

酒色着色菌内膜系统光依赖性同化亚硒酸钠 为硒半胱氨酸的研究*

王梦亮 金小弟

(山西大学生命科学系 太原 030006)

郭小青 齐延兵

(山西大学高新技术总公司生物工程实验室 太原 030006)

摘 要 分离的酒色着色菌(*Chromatium vinosum*)内膜系统在光照和 O-乙酰丝氨酸(OAS)存在的条件下,能以 359 纳摩尔/毫克细菌叶绿素·小时($\text{nmol} \cdot \text{mgBchl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)的速度催化 SeO_3^{2-} 合成硒半胱氨酸。用超声波处理的内膜系统,催化速度仅为处理前的 1.1%,加入谷胱甘肽(GSH)和还原型辅型 II (NADPH)后,其速度增加至处理前的 88.3%,该反应对光具有依赖性,进一步实验表明,纯化的谷胱甘肽还原酶,在有半胱氨酸合酶、OAS 和 NADPH 共存时,能催化 SeO_3^{2-} 转化为硒半胱氨酸,表明 SeO_3^{2-} 在内膜系统中能被光偶联的谷胱甘肽还原酶还原为 Se^{2-} ,然后经半胱氨酸合酶的催化作用转化为硒半胱氨酸。

关键词 酒色着色菌,内膜系统,光同化作用,亚硒酸钠,硒半胱氨酸

分类号 TQ922 **文献标识码** B **文章编号** 0001-6209(1999)03-0255-59

有关植物和微生物同化 SeO_3^{2-} 的机理有不少报道,1978 年,Ng B H 从植物中分离纯化了半胱氨酸合酶(Cysteine synthase),该酶对 SeO_3^{2-} 的亲合力远大于 S^{2-} ,并能将 SeO_3^{2-} 转化为硒半胱氨酸(Selenocysteine)^[1]。由于植物能利用 SeO_3^{2-} 合成多种硒氨基酸(Selenoaminoacid)^[2~4],表明植物体内有一个将 SeO_3^{2-} 还原为 Se^{2-} 的酶系存在。早在 1963 年,Kemp 等研究了 *E. coli* 的硫酸盐还原酶还原 SeO_3^{2-} 的过程^[5],其结果表明,该酶还原 SeO_3^{2-} 的速度为还原 SO_4^{2-} 的 10 倍。1979 年,Ng B H 等^[6]系统的研究了三叶草叶绿体同化 SeO_3^{2-} 的过程,至此,植物对 SeO_3^{2-} 的同化有了明确的结果。Heieh and Ganther^[7]利用纯化的酵母 GSH 还原酶在有 NADPH 和 GSH 存在下,催化 SeO_3^{2-} 还原为 Se^{2-} ,然后合成各种硒氨基酸,得出了一个酵母同化 SeO_3^{2-} 的理论模式。1997 年,作者曾报道了酒色着色菌利用 SeO_3^{2-} 合成四种硒氨基酸的研究^[8],本文在此基础上较系统地研究了酒色着色菌内膜系统光依赖性同化 SeO_3^{2-} 合成硒半胱氨酸的全过程,并对其机理进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 菌种

酒色着色菌是由山西大学生命科学系提供,培养条件见参考文献[8]。

1.2 内膜系统

* 太原市科委启明星计划资助课题

收稿日期:1997-09-18,修回日期:1997-12-05

菌体培养至 OD_{680} 为 1.0 时, 5000r/min 离心收集菌体, 并用 10mmol/L 的 Tris-HCl pH7.5 的缓冲液洗涤菌体 3 次, 按 Mary 方法^[9] 分离内膜。所得样品含完整内膜系统 82%, 其余 18% 为碎片, 样品含细菌叶绿素量为 164 μ g/mL。

1.3 半胱氨酸合酶

按 Ng B H 等^[10] 方法从酒色着色菌中分离, 测定其酶活, 粗酶提液活性为 0.029u/mg, 经过热处理 (55 $^{\circ}$ C, 2min)、 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀 (33% ~ 55%), 及 DEAE-cellulose 和 Sepharose 2B 柱层析纯化, 使其相对纯度达 79.3%, 所得样品酶活为 2.3u/mg。

1.4 GSH 还原酶

1.3 中分离得到的酶为半胱氨酸合酶与 GSH 还原酶的混合物, 取上述混合物的一半, 在 -15 $^{\circ}$ C 下冷藏 2 周, 其中半胱氨酸合酶的酶活仅为 0.1u/mg, 该样品采用文献[6]中的方法测定 GSH 还原酶的比活性为 9.3u/mg。

