

# 固氮酶中 $N_2$ 和 $N_2O$ 结合位的一种新的鉴定方法

张凤章<sup>1</sup> 黄静伟<sup>2</sup> 邱雪慧<sup>1</sup> 曾润颖<sup>3</sup>  
龙敏南<sup>1</sup> 张鸿图<sup>2</sup> 许良树<sup>1</sup> 万惠霖<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 厦大学生物学系 <sup>2</sup> 厦门大学化学系 <sup>3</sup> 国家海洋局第三海洋研究所 厦门 361005)

**摘要** 采用 GC 和 GC-FTIR 法,研究了  $N_2$  和  $N_2O$  对固氮酶催化  $C_2D_2$  还原活性及产物二氘代乙烯的反式-/顺式-异构体比值的影响,结果表明,  $N_2$  和  $N_2O$  均抑制  $C_2D_2$  的还原作用,并引起反式-/顺式-1,2-二氘代乙烯比值的增加 这一变化规律,与根据  $C_2H_2$  还原被  $N_2$  和  $N_2O$  抑制只发生在固氮酶铁钼辅基( $FeMoCo$ )的笼内的假设而近似计算的结果相一致 实验结果和理论计算之间的一致性支持  $N_2$  和  $N_2O$  结合在  $FeMoCo$  的笼内,并主要抑制在笼内的  $C_2D_2$  还原的看法

**关键词** 固氮酶,  $C_2D_2$  还原, 反式-/顺式-二氘代乙烯比值,  $N_2$  和  $N_2O$  结合位

**中国图书分类号** Q 554

固氮酶钼铁蛋白含有两个金属中心 M-簇和 P-簇 M-簇又称为  $FeMoCo$ -辅基( $FeMoCo$ ),它被认为是底物结合和还原的活性部位,而 P-簇则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 根据钼铁蛋白单晶的 X-射线衍射的数据提出的  $FeMoCo$ -辅基结构模型 Kim-Rees 模型<sup>[1]</sup>,为设想底物在  $FeMoCo$  上的结合和还原位点提供有力的依据 在 Kim-Rees 模型中,  $FeMoCo$  是由  $MoFe_3S_3$  和  $Fe_4S_3$  两个亚簇通过 3 个无机硫桥连而成的类双立方烷,7 个 Fe 原子中的 6 个为三配位,包括桥 S 提供的一个配基;两个亚簇之间的辅基内侧出现一个直径约为 4Å 的腔 3 个无机桥 S 之一可能具有不同于另两个桥 S 的微环境,当活性酶开始向  $FeMoCo$  输送  $H^+$  和  $e^-$  时,这个特殊的无机硫配基会被氢化并以  $H_2S$  形式除去,而在  $FeMoCo$  的 2Fe 位处留下一个缺口<sup>[2]</sup>,这就打开了一些底物从笼外进入笼内的可能通道 当一些底物共存于一个体系中且在笼内被还原时,它们会彼此竞争结合位,这就会影响底物还原活性 在我们的实验中,以  $C_2D_2$  作为  $N_2$  和  $N_2O$  ( $N_2O$  为  $N_2$  还原的竞争性抑制剂)还原的化学探针,以反式-/顺式-1,2-二氘代乙烯比值的变化作为  $N_2$  或  $N_2O$  与  $C_2D_2$  竞争结合位点而引起的变化指数,从而推测出  $N_2$ ,  $N_2O$  和  $C_2D_2$  在  $FeMoCo$  中的结合位

## 1 材料与方法

### 1.1 固氮菌菌体培养

棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii* OP) 菌种购自美国菌种中心,采用改进的 Burk's 培养

基三级发酵培养,菌体在自制的 50 L 发酵罐中生长,对数生长后期离心收集菌泥,于-70℃下冷冻保存备用

## 1.2 固氮酶组份蛋白钼铁蛋白和铁蛋白的分离

按先前的方法<sup>[3]</sup>分离 MoFe-蛋白和 Fe-蛋白 第一次柱层析洗脱的 MoFe-蛋白溶液经超滤浓缩(膜截留值 MW = 100 000),浓缩液用 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.2)稀释后,再经 DE<sub>52</sub> 柱(4 cm × 20 cm)层析提纯 第一次柱层析收集的 Fe-蛋白经二次 DE<sub>52</sub> 柱(2 cm × 20 cm)层析提纯 所有的操作均在无氧条件下进行 收集的 MoFe-蛋白溶液和 Fe-蛋白溶液存于液氮中备用 以考马斯亮蓝 G-250 法<sup>[4]</sup>测定蛋白浓度,以牛血清白蛋白为标准蛋白

