

棕色固氮菌固氮酶钼铁蛋白的不同聚合态*

林永齐 马 翥 刘东波

(吉林大学分子生物学系, 长春)

棕色固氮菌中固氮酶钼铁蛋白的研究报道很多。1973年 Shah 等首次分离到了结晶钼铁蛋白^[1], 测得分子量为 225,000 道尔顿^[2], 每分子由四个亚基组成 (α_2, β_2), α, β 亚基分子量分别为 60,000 和 50,000 左右^[3]。每个四聚体分子含有 2 个铁钼辅因子 ($FeMoCo$)^[4] 和四个铁硫原子簇^[5]。至于钼铁蛋白是否存在具有活性的其它聚合形式报道极少。

1976 年上海植物生理研究所曾报道钼铁蛋白存在二聚体^[6]。1975 年沈阳林业土壤研究所发表了钼铁蛋白的电子显微镜照片^[7], 对照照片显微分析后, 我们认为钼铁蛋白存在比四聚体更大的分子。因此, 我们认为钼铁蛋白可能存在不同的聚合态。

材料和方法

棕色固氮菌(沈-230)的培养在摇瓶中进行。培养基为修改的 Burk's 培养基, pH7.2-7.4, 培

养温度为 30℃。

结晶钼铁蛋白的获得按稍加改进的 Shah 方法, 铁钼辅因子的提取按本室方法^[8,9]进行。

钼、铁含量的测定分别采用二硫酚法^[10]和邻菲罗啉法^[11]。

不同聚合态的电泳分离和鉴定用无氧聚丙烯酰胺凝胶电泳。用二硫酚进行钼染色。用邻菲罗啉和 α, α -联吡啶进行铁染色。蛋白质显色用考马氏亮兰 G250。电泳区带扫描在日立 CS-910 薄层扫描仪上进行。

蛋白质分子量测定: 用 Sephadex G-200 柱层析方法进行测定。柱规格为 2.5 × 76cm, 用 0.025mol/L 的 Tris-HCl (pH 7.2) 缓冲液 (内含 0.15mol/L NaCl 和 0.25mg/ml 的 $Na_2S_2O_4$) 洗脱。

蛋白质亚基的分离及分子量测定用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法。

固氮酶活力测定用乙炔还原方法。

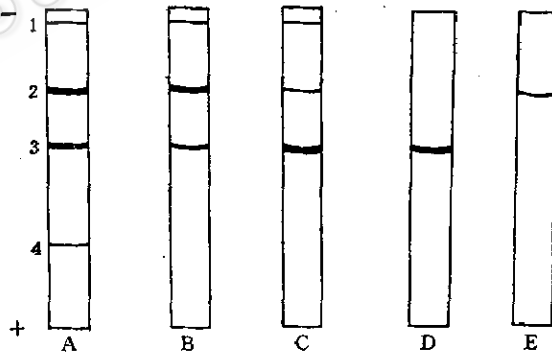


图1 不同聚合态钼铁蛋白电泳图谱
A. 无细胞提取液; B. 0.15 mol/L NaCl 洗脱液; C. 0.25 mol/L NaCl 洗脱液;
D. 结晶 MoFe 蛋白; E. 八聚体 MoFe 蛋白

