *Eur J Bio Chem*, 1988, **174**:51~57.
- [10] Miercke L J W, Ross P E, Stroud R M *et al*. *J Biol Chem*, 1989, **264**(13):7531~7535.
- [11] Seehra J S, Khorana H G. *J Biol Chem*, 1984, **259**(7):4187~4193.
- [12] Sumper M, Herrmann G. *Biochem*, 1978, **89**:229~235.

DIFFERENT PROTEIN FORMS OF PURPLE MEMBRANE PRODUCED BY *HALOBACTERIUM HALOBIVM* UNDER VARIOUS NUTRITIONAL CONDITION*

Xin Huawei Yan Zhangcai Zhou Peijin¹

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract The extremely halophilic bacterium, purple membrane producing *Halobacterium halobium* strain R1 were cultured in four liquid media which consist of different constituents. After the purple membrane is harvested by ultracentrifugation and purified by sucrose density gradient ultracentrifugation, and run on SDS-PAGE, the result of Coomassie blue staining showed different bR protein forms: three bands with molecule weight ranging from 26.0 to 27.5 kD in peptone medium, while only one band with MW 26.0 kD in other three media—complex, synthetic and artificial seawater media, which corresponded to the mature form in peptone medium. The result of Western blotting not only confirmed the different proterin forms of Coomassie blue staining in the four media, but also gave additional bands that Coomassie blue can not detect due to its lower sensitivity: 1) in the complex, synthetic and artificial seawater media, a faint 28.0 kD band existed, while in the peptone medium it did not exist; and 2) in the four media, it appeared that a faint 23.0~24.0 kD band existed. The different bR protein forms of purple membrane which result from the difference of nutritional constituents in these four media might be caused by different precursor processing enzymes or different activities of precursor processing enzyme(s) under these different nutritional conditions.

Key words Extremely halophilic bacterium, Purple membrane, Precursor process

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39870014)

¹ The State Key Laboratory of Microbial Resources (SKLMR)