

柱孢鱼腥藻的铁蛋白与棕色固氮菌的 钼铁蛋白的交叉互补作用*

何振荣 林惠民 杜代贤 戴玲芬 辛武生 黎尚豪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

纯化的柱孢鱼腥藻铁蛋白能够与棕色固氮菌的钼铁蛋白有效地交叉反应, 展现较高的活性。此异源交叉反应的乙炔还原比活及放氢比活, 分别是蓝藻同源互补比活的 83.8 及 66.7%。比较藻铁蛋白与菌钼铁蛋白异源交叉反应及藻固氮酶组分之间的同源反应的动力学特点时发现, 铁蛋白对钼铁蛋白的最佳克分子比数前者(异源交叉反应)较后者(藻同源反应)为高, 前者为 5, 后者为 1; 但反应的时间进程两者差别不大。

研究各种不同类型固氮生物的固氮酶两个组分之间的交叉互补反应, 有助于对固氮酶的结构与功能, 以及固氮生物之间在系统发育上的关系等问题的阐明。分类地位相对较高的蓝藻与其他固氮生物的固氮酶两个组分的交叉互补反应, 曾引起一些学者的兴趣。Simth 等 (1971)^[12] Tsai 和 Mortenson (1978)^[13] 以及 Hallenbeck 等 (1979)^[8] 都分别用绿假单孢杆菌 (*Chloropseudomonas ethylicum*) 巴氏梭菌 (*Clostridium pasteurianum*) 和棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 的固氮酶作为材料, 研究它们与柱孢鱼腥藻 (*Anabaena cylindrica*) 的铁蛋白与钼铁蛋白之间的交叉互补功能。其结论是: 以绿假单孢杆菌、巴氏梭菌及棕色固氮菌的铁蛋白与柱孢鱼腥藻的钼铁蛋白交叉反应, 均有较高比活; 但反过来, 以它们的钼铁蛋白与藻铁蛋白交叉反应, 其比活分别是同源重组活性的 0、1.5 和 7%。因此, 目前一般人认为, 蓝藻的铁蛋白是比较特殊的, 它在交叉互补中没有或只有极低的交换度。

作者曾经研究过几种固氮蓝藻的固氮特性, 并证明, 棕色固氮菌的铁蛋白, 可以补活不呈活性的固氮鱼腥藻 (*Anabaena azotica* 水生 686) 的无细胞抽提液 (CE), 部分提纯的藻钼铁蛋白与菌铁蛋白交叉互补有活性^[1,2]。本试验系用纯化的柱孢鱼腥藻铁蛋白与棕色固氮菌的钼铁蛋白为材料, 进一步研究它们之间的交叉互补作用和反应特点。其结果表明: 无论用乙炔还原法还是用测放氢法, 都可以测到较高的交叉互补反应比活; 在此反应中, 除了藻铁蛋白对菌钼铁蛋白的克分子比数有较高的要求外, 其反应的时间进程与藻固氮酶同源互补反应实质上是一样的。据此, 我们认为柱孢鱼腥藻的铁蛋白也与别的固氮生物的铁蛋白一样, 是能够有效地进行异源交叉反应的。

* 本文缩略词: AcCE, AcI 和 AcII 分别为柱孢鱼腥藻的无细胞抽提液, 钼铁蛋白和铁蛋白; AvI 和 AvII 为棕色固氮菌的钼铁蛋白和铁蛋白; 固氮酶比活单位: 1 单位 = 1 n mole C₂H₄/min./mg. protein.

