

用单向定量免疫电泳法测定棕色固氮菌无细胞提取物中的固氮酶两个蛋白组分的比例

顾天青 王发珠

(中国科学院植物研究所, 北京)

采用单向定量免疫电泳的方法, 有效地鉴别和测定出棕色固氮菌无细胞粗提物中的固氮酶两个蛋白组分的比例关系。若组分 I 分子量以 25 万计, 组分 II 分子量以 6 万计, 则两个蛋白组分的比例为 1:6—1:8。另外, 在固氮酶的分离提取过程中, 由于经过 60℃ 加热等步骤, 使其固氮酶的两个蛋白组分都受到相当可观的损耗 (大致 60—70%), 为了提高固氮酶的得率, 必须对这一步骤加以改进。

由于免疫化学方法具有高度的专一性和敏感性, 因此, 在酶学研究中的应用也日趋广泛。我们采用单向定量免疫电泳的方法, 即在电场的作用下, 定量的抗原在含定量的抗体离子琼脂中泳动后, 比例合适时, 可在短时间内出现锥形沉淀峰, 故可精确地计算出样品中特别是混合物中一定抗原的含量^[1]。

固氮酶是由两种蛋白即 Mo·Fe 蛋白与 Fe 蛋白组成的, 二者同时合成。这两种蛋白只有按一定的比例同时存在时才表现出固氮活性^[2]。在固氮酶的分离提取过程中, 由于经过加热等步骤, 这两种组分的回收率不能反映两者在天然状况下的比例关系。我们采用单向定量免疫电泳的方法, 确定了无细胞提取物中固氮酶 Mo·Fe 蛋白与 Fe 蛋白的分子比, 并对天然状况下的功能单位进行了讨论。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

实验中所用棕色固氮菌为 *Azotobacter vinelandii* U_w。

(二) 分析方法

固氮酶的分离提纯结晶等方法均按过去所报

道的方法^[3], Mo·Fe 蛋白抗血清的制备、纯化按以前所用的方法^[4], Fe 蛋白抗血清的制备、纯化与 Mo·Fe 蛋白抗血清的制备纯化相同。蛋白浓度测定用双缩脲法^[5], 聚丙烯酰胺圆盘电泳参考 Davis 等人的方法^[6], 乙炔还原活性测定参考 Hardy 等人的方法^[7]。固氮酶 Fe 蛋白的提纯, 是经过二次 DEAE 纤维素柱层析后, 用超滤浓缩, 再经过 Sephadex-G100 凝胶过滤提纯^[8], 其均一性用聚丙烯酰胺电泳检查。经过此方法提纯的 Fe 蛋白是比较纯的, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳柱上主要集中在一条带上。

(三) 标准曲线的制作

1. Mo·Fe 蛋白与 Fe 蛋白抗体琼脂板的制备: 取纯化后的 Mo·Fe 蛋白抗体与 Fe 蛋白抗体各 0.15 毫升, 分别加入 2% 琼脂糖溶液 7.5 毫升, 在 50℃ 混合, 立即倾入 6×8 厘米的玻璃片上, 分别制成含有 Mo·Fe 蛋白抗体和 Fe 蛋白抗体的琼脂板。

2. 琼脂凝固后, 用 3 毫米的钢管打孔, 孔间距 5 毫米, 根据需要来确定打孔数。然后将抗体琼脂板放入电泳仪内, 用滤纸与电极槽连接。电极槽缓冲液为 0.05 M、pH 8.6 的巴比妥缓冲液。

3. 接通电源, 开始加入标准抗原。标准抗原分别用二倍稀释法稀释成所需浓度。加样过程在

本文于 1980 年 4 月 10 日收到。

本工作得到宣武医院盛树力大夫的指导和本所李佳格先生修改稿件, 特此致谢。

低压下进行。每孔加抗原量 10 微升,使其抗原液面与琼脂板面平,用微量注射器加样。

4.开始电泳,在我们的条件下,电压升到 40 V,电流为 120 mA,时间为 4 小时。共做 6 个板。随着条件的不同,电泳的时间可具体选择,但必须以电泳出的锥形沉淀峰顶端清晰且呈“火箭形”为适宜,否则直接影响定量结果。

5.关闭电源,取下琼脂板,放入 0.85% 的生理盐水中浸泡 3 天,中间换几次。

6.干燥、染色、脱色方法同前^[4]。

7.测定沉淀峰高度,以标准抗原蛋白含量为横座标,沉淀峰高度为纵座标,绘制标准曲线。

8.测定粗提物中的固氮酶两个蛋白组分。测定在纯化后的抗体琼脂板上,即 Mo·Fe 蛋白抗体琼脂板与 Fe 蛋白抗体琼脂板上电泳出的锥形沉淀峰的高度,再从标准曲线中找出相对抗原含量的绝对值。

