

柱胞鱼腥藻固氮酶铁蛋白的分离纯化 及其某些特性的研究

杜代贤 林惠民 何振荣

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 通过 DEAE-纤维素柱层析分级分离可将柱胞鱼腥藻 (*Anabaena cylindrica*) 固氮酶铁蛋白组分纯化 21 倍, 比活性达 $142.46 \text{ nmol C}_2\text{H}_4/\text{mg 蛋白} \cdot \text{分}$ 。纯化的铁蛋白质用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定呈均一状态, 分子量约为 61,000。氨基酸组分分析的结果不含色氨酸, 而酸性氨基酸中天门冬氨酸和谷氨酸的含量占氨基酸总数的 22%, 约为碱性氨基酸中精氨酸和赖氨酸的 2.6 倍。用原子吸收分光光度计测定不含钼, 每个铁蛋白分子中平均含有 3.36 原子的铁。柱胞鱼腥藻固氮酶钼铁蛋白与铁蛋白的滴定试验表明, 钼铁蛋白和铁蛋白的最佳分子比约为 1:2。提纯的柱胞鱼腥藻和棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 固氮酶组分的正反交叉重组结果表明均有活性。

从各种不同固氮生物的固氮酶中均分离到钼铁蛋白和铁蛋白二个固有的组分, 而且只有二者相结合时, 固氮酶才表现出所特有的催化活性。迄今, 有关固氮酶的研究较多地集中于钼铁蛋白。以蓝藻为材料的固氮酶研究大大少于菌类, 有关提纯的藻类铁蛋白的正式报道, 至今尚未见到。然而, 为了阐明固氮酶作用机理及揭示生物固氮的本质, 开展各类固氮生物的固氮酶铁蛋白的研究是必要的。本文报道了固氮蓝藻柱胞鱼腥藻固氮酶铁蛋白的分离纯化方法及其某些特性。

材料和方法

1. 材料的准备 实验所用的藻种为柱胞鱼腥藻 (*Anabaena cylindrica*)。藻种的培养包括原种培养、前期培养(即大量培养)以及强化培养(提高固氮酶活力)等数个阶段。经过逐级扩大培养的藻种大量培养在数个容积为 10L 的玻璃容器中。采用 Allen 和 Arnon 培养基, 光照强度为 5000—6000lx, 温度为 30°C, 通入含有 3% CO_2 的氮气并连续搅拌。将扩大培养的藻体浓缩成一瓶, 在限制氧、氮, 饥饿, 高光强的条件下, 颜色由浓绿转黄, 得到固氮活力较高的培养物。厌氧离心收集藻糊并保存于液氮中备用。

2. 固氮酶铁蛋白的分离和纯化 取上述方法得到的藻糊 120—150g, 以大致同体积的去氧的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4, 内含 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.5mg/ml) 稀释, 加入 $20 \mu\text{g/ml}$ 的 DNase, 分批转入自制的厌氧超声破碎容器, 每批约 60ml, 置于冰浴中, 在不断通入氩气

和搅拌的情况下间歇超声破碎(每次超声 1 分钟,停半分钟,共 4 次;采用 CFS-25-4 型超声加工机床, 250W, 19kHz)。破碎物以氩气压入事先加有液体石蜡并用氩气去氧的厌氧离心管中离心(70,000g, 30 分钟)。厌氧收集和测定所得上清液的酶活性及蛋白质浓度,并立即上预先充分还原平衡的 DEAE-纤维素柱 (DE52, $\phi 3.2 \times 12\text{cm}$) 进行全酶层析。通过一根两端带有头皮针的塑料管 ($\phi 0.2\text{cm}$), 一端与层析柱连接,另一端与一定盐浓度的 Tris-HCl 洗脱液连接。洗脱液在一个具有 $4.9 \times 10^4\text{Pa}$ 压力的氩气球的驱动下,用含 0.1mol/L NaCl 的 0.25mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4),以一定的速度流洗下藻蓝素等大量的色素蛋白,至流出液无色(至少 4 个柱体积),接着以 0.6mol/L NaCl 浓度的上述缓冲液洗下全酶。全酶再经 DEAE-纤维素柱 ($\phi 2.2 \times 8\text{cm}$) 层析分离,按照上述方法顺次以含 0.1, 0.25, 0.6mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 洗脱。 0.25mol/L NaCl 洗下的部分为钼铁蛋白组分, 0.6mol/L NaCl 洗下的部分即为铁蛋白的粗制组分。收集的铁蛋白组分经过 DEAE-纤维素小柱 ($\phi 1 \times 8\text{cm}$) 纯化。纯化步骤可再重复进行 1—2 次,也可以自制的小型厌氧制备电泳进一步纯化¹⁾。这样得到的电泳纯铁蛋白,单独测定无乙炔还原活性,而重组后则有活性,聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为一条带。

