

棕色固氮菌过氧化物酶研究*

马 轟

(空军航空医学研究所, 北京 100036)

林 永 齐

(吉林大学分子生物学系, 长春 130021)

从具有固氮能力的棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 中首次分离纯化到一种高活性过氧化物酶。此酶分子量为 150000 道尔顿, 由两个分子量相同的亚基组成。卟啉铁为其活性辅基。圆二色性谱表明酶分子中含有 30% 左右的 α -螺旋。

该酶最适 pH 6.0, 最适温度 37℃, 在 55℃ 迅速失去活性。此酶具有特殊的催化活性, 在没有电子供体时, 可催化单一底物—— H_2O_2 分解, 即同时具有过氧化氢酶活性。以 H_2O_2 为底物的动力学研究发现其具有别构酶特征, 这在催化细胞内 H_2O_2 分解时具有特殊的生理意义。

用纯酶进行防氧保护酶与固氮酶组合实验, 发现防氧酶系对防止 H_2O_2 和 O_2 对固氮酶的损伤有显著保护作用。

关键词 棕色固氮菌; 过氧化物酶; 固氮酶

过氧化物酶是生物化学家研究最早的酶之一。先后在植物、动物、微生物中发现并进行了提纯、结构、酶动力学、作用机理及应用研究^[1-4]。研究表明, 不同来源的过氧化物酶在分子量、分子结构、理化性质、催化功能等方面差别很大。但是, 大部分分子中都含有铁卟啉辅基。由于应用前景较广阔, 近年来该酶的研究愈加被科学家所重视。

我们已报道过棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 中固氮酶活性与过氧化氢酶 (CAT)、过氧化物酶 (POD)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性有密切的相关性^[5-6]。并认为与固氮酶的防氧保护有关。关于固氮放线菌 (*Frankia*) 中的 SOD、POD、CAT 活性与固氮酶活性有密切相关性虽有报道^[7], 但未对纯酶进行研究。本文对棕色固氮菌中的过氧化物酶进行了提纯, 并研究了性质及其在固氮酶防氧保护中的作用。

材料与 方法

(一) 材料

1. 棕色固氮菌由中国科学院沈阳应用生态所提供(发酵罐生产)。
2. DEAE-纤维素 (DEAE-52) 购自 Whatman 公司; Sephadex G-200、DEAE-Sephadex A-50 购自 Pharmacia 公司; Bio-Gel P 300、Bio-Gel P 200 购自美国伯乐公司; 载体两性电解质为 Pharmacia 产品。

本文于 1990 年 9 月 3 日收到。

* 本课题为国家自然科学基金资助。

郭振男同志参加部分工作。

3. 主要仪器: 全套低温层析系统(瑞典 LKB 产品); J2-21M 高速冷冻离心机(美国贝克曼公司产品); UV-250 紫外、可见分光光度计(日本岛津产品); Jasco-50 型圆二色谱仪(日本分光产品); CS-910 型薄层扫描仪(日本岛津产品)。

(二) 方法

1. 固氮酶、过氧化物酶、过氧化氢酶活力测定与文献[6]相同。
2. 蛋白质分子量测定: (1) 垂直板型聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳^[6]; (2) Sephadex G-200 柱层析法^[9]。
3. 酶纯度鉴定采用聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳^[6]和等电聚焦电泳^[10]。
4. 蛋白质亚基的拆离与分子量测定用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[11]。
5. 酶的等电点测定用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳法^[10]。
6. 紫外、可见吸收光谱用 UV-250 型分光光度计测定。
7. 圆二色光谱用 Jasco-50 型圆二色谱仪测定, 用多聚赖氨酸和多聚谷氨酸为标准样, 然后计算未知样的 α -螺旋度。

结果与讨论

(一) 棕色固氮菌(AV-230)中过氧化物酶(POD)的分离、提纯

1. 无细胞提取液的制备: 100g 菌糊加 100 ml pH 7.2 的 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液。用超声波破碎细胞 30 分钟。高速离心得提取液。

2. 鱼精蛋白去核酸: 向提取液中加入鱼精蛋白(按总蛋白量的 2% 加入), 调 pH 7.0—7.2, 搅拌 30 分钟, 离心去掉核酸-鱼精蛋白复合物沉淀, 保留上清液。

3. 硫酸铵分级: 向上清液中加入硫酸铵使达到 30% 饱和度, 沉淀杂蛋白, 离心去除。向上清液中加入硫酸铵达到 50% 饱和度, 放置过夜, 离心得到酶沉淀。将酶用 pH 7.2 的 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液溶解, 并对此缓冲液透析去除硫酸铵。