1.5 方法

1.5.1 酒色着色菌内膜系统光同化 SeO_3^{2-} 为硒半胱氨酸: 将 pH7.6 的 45 μ mol/L HEPES 的缓冲液, 10 μ mol/L OAS, 0.5 μ mol/L SeO_3^{2-} 与 1mL 分离的内膜系统混合, 30 $^{\circ}$ C 下孵育 30min, 光照强度为 3000Lx, 反应结束后用 0.1mol/L 的 N-乙酰马来酰亚胺 (NEM) 乙醇溶液 0.2mL 终止反应, 检测其中硒半胱氨酸含量。

1.5.2 GSH 还原酶和半胱氨酸合酶系统对 SeO_3^{2-} 的同化: 将分离得到的酶液各取 1mL, 用 N_2 在 35 $^{\circ}$ C 下处理 20min, 加入 10 μ mol/L OAS, 4 μ mol/L NADPH, 0.5 μ mol/L SeO_3^{2-} 及 100 μ mol/L 磷酸缓冲液 pH7.8, 反应 30min, 用 0.1mol/L NEM 的 80% 的乙醇溶液 0.2mL 终止反应, 检测其中硒半胱氨酸的含量。

1.5.3 硒半胱氨酸的测定: 反应液用纸层析进行分离, 展开剂为丁醇: 吡啶: 水 (1:1:1), 取 R_f 为 0.37 的斑点按文献[1]方法进行洗脱, 分光光度法测定。

1.5.4 硒测定采用 2,3-二氨基萘荧光法。

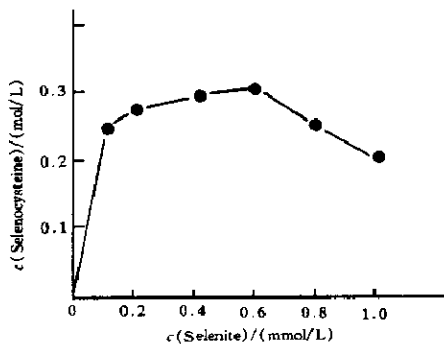


图 1 亚硒酸钠浓度对硒半胱氨酸合成的影响

Fig. 1 Effect of Na_2SeO_3 on selenocysteine synthesis

呈线型上升, 本文取 0.5mmol/L 作为内膜系统同化 SeO_3^{2-} 的最佳浓度。

2.2 内膜系统光同化 SeO_3^{2-} 为硒半胱氨酸

2 结果

2.1 SeO_3^{2-} 浓度对内膜系统同化 SeO_3^{2-} 为硒半胱氨酸的影响

分别取不同浓度的 SeO_3^{2-} 与内膜系统和 OAS 的混合液共同温育 30min, 反应应用 NEM 终止, 测定其中硒半胱氨酸含量, 结果见图 1。

图 1 结果表明, Na_2SeO_3 浓度对内膜系统光同化 SeO_3^{2-} 合成硒半胱氨酸有很大的影响, 在 0~0.1mmol/L 范围内随着 SeO_3^{2-} 浓度的增大, 硒半胱氨酸的合成量

内膜系统在不同的条件下光同化 SeO_3^{2-} 为硒半胱氨酸的结果见表 1。

表 1 光照的完整内膜系统同化 SeO_3^{2-} 为硒半胱氨酸

Table 1 Incorporation of SeO_3^{2-} into selenocysteine by illuminated intact chromatophore

处理孵育条件 Treatment incubation conditions	硒半胱氨酸合成 Selenocysteine synthesized /($\text{nmol} \cdot \text{mgBchl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	相对合成量 Relative synthetic volume/ %
完全混合液* Complete mixture	359	100
完全混合液无光 Complete mixture minus light	4	1.1
完全混合液无 OAS Complete mixture minus OAS	0	0
完全混合液加二氯苯二甲脒(DCMU)2 $\mu\text{mol/L}$ Complete mixture plus DCMU 2 $\mu\text{mol/L}$	18	5.0

*完全混合液的孵育条件按方法 1.5.1 中所述。

Incubation conditions for the complete mixture were described in method 1.5.1

表 1 结果表明, OAS 和光是内膜系统同化 SeO_3^{2-} 为硒半胱氨酸的必备条件, 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCMU 可以抑制该反应。

将分离的内膜系统用超声波处理破碎, 其碎片同化 SeO_3^{2-} 为硒半胱氨酸的结果见表 2。

表 2 超声波处理的内膜系统同化 SeO_3^{2-} 为硒半胱氨酸

Table 2 Incorporation of SeO_3^{2-} into selenocysteine by sonicated chromatophore