使用 Tris-HCl 缓冲液和 Hepes 缓冲液的结果表明,二者无大的差异。

本过程自始至终都在极为严格的厌氧条件下进行,缓冲液在真空下充分去氧后加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 其浓度为 $0.3\text{—}0.4\text{mg/ml}$ 。

3. 固氮酶活性的测定 采用乙炔还原的方法。

4. 氨基酸组分的分析 电泳纯铁蛋白用 5.7mol/L 的超纯盐酸在 110°C 下分别消化 24, 48, 72 小时,真空干燥后溶于 pH2.2 的柠檬酸缓冲液中。分析半胱氨酸的样品,先用过甲酸氧化,使半胱氨酸氧化成半胱磺酸,再用盐酸水解 24 小时,样品处理好后用日立 835 型氨基酸自动分析仪测定。

色氨酸是用 2mol/L 的 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 在 110°C 下消化 72 小时后利用光谱法测定。

5. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 参照戴维斯 (Davis) 的方法^[3],分离胶为 7.5%,浓缩胶为 3%,样品胶改用样品液中加入 20% 的蔗糖。

6. 分子量的测定 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定^[10]。

7. 蛋白质含量的测定 用考马氏亮蓝染色法测定。

8. 钼和铁的含量的测定 用原子吸收分光光度计测定。

结果与讨论

1. 铁蛋白的分离和纯化 经上述方法制备的柱孢鱼腥藻固氮酶铁蛋白组分较无细胞提取液纯化 21 倍,其比活性为 $142.46\text{nmol C}_2\text{H}_4/\text{mg 蛋白} \cdot \text{分}$ (表 1)。纯化后的铁蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳分析为一条带,微量光密度扫描图谱呈一峰(图 3),元素分析的结果表明不含钼,经氨基酸组分分析也不含色氨酸(表 3)。

粗酶液 (CE) 中杂蛋白等的去除,曾采用加热,加硫酸鱼精蛋白、硫酸链霉素以及聚乙二醇等方法,均未能获得令人满意的结果。而将 CE 通过一个短而粗的 DEAE-纤维

1) 戴玲芬等,植物生理学通讯。1985 年第 1 期。

表 1 柱孢鱼腥藻固氮酶铁蛋白的分离和纯化

纯化步骤	无细胞提取液	全酶层析	DEAE-纤维素柱分离	DEAE-纤维素柱纯化
比活性 (nmol/LC ₂ H ₄ /mg 蛋白·分)	6.90	71.55	105.16	142.46
纯化倍数	1	10.4	15.2	21.0

素柱 (DE52) 取得效果甚佳。

Oppenheim 等^[6]曾报道棕色固氮菌固氮酶的稳定性依赖于提取的方式, 当以温和的溶菌方式 (Osmotic Lysis) 破坏细胞时, 固氮酶是可溶性的, 极易为氧失活; 而以超声或 French pressure-cell 等方式破碎细胞时, 固氮酶成为颗粒状的复合体形式, 对氧是稳定的。柱孢鱼腥藻也似乎表现出某种类似性, 即经过第一步 DEAE-纤维素柱进行全酶洗脱, 仅除去大量的藻蓝素等色素蛋白 (图 1), 纯度提高约 10 倍, 此时固氮酶活性并不丧失。显而易见, 全酶洗脱方式下酶活性比较稳定。第二步用 DEAE-纤维素柱分离时, 尽管经大量的 0.25mol/L NaCl 浓度洗脱以去除钼铁蛋白, 但得到的铁蛋白单独反应时, 仍会有很低的乙炔还原活性, 微量光密度扫描表明仍是不纯的 (图 2), 电泳分析也呈不均一状态, 表明尚有少量的钼铁蛋白污染。

