

嗜冷弧菌 ATCase 的酶学特性

张 远 富

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 北京 102206)

徐 莹 M Van de Castele 梁子原 N Glansdorff

(布鲁塞耳自由大学微生物学遗传学研究所 E. Grysonlaan 大道 1 号 布鲁塞耳 B1070 比利时)

摘要 从非洲 2800 米深的海底分离的嗜冷弧菌 (*psychrophilic Vibrio* sp.) 菌株 2693 的天冬氨酸氨甲酰基转移酶 (ATCase) 进行了某些酶学特性方面的研究。该酶由一条催化链和一条调节链组成, 全酶的分子量为 350ku。酶反应最适温度在 37℃ 左右。该酶受嘧啶生物合成的最终产物 CTP 的反馈抑制。但是, 嘌呤途径的最终产物 ATP 并没有表现出明显的激活作用。

关键词 嗜冷弧菌, ATCase, 酶学特性

分类号 Q938.8 **文献识别码** A **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-41-44

ENZYMOLOGICAL PROPERTIES OF ATCase FROM A PSYCHROPHILIC *VIBRIO* 2693

Zhang Yuanfu

(Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy for Preventive Medicine, Beijing 102206)

Xu Ying, M Van de Castele, Liang Ziyuan, N Glansdorff

(Institute of Microbiology and Genetics, 1 ave E. Grysonlaan B1070, Brussels Belgium)

Abstract Studies of enzymological properties of ATCase from a psychrophilic *Vibrio* sp., strain 2693 revealed that the activity increased gradually with temperature between 0 and 37°C. Above 40°C, the activity decreased. The optimal temperature for this enzyme was about 37°C. Still considerable activity was observed at 0°C. ATCase activity did not appreciably decreased, up to 50°C, but thereafter drastically declined. It can be seen that the enzyme was almost completely inactivated by a 15 min incubation at 60°C. The transition midpoint was about 55°C. This enzyme is feed-back inhibited by CTP, the end product of pyrimidine biosynthesis, however it is not appreciably activated by ATP, one end product of the purine pathway. The ATCase consisted of a catalytic and a regulatory chain, the molecular mass of the holoenzyme approximates 350Ku.

Key words Psychrophilic *vibrio*, ATCase, Enzymological properties

对嗜极性微生物的研究,将了解有机体对极端环境条件下的生物学适应性的分子机理提供一些信息。在这方面,对既嗜冷又耐压的嗜冷性弧菌 2693 有着特别的意义。弧菌 2693 生长温度为 0~14°C,最适合生长温度为 6°C。ATCase 催化氨甲酰磷酸和天冬氨酸缩合,生成氨甲酰-L-天冬氨酸和无机磷,这一反应是嘧啶生物合成的第一步,也是关键的一步。研究得最详细的是大肠杆菌的 ATCase。科学家们从协同和别构控制的机制^[1],以及从原核生物到人这一机制的进化中来研究结构与功能关系,把大肠杆菌的 ATCase 作为研究结构与功能关系的模型。ATCase 由二个起催化作用的三聚体通过蛋白质桥与调节亚单位互相联结起来。pyrB 基因编码催化链,pyrI 基因编码调节链^[1]。本文仅就其某些酶学特性作一简要报道。

1 材料和方法

1.1 材料

化学试剂:氨甲酰基磷酸盐, L-天冬氨酸,三磷酸腺苷 (ATP), 三磷酸胞苷 (CTP), 购自

Sigmaco.

菌株:嗜冷弧菌 菌株 2693 是从非洲的海底 (2800 米深) 分离的, 生长在富集的海洋无机培养基中 (此培养基购自 Difco Laboratories)。生长温度为 2~14°C, 最适合的生长温度 6°C。

1.2 方法

用 Lowry 等^[2]法测定蛋白质浓度。测定 ATC 酶活性的方法是按照 Gerhart 和 Pardee^[3]所介绍, 并由 Fortermann 等^[4]所改进的标准比色测定法。按 Xi 等^[5]介绍的方法测定核苷酸对酶促反应速度的影响。ATC 酶的活性用每毫克蛋白质的酶单位来规定, 每小时合成 1moL 氨甲酰天冬氨酸所需的酶量定为一个酶单位。

2 结果

2.1 最适温度

为测定弧菌 2693 ATC 酶反应活性的最适温度, 在不同温度下 (0~60°C) 检查无细胞提取物的酶活性。测定的结果表明, 该酶在 0~37°C 之间, 酶的活性随着温度的增加而逐渐增加。高于 40°C 时, 活性降低。最适温度在 37°C 左右。0°C 时, 仍具有明显的活性 (约为最高酶

活性的 19%)。

2.2 热稳定性

弧菌 2693 无细胞提取物 (在 50mmol/L, (pH9.0) Tris 缓冲液于不同温度中保温 15min (此时未加底物)。取出样品, 在标准试验条件下 (反应温度为 30℃, 反应时间为 10min) 测定它的 ATC 酶活性, 测定的温度范围为 0~60℃。测定结果见图 1。

