



生物化学译丛

第 4 辑

生物化学译丛

(第四辑)

《生物化学译丛》编辑组编

*

上海科学技术文献出版社出版

(上海高安路六弄一号)

在沪各书店均有代售

江苏宜兴南漕印刷厂印刷

*

开本787×1092 1/16 印张4.75 字数118,000

1981年10月第1版 1981年10月第1次印刷

印数: 1- 3050

书号: 13192.29 定价: 0.65 元

《科技新书目》3-253

目 录

| | |
|---|------|
| 干扰素诱导的酶活性和它们在抗病毒状态中的作用..... | (1) |
| 依赖 cAMP 的蛋白激酶 I：一种独特的变构酶..... | (9) |
| 平兰氏阴性细菌外膜蛋白质的生物合成和功能..... | (13) |
| 现代 DNA 核苷酸序列分析的方法..... | (30) |
| 不用载体的酶稳定化..... | (37) |
| 用杂交法分离细胞表面蛋白..... | (46) |
| 测定红细胞表面唾液酸残余物的新比色法..... | (54) |
| 酶标记免疫测定中蛋白质结合的新方法..... | (58) |
| 酶促制备 [¹⁵ N] 标记 L- 谷氨酸的简单方法..... | (61) |
| 肾(尿)激肽释放酶..... | (66) |
| 前列腺素和动脉硬化..... | (67) |
| 前列腺素和凝血机能..... | (68) |
| 有关生化文献的近年情况..... | (69) |

干扰素诱导的酶活性和它们在抗病毒状态中的作用

O. Baglioni

干扰素是细胞受病毒感染后所分泌的糖蛋白，它能促使尚未受到感染的细胞建立起一种抗病毒状态。组织培养的动物细胞用干扰素处理就会通过一种还不了解的机制降低它们复制RNA和DNA病毒的能力。干扰素作用机制的早期研究是用病毒感染的细胞进行的。这些研究表明了病毒模板的积累和(或)受到抑制，但未能揭示其抑制的原因。根据一些研究者的报道，最近的工作集中于了解干扰素处理的和未处理的细胞抽提液间酶活性的差别。这些酶活性和抗病毒状态之间的确切关系至今还没有搞清楚，但是在不久的将来很可能从分子水平上对抗病毒状态作出某些解释。

dsRNA(双链RNA)是干扰素合成最有效的诱导剂。合成的 dsDNA(双链DNA)和病毒的 dsRNA都能诱导动物细胞合成与分泌干扰素。这些事实引出一个假设，即双链复制形式的病毒RNA(由RNA病毒形成的“复制中间物”)能通过一种未知的机制激发干扰素的合成。从 mengo 病毒感染的细胞得到的复制中间物确实是干扰素合成的一种有效诱导剂。Marcus 和 Sekelick 对 dsRNA 在和细胞相互作用中的巨大能力作了出色的说明。含有 dsRNA 的水泡性口膜炎病毒(VSV)单缺失型的干扰颗粒能诱导干扰素合成。这种缺失型的干扰颗粒可以看成是注射到细胞里的单个 dsRNA 分子，它足以诱导干扰素合成。而且，对于干扰素处理过的细胞抽提液来说，dsRNA 是蛋白质合成的强力抑制剂，有关 dsRNA 这种对抑制敏感性的促进作用的研究导致了发现两种酶活性。这两种酶为干扰素所诱导并依赖于 dsRNA(图1)，它们是寡聚核苷酸聚合酶和蛋白激酶，前者能催化从ATP合成一系列含有特殊的 2',5' 磷酸二酯键的寡聚核苷酸，后者能使启动因子 eIF-2 的小亚基磷酸化。寡聚核苷酸聚合酶的产物 pppA (2' p5'A) (简称 2',5' 寡聚 A 或 2,5A) 是一种核酸内切酶的激活剂，这种能合成寡聚核苷酸的酶称为 2,5A 聚合酶。

本评论主要讨论蛋白激酶和 2,5A 聚合酶-核酸内切酶系统的最近的工作以及介绍细胞抽提物中 2,5A 稳定性方面的研究。这些研究可能帮助我们了解核酸内切酶在病毒感染、并经干扰素处理过的细胞内如何发挥功能。另外关于病毒 mRNA 甲基化抑制作用的一些研究，也将作简要介绍，虽然这种抑制机构目前还未从分子水平加以阐明。在

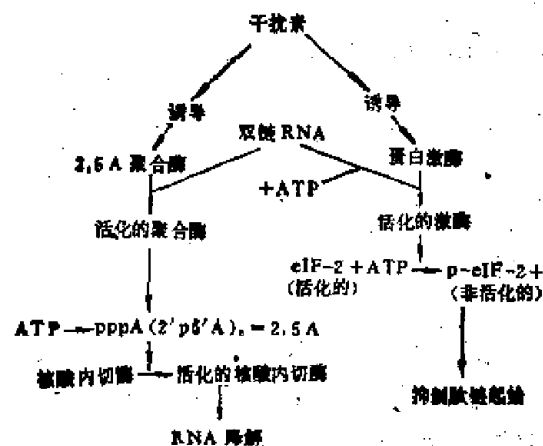


图1 干扰素对动物细胞二种效应的图解说明

这里进行讨论,是因为它是细胞抽提物中和干扰素有关而且不需要加入 dsRNA 的一种活性,病毒 mRNA 甲基化的这种抑制也可能是其翻译受阻的原因之一。

2',5'寡聚(A)聚合酶

据 Roberts 等报道,将 dsRNA 与 ATP 和干扰素处理过的 L 细胞保温后,在这种细胞的抽提物中就会形成一种低分子量的蛋白质合成抑制剂。Kerr 及其同事接着把工作推向这种抑制剂的分离与化学鉴定。由于观察到结合在琼脂糖上的合成的 dsRNA poly(I)·poly(C)能用来吸附并活化与抑制剂合成有关的酶活性,从而使这些研究变得容易了。按照 Kerr 等设计的程序,先使细胞抽提液通过小的 poly(I)·poly(C)-琼脂糖柱,接着再和 ATP 一起保温,然后将形成的抑制剂洗脱下来,并用 DEAE-纤维素层析进行纯化。这种程序现已成为人们从各种细胞抽提液中制备该抑制剂所采用的方法。但是最近在溶液中用 dsRNA 有效地合成抑制剂的条件已有报道。这种方法对于研究反应过程中 2,5A 合成的动力学,或研究不同的 dsRNA 以及其他成分的影响,都是方便的。

