

无机磷影响叠氮钠对 ATP 合成酶合成活性的抑制*

蒙 昔 李生广** 林治焕

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 利用 ADP 和放射性磷直接合成 ATP 的方法, 研究了无机磷 (P_i) 和叠氮钠对猪心线粒体 ATP 合成酶 (F_1F_0 -ATPase) ATP 合成活性的影响. 结果发现无机磷除作为合成 ATP 的底物参与 F_1F_0 -ATPase 的合成反应外, 还对 F_1F_0 -ATPase 的合成活性呈现抑制作用, 在 1 mmol/L ADP 存在时, 随着 P_i 浓度由 0.01 ~ 10 mmol/L 增加, 抑制合成作用越来越强. 与叠氮钠在低浓度时 (小于 1 mmol/L) 只抑制 ATP 水解, 不影响 ATP 合成的观点不同. 实验结果显示 0.1 mmol/L 叠氮钠表现激活 F_1F_0 -ATPase 的 ATP 合成活性, 且激活程度与反应体系中所加 P_i 的浓度呈负相关. 当固定 P_i 浓度 (0.1 mmol/L) 后, 随着叠氮钠浓度的增加表现激活程度也在变化, 叠氮钠与磷浓度相等时表现激活程度最大, 直至叠氮钠浓度接近 0.5 mmol/L 时, 开始呈现表现抑制现象, 叠氮钠浓度高于 1 mmol/L 之后, 就出现解偶联现象.

关键词 F_1F_0 -ATPase, ATP 合成, 叠氮钠, 无机磷

学科分类号 Q244

线粒体 F_1F_0 -ATPase 复合体由突出膜外的 F_1 部分, 以及镶嵌于膜内的 F_0 部分组成. F_1 是催化 ATP 水解与合成的活性部位, 共有 6 个核苷酸结合位点, 3 个非催化位点位于 γ 亚基, 3 个催化位点位于 β 亚基. 1977 年, Kobayashi 等^[1]就指出叠氮钠是 *E. coli* H^+ -ATPase 的单向抑制剂, 即低浓度 (小于 1 mmol/L) 时只抑制 ATP 水解不抑制 ATP 合成. 1995 年, Syroeshkin 等^[2]以牛心亚线粒体为研究对象, 结果显示在反应底物 P_i 浓度为 10 mmol/L, ADP 浓度为 1 mmol/L 的合成反应体系中加入 0.1 mmol/L 叠氮钠后 ATP 合成活性不受影响, 但却抑制 F_1F_0 -ATPase 的水解过程. 基于这样的实验结果, Syroeshkin 等提出 F_1F_0 -ATPase ATP 水解和 ATP 合成过程是不可逆的论点. 长期以来, 人们根据大量实验的支持, 一直认为 F_1F_0 -ATPase 水解 ATP 的过程是其合成 ATP 过程的逆反应. 因此, 叠氮钠到底对 F_1F_0 -ATPase 合成 ATP 有无影响就成为人们希望了解的一个重要问题. 本文利用猪心亚线粒体研究了叠氮钠对 F_1F_0 -ATPase 合成 ATP 活性的影响, 和其与 P_i 在合成 ATP 过程中的相互作用, 以及无机磷 (P_i) 本身对 ATP 合成过程的影响. 发现 P_i 本身对 ATP 合成反应就有一定的抑制作用, 且影响叠氮钠对 ATP 合成酶合成活性的抑制.

1 材料和方法

1.1 材料

Tris, NADH, ATP, ADP, 丙酮酸激酶 (PK), 乳酸脱氢酶 (LDH), BSA 购自 Sigma 公司, 叠氮钠为 British Drug House LTD 产品. 其他为国产分析纯级.

1.2 猪心线粒体和亚线粒体的制备

猪心线粒体的制备按文献 [3] 方法进行. 亚线粒体参照文献 [4] 方法进行制备. 活力测定按李生广等^[5]方法进行. 本实验使用的亚线粒体比活力分别为 2.19 U/mg 和 2.17 U/mg 蛋白, 寡霉素抑制率分别为 74.5% 和 72.4%.

1.3 蛋白质浓度的测定

参照 lowry 方法^[6], 以牛血清蛋白 (BSA) 为标准.

1.4 F_1F_0 -ATPase 合成活性的测定

反应体系参照文献 [2], 合成 ATP 测定参照 ATP- P_i 交换方法 [7] 进行.

