N₂和H⁺在固氮酶活性中心金属原子簇中 还原位点的分析

关 锋 赵德华 潘 淼 姜 伟 李季伦*

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 生物学院微生物与免疫学系, 北京 100094.

* 联系人, E-mail: jilunli@gmail.com, lijilun@cau.edu.cn)

摘要 目前研究表明, 固氮酶的生理底物氮气(N₂)和质子(H⁺)在钼铁蛋白中的铁钼辅因子(FeMo-co)上被还原, 但其确切的还原位点尚未确定. 对比分析了棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii*, Av)野生型(WT)与 5 种突变株(包括FeMo-co附近 2 个保守氨基酸 α -191^{Gln}和 α -195^{His}单突变菌株(Q α 191K和H α 195Q)、FeMo-co上钼原子相连的高柠檬酸突变株(*nifV*⁻)以及 α -191^{Gln}和 α -195^{His}与高柠檬酸的双突变菌株(Q α 191K/*nifV*⁻和H α 195Q/*nifV*⁻))固氮酶催化还原N₂和H⁺活性的变化, 结果表明, N₂在靠近FeMo-co中心硫原子(S2B)的Fe2 和Fe6 上络合和还原, FeMo-co上的钼原子是H⁺还原的位点. 结合生物信息学分析结果显示, [8Fe7S]和FeMo-co之间可能存在两条平行的电子传递通路.

关键词 *Azotobacter vinelandii*突变株 固氮酶 N₂和H⁺还原位点 电子传递通路

固氮酶体系包括两个蛋白组分: 钼铁蛋白和铁蛋白^[1,2]. 铁蛋白是钼铁蛋白的电子供体, 是由一个[4Fe-4S]簇桥联而成的 γ_2 型二聚体^[3,4]. 钼铁蛋白是一个 $\alpha_2\beta_2$ 型四聚体, 包含两个金属簇, 一个为[8Fe7S], 即P簇, 是电子传递的中间体^[1], 另一个为[Mo-7Fe-9S-X-高柠檬酸] (X代表未知原子), 称为FeMo-co, 是固氮酶的催化活性中心^[5-10].

近年来, 利用传统生物化学技术、理论计算和结构模拟等研究手段, 已提出多个固氮酶反应模型^[11,12]. 随着固氮酶三维结构的解析, 人们发现, FeMo-co周围的多肽环境与固氮酶的活性存在密切联系. 例如, Av钼铁蛋白中的 α -191^{Gln}与高柠檬酸的短羧基臂以氢键相连, 而高柠檬酸的长羧基臂则被周围丰富的水分子包围, 这些水分子可能为FeMo-co提供质子来源^[13]. 堆积在FeMo-co“腰部”的 α -195^{His}, 其咪唑基的 ϵ -N可以和FeMo-co的中心硫原子(S2B)形成氢键^[14], α -70^{Val}和 α -96^{Arg}靠近FeMo-co特定的铁-硫面^[15,16]. 这些结构上的特征暗示, FeMo-co周围的氨基酸残基参与了固氮酶还原不同底物的反应. 虽然现在仍不确定高柠檬酸和这些氨基酸残基如何与FeMo-co互相作用, 但通过分析突变钼铁蛋白的活性变化, 普遍认为高柠檬酸、 α -191^{Gln}和 α -195^{His}可能位于质子和电子进入底物还原位点的通路上, 而

α -69^{Gly}和 α -70^{Val}可能位于底物进入还原位点的入口处^[17-20].

尽管早已证实FeMo-co是固氮酶的活性中心^[21,22], 但固氮酶生理底物N₂和H⁺络合和还原的确切位点仍有分歧. 此外, 对固氮反应的准确计量式也存在着争议^[13,23]. 公认的反应计量式中, 每还原一分子氮气的同时释放一分子H₂, 即H₂/N₂ = 1; 而实际上, 即使在 50 个大气压的N₂中, 固氮反应中H₂/N₂仍然大于 1^[24]. 因此, 在固氮反应过程中, N₂和H₂的具体比例是研究固氮酶生化机制的另一个需要明确的问题.