低分子量抑制剂的结构已从 α -和 γ - ^{32}P -ATP 标记的图谱中,通过用 DEAE-纤维素层析测定了其电荷,以及通过用 DEAE-纤维素和薄层层析鉴别了其不同核酸酶的降解产物,得到确定。简言之,这种抑制剂是由腺苷酸彼此通过磷酸二酯键连接而成的,它能抵抗裂解 3'-5' 键的酶作用。磷酸酯酶可以切下末端三磷酸酯,用蛇毒磷酸二酯酶消化的产物只有 5'AMP。此外还可借助过碘酸氧化降解, β -消去法证明它连接有 2',5'磷酸二酯。抑制剂制剂中主要成分是一种三聚核苷酸 pppA₂'p₅'A₂'p₅'A,但是也存在一些具有类似结构的其他寡聚核苷酸,这类寡聚核苷酸系列的一般通式是 pppA(2'p₅'A)_n,其中 n 为 1~10。在这些寡聚核苷酸中,除了二聚体外,全都能抑制蛋白质合成。这种 2,5A 的结构已通过化学合成得到了证实。化学合成的 2,5A 在生物活性、质子与磷的核磁共振谱等方面都和生物合成的 2,5A 完全相同。

据 Ball 等人报道,他们分别在干扰素处理的小鸡鸡胚 3T6 和 HeLa 细胞中观察到 2,5A 的合成。Hovanessian 和 Kerr 描述了在兔网织红血球裂解液中 2,5A 的合成,并表明没有经过干扰素处理的细胞抽提液通常也能合成少量的寡聚核苷酸。Stark 等指出,除两栖动物非洲爪蟾和昆虫 *Drosophila melanogaster* 以外,在鸟类和哺乳动物的不同细胞和组织中都已测出不同水平的 2,5A 聚合酶活性。小鸡输卵管当消除雌激素的刺激作用以后,可以看到 2,5A 聚合酶活性显著升高。这些情况意味着在那些高度分化的细胞,如网织红血球或输卵管细胞中,这种酶活性可能很高,而在这些细胞建立特异性功能的过程中,mRNA 的降解起着重要作用。

Baglioni 等已经研究了当细胞用干扰素处理时,2,5A 聚合酶的活性增加。在 HeLa 细胞中经过开始 2~3 小时的潜伏期后,相继的几小时内酶活性线性地上升,大约 24 小时后停止。超出对照细胞基础水平的程度因细胞株系而不同,在干扰素处理的小鸡鸡胚细胞中可高达 10,000 倍。这种酶活性的增加和 RNA 以及蛋白质合成有关,说明在用干扰素处理的细胞中合成了 2,5A 聚合酶的 mRNA,也说明要提高这种酶活性,它的 mRNA 还必需翻译。不过这些推断只有在分离了 mRNA,并将它翻译成 2,5A 之后才能得到直接证明。

Ball 报道在小鸡鸡胚细胞分去了核糖体的上清液中存在一种多肽,它是在干扰素处理后合成的,能和 2,5A 聚合酶共层析,用 EDS 胶电泳分析表明其表观分子量约为 56,000。这种多肽能和 dsRNA 结合并可借此进行部分纯化,它的合成和干扰素处理的剂量与时间有关,

同时为放线菌素 D 所阻断,说明它可能就是 2,5A 聚合酶。Ratner 等报道,他们部分地纯化了一种能合成核酸内切酶激活剂的酶,并推测这种激活剂为 2,5A。Zilberstein 等也从干扰素处理的细胞中纯化了一种能使 ATP 聚合为 2,5A 的酶。Hovanessian 和 Kerr 通过 poly(I)·poly(C)-Sepharose 柱吸附,用 M KCl 洗脱纯化了 2,5A 聚合酶和依赖于 dsRNA 的蛋白激酶,这两种酶还能进一步通过 DEAE-纤维素层析分离开来。令人惊奇的是,没有激酶的 2,5A 聚合酶对其最适活性来说还需要第二个因子,而纯化的激酶则不再依赖 dsRNA。

Baglioni 等在感染 EMCV(脑心肌炎病毒)的 HeLa 细胞中观察到 2,5A 聚合酶的诱导和病毒 RNA 合成抑制之间的相互关系。当细胞用干扰素处理时,2,5A 聚合酶活性升高,病毒 RNA 的合成就逐渐地降低(图 2A)。用不同浓度的干扰素处理,在其他细胞中也观察到类似的相关性,这些细胞中 2,5A 聚合酶的活性随着用来处理细胞的干扰素浓度增加而升高,同时 EMCV RNA 的合成受到抑制。关于干扰素处理时间及其浓度对小鸡鸡胚细胞中 VSV 复制的影响,Ball 也做了类似的观察。将用干扰素处理的 HeLa 细胞洗净并放在缺乏这种抗病毒因子的条件下培养时,2,5A 聚合酶的水平则随细胞质量的增加而减少。同时 EMCV RNA 合成的抑制也逐渐减少(图 2B)。这些结果说明,2,5A 聚合酶与病毒 RNA 的积累以及病毒复制的抑制有关。

在图 2 中,(A)为 Baglioni 等观察的结果。细胞培养物用 100 单位/毫升人纤维母细胞干扰素处理,为了测定抽提物制剂中 ³H-尿嘧啶 30 分钟的脉冲数,将培养物分份制成细胞抽提物并预先用 EMCV 感染 5 小时。(B)为 Minks 等测得的 2,5A 聚合酶活力数据,而 EMCV RNA 合成的资料则根据 Maroney 和 Baglioni 提供的。细胞用 100 单位/毫升的干扰素保温 30 小时,洗涤并在未加干扰素的培养基中培养。移除干扰素之后(时间为 0)每隔 24 小时取出一份以制备细胞抽提物并用 EMCV 感染。EMCV RNA 的合成通过 ³H-尿嘧啶 30 分钟的脉冲数来测定。2,5A 聚合酶活性以与干扰素接触 24 小时(A)或 30 小时(B)的细胞抽提物中测得的最大合成百分数表示。EMCV RNA 的合成以未经干扰素处理的细胞中所测得的最大合成百分数表示。

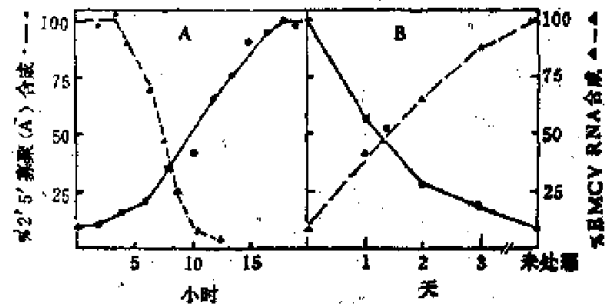


图 2 在感染的细胞中干扰素对 2,5A 聚合酶活性的诱导和对 EMCV RNA 合成的抑制(A); 移去干扰素后 2,5A 聚合酶活性的衰减和 EMCV RNA 的合成(B)

依赖于 2'5' 寡聚(A)的核酸内切酶

Lengyel 及其同事观察到干扰素处理的细胞抽提液和 dsRNA 及 ATP 一起保温会导致 mRNA 断裂,核酸内切酶降解 mRNA 的过程可以分为两个阶段:活化阶段——需要 dsRNA 和 ATP,核酸水解阶段——不需要 dsRNA 和 ATP。上述观察到的情况可以这样解释,在第一个阶段中合成 2,5A,在第二个阶段中活化的核酸内切酶降解 mRNA。这种两步式过程已被一些研究者直接证明。他们根据 Hovanessian 等的方法合成了 2,5A,并将纯化了的寡聚核苷酸加到细胞抽提物和核酸内切酶底物组成的保温系统中,这种核酸内切酶不论其处于游离的状态还是与多聚核糖体结合的状态,都能断裂细胞的 mRNA 和病毒的 mRNA。由此可见,2,5A 对蛋白质合成的抑制是由于核酸内切酶的活化及相继对 mRNA 的降解而引起的。这初步说明,不同的 RNA 被 2,5A 活化的核酸内切酶断裂的速度是不同的,但是其他研究者