*国家自然科学基金 (39670183) 和北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室基金资助项目.

**通讯联系人.

Tel: 010-64888525, E-mail: lsg@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2000-11-23, 接受日期: 2001-01-20

反应总体积为 1 ml: 蔗糖 0.25 mol/L, EDTA 0.1 mol/L, BSA, Tris-HCl 50 mmol/L, 琥珀酸钠 20 mmol/L, ADP 1 mmol/L, P_i 0.1 ~ 10 mmol/L, pH 7.4, 加入约 0.5 ~ 1.0 mg 线粒体蛋白悬浮液. 加入放射性磷 ($^{32}P_i$ cpm 值约为 5×10^6) 后 (对照的样品在终止反应后加入放射性磷), 在 30 °C 保温 15 min, 加入 0.2 ml 30% 三氯酸终止反应. 在 4 000 r/min 离心 10 min, 取 0.2 ml 上清液. 按下述过程抽提掉未反应的无机磷.

样品 0.2 ml, 加 1.4 ml 钼酸铵

第一次抽提 加入 2.4 ml 异丁醇, 苯和丙酮 (用水饱和, 5:5:1) 混合物, 用力振荡, 2 000 r/min 离心 2 min, 可见分两层, 弃有机相, 留水相.

第二次抽提 重复上述过程两次, 经过三次抽提后, 将未反应的无机磷抽提干净.

第三次抽提

测放射性强度 取 1.0 ml 经上述抽提后的水层样品 (含合成的 ATP^*), 用液闪仪测其放射性强度.

另有一管作为总计数管, 取 1.0 ml 反应液, 加入 0.1 ml 水, 不经过上述抽提过程直接测放射性强度.

计算公式为:

$$ATPase \text{ 比活性 } (U \cdot mg^{-1}) = \frac{(C_1 - C_2) \times 1.2 \times 1.6}{C \times 2 \times 0.2 \times 1.0 \times P}$$

C_1 : 实验样品每分钟的计数 (cpm); C_2 : 对照样品每分钟的计数 (cpm); C : 总计数管每分钟的计数 (cpm); P : 放入反应系统中样品的蛋白量 (mg); 1.2: 反应液总体积 1.0 ml 加上终止反应后加入 0.2 ml 30% 过氯酸后的总体积; 0.2: 从 1.2 ml 的样品中, 取 0.2 ml 进行抽提; 1.6: 在 0.2 ml 抽提样品中加入 1.4 ml 钼酸铵后的总体积; 1.0: 测放射性强度时, 从 1.6 ml 中取样的量.

2 结果与讨论

2.1 无机磷对 F_1F_0 -ATPase 合成活力的影响

反应体系中固定底物 ADP 浓度为 1 mmol/L, 由 0.01 mmol/L, 0.1 mmol/L, 1 mmol/L,

10 mmol/L, 改变 P_i 浓度进行反应, 结果见表 1 和图 1 中的 A.

由表 1 和图 1-A 所示, 随底物 P_i 浓度的升高, F_1F_0 -ATPase 的合成活性降低, ATP^* 生成量减少. 由此可见 P_i 不仅作为底物参与 ATP 的合成, 而且对 F_1F_0 -ATPase 的活性也有一定的调节作用. 推测在 ATP 合成过程中 P_i 可能起着与水解过程中相同构象调节作用, 即, P_i 与酶分子结合导致酶分子的构象发生某种变化^[8], 这种变化使 ADP 与 F_1F_0 -ATPase 催化位点的结合能力降低, 阻碍了 ATP 合成过程的顺利进行. 因而呈现随 P_i 浓度增加而合成活性降低的情况.

Table 1 Effects of different P_i concentration on ATP synthesis of F_1F_0 -ATPase

$c(P_i)$ / mmol L^{-1}	No. of Experiments	Synthesis activity of F_1F_0 -ATPase / $U \cdot mg^{-1}$	s
0.01	2	0.73050	0.00354
0.1	10	0.55180	0.06826
1	10	0.25960	0.02687
10	6	0.04263	0.01203

ADP concentration is 1 mmol/L in the reaction system.