结果和讨论

(一) 棕色固氮菌中钼铁蛋白不同聚合态的存在与分离

将固氮菌用超声波破碎细胞后, 用 0.025 mol/L Tris-HCl (pH7.2) 缓冲液抽提, 用无氧聚

丙烯酰胺凝胶电泳进行分析, 用二硫酚试剂对含钼的蛋白进行特异性染色, 发现四条含钼的区带。

本文于 1986 年 9 月 3 日收到。

* 孔威、施一荣、刘春和王菲同志参加部分研究工作。

区带 1 分子量很大,几乎不能进入胶中,区带 4 分子量较小。区带 3 相当结晶钼铁蛋白位置(图 1)。

将无细胞提取液用 DEAE-纤维素柱进行分离,先用 0.025mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.2) 洗脱。再用 0.025mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.2, 内含 0.15mol/L NaCl 的溶液) 洗脱,最后用内含 0.25mol/L NaCl 的上述缓冲液洗脱。收集 0.15mol/L NaCl 溶液洗脱部分,并超滤浓缩至含 40mg/ml 蛋白以上。再用 Sephadex G-200 柱分离,柱规格及洗脱条件同分子量测定(以上操作均在无氧条件下进行)。分离得到两个含钼的蛋白质(图 2)。第一峰相当电泳区带 2,第二峰相当电泳区带 3。电泳检查两个峰虽含有少量杂蛋白,但杂蛋白不含钼。

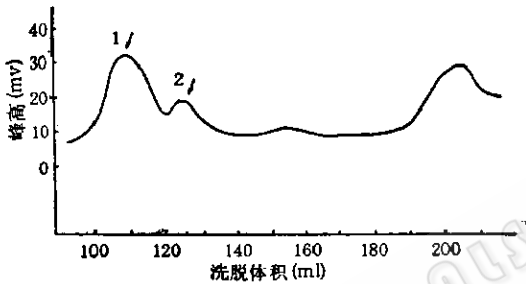


图 2 不同聚合态钼铁蛋白 Sephadex G-200 柱层析
1.八聚体; 2.四聚体

经进一步电泳提纯,得到两种不同聚合态的钼铁蛋白。

(二) 不同聚合态钼铁蛋白的性质

1.固氮酶活性: 将提纯后的区带 2 和 3,分别与单独无活性的铁蛋白组合,测定乙炔还原活性。区带 2 比活性为 $50 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1}$,区带 3 为 $300 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1}$ 。

2.不同聚合态的分子量与亚基组成: 用 Sephadex G-200 凝胶过滤柱层析法测定区带 2 和区带 3 的分子量(图 3)。得到区带 2 的分子量为 450,000。区带 3 的分子量为 220,000,与结晶钼铁蛋白相同。因此认为区带 3 为四聚体,是固氮酶钼铁蛋白的主要部分,而区带 2 是八聚体。

用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定这两种聚合态的亚基组成和分子量,证实四聚体和八聚体都是由两种亚基组成。两种亚基分子量分别为 60,000—62,000 和 51,000—54,000 道尔顿(图

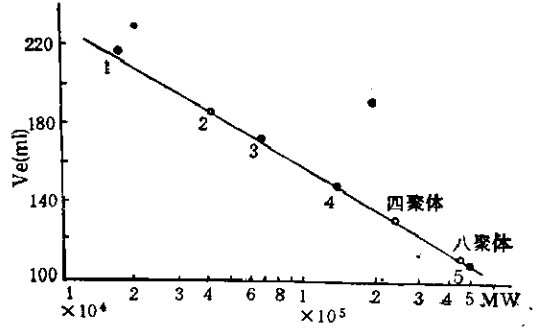


图 3 凝胶过滤法测定区带 2 及区带 3 的分子量
1.肌红蛋白(18,800); 2.过氧化物酶(40,500);
3.牛血清白蛋白(BSA)单体(67,000); 4.BSA
二聚体(134,000); 5.高铁铁蛋白(440,000)

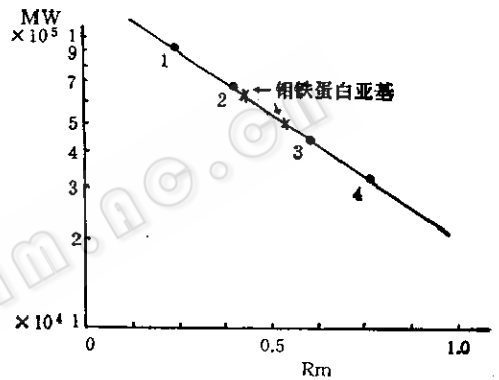


图 4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测
定亚基分子量

- 1.磷酸化酶(92,500); 2.BSA 单体(67,000);
- 3.卵清白蛋白(45,000); 4.大豆胰蛋白酶抑制剂(21,500)