没有检出病毒 mRNA 和细胞 mRNA 在断裂速度上有何差别,而且看来这样核酸内切酶似乎不大可能象限制性核酸内切酶一样能断裂特定的核苷酸顺序。

Schmidt 等及 Ratner 等已纯化了依赖于 2,5A 的核酸内切酶, Baglioni 等指出这种酶活性与干扰素作用机制有关, Baglioni 等又揭示它和机制有关的某些独特的特征。这种酶存在于干扰素处理的和未处理的细胞中,也存在于网织红细胞裂解液中,它的活性取决于 2,5A 的连续存在(当这种活化剂除去时,酶即回复为潜伏的非活性状态),它能和 2,5A 结合,但是只有 2,5A 三聚体或较高的寡聚体才能活化核酸内切酶,才是蛋白质合成的强力抑制剂。这些情况意味着如果寡聚核苷酸形成的量有限而且很快就被分解时,那么这种酶在体内就能被 2,5A 以一种瞬时的方式活化。最近 Williams 和 Kerr 将 2,5A 寡聚核苷酸加到透性的 BHK 细胞中,表明在完整细胞内 2,5A 能抑制蛋白合成。在这种透性细胞内有一种核酸酶能被瞬时地活化,同时它的活性取决于 2,5A 的加入量。

2.5' 寡聚(A)的分解代谢

Schmidt 等观察到部分纯化的核酸内切酶和 2,5A 预保温,结果导致核酸内切酶活性丧失,这是因为有降解 2,5A 的杂酶存在的缘故。这种杂物可以通过进一步的分级分离和核酸内切酶分离开来。2,5A 的主要降解产物为 5'AMP 和 ATP,说明磷酸二酯键被专一性切断了。Minks 等在细胞抽提物中也同样观察到 2,5A 的降解。这些研究者指出,2,5A 的降解速度在对照细胞抽提液中和在干扰素处理的细胞抽提液中是接近的。将 2,5A 加到 L 细胞或 Hela 细胞抽提物中,结果使这种寡聚核苷酸很快就被分解,同时核酸内切酶活性相应地降低。在不加 ATP 和缺少 ATP 再生的系统中,2,5A 降解特别快,但是在完整细胞中 2,5A 是否也被很快地分解尚有待证明。

现在还没有得到关于这些寡聚核苷酸在干扰素处理并经病毒感染的细胞内合成的直接证据,因此有关 2,5A 合成与降解的观察的确切资料,只限于细胞抽提物。不同研究者的工作表明,2,5A 活化的核酸内切酶以及降解这些寡聚核苷酸的酶,在干扰素处理的和未经处理的细胞中其存在量相近,并表明在干扰素处理后只有合成 2,5A 的酶活性显著地增加,但是有些研究者观察到核酸内切酶活性也稍有增加。在未经干扰素处理的细胞中为什么有这些酶存在,这是个谜,这个事实说明了这些酶活性可能在细胞 mRNA 的分解代谢中起着某种作用。

病毒与细胞 mRNA 间的辨别机制

关于依赖于 2,5A 的核酸内切酶在病毒感染并经干扰素处理的细胞中的功能,现在还没有获得直接证据。在这些细胞中病毒 mRNA 的积累受到抑制,但是不清楚这种抑制是否由于转录或翻译损伤,或者由于病毒模板断裂。用完整细胞进行的实验,要解释它往往是很复杂的,这是因为在感染循环过程中病毒模板和复制酶重新合成而使病毒 mRNA 放大了。病毒 mRNA 的断裂、翻译或转录的缺失能够阻止这种放大。

为了研究干扰素处理对不受放大影响的病毒 mRNA 积累的效应, Marcus 和 Sekellick 测定了用 VSV 温度敏感突变株感染的细胞中或用环己胺处理的细胞中病毒模板的积累。在这两种情况下,转录都依赖随感染病毒进入细胞的病毒复制酶。在干扰素处理的细胞中,这种初级的(primary)转录比对照要低几倍,但是在干扰素处理的细胞中,合成的 VSV mRNA 在大小和半寿期方面都和对照细胞相等。Marcus 和 Sekellick 推测,干扰素处理降低了启动病毒 mRNA 转录的可能性,但他们不能排除另一种可能,即某些 mRNA 在干扰素处理的细胞内过早地被终止或被完全降解。

Baglioni 等推测, 2, 5A 聚合酶可能被 RNA 病毒部分双链化的复制中间络合物(RI)活化, 而合成的 2, 5A 又可能局部地活化依赖于 2, 5A 的核酸内切酶。在这种情况下, 病毒 mRNA 就将首先被裂解。Nilson 和 Baglioni 在干扰素处理的细胞抽提物中证明了这种识别机制(识别可定义为区别病毒模板和细胞模板的过程)。这些研究者观察到, 在干扰素处理的 HeLa 细胞抽提液中, 共价偶联到 dsRNA 上的 mRNA 比没有连接到 dsRNA 上的 mRNA 先被裂解, 而在对照细胞抽提液中, 这种选择性降解却较少。这些研究最初是用模式底物进行的, 包括和 poly(U)一起退火带有 poly(A)的病毒或细胞 mRNA 以及和 poly(I)一起退火带有 poly(G)的 EMCV RNA, 不管 dsRNA 的位置是在 mRNA 的 3'-末端还是近 EMCV RNA 的 5'-末端, 也不管 dsRNA 的碱基组成如何, 都观察到在干扰素处理的细胞抽提物中, 与 dsRNA 连接的单链 RNA 优先降解。这种降解可能是通过 2, 5A 聚合酶和依赖于 2, 5A 的核酸内切酶的共同作用而发生的, 因为在阻止 2, 5A 合成的条件下将使 mRNA 的内切降解消除, 而有利于大量 2, 5A 合成的条件则将导致上述识别力损失。标记的 RI(从 EMCV 感染的细胞中获得)和干扰素处理的细胞抽提液一起保温, 结果被降解产生一种 20S 的“核心”, 这种“核心”能抵抗 RNase A 的消化作用, 这就清楚地说明, 在干扰素处理的细胞中存在一种酶活性, 它能从复制中间络合物的双链核心上“切削”单链的早期病毒 RNA 链。如果这种现象能在干扰素处理并经病毒感染的细胞中得到证明, 也许就能解释许多研究者在不同细胞或病毒系统中观察到的病毒 mRNA 积累的降低。

2, 5A 的合成被 EMCV 的 RI 和模式底物 mRNA(A)_n·(U)_n 所活化, 这种底物含有和 mRNA 的 3' poly(A)一起退火的 poly(U)。如果这种 2, 5A 寡聚核苷酸的合成量有限而且又被很快地分解, 那么 2, 5A 的浓度可能随其与合成位点距离的增加而减少。在这种扩散限制过程中, 依赖于 2, 5A 的核酸内切酶的局部活化, 似乎最能解释病毒与细胞 mRNA 之间的识别。

