

棕色固氮菌钼铁蛋白结晶 及一些物理化学性质*

中国科学院水生生物研究所第五室生化、遗传组**

提 要

获得了棕色固氮菌固氮酶钼铁蛋白的针状结晶，大小为 $2-2.5 \times 25-65$ 微米，成晶所要求的条件不是很严格的。

SDS 电泳和氨基酸分析结果表明，钼铁蛋白分子量为 250,000。只观察到一种类型亚单位。其中酸性氨基酸占优势。

分子氧使针状晶体演变为发状晶丝，晶丝又密集成束。晶束可保存较长时间。氧使钼铁蛋白在电泳时形成高聚合态。

固氮酶是生物固氮过程中将分子氮还原为氨的酶系统，它由二个蛋白即钼铁蛋白和铁蛋白组成，二个组分对于酶的活力都是必需的。进化程度不同的固氮生物，其固氮酶的作用原理基本上是相同的，它们的二个组分之间有的可以交叉互补形成有功能的固氮酶，有的彼此不能互补。我们的研究结果表明，柱孢鱼腥藻固氮酶的钼铁蛋白可以与棕色固氮菌固氮酶的铁蛋白互补^[1]，看来棕色固氮菌和蓝藻固氮酶的钼铁蛋白可能有较大程度的类似性，但有关钼铁蛋白的物理化学性质仍存在一定的差异，特别是棕色固氮菌钼铁蛋白的物理化学性质，文献报道的结果往往出入较大。已报道的分子量有 216,000^[8]，270,000^[4,14] 和 245,000^[15]，至于亚单位类型，有人认为是一种类型^[4,14]，有的作者坚持是二种类型^[6,15]，最近 Kennedy 等^[7]证明不同来源的钼铁蛋白的亚单位类型数目与电泳时使用的 SDS 有关，钼铁蛋白是多聚体蛋白，可能会依条件的不同呈现不同的解离 \rightleftharpoons 聚合状态^[5,10]。分子氧使固氮酶失活。这种失活作用是否与酶蛋白的聚合状态也有关。显然，钼铁蛋白物理化学性质的确定，对于阐明固氮酶的结构和功能以及固氮所包含的基因数目和性质都是必要的。为准确测定这些物理化学性质，就需要用高纯度的钼铁蛋白进行试验。本文报道了棕色固氮菌固氮酶钼铁蛋白结晶及它的一些物理化学性质。

材 料 和 方 法

棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii* NO 230) 菌糊由中国科学院原子能利用研究所

* 本工作的初步结果曾于 1975 年在化学模拟生物固氮学术讨论会上报告。

** 参加工作人员有：王业勤、戴玲芬、何家莞、杜代贤、林惠民、何振荣、李辛夫、谭渝云、黎尚豪；显微摄影承何楚华同志协助，特此致谢。

惠供, -20°C 保存。

(1) 钴铁蛋白的分离提纯和结晶, 参照 Shah 等^[12]和林土所固氮组^[13]方法, 用超声击碎器击破细胞, 55°C 热处理 8—10 分钟, 离心 30,000 × g/分, 20 分钟, 得棕色上清液, 通过二次 DEAE-11 纤维素柱层析分离纯化, 除无细胞提取液外, 分离过程均在厌氧条件下进行。

将经过二次柱分离的钴铁蛋白组分用自制的超滤装置通过醋酸纤维素膜超滤浓缩, 使蛋白浓度达到 10—50 毫克/毫升, 超滤时一次或分几次加入缓冲液, 使 NaCl 浓度降至 0.06—0.08M, 将生成的结晶液离心, 洗涤晶体二次, 晶体溶于 0.25M NaCl-tris 缓冲液中, 离心弃去不溶物, 将溶液厌氧保存备用, 或进行重结晶。

(2) 固氮酶活力用乙炔还原法测定。

(3) 蛋白浓度的测定采用 Folin 试剂。

(4) 聚丙烯酰胺凝胶分析电泳按 Davis 方法, 采用 pH8.9 的甘氨酸-tris 系统。

(5) 非血红铁蛋白的染色检测方法按 Brill 等^[14]的方法进行, 用 0.7% α , α -联吡啶和 8% 疏基乙酸染色。

(6) 钴铁蛋白亚单位分子量按 Weber 方法, 采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定。

