

聚球藻 PCC 7942 氢酶的分离纯化及特性研究

徐惠娟¹, 鄢小兵¹, 李筱泉¹, 龙敏南¹, 梁世中²

1. 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005
2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006

【摘要】 报道了室温、空气环境下聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 氢酶的分离纯化。经过超声破碎、超速离心、离子交换层析、疏水层析及凝胶层析等步骤, 氢酶被纯化了218倍, 得率为6.5%, 比活为1.46 U·mg⁻¹蛋白。纯化氢酶的SDS-PAGE图显示五条蛋白带, 分子量约为83kDa, 60kDa, 47kDa, 30kDa和27kDa。该氢酶为可溶性的双向氢酶, 其催化放氢的最佳电子供体为还原态的甲基紫精, 最适温度50℃, 最适pH 8.0。

关键词: 氢酶; 放氢; 聚球藻; 纯化; 特性

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1008-8873(2008)04-227-05

Purification and characterization of hydrogenase from *Synechococcus* sp. PCC 7942

XU Hui-juan^{*}, WU Xiao-bing¹, LI Xiao-quan¹, LONG Min-nan¹, LIANG Shi-zhong²

1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China
2. College of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

Abstract: Hydrogenase from *Synechococcus* sp. PCC 7942 was purified to close homogeneity aerobically at room temperature. The hydrogenase-containing crude extract was collected after ultrasonic disruption and removal of cell debris by ultracentrifugation. Subsequently, three steps of column chromatographies (anion exchange, hydrophobic interaction and gel filtration) were performed. Hydrogenase was purified about 218-fold with a yield of 6.5% finally. The purified enzyme has a specific activity for hydrogen evolution of 1.46 U·mg⁻¹ protein. SDS-PAGE gel of the purified enzyme revealed five predominant protein bands with estimated molecular weights of 83, 60, 47, 30 and 27 kDa, respectively. The enzyme is a soluble bidirectional hydrogenase and shows maximum activity while using reduced methyl viologen as an electron donor. The optimum temperature and pH value for hydrogen evolution catalyzed by the purified hydrogenase are 50 °C and pH 8.0.

Key words: hydrogenase; hydrogen evolution; *Synechococcus* sp. PCC 7942; purification; characterization

收稿日期: 2008-06-24 收稿, 2008-08-10 接受
基金项目: 福建省自然科学基金 (C0410002) 资助
作者简介: 徐惠娟(1971-), 女, 讲师, 研究方向为酶工程。
*通讯作者, E-mail: hjxu@xmu.edu.cn

1 引言 (Introduction)

氢酶是一类催化氢的氧化或质子还原的酶,广泛存在于原核微生物和一些简单的真核生物中,如厌氧细菌、光合细菌、蓝藻和某些真核藻类,在这些生物体的能量代谢中扮演着重要角色^[1,2]。氢酶从功能上分为吸氢酶和双向氢酶。吸氢酶主要催化利用分子氢的反应,而双向氢酶既可催化放氢,也可催化利用分子氢的反应。当今世界面临的能源危机,使得利用微生物制取清洁燃料氢气成为科学界的热点。氢酶是生物产氢过程中的关键酶,对氢酶的深入研究不仅可以揭示它的催化机理,而且能为氢酶的改造和高效生物制氢系统的构建奠定基础。

聚球藻 *Synechococcus* sp. PCC 7942 是一种单细胞海生蓝藻,本实验室的前期研究发现该藻在厌氧黑暗条件下能利用葡萄糖产氢,且产氢效率较高,说明其体内必然存在能够催化放氢的氢酶。已经有多种氢酶从不同微生物中分离出来,因为氢酶对氧敏感,热稳定性差,纯化步骤通常在低温、厌氧条件下进行^[3-5]。本文报道了非厌氧条件下聚球藻 PCC 7942 氢酶分离纯化,并对其催化放氢的特性进行了初步研究。

2 材料与方法 (Materials and Methods)

2.1 材料

聚球藻 (*Synechococcus* sp. PCC 7942) 由本实验室保存。

生长培养基: BG-11 培养基^[6]。

诱导培养基: 改进的 BG-11 培养基,以等当量的 NH_4Cl 代替 NaNO_3 , 并加入 1.5% (w/v) 的葡萄糖, pH8.0。

2.2 藻的培养及诱导

将聚球藻接种于生长培养基, 28℃ 连续光照、通气培养两周后, 离心收集藻体, 以诱导培养基洗涤两次, 将藻细胞悬浮于适量诱导培养基中, 放入血清瓶, 抽充氩气, 密闭, 于 40℃、黑暗条件下诱导一天, 之后离心收集藻体, 以无菌水洗涤两次, 藻泥于 -20℃ 保存备用。

