棕色固氮菌固氮酶的提纯及其某些性质研究*

吉林大学化学系固氮组

固氮菌固氮酶的研究, 对发展我国社会主义农业生产有着一定的意义。我们选取了本国“沈-230”棕色固氮菌作为研究对象。

自从 1960 年 Carnahan 等人^[1,2]成功地实现了对巴氏梭菌无细胞提取液的固氮之后, 固氮的生物化学发展很快。近几年来, 一些实验室用不同的方法已经得到了巴氏梭菌、棕色固氮菌和克氏肺炎杆菌的均一的固氮酶制剂, 并对其性质作了研究^[3-10]。同时对其固氮机理等问题也作了一些探讨^[11-16]。为了进一步研究固氮机理, 我们参考了 Burns 等人的工作^[3], 结合我们的工作做了一些改进, 对棕色固氮菌固氮酶进行了分离和提纯, 得到了一定纯度和活力的固氮酶。并对其某些性质作了初步探讨。

一、实验与结果

固氮菌种用沈-230 棕色固氮菌, 于 Nicholas 培养基 30℃ 经二级培养得到菌体。菌体为棕色。细胞破碎采用超声波或冻融减压法。

分离提纯过程如下: 菌体破碎后经离心得无细胞抽提液, 蛋白浓度 30—40 毫克/毫升, 为 E₁。60℃ 加热 10 分钟, 离心除去杂蛋白, 为 E₂。破碎后不离心便加热, 然后离心, 也能达到除杂蛋白的同样效果。于加热离心后的无细胞抽提液中, 加入占抽提液总蛋白量 7—10% 的鱼精蛋白, 沉淀核酸。再加鱼精蛋白至 19—21% (视固氮酶沉淀情况而定) 沉淀固氮酶。鱼精蛋白分级的活力比较见表 1。最后加 pH7.2, 0.025 M Tris 缓冲液和磷酸纤维素 (250 毫克/克蛋白) 搅拌两小

表 1 鱼精蛋白分级固氮酶活力提高情况

鱼精蛋白加入量占抽提液总蛋白量的%	5—7	7—12	5—17	10—19
活力提高倍数	0	0.71	1.45	>2.4

时左右至固氮酶释放完全, 上清液为 E₃。整个操作在氢气保护下进行。加入少量甘油可有一定的保护作用。

将释放后的固氮酶经 DEAE-纤维素柱层析分离。柱规格为 2.2 × 6.5 厘米, 上柱蛋白总量为 250 毫克左右。先用含有 15 mM MgCl₂, pH 7.2, 0.025 M Tris 缓冲液洗脱, 按颜色和钼的含量收集钼铁蛋白 (成分 I) 部分。再用含有 90 mM MgCl₂ 的同一种 Tris 缓冲液洗脱, 收集交叉有活力的铁蛋白 (成分 II) 部分。分别用多聚葡萄糖凝胶 G 150 柱脱氨。各级的纯化均在无氧条件下完成。活力比较列入表 2。柱层析图谱如图 1。其纯度用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定如图 2。

CP (即磷酸肌酸), 按 Lardy 法^[17]制备;

表 2 各级分离活力变化情况

不同纯度	总体积 (毫升)	乙炔还原总活力 (毫微克分子/分)	总蛋白量		乙炔还原比活力 (毫微克分子/分, 毫克)	纯化倍
			毫克	毫克/毫升		
粗抽提液 E ₁	63	4794	1594	25.3	3.0	1
60℃ 加热后 E ₂	63	7680	1072	17.0	7.2	2.4
鱼精蛋白处理 10—19% E ₃	21	2196	251	12.0	9.2	3.1
柱分离成分 I	10	2738	31.6	3.16	86.6	28.9
柱分离成分 II	12	3282	18.48	1.54	177.6	59.0

本文 1973 年 3 月 26 日收到。

* 本文曾在 1973 年 3 月厦门全国化学模拟生物固氮研究工作会议上报告过。

图1 在DEAE-纤维素柱上用 $MgCl_2$ 梯度进行洗脱图

光密度OD值为蛋白经Folin-酚试剂显色后,于680 m μ 测得。洗脱液是 $MgCl_2$ 溶于pH 7.2的0.025 M Tris缓冲液中

图2 成分I和II的聚丙烯酰胺电泳图

CK (即肌酸激酶)由兔肌提取^[18]。

铁含量测定,采用 Peterson 邻啡咯啉法^[19-20]。

钼含量测定,采用 Clarke 和 Bulen 的二

磺酚法^[21-22]。

活力测定,通过对反应体系各种试剂浓度对活力影响的实验,最后确定,在2.5毫升溶液内含6 μM $MgCl_2$ 、13.2 μM ATP、60 μM CP、0.00736 μM CK 和20 μM $Na_2S_2O_4$ 。30 $^{\circ}C$ 保温60分钟。反应瓶总体积为7毫升。乙炔还原法注入纯乙炔1毫升;氮还原法,将反应瓶充满氮气。乙炔还原成乙烯的测定,用SP-02气相色谱仪,鉴定器为氢火焰离子化鉴定器。氮还原成氨的测定,用扩散、Nessler试剂显色法测定。

两种蛋白不同配比活力变化见图3、4。

紫外吸收光谱,用 Unicam SP-700 自动

图3 令成分I的量固定为1,变化成分II的量,测定对I的比活力变化。比例为毫克比。活力用乙炔还原法测定

图4 令成分II的量固定为1,变化成分I的量,测定对II的比活力变化。比例为毫克比。活力用乙炔还原法测定

记录分光光度计测定,吸收池光程为10毫米。可见吸收光谱,用72-型分光光度计测定,吸收池光程为5毫米。结果如图5、6、7、8。

图5 钼铁蛋白的可见吸收光谱

蛋白浓度1.02毫克/毫升。实线为天然钼铁蛋白。虚线指钼铁蛋白在空气中暴露5分钟后加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$,每毫升加10毫克。吸收池光程为5毫米

