

环一磷酸腺苷(3',5'-cAMP) 对三磷酸腺苷(ATP)形成的影响*

饶玉树 苏拔贤

(生物学系生化室)

摘 要

本文研究了环一磷酸腺苷(3',5'-cAMP)对三磷酸腺苷(ATP)形成的影响。利用啤酒酵母在适当条件下与腺嘌呤一起温育,当加入cAMP及cAMP磷酸二酯酶抑制剂茶碱后,ATP形成量显著增加;但cAMP不能改变ATP形成的高峰期,温育5-6小时后ATP形成到达高峰,ATP的最高产量可达12mM/ml,一般情况下为8mM/ml左右。而未加cAMP的对照组ATP的形成量只有4mM/ml。

环一磷酸腺苷(3',5'-cAMP)在生物体内的作用是近年来生物科学中比较活跃的研究课题。Robinson等⁽¹⁾曾作了较为系统的叙述。随着时间的推移,cAMP的研究涉及的范围不断扩大。

cAMP在生物体内的作用是多方面的。在动物体内,cAMP作为第二信使协同激素执行多种生理机能^(2,3)。在微生物中cAMP的非特异性作用有效地控制着微生物的生长和代谢^(4,5)。此外,cAMP亦从分子水平上控制着蛋白质合成⁽⁶⁾、细胞的生长、形态的变化及基因的表达等^(7,8)。

一般认为在细胞内,ATP在腺苷酸环化酶的作用下转化为3',5'-cAMP,到目前为止,大部分涉及到对cAMP作用的研究都与ATP的消耗有关。本实验证明,在一定条件下,当茶碱等3',5'-cAMP磷酸二酯酶抑制剂存在时,外源性cAMP能有效地促进ATP的形成和积累。

材 料 和 方 法

一、材料

- 1) 5'-AMP 佳木斯啤酒厂出品,纯度78%;
- 2) 腺嘌呤(维生素B₄) 上海辅料厂产品,纯度90%以上;
- 3) 3',5'-cAMP 本室合成,层析纯,含量95%以上;
- 4) 啤酒酵母 取自广州饮料厂。

* 本文采用的缩写:3',5'-cAMP或cAMP为腺嘌呤核苷3'5'-环状一磷酸,简称环一磷酸腺苷;ATP为三磷酸腺苷。

5) 茶碱.

除茶碱为生物试剂外,其余化学药品均为化学纯。

二、反应系统 除根据需要另加入各种辅助因子(见实验部分)外,基础反应系统参照我室以前工作报告⁽⁴⁾,其配比如表1所示,啤酒酵母经2500r.p.m离心10分钟后取酵母泥备用。

表1 基础反应系统

	I	II
5'-AMP (mg/ml)	0.50	—
B ₄ (gm)/ml	2.12	2.12
NaH ₂ PO ₄ (mg/ml)	20.00	20.00
葡萄糖 (mg/ml)	25.00	25.00
4% MgCl ₂ (w/v)	1%(v/v)	—
4% KCl (w/v)	1%(v/v)	1%(v/v)
酵母泥 (湿重)(g)	30%(w/v)	30%(w/v)
pH	7.0	7.0

三、分析方法

1) 纸层析 采用新华1号层析滤纸,溶剂系统I为正丁醇:吡啶:水(1:1:1, v/v),溶剂系统II为异丁酸:0.5M氢氧化铵(100:60, v/v),室温上行20厘米。

2) 纸电泳 新华1号滤纸裁成20×3厘米,采用pH3.0, 0.02M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,电压15—20v/cm,室温2小时。

3) 薄层层析 DEAE-纤维素(DE II)用1NHCl浸泡6小时后水洗至中性,然后以少量蒸馏水调成浆状,均匀地涂布于20×6厘米的普通玻片上,厚度适中,60℃烘干备用。点样后斜放于0.02M柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH3.0)中,溶剂行进15—17厘米后,紫外灯下观察紫外吸收点。

4) 紫外分光光度测定 反应每进行1小时,取样一次,离心后取上清液点样10微升,于层析溶剂系统I中上行层析展层两次。紫外灯下画出吸收点(系统I中展层二次的层析图谱见图1),剪下标准品及样品中对应处的紫外吸收点后,以5ml, 0.01NHCl,

45℃浸泡1.5小时洗脱,各管洗脱液用 Unicam sp5 00分光光度计测定光吸收值(O.D),按下式计算各物质浓度:

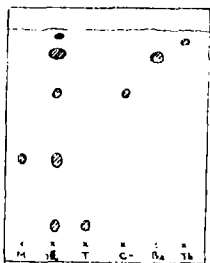
$$C_{(mM)} = \frac{O.D_{260}}{E_{260}} \times 500 \times 1000$$

其中: C——ATP, AMP, B₄或cAMP的毫克分子浓度;

O.D₂₆₀——260mμ下, ATP, AMP或B₄的光密度值, cAMP为O.D₂₅₈;

E₂₆₀——260mμ下, ATP, AMP及B₄的克分子消光系数, cAMP为E₂₅₈;