本研究以棕色固氮菌为材料, 通过定点突变和基因替代技术, 对必需氨基酸残基 α -195^{Gln}和 α -191^{Lys}与编码高柠檬酸合成酶的基因*nifV*进行突变, 分别构建单突变和双突变菌株, 拟破坏钼铁蛋白中电子进入 FeMo-co 的可能入口, 分析突变株固氮酶催化N₂和H⁺还原活性的变化, 以期确定N₂和H⁺还原的位点.

1 材料和方法

() 菌株及突变株的构建. *A. vinelandii* 野生型菌株由本室保存. 突变株 Av DJ540 和 Av DJ71 分别由 D. R. Dean(弗吉尼亚理工大学, 美国)和 Paul Ludden 教授(加州大学伯克利分校, 美国)惠赠.

突变株 Av DJ191, Av 191V 和 Av 195V 的构建参考赵德华等人^[25]的报道: 将携带有突变靶位点的基因片段克隆至诱变质粒pALTER-1, 完成体外定点突变 (Altered Sites *in vitro* Mutagenesis Systems, Promega), 再将含突变位点的片段亚克隆至自杀载体pGPCm后, 与野生型菌株OP和突变株DJ71 的染色体进行同源交换. 经连续传代培养分别筛选交换正确的突变株, 最后经过测序验证. 实验菌株分别列于表 1.

() 菌株的培养和固氮酶的提取. 在 42 L 发酵罐上对各菌株进行培养、固氮酶的诱导和表达后^[18,26], 分别进行各固氮酶的提取和纯化^[26,27]. 所有钼铁蛋白经DEAE-52 离子交换柱和 Sephacryl S300 层析柱 (16 mm × 65 cm, LKB, 2137 Chromatography Column) 纯化, 铁蛋白经DEAE-52离子交换柱和制备电泳纯化.

() N_2 和 H^+ 还原反应. 反应在 10 mL 的血清瓶中进行^[26], 所用铁蛋白和钼铁蛋白的摩尔比为 20 : 1. 反应 15 min 后, 注入 0.2 mL 30% (体积比) 三氯乙酸中止反应以测定 H_2 的生成, 或注入 0.2 mL 0.5 mol/L EDTA 溶液 (pH 8.0) 中止反应以测定生成 NH_3 的量. H^+ 和 N_2 还原反应分别在 100% Ar , 100% N_2 和 90% $Ar + 10\% CO$ 中进行.

反应生成的 H_2 用SQ206 型气相色谱检测(TCD 检测器, 0.5 nm 分子筛, 北分SQ206, 北京); NH_4^+ 通过高效液相色谱测定(Waters 600E HPLC, 474 型荧光检测器)^[28].

2 结果

2.1 突变株的获得

本研究获得以下菌株: *nifD*-Q α 191K 单突变株 (Av DJ191), *nifV*::*Kan* 和 *nifD*-Q α 191K 双突变株 (Av 191V), Δ *nifV* 和 *nifD*-H α 195Q 双突变株 (Av 195V), 经测序证明, 3 个菌株目的位点突变成功, 没有引入其他位点的突变.

2.2 固氮酶纯化及其检测

野生型及突变株钼铁蛋白经纯化后, 在 SDS-PAGE 结果中显示出一致迁移率, 并证明了纯化后固氮酶各组分都没有单独的放氢活性. 实验中用于反应的铁蛋白的放氢活性为 $2200 \text{ nmol } H_2 \cdot \text{mg 蛋白}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

2.3 100% Ar 中各钼铁蛋白放氢活性的比较

如表 2 所示, 与野生型钼铁蛋白相比, α -191^{Lys} 和 NifV⁻ 钼铁蛋白的放氢活性分别下降至 8.7% 和 15.8%. 而 α -195^{Gln}/NifV⁻ 钼铁蛋白的放氢活性略高于 NifV⁻ 钼铁蛋白的活性, 表明 195 位组氨酸的突变与电子流的下降没有直接关系. α -191^{Lys}/NifV⁻ 钼铁蛋白的放氢活性只有野生型钼铁蛋白的 2%, 明显低于 α -191^{Lys} 钼铁蛋白的活性. 此结果暗示, α -191^{Gln} 对于电子传递可能有着重要作用.