(7) 抗钴铁蛋白血清的制备, 参照 Shah 等^[11]方法, 家兔用钴铁蛋白加福氏佐剂进行二次皮下注射作基础免疫, 一星期后单用钴铁蛋白进行静脉注射作为加强免疫, 两天一次共七次, 最后一次加强免疫后十天, 从颈动脉采血制备抗血清, 其效价用稀释法测定为 1,250。

(8) 免疫交叉反应用微量多槽免疫电泳和对流免疫电泳法进行, 1% 琼脂凝胶, 电泳液为 pH8.6 $\mu = 0.05$ 的硼酸缓冲液, 对流电泳时板两端的电压 50 伏, 电泳 15—30 分钟。免疫扩散电泳时, 先将抗原电泳 45 分钟, 取出在槽中加抗血清扩散。

(9) 结晶钴铁蛋白氨基酸组成的分析方法是将重结晶钴铁蛋白用重蒸三次 5.7N 盐酸在 110°C 水解 24, 48, 72 小时, 再用 AA-500 型氨基酸自动分析仪分析, 每组重复三次取平均值, 半胱氨酸和甲硫氨酸用过甲酸氧化成半胱氨酸和甲硫氨酸后测定。

结 果

(一) 钴铁蛋白结晶的条件

根据近二十次钴铁蛋白结晶试验的结果表明, 用超滤浓缩法是易于获得钴铁蛋白晶体的。成晶所要求的条件并不是很严格的。一般来说, 通过超滤浓缩使总蛋白浓度达到 10—50 毫克/毫升, 这时钴铁蛋白处于过饱和状态, 在超滤过程中就有大量晶体形成, 但有时蛋白浓度在 10 毫克/毫升以下时也能成晶, 这取决于蛋白的纯度, 结晶时盐浓度要降低至 0.08N 以下。但有时在室温较高时, 盐浓度降至 0.12N 时也有沉淀产生出来。蛋白纯度高, 逐渐降低盐浓度有利于获得均一整齐的晶体。结晶时的 pH 范围在 6.7—7.4 之间, 说明钴铁蛋白形成针状晶体所要求的 pH 范围不是很窄的。同时它对温度的变动也很敏感, 在 4°C 静置以及在 30°C 左右超滤时都能生成晶体。然而, 如果菌糊存放过久或分离过程中微生物污染严重时, 均难于获得结晶。

(二) 分子氧对钼铁蛋白晶体的影响

钼铁蛋白晶体在相差显微镜下呈现均一的淡棕色针状结晶, 其大小一般为 $2-2.5 \times 25-65$ 微米, 个别的可达 100 微米左右。晶体溶解后与铁蛋白重组时显示明显的乙炔还原活力, 证明它是固氮酶钼铁蛋白所形成的晶体。在氩气氛围中加液体石蜡的厌氧条件下保存了三个星期, 晶体仍可保持针状。图版 I 是钼铁蛋白晶体的大小形状及遇氧后不同时间的变化过程。曝氧(指在盖玻片下)一个半小时后, 原来均匀自由排列的晶体开始随机定向, 许多个晶体相互聚集排列成串, 同时逐渐溶解成为外观上互相连接的一条长晶体, 看来这个过程的速度与氧的损伤程度有关, 也与晶体所处的微环境有关。在结晶试验中曾出现密集的稍为弯曲的发状长晶丝, 而发状晶丝又彼此聚集成片带状。然而这些发状晶丝之间尚保存有少量针状晶体, 显然发状晶体是在结晶过程中及其以后, 局部受氧的损伤所引起(图版 II:1)。

氧使针状晶体聚集并融为发状, 而发状晶丝又进一步密并成束, 演变为高度聚合状态, 这种高度聚合的钼铁蛋白晶体形态似乎更不容易被氧进一步损伤(图版 II:2-6), 晶体在玻片上, 用液体石蜡涂封盖玻片四周, 简单地隔绝空气, 在这样的条件下, 发状晶丝竟然保存了一个月, 这是文献中未见报道的现象。由此看来, 发状晶丝是钼铁蛋白结晶的另一种演变形态, 它是耐氧的, 在一定条件下可保存较长的时间。