1984 年 10 月 24 日收到。

材料与方法

(一) 蓝藻的培养及棕色固氮菌来源

柱孢鱼腥藻来自水生所藻种组。藻细胞自琼脂斜面接至三角瓶并转移 1—2 次, 进行静置液体培养, 作为种源。然后进行前期培养(用 10 升血清瓶, 加电磁搅拌, 通入含 2.5% CO_2 的 N_2 , 光照度 3,000—5,000 lx, 30°C) 和强化培养(用 5 升试剂瓶, 电磁搅拌, 通入含 0.5% CO_2 的 Ar , 光照度 10,000 lx, 30°C)。柱孢鱼腥藻固氮酶活力的大小, 与培养条件有很大关系。只有进行强化培养(提高光强、厌氧、缺氮), 才有希望得到高活力的酶制剂。

棕色固氮菌是中国农业科学院原子能应用研究所惠赠。

藻浆及菌浆使用前保存在 -25°C 或液氮中。

(二) 固氮酶两个组分的分离和纯化

棕色固氮菌的钼铁蛋白与铁蛋白的分离纯化, 主要按层析法制备^[3]。

蓝藻固氮酶两个组分的分离纯化按下述方法进行:

取深冷保存的藻浆 120—150 克, 注入除氧的 tris-HCl 缓冲液 (pH7.4, 含 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.5mg/ml) 120—150 ml, 解冻后, 加入 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase, 转移到自制的厌氧超声破碎器上, 超声破碎。声裂物厌氧离心, 得无细胞抽提液 (CE), 比活为 6.9 单位(据测定用此法得到的 CE, 酶活损失不大 tris-HCl 缓冲液与 HEPS 缓冲液也没有多大区别)。

CE 进行酶组分分离前, 必须适当浓缩并除去部分杂蛋白(主要是藻蓝素)。将 CE 通过第一个 DEAE-纤维素 (DE52) 柱, 将固氮酶一次洗脱, 可得全酶液 50 ml, 使酶液浓缩 4—5 倍, 比活达 70 单位左右。全酶液经第二个 DEAE-纤维素柱, 进行分离。用 0.1, 0.25 及 0.6M NaCl 的 tris-HCl 缓冲液(含 0.3 mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, pH 7.4) 分部洗脱, 先后可得到藻蓝素、钼铁蛋白和铁蛋白。后二者再分别用一个小 DEAE-纤维素柱浓缩并纯化, 最后可得铁蛋白约 6 ml, (1.5 mg/ml) 钼铁蛋白 9ml (10mg/ml) 重组比活为 142 单位, 钼铁蛋白及铁蛋白单独活性很低(不超过 1%) 或无活性。如果做交叉反应, 就用这种材料, 如果作理化分析测定, 则需再用一个小型制备凝胶电泳柱进行电泳纯化^[4]。

以上全部过程, 均在氩气氛的厌氧环境, 于 13—17°C 条件下进行, 两天内完成。

(三) 固氮酶活性的测定

在 6.3 ml 的可的松瓶子里, 加入 100 μmoles HEPS 0.3ml, 5 μmoles $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 ml, 5 μmoles ATP 0.1ml, 20 μmoles 磷酸肌酸 0.2 ml, 100 μmoles 肌激酶 0.2 ml, 抽气充氩 4—5 次后, 再充氩, 放平压, 加入 0.7 ml C_2H_2 , 随后加入 0.1 ml 2.5 μmoles 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 酶液按试验需要的用量最后加入, 放在互勃氏呼吸仪上摇荡 30 分钟 (80—100 次/分, 30°C), 注射 20% 三氯醋酸终止反应。生成的乙稀用“上分”100 型气相色谱仪检测, 使用氢焰离子化鉴定器, GDX-502 固定相的填充柱 ($\phi 4 \times 2000\text{mm}$)。乙稀标准气为上海高砾化工厂产品。

如果做酶反应的时间进程,则在同一反应瓶中依不同时间抽样测定。

(四) 蛋白质测定

蛋白质测定用改进的考马氏亮蓝染色法^[5],以13% (W/V)的磷酸用量代替原试剂的8.5% (W/V)用量。其结果用Folin-Phenol法修正。

(五) 放氢活性测定

在测定固氮活性的同一反应瓶中同时抽取气样100 μl,在“上分”103型气相色谱仪上测定。用热导池鉴定器,5A分子筛分离柱。

结 果

(一) 柱孢鱼腥藻与棕色固氮菌固氮酶两个组分的交叉互补反应

表1中试验I是在保证有足够的AcI的实验条件下,以互补反应中铁蛋白所能获得的最高比活加以比较;试验II则使酶蛋白尽可能一致,即在参加反应的酶组分比一致的基础上进行比较。这两种情况,都可以说明,蓝藻的铁蛋白皆能与棕色固氮菌的钼铁蛋白形成有活性的酶复合物,它产生的乙炔还原比活(119.42单位)可以达到蓝藻同源重组比活