4. 离子交换层析分离: 将透析后酶液加到 DEAE-52 离子交换纤维素柱上 (25 × 3cm), 然后分别用含 0.05、0.1、0.15 和 0.3 mol/L 乙酸钠的 0.025 mol/L pH 7.2 Tris-HCl 缓冲液进行阶段洗脱。收集用 0.15 mol/L NaAc 洗下来的有 POD 活性部分。

将收集部分用蒸馏水稀释一倍, 上 DEAE-Sephadex A-50 柱 (15.3 × 2.5 cm), 然后用含乙酸钠的连续梯度的 pH 7.2 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液进行洗脱(乙酸钠浓度从 0.05 mol/L—0.6 mol/L), 收集活性峰。

5. 分子筛层析: 将前面收集的有 POD 活性部分超滤浓缩至 50 mg/ml 蛋白。先后用 BIO-Gel P 300 柱 (98 × 3.0 cm)、Sephadex G-200 柱 (116 × 1.5 cm)、BIO-Gel P 200 柱 (65 × 1.0cm) 进行三次提纯, 进行下一次柱层析之前均需将样品浓缩。洗脱液为 0.025 mol/L pH 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液, 收集活性峰。经以上提纯过程得到聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦电泳纯的过氧化物酶。提纯结果见表 1。

(二) 过氧化物酶的理化性质

1. 纯度、分子量及其亚基组成: 将前述提纯得到的酶溶液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳和等电聚焦电泳后用考马斯亮蓝进行蛋白质染色, 凝胶上均显现单一的蛋白带, 说明此酶为电泳均一的酶制剂。将电泳凝胶和等电聚焦凝胶用 CS-910 型双波长薄层扫描仪在

表 1 棕色固氮菌中过氧化物酶的提纯

Table 1 Purification of the peroxidase from Av-230

分离步骤 Procedure	酶溶液体积 Volume (ml)	蛋白浓度 Concentration (mg/ml)	总活力 Total act. (u)	比活力 Sp. act. (u/mg)	提纯倍数 Purification fold	收率 Recovery (%)
无细胞提取液 Crude extract	200.0	49.0	176600	18.0	1	100
硫酸铵分级 (NH ₄) ₂ SO ₄ fraction	327.0	15.2	513100	103.2	5.7	291
DEAE-52 柱 DEAE-52 Cellulose	85.0	4.7	216700	544.7	30.3	123
凝胶过滤 DEAE-Sephadex A-50	31.0	5.3	124700	766.3	42.6	71
Bio-Gel P 300	20.0	1.9	94340	2476.1	137.6	58
Sephadex G-200	17.5	0.74	87760	6777.0	376.5	50
Bio-Gel P 200	12.5	0.72	64450	7211.2	400.7	36

620 nm 处扫描,结果表明,其纯度在 98% 以上(图 1)。用 pH 3—9 的载体两性电解质做等电聚焦电泳,将电泳后的凝胶条精密切割,浸出两性电解质,精密测定 POD 等电点为 3.5。

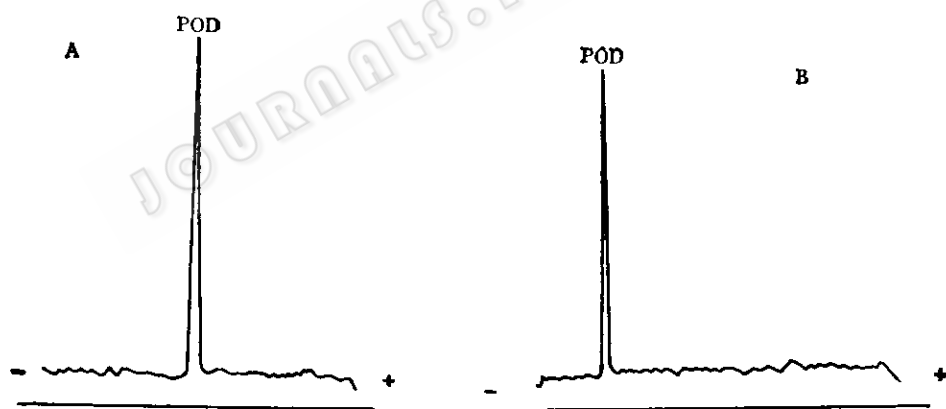


图 1 POD 酶的纯度鉴定

Fig. 1 Identification of POD purity

A: POD 聚丙烯酰胺凝胶电泳胶条扫描(620nm) Scanning of purified POD in polyacrylamide gel
B: POD 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳胶条扫描(620 nm) Scanning of purified POD in PIEF

用聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳测定酶蛋白分子量,用蛋白质的分子量对数对各标准蛋白质的相对迁移率作图,从标准曲线上查得 POD 的分子量为 155000 道尔顿。使用 Sephadex G-200 柱层析测定分子量,以标准蛋白分子量的对数对洗脱体积作图,从标准曲线上查得 POD 分子量为 150000 道尔顿(图 2)。

用 SDS 和巯基乙醇将 POD 亚基拆离,并用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定亚基分

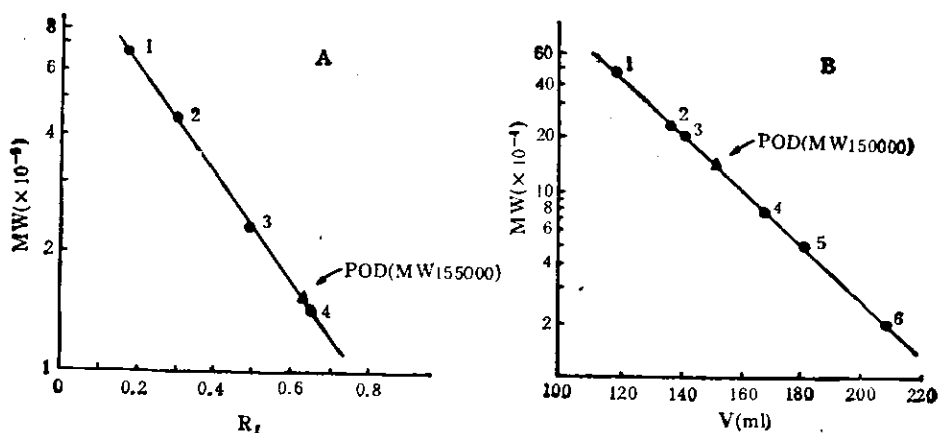


图 2 POD 酶分子量的测定

Fig. 2 Determination of the molecular weight of POD

A: 聚丙烯酰胺梯度电泳测分子量

Molecular weight of POD by gradient polyacrylamide gel electrophoresis

标准蛋白分子量

Molecular weight of standard protein:

1. 甲状腺球蛋白 Thyroglobin (MW 669000)

2. 铁蛋白 Ferritin (MW 440000)

3. 过氧化氢酶 Catalase (MW 232000)

4. 乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase (MW 140000)

B: Sephadex G-200 测定 POD 分子量

Molecular weight of POD by Sephadex G-200

标准蛋白分子量

The molecular weights of standard proteins:

1. 肌红蛋白 Myoglobin (MW 18800)

2. 清蛋白 Albumin (MW 45000)

3. 牛血清白蛋白 Bovine serum albumin (MW 68000)

4. 牛血清白蛋白三聚体 Bovine serum albumin trimer (MW 205000)

5. 过氧化氢酶 Catalase (MW 235000)

6. 铁蛋白 Ferritin (MW 450000)

子量,电泳图谱上为一条区带,以标准蛋白质的分子量的对数对相对迁移率作图,从标准曲线上查得 POD 的亚基分子量为 75000 道尔顿,说明该酶是由两个相同的亚基组成的(图 3)。

2. 过氧化物酶的紫外、可见吸收光谱及圆二色光谱: 紫外、可见吸收光谱用 UV-250 分光光度计测定(图 4)。从图可见,在 220 nm、280 nm 有强的吸收,为肽键和氨基酸侧基吸收。在 405 nm、556 nm 和 635 nm 有三个吸收峰为卟啉铁的特征吸收。将酶用硫代硫酸钠还原后,卟啉铁中的铁由 Fe^{3+} 变为 Fe^{2+} ,吸收光谱在可见区的吸收峰向短波移动。以上结果说明该酶与其它来源的酶相似,以卟啉铁为辅基。