## 1.3 固氮酶活性测定

在一系列带反口橡皮塞的反应瓶中,加入反应系统<sup>[5]</sup>(CP, CK, ATP-2Na 和 MgCl<sub>2</sub>) 0.4 mL,反复抽气充 Ar 或充 N<sub>2</sub> 气,然后注入一定量的 MoFe-蛋白和 Fe-蛋白及 0.1 mL 0.4 mol/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>,反应瓶以注射针筒扎针放气至 1 atm 后,注入 C<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 及 N<sub>2</sub>O,在 30℃ 水浴中振荡反应 30 min,注入 0.1 mL 7% (W/V) 三氯乙酸终止反应 以 103 型气相色谱仪(氢火焰离子化检测器,AL<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 柱,固定相为硅油,0.3 cm × 200 cm,载气为 N<sub>2</sub>)测量生成的 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 以 102G 型气相色谱仪(5A 分子筛柱,以 Ar 为载气,热导池检测器)检测生成的 H<sub>2</sub>

用微量扩散法收集生成的 NH<sub>3</sub>,以 Nessler's 试剂比色测定 NH<sub>3</sub> 生成量<sup>[6]</sup>.

## 1.4 红外光谱测定

用 GC-FTIR 联用仪测量二氘代乙烯 CHD = CHD 的红外光谱 将反应体系的气体混合物注入 PE-2000 型光谱计配置的色谱柱(GDX-502 柱,0.3 cm × 250 cm),以 He 气为载气,在 45℃ 下层析分离,然后以 PE-2000 型 FTIR 光谱仪测量 CHD = CHD 在 1 130~770 cm<sup>-1</sup> 区的红外光谱,KB<sub>r</sub> 棱镜, MCT 检测器 从红外光谱图中的 988 cm<sup>-1</sup> 和 843 cm<sup>-1</sup> 处的特征峰的峰面积积分值,计算反式-/顺式-1,2-二氘代乙烯的比值

# 2 结 果

## 2.1 反应条件及产物氘代乙烯检测方法的选择

在重水体系中固氮酶能催化 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 还原产生 1,2-二氘代乙烯<sup>[7]</sup>. Crawford 等<sup>[8]</sup>和 Hardy 等<sup>[9]</sup>认为反应后的气体混合物,其红外光谱中的 988 cm<sup>-1</sup> 和 843 cm<sup>-1</sup> 处的特征峰分别为反式-1,2-二氘代乙烯和顺式-1,2-二氘代乙烯的振动吸收 在不同反应条件下两个特征峰的面积的变化已被用来计算反式-/顺式-1,2-二氘代乙烯比值的变化<sup>[10]</sup>. 虽然固氮酶是在重水体系中催化底物乙炔还原的,但由于体系中含有痕量的 H<sub>2</sub>O,故反应中仍有 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 产生,这样,反应后的气体混合物的红外光谱中的 988 cm<sup>-1</sup> 的峰将作为 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 特征峰(949 cm<sup>-1</sup> 处)的伴峰(见图 1A),结果反式-/顺式-异构体比值就不能精确计算,所以选择 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 在重水体系中还原是不适宜的 选择 C<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 作为固氮酶底物,在 H<sub>2</sub>O 体系中反应虽然可以消除 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 的影响,但在反应后的气体混合物的红外光谱中,C<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 的 1020 cm<sup>-1</sup> 特征峰尾部(图 1C)与 CHD = CHD 的 988 cm<sup>-1</sup> 处特征峰发生交盖,亦干扰反式-/顺式-异构体比值的正确计算 为了解决这个问题,在实验中我们先用 GC 柱(GDX-502 柱)分开 C<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 和 CHD = CHD,然后只对 CHD = CHD 的红外光谱进行观测