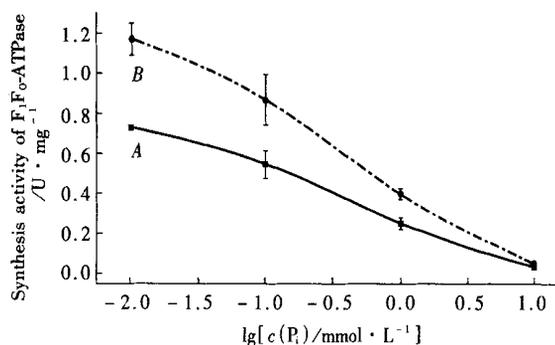


Fig. 1 Effects of P_i and azide on ATP synthesis of F_1F_0 -ATPase

In the reaction system, ADP concentration is 1 mmol/L. A: without azide in the reaction system; B: presence of 0.1 mmol/L azide in the reaction system.

2.2 叠氮钠对 F_1F_0 -ATPase 合成活力的影响

2.2.1 固定叠氮钠浓度变化磷浓度对酶活力的影响: 反应体系中固定底物 ADP 浓度为 1 mmol/L, 叠氮钠浓度为 0.1 mmol/L, 由 0.01 mmol/L, 0.1 mmol/L, 1 mmol/L, 10 mmol/L, 改变 P_i 浓度进行反应 (表 2 和图 1-B).

Table 2 Effects of different P_i concentration on the synthesis activity of F_1F_0 -ATPase in the presence of 0.1 mmol/L azide

$c(P_i)$ / mmol L^{-1}	No. of Experiments	Synthesis activity of F_1F_0 -ATPase / $U \cdot mg^{-1}$	s
0.01	2	1.17100	0.08061
0.1	7	0.87229	0.12582
1	6	0.40467	0.02413
10	3	0.06300	0.00265

ADP concentration is 1 mmol/L in the system.

图 1-B 可见在合成反应体系中有 0.1 mmol/L 叠氮钠存在情况下, 除 10 mmol/L P_i 浓度时, 由于 ATP 合成量很低, 绝对增加量较少外, ATP* 的生成量都明显提高. 这与 1977 年 Kobayashi 等提出的叠氮钠在低浓度时 (小于 1 mmol/L) 只抑制 ATP 水解不影响 ATP 合成的观点不同^[1]. 通过我们的实验发现叠氮钠在低浓度 (0.1 mmol/L) 时同样影响了 F_1F_0 -ATPase 的合成活性, 见表 3 和图 1. 且这一影响与反应体系中所加 P_i 浓度密切相关. 很可能是由于 ATP 合成过程中叠氮钠起着与在水解过程同样的稳固 $MgADP$ 与酶分子结合的构象作用, 拮抗了 P_i 与酶分子接触所导致 ADP 与 F_1 催化位点结合能力降低的构象变化, 使得 ADP 和 F_1F_0 -ATPase 的结合更为容易, 从而有利于 ATP 的合成, 呈现出较无叠氮钠存在时表观合成活性的增加.

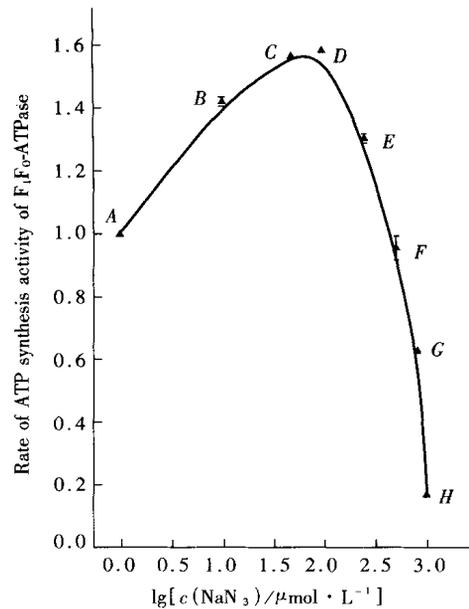
Table 3 Increased percentage of ATP synthesis of F_1F_0 -ATPase in presence of 0.1 mmol/L azide compared with the control (without azide)

$c(P_i)$ / mmol L^{-1}	0.01	0.1	1	10
Increased percentage of ATP synthesis	60.3 %	58.1 %	55.9 %	47.8 %

2.2.2 固定磷浓度变化叠氮钠浓度对酶活力的影响: 反应体系中固定底物 ADP 浓度为 1 mmol/L, P_i 浓度为 0.1 mmol/L, 改变叠氮钠浓度进行反应, 结果见图 2.

