

• 研究快报 •

光合细菌 *Chromatium vinosum* 可溶性氢酶的分 离提纯及特性*

龙敏南 苏文金 S. P. J. ALBRACHT** 张凤章 许良树

(厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005;

** E C Slater Institute, University of Amsterdam, 1018TV, Amsterdam, the Netherlands)

摘要 光合细菌 *Chromatium vinosum* 可溶性氢酶经 4 次柱层析(Whatman DE-52, TSK-DEAE, Ultragel AcA-44, Mono Q) 分离提纯后被纯化 630 倍, 得率为 33.5%。可溶性氢酶催化放氢比活性为 $7.5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。SDS-PAGE 结果显示, 可溶性氢酶由 52 kD 和 21.5 kD 两个亚基组成。大亚基 N 端氨基酸序列为: SRTITIEPVT RXEGHAR; 小亚基 N 端氨基酸序列为: STQPKIT-VATXLDG。氧化态可溶性氢酶在 54K 时产生了典型的 Ni(III) 电子顺磁共振(EPR)信号($g_{xyz} = 2.37, 2.16, 2.016$ 和 $g_{x,y,z} = 2.30, 2.23, 2.016$)。研究结果表明, *C. vinosum* 可溶性氢酶是一种新的催化放氢的 NiFe-氢酶。

关键词 *Chromatium vinosum*, 可溶性氢酶, 纯化及特性

中图分类号 Q55, Q71

Purification and Properties of Soluble Hydrogenase from Photosynthetic Bacterium *Chromatium vinosum**

LONG Min-nan, SU Wen-jin, S. P. J. ALBRACHT**, ZHANG Feng-zhang, XU Liang-shu

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

** E C Slater Institute, University of Amsterdam, 1018TV, Amsterdam, the Netherlands)

Abstract The soluble hydrogenase (SH) from *Chromatium vinosum* was purified 630 folds with a yield of 33.5% and a specific activity of $7.5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ by 4 steps of column chromatography (Whatman DE-52, TSK-DEAE, Ultragel AcA-44 and Mono Q). The enzyme consists of two alien subunits (52 kD, 21.5 kD). The N-terminal sequence of the large subunit and small subunit were SRTITIEPVT RXEGHAR and STQPKIT-VATXLDG respectively. The oxidized soluble hydrogenase exhibited a typical Ni(III) EPR (electron paramagnetic resonance) signals ($g_{x,y,z} = 2.37, 2.16, 2.016$ and $g_{x,y,z} = 2.30, 2.23, 2.016$). The results showed that the SH from *C. vinosum* was a new NiFe-hydrogenase which catalyze H_2 -production.

Key words *Chromatium vinosum*, Soluble hydrogenase, Purification and properties

氢酶是一类催化放氢与吸氢的酶。它广泛存在于光合细菌、固氮菌及蓝细菌等微生物中。由于人类面临环境污染、能源短缺等一系列世界性难题, 氢被看作是一种无污染、可再生的理想能源, 因而氢酶及其产氢的研究受到了全世界的普遍重视^[1]。光合细菌的培养条件简单, 催化放氢的速率及能量的转化效率高^[2], 具有很好的研究价值和应用前景。光合细菌 *Chromatium vinosum* 含有一种可溶性氢酶 (SH) 和一种膜结合态氢酶 (MBH)^[3]。其膜结合态氢酶是

一种催化吸氢的氢酶, 而可溶性氢酶则由于其在细胞中的含量特别低, 并且其特性不同于其它氢酶, 因而一直未得到有效纯化。本研究报道了光合细菌 *C. vinosum* 可溶性氢酶的分
离提纯及某些理化特性。

* 教育部重点科技项目资助 (No. 99070)

联系人: 龙敏南, 男, 1965 年 1 月生, 博士, 副教授

Tel: 0592-2186392

E-mail: longmn@jingxian.xmu.edu.cn

收稿日期: 2000-06-15; 修回日期: 2000-08-30

1 材料与方法

1.1 菌体培养

光合细菌 *C. vinosum* DSM 185 菌株(由荷兰阿姆斯特丹大学 E. C. Slater 研究所提供) 培养在一 700 L 的密闭容器中, 其培养基及培养条件如文献 [3] 所述. 以 Sharples Mp4 连续离心机离心收集菌体细胞, 经快速冷冻后贮存于 -20 °C 备用.

