

棕色固氮菌固氮酶铁蛋白的提纯及其某些特性的研究

中国农林科学院原子能利用研究所固氮组

(北 京)

用 DEAE-纤维素和凝胶过滤法,可将棕色固氮菌固氮酶铁蛋白组分提纯 43 倍,比活性达 512 毫微克分子 NH_3 /毫克蛋白·分。用聚丙烯酰胺凝胶电泳检定,呈均一状态,不含色氨酸、铝。每分子铁蛋白含 3.89 个原子 Fe,分子量约 64,000。氨基酸组分分析结果表明,铁蛋白中酸性氨基酸含量为碱性氨基酸含量的一倍。在 380—650 毫微米区内有宽的吸收带,但无明显吸收峰。

生物固氮过程中,不论固氮酶的来源如何,铁蛋白都是催化氮固定所必需的两种酶蛋白组分之一^[1,2]。开展固氮酶结构及功能的研究,进而弄清铁蛋白在生物固氮中的作用,对揭示生物固氮的本质,进一步进行生物固氮的化学模拟都是有意义的。

本文在于探索棕色固氮菌固氮酶铁蛋白的提纯方法,并对某些特性进行鉴定。

材 料 和 方 法

(一) 菌体

实验采用棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii* 230)。该菌株生长在改良的伯克 (Burk) 或尼古拉斯 (Nicholas) 培养基中。大量培养在 1000 升培养液中进行。用测量浊度(660 毫微米)来观测菌体生长,同时用乙炔还原法检测培养过程中菌体活性的变化,以适时用连续离心机收获菌体^[3]。细胞糊在 -40°C 冷冻贮藏。

(二) 固氮酶铁蛋白的分离和提纯

菌体用超声 20 千赫/秒破碎后,经 $100,000 \times g$ 离心 30 分钟得无细胞抽提液,蛋白浓度为 60—70 毫克/毫升。再在 60°C 下加热 10 分钟, $27,000 \times g$ 离心 30 分钟除去杂蛋白,留上清液,蛋白浓度 25—30 毫克/毫升。

将上清液直接用 DEAE-纤维素柱 (4.0×25 厘米)层析分离,依次用含 0.15M、0.25M、0.35M

NaCl pH7.4 的 0.025M Tris-HCl 缓冲液洗脱^[4]。0.25M NaCl 洗脱为铝铁蛋白组分, 0.35M NaCl 洗脱为铁蛋白组分,为 F_1 。收集的铁蛋白组分,必要时可放在液氮中保存过夜,活性并不损失。将 F_1 再经 DEAE-纤维素柱 (3.2×18.0 厘米)层析,用 0.25M NaCl 洗脱污染的铝铁蛋白组分,用 0.35M NaCl 洗脱铁蛋白组分,为 F_2 。

将 F_2 经葡聚糖凝胶 G-100 柱 (3.3×20.0 厘米)纯化。用含 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (0.2 毫克/毫升) 0.025M pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱,收集已提纯的铁蛋白组分。

除无细胞抽提液外,所有实验过程都在严格厌氧条件下进行,缓冲液在真空下去气后,用无氧的氩气连续冲洗,每毫升缓冲液含 0.2 毫克 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 。

(三) 酶活测定

N_2 的固定是测定一个大气压 N_2 下 NH_3 的形成。 NH_3 在扩散后用纳氏 (Nessler) 试剂测定^[5]。

(四) 氨基酸组分分析

提纯的铁蛋白溶液先后对 0.1M KCl 和无离子水透析 36 小时后,真空冷冻干燥成干粉,用恒沸 HCl 在真空玻璃管中 110°C 下水解 16, 24, 48, 72 小时^[6]。用 AA-600 型氨基酸分析仪测定。半胱氨酸和甲硫氨酸用过甲酸氧化成半胱磺酸^[7]和甲硫氨酸亚砷测定。色氨酸用光谱法测定^[8]。

本文于 1975 年 12 月 24 日收到。

将结果对水份和灰份进行校正。

(五) 聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳

参照戴维斯 (Davis) 等方法^[9]。

(六) 分子量测定

按斯托克洛萨 (Stoklosa) 等方法^[10], 用硫酸十二烷基酯钠-聚丙烯酰胺电泳测定。

(七) 蛋白质含量测定

用双缩脲法或福林 (Folin) 试剂测定。

(八) 钼含量测定

用极谱法^[11]测定。

(九) 铁含量测定

用原子吸收分光光度计测定。

结果和讨论

(一) 铁蛋白的提纯

用上述方法制备的固氮酶铁蛋白组分提纯 43 倍, 不含钼和色氨酸, 活性也较高 (表 1)。第 1 次用 DEAE-纤维素柱层析后, 用 0.35M NaCl 洗脱的铁蛋白组分仍含有