(三) 钼铁蛋白亚单位的分子量

重结晶钼铁蛋白和已知分子量的几种标准蛋白, 用 1% SDS 加 1% 疏基乙醇在室温下处理过夜, 然后进行 SDS 电泳。求出相对迁移率(R_f 值), 以 R_f 值为横轴对纵轴 \log 分子量作图, 求出钼铁蛋白亚单位的分子量。

重结晶钼铁蛋白经 SDS 处理后, 在我们的实验条件下仅有一条蛋白带, 也就是仅有的一种类型的亚单位, 其相对迁移率比牛血清白蛋白稍快。重复试验未观察到二种类型的亚单位, 根据相对迁移率与分子量的关系曲线(图 1), 钼铁蛋白亚单位的分子量为 67,000 左右。

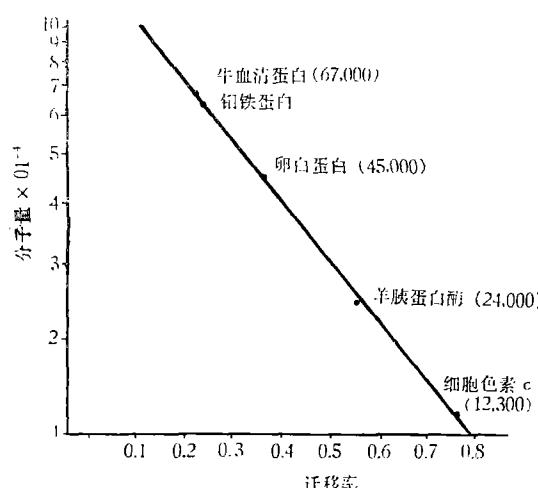


图 1 钼铁蛋白亚单位的分子量

(四) 钴铁蛋白的氨基酸成分

钼铁蛋白氨基酸组分的分析结果见表 1。丝氨酸和苏氨酸最佳值按其回收值外推到零计算, 赖氨酸和异亮氨酸取 48 小时和 72 小时的平均值, 甲硫氨酸亚砜和半胱氨酸仅分析了水解 24 小时的产物, 其他氨基酸以全部水解时间的平均值计算。从表 1 可看到, 钴铁蛋白的酸性氨基酸占优势, 门冬氨酸和谷氨酸含量占全部氨基酸(不包括色氨酸)的 20%, 赖氨酸和精氨酸占 11.1%, 类似于其他固氮生物的相应蛋白的。最佳比和分子量按 Thoruber 法^[16]计算, 钴铁蛋白分子量是 248,000(已加上 50 个色氨酸残基数), 与 SDS 电泳分析测得的数值相近。看来, 棕色固氮菌钼铁蛋白的分子量应为 250,000 左右。

表 1 棕色固氮菌钼铁蛋白氨基酸组分(微克分子)

氨基酸	水解时间			最佳值	最佳比	最相近整数
	24	48	72			
赖氨酸	0.538	0.568	0.509	0.539	135.8	136
组氨酸		0.185	0.180	0.183	46.1	46
氨	0.564	0.542	0.438			
精氨酸	0.393	0.400	0.431	0.408	102.8	103
门冬氨酸	0.831		0.787	0.809	203.5	204
苏氨酸	0.451	0.422		0.485	122.2	122
丝氨酸	0.475	0.408	0.354	0.550	138.5	139
谷氨酸	0.939	0.881		0.910	229.2	229
脯氨酸	0.383	0.386		0.385	97.0	97
甘氨酸	0.786	0.772		0.779	196.2	196
丙氨酸	0.514	0.555		0.535	134.8	135
半胱氨酸*	0.130				32.7	33
缬氨酸	0.678	0.587	0.685	0.639	161.0	161
甲硫氨酸*	0.304				76.6	77
异亮氨酸	0.459	0.459	0.473	0.466	117.4	117
亮氨酸	0.695	0.727	0.719	0.714	179.8	180
酪氨酸	0.278		0.294	0.286	72.1	72
苯丙氨酸	0.472	0.441	0.461	0.438	110.3	110
总 量						2160