1.2 可溶性氢酶的分离提纯

取 50 g 菌体悬浮于 200 ml 冰冷 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中. 菌悬液在冰水浴中超声破碎处理 (W-380, University of Virginia) 15 min 后, 离心 (20 000 × g, 30 min) 除去细胞壁和未破碎的细胞. 上清液经超速离心 (200 000 × g, 90 min) 除去细胞膜碎片等高分子复合物. 将离心所得的上清液直接上 DEAE-纤维素柱 (Whatman DE-52), 以 2 倍体积的起始洗脱缓冲液将未与柱物质结合的蛋白质洗脱下来, 然后进行连续梯度洗脱 (0 ~ 0.4 mol/L NaCl). 收集含可溶性氢酶的洗脱液, 经透析后装入 TSK-DEAE 650 (M) (Merck) 柱, 分别以含 0.1 mol/L, 0.13 mol/L 和 0.15 mol/L NaCl 的缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0) 洗脱. 收集含可溶性氢酶活性的洗脱液, 经超滤浓缩至 0.5 ml, 加入到 Ultragel AcA-44 (LKB-LBF) 柱进行洗脱 (流速为 45 ml/h). 收集含可溶性氢酶活性的洗脱液, 经透析后过快速蛋白液相色谱 Mono Q (Pharmacia) 柱进行连续梯度 (0 ~ 0.3 mol/L NaCl) 洗脱.

1.3 氢酶活性的测定

氢酶活性的测定在一 2 ml 厌氧池内进行, 以 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0) 作反应缓冲液. 测定放氢活性时以被连二亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 还原的甲基紫精 (Methyl viologen, 简称 MV) 作电子供体, 反应系统包括终浓度为 1.5 mmol/L 的 MV 和 50 mmol/L 的连二亚硫酸钠及适量的酶样品; 测定吸氢活性时, 反应系统包括终浓度为 40 mmol/L H_2 , 2.0 mmol/L 苜基紫精 (Benzyl viologen, 简称 BV), 适量的酶和 50 $\mu\text{mol/L}$ 连二亚硫酸钠.

1.4 蛋白质含量的测定

取 50 μl 酶样品和 2.5 ml 显色液 (配制: 85% 磷酸 100 ml, 100 mg 考马斯亮蓝 G-250, 无水乙醇 50 ml, 加水至 200 ml) 加入到一次性比色杯中. 于室温下反应 5 min 后, 测定在 595 nm 处的吸收值. 以只加显色液的处理作为空白对照. 以牛血清白蛋白为标准蛋白.

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 及染色

聚丙烯酰胺凝胶电泳在一垂直装置中进行, 丙酮酰胺的浓度为 7.5%. 对于 SDS-PAGE, 其 SDS 的浓度为 0.5%, 电泳的电流为 30 mA.

考马斯亮蓝染色: 电泳后, 将凝胶块置于染色液 (0.25% 考马斯亮蓝 R-250, 10% 乙酸, 40% 甲醇) 中染色 30 min, 然后在洗脱液 (10% 乙酸, 40% 甲醇) 洗脱 1 ~ 2 h.

氢酶活性染色: 电泳后, 将凝胶块置于反应液 (50 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 6.0, 50 mmol/L β -巯基乙醇和 1 mmol/L MV) 中 30 min, 然后将凝胶块转移到真空器中, 反复抽充以除去残留的氧, 再充以 100% H_2 , 在室温保持 30 ~ 60 min, 待甲基紫精被氢还原, 蛋白带呈现蓝色后, 在 Ar 气氛下加入 2.5% 的三苯基四氮唑盐酸盐, 于室温保持约 20 min, 至蛋白带由蓝色变为稳定的红色.

