

兔膀胱上皮细胞不对称单位膜 2.0 nm 分辨率的投影结构*

李宗利^① 刘 维^① 阳世新^① 徐 伟^② 李方华^①

(^①中国科学院物理研究所, 中国科学院凝聚态物理中心, 北京 100080; ^②中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 从兔膀胱上皮细胞中分离纯化了不对称单位膜(AUM), 拍摄了负染样品的电子显微像, 用计算机对数字化像作了 Fourier 滤波, 校正了晶格畸变, 首次得到了兔膀胱 AUM 蛋白 2.0 nm 分辨率的二维投影结构.

关键词 膜蛋白 不对称单位膜 二维晶体 图像处理 投影结构

生物膜在细胞的生命活动中起着十分重要的作用. 生物膜的基本组成单元是脂类和蛋白质, 其中蛋白质在膜功能发挥方面起着主导性的作用, 而膜脂则为膜蛋白功能的发挥营造了适宜的环境条件.

与膜脂相接的膜蛋白表面多呈疏水性, 因而不易形成结构良好的三维晶体, 限制了利用 X 射线晶体学的方法测定其结构. 同时, 膜蛋白的分子量一般都较大, 目前的核磁共振(NMR)波谱法对于测定其结构也有一定困难. 但是, 若能将纯化的膜蛋白在一定的外界条件下重组到脂双层中而形成二维蛋白质晶体, 就可以利用电子晶体学的方法确定它们的空间结构. 另外, 有少数膜蛋白在天然状态下即形成小块的二维有序阵列, 可以直接用来进行结构分析. 本文中涉及的不对称单位膜(asymmetric unit membrane, AUM)就是其中的一种.

哺乳动物膀胱上皮表层细胞中存在一种特殊的膜结构, 其腔面质膜及细胞质内的梭形小泡的腔面的大部分区域覆盖着一种扇贝形的斑块结构, 使腔面一侧增厚(8 nm), 而细胞质一侧则维持通常的厚度(4 nm), 两侧在厚度上呈不对称性. 1965 年, Hicks 首先观察到这一现象并将此种细胞膜命名为不对称单位膜^[1]. 已经表明, AUM 中的斑区是由 AUM 蛋白(uroplakins)颗粒向外延伸形成的, 每个星形的蛋白复合体由 6 个内部和 6 个外部的结构域组成, 所有的星形颗粒形成一个 $p6$ 对称的平面阵列. 这样的天然二维晶体很适合用电子晶体学方法研究其中的膜蛋白结构^[2]. 事实上, 目前已发表的 AUM 蛋白的结构数据基本上都是用电子晶体学的方法得到的, 所用材料来源于牛膀胱^[2,3]或猪膀胱^[4], 采用负染制样, 分辨率约 2.2 nm. 本文从兔膀胱中成功分离了 AUM 并拍摄了其负染样品的电子显微像, 在此基础上进行了初步的图像处理, 第 1 次得到了兔膀胱中 AUM 蛋白 2.0 nm 分辨率的投影结构.

1999-06-23 收稿, 1999-09-02 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 19634020, 19874074)

1 实验与数据处理方法

1.1 AUM 的分离纯化

采用 Vergara 等人^[5-7]的方法,并做了适当改动。在实验室里将兔子宰杀后迅速取出膀胱,将膀胱翻转,用预冷至 4℃ 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲盐水(PBS)浸洗 3 次。然后用钝的手术刀轻轻刮取上皮细胞,悬浮于适量 PBS 中,在 4℃, 4 600r/min 下离心 10 min。同样条件下用 PBS 洗涤沉淀之后,将其重新悬浮于 pH7.5 的 10 mmol/L HEPES 缓冲液中,其中含有 1 mmol/L 氟化苯甲磺酰(phenylmethyl-sulfonyl fluoride, PMSF), 1 mmol/L EDTA 和 1 mmol/L EGTA (缓冲液 A)。用玻璃匀浆器破碎细胞后,4℃ 下离心,弃去上清液。沉淀在同样的条件下用缓冲液 A 洗涤 3 次。收集沉淀并将其重新悬浮于缓冲液 A 中,置于 1.6 mol/L 蔗糖溶液上面,在 4℃, 17 000 r/min 下离心 20 min,收集位于两溶液界面处的粗膜,用缓冲液 A 洗涤 2 次。沉淀用 2% 的月桂酰肌氨酸钠在室温下处理 10 min。4℃, 17 000 r/min 下离心 30 min, 弃去上清液,同样条件下用缓冲液 A 洗涤沉淀。然后用 25 mmol/L NaOH 在室温下处理沉淀 10 min,离心后洗涤沉淀。最后收集纯净的 AUM,悬浮于适量缓冲液 A 中,-70℃ 下保存备用。