表 1 固氮酶铁蛋白组分的提纯

区 分	体 积 (毫升)	总 蛋 白 (毫克)	Mo (毫克/毫克 蛋白)	比活性* (毫克分子NH ₃ / 毫克分钟)	纯 度 (倍 数)
无细胞抽提液	120	7180	1.97	11.70	1
60℃加热处理	95	2450	1.57	28.25	2.41
第 1 次 DEAE-纤维素柱	50	252	0.89	150.56	12.86
第 2 次 DEAE-纤维素柱	35	161	0	229.1	19.58
葡聚糖凝胶 G-100 柱	28	38.8	0	512.4	43.49

* 活性测定: 在总容积为 1.0 毫升的反应混合物中含 ATP 5 微克分子, 磷酸肌酸 50 微克分子, 肌激酶 0.5 毫克, MgCl₂ 5 微克分子, Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 30 微克分子, Na₂S₂O₄ 30 微克分子; 气相 N₂, 钼铁蛋白与铁蛋白比例 1:2, 总蛋白量 ≤ 0.5 毫克。

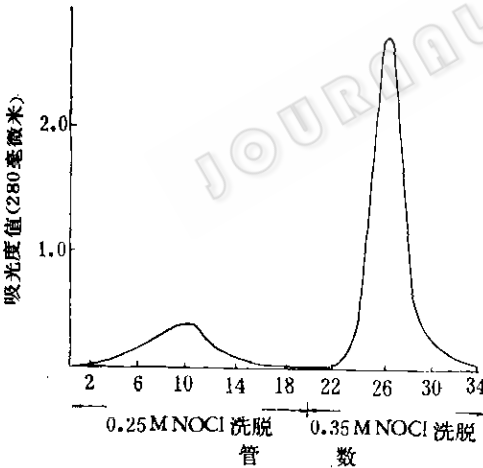


图 1 棕色固氮菌固氮酶铁蛋白经第 2 次 DEAE-纤维素柱的层析谱(每管 5 毫升)

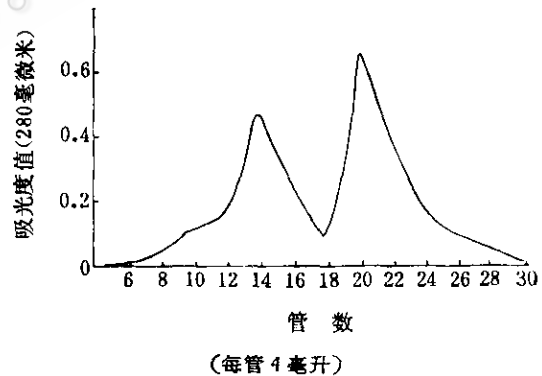


图 2 铁蛋白葡聚糖凝胶 G-100 柱的洗脱

少量钼, 这说明了还有少量钼铁蛋白存在。第 2 次用 DEAE-纤维素柱层析谱中也可以见到仍有 0.25M NaCl 洗脱组分 (图 1)。第 2 次 DEAE-纤维素柱层析后的铁蛋白组分, 虽然已不含钼, 但是在电泳中还不呈均一状态 (图 3A)。进一步用葡聚糖凝胶

G-100 提纯后, 可得到活性和纯度都较高的铁蛋白组分 (图 2), 用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定呈均一状态 (图 3B)。在适当增大葡聚糖凝胶 G-100 柱后, 用第 1 次 DEAE-纤维素柱层析所得的铁蛋白组分不经第 2 次 DEAE-纤维素柱直接用葡聚糖凝胶 G-100 分离, 也可以得到同样的提纯效果。这方法比已报道分离提纯此菌固氮酶铁蛋白的方法^[12,13]都较为简便。

(二) 铁蛋白的一些特征

铁蛋白对氧极端敏感,暴露于空气中 5 分钟后,失去全部活性,在圆盘凝胶电泳中形成 3 条带(图 3C)。用 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理空气钝化了的铁蛋白,则在电泳上呈一条扩散的带,电泳区带位置也略有改变(图 3D),活性也不能恢复。

