



棕色固氮菌中固氮酶对氧毒害保护的初步研究*

徐 继 李佳格

(中国科学院植物研究所固氮研究室,北京)

固氮酶对氧极不稳定。随着其纯度的提高,遇氧不可逆的失活现象更加明显。在自然界生长的好气性固氮菌、固氮的藻类及豆科植物的共生固氮系统中有着特殊的适应机制^[1],这种机制可使固氮酶在有氧条件下免受氧的钝化。因此,研究固氮酶遇氧钝化的原因及好气性固氮菌所特有的氧保护机制,对固氮酶本身的研究以及实现固氮基因的转移都有重要的意义。

关于固氮酶的氧钝化和保护问题曾有不少研究工作。其中关于好气性固氮菌的研究,主要有呼吸保护学说^[2-5]及构象保护学说^[1,4,6]。最近 Haaker 等认为好气性固氮菌中存在对氧钝化的保护因子^[6]。

本文报道我们从棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 中固氮酶氧保护因子的分离提纯及其性质的初步研究,以及固氮酶组分之一 MoFe 蛋白遇氧失活后金属含量变化的分析结果。

材 料 和 方 法

材料:棕色固氮菌菌株 OP 和林土 230,发酵培养系采用 Burk 培养基。取培养 18 小时(对数生长期)的菌液离心后将糊状菌体贮存于 -20℃ 低温冰箱中。

细胞破碎:将冻存菌糊加入等重(重量/体积)的 Tris-HCl (pH7.4) 缓冲液。待菌糊融化后,用 CFS-250C 超声波发生器处理 15 分钟,再在 55℃ 水浴中加热 8 分钟,而后立即冷却至室温。用 MSE50 离心机 18,000g 离心 30 分钟,上清液即为固氮酶粗提取物。

固氮酶两组分 MoFe 蛋白及 Fe 蛋白的分离纯化:按本实验室 1972 年的方法^[7]。

氧保护因子的分离与初步纯化:固氮酶粗提物经 DEAE 离子交换纤维素厌氧柱层析。上样后分别用含 0.05 M 和 0.10 M NaCl 的 Tris-HCl (pH7.4) 缓冲液洗脱至流出液无色,以除去粗提物中的一些杂质。再用含 0.15 M NaCl 的上述缓冲液洗脱。层析柱上呈现一红色带,厌氧条件下收集。此部分即为保护因子,简称 P_(0.15)。

将 P_(0.15) 部分超滤浓缩后,经 Sephadex G-100 纯化去掉混杂的 MoFe 蛋白和细胞色素等物质。收集红色带部分即为初步纯化的保护因子,简称 S_(red)。

固氮酶活性测定:经过两次 DEAE-52 纤维素纯化后的 MoFe 蛋白或结晶的 MoFe 蛋白与 Fe 蛋白,在厌氧反应瓶中分别加入 P_(0.15) 或 S_(red),混匀后在室温下平衡 30 分钟。向反应瓶中注入空气并振荡 1 分钟,而后再反复抽气充氧,注入反应系统及乙炔^[7]。在 30℃ 水浴中振荡 15 分钟,测其乙炔还原活性。

电泳分析:采用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳 Ortec 系统^[9]。分离胶浓度为 5%。

金属分析:Mo 含量测定用 dithiol 比色法^[10]及中子活化分析法。Fe 含量测定用中子活化分析法。

蛋白质浓度测定:采用双缩脲法^[11]。

* 本文承阎隆飞先生和王发珠先生提出宝贵意见。含细胞色素 b 的铁蛋白结晶由本室李久蒂同志提供。中子活化分析法测 Mo、Fe 由中国科学院高能物理研究所中子活化分析室测定。光谱分析由本所光合室张国铮同志测定。在此一并表示感谢。

光谱测定：用日立 356 双光束双波长分光光度计记录光谱。

结果和讨论

我们从固氮菌无细胞粗提物中分离出对固氮酶遇氧具有保护功能的蛋白质 $P_{(0.15)}$ 或 $S_{(red)}$ 。将 $P_{(0.15)}$ 或 $S_{(red)}$ 加入到 MoFe 蛋白和 Fe 蛋白混合物中，一起保温平衡后再经见氧处理，则固氮酶乙炔还原活性可以保持未见氧时活性的 90% 以上（见表 1）。可见固氮酶的遇氧钝化得到了