* 用过甲酸氧化成半胱氨酸和甲硫氨酸测定

(五) 钴铁蛋白在电泳时的不同聚合状态

一次结晶的钼铁蛋白用聚丙烯酰胺厌氧分析电泳检查呈现均一的蛋白染色带, 但加样量多时, 在很浓的主带上面和下面都能隐约地看到一条很淡的染色带, 而有时仅有主带和上面的一条很淡的染色带, 这可能是厌氧不严格所引起(图 2A)。因为重结晶钼铁蛋白厌氧电泳只有一条染色带, 而不厌氧电泳时出现二条带, 新增加的一条带在原厌氧电泳带的上面, 这二条带用 α , α -联吡啶染色时均可染成粉红色(图 2C), 表明它们是钼铁蛋白的不同聚合体。这二条带当分别切出再进行 SDS 电泳时仅出现一条与牛血清白蛋白一起迁移的蛋白带。以上结果表明在主带上面出现的第二条带仍是有氧时钼铁蛋白的高聚合体。看来氧使钼铁蛋白的亚单位聚集。

(六) 结晶钼铁蛋白的免疫交叉反应

兔子用钼铁蛋白免疫后产生高效价免疫血清，将这样的抗血清与二次柱分离的钼铁蛋白组分及无细胞粗提取液(CE)进行微量多槽免疫电泳时，只有一种移向阳极的抗原成分与抗血清复合产生一条正常的沉淀弧，没有交叉弧或平行弧。从图3可看到，二次柱分离的钼铁蛋白组分与抗血清产生的沉淀弧同CE与抗血清交叉所产生的沉淀弧其形状和位置是一致的，说明在二者之中的抗原成分相同。

把重结晶的钼铁蛋白作为抗原与抗血清进行免疫对流电泳时，也仅形成一条沉淀带，表明在抗血清中存在的是与钼铁蛋白产生交叉反应的特异抗体。为了证明重结晶钼铁蛋白在不厌氧电泳时形成的二条都能被 α, α -联吡啶染色的蛋白带的抗原性是否相同，是不是钼铁蛋白的不同聚合体，为此将二条电泳带分别切出，洗出其中的蛋白，再与抗血清进行对流免疫电泳。结果表明上带和下带都能与抗血清交叉产生一条特异沉淀带，它们彼此相连，形状位置相似，它们的抗原性是相同的(图4)。应指出钼铁蛋白经过pH2的盐酸酸解后仍保留其专一的抗原特性。这样， α, α -联吡啶染色和免疫交叉反应证明重结晶钼铁蛋白在不厌氧电泳时出现的第二条带是氧引起的钼铁蛋白的高聚合态。