1.6 可溶性氢酶电子顺磁共振 (EPR) 谱的测定

取 5U 纯化的氧化态可溶性氢酶 (7.5 U/mg) 稀释至 250 μl , 注入到 EPR 管, 然后将 EPR 管短暂离心 (100 × g), 使管壁的酶液落到管的底部, 再套上带侧孔的橡皮管, 在橡皮管的另一端连接有机玻璃棒, 将 EPR 管缓慢放入液氮中冷冻. EPR 谱在 Braker ECS106 EPR 波谱仪上测定. 分别在 45K 和 10K 下记录酶的 EPR 谱. 测定条件: 9 248 MHz, 20 dB.

2 结果

2.1 可溶性氢酶的纯化

菌体细胞经超声破碎后, 可溶性氢酶和部分膜结合态氢酶都能从细胞中释放出来. 经超速离心后, 大部分膜结合态氢酶存在于沉淀中, 而上清液中含可溶性氢酶和部分游离的膜结合态氢酶. 由于可溶性氢酶在细胞中的含量特别低, 所以, 尽管只有小部分膜结合态氢酶溶于可溶部分, 其量仍然比可溶性氢酶大得多. 经 DE-52 柱洗脱后, 出现两个氢酶活性峰 (Fig. 1 B). 电泳后活性染色的结果显示, 第一个活性峰氢酶的电泳特征与纯化的膜结合态氢酶明显不同, 而第二个活性峰氢酶则与纯化的膜结合态氢酶表现出相同的迁移特征 (Fig. 2). 两个活性峰的氢酶催化放氢与吸氢的特性存在明显差异, 第一个活性峰的氢酶主要表现为催化放氢, 而第二个活性峰的氢酶则主要表现为催化吸氢. 对比研究表明, 第一个活性峰的氢酶属于可溶性氢酶.

含可溶性氢酶的洗脱液依次经 TSK-DEAE 纤

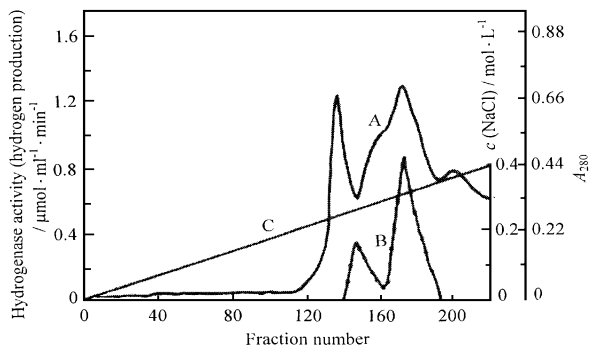


Fig. 1 The elution profile of hydrogenases from DE-52 column

A: Protein absorbance at 280 nm; B: hydrogen production activity; C: NaCl gradient

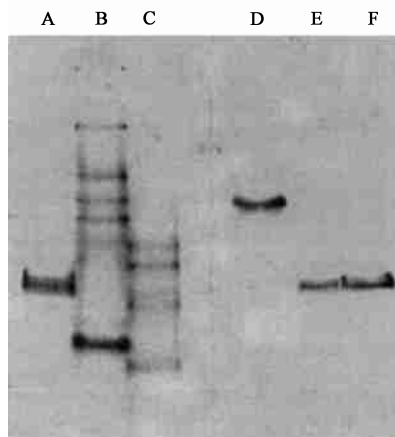


Fig. 2 Native-PAGE analysis of hydrogenase activity peaks from DE-52 column

A, F: purified *C. vinosum* MBH. B, D: first activity peak. C, E: second activity peak. A, B, C: staining with Coomassie brilliant blue R-250. D, E, F: activity staining