2.3 氢酶纯化

湿藻泥用 1:2.5 (w/v) 的 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl

缓冲液 (pH8.5) 悬浮, 充分搅拌, 加入 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶菌酶, 37℃ 水浴处理 1h。加入 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇 (DTT), 冰浴超声破碎 (800 W, 超声 5s, 间隔 5 s), 超声时间为 2.5 min/g 藻。破碎液于 4℃、100,000 \times g 离心 1 h, 上清即为粗酶液。

DEAE-Sepharose FF 离子交换柱 (2.7 \times 13.5 cm) 预先以 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 平衡, 以粗酶液上样, 同样的缓冲液洗脱未结合蛋白, 之后分别以含 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 的缓冲液洗脱。合并有氢酶活性的洗脱液, 室温下以饱和硫酸铵溶液沉淀 2 h, 10,000 \times g 离心 10 min, 去上清, 沉淀以少量缓冲液溶解作为疏水柱层析的样品。

Butyl-Sepharose 4 FF 疏水柱 (2.7 \times 4 cm) 预先以含 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 平衡, 上样, 先以含 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的缓冲液洗脱未结合蛋白, 之后进行 2~0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的线性梯度洗脱。合并有活性的洗脱液, 以截留分子量为 10kDa 的超滤离心管进行浓缩 (4℃, 5800 \times g), 至样品体积小于 500 μL , 作为凝胶柱层析的样品。

Sephacryl S-200 凝胶柱 (1.6 \times 63 cm) 预先以 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5) 平衡, 上样, 以同样的缓冲液洗脱一个柱体积, 收集氢酶活性最高的洗脱液。纯化的氢酶于 -20℃ 保存。

2.4 氢酶活性测定

主要测定放氢活性。反应在有效容积为 5 mL 的真空采血管中进行, 反应体积为 2 mL, 缓冲液为 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH7.5), 体系中含 1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基紫精 (MV) 和 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 抽充氩气, 于 50℃ 水浴反应 30 min, 以气相色谱检测上层气相中的氢气。不含氢酶的反应体系为空白对照。50℃, 反应 30 min 产生 1 μmol 氢气的酶量定义为一个氢酶活性单位。

2.5 氢酶催化放氢的影响因素实验

2.5.1 温度实验

反应体系同氢酶活性测定, 分别于 20, 30, 40, 50, 60, 70℃ 反应 30 min, 以气相色谱检测上层气相中的氢气。

2.5.2 pH 实验

反应体系中的缓冲液均为 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 分别为 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 其余同氢酶活性

表 1 聚球藻 PCC 7942 氢酶的分离纯化

Table 1 Purification of the hydrogenase from *Synechococcus* sp. PCC 7942

纯化步骤 Purification step	总蛋白 Total protein (mg)	总活性 Total activity (U)	比活 Specific activity (U·mg ⁻¹ protein)	纯化倍数 Purification factor	得率 Yield (%)
粗酶液 Crude extract	2520	16.8	0.0067	1	100
DEAE-Sepharose FF	57.1	12.7	0.22	32.8	75.6
Butyl-Sepharose 4 FF	14.2	6.84	0.48	71.6	40.7
Sephacryl S-200	0.75	1.10	1.46	218	6.5

测定, 50℃下反应 30 min, 以气相色谱检测上层气相中的氢气。

2.5.3 电子载体实验

反应体系中的电子载体分别为甲基紫精 (MV), NADP, 苜基紫精 (BV) 和 NADH, 浓度均为 1.5 mmol·L⁻¹, 其余同氢酶活性测定, 50℃下反应, 定期以气相色谱检测上层气相中的氢气。

2.6 蛋白质含量测定

采用考马斯亮兰法^[7]。

2.7 主要化学试剂

Na₂S₂O₄, 苜基紫精和 NADH 为 sigma 公司产品, NADP 购自 Amresco 公司, 甲基紫精购自中国百灵威公司, DEAE-sepharose FF, Butyl-sepharose 4 FF 和 Sephacryl S-200 均为 Pharmacia 公司产品。

3 结果与分析(Results and Analysis)

3.1 纯化结果

从藻细胞中提取氢酶, 通常采用高压匀浆或珠磨的方法破碎细胞^[4,8,9]。本文研究了超声波处理法在聚球藻 PCC 7942 上的应用。由于超声破碎法受到功率、处理时间、细胞浓度和菌种类型的影响, 对聚球藻 PCC 7942 的破碎效果不太理想。经过改进, 在超声破碎之前增加溶菌酶的处理过程, 获得了稳定而有效的破碎效果。溶菌酶分子量较小, 且用量少, 易分离, 不影响氢酶的纯化。

第一步离子交换层析能除去大量的杂蛋白, 再经过疏水层析和凝胶层析, 氢酶被纯化了 218 倍, 得率为 6.5%, 比活为 1.46 U·mg⁻¹ 蛋白。纯化结果如表 1 所示。