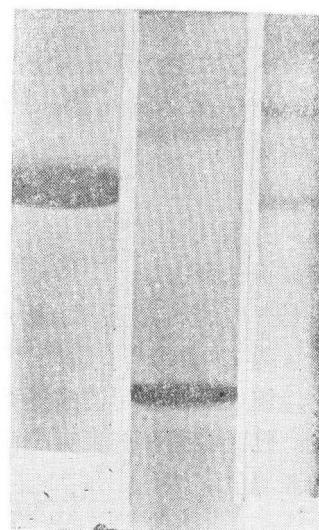


图2 钼铁蛋白和铁蛋白的凝胶电泳
1.结晶钼铁蛋白； 2.铁蛋白；
3.重结晶钼铁蛋白。

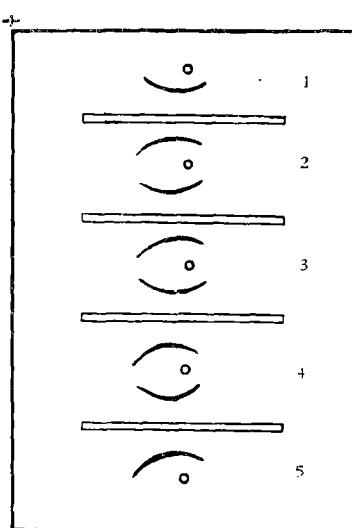


图3 钼铁蛋白微量多槽免疫电泳

1, 2 小孔加钼铁蛋白；
3, 4, 5 小孔加粗提物；
电泳45分钟后在粗槽中加抗血清

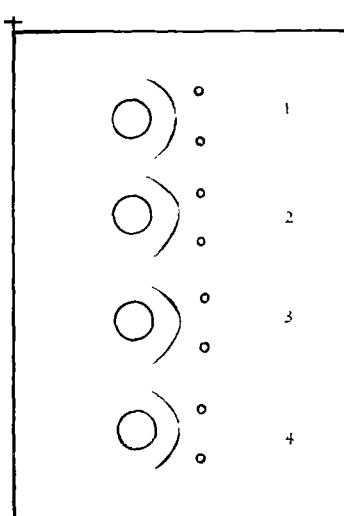


图4 结晶钼铁蛋白的对流电泳

1号小孔加重结晶的钼铁蛋白；
2号小孔加钼铁蛋白经凝胶电泳后的上带蛋白；
3号小孔加钼铁蛋白经凝胶电泳后的下带蛋白；
4号的上小孔加上带蛋白，下小孔加下带蛋白

讨 论

棕色固氮菌固氮酶钼铁蛋白的分子量, Burns 等人和 Stasny 等人测定的结果是 270,000, 而 Kleiner 和 Chen 用凝胶过滤法测定的分子量是 216,000, Swicher 等用沉降平衡法测定结晶钼铁蛋白的分子量是 245,000。我们用 SDS 电泳测定结果是 256,000, 而根据氨基酸分析结果计算分子量为 248,000, 两种方法测定结果接近。因此, 估计棕色固氮菌钼铁蛋白四聚体分子量应为 250,000 左右。在这之后, Shah 等^[13]报道棕色固氮菌结晶钼铁蛋白的分子量也是 250,000。这样, Swicher、Shah 和我们用不同方法测得的结果是一致的。最近还有报道指出, 固氮蓝藻 (*Anabaena cylindrica*) 固氮酶钼铁蛋白的分子量为 250,000^[17]。看来这两种固氮生物固氮酶的钼铁蛋白的分子量是颇接近的。

钼铁蛋白亚单位的类型, 究竟是一种类型还是二种类型, 至今尚未获得断定性的结论。巴氏梭菌和肺炎克氏杆菌的钼铁蛋白有二种不同的亚单位, 根瘤菌的只有一种类型的亚单位。棕色固氮菌钼铁蛋白有人分析是一种类型, 另有人分析是二种类型, 甚至同一个样品得出不同的结果^[6,14], 最近, Lundell 和 Howard 报道了新的研究结果^[9], 棕色固氮菌钼铁蛋白用 pH5.4 的 7M 尿素解离后分为二种不同的亚单位, 它们的氨基酸成分是类似的, 但 N-端顺序完全不同, 用羧肽酶分析时, C-端也是不同的。而 Tsai 和 Mortenson 最近也指出, 柱孢鱼腥藻固氮酶钼铁蛋白有二种类型的亚单位, 其一分子量为 67,000, 另一分子量为 59,000^[17]。看来, 钼铁蛋白具有二种亚单位的证据日趋增多。而棕色固氮菌和柱孢鱼腥藻的钼铁蛋白是可以互换的, 如果它们含有不一致的亚单位就难于解释它们之间的交叉互补。在我们的实验中只观察到一种类型的亚单位, 这可能是因为实验条件不同的关系。Kennedy 等人指出过, 钼铁蛋白在进行 SDS 电泳时, SDS 的来源不同影响到蛋白带的数目, 导致同一样品产生不同的结果。可见仅仅用 SDS 电泳还不易断定多聚体钼铁蛋白的亚单位类型。

钼铁蛋白是多聚体蛋白, 由于条件的不同可能呈现不同的聚合状态。我们的电泳结果暗示, 钼铁蛋白被氧损伤时出现高聚态, 这个现象与 Eady 等人^[3]报道的结果是一致的。氧损伤的钼铁蛋白保留抗原特性。分子氧使固氮酶失活, 而这种失活作用可能也包含着天然酶蛋白构型向高聚态方向转变的因素。因为除了有氧时钼铁蛋白的电泳行为不同之外, 我们也观察到钼铁蛋白晶体形状在遇氧时出现聚集和融并。强烈氧损伤时融并和晶体的溶解是同时进行的。而氧损伤程度较轻时, 晶体密集融并为发状晶丝, 而晶丝又进一步密并成束, 且没有明显的溶解。在简单厌氧条件下这种形态的晶体保存了一个月。可以认为发状晶丝是针状晶体遇氧后演变形成的, 但它们对氧的敏感程度比针状晶体要低一些。根据上述结果, 我们推测高聚合态的钼铁蛋白不是它的正常功能状态。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院水生生物研究所第五室生化、遗传组, 1979。固氮蓝藻与棕色固氮菌固氮酶组分的交叉互补功能。本刊本期: 61 页。
- [2] 沈阳林业土壤研究所微生物室生物固氮组, 1974。棕色固氮菌固氮酶组分的提纯和结晶。应用微生物, 第一期。