表1 柱孢鱼腥藻与棕色固氮菌固氮酶两个组分的交叉反应*

Tab. 1 Cross-reactivity of two components of nitrogenase from *A. cylindrica* and *A. vinelandii*

试验 Tests	固氮酶系统 Nitrogenase systems		乙炔还原比活 Specific activity of C ₂ H ₂ reduction (n moles C ₂ H ₂ /min./mg. protein)		放氢比活 Specific activity of H ₂ -evolution (n moles H ₂ /min. /mg. Fe-protein)
	钼铁蛋白 MoFe-protein (mg)	铁蛋白 Fe-protein (mg)	基于铁蛋白 Based on Fe-protein	基于钼铁蛋白 Based on MoFe-protein	
I	AcI (1.30)	0	/	1.35	not detered
	0	AcII (0.18)	0	/	not detered
	AvI (3.66)	0	/	0.03	not detered
	0	AvII (0.22)	0.30	/	not detered
	AcI (2.60)	AcII (0.37)	142.46	20.27	not detered
	AvI (3.66)	AcII (1.12)	119.42	36.54	not detered
II	AcI (2.54)	0	/	0	0
	0	AcII (0.68)	0	/	0
	AvI (3.92)	0	/	0.02	0
	0	AvII (1.00)	0.15	/	0.16
	AcI (1.27)	AcII (0.34)	1.78	3.02	12.03
	AvI (1.18)	AcII (0.34)	4.07	1.17	8.02
	AcI (1.27)	AvII (1.01)	6.29	5.00	1.56
	AvI (3.92)	AvII (1.00)	22.36	8.67	33.52

* 表中交叉反应的比活性已减除单独铁蛋白或钼铁蛋白的本底活性。

The specific activity of each cross-reactivity shown in the Table has been subtracted by back-ground value of Fe-protein or MoFe-protein.

(142.46 单位)的 83.8%，放氢比活也可达 66.7%。

表 1 中试验 II 的藻固氮酶比活较低, 可能由于铁蛋白存于液氮中再取出解冻时有部分“冷失活”。这并不影响其同源重组与异源互补活性的比例关系。

(二) 蓝藻铁蛋白与棕色固氮菌钼铁蛋白交叉反应的时间进程

在一定的条件下(其最佳反应条件未经选择), 20 分钟内, 它的比活与时间呈线性关系; 以后, 其比活逐渐降低。这与蓝藻的无细胞抽提液以及细菌的铁蛋白和藻钼铁蛋白交叉互补的情况相似。两种材料的固氮酶组分在异源互补反应中, 它们的动力学特征, 与同源互补反应没有显著差异(图 1)。

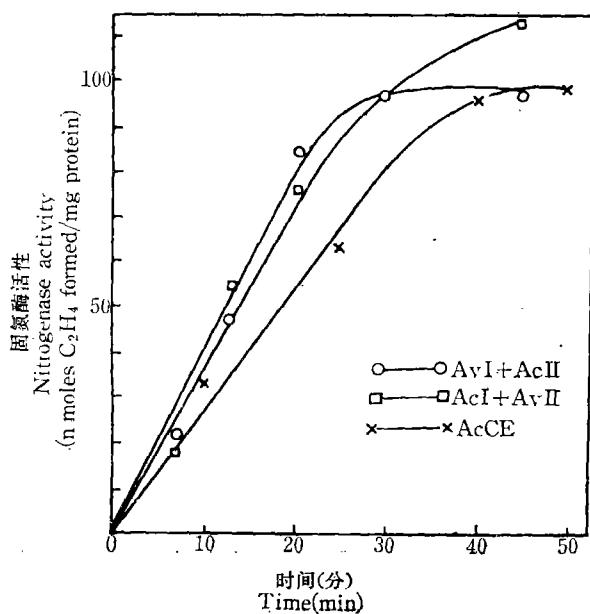


图 1 柱孢鱼腥藻铁蛋白与棕色固氮菌钼铁蛋白交叉反应的时间进程

Fig. 1 Time course of the cross-reactivity of Fe-protein from *A. cylindrica* and MoFe-protein from *A. vinelandii*