500——稀释倍数。



M—5'-AMP
混—5'-AMP, ATP,
cAMP, B₄, 茶碱的
混合样品
T—ATP
C—3', 5'-cAMP
B₄—维生素B₄(腺嘌呤)
Th—茶碱

图1 反应清液在溶剂系统I中的层析图谱

四、产物鉴定 为了进一步证实本实验的结果, 实验过程中除采用溶剂系统 I 纸层析为主要分离分析手段外, 还配合采用了溶剂系统 II 纸层析和纸电泳进行分析及以薄层层析跟踪反应, 及时了解反应进程; 反应终止后, 以钼汞法提取 ATP, 并用酒精沉淀获得 ATP 粉, 再用不同溶剂系统纸层析和纸电泳鉴定, 并稀释至一定浓度, 于 Unicam sp-700 分光光度计中描出不同 pH 下 ATP 的吸收曲线 (见图 2)。

实验部分

一、实验设计 为全面快速地检讨诸因素对实验结果的影响, 在本实验进行的前期采用正交设计⁽¹⁰⁾〔按需要选用正交表 $L_{16}(4^4 \times 2^8)$ 和 $L_9(3^4)$ 〕, 对结果进行分析后订出进一步实验计划。

二、实验结果 本文仅将正交设计指导下各组实验结果分述于后, 同时, 为了使实验数据有指导生产的意义, 逐步扩大实验反应系统的总体积, 由开始 100 毫升扩大至 500、1000 至 5000 毫升。根据前期多次实验结果, 使用基础反应系统 (I) 比系统 (II) ATP 形成量均高出 10% 以上, 故以下实验均用系统 (I) 进行反应。

1) cAMP 添加量与 ATP 积累的关系 反应系统如表 (1), 37°C 温育一小时后, 加入不同量的 cAMP, 按材料与方法部分所述, 跟踪反应进行的情况, 并且测定 ATP 形成的高峰期和生成的量, 结果如图 (3) 所示。由图 3 可见, $10^{-5}M$ 的 cAMP 即有利于 ATP 的生成, 随着添加 cAMP 量的增加, ATP 形成也明显增加。添加 $10^{-3}M$ cAMP 时温育 5 小时 ATP 形成量最高可达 12mM, 一般情况都有 7—9mM, 比没有添加 cAMP 时, ATP 的形成量平均高出 100%, 但 cAMP 添加量多少均不能使产物——ATP 形成的高峰期提前。当反应系统中单独加入 cAMP 时, 约在 3 小时后, cAMP 在纸层析上的斑点即完全消失。

2) 茶碱对 cAMP 影响 ATP 形成的协同作用 茶碱能有效地抑制 3', 5'-cAMP 磷酸二酯酶对 cAMP 的分解作用⁽¹¹⁾, 因此加入茶碱应能间接增强 cAMP 对 ATP 形成的影响。在表 1 所示的反应系统 (I) 中加入 $10^{-3}M$ 的茶碱后, cAMP 对 ATP 的形成的影响及 cAMP 在反应过程中的变化情况如图 4, 5 所示。由图中可以看出, 加入一定量茶碱后, cAMP 在反应混合物中的消失速度变慢, 这与单独加入 cAMP 时形成明显的对比。同时, 茶碱能有效地协同 cAMP 刺激 ATP 的形成和积累。但单独加入茶碱对 ATP 形成



图2 ATP产品在Unicam Sp-700分光光度计下的紫外吸收图谱

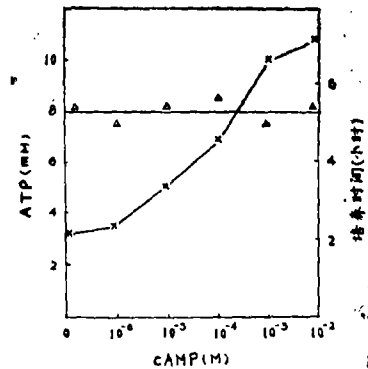


图3 cAMP对ATP形成量及形成高峰期的影响
条件: 反应系统(I)温育至6小时, 37°C
×—为ATP实际生成的量
△—为ATP形成的高峰期(培养时间)

量无明显影响。

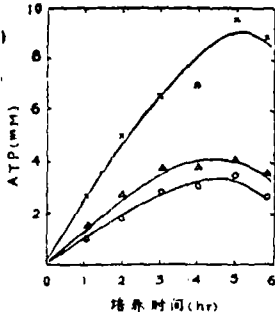


图4 加入cAMP和茶碱及只加茶碱对ATP形成的影响

× — 加入
cAMP($10^{-3}M$)
和茶碱($10^{-3}M$)
△ — 只加
茶碱($10^{-3}M$)
O — 对照

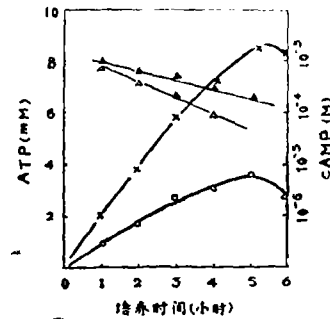


图5 茶碱的存在对cAMP在反应混合物中消失速度的影响

× — 单独加入
cAMP($10^{-3}M$)
O — 对照
△ — 无茶碱存在时
cAMP的变化
▲ — 有茶碱存在时
cAMP的变化

3) 甘油对 ATP 积累的影响 Gudewiey 等⁽⁴⁾指出甘油能提高细胞内 cAMP 水平。在本实验中也观察到, 15—20% (w/v) 的甘油对 ATP 的积累有促进作用。但随着甘油量的增加, ATP 形成量明显下降, 这可能是由于甘油对微生物生长代谢的抑制所致。