以不加叠氮钠合成体系 ATP 生成量 (A) 为参照点, 定义为 1. 加入叠氮钠后 F_1F_0 -ATP 合成酶的 ATP 合成活性表观看来迅速提高, 0.01 mmol/L 时提高了 40% 左右. 在无机磷与叠氮钠浓度比约为 1 时, F_1F_0 -ATP 合成酶的合成活性

达到最高点 (D). 而在叠氮钠浓度更高的合成体系 (D ~ F) 中 F_1F_0 -ATP 合成酶的合成活性虽仍高于 (A) 点, 却已出现明显的下降趋势. 降至点 (F) 后呈现一段表观抑制过程, 解偶联作用应始于 (H) 点之后, 这时合成体系中叠氮钠浓度高于 1 mmol/L.

**Fig. 2** Effects of azide on ATP synthesis activity of F_1F_0 -ATPase

In the reaction system ADP concentration is 1 mmol/L and P_i is 0.1 mmol/L. From A to H, the concentrations of azide are: 0 mmol/L, 0.01 mmol/L, 0.05 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.25 mmol/L, 0.5 mmol/L, 0.8 mmol/L, 1 mmol/L.

如上节所述, 叠氮钠拮抗了 P_i 导致的 F_1 催化位点的构象变化, 稳固了 $MgADP$ 与 F_1F_0 -ATP 合成酶催化位点的结合, 较之 P_i 单独对酶分子的作用更有利于 ATP 的合成. 在 (D) 点这种相互拮抗作用达到最高, 即叠氮钠几乎完全拮抗了 P_i 对酶分子构象的影响, 因而表现出了最大的合成活性. (D) 点之后叠氮钠对酶分子构象的影响开始占主导地位, 且这种主导地位逐渐加强, 即叠氮钠稳固“ADP 与酶分子结合能力”逐渐大于 P_i 驱使的“ADP 与酶分子结合减弱的的能力”, 这种构象同样呈现出使 ATP 合成能力逐渐降低的趋势. 1998 年, Weber 等^[9]利用催化位点上色氨酸光谱特性的研究, 发现叠氮钠同时降低 $K_d(ATP)$ 和 $K_d(ADP)$ 值, 但对 $K_d(ATP)$ 的影响远大于对 $K_d(ADP)$ 的影响. 反应体系中由于 ATP 合成量的积累, 叠氮钠降低 $K_d(ADP)$ 的同时造成 ATP 和 F_1F_0 -ATPase 的结合, 这种作用不利于产物 ATP 的解离, 一定程度上更为严重地干扰了 ATP

的合成过程. 因而在叠氮钠浓度更大的合成体系 ($F \sim H$) 里, 由于上述两种因素的作用, 叠氮钠才开始呈现出表观抑制合成的作用. 当叠氮钠浓度高于 1 mmol/L 时 F_1F_0 -ATP 合成酶合成活性迅速降低, 几乎为零. 显然, 这时叠氮钠引起了解耦联作用. 类似于 Kobayashi 等的实验^[1], 他们用大肠杆菌 H^+ -ATPase 为实验材料证明了在叠氮钠高于 10 mmol/L 的合成体系里起解耦联的作用, H^+ -ATPase 的合成活性迅速降低.

如上所述 P_i 不仅作为合成 ATP 的底物参与 F_1F_0 -ATP 合成酶的合成反应, 且对该酶的合成活性也有一定的抑制作用. Synroeshkin 等^[2] 根据他们的实验, 0.1 mmol/L 叠氮钠只抑制 F_1F_0 -ATPase 水解反应, 而不抑制其 ATP 合成反应, 提出 ATP 合成反应不是 ATP 水解反应的逆反应. 因而对被多数实验支持的 ATP 水解是 ATP 合成的逆反应提出了置疑. 叠氮钠是否是只抑制 F_1F_0 -ATPase 水解反应而不抑制其 ATP 合成反应呢? 根据我们的实验, 当 ADP 为 1 mmol/L, 而 P_i 为 10 mmol/L 时, 这时 F_1F_0 -ATPase 因受 P_i 的抑制作用, 合成活力已经很低, 在这种情况下观察叠氮钠对其合成活性的影响, 误差是极大的, 显然是难以得到准确的结果. Synroeshkin 等正是在这种十分不利的条件下进行 ATP 合成实验, 这样的结果是缺乏说服力的. 我们研究叠氮钠对 F_1F_0 -ATP 合成酶合成活性影响时, 选用了 ATP 合成活性较高的条件下进行的, 此时 ADP 浓度为 1 mmol/L, P_i 浓度仅为 0.1 mmol/L (图 1). 不同于叠氮钠是 F_1F_0 -ATP 合成酶单向抑制剂的观点, 我们得到叠氮钠同样影响 F_1F_0 -ATP 合成酶的 ATP 合成活性