到最高比活; 但是藻铁蛋白与菌钼铁蛋白的异源互补, 在这两种蛋白的克分子比数为 1 时, 比活很低, 至铁蛋白与钼铁蛋白之比约为 5:1 时, 才得到它的最高比活(图 2)。这与其放氢比活的最佳克分子比值的要求大致相同(图 3)。放氢比活在铁蛋白与钼铁蛋白之比约为 3:1 时达最大值。增加克分子比值(即增加铁蛋白量), 比活降低。此与 Tsai 和 Mortenson^[13] 在用巴氏梭菌铁蛋白和柱孢鱼腥藻钼铁蛋白进行异源互补试验看到的情况不同, 他们将巴氏梭菌铁蛋白对藻钼铁蛋白的克分子比率增至 30:1, 亦未见到铁蛋白的抑制作用。本试验中存在的这种过多的藻铁蛋白的抑制现象, 可能与酶液中残存盐的抑制作用有关。

讨 论

蓝藻固氮酶的分离与纯化, 目前还没有一个满意的方法, 这主要是由于它对氧特别敏感, 以及它在藻细胞中的含量低的缘故。Tsai 和 Mortenson^[13] 曾试用离子交换层析, 聚聚

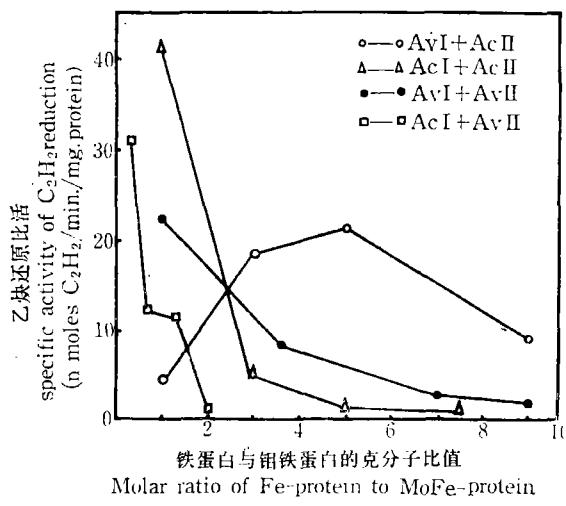


图2 在柱孢鱼腥藻和棕色固氮菌固氮酶两个组分的交叉反应中,乙炔还原活性与铁蛋白对钼铁蛋白克分子比值的关系

Fig. 2 The relationship between acetylene reduction activity and molar ratio of Fe-protein to MoFe-protein in the cross-reaction of two components of nitrogenase from *A. cylindrica* and *Azotobacter*

分子量按:

Molecular weights based on: 230,000 AcI; 64,000 AcII; 220,000 AvI; 62,000 AvII.

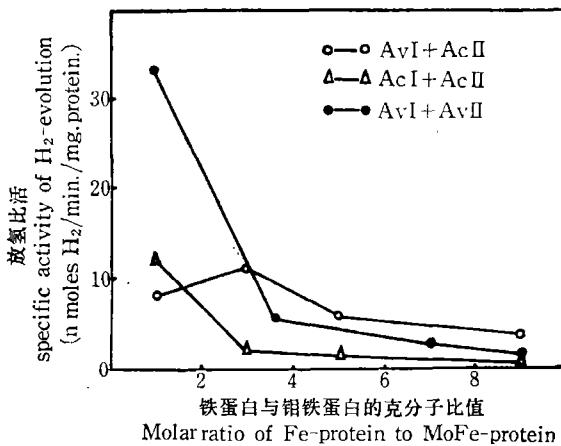


图3 柱孢鱼腥藻和棕色固氮菌固氮酶两个组分在交叉反应中,其放氢比活与铁蛋白对钼铁蛋白的克分子比值的关系

Fig. 3 The relationship between H₂-evolution activity and molar ratio of Fe-protein to MoFe-protein in the cross-reaction of two components of nitrogenase from *A. cylindrica* and *Azotobacter*

分子量按图2所示。

Molecular weights based on those shown in Fig. 2.