依赖于 dsRNA 的蛋白激酶

Hunt 和 Ehrenfeld 报道了多瘤病毒感染的细胞浆能抑制网织红血球裂解物中的蛋白合成。以后又报道了 dsRNA 或病毒能抑制肽链起动。Hunter 等报道, 多种 dsRNA 在 0.01~0.1 微克/毫升浓度范围内具有最大的抑制力, 但使人惊奇的是, 较高浓度的 dsRNA 没有抑制能力。这些研究者还确定, 只有配对适当, 50 个碱基对以上的 dsRNA 才具有抑制力。最近, Farrell 等发现, 在网织红血球裂解物中起动的抑制和一种蛋白激酶有关, 这个酶能使起动因子 eIF-2 的最小亚基(α)磷酸化, 并同时抑制起动子 tRNA 结合到 40S 的天然核糖体亚基上。这种抑制可细分为两个明显的步骤: 第一步是活化, 需要 dsRNA 和 ATP, 它能使分子量为 65,000 的蛋白质(P1)磷酸化, 第二步是 eIF-2 α 的磷酸化, 这一步需要 ATP, 但不需要 dsRNA。现在已有迹象表明, P1 蛋白就是依赖于 dsRNA 的蛋白激酶。

那些研究 dsRNA 影响的工作者已经在干扰素处理的细胞作成的非细胞系统中获得了类似的证据, 即蛋白激酶和促进两种多肽的磷酸化有关。但是, 这种蛋白激酶的活性检测是复杂的, 因为它的底物选择范围相当有限, 也因为在细胞抽提物中存在着蛋白质磷酸酯酶活性, 同时还因为 dsRNA 对它的特殊的活化作用。

激酶能使 P1 蛋白与 eIF-2 α 高效地磷酸化, P1 蛋白的分子量在各种哺乳动物中是不同的。Roberts 等曾用组蛋白作为激酶的底物。Zilberstein 等报道认为富含精氨酸的组蛋白 H₁ 和 H₂ 能被这种激酶磷酸化, 而 Sen 等则用 *Drosophila* HI 组蛋白作为底物。Kerr 等推测, 组蛋白的磷酸化可能对转录与细胞生长有某些生理学方面的影响, 但是说明蛋白激酶在这种功能方

面依赖于 dsRNA 的证据目前还没有得到。

Revel 等报道有一种磷酸酯酶, 它能使蛋白 P1 和 eIF-2 脱磷酸。这种磷酸酯酶的存在使得没有经过分级分离的细胞抽提液中激酶活性的检测复杂化了, 而且有些研究者发现, 在分离出来的核糖体中有利于此种酶的检测。激酶和它的底物与核糖体共沉淀, 而磷酸酯酶一般认为是留在分去了核糖体的上清液中。核糖体和 ATP 以及 dsRNA 一起作短时间保温就能使激酶活化。它的活性可用两种方法检测, 即采用 ^{32}P - γ -ATP 进行反应, 而后借助电泳分离磷酸化的产物; 或者直接测出它对蛋白合成的抑制能力。

应用这些检测方法, 某些研究者研究了干扰素处理的剂量与处理时间对蛋白激酶活性诱导的影响。Jarvis 等报道, 在 3T6 细胞中蛋白激酶的活性水平和抗病毒状态的程度与应用的干扰素浓度具有对数关系。Samuel 等根据 P1 和 eIF-2 α 磷酸化的测定, 观察到激酶活性的诱导和时间有关; 这种活性与结合在核糖体上的翻译抑制剂的诱导相关; 活性的升高和干扰素的剂量成比例, 并为放线菌素 D 所切断。Sen 等已经将这种激酶纯化了几百倍, 在许多未经干扰素处理的细胞中, 激酶也具有一定的水平。在干扰素处理的 L 细胞中和 HeLa 细胞中激酶活性升高约 5 倍。

激酶能和 dsRNA-琼脂糖结合, 而且在和 dsRNA 结合时就被活化; 但是在溶液中使用 dsRNA 活化这种酶仅能在一定的 dsRNA 浓度范围发生; 一旦活化后, RNase III 对 dsRNA 的降解就不会影响激酶的活性。磷酸化的速度与环状核苷酸的关系不大, 而在没有外加 KCl 的情况下达到最高。后一特征可以解释为在高盐浓度下, 含有痕量 dsRNA 的病毒 mRNA 明显地优先翻译。蛋白激酶对蛋白合成的抑制随盐浓度升高而减弱。Cooper 等人的实验表明, dsRNA 活化的激酶抑制 Met-tRNA_i/40S 核糖体亚基络合物的形成。Cooper 等是将干扰素处理的 L 细胞抽提物加到网织红血球裂解物中观察到的, 而 Lewis 等则是在 dsRNA 加到对照和干扰素处理的细胞抽提物中时追踪到这种络合物的形成的。激酶能催化 eIF-2 的最小亚基磷酸化, 它作用的位点和 hemin 调节的激酶催化的磷酸化位点没有区别。

现在还没有证据说明在干扰素处理并经病毒感染的细胞内激酶是被活化的。Gupta 在与 dsRNA 一起保温的完整的 L 细胞内检测到激酶的活性; 但是用两种不同的 RNA 病毒感染干扰素处理的细胞时并没有看到活性有什么升高。在某些干扰素处理并经病毒感染的细胞内的确可以观察到蛋白质合成受到了普遍抑制, 但其原因没有得到解释。很可能是, 如果激酶被活化, 那么病毒和寄主的蛋白合成都将受到抑制, 因为所有蛋白质的合成起动都要通过 eIF-2。dsRNA 对激酶的活化作用很可能代表一条与 2, 5A 聚合酶-核酸内切酶的抑制病毒复制不同的途径; 如果病毒 mRNA 的积累不能被这些酶的联合作用所阻止, 那末激酶就可能在为病毒装配所需生产足够量的病毒结构蛋白以前就切断蛋白质的合成。

在干扰素处理的细胞中病毒 mRNA 的帽的甲基化

Sen 等将对照的小鼠腹水细胞抽提液中和用干扰素处理的细胞抽提液中戴了帽但未甲基化的呼肠孤病毒 mRNA 的甲基化作用进行了比较, 表明在干扰素处理的细胞抽提液中 5' 末端鸟苷的甲基化受到了损伤, 但这不能用病毒 mRNA 的降解来解释。Shaila 等用人干扰素处理 HeLa 细胞的抽提液得到了基本上相同的结果。在这两种情况下, 甲基化的损伤随所用的病毒 mRNA 的浓度升高而降低。Sen 等进一步研究了这一现象, 他们排除了由于 S-腺苷甲硫氨酸耗尽或 S-腺苷同型半胱氨酸积累这二种作为甲基化损伤原因的解释, 并进一步表明, 也不是由于甲基化酶的不可逆失效。甲基化作用的抑制剂是一种大分子, 它可能使 mRNA 不能