2.4 100% N_2 中各钼铁蛋白催化活性的比较

从表 3 可以看到, 在 100% N_2 中, 野生型菌株钼

表 1 棕色固氮菌野生型及突变型菌株

菌株	相关基因型及描述	来源
Av OP	野生型(<i>nifD</i> α -191 ^{Gln} , α -195 ^{His})	本室保存
Av DJ191	<i>nifD</i> -Q α 191K 单突变株	本研究
Av DJ540	<i>nifD</i> -H α 195Q 单突变株	D. R. Dean 教授惠赠
Av DJ71	Δ <i>nifV</i>	Paul Ludden 教授惠赠
Av 191V	<i>nifV</i> :: <i>Kan</i> , <i>nifD</i> -Q α 191K 双突变株	本研究
Av 195V	Δ <i>nifV</i> , <i>nifD</i> -H α 195Q 双突变株	本研究

表 2 100% Ar 中野生型及突变株钼铁蛋白催化活性的比较^{a)}

钼铁蛋白	H^+ 还原活性/nmol $H_2 \cdot \text{mg 蛋白}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	电子数 ^{b)} /nmol $e^- \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	电子流百分比 ^{c)} (%)
WT	1464	2928	100
α -195 ^{Gln}	1097	2194	74.9
NifV ⁻	231	462	15.8
α -195 ^{Gln} /NifV ⁻	257	514	17.6
α -191 ^{Lys}	127	254	8.7
α -191 ^{Lys} /NifV ⁻	29	58	2

a) 表中各数据为两个平行重复研究结果的平均值; 各反应中钼铁蛋白的用量为 50 μg , 铁蛋白/钼铁蛋白比值为 20 : 1; b) 单位以 $\text{nmol } e^- \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示 ($3e^-/\text{NH}_3$, $2e^-/\text{H}_2$); c) 此列数值表示各突变型钼铁蛋白所用总电子数与野生型钼铁蛋白所用总电子数的百分比

表3 100% N₂中野生型及突变株钼铁蛋白催化活性的比较

钼铁蛋白	N ₂ 还原活性 ^{a)} /nmol NH ₃ · mg ⁻¹ · min ⁻¹	H ⁺ 还原活性 ^{a)} /nmol H ₂ · mg ⁻¹ · min ⁻¹	电子数/nmol e ⁻ · mg ⁻¹ · min ⁻¹	电子流百分比(%)
WT	495(63.5)	426(36.5)	2337	100
α-195 ^{Gln}	36(5.4)	937(94.6)	1982	84.8
NifV ⁻	108(52.8)	145(47.2)	614	26.3
α-195 ^{Gln} /NifV ⁻	0	124	248	10.6
α-191 ^{Lys}	0	87	174	7.4
α-191 ^{Lys} /NifV ⁻	0	0	0	0

a) 括号中的数值表示某一种产物所用电子占总电子流的百分比

铁蛋白 63.5%的总电子用于生成NH₃, 其余 36.5%用于放氢. α-195^{Gln}钼铁蛋白的总电子数中只有 5.4%的电子用于生成NH₃, 而 94.6%的电子都用于放氢. NifV⁻钼铁蛋白的总电子数下降至野生型钼铁蛋白总电子数的 26.3%, 其中 52.8%用来产生NH₃, 其余 47.2%用来放氢. 3 种突变株α-195^{Gln}/NifV⁻, α-191^{Lys}和α-191^{Lys}/NifV⁻钼铁蛋白消耗的总电子数分别下降至野生型钼铁蛋白总电子数的 10.6%, 7.4%和 0%. 其中 α-191^{Lys}钼铁蛋白的全部电子用来放氢, α-191^{Lys}/NifV⁻钼铁蛋白丧失了还原N₂和H⁺的能力. α-195^{Gln}/NifV⁻钼铁蛋白也丧失还原N₂的能力, 其放氢活性与NifV⁻钼铁蛋白放氢活性相当.