- [3] Brill, W. J. et al., 1974. Detection of nitrogenase components and other nonheme iron proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochem.*, **60**: 237—241.
- [4] Burns, R. C. and R. W. Hardy, 1972. Purification of nitrogenase and crystallization of its Mo-Fe protein. *Methods in Enzymol.*, **24B**: 480—496.
- [5] Eady, R. R. et al., 1972. Purification and properties of components protein of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase. *Biochem. J.*, **128**: 655—675.
- [6] Fleming, H. and R. Haselkorn, 1973. Differentiation in *Nostoc muscorum*: Nitrogenase is synthesized in heterocysts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**: 2,727—2,731.
- [7] Kennedy, C. et al., 1976. The molybdenum-iron protein of *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase: Evidence for non-identical subunits from peptide mapping. *Biochem. J.*, **155**: 383—389.
- [8] Kleiner, D. and C. H. Chen, 1974. Physical and chemical properties of the nitrogenase proteins from *Azotobacter vinelandii*. *Arch. Microbiol.*, **98**: 93—100.
- [9] Lundell, D. J. and J. B. Howard, 1978. Isolation and partial characterization of two different subunits from the Mo-Fe protein of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *J. Biol. Chem.*, **253**(10): 3,422—3,426.
- [10] Nicholas, D. J. D. and J. V. Deering, 1976. Repression, derepression and activation of nitrogenase. *Aust. J. Biol. Sci.*, **29**: 147—161.
- [11] Shah, V. K. et al., 1973. Nitrogenase III: Nitrogenaseless mutants of *Azotobacter vinelandii*: activities, cross-reaction and EPR spectra. *Biochem. Biophys. Acta*, **292**: 246—254.
- [12] Shah, V. K. and W. J. Brill, 1973. Nitrogenase IV: Simple method of purification to homogeneity of nitrogenase components from *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. Biophys. Acta*, **305**: 445—454.
- [13] Shah, V. K. and W. J. Brill, 1977. Isolation of iron-Mo cofactor from nitrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**: 3249—3253.
- [14] Stasny, J. T. et al., 1974. Electron microscopy of the Mo-Fe protein from *Azotobacter nitrogenase*. *J. Cell Biol.*, **60**: 311—316.
- [15] Swisher, R. H. et al., 1977. The molecular weight of and evidence for two types of subunits in the Mo-Fe protein of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. *Biochem. J.*, **163**: 427—432.
- [16] Thornber, J. P. and J. M. Olson, 1968. The chemical composition of a crystalline bacteriochlorophyll protein complex isolated from the green bacterium, *Chloropseudomonas ethylidicum*. *Biochemistry*, **7**(6): 2242—2249.
- [17] Tsai, L. B. and L. E. Mortenson, 1977. *Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, p. 206 (cited from *Ann. Rev. Plant Physiol.*, Vol. 29 p. 331).

CRYSTALLIZATION AND SOME PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF MO-FE PROTEIN OF *AZOTOBACTER VINELANDII* NITROGENASE

Biochemical and Genetic Section, Laboratory of Phycology,
Institute of Hydrobiology, Academia Sinica