通常认为蓝藻中既可催化吸氢又可催化放氢的双向氢酶由 NiFe 氢化酶和心肌黄酶两部分组成, 其中 NiFe 氢化酶包含 HoxY 和 HoxH 两个亚基, 心肌黄酶部分的两个亚基为 HoxF 和 HoxU。后来 Schmitz 等人研究发现, 心肌黄酶还包含第三个亚基 HoxE, 蓝藻的双向氢酶是个五聚体 (HoxEFUYH)^[9-11]。聚球藻 PCC 7942 纯化氢酶的 SDS-PAGE 结果如图 1。

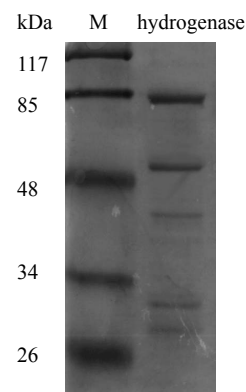


图 1 纯化氢酶的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE of purified hydrogenase

从图上可以看到五条明显的蛋白条带, 分子量大约为 83kDa, 60kDa, 47kDa, 30kDa 和 27kDa。Schmitz 等人对 *Synechococcus* sp. PCC 6301 的氢酶进行了分离纯化^[9], 纯化氢酶的 SDS-PAGE 图显示六条蛋白带, 其中的五个蛋白分别为氢酶的 HoxF, HoxH, HoxU, HoxY 和 HoxE 亚基。*Synechococcus* sp. PCC 7942 与 *Synechococcus* sp. PCC 6301 同为聚球藻属 (*Synechococcus*), 它们的氢酶应该有相似之处。比较二者氢酶的 SDS-PAGE 图谱, 发现其中有四条蛋白的分子量非常接近, 因此推测 60kDa, 47kDa, 30kDa 和 27kDa 对应的蛋白分别为聚球藻 PCC 7942

氢酶的 HoxF, HoxH, HoxU 和 HoxY 亚基, 而 83kDa 的条带为一未知蛋白。聚球藻 PCC 7942 的氢酶是否也由 HoxEFUYH 五个亚基组成, 它与聚球藻 PCC 6301 的氢酶差别多大, 该问题有待进一步验证。

3.2 温度和 pH 对氢酶催化放氢的影响

温度和 pH 是影响氢酶活性的重要因素。本研究发现, 较高的温度有利于聚球藻 PCC 7942 的氢酶催化放氢, 其最适温度为 50°C (图 2)。聚球藻 PCC 7942 氢酶催化放氢的最适 pH 为 pH8.0 (图 3), 与 *Spirulina platensis* 和 *Chlorococcum littorale* 氢酶的最适 pH 值 (pH7.5) 接近。

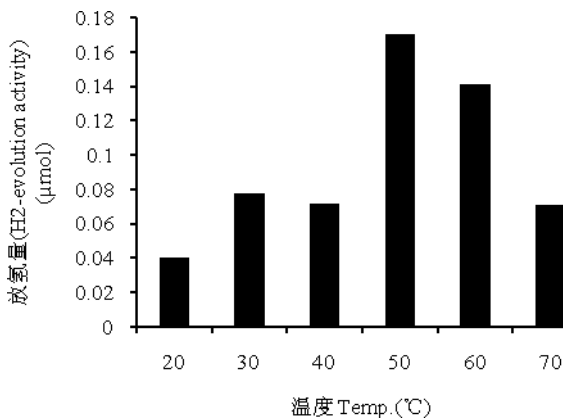


图 2 温度对氢酶催化放氢的影响

Fig.2 Effect of temperature on H₂-evolution catalyzed by hydrogenase

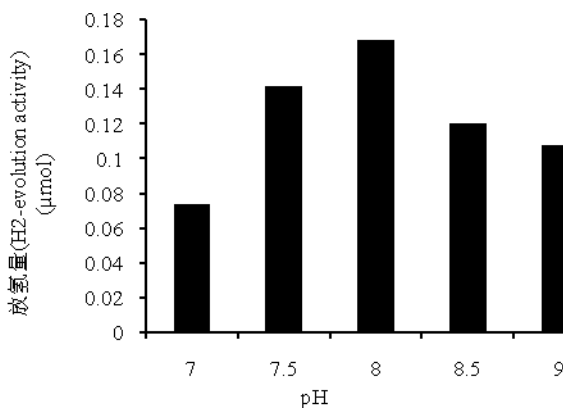


图 3 pH 对氢酶催化放氢的影响

Fig.3 Effect of pH on H₂-evolution catalyzed by hydrogenase

3.3 氢酶的电子载体

当合适的电子载体存在时, 氢酶在体外也能催化放氢。本文研究了天然和人工的电子载体对聚球藻

藻 PCC 7942 氢酶催化放氢的影响, 反应体系中均加入 Na₂S₂O₄ 以除去微量溶氧并使电子载体处于还原态。结果表明, 还原态的甲基紫精 (MV) 是聚球藻 PCC 7942 氢酶的最佳电子供体 (表 2)。以苜蓿紫精 (BV) 或 NADP 做电子载体, 氢酶的放氢活性大大降低, 而 NADH 下未能检测到放氢活性。氢酶以 NADP 或 NADH 为电子载体的低放氢活性, 可能是因为体外放氢的反应条件不适合这两种电子载体。