Table 1 Purification of soluble hydrogenase from *Chromatium vinosum*

Steps	Total protein /mg	Total activity /U*	Specific activities /U · mg ⁻¹	Purification (folds)	Yield (%)
Cru de enzyme	2070	24.8	0.012	1.0	100
DE-52 column	230	22.0	0.096	8.0	88.7
TSK-DEAE column	20.8	14.8	0.71	59.2	59.7
AcA-44 column	4.2	11.4	2.71	226.5	46.0
FPLC Mono Q	1.1	8.3	7.55	629.8	33.5

* U = μmol H₂ produced per minute

纤维素柱, Ultragel AcA-44 柱和 Mono Q 柱层析纯化后, 可溶性氢酶被纯化 630 倍, 得率为 33.5% (Table 1). 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果显示, 经 4 步柱的纯化后所获得的氢酶具有较高的纯度 (Fig. 3).

2.2 可溶性氢酶亚基组成及分子量测定

纯化的可溶性氢酶经 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色后, 显示两条带, 表明该酶含有两种亚基. 根据标准蛋白分子量的 R_f 值计算出可溶性氢酶两个亚基的分子量分别为 52 kD 和 21.5 kD (Fig. 4).

2.3 可溶性氢酶对热的稳定性

将可溶性氢酶在不同的温度下 (0、10、20、30、40、50、60、70) 温育 1 h, 然后测定氢酶催化放氢的活性. 结果表明, 可溶性氢酶在 40 以下比较稳定, 但当温度高于 40 时, 氢酶容易失活. 酶在 50 条件下保温 1 h, 失去 30% 的活性; 60 保温 1 h, 失去 70% 的活性; 70 下保温 1 h, 则酶全部失活 (Fig. 5).



Fig. 3 Native-PAGE analysis of hydrogenase activity peak from FPLC-Mono Q column

A and D: *C. vinosum* MBH. B and C: sample of activity peak. A and B: staining with Coomassie-brilliant blue. C and D: activity staining

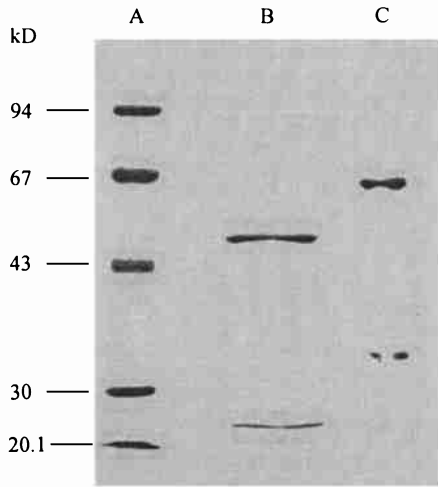


Fig. 4 SDS-PAGE analysis of SH from *C. vinosum*
A: protein marker; B: *C. vinosum* SH (52 kD, 21.5 kD); C: *C. vinosum* MBH (62 kD, 32 kD)

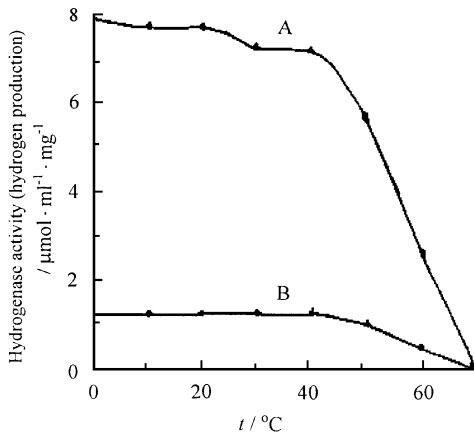


Fig. 5 Detection of temperature stability of *C. vinosum* soluble hydrogenase
A: H₂ production activity; B: H₂ uptake activity