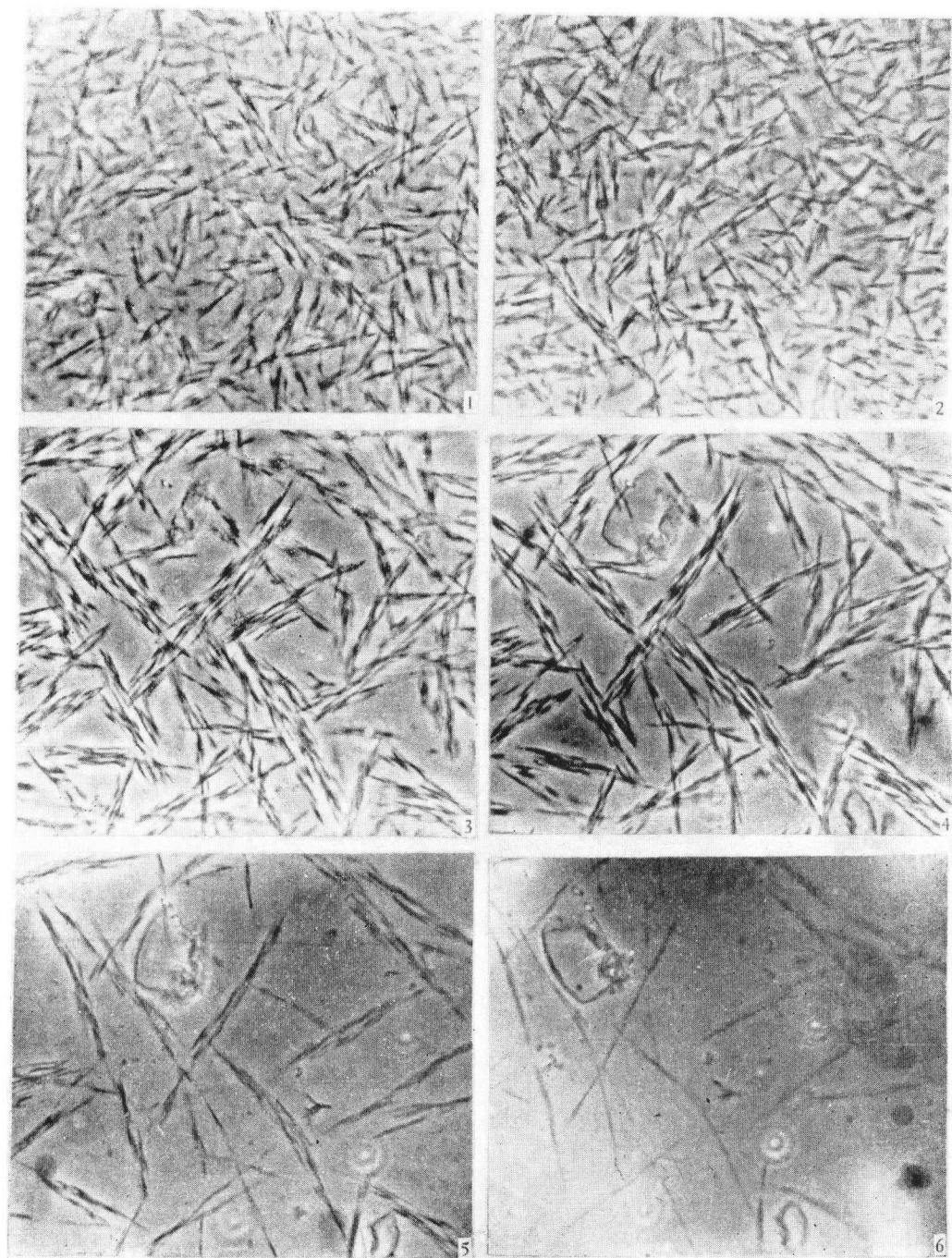
Abstract

A series of experiments were carried out to study the crystallizing conditions of Mo-Fe protein of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase.

Needle-like crystals of Mo-Fe protein were obtained, with crystal size fluctuated in the range of $2-2.5 \times 25-65 \mu$. The conditions required for crystallization were not very strict.

The molecular weight of Mo-Fe protein was estimated by SDS gel electrophoresis and by amino acid analysis to be approximately 250000. Only one type of subunit was observed; in the Mo-Fe protein acidic amino acid was predominant.