表 2 不同电子载体下聚球藻 PCC 7942 氢酶的放氢活性

Table 2 H₂-evolution activity of the hydrogenase from *Synechococcus sp* PCC 7942 with different electron carriers

电子载体 Electron carrier	相对活性 Relative activity (%)
MV	100
BV	4.4
NADP	1.8
NADH	未检出 not detectable

3.4 氢酶的稳定性

大多数氢酶的纯化过程都在厌氧环境下进行, 有的还需要严格的厌氧条件, 所用试剂及设备均需充入无氧气体, 而且纯化过程中通常保持低温 (4°C)。本论文聚球藻 PCC 7942 氢酶的分离纯化都在空气环境下进行, 相关的试剂与设备均未进行无氧处理, 且基本上在室温下操作。经过多步分离纯化之后, 仍然能检测到较高的氢酶活性。此外, 纯化的氢酶在 -20°C 下保存 5d 活性几乎未损失。以上结果说明聚球藻 PCC 7942 的氢酶比较稳定, 对氧不是特别敏感, 可在一般空气环境下分离。

4 讨论 (Discussion)

蓝藻中的固氮酶和双向氢酶都能催化产氢, 在非固氮情况下的产氢主要是由双向氢酶催化的。固氮酶催化产氢需要 ATP 的参与, 而氢酶不需要, 且双向氢酶一般为可溶性的。本研究预先在铵盐培养基、厌氧 (氩气) 黑暗条件下诱导聚球藻 PCC 7942 产氢, 其后以超声法破碎细胞, 经超速离心去除细胞碎片, 获得的酶液在合适的电子载体存在时即可催化产氢, 说明分离纯化的为可溶性的双向氢酶。

本研究建立了在室温、空气环境下分离纯化聚球藻 PCC 7942 氢酶的方法, 操作过程简单。当然, 纯

化过程中为了保持更高酶活, 仍应尽可能减少酶液曝氧的时间, 此外在超声破碎时, 加入一定的蛋白保护剂 ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DTT), 对氢酶也能起到一定的保护作用。

蓝藻的固氮酶产氢需要大量的 ATP, 产氢效率不高, 双向氢酶则对氧敏感, 限制了蓝藻产氢的应用。本研究发现聚球藻 PCC 7942 的双向氢酶对氧不甚敏感, 在室温下也比较稳定, 因而对其分子组成和结构等深入研究后, 可望有进一步研究应用前景。

参考文献 (References)

- [1] Adams M W W, Mortenson L E, Chen J S. 1981. Hydrogenases[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, **594**:105-176.
- [2] Vignais P M, Billoud B, Meyer J. 2001. Classification and phylogeny of hydrogenase[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, **25**:455-501.
- [3] 陈浩源, 陈兆平, 程双奇, 等. 1997. 螺旋藻氢酶的纯化与生化特性[J]. *水生生物学报*, **21**(2):123-130.
- [4] Ueno Y, Kurano N, Miyachi S. 1999. Purification and characterization of hydrogenase from the marine green alga, *Chlorococcum littorale*[J]. *FEBS Letters*, **443**:144-148.
- [5] Kamp C, Silakov A, Winkler M, et al. 2008. Isolation and first EPR characterization of the [FeFe]-hydrogenases from green algae[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1777**:410-416.
- [6] Rippka R, Deruelles J, Waterbury J B, et al. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria[J]. *Journal of General Microbiology*, **111**:1-61.
- [7] Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, **72**:248-254.
- [8] Bhosale S H, Pant A, Khan M I. Purification and characterization of putative alkaline [Ni-Fe] hydrogenase from unicellular marine green alga, *Tetraselmis kochinensis* NCIM 1605[J]. *Microbiological Research*, Article in press.
- [9] Schmitz O, Boison G, Salzmann H, et al. 2002. HoxE-a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1554**:66-74.
- [10] Schmitz O, Boison G, Hilscher R, et al. 1995. Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria[J]. *European Journal of Biochemistry*, **233**(1):266-276.
- [11] Boison G, Bothe H, Schmitz O. 2000. Transcriptional analysis of hydrogenase genes in the cyanobacteria *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR[J]. *Current microbiology*, **40**:315-321.