2.5 10% CO + 90% Ar 中各钼铁蛋白催化活性的比较

表 4 是在 10% CO + 90% Ar 中各钼铁蛋白催化活性的比较. 在 CO 存在时, 固氮酶所有的电子都将用于放氢. α-195^{Gln}钼铁蛋白的放氢活性略低于野生型钼铁蛋白, 受 CO 的影响不大. NifV⁻, α-191^{Lys}和 α-191^{Lys}/NifV⁻ 3 个突变型钼铁蛋白的放氢分别下降至野生型的 3.6%, 8.3%和 0%, 而双突变α-195^{Gln}/NifV⁻钼铁蛋白所用的总电子数多于上述 3 个菌株的固氮酶.

3 分析和讨论

Seefeldt 研究组^[29]证明了固氮酶中电子和质子的传递是偶联发生的. 为了计算方便, 本研究只以电子流

表示固氮酶活性的变化, 以分析电子进入 FeMo-co 活性位点的可能入口, 并推测电子的传递通路.

3.1 N₂和H⁺络合和还原的位点

现已证明, FeMo-co 上的中心铁原子是 N₂ 络合和还原的最适宜位点^[5,21,30]. 波谱学研究结果证实了 CO 可以络合到 FeMo-co 的中心铁原子上^[31,32], 抑制除 H⁺ 以外所有底物的还原. Seefeldt 等人^[12,19]提出, N₂ 和 C₂H₂ 或许在 FeMo-co 的 4Fe4S 面被还原(由 FeMo-co 上第 2, 3, 6, 7 位铁原子组成). 固氮酶晶体结构显示, α-195^{His} 可能与 4Fe4S 面上连接 Fe2 和 Fe6 的中间硫原子(S2B)形成氢键^[14], S2B 可能是底物还原所需的质子入口^[33]. 而 Fe2 和 Fe6 靠近 S2B, 推测 Fe2 和 Fe6 也许可以与 N₂ 形成桥联(Fe2—N=N—Fe6), N₂ 在此络合和被还原^[34]. 当 α-195^{His} 被突变为 Gln 后, 原有的 His 与 S2B 之间氢键被打断, 电子不能被有效地传递到 S2B, 因此导致 α-195^{Gln} 钼铁蛋白的固氮能力大大下降(表 3).

在 100% Ar 中, α-195^{His} 的替代几乎没有影响到总电子流的变化(表 2), 表明 H⁺ 和 N₂ 可能在 FeMo-co 上不同的位点络合和被还原. Liang 等人^[35]研究发现, 在固氮酶反应的前稳定期, H₂ 的生成量与钼原子数呈 1:1 的比例关系, 表明单独的放氢反应可能在钼原子发生, 固氮过程中此放氢反应持续进行.

本研究结果验证了上述假设, 当 FeMo-co 的钼原子周围的氨基酸残基发生突变, H⁺ 还原变得对 CO 敏感, 而柠檬酸替代高柠檬酸的突变, 钼铁蛋白(NifV⁻)也

表4 10% CO + 90% Ar 中野生型及突变株钼铁蛋白催化活性的比较

钼铁蛋白	H ⁺ 还原活性/nmol H ₂ · mg ⁻¹ · min ⁻¹	电子数/nmol e ⁻ · mg ⁻¹ · min ⁻¹	电子流百分比(%)
WT	1377	2754	100
α-195 ^{Gln}	1051	2102	76.3
NifV ⁻	49	98	3.6
α-195 ^{Gln} /NifV ⁻	114	228	8.3
α-191 ^{Lys}	45	90	3.3
α-191 ^{Lys} /NifV ⁻	0	0	0