### 2.2 不同条件下 $C_2D_2$ 的还原活性及 $CHD=CHD$ 的反式/顺式比

在固氮酶的生理底物  $N_2$  的存在下,  $C_2D_2$  的还原受  $N_2$  的竞争性抑制, 其结果示于表 1 和图 2 特征峰的面积是面积积分仪自动积分获得的, 由此计算反式-/顺式-1, 2-二氘代乙烯的比值, 其数值亦列于表 1 中. 从表 1 可见, 在  $A_r$  气氛下,  $C_2D_2$  的还原活性随  $C_2D_2$  的分压 ( $P_{C_2D_2}$ ) 的降低而呈线性下降, 而反式-/顺式-比值增大. 其最大可能是放  $H_2$  作用增强并主要影响低  $P_{C_2D_2}$  下的  $C_2D_2$  在笼内的还原. 当用  $N_2$  气代替  $A_r$  气作为反应气氛时,  $C_2D_2$  的还原活性下降, 而反式-/顺式-比值升高, 且  $C_2D_2$  还原活性的降低和反式-/顺式-比值的增大的幅度要比  $A_r$  气氛下  $P_{C_2D_2}$  降低引起的同样变化的幅度大.

### 2.3 在不同条件下底物的还原和反式-/顺式-1, 2-二氘代乙烯比值

$N_2O$  是  $N_2$  以外第一个被发现的固氮酶底物<sup>[11]</sup>, 它在固氮酶催化下还原生成  $N_2$  和  $H_2O$ <sup>[12]</sup>, 生成的  $N_2$  中一部分将继续被还原为  $NH_3$ <sup>[13]</sup>, 这就意味着  $N_2, N_2O$  和  $H^+$  与同样形式的固氮酶相互作用<sup>[13]</sup>, 因此  $N_2O$  是检测固氮酶中  $N_2$  结合位的好探针. 在  $N_2O$  存在或不存在下测量  $C_2D_2$  的还原活性, 放  $H_2$  活性和  $N_2$  还原活性, 其结果见表 2 和图 3.

比较在  $N_2$  存在下情形,  $C_2D_2$  还原活性, 放  $H_2$  和  $NH_3$  生成均降低, 而反式-/顺式-比值则因  $N_2O$  和  $N_2$  的存在而增大. 结果表明,  $N_2O$  抑制  $C_2D_2$  还原、放  $H_2$  及  $N_2$  的还原. 这与 Liang 和 Rivera-Ortiz 的结果一致<sup>[14, 15]</sup>. 在  $N_2O$  和  $N_2$  同时存在下的总电子流分配亦低于无  $N_2O$  存在下的总电子流分配. 这可能是因  $N_2O$  还原需要电子, 即一些电子用于  $H_2O$  的形成.

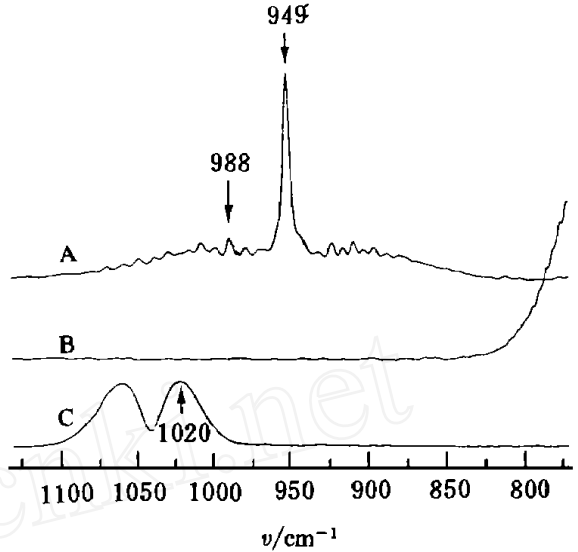


图 1  $C_2H_4$  (A),  $C_2H_2$  (B) 和  $C_2D_2$  (C) 的红外光谱  
Fig. 1 IR spectra of  $C_2H_4$  (A),  $C_2H_2$  (B) and  $C_2D_2$  (C)

