

苯硫酚对固氮酶催化活性的影响

杨胜利¹, 龙敏南¹, 周朝晖², 徐惠娟¹,
张凤章¹, 许良树¹, 万惠霖²

(1. 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,
2. 厦门大学化学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 研究了苯硫酚对棕色固氮菌固氮酶催化底物还原活性的影响. 结果表明: 当反应体系中固氮酶钼铁蛋白与苯硫酚的摩尔比为 1:4 时, 固氮酶的乙炔还原活性比对照组下降了 62.3%, 下降的幅度随着苯硫酚浓度的升高而增大; 但在乙炔存在的情况下, 固氮酶的放 H₂ 活性随着苯硫酚的浓度的升高而升高. 在氩气氛下, 苯硫酚浓度的升高对固氮酶放 H₂ 活性的影响不明显. 这一现象有可能是由于苯硫酚取代与铁钼辅基的 Fe₁ 原子连接的半胱氨酸的巯基而引起的.

关键词: 固氮酶; 苯硫酚; 活性

中图分类号: Q 554

文献标识码: A

固氮酶由钼铁蛋白和铁蛋白组成. 钼铁蛋白含有两个金属中心即 M-簇 (FeMoco) 和 P-簇, 前者被认为是底物络合和还原的活性部位^[1,2], 后者被认为是固氮酶的电子库, 在固氮酶催化底物还原时参与电子和质子的传递^[3,4]. 根据 K-R 模型^[5], FeMoco 是由 MoFe₃S₃ 和 FeFe₃S₃ 两个亚簇通过 3 个无机硫和一个氮桥连接而成的类双立方烷, 有 1 个高柠檬酸分子通过 1 个羧基 O 和 1 个烷氧基 O 与 Mo 原子相连^[6]. FeFe₃S₃ 亚簇上的 1 个 Fe 原子和 MoFe₃S₃ 亚簇上的 Mo 原子分别与 α -亚基上的 1 个半胱氨酸残基和一个组氨酸残基结合. 此外, 还有一些氨基酸残基通过水分子与 FeMoco 形成氢键. Kim 等^[7,8]通过对钼铁蛋白的 α -亚基氨基酸序列进行定点突变, 比较了突变株与野生型的钼铁蛋白的特性, 并研究了 FeMoco 周围微环境内氨基酸残基的作用. 本文以苯硫酚为化学探针, 分析其对固氮酶催化活性的影响, 藉以研究与 FeMoco 直接相连的氨基酸残基的作用.

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件

菌株为棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii* OP), 由中国科学院北京植物所提供. 采用改良的 Burk's 培养基 (pH 7.2) 进行 3 级培养. 首先在斜面上活化棕色固氮菌, 接着用摇瓶放大培养, 最后级采用德国产的全自动发酵罐 (B·Braun Biotech International) 小批量发酵生产固氮菌, 在 30 °C 下通气搅拌培养约 18 h (转速为 220 r/min), 离心收集菌体, 于 -70 °C 冰箱中贮存待用.

1.2 固氮酶组份分离提纯

分离固氮酶组份时先将菌体悬浮于 25 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.2, 终浓度为 4.5 × 10⁵ mL/m³) 中, 菌体悬浮液用 W-375 型超声波处理机 (Heat Systems-Ultrasonics, Inc.) 破碎. 细胞破碎液经反复抽气充氩后于 55 °C 下热处理 5 min, 迅速冷却至室温, 离心 (35 000 g, 4 °C) 25 min, 获得粗酶液. 固氮酶组份蛋白的后续纯化步骤按方法 [9] 进行. 整个纯化过程均在严格无氧条件下进行.

1.3 固氮酶活性的测定

反应瓶 (6.5 mL) 经反复抽气充氩后, 注入 0.4 mL 四合一反应系统 [含 3.05 mg MgCl₂ · 6H₂O, 5 mg ATP-Na₂, 17.5 mg 肌酸磷酸 (CP)、

收稿日期: 2002-09-20

基金项目: 国家自然科学基金 (39970176) 和基础研究计划 (001CB108906) 资助

作者简介: 杨胜利 (1978-), 男, 硕士研究生.

