

- [5] 上海植物生理所光合作用研究室二组,《植物学报》1977年19期216页。
[6] 广东植物研究所生理生化研究室,《植物研究》,1976年4期12页。
[7] 中国科学院生物物理研究所三室二组,《生物化学与生

- 物物理进展》,1978年1期1页。
[8] 杨福愉等,《科学通报》1978年23期752页。
[9] 杨福愉等,《科学通报》1979年24期24页。

[本文于1981年4月21日收到]

支原体膜的结构与功能——支原体膜上 ATPase 动力学参数的测定

董仁杰 蒋以文 王苏民 黄 芬

(中国科学院生物物理研究所)

ATPase 是生物膜上一种重要的酶,它不仅参与能量代谢,物质运送,氧化磷酸化等重要生化过程,而且它与膜上磷脂的结合状态,将影响膜的流动性,从而影响膜的其他功能。因此,研究 ATPase 的性质和功能,对生物膜的结构与功能的研究具有重要意义。

支原体膜上自发现有 ATPase 以来^[1],对其性质的研究,虽不及哺乳动物物质膜或线粒体膜的工作做的那么深入,但近年来也开展了一些研究^[2,3]。这种酶为 Mg^{2+} 所激活,某些二价阳离子也能在不同程度上使其激活。关于一价阳离子的作用以及某些抑制剂的作用则有不同的结果。

本文以鸡败血症支原体为材料,就某些因素对膜上 ATPase 活性的影响进行了研究。目的是选择一定条件,以便对 S_6 菌株膜上 ATPase 水解 ATP 的某些动力学常数进行测定。

一、材料和方法

1. 菌种 鸡败血症支原体 S_6 株(由农业部兽医药品监察所赠给)

2. 培养基配制与菌体培养 见前文^[4]。

3. 菌体的收集与膜的提取和纯化 接种后的培养液,在 37°C 培养 36 小时取出后, $13,000 \times g$ 离心 15 分钟,收集菌体,以 β -缓冲液 pH7.4 (含 $0.15M$ NaCl, $0.05M$ Tris, $0.01M$ β -巯基乙醇,用盐酸调到所需的 pH) 洗涤菌体两次。然后悬浮于适量的 $1:20 \beta$ -缓冲液中,置 37°C 恒温

水浴保温 20 分钟,使菌体低渗裂解。以 $8000 \times g$ 离心 5 分钟,除去未破的菌体,膜悬液再以 $48,000 \times g$ 离心 30 分钟收集膜。将膜再悬浮于 $1\text{ml}:20\beta$ -缓冲液中(含膜蛋白 $5-10\text{mg}$),将此膜悬液加入 6.5ml 梯度离心管的蔗糖液面上(先在此管中加入 $2\text{ml} 50\%(\text{W/W})$ 的蔗糖液,再缓缓加入 $2\text{ml} 35\%(\text{W/W})$ 的蔗糖液)再加入适量的 $1:20\beta$ -缓冲液,封管。在 MSE75 离心机中离心 2 小时(4°C), $100,000 \times g$ 。取出两层蔗糖液面上的膜^[5]再用 $1:20\beta$ -缓冲液洗涤两次, $48,000 \times g$ 离心收集膜,最后再悬浮于 $1:20\beta$ -缓冲液中于 4°C 冰箱保存备用。如需长时间保存应放于 -40°C 冰箱中或液氮内。蛋白含量按 Lowry 法^[4]测定。

4. ATPase 活性测定和比活性的计算

用分光光度法^[4]测 NADH OD_{340} 下降值。以每毫克蛋白每分钟 NADH 之 ΔOD_{340} 计算酶的比活。所用底物均经纯化。此外,还用测定 ATPase 反应释放出的无机磷的方法^[4]进行了比较。

5. ATPase 抑制常数 K_i 的计算^[6]

计算公式如下:

$$\frac{V_{\max}}{V_i} = 1 + K_i[I]$$

二、结果和讨论

1. 不同低渗液对膜上 ATPase 比活性的影响

在使支原体膜破裂的方法中,许多人认为最简单、最温和的手段是低渗裂解。但用 1:20 β -缓冲液来裂解膜产量很低,我们用重蒸水和 1:20 β -缓冲液平行比较破膜效果,结果如下:

表 1 不同低渗液对酶比活性的影响

裂解液	次数			平均
	1	2	3	
1:20 β -液	100	100	100	100
重蒸水	167	126	121	138 $\pm$ 25

Razin^[7] 等认为鸡败血症支原体 S_6 株对低渗不敏感,我们用重蒸水破膜,可提高产率 3 倍左右,酶比活性也略有提高(见表 1),但为保持酶活性,膜制品应保存于 1:20 β -缓冲液中,并放置冰箱内。

2. 蔗糖密度梯度离心纯化膜

参照 Rottem 等人的实验^[5],我们选择了 35% 和 50% 两个浓度的蔗糖液,做为密度梯度离心液。离心后分为三层,上层和下层膜量的较少,中层最多,约为总量的 70—90%,膜色浅黄,较易悬浮,酶比活性比未做梯度离心的膜提高约 60% 左右。

膜经裂解后,内含物外流,电镜观察多为“空袋状”经洗涤不易完全纯化,经梯度离心使比重相近的膜片集中在一起,除去的仅是少量的内含物或比重过大过小的膜片,因此量损失不大,酶比活性提高亦不大。

3. Mg^{2+} 浓度对膜上 ATPase 比活性的影响

既然鸡败血症支原体 S_6 膜上 ATPase 是 Mg^{2+} 激活的^[4],那么 Mg^{2+} 的浓度将如何影响酶活性呢?作者比较了不同的 Mg^{2+} 与 ATP 克分子数之比*,对 ATPase 比活性的影响。结果表明: Mg^{2+} :ATP = 5:1 时比活性最高,增加或减少 Mg^{2+} :ATP 的比例比活性均下降,不加 Mg^{2+} 时比活性最低(图 1)。

Mg^{2+} 激活 ATPase 一般认为是通过活化底物形成 Mg^{2+} -ATP 达到目的的。从上面的数据

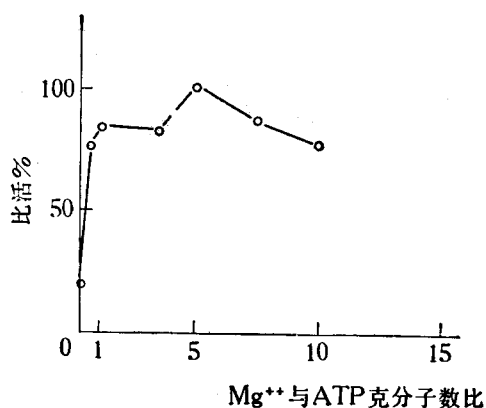


图 1 不同比例的 Mg^{2+} :ATP 对酶活性的影响

看 Mg^{2+} :ATP 为 5:1 时比活性最高,即 Mg^{2+} -ATP 可能处于最佳状态,底物 ATP 得到充分活化。当 Mg^{2+} :ATP < 5:1 时, Mg^{2+} 量不足,形成的 Mg^{2+} -ATP 较少,被水解的 ATP 量相应减少,表现出酶比活较低,当 Mg^{2+} :ATP > 5:1 时,过量的 Mg^{2+} 与产物 ADP 结合,形成 Mg^{2+} -ADP,它是 ATP 的竞争性抑制剂,能够抑制 Mg^{2+} -ATP 的水解,同时,增加游离的 Mg^{2+} ,也减少了 Mg^{2+} -ATP 与 ATPase 的亲合力,从而降低反应速度。有人认为 ATPase 受过量 Mg^{2+} 抑制作用的机理是竞争性和非竞争性作用的混合^[9]。由此可以说明 Mg^{2+} 对膜上 ATPase 又激活又抑制的原因。Ulrich 研究线粒体外膜,获得的结果是: Mg^{2+} :ATP = 2:3 时酶比活性最高,这可以看出不同来源的 ATPase 受 Mg^{2+} 的影响也是不同的。

4. 膜上 ATPase 米氏常数 K_m 的测定

底物 ATP 用量选择 0.01mM 至 0.18mM (测定七个点),在温度 21℃,pH7.4 时,测定相应底物浓度下的反应速度,直到最大反应速度 V_{max} 测出为止。同时,也比较了不同的 Mg^{2+} 浓度对 K_m 和 V_{max} 的影响。所得数据用 Lineweaver 和 Burk 作图(双倒数作图)^[10],计算出结果见表 2。

表中可见两种不同的 Mg^{2+} 浓度,不影响

* ATP 浓度为 0.37mM, Mg^{2+} 浓度根据不同的比例要求而变。如: $ATP:Mg^{2+}$ = 1:5 时, Mg^{2+} 浓度为 1:85mM。