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/CSB2007-52-10-1141>

呈现同样的结果. 然而, 这种CO抑制在 α -195^{Gln}钼铁蛋白中没有出现. 如前所述, CO可以络合在FeMo-co的中间铁原子上, 抑制了置换放氢反应. 在10% CO中, 如果 α -191^{Gln}或高柠檬酸发生突变, 电子不能被有效地传递到钼位, 导致了放氢能力的下降; α -195^{Gln}钼铁蛋白的钼位放氢没有受到影响, 而表现出与野生型相近的活性. 这也表明钼位是另一个不依赖于N₂的放氢位点, 并且钼位放氢不受CO抑制.

铁位和钼位对电子的竞争关系同样支持了这个双位点模型. 例如, 野生型钼铁蛋白用于还原N₂和C₂H₂的电子数分别占到总电子数的63.5%和69.7% (结果未显示), 表明铁位比钼位具有更强的竞争电子能力. 当 α -195^{His}发生突变后 (如 α -195^{Gln}和 α -195^{Gln}/NiFV⁻), 将影响到电子向铁位的传递, 使电子更多地用于放氢, 而总电子流下降的结果是由于电子传递速率下降所致^[14]. 此外, 100% N₂中195^{Gln}/NiFV⁻钼铁蛋白的放氢活性与10% CO中的放氢活性相近, 表明N₂和CO在铁位的络合而未被还原, 电子流速降低, 导致了相近的放氢活性. 因此推测 α -195^{His}是一个“调整开关”, 控制电子在这两个位点的分配, 而固氮酶的底物如N₂在控制电子的流向方面起着一定的作用.

基于上述讨论, 结合本实验室原来提出的双位点放氢模型^[36,37], 本研究明确提出FeMo-co上Fe2和Fe6是N₂络合和还原的位点 (N₂分子在两个铁原子的络合形式为Fe2—N=N—Fe6), 在此位点上每络合一分子N₂同时置换出一分子H₂, 这种放氢反应依赖于N₂, 受CO抑制; FeMo-co的钼原子是另一个独立的放氢位点, 不受CO抑制 (图1).

3.2 固氮酶的P簇和FeMo-co之间可能存在两条电子传递通路

FeMo-co上存在两个不同的底物还原位点, 意味

着P簇和FeMo-co之间可能存在两条电子传递通路分别为其提供电子^[13]. α -195^{His}骨架上的NH-基与 α -191^{Gln}主链上的C=O基团可以形成氢键; α -191^{Gln}侧链上的氧原子可以与 α -61^{Gly}骨架上的NH-基形成氢键, 而 α -61^{Gly}与连接于P簇的氨基酸残基 α -62^{Cys}紧密相连 (图2). Dean等人^[38]也证实棕色固氮菌钼铁蛋白保守的 α -62^{Cys}对于固氮酶的活性至关重要. 因此, α -191^{Gln}在电子从P簇到FeMo-co的氢键网络中, 扮演着重要的角色. 如表3所示, α -191^{Gln}的改变阻断了电子传递通路, 电子不能到达FeMo-co上的S2B, 直接导致了 α -191^{Lys}钼铁蛋白丧失了固氮能力.

结合McLean和Dixon等人^[39]的研究结果, 推测高柠檬酸的长羧基臂可能处于另一条电子传递通路上. 高柠檬酸的长臂端可以与某些氨基酸残基直接或通过水分子间接形成氢键, 在NiFV⁻钼铁蛋白中高柠檬酸长羧基臂缩短了一个亚甲基, 氢键作用被破坏, 因此表现出NiFV⁻固氮酶总电子流大大下降 (表2~4). 此外, 高柠檬酸长臂周围的氨基酸残基发生改变, 如 α -426^{Lys}被突变为Arg, 其突变钼铁蛋白表现出近似于NiFV⁻钼铁蛋白的特性^[40]. 这表明高柠檬酸的长臂及其周围的多肽环境在电子传递过程中也起着重要作用.