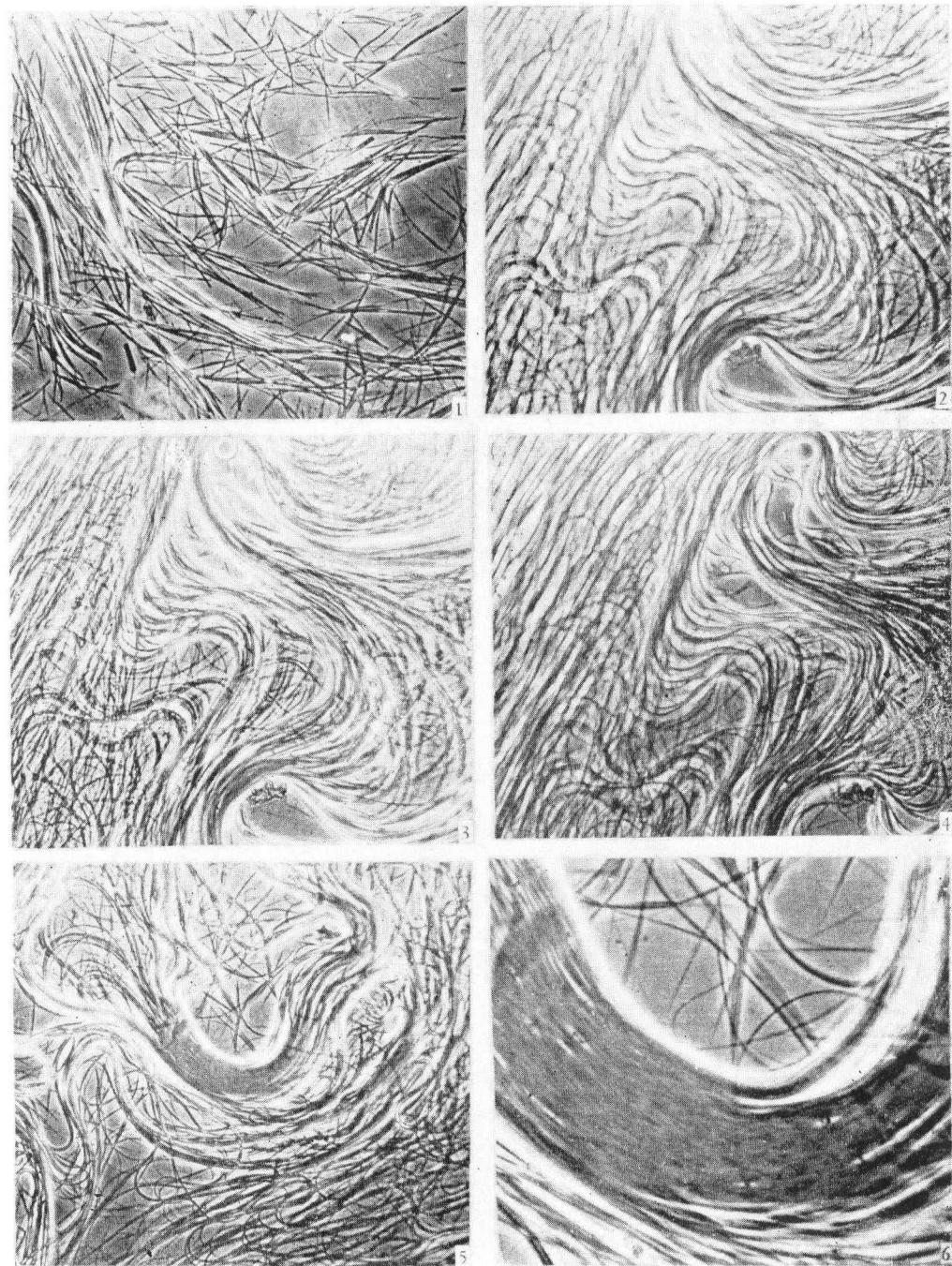
It was found that oxygen caused the needle-like crystals to transform into hair-like crystals which may aggregate somewhere further into bundles. The latter under anaerobic condition could last for longer time. It was also demonstrated that during the gel electrophoresis the formation of a higher molecular weight polymer was dependent on the presence of oxygen.



棕色固氮菌固氮酶钼铁蛋白针状晶体及遇氧后的变化

1. 2月6日14时30分摄； 2. 2月6日16时摄； 3. 2月6日21时摄；
4. 2月7日17时摄； 5. 2月8日15时30分摄； 6. 2月8日19时30分摄。

注：1975年2月6日结晶，制片，盖玻片四周用液体石蜡涂封，在相差显微镜下定位连续观察。上面图片为同一视野定位连续观察的图片



棕色固氮菌固氮酶钼铁蛋白发状晶丝及其变化

1. 2月27日撮； 2. 2月24日撮； 3. 2月25日撮；
4. 2月28日撮； 5. 3月5日撮； 6. 同5, 局部放大。

注：1975年2月20日结晶未成晶，2月21日再浓缩生成晶体在氩气氛中保存，2月24日制片，盖玻片四周用液体石蜡涂封，晶体保存至3月20日始消失。本图片系摄自同一玻片。

上图1表示制片后三天，除有发状晶丝外，局部尚有针状晶体