2.4 pH 对可溶性氢酶催化活性的影响

pH 对可溶性氢酶催化放氢活性的影响如图 (Fig. 6) 所示, 在磷酸缓冲液 (pH4 ~ 8) 中, 可溶性氢酶催化的最适 pH 为 6.0。当 pH 小于 6.0 时, 酶活性缓慢下降; 当 pH 大于 6.0 时, 酶活性则迅速下降。此外, 不同的缓冲液系统会影响可溶性氢酶的催化活性, 可溶性氢酶在 Tris-HCl 缓冲液中的催化活性比在磷酸缓冲液中低得多。

2.5 可溶性氢酶大、小亚基 N 端序列的测定

SDS-PAGE 后, 将可溶性氢酶的两个亚基转移 (Semi-dry transfer, Bio-Rad) 到硝酸纤维素膜上, 经考马斯亮蓝染色, 切下可溶性氢酶两个亚基的蛋白

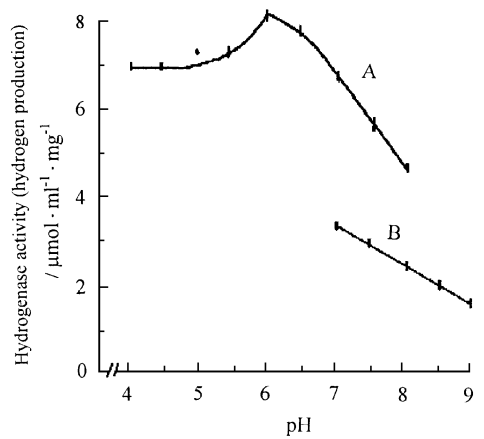


Fig. 6 Effect of pH on the H₂ production activity of *C. vinosum* SH
A: in 50 mmol/L phosphate buffer (pH 4 - 8); B: in 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7 - 9)

带, 在蛋白质自动测序仪 (494 Protein Sequencer, Applied Biosystem) 上测序。氢酶大亚基 N 端氨基酸序列为: SRTITIEPVTRXEGHAR (X 为不确定氨基酸, 下同), 与其它 NiFe-氢酶大亚基的 N 端氨基酸序列比较, 发现它们具有较高的同源性 (Fig. 7), 且都含有相同的保守序列 PVTRIEGH。可溶性氢酶小亚基 N 端氨基酸序列为: STQPKIT-VATXLDGXV。一般来说, NiFe-氢酶小亚基氨基酸的同源性都较低。

Large subunit		Similarity (%)
C. v SH	S R T I T I E P V T R X E G H A R	
A. e SH ^[4]	S R K L V I D P V T R I E G H G K	64.7
T. r MBH ^[6]	M...G K R I V V D P I T R I E G H L R	52.9
A. e MBH ^[6]	S...G R R I V V D P V T R I E G H M R	64.7
M. t MBH ^[7]	M V K L T M E P V T R I E G H A K	64.7
Small subunit		
C. v SH	S T Q P K I T V A I X L D G X V	
A. e SH	S I Q I T I D G K T L T T E E G	
T. r MBH	M P T T E T Y Y E V M R R Q G I	
A. e MBH	M V E T F Y E V M R R Q G I S R	
M. t MBH	M I I V N K E D C I R C G A C Q	

Fig. 7 Comparison of similarity of N-terminal sequences of hydrogenases
* C. v: *Chromatium vinosum*; A. e: *A. alcaligenes eutrophus*; T. r: *Thiobacillus roseopersicina*; M. t: *Methanobacterium thermoautotrophicum*; SH: soluble hydrogenase; MBH: membrane-bound hydrogenase

2.6 可溶性氢酶的 EPR 谱

大多数在有氧条件下纯化的 NiFe-氢酶存在活化态和非活化态两种形式^[8] 因而产生两组 Ni(II)