因此, 本研究假设: P簇和FeMo-co之间存在两条平行的电子传递通路 (图2), 其中一条为P簇→ α -62^{Cys}→ α -61^{Gly}→ α -191^{Gln}→ α -195^{His}→S2B, 电子最终从S2B进入FeMo-co用于固氮; 另一条由P簇出发, 经多个尚未确定的氨基酸残基形成的 α 螺旋、高柠檬酸的长臂进入FeMo-co的钼原子用于放氢. 而 α -191^{Gln}可以与高柠檬酸的短臂形成氢键, 从而将两条电子通路有机地联系起来.

通过生物信息学分析, α -191^{Gln}可以与 α -195^{His}及高柠檬酸的短羧基臂形成氢键, 处于电子传递通路

图1 固氮酶FeMo-co中还原N₂和H⁺的双位点模型

FeMo-co上的两个底物还原位点: ()铁位; ()钼位. 当有N₂存在时, 铁位进行持续的置换放氢反应, 钼位的放氢量等于4K_m(N₂)/pN₂; 当不存在N₂时, 放氢反应只在钼位上进行

图 2 P 簇和 FeMo-co 之间可能存在的两条电子通路

此图像为软件 Swiss-PDBViewer V3.7 SP5 分析 PDB 文件 2MIN 生成。其中，黑色虚线表示推测的不同电子传递通路；蓝色数字表示利用软件计算出的氢键的长度；铁、硫、碳、氮、氧和钼元素分别用绿色、黄色、灰色、蓝色、红色和红紫色表示

的“枢纽”位置，将两条电子传递通路连接起来，调节了电子在铁位和钼位的分配。当电子进入 FeMo-co 的两个重要中介， α -191^{Gln} 和高柠檬酸的长臂任何一个发生突变，将导致突变株钼铁蛋白总电子流下降到野生型钼铁蛋白电子数的 8.7%~15.4% (表 2)，当两个同时发生突变 (α -191^{Lys}/NifV⁻)，突变株钼铁蛋白的活性几乎全部丧失。

此外，Nyborg 等人 [41,42] 和 Lowery 等人 [43] 报道用非生理还原剂柠檬酸三钛 (Ti()) 和生理还原剂黄素氧还蛋白，分别在体外和体内可以将铁蛋白中 [4Fe4S] 簇还原至全亚铁态 [4Fe4S]⁰，揭示铁蛋白可以发生 [4Fe4S]²⁺/[4Fe4S]⁰ 氧化还原态的变化，并可能作为双电子供体参与固氮酶的反应，在固氮酶的构象翻转过程中，每次为钼铁蛋白提供两个电子。这从另一个角度支持了本研究两条电子传递通路的假设：固氮酶反应中，铁蛋白的 [4Fe4S] 每次传递给 P 簇两个电子，然后这两个电子可能分别在两条平行的通路上传递至 FeMo-co 的两个位点。

参 考 文 献

- Burris R H. Nitrogenases. J Biol Chem, 1991, 266(15): 9339—9342
- Burgess B K, Lowe D J. Mechanism of molybdenum nitrogenase.