结 果

(一) 标准抗原 Mo·Fe 蛋白结晶溶液标准曲线

实验过程中所用之标准抗原均具有乙炔还原活性。不同浓度的标准抗原 Mo·Fe 蛋白结晶在相应的抗体琼脂板上电泳出的锥形沉淀峰与抗原、抗体二者的浓度比有关。我们选定的抗体稀释度,是用 2% 的琼脂糖 7.5 毫升,加入纯化后的抗体 0.15 毫升,充分混合后倾入 6×8 厘米的玻璃片上。在这种条件下,多次重复实验结果表明,标准抗原 Mo·Fe 蛋白结晶的浓度范围,在 0.07 γ /10 微升—0.57 γ /10 微升之间为直线关系,大于 0.57 γ 的浓度则呈曲线关系,整个曲线表现出“半抛物线形”,定量选择的是在直线形这一范围内。图版 I-1 即是不同浓度的标准抗原 Mo·Fe 蛋白结晶在相应的抗体琼脂板上电泳出的锥形沉淀峰一例,蛋白浓度与峰高的关系见表 1。

(二) 标准抗原 Fe 蛋白标准曲线

表 1 标准抗原 Mo·Fe 蛋白结晶浓度与峰高的关系*

	孔 号	标准抗原 Mo·Fe 蛋白结晶加入量 (γ)	峰 高 (厘米)
纯 Mo·Fe 蛋白抗体琼脂板	1	0.07	0.3
	2	0.14	0.4±0.1
	3	0.28	0.8±0.1
	4	0.57	1.5±0.1
	5	1.13	2.3±0.1
	6	2.26	3.1±0.2
	7	4.5	顶端界限不清

* 表中所列出的数据为 4 次实验的平均值,± 表示标准偏差。

纯化后的 Fe 蛋白具有乙炔还原活性。电泳出现的锥形沉淀峰与抗原、抗体的比例及电泳的时间有关。实验结果表明,选择的标准抗原 Fe 蛋白的浓度在 0.08 γ —0.63 γ 之间,则标准曲线的斜率最大。这斜率最大的区域也是我们定量选择的区域。当标准抗原的浓度大于 0.63 γ 时,则呈曲线关系,但浓度超过 1.25 γ 时,锥形沉淀峰的顶端界限不清楚或不出现沉淀线。整个曲线表现出“半抛物线”形。电泳的时间为 4 小时。这个时间随抗原、抗体的比例不同而不同。不同浓度的标准抗原 Fe

表 2 标准抗原 Fe 蛋白浓度与峰高的关系*

	孔 号	标准抗原 Fe 蛋白加入量 (γ)	峰 高 (厘米)
纯 Fe 蛋白抗体琼脂板	1	0.08	1.3
	2	0.16	1.6±0.1
	3	0.31	2.0±0.1
	4	0.63	2.7±0.1
	5	1.25	3.4±0.2
	6	2.5	顶端界限不清

* 表中所列出的数据为 4 次实验的平均值,± 表示标准偏差

蛋白在相应的抗体琼脂板上电泳出的锥形沉淀峰见图版 I-2。标准抗原 Fe 蛋白的浓度与峰高的关系见表 2。

(三) 固氮酶中 Mo·Fe 蛋白与 Fe 蛋白在粗提物中的比例

1. 无细胞粗提物在纯 Mo·Fe 蛋白抗体琼脂板上进行单向定量免疫电泳, 结果见图版 I-3, 蛋白浓度与峰高的关系见表 3。

表 3 蛋白浓度与峰高的关系

	孔号 位置	加入蛋白 量 (r)	峰 高 (厘米)	相对于标准 曲线上的蛋白含 量 (r)
纯 Mo·Fe 蛋白抗体琼 脂板	1	7	1.0	0.35
	2	7	1.0	0.35
	3	0.28	0.7	0.24
	4	1.13	2.3	1.10

从上表中可以看出, 无细胞粗提物的蛋白浓度是 7 r, 其中约含 Mo·Fe 蛋白 0.35 r。

2. 无细胞粗提物在纯 Fe 蛋白抗体琼脂板上进行单向定量免疫电泳, 其结果见图版 I-4, 蛋白浓度与峰高的关系见表 4。

表 4 蛋白浓度与峰高的关系

	孔号 位置	每孔加入蛋白 量 (r)	峰高 (厘米)	相对于标准 曲线上的蛋白含 量 (r)
纯 Fe 蛋白 抗体琼脂板	1	7	2.4	0.48
	2	7	2.4	0.48
	3	0.08	1.1	0.07
	4	0.3	2.0	0.34

从表 4 中可以看出, 无细胞粗提物蛋白浓度 7 r, 其中含 Fe 蛋白约 0.48 r。

3. 如果 Mo·Fe 蛋白分子量以 25 万计^[9], Fe 蛋白分子量以 6 万计^[9], 将粗提物中固氮酶 Mo·Fe 蛋白含量与 Fe 蛋白含

量换算成分子比, Mo·Fe 蛋白: Fe 蛋白 = $\frac{0.35}{25} : \frac{0.48}{6} = 1.4 : 8 \approx 1 : 6$, 即 Mo·Fe 蛋白分子: Fe 蛋白分子 $\approx 1 : 6$, 多次重复的实验结果为 1:6—1:8。