1.2 电子显微镜样品制备与显微像拍摄

先挑选载有碳膜的铜网,碳膜应均匀平整,完好无损。碳膜需预先进行辉光放电处理,以增加样品悬液在碳膜表面的附着力。取适量样品悬液,用缓冲液 A 稀释至约 1.0 μg/mL,充分混匀。取约 5 μL 样品悬液滴于镀有碳膜的铜网上,30 s 后用滤纸吸去多余样品,迅速滴加约 10 μL 1% 的醋酸双氧铀溶液,经 30 s 负染后用滤纸吸去残留溶液。室温下干燥。好的样品在电子显微镜下易观察到较多的 AUM 膜片,而且膜之间不太重叠、堆积。在筛选负染色剂时,除了 1%~2% 的醋酸铀水溶液外,还尝试过 1% 的醋酸铀的乙醇溶液以及 1% 的磷钨酸水溶液(pH 7),但染色效果均比不上前者。制备好的样品在 JEM 200CX 型电子显微镜上进行观察拍照,加速电压为 200 kV。

1.3 数据处理

利用光学衍射方法挑选衍射斑明锐、对称性好和分辨率高的负片^[8,9],使用线状照明的显微光密度计,LeafScan 45^[10]对选定的底片进行数字化,扫描步长为 10 μm。

数字化像的计算机图像处理应用美国 Baylor 医学院 Schmid 等人^[11]编制的计算机程序 Spectra 在 SGI 工作站上进行。

2 结果与讨论

图 1 是兔膀胱 AUM 的电子显微像。对数字化像作 Fourier 变换后,对一些强斑点作指标化,再用这些强斑点作最小二乘法精修,得到以像素为单位的倒空间晶胞参数。根据像的放大倍数和底片数字化时的扫描步长,计算出兔膀胱 AUM 蛋白二维晶体的点阵参数如下: $a = b = 16.5 \text{ nm}$, $\gamma = 120^\circ$ 。

晶体点阵畸变的校正是数据处理中最重要的一个步骤。先用孔径适中的掩模对数字化像作 Fourier 滤波,从得到的滤波像上选取一个较完整的区域作为参考区,通常参考区选在像的中心部位,作像与参考区的卷积,得出互相关函数及相应的互相关图(CCM)^[12](图 2(a))。CCM 上斑点的峰高反映了晶体的畸变程度,峰愈高表示相关性愈好,畸变小;峰较弱则说明相

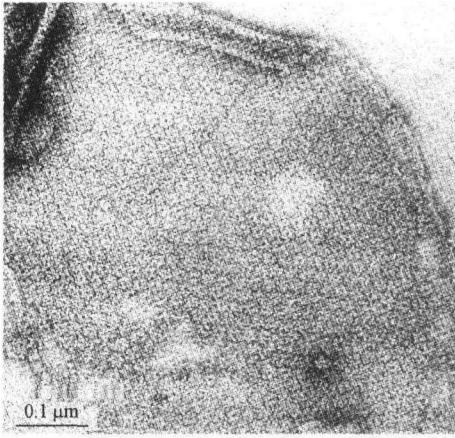


图 1 用于数字化图像处理的兔膀胱 AUM 的电子显微像

关性差,畸变大. 随后搜寻 CCM 上的峰位置^[13],用最小二乘法精确测定峰的重心^[14],用矢量制图描绘出每个晶胞偏离理想位置的方向和距离^[15](图 2 (b)). 借助 Spline 函数用若干个参量来描绘像的畸变,从而可计算出像上每一点所需作的校正量(图 2 (c)),然后再用图表示出校正后的晶胞位置的畸变量(图 2(d)). 可以看出它比校正前的图明显改善. 经过二次校正后,畸变量已经很小. 接下来应该是修正衬度传递函数(contrast transfer function, 简称为 CTF),由于负染样品分辨率较低,此时 CTF 的影响并不明显,所以一般并不做 CTF 修正. 图 3(a)是经过各项校正之后的像的 Fourier 变换.