4) 各种金属离子对 ATP 形成的影响 cAMP 的生理功能与某些金属离子是分不开的。在 cAMP 存在下, 分别考察了 K^+ 、 Ca^{++} 、 Mg^{++} 和 Mn^{++} 对 ATP 形成的影响, 结果如表 2 所示。由表 2 可见, 在本实验条件下: Mg^{++} 是必需的, K^+ 的含量对 ATP 形成关系较大; Ca^{++} 的浓度过高时, 将严重影响 ATP 的积累; Mn^{++} 对 ATP 的形成无明显影响。

表 2 金属离子对 ATP 形成的影响

	$0.5 \times 10^{-2}mM$	$2.5 \times 10^{-2}mM$	$5 \times 10^{-2}mM$
K^+	+	++	+++
Mg^{++}	++	+++	+++
Mn^{++}	+	++	+
Ca^{++}	±	-	--

注: +、- 符号表示与对照组 ATP 量的高、低程度。

讨 论

3',5'-cAMP 对微生物的生长及代谢的影响已见报告^(4,5)。很多作者已经证明 cAMP 能活化蛋白质磷酸化酶, 认为被 cAMP 活化了的蛋白激酶, 将 ATP 的 γ 位上的磷酸基转至激酶的反应底物, 即蛋白分子的丝氨酸和苏氨酸残基上, 以改变底物蛋白的反应性能; 又细胞内 cAMP 的形成有赖于 ATP 的分解, 即在腺苷酸环化酶的作用下将 ATP 转化为 3',5'-cAMP^(1,3)。上述有关 cAMP 的作用与形成都与 ATP 的分解有关。而我们的实验则证明, 在本实验条件下, cAMP 相当明显地刺激 ATP 的形成和积累, 但其机制尚不十分清楚。

茶碱能协同cAMP增加ATP的形成和积累,而且使cAMP分解速度减慢。曾有报告提到ATP的形成与酶的泄放有关^(11,12,13),表面活性剂能有效地增强酵母细胞的上清液形成ATP的能力。因此,我们认为cAMP的可能作用是:(1)活化本反应系统中与ATP合成有关的酶类;(2)能有效地改善细胞膜的透性,有利于产物或底物的渗漏或泄放,从而促进ATP的形成和积累。

参 考 文 献

- [1] Robinson, G. A. et al., *Cyclic AMP*, New York, Academic Press, (1971).
 [2] George I. Drummond et al., *Annual Report in Medicinal Chemistry*, 1970, Academic press, New York, (1971), 215.
 [3] Rynchi Noyowa (野泽龙嗣), *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, 18 (1973), 13, 1195.
 [4] N. D. Gudewicz et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52 (1973), 4, 1257.
 [5] W. S. M. Wold et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 50 (1973), 2, 237.
 [6] Nages. G., *Acta Endocrinol.*, 75 (1974), 2, 398.
 [7] Roelend Van wijic et al., *Cancer Res.*, 32 (1972), 9, 1905.
 [8] B. M. Bombilc, *Exp. Cell Res.*, 80 (1973), 1, 88.
 [9] 中山大学生化微生物教研室, 由腺嘌呤酶促合成三磷酸腺苷的研究, 中山大学学报(自然科学版), (1975), 3, 15.
 [10] 中国科学院数学所统计组编, 常用数理统计方法, 科学出版社, (1973), 34.
 [11] Tock, kua, A. et al., *J. Ferment Technol.*, 45 (1967) 511—529.
 [12] Tanaka, A. and Hironaka, *J. Agr. Biol. Chem.*, 36 (1972), 867—869.
 [13] 胡兆庆等, 面包酵母酶促磷酸化合成腺嘌呤核苷三磷酸, 微生物学报, 18 (1978), 3, 239—247.

A Stimulative Effect of 3,5—cAMP on Formation of ATP by Yeast

Rao Yu shu Su Ba xian

Abstract

During production of adenosine triphosphate (ATP) by yeast from adenine, a stimulative effect on the formation of ATP has been found when 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (3',5'-AMP) and 3',5'-AMP phosphodiesterase inhibitor theophylline were added. Under optimal conditions, the accumulation of ATP increased markedly, but the incubation time of yeast at which the maximal yield of ATP reached remain unchanged. The highest concentration of ATP accumulated in the reaction system was 12mM (8mM in general) and the control was 4mM after 5-6 hours incubation.