(四) 无细胞粗提物的凝胶电泳扫描

为了确定无细胞粗提物中固氮酶二个组分之间的分子比, 我们曾采用凝胶电泳扫描的方法, 结果见图版 I-5 和图 1。图版 I-5 为无细胞粗提物的聚丙烯酰胺圆盘电泳, 图 1 为凝胶电泳扫描结果。从图版 I-5 可以看出, 粗提物在聚丙烯酰胺圆盘电泳上出现 20—30 个区带, 除了固氮酶的两个蛋白组分外, 粗提物中尚有多种其它杂蛋白, 相互干扰较大, 直接用光密度计扫描不能给出固氮酶两个蛋白组分的定量关系。因此, 用这种方法确定粗提物中固氮酶两个蛋白组分的比例有困难。

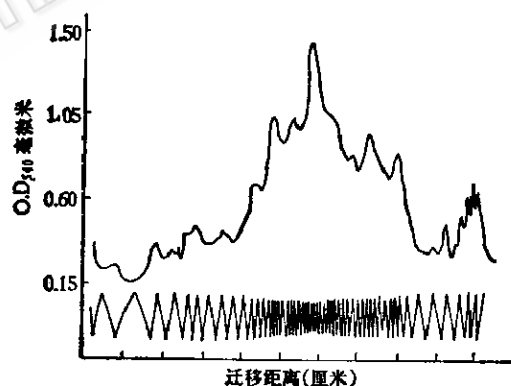


图 1 用氨基黑染色的无细胞粗提物聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图谱

讨 论

从上面实验结果, 可以认为应用单向定量免疫电泳的技术, 可以鉴别和测定棕色固氮菌无细胞粗提物中的固氮酶两个蛋白组分的比例关系。这是目前用凝胶电泳扫描或蛋白组分回收等方法难以达到的。

上述结果还表明固氮酶组分 I 与组分

II 分子比是 1:6—1:8。以前曾有人报道过固氮酶组分 I 与组分 II 是以 1:2 分子比组成功能单位^[1] (复合体), 这是指经过分离提纯后的固氮酶两个蛋白组分而言的。如果这个论点成立, 那么在天然状况下存在过量的组分 II 的作用如何解释呢? 有可能过量的组分 II 有利于电子的驱动。不能排除和抗体发生作用的组分 II 并不都是有活性的, 如可能存在无活性的组分 II 的前体蛋白。

无细胞粗提物经过 60℃ 加热处理以除去杂蛋白, 其固氮酶的两个组分都有相当可观的损耗 (大致 60—70%)。从制备提纯固氮酶的角度, 为了提高得率, 这一处理步骤有必要加以改进。另一方面, 虽然固氮酶是一个热稳定酶, 但是正如一些人曾提出过^[10,11], 在好气性棕色固氮菌中, 固氮酶是一种微粒, 与细胞的膜结合, 因此, 也就有可能, 在加热处理过程中随同膜蛋白一起沉淀。但也有人认为, 经过超声波处理后, 固氮酶是可溶性的^[12]。关于棕色固氮菌中固氮酶在生物膜上的定位问题还

有待于用其它方法进一步加以判明。

参 考 文 献

- [1] Laurell, C. B.: *Anal. Biochem.*, 15: 45—52, 1966.
- [2] Dalton, H. et al.: *Bact. Rev.*, 36(2): 231—260, 1972.
- [3] 中国科学院植物研究所七室: *植物学报*, 15(2): 281—284, 1973 年.
- [4] 顾天青、王继文: *生物物理与生物化学进展*, 1: 48—50, 1980.
- [5] Layne, E.: *Methods in enzymology* Vol. III, Eds. S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Acad. Press, N. Y. 1957, p. 450.
- [6] Davis, L. C. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 256: 521—523, 1972.
- [7] Hardy, B. W. F. et al.: *Plant Physiol.*, 43: 1185—1207, 1968.
- [8] Shah, V. K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 305: 445, 1973.
- [9] Bulen, W. A. *Proceedings of the 1st. International Symposium on Nitrogen Fixation*, Vol. I, Newton, W. E. and Nyman, C. J., Washington State University Press, pp. 177—186.
- [10] Bulen, W. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 17: 265—277, 1964.
- [11] Hardy, B. W. F. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 132: 520—531, 1966.
- [12] Oppenheim, J. et al.: *Jour. Bact.*, 101: 292—296, 1970.

MOLECULAR RATIO DETERMINATION OF THE TWO COMPONENTS OF NITROGENASE IN CELL-FREE EXTRACT FROM *AZOTOBACTER VINELANDII* BY ONE-DIMENSIONAL QUANTITATIVE IMMUNOELECTROPHORESIS

Gu Tianqin Wang Fazhu

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing*)

Molecular ratio of the two components of nitrogenase in cell-free crude extract from *Azotobacter vinelandii* was determined by means of one-dimensional quantitative immunoelectrophoresis. Based on the molecular weight of 250,000 for component I (Mo-Fe protein) and 60,000 for component II (Fe protein), respectively, a molecular ratio of 1:6—1:8 for

the two components was obtained. Both components were significantly damaged by approximately the same percentage (60—70%) resulting from 60°C heat treatment of the crude extract. In order to obtain higher yield of this enzyme preparation, omission of heat treatment procedure should be taken into consideration.