图 3(b)是放大输出的 2.0 nm 以内的各衍射斑点的 IQ 值^[15]. 若根据 IQ 值小于或等于 3 的斑点来判断像的分辨率,则可以看出分辨率至少可达 2.0 nm. 图 4 是根据图 3(a)计算出的 AUM 蛋白的 2.0 nm 分辨率的二维投影结构图. 从图中可以清楚地看出 AUM 蛋白复合体的 6 个结构

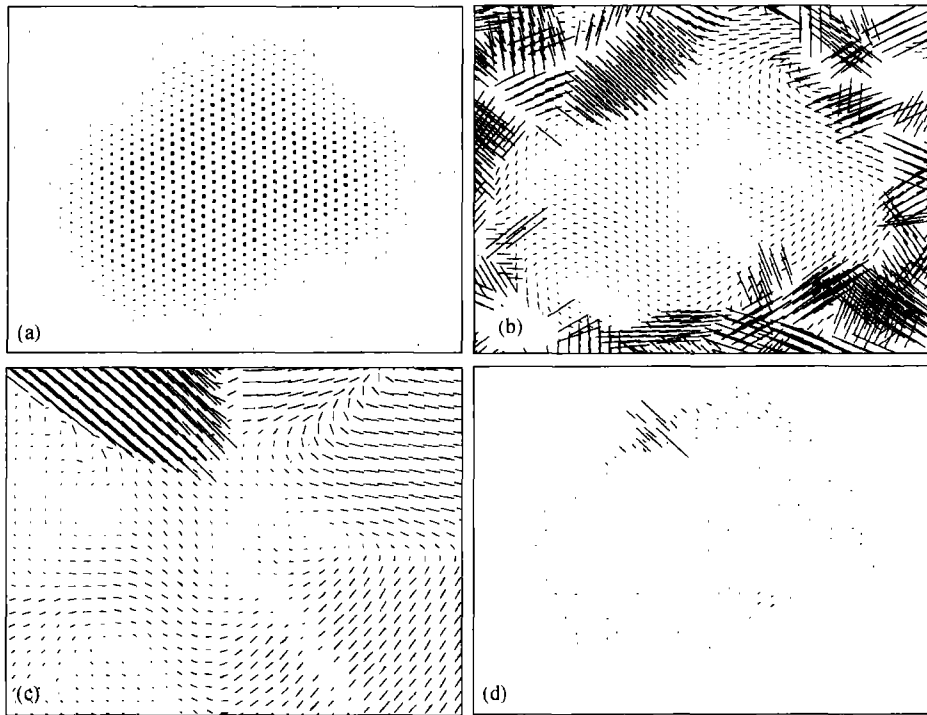


图 2 二维晶体点阵的畸变校正

(a) 根据互相关函数得到的互相关图; (b) 以矢量表示的每个晶胞的畸变量; (c) 像上每一点所需做的校正量; (d) 校正后晶胞的畸变量

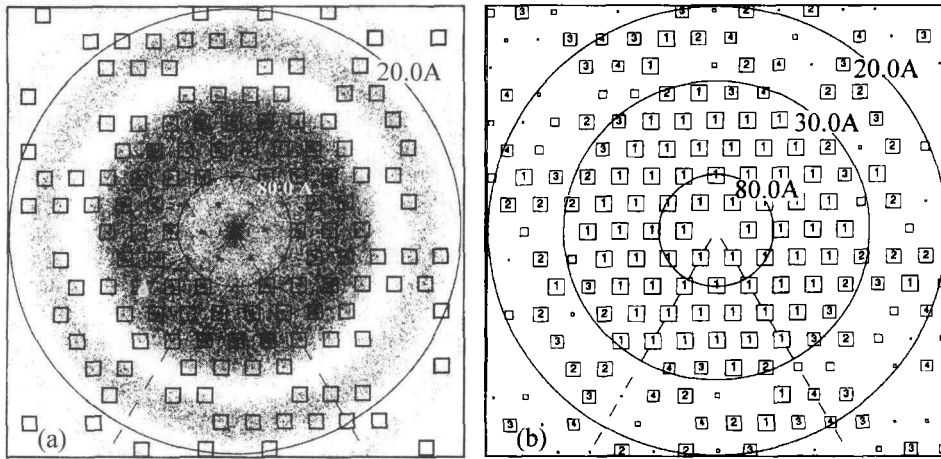


图 3 经过各项校正之后像的 Fourier 变换(a)及放大输出的 2.0 nm 以内各衍射斑点的 IQ 值(b)