被甲基化，这种抑制剂在低温时被活化。此外他们也观察到，当病毒 mRNA 被呼肠孤病毒结合的转录酶重新合成时，抑制程度较小。

Samuel 等检测出干扰素处理的 L 细胞与对照细胞的细胞液之间对呼肠孤病毒 mRNA 的甲基化能力方面没有任何明显的不同，这一结果和 Lengyel 等得到的结果不同，其差异可以用制备细胞液的方法——涉及到胶过滤——不同来解释。因为抑制剂是不稳定的，在这一分级分离步骤中很可能丢失。此外，Ball 和 White 也对于干扰素处理的小鸡鸡胚细胞和对照细胞的抽提液中病毒粒子转录的 VSV mRNA 的甲基化作用进行了研究，同样没有观察到任何不同，但是，这些细胞抽提液经过预保温，其内源蛋白合成比较低，并且很可能在预保温过程中不稳定的抑制剂被钝化。Lengyel 及其同事观察的可靠性是不容怀疑的，除非采用完全相同的实验条件。为了确定帽甲基化的抑制在干扰素作用机制中是否具有普遍意义，看来应将这些观察扩大到干扰素处理的其他细胞中去。

在干扰素处理的细胞中帽甲基化的损伤至今还未得到满意地证实。Desrosiers 和 Lengyel 报道，在干扰素处理的 L 细胞中，合成的呼肠孤病毒 mRNA 比对照细胞中的病毒 mRNA 所含的“帽 II”少 50%（在呼肠孤病毒 mRNA 中有 $\frac{2}{3}$ ~ $\frac{1}{2}$ 含“帽 I”，它带有甲基化的倒数第二个核苷酸的核糖；其余的包含“帽 II”，它带有甲基化的倒数第二个核苷酸的核糖和甲基化的邻近核苷酸的核糖）。Muthukrishnan 等证明，带有帽 I 的牛痘病毒 mRNA 比带有帽 0 相应的 mRNA 能更有效地和核糖体结合，帽 0 缺少核糖甲基化。因此，帽甲基化作用的损伤很可能使体内翻译效率降低。Kroath 等报道，不管是否经过牛痘病毒感染，用干扰素处理的小鸡成纤维细胞中病毒的和细胞的 mRNA，其倒数第二个核苷酸核糖的甲基化都降低了 50% 以上，而 5' 端 G 的甲基化则没有减少。

某些研究者研究了干扰素对在裂解循环过程中 SV40 基因表达的影响。细胞预先用干扰素处理，并用这种 DNA 病毒感染后，结果使 SV40mRNA 的量降低。但是在感染后用干扰素处理，不能抑制病毒 mRNA 的合成；病毒 19S 和 16S mRNA 相对对照细胞来说在裂解循环的后期达到正常量，但是这些 mRNA 和多聚核糖体的结合受到了损伤，而且它们的翻译产物也显著减少。Revel 等报道，从干扰素处理的细胞来源的 SV40 RNA 和对照的感染细胞来源的细胞 mRNA 或病毒 RNA 相比较，表明前者的 RNA 中缺少 m⁷GpppX 帽式结构。但是最近的实验表明，SV40 RNA 帽的甲基化作用没有减少，而且内部 m⁶A 甲基化作用有相当大的增加。

结 论

组织培养细胞中干扰素诱导的酶活性的发现，极大地提高了我们对于抗病毒状态在分子水平上的认识。留下来的问题是要搞清楚在动物体内，干扰素处理或病毒感染是否也诱导这些酶活性。在 EMCV 感染的小鼠中进行的 2,5A 聚合酶活性的研究表明，这种酶在脾脏和肺中都升高，但是在动物体内干扰素诱导的酶活性还未检定，而且我们至今还不知道这些酶活性如何干扰病毒 mRNA 的积累、病毒的翻译与复制。因为上述过程是彼此关联的，可以假定，病毒的生长能够在几个不同的环节上受特定的一些机制所阻断。2,5A 聚合酶-核酸内切酶系统可能是一个例子，通过这种机制病毒 mRNA 的积累被阻断。如果这些酶是在 RNA 病毒的复制络合物水平上起作用的话，那末它们就能有效地切断病毒 mRNA，并阻止其积累。但是这种机制是否在完整细胞内发挥作用还是仅能在体内影响复制中间络合物，尚未得到证明。dsRNA 活化的激酶一旦为病毒的 dsRNA 活化，就可能阻断蛋白质的合成；但是留下

来的问题是，在某些情况下干扰素处理并经病毒感染的细胞中观察到的蛋白合成抑制是否就是由于激酶的作用。最后，帽的甲基化抑制可能代表另一种机制，这种机制能损伤病毒 mRNA 的翻译。干扰素的这种影响还没有详细研究，而且为了证实一种特定的抑制并在分子水平上解释它的作用机制还有许多工作要做。这种抑制可能是抗病毒状态的一个重要内容，因为它能影响受 DNA 病毒编码的 mRNA 的翻译，但是它对那些没有帽结构的病毒 mRNA，如 picornaviruses 的 mRNA 则没有影响。

某些研究者报道了干扰素处理的其它一些效应，例如 Eppstein 和 Samuel 从干扰素处理的 L 细胞的盐洗核糖体部分纯化了已活化的一种核酸内切酶，虽然这种核酸酶似乎在体外已和用 γ - P^{32} -ATP 体外标记的低分子量活化剂结合了，但它和 2,5A 活化的核酸酶的关系却完全不清楚；看来这种核酸酶降解呼肠孤病毒 mRNA 比细胞的 mRNA 要快。Marcus, Terry 等报道了另一种核糖核酸酶活性，它是从干扰素处理的小鸡鸡胚细胞的膜部分中获得的，在干扰素处理过程中有 RNA 和蛋白质合成抑制剂存在时却没有观察到这种核糖核酸酶活性。Aujean 等在干扰素处理并经 mengovirus 感染 L 细胞的膜部分也观察到核糖核酸酶活性升高。这个膜部分包含病毒复制络合物，它可能与核糖核酸酶以及激酶的活化有关。上述核糖核酸酶能降解 mengovirus RNA 和 poly(A), poly(U) 以及 poly(C)，在这一方面，它似乎不同于 2,5A 活化的核酸内切酶，因为后者不能裂解 poly(A)。

干扰素的某些抗病毒效应可能和核酸酶有关，这一点和 Lengyel 等的报道一致，他们观察到呼肠孤病毒 mRNA 的平均半寿期在对照细胞中大约 12.7 小时，但在干扰素处理的 L 细胞中只有 4.8 小时。对照细胞及干扰素处理的细胞抽提液之间的另一差别是某些 tRNA 的钝化速度不同，这种钝化是明显地依赖于抽提物的预保温，但是它的生理意义有待确定。Yan 等最近指出，蛋白质合成延伸的速度因抑制剂的存在而稍稍下降，如环己亚胺专一地抑制某些病毒蛋白的合成。降低延伸速度的一种可能的机理是干扰素诱导的某些较小的 tRNA 分子失效，但是在干扰素处理并经病毒感染的细胞中是否存在这种假定的失效，有待阐明。