Chem Rev, 1996, 96(7): 2983—3011 [DOI]

- Howard J B, Davis R, Moldenhauer B, et al. Fe:S cluster ligands are the only cysteines required for nitrogenase Fe-protein activities. J Biol Chem, 1989, 264(19): 11270—11274
- Georgiadis M M, Komiya H, Chakrabarti P, et al. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. Science, 1992, 257(5077): 1653—1659 [DOI]
- Kim J, Rees D C. Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. Science, 1992, 257(5077): 1677—1682 [DOI]
- Kim J, Rees D C. Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*. Nature, 1992, 360: 553—560 [DOI]
- Dean D R, Bolin J T, Zheng L. Nitrogenase metalloclusters: Structures, organization, and synthesis. J Bacteriol, 1993, 175(21): 6737—6744
- Mayer S M, Lawson D M, Gorma C A, et al. New insights into structure-function relationships in nitrogenase: A 1.6 Å resolution X-ray crystallographic study of *Klebsiella pneumoniae* MoFe-protein. J Mol Biol, 1999, 292(4): 871—891 [DOI]
- Yang T C, Laryukhin M, Lee H I, et al. The interstitial atom of the nitrogenase FeMo-cofactor: ENDOR and ESEEM evidence that is not a nitrogen. J Am Chem Soc, 2005, 127(37): 12804—12805 [DOI]
- Einsle O, Tezcan F A, Andrade S L, et al. Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: A central ligand in the FeMo-cofactor. Science, 2002, 297(5587): 1696—1700 [DOI]
- Rees D C. Great metalloclusters in enzymology. Annu Rev Biochem, 2002, 71: 221—246 [DOI]
- Igarashi R Y, Dos Santos P C, Niehaus W G, et al. Localization of a catalytic intermediate bound to the FeMo-cofactor of nitrogenase. J Biol Chem, 2004, 279(33): 34770—34775 [DOI]
- Rees D C, Howard J B. Nitrogenase: Standing at the crossroads. Curr Opin Chem Biol, 2000, 4: 559—566 [DOI]
- Kim C H, Newton W E, Dean D R. Role of the MoFe protein alpha-subunit histidine-195 residue in FeMo-cofactor binding and nitrogenase catalysis. Biochemistry, 1995, 34(9): 2798—2808 [DOI]
- Christiansen J, Cash V L, Seefeldt L C, et al. Isolation and characterization of an acetylene-resistant nitrogenase. J Biol Chem, 2000, 275(15): 11459—11464 [DOI]
- Benton P M, Mayer S M, Shao J, et al. Interaction of acetylene and cyanide with the resting state of nitrogenase alpha-96-substituted MoFe proteins. Biochemistry, 2001, 40: 13816—13825 [DOI]
- Scott D J, Dean D R, Newton W E. Nitrogenase-catalyzed ethane production and CO-sensitive hydrogen evolution from MoFe proteins having amino acid substitutions in an alpha-subunit FeMo cofactor-binding domain. J Biol Chem, 1992, 267(28): 20002—20010
- Fisher K, Dilworth M J, Newton W E. Differential effects on N₂ binding and reduction, HD formation, and azide reduction with alpha-195(His)- and alpha-191(Gln)-substituted MoFe proteins of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase. Biochemistry, 2000, 39: 15570—15577 [DOI]