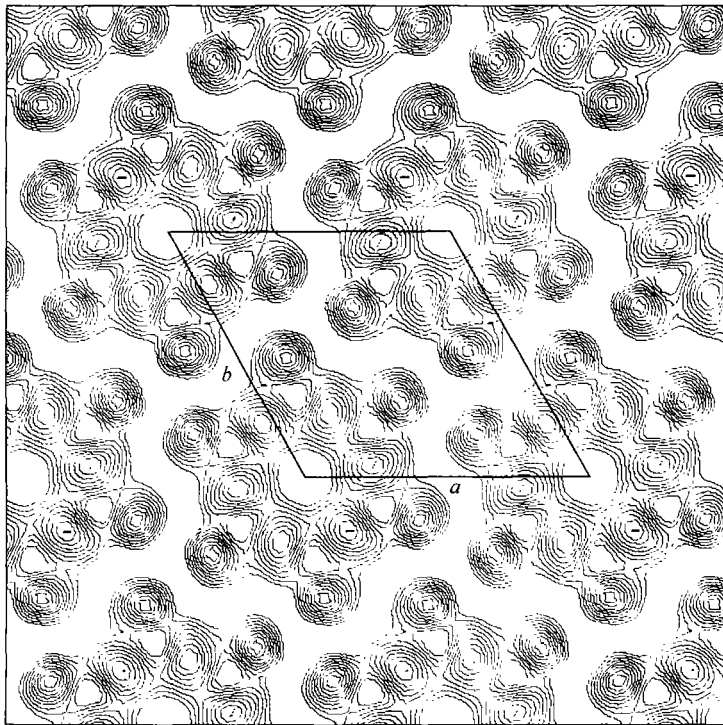


图 4 兔膀胱 AUM 蛋白 2.0 nm 分辨率的投影结构图

域,每个结构域分为内、外两圈. 这与从牛、猪、老鼠等哺乳动物膀胱中所得到的结果是一致的^[1-4],从而进一步证实了 AUM 结构在哺乳类动物中的高度保守性. 由于目前所得的只是一个较低分辨率的投影结构,仅靠它还难以清楚阐明 AUM 的生物学功能. 只有在得到了高分辨

率(原子或近原子分辨率)的三维结构数据之后,才有可能从分子水平上对 AUM 这一特殊的膜结构的生物学功能及其功能发挥的机理进行详尽的分析和研究.

致谢 感谢中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室周筠梅研究员、纽约大学医学院梁风霞博士在样品分离提纯方面给予的帮助. 感谢美国 Balor 医学院 Dr. W. Chiu 和 Dr. Z. H. Zhou 提供了 Spectra 程序以及 Dr. Z. H. Zhou 在 Spectra 程序使用上所给予的帮助. 感谢日本京都大学 Y. Fujiyoshi 教授及日本国立生物物理研究所 K. Murata 先生在底片数字化及图像处理方面给予的帮助.

参 考 文 献

- 1 Kicks R M. The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter. *J Cell Biol*, 1975, 26: 25
- 2 Walz T, Häner M, Wu X R, et al. Towards the molecular architecture of the asymmetric unit membrane of the mammalian urinary bladder epithelium: a closed "twisted ribbon" structure. *J Mol Biol*, 1995, 248: 887
- 3 Taylor K A, Robertson J D. Analysis of the three-dimensional structure of the urinary bladder epithelial cell membrane. *J Ultrastruct Res*, 1984, 87: 23
- 4 Brisson A, Wade R H. Three-dimensional structure of luminal plasma membrane protein from urinary bladder. *J Mol Biol*, 1983, 166: 21
- 5 Wu X R, Manabe M, Yu J, et al. Large scale purification and immunolocalization of bovine uroplakins I, II and III. *J Biol Chem*, 1990, 265(31): 19 170
- 6 Vergara J, Zambrano F, Robertson J D, et al. Isolation and characterization of luminal membranes from urinary bladder. *J Cell Biol*, 1974, 61: 83
- 7 Caruthers J S, Bonneville M A. Isolation and characterization of the urothelial luminal plasma membrane. *J Cell Biol*, 1977, 73: 382
- 8 Unwin P N T, Henderson R. Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. *J Mol Biol*, 1975, 94: 425
- 9 李方华, 刘 维, 李宗利. 蛋白质电子晶体学. *物理*, 1997, 26: 515
- 10 Mitsuoka K, Murata K, Kimura Y, et al. Examination of the LeafScan 45, a line-illuminating micro-densitometer, for its use in electron crystallography. *Ultramicroscopy*, 1997, 68: 109
- 11 Schmid M F, Dargahi R, Tam M W. Spectra: a system for processing electron images of crystals. *Ultramicroscopy*, 1993, 48: 251
- 12 Saxton W O, Frank J. Motif detection in quantum noise limited electron micrographs by cross-correlation. *Ultramicroscopy*, 1977, 2: 219
- 13 Crepeau R H, Fram E K. Reconstruction of imperfectly ordered zinc-induced tubulin sheets using cross-correlation and real space averaging. *Ultramicroscopy*, 1981, 6: 7
- 14 Frank J. New methods for averaging non-periodic objects and distorted crystals in biologic electron microscopy. *Optik*, 1982, 63: 67
- 15 Henderson R, Baldwin J M, Downing K H, et al. Structure of purple membrane from halobacterium halobium: recording, measurement and evaluation of electron micrographs at 3.5Å resolution. *Ultramicroscopy*, 1986, 19: 147