4)。

3.四聚体、八聚体及结晶钼铁蛋白的金属组成和铁钼辅因子: 金属组成列入表 1(每 mol 蛋白所含金属的原子数)。如果分子量均按 225,000 计算,几种形式的钼铁蛋白中钼的含量相似,均为每分子两个左右。而铁含量均较结晶钼铁蛋白低,这可能是由于不同聚合态的提纯步骤较多,造成铁硫原子簇的损失。

表 1 四聚体、八聚体和结晶钼铁蛋白的金属组成比较

钼铁蛋白	八聚体	四聚体	结晶
分子量	450,000	220,000	225,000
蛋白质:Mo: Fe(mol 之比)	1:4.4:40	1:1.6:17	1:2:32

用本室提取铁钼辅因子 (FeMo-co) 的方法

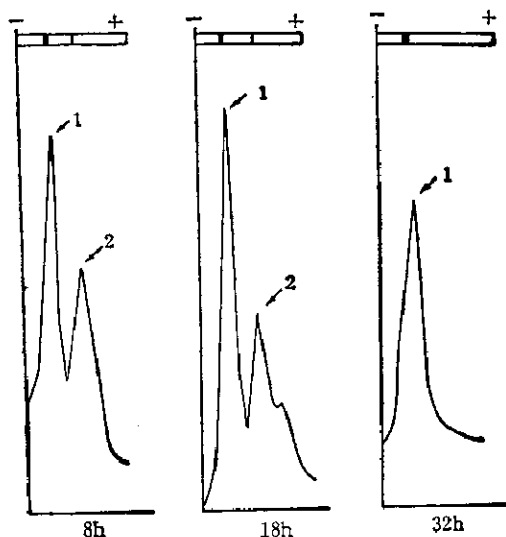


图5 不同培养时间的固氮菌提取液中八聚体与四聚体含量比较
1.八聚体; 2.四聚体

从两种不同聚合态钼铁蛋白分子中得到了 FeMo-co 。 FeMo-co 中的钼铁比分别为: 八聚体中为 1:9.9, 四聚体中为 1:7.9, 结晶中为 1:7.9—8.4。可以说它们所含 FeMo-co 也相似。

我们认为固氮酶钼铁蛋白八聚体可能是由两个四聚体组成。关于两种聚合态关系的研究正在进行中。

三、固氮菌在不同生长期固氮酶活性变化及钼铁蛋白不同聚合态的变化

将棕色固氮菌在不同培养时间 8 小时、18 小

时(对数期)、32 小时(老化)取样,破碎细胞,得到固氮酶提取液。分别测定乙炔还原活性,8 小时培养其活性为 $50 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1}$, 18 小时培养为 $31 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1}$, 32 小时培养为 $7 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg 蛋白}^{-1}$ 。说明菌体老化后活力下降。与此同时用电泳法测定四聚体和八聚体含量的变化(图 5)。发现随着菌体老化,八聚体增加,四聚体减少。这种变化的生理意义正在研究中。

参 考 文 献

- [1] Shah, V. K. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 305: 445, 1973.
- [2] 林永齐等: 吉林大学自然科学学报, 3: 82, 1977.
- [3] Swisher, R. H. et al.: *Biochem. J.*, 163: 427, 1977.
- [4] Zimmermann, B. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 537: 185, 1978.
- [5] Kurtz, D. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 4986, 1979.
- [6] 上海植物生理研究所固氮组: 生物化学与生物物理学报, 8: 161, 1976.
- [7] 沈阳林业土壤研究所固氮组: 科学通报, 20: 337, 1975.
- [8] 周 慧等: 吉林大学自然科学学报, 4: 96, 1984.
- [9] 吉林大学化学系固氮组: 吉林大学自然科学学报, 4: 73, 1978.
- [10] Bulen, W. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 56: 979, 1966.
- [11] Massey, V. et al.: *J. Biol. Chem.*, 293: 763, 1957.