表 1 $P_{(0.15)}$ 和 $S_{(red)}$ 在固氮酶见氧毒害中的保护作用

样 品	处理	乙炔还原活性*(%)
MoFe 蛋白 + Fe 蛋白	厌氧	100
MoFe 蛋白 + Fe 蛋白	见氧	0
MoFe 蛋白 + Fe 蛋白 + $P_{(0.15)}$	见氧	90
Fe 蛋白 + $P_{(0.15)}$	厌氧	0
MoFe 蛋白 + Fe 蛋白 + $S_{(red)}$	见氧	105
MoFe 蛋白 + Fe 蛋白 + $S_{(red)}$	厌氧	90

* 乙炔还原活性以 MoFe 蛋白 + Fe 蛋白厌氧处理为 100%。

$P_{(0.15)}$ 或 $S_{(red)}$ 的保护。这种保护机制目前还不十分清楚。我们曾做过这样的实验，加 $P_{(0.15)}$ 至遇氧失活后的固氮酶中，此固氮酶的乙炔还原活性不能再恢复。因此保护作用很可能是保护因子与固氮酶结合形成的复合物使固氮酶被保护免受氧的钝化。具有这种保护功能的不仅仅是 $S_{(red)}$ 一种，其它如黄素氧还蛋白^[12,13]和铁氧还蛋白^[14]等以至某些含细胞色素 b 的铁蛋白也可能对氧的毒害有保护功能。我们曾将从棕色固氮菌中提出的含细胞色素 b 的铁蛋白^[15] 加到 MoFe 蛋白和 Fe 蛋白的混合物中一起保温后，用上述同样方法处理并测其乙炔还原活性。结果表明加入含细胞色素 b 铁蛋白后遇氧的固氮酶活性可保存原固氮酶活性的 80%。

我们对 $S_{(red)}$ 的光谱和电泳特性进行了初步分析。在波长 300—700 毫微米范围内，分别测定氧化型 $P_{(0.15)}$ 和 $S_{(red)}$ 的吸收光谱（见图 1）。

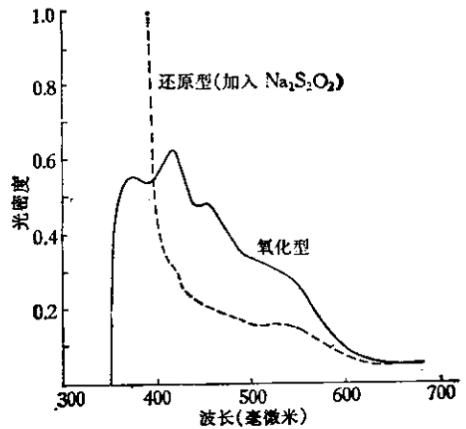


图 1 氧保护因子 $S_{(red)}$ 的吸收光谱

二者在 417 毫微米处都有一显著的吸收峰。在 450—460 毫微米和 540—550 毫微米处各有一吸收肩。加入 $Na_2S_2O_4$ 后 $S_{(red)}$ 和 $P_{(0.15)}$ 还原型光谱在 417 毫微米处的吸收峰成为吸收肩。其它两处的吸收大大减弱。此光谱特性类似于 Fe-S 蛋白 II^[12]，与 Haaker^[6] 提出的氧保护因子的光谱一致。

5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 $P_{(0.15)}$ 和 $S_{(red)}$ 分别有 7 条带和 2 条带（见图 2）。我们用 5%（内径 1 厘米，长 9 厘米）的制备电泳胶柱电泳后，切割分段（每段 0.5 厘米厚）。测其每段的可见吸收光谱。结果表明 $S_{(red)}$ 的两条带都有 Fe-S 蛋白 II 的吸收光谱。

为了更深入地研究固氮酶对氧钝化的保护机制，有必要进一步探讨固氮酶遇氧失活的原因。根据钼在 MoFe 蛋白固氮中的作用^[16,17]，以及 Mortenson^[18]曾报道过从巴氏梭菌（*Clostridium pasteurianum*）中分离出无活性的 MoFe 蛋白，其中缺少钼，我们考虑固氮酶遇氧失活是否和钼原子的变化有关。为此我们做了如下的实验：将 MoFe 蛋白针状结晶充分见氧后，再进行有氧透析一昼夜。透析后的样品及外透液经真空冷