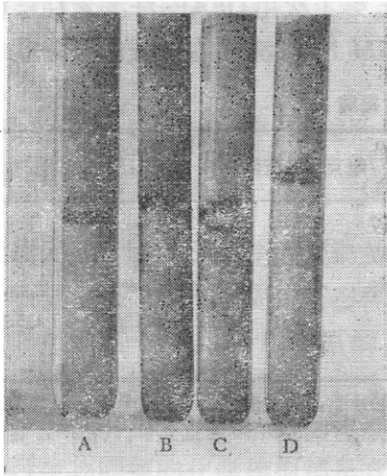


图 3 固氮酶铁蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图 (样品用量为 100—130 微克)

- A: 经第 2 次 DEAE-纤维素柱层析。
B: 经葡聚糖凝胶 G-100 分离。
C: 同上,暴露于空气中 5 分钟。
D: 同 C, 加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 处理。

固氮酶铁蛋白的吸收光谱见图 4, 在 380—650 毫微米范围内有一个很宽的吸收带,但没有明显的吸收峰。样品暴露于空气后,在 380—650 毫微米区域内吸收增加。波长短于 380 毫微米的吸收主要是来源于 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 。

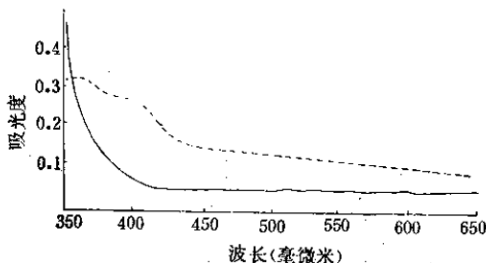


图 4 铁蛋白的吸收光谱 (2.40 毫克/毫升)
——未暴露于空气 ---暴露于空气后

用硫酸十二烷基酯钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量,经鉴定,铁蛋白亚单位分子量为 31,000—32,000 (图 5)。因此铁蛋白分子量应为 62,000—64,000。这与氨基酸组分分析所计算的结果一致,与某些报道^[4,14,15]所估计的棕色固氮菌铁蛋白的分子量为 30,000—40,000 或 46,000—50,000 有差别,但与克伦德 (Klender) 等^[16]用多种方法实测的结果相符。

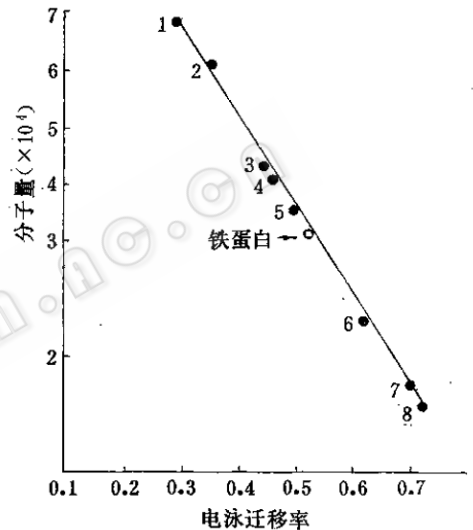


图 5 用圆盘电泳测定铁蛋白亚单位分子量

标记蛋白质:

1. 牛血清白蛋白(分子量 68,000);
2. 过氧化氢酶(分子量 60,000);
3. 卵白蛋白(分子量 43,000);
4. 肌激酶(分子量 40,000);
5. 胃蛋白酶(分子量 35,000);
6. 胰蛋白酶(分子量 23,000);
7. 溶菌酶(分子量 14,300);
8. 细胞色素C(分子量 11,700)。

提纯了的铁蛋白含铁量按分子量为 64,000 计算,每分子铁蛋白含 3.89 原子铁。

铁蛋白的氨基酸组份分析结果如表 2。丝氨酸和苏氨酸值用外推至零来计算,缬氨酸和异亮氨酸由 48 和 72 小时平均水解值计算。最适比例按索尔伯 (Thoruber) 和奥尔森 (Olson) 法^[17]计算,按该方法计

表 2 铁蛋白氨基酸组分(微克分子)