用 Jasco-50 型圆二色谱仪测圆二色谱(见图 5)用波长 222 nm 处的 $[\theta]$ 值计算该酶分子的 α -螺旋含量为 32.8%。

(三) 过氧化物酶的生化性质

1. 酶的最适温度和热稳定性: 将酶液和底物同时在不同温度下保温 30 分钟,在此温

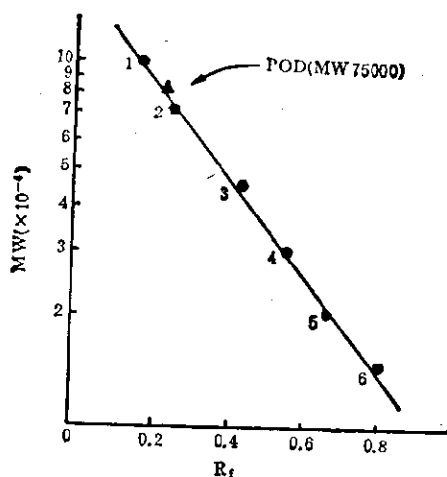


图3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 POD 的亚基分子量

Fig. 3 Subunit molecular weight of POD by SDS polyacrylamide gel electrophoresis

标准蛋白分子量

The molecular weights of standard proteins:

1. 磷酸化酶 Phosphorylase (MW 94000)
2. 牛血清白蛋白 Bovine serum Albumin (MW 68000)
3. 卵清蛋白 Ovalbumin (MW 43000)
4. 碳酸酐酶 Carbonic anhydrase (MW 30000)
5. 胰蛋白酶抑制剂 Trypsin inhibitor (MW 20100)
6. α-乳清蛋白 α-Lactalbumin (MW 14400)

度下测定过氧化物酶活性, 用比活性对温度做图求出最适温度为 37℃。

将酶液在 55℃ 加热 5 分钟后, 立即降低温度到 37℃, 测定酶活性, 结果酶全部失去活性。在室温放置 48 小时, 在 37℃ 下测定酶活性没有明显改变。

2. 酶的最适 pH 值: 将酶溶解在不同 pH 的缓冲液中与不同 pH 下的底物在 20℃ 分别保温 20 分钟, 然后将相同 pH 的酶与底物迅速混合测定活性。用酶的比活性对 pH 值作图, 测得最适 pH 为 6.0。

3. 酶动力学研究: 我们发现电泳纯的过氧化物酶具有催化 H_2O_2 为单一底物反应的功能。

反应体系使用 pH 7.2 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液, 酶浓度为 3.73 n mol/L。反应速度对底物浓度作图为一 S 型曲线。用 Hill 法作图为一 直线 (见图 6)。从以上两图中得出 $K'_i = 1.61 \times 10^{-7}$ mol/L, $K_m = 9.0 \times 10^{-4}$ mol/L, $V_m = 1.34 \times 10^3$ u/mg, 单位时间酶催化 H_2O_2 分解的转换数为 2.0×10^3 /min。说明 POD 具有别构酶特征。

(四) 防氧保护酶体系细胞外组合

根据固氮酶和防氧酶的性质设计组合实验。这些性质是: (1) 棕色固氮菌无细胞提取液对氧不敏感; (2) 55℃ 加热 5 分钟后的无细胞提取液对氧敏感; (3) 固氮酶 55℃ 加热 5 分钟不失活; (4) SOD 55℃ 加热 5 分钟不失活; (5) 过氧化物酶 55℃ 加热 5 分钟后全部失去活性。根据这些性质, 我们采用 55℃ 加热 5 分钟后的固氮菌无细胞提取液做为固氮酶的原液 (酶 1) 来研究提纯的过氧化物酶对氧和过氧化氢损伤固氮酶的保护作

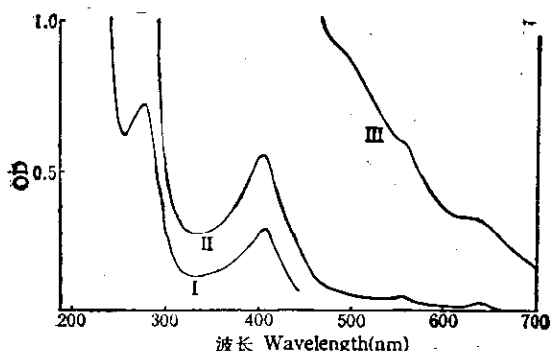


图 4 POD 的紫外、可见吸收光谱

Fig. 4 The UV-absorption spectrum of POD

The enzyme concentration:

I: 0.5mg/ml; II: 1.0 mg/ml; III: 5.0mg/ml

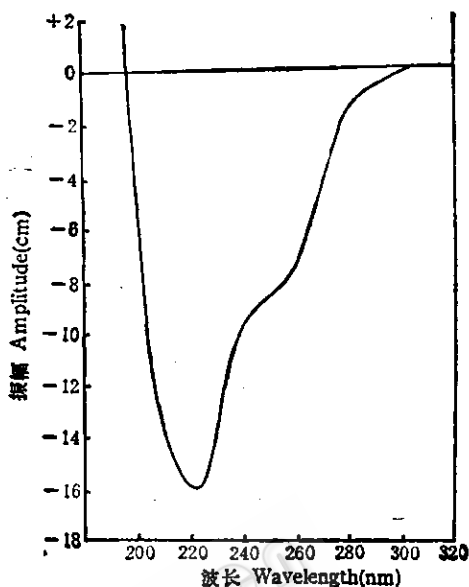


图 5 POD 的圆二色光谱

Fig. 5 The CD-spectrum of POD

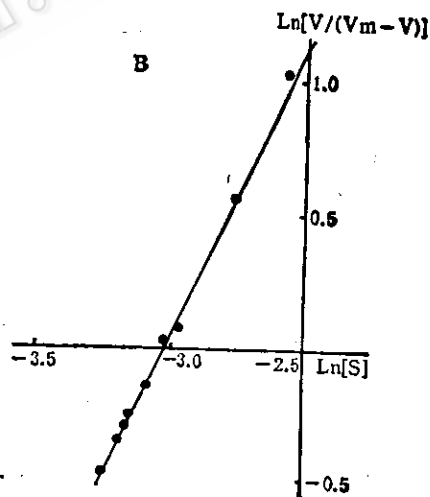
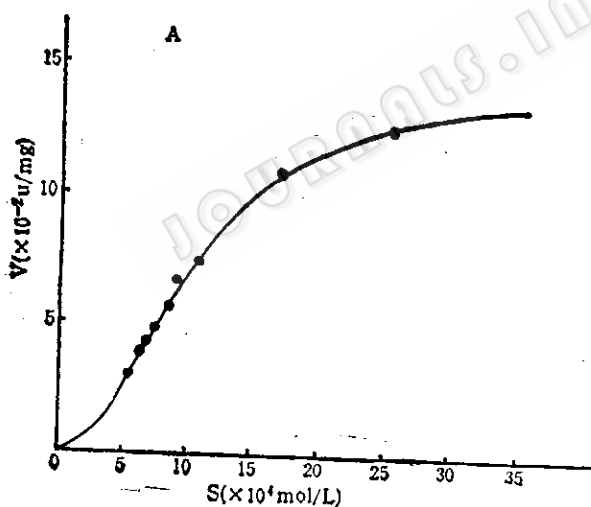


图 6 POD 酶的动力学

Fig. 6 Kinetics of POD

A: POD 酶动力学 V-S 曲线

The POD substrate concentration curves;

B: POD 酶动力学 Hill 作图

The $\text{Ln}[V/(V_m - V)]$ to $\text{Ln}[S]$ plot for POD

用。

在酶 1 中加入 1 ml 浓度为 250 $\mu\text{g/ml}$ 的 POD, 30 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 分钟, 再加入 10 μl 5% H_2O_2 或爆氧两分钟后测定酶 1 的固氮酶活性。参比中用 1 ml pH 7.2 的 0.025 mol/

表2 保护酶对 O_2 、 H_2O_2 造成固氮酶失活的保护作用Table 2 O_2 -Protect enzymes prevent H_2O_2 , O_2 from damage of nitrogenase

反应体系 Cat. system	1ml 酶1+1ml 磷酸缓冲液 1ml Enzyme 1 +1 ml PB	1ml 酶1+1ml 磷酸缓冲液 1ml Enzyme 1 +1 ml PB	1ml 酶+1ml 磷酸缓冲液 1ml Enzyme +1 ml PB	1ml 酶1+1ml POD 1ml Enzyme 1 +1 ml POD	1ml 酶1+1ml POD 1ml Enzyme 1 +1 ml POD
处理过程 Pretreated procedure	/	10 μ l 5% H_2O_2	O_2 2min	10 μ l 5% H_2O_2	O_2 2min
保留固氮酶活性 Residual Nase act.	100%	59.0%	38.4%	90%	65.5%

L 磷酸盐缓冲液代替 POD。结果见表 2。

讨 论

在棕色固氮菌中存在着三种以上的过氧化物酶同工酶。该酶在分子量、亚基组成,特别是酶学性质方面与其它来源的过氧化物酶有很多不同。

该酶具有过氧化物酶活性,同时又能催化过氧化氢自身歧化分解,即具有过氧化氢酶活性。酶动力学研究表明,当以过氧化氢为单一底物时,该酶表现出别构酶性质。当过氧化氢浓度低时,该酶的催化活性并不高;而当过氧化氢浓度达到临界状态稍有增加时,该酶催化过氧化氢分解的速度迅速增加。该性质在于固氮菌消除自身代谢产生的过氧化氢,从而保护了固氮酶不受损伤。