应该指出的是，干扰素象很多激素一样，是影响多种细胞活性的一种多型性效应剂。特定的酶的诱导可能是一种最简单的效应，这种效应能在分子水平上加以描述。但是能和这些酶相互作用的其它细胞成分作为组成物质存在细胞中的，2,5A 活化的核酸内切酶和 2'5' 核酸外切酶看来就是属于这种情形的。干扰素的其它效应是非常有趣的，然而至今不能从分子水平上加以解释。例如，Halbach 等最近报道在干扰素处理的细胞中溶酶体具有易脆性，同时人们也逐渐认识到干扰素对肿瘤细胞增殖的抑制作用。随着在成骨肉瘤病人身上进行有希望的临床试验之后，干扰素的这种效应受到了广泛的注意。显然，对于干扰素和其它激素在控制细胞增殖和诱导特殊蛋白合成方面的作用机制，我们还有许多东西需要了解。有关干扰素诱导上述两种酶的研究工作已经取得了可喜的进展，但是在认识这些酶对抗病毒状态的作用以及揭示干扰素和细胞相互作用引起的其它分子效应以前，我们还有许多工作要做。不过，有一点看来是清楚的，就是这两种酶代表了 dsRNA 抑制蛋白质合成的两种不同的途径。有趣的是，2,5A 聚合酶在高浓度 dsRNA (>10 微克/毫升) 情况下活化最好，而激酶则在较低的 dsRNA 浓度范围 (<10 微克/毫升) 内活化。

研究干扰素作用机制的另一条有希望的途径是由于分离到了一些细胞突变株，这些突变株能在没有诱导剂存在的情况下合成可以检测出来的少量干扰素。这些突变的 3T6 细胞株是

(下转第29页)

依赖 cAMP 的蛋白激酶 I: 一种独特的变构酶

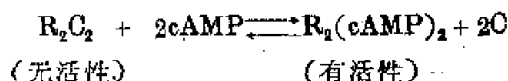
J. Hoppe K. G. Wagner

已知依赖cAMP的蛋白激酶通过解聚而激活, 在哺乳动物胞液内, 这些酶有两种类型, 它们具有类似的催化亚基, 但亚基调节不同。ATP可阻止cAMP活化蛋白激酶 I。本文综述此类酶的配体连结部位的近期研究情况。

亲水性激素不能透过其靶细胞膜, 它通过 Sutherland 发现的机制起作用。激素在细胞表面与其特异受体接触后, 在细胞内合成“第二信使”cAMP。一般认为在高等生物中 cAMP 只通过活化蛋白激酶, 将 ATP 分子 γ -磷酸基转移到各蛋白底物分子上。

蛋白激酶同工酶

在哺乳动物细胞的胞液中, 至少有两种不同类型的依赖 cAMP 的蛋白激酶, 其相对比例随种族及组织而异。I 型和 II 型两种同工酶都是四聚体蛋白, cAMP 通过将无活性的全酶解聚成为 cAMP 连结的二聚调节亚基 (R_2) 和 2 个催化亚基 (2C), 使它们活化



两种同工酶的催化亚基具有非常相似的分子量(约 40,000)、氨基酸组成和底物专一性, 可是, 调节亚基分子量却明显不同, I 型为 49,000, II 型为 56,000。由于调节亚基不同所引起的两种同工酶之间主要差异是其对 ATP 的作用不同。在 ATP 存在下, II 型酶可自动磷酸化, ATP 可提高此酶对 cAMP 的敏感性。催化亚基从 ATP 分子内将一个磷酸基转移至二聚调节亚基 (R_2) 的每个多肽分子上。此型同工酶的解聚或活化需要的 cAMP 浓度较低, 在 cAMP 除去后, 亚基间的重新聚合很慢。

另一方面, I 型蛋白激酶不受自动磷酸化调节, 它系通过另一种机制(虽然也牵涉到 ATP) 来改变其对 cAMP 的敏感性, 其效应与 II 型蛋白激酶自动磷酸化的效应相反。未解聚的蛋白激酶 I 以极高的亲和力与 2 分子 ATP 相连结, ATP 可降低该酶对 cAMP 的亲和力, 故需高浓度的第二信使才能使此蛋白激酶解聚和活化。并且, 在缺 cAMP 时, ATP 尚能促进酶的重新聚合。在生理条件下, 当细胞内 ATP 浓度相当高时, 要使激酶活化, cAMP 浓度就需上升到微克分子水平; 然而, 在体外条件下, ATP 缺乏时, cAMP 浓度达到毫微克分子水平时, 就足以使激酶解聚。

蛋白激酶 I 的配体部位

在生理条件下, 蛋白激酶 I 活化的平衡方程是:



cAMP 牢固地连结于 R_2 亚基, 促进酶的解聚。ATP 与未解聚的激酶以及游离的催化亚基皆可作用。当 ATP 连结于游离的催化亚基时, ATP 是用于蛋白底物 ($K_m = 10 \mu M$) 的磷酸化反应, 但 ATP 如连结于未解聚的全酶时, 则 ATP 不被水解。因为未解聚的酶蛋白和 ATP 的亲和力高

($K_d = 50 \sim 100 \mu M$), 所以高浓度ATP使平衡趋向无活性形式。这样, ATP作为一种效应剂, 在生理条件下, 当cAMP缺乏时, 可使酶完全失活。

解聚的 R_2 和 C 都有各自的特殊配体连结部位。对在未解聚的 R_2C_2 分子上的ATP有高亲和力部位(ATP效应剂部位), 究竟是第三配体部位, 还是原来在解聚亚基上的部位转化而生成呢? 通过cAMP的连结控制蛋白激酶的解聚从而调节磷酸转移酶活性的机制, 有助于回答这个问题。

对三个配体部位的本质进行比较将会搞清楚 R_2C_2 分子上的ATP效应剂部位究竟是和 C 亚基上ATP部位有关, 还是和 R_2 亚基上cAMP部位有关, 还是与两者均无关。当配体的特异化学结构改变(如引进烷基或用硫原子取代氧)引起配体亲和力产生类似改变(通常是减少)时, 使用不同的配体类似物, 就能确定这些部位是相同的还是相似的。同一技术也可用于比较与有关配体作用的部位, 如cAMP(R_2)部位和ATP(R_2C_2)部位。因为这些配体一般都有腺嘌呤部分。