氨基酸	水解时间 (小时)				最适数值	最适比例	最接近整数
	16	24	48	72			
赖氨酸	0.143	0.141	0.152	—	0.145	36.2	36
组氨酸	0.034	0.036	0.033	—	0.034	8.5	9
NH ₃	0.227	0.258	0.298	0.292	—	—	—
精氨酸	0.097	0.091	0.105	—	0.098	24.4	24
天门冬氨酸	0.216	0.232	0.243	—	0.230	57.5	58
苏氨酸	0.084	0.103	0.098	0.090	0.110	27.5	28
丝氨酸	0.105	0.101	0.098	0.080	0.112	28.0	28
谷氨酸	0.279	0.242	0.264	—	0.261	65.3	65
脯氨酸	0.082	0.085	0.83	—	0.083	20.7	21
甘氨酸	0.221	0.208	0.224	—	0.218	54.4	54
丙氨酸	0.212	0.208	0.217	—	0.212	53.0	53
缬氨酸	0.155	0.153	0.183	0.174	0.179	44.8	45
异亮氨酸	0.120	0.125	0.148	0.128	0.138	34.4	34
亮氨酸	0.216	0.216	0.248	0.208	0.222	55.4	55
酪氨酸	0.061	0.052	0.055	—	0.056	14.0	14
苯丙氨酸	0.101	0.099	0.114	—	0.099	24.8	25
半胱氨酸*	0.052	—	0.048	—	0.052	13.0	13
甲硫氨酸*	0.105	—	0.091	—	0.098	24.4	24
色氨酸	—	—	—	—	0	0	0
总 量							586

* 用过甲酸氧化成半胱磺酸和亚硫酸氨基砷测定。

算,铁蛋白分子量为 63,800。棕色固氮菌铁蛋白不含色氨酸,天门冬氨酸和谷氨酸含量占全部氨基酸的 20.9%,缬氨酸和精氨酸占 10.3%,这和其他固氮微生物的相应蛋白相似^[18]。酸性氨基酸含量远超过碱性氨基酸含量。半胱氨酸含量和国外某些报道^[16]相比有差别,但和巴氏梭菌,克肺炎氏杆菌固氮酶铁蛋白中半胱氨酸含量相近^[18]。其他氨基酸也大都和上述两种有机体固氮酶铁蛋白中含量^[18]相近似。

参 考 资 料

[1] Burris, R. H.: The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation, p. 106,

1971.
[2] Eady, R. R. et al.: *Biochem. J.*, 128: 655, 1972.
[3] 中国农林科学院原子能研究所固氮组: 棕色固氮菌产生固氮酶的动力学(待发表)。
[4] Bulen, W. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.*, 56:979, 1966.
[5] Burris, R. H.: *Methods in Enzymology*, 24B:415, 1972.
[6] Moore, S. et al.: *Methods in Enzymology*, 6:819, 1963.
[7] Moore, S.: *J. Biol. Chem.*, 238:235, 1963.
[8] Blackburn, S.: *Amino Acid Determination*, p. 182, 1968.
[9] Davis, L. C. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 256: 512, 1972.
[10] Stoklosa, T. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 58:14, 1974.
[11] Violanda, A. T. et al.: *Anal. Chem.*, 36:

- 2287, 1964.
- [12] Shah, V. K. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **305**: 446, 1973.
- [13] Moustafa, E.: *Ibid.*, **206**:178, 1970.
- [14] Yates, M. G.: *The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation*, p. 304, 1971.
- [15] Kajiyama, S. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **37**:711, 1969.
- [16] Klender, D. et al.: *Arch. Microbiol.*, **98**: 93, 1974.
- [17] Thoruber, J. P. et al.: *Biochemistry*, **7**: 2242, 1968.
- [18] Chen, J. S. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **310**: 51, 1973.

PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF IRON-PROTEIN OF NITROGENASE FROM *AZOTOBACTER VINELANDII*

RESEARCH GROUP OF NITROGEN FIXATION, INSTITUTE OF UTILIZATION
OF ATOMIC ENERGY, CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURE AND
FORESTRY SCIENCES
(Beijing)

Azotobacter Fe-protein has been purified by treating the cell-free extract of *Azotobacter vinelandii* at 60°C for 10 minutes, fractionating twice through DEAE-cellulose column and finally by gel filtration. Its specific activity is 512 n moles $\text{NH}_3/\text{min.}/\text{mg. protein}$. It was homogeneous as shown by (1) the absense of Mo and tryptophan, (2) gel electrophorogram, and (3) containing

about 4 atoms of Fe per mole protein. Its molecular weight is 64,000 daltons, estimated by SDS-gel electrophoresis and calculated from the amino acid composition. The Fe-protein is acidic, containg twice as many acidic amino acid residues as the basis ones. The native Fe-protein is yellow-brown with broad absorption from 380 to 650 nm.