该酶是以卟啉铁为辅基,这与其它过氧化物酶和过氧化氢酶相似,其催化过氧化氢分解 $K'_m = 1.61 \times 10^{-7}$ mol/L, 转换数 2×10^5 /min, 说明该过氧化物酶对过氧化氢有很高的亲合力。这一点在其发挥生物学功能方面可能是非常重要的。该酶同时具有过氧化物酶活性和过氧化氢酶活性,与大肠杆菌中发现的过氧化物酶有相似之处^[11]。

在固氮菌过氧化物酶分离纯化过程中,发现硫酸铵分级沉淀对酶进行粗提时,酶的总活性高于无细胞提取液,我们用无细胞提取液对蒸馏水直接透析,除去小分子后酶活性也相应提高,这说明硫酸铵分级时除去的成分中存在对过氧化物酶有抑制作用的小分子物质。

防氧酶系与固氮酶组合实验证明,过氧化氢、分子氧在没有过氧化物酶存在时,均造成固氮酶失活。当加入过氧化物酶后,固氮酶的失活减少,特别是对过氧化氢造成的失活,可以保护 90% 以上的固氮酶活性。这些结果直接证明氧和固氮菌在代谢过程中产生的活性氧对固氮酶有损伤作用。而 POD、SOD 和 CAT 能迅速排除氧和过氧化氢对保护生物固氮正常进行起着非常重要的作用。其它研究者所提出的保护机理^[12]我们认为与此机理不相矛盾,固氮菌中固氮酶的防氧保护应该是多层次的。

参 考 文 献

- [1] Brunori, M. et al.: *Methods Enzymol.*, 105: 22—35, 1984.
- [2] Roberts, J. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256: 2118—2121, 1981.
- [3] Hanson, L. K. et al.: *J. Amer. Chem. soc.*, 103: 663—670, 1981.

- [4] Khan, A. U. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**: 5195—5197, 1983.
- [5] 马 彪等: 吉林大学自然科学学报, **3**: 123—124, 1987。
- [6] 林永齐等: 微生物学报, **29**(6): 439—443, 1989。
- [7] Steele, D. B. et al.: *Can. J. Microbiol.*, **32**: 409—413, 1986.
- [8] 张龙翔等: 生化实验方法和技术, p. 112—119, 人民教育出版社, 北京, 1982。
- [9] 吉林大学化学系固氮组: 吉林大学自然科学学报, **3**: 82—85, 1977。
- [10] 蔡武城等: 生物化学实验技术教程, p. 8—20, 复旦大学出版社, 上海, 1987。
- [11] Claiborne, A. I. et al.: *J. Biol. Chem.*, **254**: 4225—4252, 1979.
- [12] Gallon, J. R.: *TIBS.*, **6**: 19—23, 1981.

STUDIES ON THE PEROXIDASE FROM *AZOTOBACTER VINELANDII*-230

Ma Biao

(Institute of Aviation Medicine, Beijing 100036)

Lin Yongqi

(Department of Molecular Biology, Jilin University, Changchun 130021)

The peroxidase from *Azotobacter vinelandii*-230 was purified. Its molecular weight is 155000 dalton. The result of SDS-gradient gel electrophoresis demonstrated that the peroxidase is constructed by two same subunits with molecular weight 75000 dalton. The CD spectrum showed that the enzyme consists of 30% α -helix. The Visible-ultraviolet spectrum of it showed three intense absorption at 405nm, 556nm, 630nm. This spectrum has the characteristics of porphyrins. The iso-electric point of it is pH 3.5. The optimum pH is 6.0. The optimum temperature is 37°C.

The enzyme has a special catalytic activity. When there is not any electron-donor, it can catalyze decomposition of H_2O_2 , O_2 . It has catalase activity. Studies on kinetics of catalytic reaction with only one substrate- H_2O_2 exhibited that the enzyme is a allosteric enzyme.

We reconstructed the system of nitrogenase and O_2 -protect enzymes and found that O_2 -protect enzymes can prevent H_2O_2 , O_2 from damage of nitrogenase O_2 -protect enzymes can protect activity of Nitrogenase in atmosphere or H_2O_2 -solution.

Key words

Azotobacter vinelandii; Peroxidase; Nitrogenase