表2 膜上 ATPase 的 K_m 和 V_{max}

数据 方法	项目 编号	Mg ²⁺ 浓度 (mM)	K_m (μM)	V_{max} OD/30 μg 蛋白·分
$\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{s}$ 作图	1	0.37	12.1 $\pm$ 1.5	1.605 $\pm$ 0.043
$K_m = V_{max} \cdot \text{tg } \alpha$	2	1.85	12.0 $\pm$ 1.7	1.49 $\pm$ 0.36

K_m 值, 却对 V_{max} 产生影响。当 ATP 用量达 0.148mM 时可达最大反应速度 V_{max} , 公式法比图解法略低。

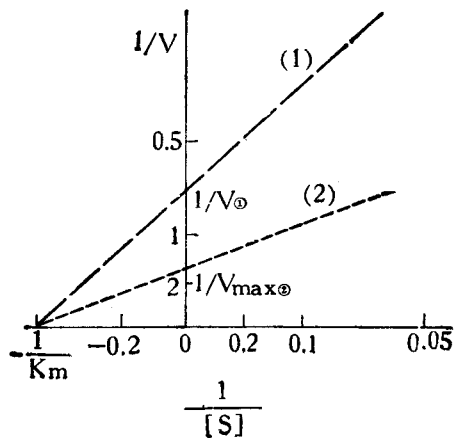


图2 S_0 膜上 ATPase 底物 ATP 浓度与反应速度的双倒数作图

K_m 作为酶的特征常数, 它反应了酶和底物亲和力的大小(其值用 $1/K_m$ 表示), 两种 Mg^{2+} 浓度不影响 K_m 值, 说明在这两种浓度下, Mg^{2+} 影响酶和底物的亲和力相等。 K_m 的物理意义只表示酶反应速度达最大反应速度一半时, 所要求的底物浓度, 测定 K_m 值的实验数据(图2)可以证明支原体膜上 ATPase 的反应速度规律, 是符合 Michaelis-Menten 方程的。Jinks 等人认为测定膜上的 ATPase 的 K_m 值受温度的影响, 而膜的流动性和相的状态不影响 K_m 。由此可推断出底物与酶的束缚力是发生在膜脂环境的

外面^[6]。而 V_{max} 不仅受温度的影响, 也受膜上相的状态的影响。这可能是膜上的酶与纯化后的酶在动力学性质上的差异之一。

5. 抑制常数 K_i 的测定

NaF 和 KSCN 对此酶有抑制作用^[4]。 本实验用含有 15.8mM NaF, 31.7mM KSCN 的 Tris-HAC 缓冲液反应体系, (加有 5 μM 的 Mg^{2+}) 在 pH7.4, 21 $^{\circ}C$ 条件下, 测得各组对应的 V_{max} 和 V_i , 然后以 Taidler^[6] 的公式计算之。 结果是: NaF 的 $K_i = 24.3(\mu M)^{-1}$, KSCN 的 $K_i = 56.7(\mu M)^{-1}$ 。 K_i 反应抑制剂与酶, 或抑制剂与酶-底物络合物结合的能力。 NaF 和 KSCN 均为非竞争性抑制剂, 它不影响酶的 K_m 值, 只是使 V_{max} 缩小了 $1 + K_i[I]$ 倍, 因 K_i 与底物浓度无关, 故用抑制剂浓度(或其倒数)表示之, 从所得值看 KSCN 的抑制作用比 NaF 强。 用定无机磷的方法比较, 所得数据相近。

(注: 本文实验数据均为三次以上实验的平均值)

承本所二室邹惠君同志、本室史宝生同志在实验技术上给予帮助, 谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Pollack, J. D. et al.: *J. Bacteriol.*, **90**, 617, 1965.
- [2] Razin, S.: *Microbiological Reviews*, **42**(2), 414, 1978.
- [3] Rottem, S. et al.: *J. Bacteriol.*, **92**, 714, 1966.
- [4] 黄芬等: 《实验生物学报》1981年, 第2期。
- [5] Rottem, S.: et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **219** (1) 104, 1970.
- [6] Taidler K. J.: *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, 1958.
- [7] Razin, S.: *J. Gen. Microbiol.*, **33**, 471, 1963.
- [8] Jinks, D. C. et al.: *J. Bacteriol.*, **136**, 1027, 1978.
- [9] Ulrich, F.: *J. Biol. Chem.*, **239**(10), 3532, 1964.
- [10] I Rwin, H. S.: *Biochemical, Calculation*, 1976.

[本文于 1981 年 1 月 5 日收到]