糖凝胶过滤,超滤等手段反复进行分离、纯化,结果也只能将钼铁蛋白及铁蛋白部分纯化,其过程费时而繁杂。蓝藻铁蛋白的纯化更为困难。Hallbeck等^[8]亦只能将它部分纯化,并指出它用DEAE-纤维素及Sephadex G-200分离纯化后,还需用离子交换纤维素及Sep-

hadex G-100 进一步纯化，皆因活性大量丧失而无法进行。而本实验可将蓝藻铁蛋白纯化 21 倍，两天内完成。

固氮酶中两个组分的结合方式，即一个钼铁蛋白分子结合几个铁蛋白分子？目前还没有一致看法。一般认为铁蛋白与钼铁蛋白之比是 1:1 或 2:1^[10,11]。用巴氏梭菌的铁蛋白滴定柱孢鱼腥藻的钼铁蛋白，最高比活性在铁蛋白与钼铁蛋白之比为 10:1 左右^[13]。我们用棕色固氮菌的钼铁蛋白滴定柱孢鱼腥藻的铁蛋白，最佳克分子比数也在 AcII 3:1 AvI (测放 H₂) 至 5:1 (测乙炔还原)。异源交叉反应为什么需要较高的铁蛋白比例，其机理还不清楚。

Emerich 和 Burris^[7] 曾经用测定乙炔还原，产 NH₃，ATP 水解及放氢等方法，研究了八种不同类型细菌的固氮酶两个组分之间的交叉互补作用。他们虽然没有用藻类作材料，但指出了它们广泛的催化相似性。Hallenbeck 等^[8]在研究柱孢鱼腥藻固氮酶的特性中认为，它的铁蛋白是不能与棕色固氮菌的钼铁蛋白有效反应的(可是他们没有给出详细的酶蛋白活性滴定及有关的反应动力学资料)。固氮酶组分互补反应活性受组分比及酶蛋白浓度的影响很大。在实验中出现的交叉互补活力参差不一的现象，除了所用酶制剂的活性及纯度问题以外，恐怕与组分比及酶浓度用量有很大关系。总之我们在反应时所用的酶浓度绝对值，均比其他人为高。

迄今对各种类型的固氮生物的固氮酶研究结果表明，它们的化学结构及生理生化性质是彼此相似的^[6,10]。巴氏梭菌 (Tanaka 等 1977) 和棕色固氮菌 (Hausinger 和 Howard, 1982)^[9] 的铁蛋白氨基酸顺序已被确定，而鱼腥藻 7120 (Mevarech 等 1980)，肺炎克氏菌 (Sundaresen 和 Ausubel, 1981) 以及根瘤菌 (Török 和 Kondorosi, 1981) 的铁蛋白亦从编码它们的 nifH 基因的 DNA 序列分析中给予推断。比较它们的共同点发现，它们有相当高的一致性。特别是在它们的 5 个半胱氨酸周围的氨基酸顺序，以及其蛋白核心疏水区的氨基酸顺序是高度保守的。从结构与功能统一的观点来看，也可以说不同来源的钼铁蛋白与铁蛋白能够互相取代，形成有活性的复合物。

Hausinger 和 Howard^[9] 在比较鱼腥藻属的铁蛋白氨基酸顺序与其他固氮生物、棕色固氮菌铁蛋白、巴氏梭菌铁蛋白及肺炎克氏菌铁蛋白的氨基酸顺序的特点中，证明这种蓝藻的铁蛋白与棕色固氮菌铁蛋白享有 70% 左右的同一性，与巴氏梭菌铁蛋白享有 63% 的同一性，并试图以铁蛋白的这种同一性即保守性去考察这些生物在系统发生中的关系。这是一种有益的尝试。这个问题的解决，需要更多的有关铁蛋白的分析材料，包括比较准确的酶组分交叉反应比活材料。而我们的工作正好在这方面提供了一些资料。