图6 铁蛋白的可见吸收光谱

蛋白浓度2.3毫克/毫升, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 加入量为每毫升10毫克。吸收池光程为5毫米

二、结果讨论

从实验结果可见,无细胞抽提液经过加热处理可以除掉杂蛋白35%以上,提高比活力2.5倍,提高总活力1.6倍以上。鱼精蛋白分级可以除掉核酸和一些杂蛋白,提高固氮酶比活力3—6倍以上。在DEAE-纤维素柱上用 MgCl_2 进行梯度洗脱,可以将固氮酶的两个组分较好地分开(图1)。达到单独无活力,合起来显出较高的活力(表3),可提高活力20倍以上。在进行柱层析分离时,用 NaCl 梯度洗脱,可将固氮酶二组分分开,但 NaCl 的存

图7 钼铁蛋白的紫外吸收光谱

测定在密封吸收池中进行。吸收池光程为10毫米

图8 铁蛋白的紫外吸收光谱

测定在密封吸收池中进行。吸收池光程10毫米

表3 组分I和II单独与组合后的活力比较

比活力 测活力方法	组分		
	I	II	I+II
乙炔还原 ($\text{nMC}_2\text{H}_2/\text{分,毫克}$)	0	0	36.1; 51.8
氮还原 ($\text{nMn}_2/\text{分,毫克}$)	0	0	14.9; 17.3

在对固氮酶有一定的抑制作用。用聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度,观察到成分I的部分

主带之外有几条极浅的带，而成分 II 的部分除主带外，带比较多。因为电泳是在空气中进行的，空气影响可能造成多带情况。两种蛋白单独存在时完全无活力，说明两种蛋白得到了很好的分离。成分 I 含有钼和铁，钼和铁的克原子比在 1:18 左右。含钼量每毫克蛋白在 0.43—0.56 微克范围。成分 II 含有铁，并含有极微量的钼。

通过成分 I 和 II 的不同配比实验，我们认为，测定活力时，两个蛋白成分的比例是非常重要的(图 3、4)。Burris^[23] 观察到棕色固氮菌固氮酶的成分 I 增加到一定量时，对活力有抑制作用，并指出这是由于成分 I 含有氢化酶，在还原乙炔时，起竞争电子作用，因此成分 I 量过大时就起了抑制作用。除去氢化酶，则抑制作用消失。在我们的实验中，有时铁蛋白(成分 II)纯度较差，在铁蛋白量过大时也出现这种现象。

成分 I 和 II 的紫外、可见吸收光谱有明显的不同。成分 I 在 264 m μ 处有一个吸收峰，成分 II 在 269 m μ 处有一个吸收肩。二者在 420 m μ 处均有较强的吸收。成分 II 在 560 m μ 处有一个小的吸收肩。用保险粉还原后，成分 I 的可见吸收光谱变化不大，成分 II 则有明显变化(图 5、6)。成分 I 没有出现 Burns 等人^[3]所述在 525 m μ 和 530 m μ 的两个吸收增加。

固氮酶在粗抽提液中是较稳定的，在无氧条件下 0℃ 放置 72 小时，活力仍可保留 60% 以上。分离后的酶制剂放置 24 小时以后，几乎完全丧失活性，并生成沉淀。特别是成分 II 更为不稳定。

参 考 文 献

- [1] Carnahan, J. E. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **44** (1960), 520.
- [2] Nicholas, D. J. D. et al., *Nature*, **186** (1960), 735.
- [3] Burns, R. C. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **39** (1970), 90.
- [4] Eady, R. R. et al., *Biochem. J.*, **128** (1972), 655.
- [5] Dalton, M. et al., *Biochemistry*, **10** (1971), 2066.
- [6] Nakos, G. et al., *ibid.*, **10** (1971), 455.
- [7] Vandecasteele, J. P. et al., *J. Bacteriol.*, **101** (1970), 794.
- [8] Kajiyama, S. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **37** (1969), 7179.
- [9] 沈阳林业土壤研究所生物固氮组, 应用微生物, 增刊一, 1973, 1.
- [10] Shah, V. K. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **305** (1973), 445.
- [11] Zumft, W. G. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **48** (1972), 1525.
- [12] Orme-Johnson, W. H. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69** (1972), 3142.
- [13] Smith, B. E. et al., *Biochem. J.*, **130** (1972), 641.
- [14] Ward, M. A. et al., *Bacteriol. Proc. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, 1971.
- [15] Dalton, H. et al., *Bacteriol. Rev.*, **36** (1972), 231.
- [16] Hardy, R. W. F. et al., *Advan. Chem. Series*, 1971, 100.
- [17] Colowick, S. P. et al., *Methods in Enzymology*, **11** (1955), 605.
- [18] W. W. 恩布赖特等著, 姚侃等译, 检压技术, 1961 283, 科学出版社.
- [19] Peterson, R. E., *Anal. Chem.*, **25** (1953), 337.
- [20] Doeg, A. K. A. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **97** (1962), 37.
- [21] Clarke, L. et al., *Anal. Chem.*, **27** (1955), 2000.
- [22] Bulen, W. A. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **56** (1966), 979.
- [23] Burris, R. H., *Proc. Roy. Soc. B.*, **172** (1969), 339.