1 用一系列核苷酸类似物作为配体, 所获结果列于图1。

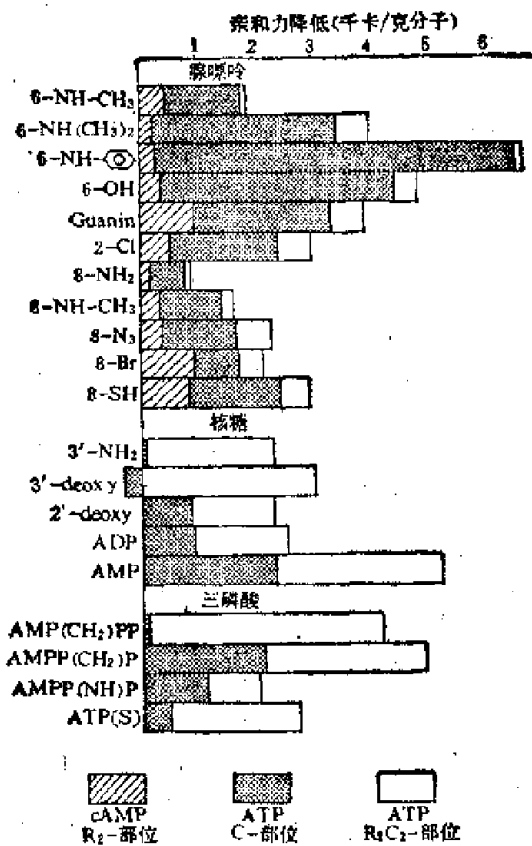


图1 用核苷酸类似物作配体所绘制的核蛋白激酶I上的配体部位图

在图1中, 天然配体(ATP或cAMP)的化学修饰, 通常降低对配体的亲和力。柱长表示亲和力降低的千卡/克分子数。cAMP和ATP对 R_2C_2 的连结是通过与 3H 标记的天然配体的竞争性结合用过滤技术进行测定的。通过测定游离催化亚基的磷酸转移酶活性, 从竞争性酶动力学数据(K_i 值)中求得ATP类似物与 C 亚基的作用。

图1资料表示不同部位对化学结构改变的配体所引起的千卡/克分子减低。对蛋白激酶I的三个核苷酸部位的本质可作如下结论: (i) R_2 上cAMP部位与 R_2C_2 上的ATP部位比较, 有很大差异, 尤其在改变腺嘌呤的6-氨基时, 差异更大, 说明 R_2C_2 上ATP结合部位不是由 R_2 上的cAMP结合部位生成的。cAMP和ATP对 R_2C_2 无竞争性结合, 支持这种论点; (ii) R_2C_2 上ATP部位与 C 亚基上的ATP部位相比, 当配体的腺嘌呤部分改变时, 其亲和性变化的差异很小, 这说明 R_2C_2 和 C 上的ATP结合部位对其核苷酸碱基的亲合性是非常相似的, 但是, 对ATP的核糖和三磷酸部分则显然不同。

放射性8-叠氮-ATP的光亲和标记直接显示, 亚基与ATP的腺嘌呤部分连结。光照射后, 这种类似物与 R_2C_2 上的ATP部位连结, 且是共价连结, 解聚的亚基的SDS-凝胶电泳表明, ATP类似物仅结合在催化亚基上, 并且光亲和标记后, cAMP使 R_2C_2 解聚可显示出磷酸转移酶活性丧失, 其程度与连结到 R_2C_2 上的ATP类似物的量相平行。

ATP底物部位转化成高亲和力连结部位时, R_2C_2 的磷酸转移酶活性被阻止。

实验资料证实了这种概念, 即 R_2C_2 上高亲和力ATP部位, 是由游离的催化亚基上的ATP底物部位生成的。这种转化作用保留了腺嘌呤部位未变, 但改变了核糖和三磷酸结合部位。此变化可能是由于C与R聚合而诱导C亚基构象改变而引起的, 或是如图2所示, 是由于ATP直接连结到R亚基上所致。这里 R_2C_2 上ATP部位定位于R-C界面上, R能有区别地、较强地与ATP的核糖三磷酸部分结合。三磷酸部分的特异连结可抑制 R_2C_2 上磷酸转移酶的活性, 或许是阻止了三磷酸部分接到C亚基的催化中心上。

在图2中, 活细胞的高浓度cAMP引起全酶 R_2C_2 解聚和活化(右图); cAMP以高亲和力与R亚基连结, C亚基将ATP分子上的 γ -磷酸基转移到其蛋白底物分子上。降低cAMP浓度, 解聚的亚基重新聚合成无活性的 R_2C_2 全酶(左图), 通过这种聚合, 在C亚基上ATP底物部位

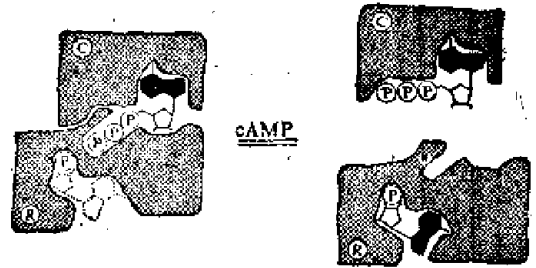


图2 蛋白激酶I激活的可能机制

转变成高亲和力ATP连结部位。ATP的腺嘌呤部分连结于C亚基上, 而核糖和三磷酸部分则连结在R亚基上。磷酸转移酶活性的抑制系通过ATP部位的转化作用而直接引起的。另一方面, 游离的 R_2 中高亲和力的cAMP部位, 通过酶的聚合而转化成低亲和力cAMP连结部位。R上的星是代表蛋白激酶II的磷酸化部位。 R_{II} 的磷酸化作用促进了激酶II的解聚, 并抑制了连结在 $(R_{II})_2C_2$ 的高亲和力ATP部位。这个概念的细节是理论推测, 连结在 R_2C_2 部位上高亲和力的腺嘌呤亚位是位于催化亚基上的, 这点已被证实。但却未证实 R_2 上有这种结合部位。在 R_{II} 上的自动磷酸化部位的位置也是理论推测的, 然后, 未解聚的全酶发生自动磷酸化时, 其部位看来位于两亚基之间。

近来, 对于调节亚基如何抑制催化亚基的细节有进一步发现。蛋白激酶I和II的多肽底物必须在磷酸化的丝氨酸附近有精氨酸。R亚基与同工酶I C亚基连结时, 或热稳定性抑制酶时, 精氨酸可参与其盐桥的形成, 因为用特殊试剂封闭精氨酸则阻止连结, 使催化活性受抑制。对同工酶II来说, 自动磷酸化是一种分子内反应。所有这些结果提示了一个亚基图像: 其中调节亚基会妨碍催化亚基的底物结合部位。因此, 有理由假定 C_2R_2 上的ATP连结部位定位于亚基界面附近。

虽然还需进一步研究其细节, 但是, 现有的观测结果与图2的描述是一致的。这说明蛋白激酶I是一种具有独特性质的变构蛋白; 酶与底物ATP的牢固连结可导致酶的抑制, 而ATP又可成为解除cAMP的活化作用的效应剂。此过程包括C亚基上ATP底物部位转化成 R_2C_2 上高亲和力连结部位, R很可能参与此部位。

配体连结如何影响酶的解聚和活化

cAMP使蛋白激酶解聚而释出催化亚基, 活化该酶, 可能有两种途径。如图3所示, 其区别在于(a) cAMP仅仅连结于游离的二聚体调节亚基 (R_2), 或(b) cAMP连结于全酶 R_2C_2 而形成中间复合物 $R_2C_2(cAMP)$, 用cAMP自旋标记的衍生物进行ESR(电子自旋共振)测定, 已得到这一中间产物。cAMP结合到果蝇胚胎蛋白激酶的速率数据, 也进一步证实了(b)通路。