的结果, 且这种影响机理可能类似于叠氮钠对 F_1F_0 -ATPase 水解 ATP 的影响, 即稳固 MgADP 与酶结合的构象, 降低了 K_d (ATP) 和 K_d (ADP) 值. 但由于合成反应中 P_i 的存在及其与叠氮钠作用的拮抗, 使得这种现象不易显现出来. 我们的实验结果支持 ATP 合成与 ATP 水解是可逆反应.

参 考 文 献

- 1 Kobayashi H, Maeda M, Anraku Y. Membrane-bound adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*: Effects of sodium azide on the enzyme functions. *J Biochem*, 1977, **81** (4): 1071 ~ 1077
- 2 Syroeshkin A V, Vasilyeva E A, Vinogradov A D. ATP synthesis catalyzed by the mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase is not a reversal of its ATPase activity. *FEBS Letters*, 1995, **366** (1): 29 ~ 37
- 3 赵云鹏, 张淑秀. 猪心线粒体可溶性腺三磷酶 (F_1 -ATPase) 冷敏感性的研究. *生物化学与生物物理进展*, 1981, **2**: 41 ~ 44
- 4 Zhao Y J, Zhang S X. *Prog Biochem Biophys*, 1981, **2**: 41 ~ 44
- 5 Lee C P, Ernster L. Studies of the energy-transfer system of submitochondrial particles 2. Effects of oligomycin and aurovertin, *Eur J Biochem*, 1968, **3** (3): 391 ~ 400
- 6 李生广, 孙 珊. 利用分光光度法测定 ATP 酶的水解活力. *生物化学与生物物理进展*, 1983, **6**: 70 ~ 72
- 7 Li S G, Sun S. *Prog Biochem Biophys*, 1983, **6**: 70 ~ 72
- 8 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the folinphenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193** (1): 265 ~ 275
- 9 Nelson N, Chibovsky R, Gutnick D L. ATP synthesis and regulation, *Methods in Enzymol*, 1979, **LV**: 356 ~ 363
- 8 杨树长, 李生广, 林治焕. 无机磷和叠氮钠对线粒体构象的不同影响. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, **15** (3): 471 ~ 474
- Yang S Z, Li S G, Lin Z H. *Chin J Biochem Mole Biol*, 1999, **15** (3): 471 ~ 474
- 9 Weber J, Jenior A E. Effects of the inhibitors azide, dicyclohexylcarbodiimide, and aurovertin on nucleotide binding to the F_1 -ATPase catalytic sites measured using specific tryptophan probes. *J Biol Chem*, 1998, **273** (50): 33210 ~ 33215

The Effects of P_i on the Inhibition of ATP Synthesis Activity of F_1F_0 -ATPase by Azide *

MENG Xi, LI Sheng-Guang **, LIN Zhi-Huan

(*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China*)

Abstract Using ATP direct synthetic method with ADP and radiophosphate, the effects of azide and inorganic phosphate on the ATP synthesis of F_1F_0 -ATPase from pig heart mitochondria are investigated. It is found that P_i not only takes an active part in ATP synthesis as a substrate, but also has an inhibition effect on ATP synthesis of F_1F_0 -ATPase. In the presence of 1 mmol/L ADP the inhibition increases with the increase of P_i concentration from 0.01 mmol/L to 10 mmol/L. The viewpoint is different from that azide only inhibits ATP hydrolysis but not affects the ATP synthesis at low concentration (< 1 mmol/L). The results indicate that

0.1 mmol/L azide apparently activates ATP synthesis of F_1F_0 -ATPase. The activation is negatively related to the concentration of P_i in the reaction system. When the concentration of P_i is kept at 0.1 mmol/L, with the increase of azide concentration, the apparent activation degree of ATP synthesis by azide is changed. When the concentrations of azide and P_i are equal, the apparent activation by azide is the biggest. The apparent inhibition of ATP synthesis by azide would not begin until the concentration of azide reaches near 0.5 mmol/L. After the concentration of azide is higher than 1 mmol/L, the uncoupling of F_1F_0 -ATPase appears. The mechanism of the roles of azide and P_i is discussed.