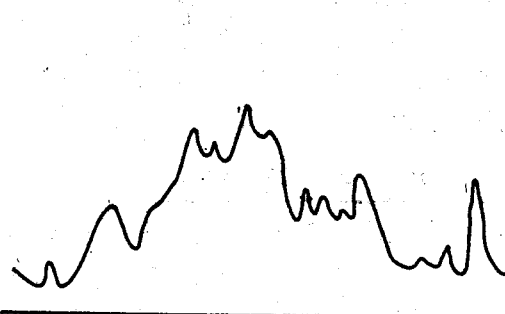


图 1 *A. cylindrica* 固氮酶全酶的微量光密度扫描

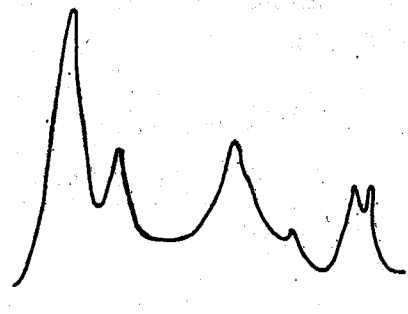


图 2 *A. cylindrica* 固氮酶二次柱分离后的铁蛋白的微量光密度扫描

第三步, 收集的铁蛋白经过 DEAE-纤维素进一步纯化和浓缩, 最终得到纯度和活性均较高的铁蛋白组分 (图 3)。应用自制的聚丙烯酰胺凝胶厌氧制备电泳作第三步提纯, 也可得到同样的效果。

分离的铁蛋白对氧是极为敏感的, 蓝藻固氮酶的铁蛋白质尤其如此。纯化过程中偶一不慎, 即可导致前功尽弃, 酶活性丧失殆尽。纯的铁蛋白在纯化以后在电泳上扩散成 2 条带, 带的颜色也由棕红色转为绿色。因此纯化过程中至关重要是自始至终置于极为严格的厌氧条件下, 必要时还可适量地增加 Na₂S₂O₄ 的用量 (本实验中用到 4mg/ml 左右)。温度是影响铁蛋白稳定性的另一个重要因素, 在 0°C 附近也极易失活^[7]。铁蛋白对环境条件的苛求或许是至今尚未能较大量地制取它的一个重要原因。本法特点是实验周期较短, 一般在 30 小时以内即可完成, 制备程序也比已报道方法简便, 这对于分离纯化极

易失活、含量甚微的蓝藻固氮酶铁蛋白是行之有效的。

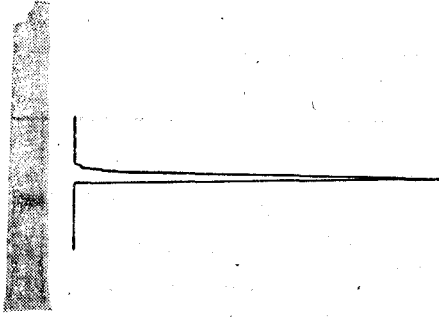


图3 *A. cylindrica* 固氮酶铁蛋白凝胶电泳图像和微量光密度扫描图谱

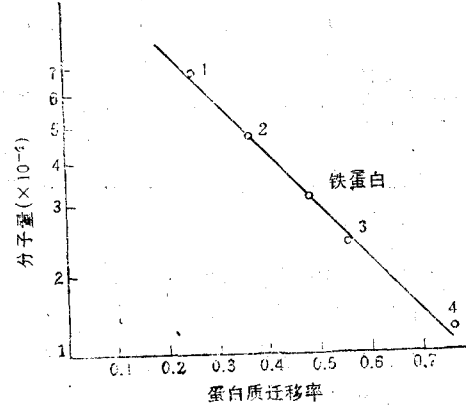


图4 利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定铁蛋白亚单位的分子量

1.牛血清蛋白 BSA(M.w. 67,000); 2.卵白蛋白 Ova(M.w. 45,000); 3.羊胰蛋白酶 Try (M. w. 24,000); 4. 细胞色素 C Cyt C (M. w. 12,300)。

2. 铁蛋白的分子量 利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定的结果, 柱胞鱼腥藻固氮酶铁蛋白的单体约为 30,500 道尔顿(图 4), 因此其分子量应为 61,000 道尔顿左右。该结果比以往报道的棕色固氮菌、圆褐固氮菌等的结果低一些, 比巴氏梭菌的结果略高(表 2), 而与本实验中通过氨基酸组分分析计算的结果完全相符(表 3)。