处理孵育条件 Treatment incubation condition	硒半胱氨酸合成 Selenocysteine synthesized /($\text{nmol} \cdot \text{mgBchl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	相对合成量 Relative synthetic volume/ %
完全混合液* Complete mixture	4	1.1
完全混合液加 GSH(4/ $\mu\text{mol/L}$) Complete mixture plus GSH(4/ $\mu\text{mol/L}$)	169	47
完全混合液加 GSH(4/ $\mu\text{mol/L}$)和 NADPH(2 $\mu\text{mol/L}$) Complete mixture plus GSH(4/ $\mu\text{mol/L}$) and NADPH (2 $\mu\text{mol/L}$)	317	88.3
完全混合液加 GSH(4 $\mu\text{mol/L}$)和 NADPH(2 $\mu\text{mol/L}$)无光 Complete mixture plus GSH(4 $\mu\text{mol/L}$) and NADPH (2 $\mu\text{mol/L}$) minus light	235	65
完全混合液加 GSSG(4 $\mu\text{mol/L}$)和 NADPH (2 $\mu\text{mol/L}$) Complete mixture plus GSSG (4 $\mu\text{mol/L}$) and NADPH (2 $\mu\text{mol/L}$)	219	61.0
完全混合液加 GSSG(4 $\mu\text{mol/L}$)和 NADPH (2 $\mu\text{mol/L}$)无光 Complete mixture plus GSSG (4 $\mu\text{mol/L}$) and NADPH (2 $\mu\text{mol/L}$) minus light	203	56.5

*完全混合液孵育条件按方法 1.5.1 中所述, 其中内膜系统用超声波处理。

Incubation conditions for the complete mixture were described in method 1.5.1 in which chromatophore were treated with ultrasonic wave.

表 2 结果表明, 超声波破碎的内膜系统, 几乎不能同化 SeO_3^{2-} , 加入 GSH 和 NADPH 后, 其 SeO_3^{2-} 转化为硒半胱氨酸的反应速度达完整内膜系统的 88.3%, 该反应体系对光的依赖性明显小于完整的内膜系统, 加入 GSSG 和 NADPH, 其 SeO_3^{2-} 转化为硒半胱氨酸的速度恢复至完整内膜系统的 61%。

2.3 GSH 还原酶和半胱氨酸合酶对 SeO_3^{2-} 转化为硒半胱氨酸的影响

按照方法 1.5.2 中所述的混合体系作为完全混合液,在不同的条件下进行 SeO_3^{2-} 转化为硒半胱氨酸的研究,其结果见表 3。

表 3 GSH 还原酶和半胱氨酸合酶系统催化 SeO_3^{2-} 合成硒半胱氨酸

Table 3 Incorporation of SeO_3^{2-} into selenocysteine by GSH reductase and cysteine synthase enzyme system.

处理孵育条件 Treatment incubation condition	硒半胱氨酸合成 Selenocysteine synthesized /($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ incubation mixture)	相对合成量 Relative synthetic volume/ %
完全混合液 Complete mixture	24.7	100
完全混合液无 OAS Complete mixture minus OAS	0	0
完全混合液无 GSH Complete mixture minus GSH	0	0
完全混合液无半胱氨酸合酶 Complete mixture minus cysteine synthase	0.3	1.2
完全混合液无谷胱甘肽还原酶 Complete mixture minus GSH reductase	7.4	38
完全混合液无 NADPH Complete mixture minus NADPH	2.7	10.9
完全混合液中加入 GSSG($2\mu\text{mol/L}$)代替 GSH Complete mixture but with GSSG($2\mu\text{mol/L}$) in place of GSH	8.9	36

表 3 结果表明, GSH 还原酶与半胱氨酸合酶偶联系统能在有 OAS、GSH 和 NADPH 存在的条件下催化同化 SeO_3^{2-} 为硒半胱氨酸, 在无 OAS 和 GSH 时, 反应几乎停止, 在无 NADPH 时, 反应产物只是完全混合液的 10.9%, GSSG 可以部分取代 GSH 的作用, 但反应产物仅为完全混合液的 36%, 结果还表明, GSH 还原酶和半胱氨酸合酶只有在二者同时存在时, 才能较好地催化该反应, 缺少 GSH 还原酶时, 反应几乎停止, 缺少半胱氨酸合酶时, 其硒半胱氨酸的合成量仅为完全混合液的 1.2%。