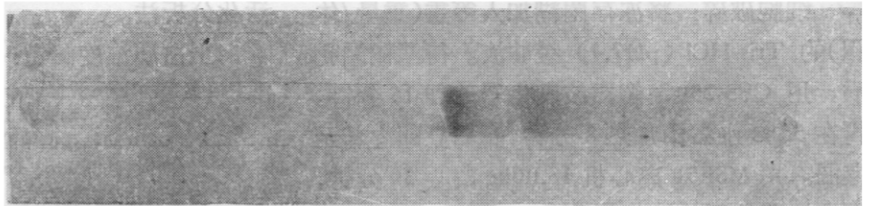


图 2 氧保护因子 $S_{(red)}$ 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

冻干燥后,用中子活化分析法测定其 Mo 和 Fe 含量,并与未经见氧透析的 MoFe 蛋白结晶进行

表 2 MoFe 蛋白见氧透析后 Mo 和 Fe 的含量
(中子活化分析法)

	样 品	处理	克含量/克样品
Mo 含量	MoFe 蛋白	见氧	5.81×10^{-4}
	MoFe 蛋白	厌氧	5.28×10^{-4}
	外 液*		2.76×10^{-4}
Fe 含量	MoFe 蛋白	见氧	7.35×10^{-3}
	MoFe 蛋白	厌氧	7.29×10^{-3}
	外 液*		1.47×10^{-3}

* 外液为 MoFe 蛋白见氧透析后的外液。

比较。结果表明(见表 2)。MoFe 蛋白见氧后,没有可被透析的含钼的物质脱落。与此同时我们对同一样品用比色法测定见氧前后 MoFe 蛋白 Mo 的含量,得到与中子活化分析类似的结果。中子活化分析测定 MoFe 蛋白铁的含量,见氧前后也无变化。

结果表明,好气性固氮菌中存在保护因子使固氮酶见氧时免于钝化。但对固氮酶遇氧失活的原因及保护因子 $S_{(\text{red})}$ 的性质及生理功能还有待更进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Yates, M. G.: *Physiological Aspects of Nitrogen Fixation, Recent Developments in Nitrogen Fixation* (ed. by Newton, W., J. R. Postgate and C. Rodriguez-Barrueco), Acad. Press, London and New York, 1977, pp. 219—270.
- [2] Drozd, J. and J. R. Postgate: *J. Gen. Microbiol.*, **63**: 63—73, 1970.

- [3] Jones, C. W. and J. M. Price: *FEBS Lett.*, **29**: 77—81, 1973.
- [4] Yates, M. G. and C. W. Jones: *Adv. Microbiol. Physiol.*, **11**: 97—135, 1974.
- [5] Haaker, H. and Cees Veeger: *Eur. J. Biochem.*, **63**: 449—507, 1976.
- [6] Scherings, G., H. Haaker and C. Veeger: *Eur. J. Biochem.*, **77**: 621, 1977.
- [7] 中国科学院植物研究所七室: *植物学报*, **15**(2): 281—284, 1973.
- [8] Hardy, R. W. F., R. D. Holsten, R. K. Jackson et al.: *Plant Physiol.*, **43**: 1185—1207, 1968.
- [9] Davis, L. C., V. K. Shah, Woj. Brill et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **256**: 512—523, 1972.
- [10] Clark, L. J. and J. H. Axley: *Anal. Chem.*, **27**: 2000, 1955.
- [11] Layne, E.: *Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins, Methods in Enzymology* (ed. by Sidney, P. Colowick and Nathan O. Kaplan), Vol. 3, Acad. Press, New York, 1957, p. 450.
- [12] Shethna, Y. I., D. V. Der Vartanian and H. Beinert: *B. B. R. C.*, Vol. **31**(6): 862—868, 1968.
- [13] Duane, C. Yoch.: *B. B. R. C.*, **49**(2): 335—342, 1972.
- [14] Yates, M. G.: *FEBS. Lett.*, **8**(5): 281—285, 1970.
- [15] 李久带, 王继文、钟泽璞等: *中国科学*, 1979 年, 第 10 期, 1022—1027 页。
- [16] Benemann, J. R., D. C. Yoch and R. C. Valentine et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **64**: 1079, 1969.
- [17] Brill, W. J., A. L. Steiner and V. K. Sahah: *J. Bacteriol.*, **118**: 986—989, 1974.
- [18] Barbara, B. E. and L. E. Morteson: *Molybdenum Storage Component from Clostridium Pasteurianum, Recent Developments in Nitrogen Fixation* (ed. by Newton, W., J. R. Postgate and C. Rodriguez-Barrueco), Acad. Press, London and New York, 1977, pp. 206—219.
- [19] Zumft, W. G. and L. E. Morteson: *Eur. J. Biochem.*, **35**: 401—409, 1973.