表 2 柱胞鱼腥藻和另几种固氮生物的固氮酶铁蛋白在分子量和铁含量上的比较

铁蛋白来源	Cp	Av	Ac(1)	Kp	Rl	Ac(2)
分子量($\times 10^{-4}$)	5.5	6.4	6.54	6.68	6.5	6.1
铁含量 (atom-Fe/mol 蛋白)	4	3.4	4	4	3.1	3.36

Cp: *Clostridium pasteurianum* (Nakos & Mortenson, 1971); Av: *Azotobacter vinelandii* (Kleiner et al., 1974); Ac(1): *Azotobacter chroococcum* (Yates & Planque, 1975); Kp: *Klebsiella pneumoniae* (Eady et al., 1972); Rl: *Rhizobium lupini* (Whiting et al., 1976); Ac(2): *Anabaena cylindrica* (Author)。

3. 铁蛋白与钼铁蛋白的最适分子比 在体外重组系统中, 以纯的不同量的铁蛋白滴定一定量的钼铁蛋白表明, 一个钼铁蛋白分子结合大约 2.3 个铁蛋白分子时, 乙炔还原活性最高; 进一步增加铁蛋白的用量其活性反而有所下降。因此, 铁蛋白与钼铁蛋白的最适分子结合比为 2:1 左右(图 5)。该值与已报道的几种固氮生物的铁蛋白与钼铁蛋白的比例为 (2—1):1 的值是相近的^[1,4,9], 不同的是出现了抑制效应, 这可能由于随着铁蛋白过剩引起系统中盐浓度增加所致(图 5)。

4. 铁的含量 应用原子吸收分光光度计测定, 铁蛋白分子中平均含有 3.36 原子的铁, 这与其它来源的铁蛋白中所含的铁原子数是相近的(表 2)。纯化过程中的铁蛋白分子全然不受损伤的情况是极少的, 因此, 表 2 中的数据差异并不意味着它们本来的区

别。

5. 铁蛋白的氨基酸组成 柱孢鱼腥藻固氮酶铁蛋白的氨基酸组分的分析结果如表 3。其中丝氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸按不同消化时间的回收值外推至零计算, 赖氨酸和异亮氨酸取水解 48 小时和 72 小时的平均值, 其它氨基酸以不同水解时间的平均值计算。按 Thoruber 法^[8]计算氨基酸组分的最适比例, 由氨基酸组分估算铁蛋白的分子量为 60,570.7。根据测定的结果, 柱孢鱼腥藻铁蛋白分子总共由 556 个氨基酸组成, 其中天门冬氨酸和谷氨酸的含量占整个氨基酸总数的 22.3%, 赖氨酸和精氨酸的含量占 8.7%。因此, 酸性氨基酸的含

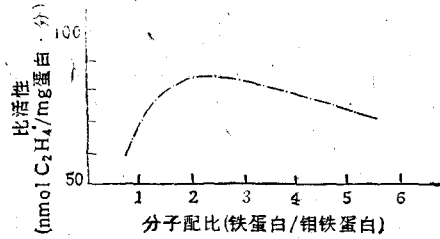


图 5 铁蛋白对一定量的钼铁蛋白的滴定曲线

表 3 几种固氮生物固氮酶铁蛋白氨基酸组成的比较

每分子铁蛋白氨基酸残基数	铁蛋白的来源	<i>C. pasteurianum</i> ¹⁾	<i>K. pneumoniae</i> ²⁾	<i>A. vinelandii</i> ³⁾	<i>A. cylindrica</i> ⁴⁾
天门冬氨酸 Asp		45	60	58	34
苏氨酸 Thr		24	36	28	36
丝氨酸 Ser		24	24	28	32
谷氨酸 Glu		70	84	65	70
甘氨酸 Gly		62	60	54	38
丙氨酸 Ala		40	60	53	38
缬氨酸 Val		34	42	45	38
甲硫氨酸 Met		16	36	24	34
异亮氨酸 Ile		34	48	34	34
亮氨酸 Leu		52	42	55	48
酪氨酸 Tyr		18	18	14	30
苯丙氨酸 Phe		11	12	25	18
赖氨酸 Lys		32	36	36	26
组氨酸 His		4	6	9	8
精氨酸 Arg		24	24	24	22
脯氨酸 Pro		18	18	21	20
半胱氨酸 Half-cys		12	18	13	10
色氨酸 Trp		0	0	0	0
天门冬氨酸 + 谷氨酸 Asp + Glu		115	144	123	124
精氨酸 + 赖氨酸 Arg + Lys		56	60	60	48
氨基酸总数		520	624	586	556
分子量			66,800	63,800	61,000

1) Chen, J. et al., 1973; 2) Eady, R. R., 1972; 3) You Chong-biao et al., 1976; 4) Author.