0.17 mg 肌酸激酶(CK)],并依次加入 350 μ L 的钼铁蛋白(0.58 mg)、100 μ L 铁蛋白(0.60 mg),100 μ L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)配制的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$,用注射器放气以平衡反应瓶内外的压力,最后注入 0.5 mL 乙炔,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中振荡反应 30 min,反应结束后立即用 103 型气相色谱仪(氧化铝柱,阿比松为固定相,火焰离子化检测器)测定乙炔的生成量,用 102G 型气相色谱仪(0.5 nm 分子筛柱,热导池检测器)测定氢气的生成量。

1.4 苯硫酚的配制及反应

将一定量的苯硫酚(国产 CP)悬浮于 mL/ m^3 25 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4 终浓度为 10 mL/ m^3)中,稀释的苯硫酚悬液的浓度为 9.785 mmol/L。由于苯硫酚不溶于水,每次注入反应瓶之前,稀释液须用力振摇以便分散均匀,然后用微量进样器将苯硫酚注入反应瓶。

1.5 蛋白质浓度的测定

参照文献[10]的方法进行。

2 结果

2.1 固氮酶组份蛋白的分离提纯

将 110 g 棕色固氮菌菌体悬浮于 220 mL 25

mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)中,经超声破碎后,细胞破碎液经反复抽气充氩,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 下热处理 5 min,然后迅速冷却至室温并离心,其上清液为粗酶液。粗酶液经第 1 次 DEAE 纤维素柱层析,洗脱的钼铁蛋白和铁蛋白的部分,分别再经过第 2 次 DEAE 纤维素柱层析进一步纯化,其结果见表 1。

由表 1 可见,粗酶液经过两次 DEAE 纤维素柱层析后,固氮酶钼铁蛋白被提纯 9.2 倍,其比活性为 1 110 nmol C_2H_4 formed / min \cdot mg prot.

2.2 不同气氛下苯硫酚对固氮酶催化底物还原活性的影响

在固氮酶反应体系中加入一定量的苯硫酚,其固氮酶乙炔还原活性受到了明显的抑制。从表 2 可见,当钼铁蛋白/苯硫酚的摩尔比为 1:4 时,其乙炔还原活性被抑制 62.7%,其抑制程度虽然随着苯硫酚浓度的升高而增大,但其幅度较小。而在乙炔存在下,在一定的固氮酶/苯硫酚摩尔比范围内(1:4~1:47),苯硫酚促进固氮酶的放氢反应,其放氢活性相对于对照组增加了 11%~28%。在氩气氛下,不存在任何其他外源底物时,固氮酶还原溶液中的 H^+ 为 H_2 。一定浓度的苯硫酚能促进该放氢反应,并且随着苯硫酚浓度的递增,其相对放氢活性从 100% 逐渐增加到 115%(见表 2)。

表 1 固氮酶组份蛋白的分离纯化结果

Tab. 1 Isolation and purification of the component proteins of nitrogenase

	体积(mL)	总蛋白(mg)	比活性*	提纯倍数
粗酶液	325	1625	120	1
第 1 次 DE ₃₂ 柱钼铁蛋白	80	325	680	5.7
第 2 次 DE ₃₂ 柱钼铁蛋白	20	128	1110	9.2

* 比活性单位为 nmol C_2H_4 formed / min \cdot mg prot.