Key words F_1F_0 -ATPase, ATP syththesis, azide, P_i

*This work is supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (39670183) and National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering Foundation, Peking University.

**Corresponding author. Tel: 86-10-64888525, E-mail: lsg@sun5.ibp.ac.cn

Received: November 23, 2000 Accepted: January 20, 2001

转基因植物疫苗免疫原基因表达研究概述

程丽琴 周继勇

(浙江大学动物预防医学研究所, 杭州 310029)

近年来, 随着基因工程、蛋白质工程以及免疫学理论与技术的迅速发展, 以开发新型高效疫苗为目标的新的研究领域异常活跃, 基因工程亚单位疫苗、基因缺失疫苗、重组病毒活载体疫苗、核酸疫苗各展风姿, 但这些系统存在设备复杂, 成本高, 免疫原性较差和外源微生物污染的缺陷. 为克服上述缺陷, 进入 20 世纪 90 年代, 以植物为生物反应器的疫苗研究策略迅速发展, 短短几年以植物为生物反应器的可食性疫苗取得了可喜的进展, 这些进展也开辟了植物生物技术革命的新天地.

1 转基因植物基因疫苗研究原理和策略

利用转基因植物生产疫苗, 是将抗原基因导入植物, 使其在植物中表达, 人或动物摄取该植物或其中的抗原蛋白质, 就可产生对某抗原的免疫应答. 转基因植物生产口服疫苗的流程如下: 目的抗原基因的获得, 插入到结构基因构建植物表达载体, 通过农杆菌介导的转化使目的基因导入植物基因组中, 进行愈伤组织的诱导和分化及转基因植物的再生, 最后进行表达水平的检测和免疫原性的测定等过程.

2 外源基因在转基因植物中的表达及免疫原性

到目前为止, 已经有乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 在烟草、马铃薯和番茄中表达且转基因植物表达的抗原与目前用作疫苗的酵母表达的 rHBsAg 十分相似, 成功地保持了蛋白质的特性, 如可激发 B 细胞和 T 细胞免疫反应的抗原决定簇. 诺沃克病毒外壳蛋白 (NVCP) 在转基因烟草和马铃薯中的表达及其表达产物口服免疫原性. 猪传染性肠胃炎病毒 (TGEV) S 蛋白在转基因芥菜和马铃薯中表达, 完整 S 基因表达产物可诱导机体产生优良的免疫应答,

其抗体效价可达 1:320 以上. 另外用转基因玉米表达了 TGEV 的 S 蛋白, 并与 TGE 弱毒活疫苗比较, 进一步证实 TGEV 转基因可食性疫苗对仔猪的保护效果优于 TGE 弱毒疫苗. 大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚单位 (LT-B) 和霍乱毒素 B 亚基 (CT-B) 基因在烟草和马铃薯中表达, 表达产物免疫小鼠, 强毒攻击试验结果表明, 具有良好免疫原性.

另外, Carrillo 和 Wigdorovitz 分别获得了口蹄疫病毒 VP1 基因的转基因拟南芥, 用含 rVP1 的叶浸提物免疫小鼠, 均可诱导特异性抗体的产生, 且免疫鼠均可抗 FMDV 强毒攻击. GI 等成功地将犬细小病毒、口蹄疫病毒、牛轮状病毒的多肽与 B-葡糖苷酶 (GUS) 蛋白融合进行了植物表达, 用 GUS 融合表达的犬细小病毒 VP2 蛋白的抗原饲喂小鼠, 可诱导产生中和抗体, 融合蛋白含量占转基因植物叶片可溶性蛋白的 3%.

3 转基因植物疫苗的优势及其前景展望

转基因植物作为疫苗生产的生物反应器, 为人类提供了一个安全和廉价的生产体系, 与微生物发酵、动物细胞和转基因动物等生产系统相比, 它具有许多潜在的优势: a. 植物细胞具有全能性, 能够再生植株, 转基因植物的种植不需要特殊技术和复杂的生产设备和设施, 是最经济有效的疫苗生产系统, 具有生产成本低的特点; b. 常规疫苗和其他新技术疫苗在制备过程中, 很容易发生外源性病原污染, 尤其是一些对人类和动物健康影响较大的病原污染, 而转基因植物疫苗传递系统无此缺陷, 具有安全性好的特征. c. 疫苗生产过程具有绿化、美化环境作用; d. 贮存条件要求低, 不需冷冻运输. 因而在未来的疫苗研究及其产业化生产中具有广阔的应用前景.