EPR 谱^{9,10}。这两组 EPR 谱的主要差别在于 g_y 值。活化态氢酶 Ni() EPR 谱的 $g_y = 2.16$, 而非活化态氢酶的 g_y 值为 2.24。纯化的氧化态可溶性氢酶在 45 K 下也产生了两组 EPR 信号($g_{xyz} = 2.37, 2.16, 2.016$ 和 $g_{xyz} = 2.30, 2.23, 2.016$) (Fig. 8A)。这两组 EPR 信号类似于其它 NiFe-氢酶 EPR 信号, 表明可溶性氢酶也属于 NiFe-氢酶。大多数 NiFe-氢酶在较低的温度 (< 18 K) 下, 在 $g = 2.0$ 处产生一个明显的 [3Fe-4S] 簇的 EPR 信号, 但氧化态可溶性氢酶在 10 K 下的 EPR 信号与 45 K 下的 EPR 信号基本上没有变化, 没有出现 [3Fe-4S] 簇的特征 EPR 信号 (Fig. 8B), 表明可溶性氢酶中不存在 [3Fe-4S] 簇。

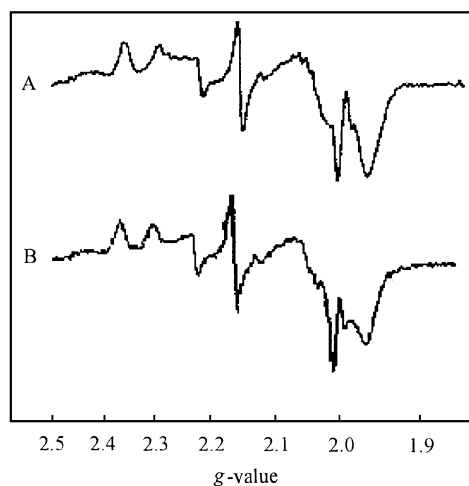


Fig. 8 EPR spectra of oxidized *C. vinosum* SH obtained at 45 K (A) and at 10 K (B)

Microwave frequency: 9248 MHz; 20 dB

3 讨 论

本研究首次分离提纯了 *C. vinosum* 可溶性氢酶。建立一种新的酶活检测方法是分离提纯成功的关键之一。可溶性氢酶是一种催化放氢的氢酶, 在最适条件下, 其催化放 H_2 的速率约为催化吸 H_2 速率的 10 倍; 而膜结合态氢酶则主要表现为催化吸 H_2 , 其催化吸 H_2 的速率约为催化放 H_2 速率的 10 倍 (数据未列出)。在以往氢酶的分离提纯中, 只检测氢酶的吸氢活性, 活性的测定在 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.0) 缓冲液中进行。而在此条件下, 可溶性氢酶的吸氢和放氢活性都很低。加上两个氢酶洗脱峰靠近, 因而无法将可溶性氢酶与膜结合态氢酶区分开来。为此, 我们建立了以磷酸缓冲液为反应缓冲液的检测系统, 并且测定洗脱组分的放氢活性, 这就大

大地提高了检测的灵敏度, 使得原本不能分开的两种氢酶轻易地区分开来。其次, 通过优化纯化各步骤的条件, 如增加破碎菌体的量, 在 TSK-DEAE 柱洗脱时改用非连续梯度洗脱等, 来提高分离效果和得率。