图3中, 当cAMP与游离亚基 R_2 相连的亲和力比全酶 R_2C_2 相连的亲和力高时, cAMP促进

革兰氏阴性细菌外膜蛋白质的生物合成和功能

J. M. DiRienzo等

展望与摘要

和真核细胞一样,革兰氏阴性菌是由一层其内分散着蛋白质的脂双层所组成的质膜(或称细胞质膜)包围着。这种膜可用著名的流动镶嵌模型予以描述。细菌细胞质膜嵌有主动运输、氧化磷酸化以及某些大分子生物合成的系统。但是,革兰氏阴性菌在细胞质膜的外表面还有一层膜,它的形态类似于细胞质膜,但含有较少的磷脂、少数几种蛋白质和一种独特的碳水化合物——脂多糖(lipopolysaccharide缩写为LPS)。外膜(outer membrane)的机能是完全不同的,它对各种化合物(如抗菌素)起着扩散屏障的作用;它含有噬菌体和大肠杆菌素受体;它参与细胞结合和分裂(更精确地说是隔膜的形成)过程;它含有各种对营养物(如铁、维生素和碳水化合物)特异的摄入系统;它还含有非特异性的被动扩散孔,以容许低分子量底物的扩散。外膜对居留于胞外质区(periplasmic region,即在细胞质膜与外膜之间的区域)的某些水解酶类和结合蛋白质类提供了一种起保护作用的包裹物。它还和肽聚糖(peptidoglycan)一起参与维持细胞结构的完整性。

如上所述,外膜含有变化不大的蛋白质。但是这些蛋白质似乎给予外膜许多上述功能,因此对外膜蛋白的探究是理解外膜功能的关键。又因为这种蛋白成分的种类不多而又大量地存在着,因此容易分离,亦利于对外膜蛋白进行特性描述。所以,外膜对研究膜蛋白合成机制、分子穿越生物膜的移位等提供了一种优良的系统。可以期望,这些类型的研究将导致确定膜分化过程的理解。

由于这类蛋白质在六十年代末和七十年代初就已完成分离和鉴定,从而使外膜蛋白在生物合成方面取得很大进展,今天有关外膜蛋白生物合成所具深远意义的图景已经形成。最近发现,脂蛋白和另一些主要的外膜蛋白系由一种氨基末端附加有约20个氨基酸肽段的前体蛋白质所组成。这类延伸肽类(extension peptides)是非常疏水的,因此对细胞质膜有高度的亲和力。这种性质暗示延伸肽类在结合于细胞质膜的那些多核糖体中——它特异地合成外膜蛋白和胞外质蛋白质(periplasmic protein)——以及在这类蛋白穿越细胞质膜的移位中是决定因子。外膜和胞外质蛋白的生物合成机制和移位作用看来似乎非常类似于真核系统中分泌蛋白类的作用。

在外膜蛋白的研究中另一项迷人而又重要的方面是脂蛋白 mRNA 的分离和特性描述。迄今仅从 *E. coli* 中分离出有生物活性的 mRNA, 它的部分核苷酸顺序已被确定,而且该顺序也证实在脂蛋白前体中存在一种延伸肽段。

本文评述了有关 *E. coli* 和 *Salmonella typhimurium* 外膜蛋白现已积累的知识。我们讨论了外膜蛋白生物合成、它们的分子特征及其与外膜中其它成份的相互作用。已经知道,肽聚糖和脂多糖是和某些外膜蛋白紧密地连在一起的,因此认识这些大分子的结构与功能将是

重要的。

外膜的一般特征

电子显微镜早期的研究揭示,革兰氏阴性菌的细胞被膜系由两种不同的膜——内部的细胞质膜(或称质膜)和外膜所组成。在超薄切片中证明这两种膜都显双轨(double-track)或双层状。肽聚糖层位于这两种膜之间。细胞质膜与外膜之间的这一区域称为胞外质区(periplasmic region)。细胞质膜与外膜厚度分别为75 Å和100 Å。冰冻蚀刻研究也揭示革兰氏阴性菌细胞被膜中存在着多层结构。

Miura和Mizushima用蔗糖密度梯度离心法首先成功地分离出*E. coli*的细胞质膜与外膜。Osborn及其同事扩大了前述研究,用一种等密度蔗糖密度梯度离心法从*S. typhimurium*中分离出这两种膜。用EDTA-溶菌酶制得的球状体经超声振荡破碎,自30~50%蔗糖梯度范围一步离心即得粗的被膜分部。最近曾用此法分离制备了*E. coli*的细胞质膜和外膜。

根据不同膜在去污剂中的溶解度而发展起另一种提纯方法。非离子型去污剂——三通X-100是一种细胞质膜增溶剂(solubilizer),这种去污剂和 Mg^{++} 结合,能成功地用来除去外膜粗制剂中被污染的细胞质膜。曾发现十二烷基肌氨酸钠能完全地增溶细胞质膜而不能增溶外膜。为了确定类脂的分布,一种包括粒子电泳在内的方法也曾用作两种膜的分离。

细胞质膜与外膜的有效分离使得有可能研究各种膜的特性。*S. typhimurium*外膜的电子显微镜揭露了一种大小均一、直径为0.1毫微米的封闭着的双轨膜囊泡的超结构。当外膜从含有盐的全膜制剂中分离出来时,它们展开成开放的C状螺旋圈结构。如同细胞质膜那样,外膜由磷脂和蛋白质所组成,但是除了这两种成份外,外膜还含有脂多糖(LPS)。每个*S. typhimurium*细胞约有 2.5×10^6 个脂多糖分子,而且它们在外膜上占据着特定位置。事实上,由于脂多糖多糖链的存在,使外膜的密度较大于细胞质膜,因此用蔗糖密度梯度离心能把它们分离开来。脂多糖约占外膜表面的45%。在脂双层外层中脂多糖分子的类脂A部分替代了磷脂部分,多糖链伸向细胞外侧。彼此紧密连在一起的脂多糖分子可由二价阳离子(主要是 Mg^{++})使之稳定,磷脂几乎只集中在外膜双层的内层。在*E. coli*和*S. typhimurium*中,外膜的组分主要由磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油和心磷脂组成。外膜的其余组成部分是蛋白质,也即是本文所留下的论题。

外膜蛋白质

主要蛋白的名称

1970年, Schnaitman报道,*E. coli*外膜是由一种分子量为44,000的“主要外膜蛋白”组成,其量约占蛋白总量的70%。但是Inouye和Yee证明由于膜蛋白异常的特性,这种“主要峰”是一种矫作物,并指出此峰实际上是由几种不同的蛋白质组成。现已确定, Schnaitman氏的“主要外膜蛋白”至少由四种不同的蛋白成分所组成,但是研究者对这些蛋白质采用了不同的命名系统(表1)。

除了这些高分子量的主要外膜蛋白外还存在着另一些称为脂蛋白的主要蛋白质。根据分子数目,这些蛋白质被认为是*E. coli*细胞中最多的蛋白质。但是在早期大多数作者忽视了