3 讨论

完整内膜系统合成硒半胱氨酸需要 OAS 表明, 半胱氨酸合酶参与了该反应, 且硒是以 Se^{2-} 的形式被同化, 这一现象表明 SeO_3^{2-} 首先必须被还原为 Se^{2-} ; 由于半胱氨酸合酶是光依赖性的^[1,2], SeO_3^{2-} 转化为硒半胱氨酸需要光, 且该反应对 DCMU 敏感, 表明 SeO_3^{2-} 还原为 Se^{2-} 是同光合电子传递相偶联; 相对低浓度的 SeO_3^{2-} 就能引起快速的硒半胱氨酸合成, 表明 SeO_3^{2-} 的还原酶系和 Se^{2-} 同化酶系都与各自的底物有高度亲和力, 这与半胱氨酸合酶和 GSH 还原酶同 Se^{2-} 有高度亲和力是一致的^[1]。

超声波处理的内膜系统, 在 GSH、NADPH 和 OAS 存在时, 能以几乎同整体内膜系统相同的速度合成硒半胱氨酸, 这个反应很大程度上不依赖于光照, 表明光反应是产生 GSH 和 NADPH 的主要反应, 而 NADPH 和 GSH 可能是用于 SeO_3^{2-} 的还原, 这与植物光同化 SeO_3^{2-} 的机理相一致。

酵母同化 SeO_3^{2-} 的研究表明, 硒半胱氨酸的合成被偶联的酶系在无 GSH 还原酶存

在时,将出现非酶还原,在还原 SeO_3^{2-} 为 Se^{2-} 的过程中出现 GSSeSG 和 GSSeH 中间产物, Se^{2-} 将作为一个中间产物,半胱氨酸合酶可以抑制 Se^{2-} 向 Se^0 的转化,并能在有 OAS 存在的条件下合成硒光胱氨酸。本文研究表明:在偶联酶系中缺少 GSH 还原酶时,几乎不能合成硒半胱氨酸,说明酒色着色菌光同化 SeO_3^{2-} 同酵母不同,主要是依赖于 GSH 还原酶借助于光合电子传递而产生的 NADPH 来还原 SeO_3^{2-} 为 Se^{2-} ,然后借助于半胱氨酸合酶催化 Se^{2-} 与 OAS 生成硒半胱氨酸。

参 考 文 献

- [1] Ng B H, Anderson J W. *phytochemistry*, 1978, 17:2069.
 [2] Peterson P J, Bulter G W. *Aust J Biol Sci*, 1962, 15:126.
 [3] Virupaksha T K, Shrift A. *Biochim Biophys Acta*, 1965, 107: 69
 [4] Nigam S N, Mc connell W B. *phytochemistry*, 1973, 12:359.
 [5] Kemp J D, Atkinson D E, Ehrer A *et al.* *J Biol chem*, 1963, 238: 3466.
 [6] Ng B H, Anderson J W. *phytochemistry*, 1979, 18:573~580.
 [7] Hsieh H S, Ganther H E. *Biochemistry*, 14: 1632, 1975.
 [8] 王梦高,杨依廉,齐延兵等.军事医学科学院院刊,1997,21(1):77~79.
 [9] Mary L P C, Robert A N. *J Bacteriol*, 1976, 126(3): 1316~1324.
 [10] Ng B H, Anderson, J W. *phytochemistry*, 1978, 11:879.

LIGHT-DEPENDENT INCORPORATION OF SELENITE INTO SELENO-CYSTEINE BY ISOLATED CHROMATOPHORE OF *CHROMATIUM VINOSUM*

Wang Mengliang Jin Xiaodi

(Department of Life science of Shanxi University, Taiyuan 030006)

Guo Xiaoqing Qi Yianbin

(Biological engineering Laboratory of company of high new technology of Shanxi university, Taiyuan 030006)

Abstract Illuminated intact chromatophore of *chromatium vinosum* in the presence of O-acetylserine(OAS) catalysed incorporation of SeO_3^{2-} into selenocysteine at rate of $359 \text{ nmol} \cdot \text{mgBchl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Sonicated chromatophore catalysed SeO_3^{2-} incorporation at 1.1% of the rate of intact chromatophore. Addition of GSH and NADPH increased the rate to 88.3% of intact rate, but SeO_3^{2-} incorporation under these conditions was essentially light dependent. The purified GSH reductase from *Chromatium vinosum* in the presence of cysteine synthase OAs and NADPH catalysed incorporation of SeO_3^{2-} into selenocysteine. It is proposed that SeO_3^{2-} is reduced by light-coupled GSH reductase and that Se^{2-} produced is incorporated into selenocysteine by cysteine synthase.

Key words *Chromatium vinosum*, Chromatophore, Incorporation by light, Selenite, Selenocysteine