量大大超过碱性氨基酸。柱孢鱼腥藻的铁蛋白分子不含色氨酸。从表 3 可以看出, 除少数几种氨基酸以外, 在氨基酸的总数和组成比例上都是非常接近的, 暗示柱孢鱼腥藻固氮

酶铁蛋白具有其它固氮生物的铁蛋白所共有的特征。

6. 铁蛋白的吸收光谱

柱孢鱼腥藻固氮酶铁蛋白的吸收光谱如图6。在大约280m μ 处出现一个吸收峰,在280m μ 后则出现一个很宽的吸收带,与用某些细菌的组分观察到的结果类似^[7]。

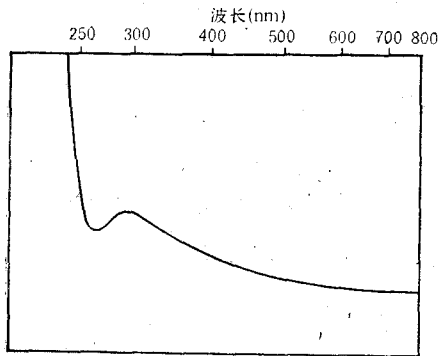


图6 *A. cylindrica* 固氮酶铁蛋白的紫外/可见光吸收光谱

7. 固氮酶的交叉重组

用分别提纯的柱孢鱼腥藻和棕色固氮菌的固氮酶铁蛋白进行了交叉重组实验。前者的钼铁蛋白和后者的铁蛋白的异源组合具有固氮活性,其活力为31nmolC₂H₄/mg蛋白·分。引人注目的是首次发现了纯化的柱孢鱼腥藻的铁蛋白与棕色固氮菌的钼铁蛋白的组合也具有较高的固氮活性,其活性达前者同源重组的83.8%。有关这一研究的较为详细的结果将另文报道。

参 考 文 献

- [1] 中村道德, 1980. 生物窒素固定. 东京学会出版センター, 第111页。
- [2] Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248—254.
- [3] Davis, B. J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404.
- [4] Eady, R. R., B. E. Smith, K. A. Cook et al., 1972. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Purification and properties of the component proteins. *Biochem. J.* 128: 655—675.
- [5] Kelly, M., R. V. Klucas and R. H. Burris, 1967. Fractionation and storage of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.* 105(1): 3C—4C.
- [6] Oppenheim, J. and L. Marcus, 1970. Correlation of ultrastructure in *Azotobacter vinelandii* with nitrogen source for growth. *J. Bacteriol.* 101(1): 286—291.
- [7] 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(2): 445—454.
- [8] Thoruber, J. P. and J. M. Olson, 1968. The chemical composition of a crystalline bacteriochlorophyll protein complex isolated from the green bacterium, *Chloropseudomonas ethylicum*. *Biochemistry* 7(6): 2242—2249.
- [9] Vandecasteele, J. P. & R. H. Burris, 1970. Purification and properties of the constituents of the nitrogenase complex from *Clostridium pasteurianum*. *J. bacteriol.* 101: 794—801.
- [10] Weber, K. and M. Osborn, 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biochem.* 244: 4406.

PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF Fe-PROTEIN OF NITROGENASE FROM *ANABAENA CYLINDRICA*

Du Daixian, Lin Huimin, He Zhenrong, Dai Lingfen,
Xin Wusheng and Li Shanghao

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan*)

ABSTRACT

The Fe-protein of *Anabaena cylindrica* has been separated and purified by chromatography through DEAE-cellulose columns and then by gel-electrophoresis. The specific activity is up to 142.46 nmol/L C_2H_4 /mg protein·min. It was homogeneous as shown by 1) a single band in gel electrophorogram; 2) absence of Mo and tryptophan; 3) containing about 3.4 atoms of Fe per mole protein. The molecular weight of Fe-protein of *A. cylindrica* is about 61,000 daltons, estimated by SDS-gel electrophoresis and calculated from the amino acid composition. The residues of aspartate and glutamate are about 2.6 times as much as that of arginine and lysine in the Fe-protein. Crossing Fe-protein of *A. cylindrica* with Mo-Fe protein of *Azotobacter vinelandii* gives positive result. The reciprocal cross also gives activity.