- 19 Barney B M, Igarashi R Y, Dos Santos P C, et al. Substrate interaction at an iron-sulfur face of the FeMo-cofactor during nitrogenase catalysis. *J Biol Chem*, 2004, 279(51): 53621—53624[DOI]
- 20 Shah V K, Imperial J, Ugalde R A, et al. *In vitro* synthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(6): 1636—1640[DOI]
- 21 Shah V K, Brill W J. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74(8): 3249—3253
- 22 Hawkes T R, Lowe D J, Smith B E. Nitrogenase from *Klebsiella pneumoniae*. An EPR signal observed during enzyme turnover under ethylene is associated with the iron-molybdenum cofactor. *Biochem J*, 1983, 211: 495—497
- 23 Rees D C, Akif Tezcan F, Haynes C A, et al. Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*, 2005, 363: 971—984[DOI]
- 24 Simpson F B, Burris R H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science*, 1984, 224(4653): 1095—1097[DOI]
- 25 赵德华, 李季伦. 肺炎克氏杆菌固氮酶双突变株的构建及其对底物还原的特性. *科学通报*, 2004, 49(15): 1512—1518
- 26 Li J L, Burris R H. Influence of pN_2 and pD_2 on HD formation by various nitrogenases. *Biochemistry*, 1983, 22(19): 4472—4480[DOI]
- 27 Turner G L, Gibson A H. Measurement of nitrogen fixation by indirect means. In: Gergerson F J, ed. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. New York: John Wiley & Sons, 1980. 112—125
- 28 Corbin J L. Liquid Chromatographic-fluorescence determination of ammonia from nitrogenase reactions: A 2-Min Assay. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 47(5): 1027—1030
- 29 Lanzilotta W N, Christiansen J, Dean D R, et al. Evidence for coupled electron and proton transfer in the [8Fe-7S] cluster of nitrogenase. *Biochemistry*, 1998, 37(36): 11376—11384[DOI]
- 30 Chan M K, Kim J, Rees D C. The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 2.2 Å resolution structures. *Science*, 1993, 260(5109): 792—794
- 31 Lee H I, Hales B J, Hoffman B M. Metal-ion valencies of the FeMo cofactor in CO-inhibited and resting state nitrogenase by ^{57}Fe Q-band ENDOR. *J Am Chem Soc*, 1997, 119(47): 11395—11400[DOI]
- 32 Pickett C J, Vincent K A, Ibrahim S K, et al. Electron-transfer chemistry of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase: Delocalized and localized reduced states of FeMoco which allow binding of carbon monoxide to iron and molybdenum. *Chem Eur J*, 2003, 9(1): 76—87[DOI]
- 33 Durrant M C. Controlled protonation of iron-molybdenum cofactor by nitrogenase: A structural and theoretical analysis. *Biochem J*, 2001, 355: 569—576
- 34 Stiefel E I. The Mechanism of Nitrogen Fixation. In: Newton W E, ed. *Recent Development in Nitrogen Fixation*. London: Academic Press, 1977. 69—108
- 35 Liang J, Burris R H. Hydrogen burst associated with nitrogenase-catalyzed reactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(24): 9446—9450[DOI]
- 36 张振水, 吴柏和, 李季伦. 固氮酶催化的放 H_2 反应. *微生物学报*, 1993, 33: 320—330
- 37 Zhang Z S, Wu B H, Li J L. Mechanism of H_2 evolution by nitrogenase. In: Palacios R, Mora J, Newton W E, eds. *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1992. 154
- 38 Dean D R, Setterquist R A, Brigle K E, et al. Evidence that conserved residues Cys-62 and Cys-154 within the *Azotobacter vinelandii* nitrogenase MoFe protein alpha-subunit are essential for nitrogenase activity but conserved residues His-83 and Cys-88 are not. *Mol Microbiol*, 1990, 4(9): 1505—1512[DOI]
- 39 McLean P A, Dixon R A. Requirement of *nifV* gene for production of wild-type nitrogenase enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature*, 1981, 292: 655—656[DOI]
- 40 Durrant M C, Francis A, Lowe D J, et al. Evidence for a dynamic role for homocitrate during nitrogen fixation: The effect of substitution at the alpha-Lys426 position in MoFe-protein of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem J*, 2006, 397: 261—270[DOI]
- 41 Nyborg A C, Johnson J L, Gunn A, et al. Evidence for a two-electron transfer using the all-ferrous Fe protein during nitrogenase catalysis. *J Biol Chem*, 2000, 275(50): 39307—39312[DOI]
- 42 Nyborg A C, Erickson J A, Johnson J L, et al. Reactions of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase using $Ti()$ as reductant. *J Inorg Biochem*, 2000, 78(4): 371—381[DOI]
- 43 Lowery T J, Wilson P E, Zhang B, et al. Flavodoxin hydroquinone reduces *Azotobacter vinelandii* Fe protein to the all-ferrous redox state with a S=0 spin state. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(46): 17131—17136[DOI]