C. vinosum 可溶性氢酶的 EPR 谱及大亚基 N-末端氨基酸序列分析结果表明, 该酶是一种 NiFe-氢酶。可溶性氢酶的分子组成及理化特性都不同于膜结合态氢酶: 可溶性氢酶由 52 kD 和 21.5 kD 两个亚基组成, 而膜结合态氢酶由 62 kD 和 32 kD 两个亚基组成。NiFe-氢酶是一类铁硫蛋白, 大多数 NiFe-氢酶的小亚基包含两个 [4Fe-4S] 簇和一个 [3Fe-4S] 簇。因此, 多数氧化态 NiFe-氢酶如 *C. vinosum* 膜结合态氢酶在较低温度 (< 18 K) 下, 都能产生一个强的 [3Fe-4S] 簇 EPR 信号 ($g = 2.0$)^[8]; 但可溶性氢酶在 10 K 时没有出现该 EPR 信号, 表明该酶是一种新的 NiFe-氢酶, 它不含 [3Fe-4S] 簇, 可能只含有 [4Fe-4S] 簇; 该结果与我们对可溶性氢酶小亚基基因克隆的结果是一致的。小亚基的氨基酸序列分析表明, 小亚基含有 5 个 Cys, 其中 4 个 Cys 位于 NiFe-氢酶保守的序列框 (CxxC... Gx-CxxxG... GCPP) 中^[11], 而该保守序列框中的 4 个 Cys 是形成 [4Fe-4S] 簇的结构基础, 说明可溶性氢酶的小亚基只含有一个 [4Fe-4S] 簇。

由于可溶性氢酶具有较高的催化放氢的活性, 并且该酶对氧和较低温度表现了较好的稳定性, 因此, 该酶在氢酶催化放氢机理的研究和氢能源的开发利用中有较好的前景。

参考文献 (References)

- 1 Adams M W W, Stiefel E I. Biological hydrogen production. *Science*, 1998, **282**: 1842 ~ 1843
- 2 Tsygankov A A, Laurinavichene T V, Bukatin V E, Gogotov I N, Hall D O. Biomass production by continuous cultures of *Rhodobacter capsulatus* grown in various bioreactors. *Appl Biochem Microbiol*, 1997, **33**: 485 ~ 490
- 3 Coremans J M C C, van der Zwaan J W, Albracht S P J. Distinct redox behaviour of prosthetic groups on ready and unready hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1119**: 157 ~ 168
- 4 Andrea T B, Warnecke U, Christian B, Christiane Z, Friedrich B. Cloning and nucleotide sequences of the genes for the subunits of NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H 16. *J Bacteriol*, 1990, **172**(2): 2920 ~ 2929
- 5 Rakhely G, Colbeau A, Garin J, Vignais P M, Kovacs K L. Unusual organization of the genes coding for Hyd^{SL}, the stable

- NiFe-hydrogenase in the photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 1460 ~ 1465
- 6 Christiane K, Karin H, Schwett E, Manfred R, Ralf B, Barbel Friedrich. A gene complex coding for the membrand-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H 16. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 6277 ~ 6289
- 7 Reeve J N, Beckler G S, Gram D S, Hamilton P T, Brow J W, Krzycki J A, Kolodziej A F, Alex L, Orme-Johomson W H, Walsh C T. A hydrogenase linked gene in *Methanobacterium thermoautrophicum* strain delta H encodes a polyferredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**(9): 3031 ~ 3035
- 8 Albracht S P J. Nickel hydrogenase: in search of the activity site. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1188**: 167 ~ 204
- 9 Happe R P, Winfried R, Albracht S P J. Pre-steady-state kinetics of the reactions of NiFe-hydrogenase from *Chromatium vinosum* with H₂ and CO. *Eur J Biochem*, 1999, **259**: 602 ~ 608
- 10 Trofanchuk O, Stein M, Gessner C, Lenzian F, Higuchi Y, Lubitz W. Single crystal EPR studies of the oxidized active site of NiFe-hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F. *J Biol Inorg Chem*, 2000, **5**: 36 ~ 44
- 11 龙敏南, 苏文金, Albracht S P J, 吴健民, 张凤章, 许良树. 光合细菌 *Chromatium vinosum* 可溶性氢酶小亚基基因的克隆. 厦门大学学报(Long M in-nan, Su Wen-jin, Albracht S P J, Wu Jian-min, Zhang Feng-zhang, Xu Liang-shu. Gene cloning of small subunit of soluble hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *J Xiamen Univ*), 2000, **39**: 247 ~ 252