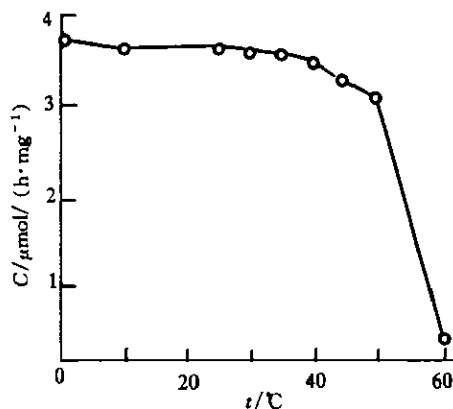


图1 ATC 酶的热稳定性

从实验结果可以看出 50℃ 之前酶活性稳定, 没有明显的降低。但是 50℃ 之后酶活性大幅度下降 (由 3.0 降到 0.26)。60℃ 中保温 15min, 酶的活性几乎完全丧失。转换中点在 55℃ 左右。

2.3 效应剂的影响

为测定效应剂 ATP、CTP 对弧菌 2693ATC 酶活性的影响, 在实验中设置实验组和对照组。对照组是未加效应剂所测得的活性值, 实验组是加效应剂所测得的活性值, 实验温度为

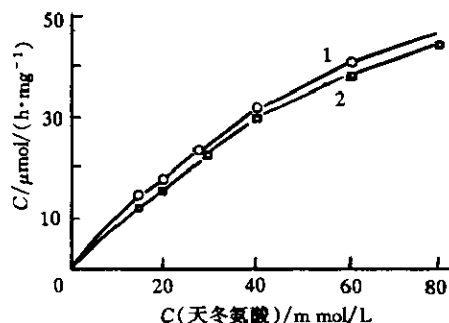


图2 ATP对酶活性的影响

1. +ATP, 2. -ATP

30℃。图 2 是 ATP 对弧菌 2693ATC 酶活性的影响, 对照组的 V_{max} 值为 42.00, 实验组为 45.00, 两组 V_{max} 值并无明显差别, 说明嘌呤途径的最终产物 ATP 并没有表现出明显的激活作用。

图 3 是 CTP 对酶活性的影响, 对照组的 V_{max} 为 38.00, $S_{0.5}$ 为 14mmol/L, 实验组 V_{max} 为 8.00, $S_{0.5}$ 为 17mmol/L, 所以, 嘧啶生物合成的最终产物 CTP 对弧菌 2693ATC 酶的活性有很强的反馈性抑制作用。

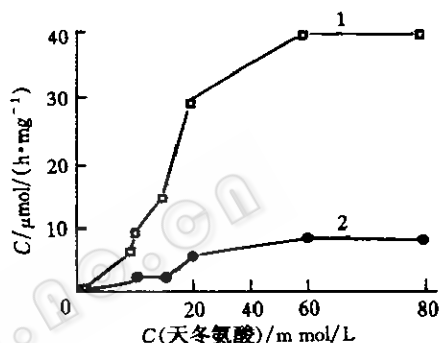


图3 CTP对ATC酶活性的影响

1. -CTP, 2. +CTP

2.4 酶的结构

该酶由一条催化链和一条调节链组成。pyrB 基因编码催化链, pyrI 基因编码调节链^[6]。

3 讨论

我们首次描述了嗜冷性微生物的天冬氨酸氨甲酰基转移酶 (ATC 酶)^[6]。对于多数这种类型的微生物来说, 酶活性较为适宜的温度大约是 10~30℃, 高于宿主菌株的最高生长温度^[7]。弧菌 2693ATC 酶也不例外, 因为这种酶的活性峰是在大约 37℃ 处; 而它的生长温度范围是 2~14℃ 之间, 当温度增到 18℃ 时, 则停止生长。但是有一点是非常明显的, 那就是从生理学角度看, 在宿主菌株的整个生长温度范围内, 弧菌 ATC 酶显示出明显的活性。当然最好的方法是用纯酶制品来进行研究, 从而计算出实际的催化效率, 以便测定在低温下酶的活性是否比中温配对物高, 因为目前人们相信这一点是根据少数例子得出的^[8]。弧菌 2693 的 ATC 酶如同

大肠杆菌配对物一样,确实也受 CTP 所抑制,但是对 ATP 几乎不敏感,但 ATP 能激活大肠杆菌的 ATC 酶,这可能与两者的 ATC 酶接受 ATP 信号的位点的界面类型不同有关^[6]。

参 考 文 献

[1] Allewell. Trends Biochem Sci, 1987, 12:331~332.

[2] Lowry O H. J Biol Chem, 1951, 193:265~275.

[3] Gerhart J C. J Biol Chem, 1962, 237:891~896.

[4] Fortemann K F. J Bacteriol, 1986, 167:285~290.

[5] Xi X G. J Mol Biol, 1991, 220:789~799.

[6] 张远富. Microbiology, in press February UK, 1998.

[7] Morita R Y. Encyclopedia of Microbiology, Vol. 2, Ac. press Inc., NewYork, 1992, 625~637.

[8] Filler B. FEMS Microbiol Rev, 1996, 18:189~202.