表 2 苯硫酚对固氮酶底物还原活性的影响*

Tab. 2 Effects of thiophenol on substrate reduction reactivity of nitrogenase at different atmosphere

钼铁蛋白/苯硫酚 (mol/mol)	相对乙炔还原活性 (%)	相对放氢活性 (10%乙炔存在下,%)	相对放氢活性 (氩气氛下,%)
1:0	100	100	100
1:4	37.3	111.0	100
1:23	35.8	114.0	104.8
1:35	34.1	122.2	115.4
1:47	31.6	127.8	115.4

* 反应体系中含:0.58 mg 钼铁蛋白,0.60 mg 铁蛋白,3.05 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,5 mg ATP- Na_2 ,17.5 mg 肌酸磷酸(CP),0.17 mg 肌酸激酶(CK),6.5 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

3 讨 论

固氮酶铁钼辅基(FeMoco)被认为是固氮酶络合和还原底物的活性部位^[1,2],缺辅基的钼铁蛋白(即 NifB 钼铁蛋白)不表现固氮活力^[11]. 另一方面, FeMoco 周围的多肽微环境也是钼铁蛋白具备催化活性的必要条件^[12], 当与 FeMoco 直接相连的 Cys α 275 和 His α 442 分别被 Asp 和 Asn 取代后,突变株的固氮酶即不表现任何固氮活性,这可能是由于固氮酶 FeMoco 在细胞的另一部位合成后,欲插入钼铁蛋白 α -亚基中时,其 Asp α 275 和 Asn α 442 残基不能有效地结合 FeMoco,因而影响蛋白质分子的稳定性和 FeMoco 的构象变化,造成其活性的丧失. 这说明 Cys α 275 和 His α 442 对固氮酶钼铁蛋白的活性至关重要.

另一方面, Cys α 275 和 His α 442 与 FeMoco 的连接是足够牢固的,用巯基乙醇等含-SH 基团的有机溶剂不能从钼铁蛋白中提取出 FeMoco, 但用 NMF(N-甲基甲酰胺)却能有效地提取 FeMoco^[13], 这说明 N-甲基甲酰胺的酰胺基能取代 His α 442 的咪唑基和 Cys α 275 的巯基. 苯硫酚的巯基(-SH)能否取代上述两种残基? 我们的实验表明,苯硫酚能抑制固氮酶的乙炔还原活性,而对其放 H₂ 活性略有促进作用. 这说明苯硫酚的介入引起了电子流(质子流)的重新分配. 一种可能的原因是由于苯硫酚的-SH 基比 Cys 的-SH 的亲合力更强,苯硫酚取代了 Cys α 275(但不取代 His α 442),与 FeMoco 的 Fe₁ 结合,这样当固氮酶体系因欲结合底物而发生构象变化时,就不能有效带动 FeMoco (M-簇)发生构象变化(因为 Fe₁ 端是松动的),这样 M-簇的笼口就不能有效张开以接纳诸如 N₂、C₂H₂ 等底物,因此其底物还原的活性就受到了明显的抑制;而 H⁺ 因体积小不受笼口大小的限制,所以放氢活性反而因电子流的再分配而有所提高. 另一种可能的原因是苯硫酚以-SH 基与 M-簇笼口的 2Fe 配位结合,而限制 C₂H₂、N₂ 等底物进入笼内结合和还原,而 H⁺ 的结合和还原则不受其影响,就象 CO 结合在笼口 2Fe 位,但不抑制放氢反应而抑制其它已知固氮酶的底物的还原那样^[14,15]. 这两种可能性有待新的实验证据的进一步证实.

参考文献:

- [1] Morningstar J E, Johnson M K, Case E E, et al. Characterization of the metal clusters in the nitrogenase molybdenum-iron and vanadium-iron proteins of *Azotobacter vinelandii* using magnetic circular dichroism spectroscopy [J]. *Biochemistry*, 1987, 26:1 795-1 800.
- [2] Kim J, Rees D C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation [J]. *Biochemistry*, 1994, 33:389-397.
- [3] May H D, Dean D R, Newton W E. Altered nitrogenase MoFe-proteins from *Azotobacter vinelandii*: a analysis of MoFe-proteins having amino acid substitutions for the conserved cysteine residues within the β -subunit [J]. *Biochem. J.*, 1991, 277:457-464.
- [4] Peters J W, Fisher K, Newton W E, et al. Involvement of the P-cluster in intramolecular electron transfer within the nitrogenase MoFe-protein [J]. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270:27 007-27 013.
- [5] Einsle O, Tezcan F A, Andrade S L A, et al. Nitrogenase MoFe-protein at 0.116nm resolution: A central ligand in the FeMo-cofactor [J]. *Science*, 2002, 297:1 696.
- [6] Madden M S, Kindon N D, Ledeen P W, et al. Diastereomer-dependent substrate reduction properties of a dinitrogenase containing 1-fluorhomocitrate in the iron-molybdenum cofactor [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87:6 517-6 521.
- [7] Kim C H, Newton W E, Dean D R. Role of the MoFe-protein α -subunit histidine-195 residue in FeMo-cofactor binding and nitrogenase catalysis [J]. *Biochemistry*, 1995, 34, 2 798-2 808.
- [8] Shen J, Dean D R, Newton W E. Evidence for multiple substrate-reduction sites and distinct inhibitor-binding sites from an altered *Azotobacter vinelandii* nitrogenase MoFe-protein [J]. *Biochemistry*, 1997, 36, 4 884-4 894.
- [9] Zhang F Z, Huang J W, Huang H Q, et al. The binding site of N₂ and N₂O in nitrogenase indirectly detected by the change of trans/cis of CHD=CHD in products [J]. *Acta Biophysica Sinica (生物物理学报)*, 1999, 15(1):25-32.
- [10] 汪家政, 范明主编. 蛋白质技术手册[S]. 北京: 科学出版社, 2000. 42-46.
- [11] Shah V K, Ugalde R A, Imperial J, et al. Molybdenum in nitrogenase [J]. *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, 53: 231-257.
- [12] Thomann H, Bermardo M, Newton W E, et al. N-

- coordination of FeMo-cofactor requires His-195 of the MoFe protein α -subunit and is essential for biological nitrogen-fixation [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88:6 620—6 623.
- [13] Shah V K, Brill W J. Isolation of an iron-molybdenum cofactor of nitrogenase [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74:3 249—3 253.
- [14] Christie P D, Lee H I, Cameron L M, et al. Identification of the CO-binding cluster in nitrogenase MoFe-protein by ENDOR of ^{57}Fe isotopomers [J]. J. Am. Chem. Soc., 1996, 118:8 707—8 709.
- [15] George S J, Ashby G A, Wharton C W, et al. Time-resolved binding of carbon monoxide to nitrogenase monitored by stopped-flow infrared spectroscopy [J]. J. Am. Chem. Soc., 1997, 119:6 450—6 451.

The Effects of Thiophenol on Catalytic Activities of Nitrogenase

YANG Sheng-li¹, LONG Min-nan¹, ZHOU Zhao-hui², XU Hui-juan¹,
ZHANG Feng-zhang¹, XU Liang-shu¹, WAN Hui-lin²

(1. School of Life Science, The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen Univ., 2. Dept. of Chem., Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

Abstract: The effects of thiophenol on substrate reduction reactions catalyzed by nitrogenase from *Azotobacter vinelandii* were investigated in this experiment. The C_2H_2 reduction activity decreased by 62.3% when the concentration of thiophenol in the reaction system was 4 : 1 mole ratio ($[\text{thiophenol}] : [\text{MoFe protein}] = 4 : 1$). However, the H_2 -evolution activity of nitrogenase increased with the increasing concentration of thiophenol at the presence of C_2H_2 . Under argon atmosphere, the H_2 -evolution activity slightly increased with the increasing concentration of thiophenol. This maybe suggest that mercapto group of Cys275 in α -subunit from MoFe-protein, which binds Fe_1 in FeMoco, is replaced by thiophenol.

Key words: nitrogenase; thiophenol; activity