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, 1980。几种固氮蓝藻的固氮酶活性及其某些特性。水生生物学集刊, 7 (1): 57—60。
- [2] ——, 1980。固氮蓝藻与棕色固氮菌固氮酶组分的交叉互补功能。水生生物学集刊, 7 (1): 61—66。
- [3] ——, 1980。棕色固氮菌钼铁蛋白及一些物理化学性质。水生生物学集刊, 7 (1): 67—73。
- [4] 戴玲芬等, 1985。纯化柱孢鱼腥藻固氮酶组分 II(铁蛋白)的厌气制备电泳法。植物生理学通讯, (1): 50—51。
- [5] Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248—54.
- [6] Burgess, B. K., 1984. Structure and reactivity of nitrogenase -an overview. in: Veeger, C. and W. E. Newton, eds., *Advances in nitrogen fixation research*. pp. 103—114. Ni jhoff/Junk, Po-

doc.

- [7] Emerich, O. W. and R. H. Burris, 1978. Complementary functioning of the component proteins of nitrogenase from several bacteria. *J. Biochem.*, **134**(3): 936—943.
- [8] Hallenbeck, P. C. Kostel, P. J., and J. R. Benemann, 1979. Purification and properties of nitrogenase from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Eur. J. Biochem.*, **98**(1): 275—284.
- [9] Hausinger, R. P. and J. B. Howard, 1982. The amino acid sequence of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol.*, **275**(5): 2483—2490.
- [10] Huang, T. C., Zumft, W. G. and L. E. Mortenson, 1973. Structure of the molybdoferredoxin complex from *Clostridium pasteurianum* and isolation of its subunits. *J. Bact.*, **113**: 884—890.
- [11] Newton, W. E. and B. K. Burgess, 1983. Nitrogen fixation: Its scope and importance. In: Muller A. and W. E. Newton, eds, Nitrogen fixation pp. 1—19. Plenum.
- [12] Smith, R. V., Telfer A. and C. W. Evans, 1971. Complementary function of nitrogenase components from a blue-green alga and a photosynthetic bacterium. *J. Bacteriol.*, **107** (2): 574—578.
- [13] Tsai, L. B. and L. E. Mortenson, 1978. Interaction of the nitrogenase components of *Anabaena cylindrica* with those of *Clostridium pasteurianum*. *Bioch. Biophys. Res. Commun.*, **8**(2): 280—287.

CROSS-REACTIVITY OF Fe-PROTEIN OF *ANABAENA CYLINDRICA* AND MoFe-PROTEIN OF *AZOTOBACTER VINELANDII*

He Zhenrong Lin Huimin Du Daixian,
Dai Lingfen Xing Wusen and Li Shanghao
(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Abstract

A modified method was used for the separation and purification of *Anabaena cylindrica* nitrogenase, based upon which a further study on the cross-reactivity between Fe-protein from *A. cylindrica* and MoFe-protein from *Azotobacter vinelandii* was made. Results indicated that these two heterologous components were able to give an effective cross-reaction and showed a relatively strong nitrogenase activity. The specific activities of acetylene reduction and H₂-evolution contributed by cross-reacting heterologous components were as high as 83.8% and 66.7%, respectively, of that produced by algal homologous complementary response. In comparison with the kinetics of the algal homologous complementary reaction, it was found that the optimum molar ratio of Fe-protein to MoFe-protein for heterologous cross-reaction is much higher (5:1), the time course for both reactions being approximately the same. Discordant with the current conception, our findings demonstrate that the Fe-protein of *A. cylindrica* can form effective complexes with the MoFe-protein of *Azotobacter*.

Key words *Anabaena*, *Azotobacter*, nitrogenase cross-reactivity