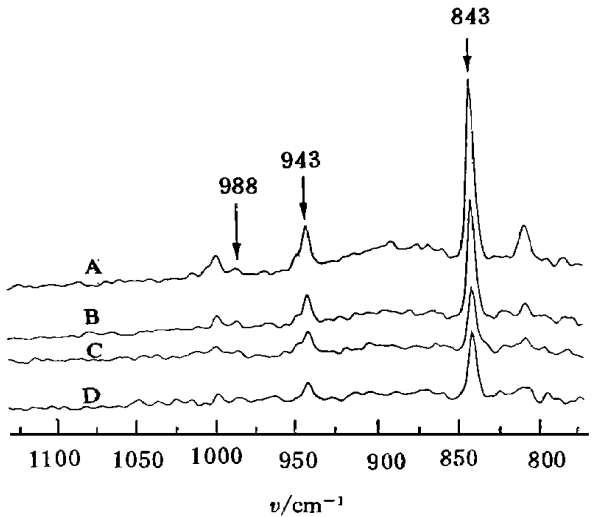


图 2 产物二氘代乙烯的红外光谱  
(A)  $A_r-1.5\% C_2D_2$ ; (B)  $A_r-0.7\% C_2D_2$ ;  
(C)  $N_2-1.5\% C_2D_2$ ; (D)  $N_2-0.7\% C_2O_2$

Fig. 2 IR spectra of product  $CHD=CHD$

表 1 不同条件下氘代乙炔还原活性及反式-/顺式-1, 2-二氘代乙烯的比值<sup>a)</sup>Tab 1 The C<sub>2</sub>D<sub>2</sub> reduction activity and the trans/cis of CHD=CHD under different conditions

| 气 相   | C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> 还原活性 <sup>b)</sup> | (反式/顺式)/(%)       |                   |
|---|--|-------------------|-------------------|
|   |  | 实验值 <sup>c)</sup> | 计算值 <sup>d)</sup> |
| A r-1. 5% C <sub>2</sub> D <sub>2</sub>             | 676.0  | 0.9               | 0.9 <sup>e)</sup> |
| A r-0. 7% C <sub>2</sub> D <sub>2</sub>             | 316.6  | 1.8               | 1.9               |
| N <sub>2</sub> -1. 5% C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> | 220.1  | 3.0               | 2.7               |
| N <sub>2</sub> -0. 7% C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> | 151.8  | 4.2               | 3.9               |

a) A v1, 0.68 mg; A v2, 2.68 mg; A v1 比活性, 1360 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 生成/min · mg prot; b) 单位: nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 生成/min · mg prot; c) 数值得自图 2 中反式-和顺式-1, 2-二氘代乙烯特征峰的峰面积积分比值; d) 数值见文中所述的近似计算; e) 此值为实验值, 作为计算同系列反式-/顺式-1, 2-二氘代乙烯比值的起始点

表 2 不同条件下底物还原和反式-/顺式-1, 2-二氘代乙烯的比值<sup>a)</sup>

Tab 2 The substrates reduction and the trans/cis ratio of CHD=CHD under different conditions

| 气 相   | C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> 还原活性 <sup>b)</sup> | 放 H <sub>2</sub> 活性 <sup>c)</sup> | N <sub>2</sub> 还原活性 <sup>d)</sup> | (反式/顺式)/(%)       |                   |
|---|--|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
|   |  |                                   |                                   | 实验值 <sup>e)</sup> | 计算值 <sup>f)</sup> |
| Argon-10% C <sub>2</sub> D <sub>2</sub>                               | 123.5  | 150.4                             | 0                                 | 0.6               | 0.6 <sup>e)</sup> |
| N <sub>2</sub> -1% C <sub>2</sub> D <sub>2</sub>                      | 21.8   | 161.8                             | 25.6                              | 3.3               | 3.3               |
| N <sub>2</sub> -1% C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> -5% N <sub>2</sub> O | 19.2   | 149.1                             | 24.1                              | 3.9               | 3.8               |

a) A v1, 1.00 mg; A v2 1.75 mg, A v1 比活性, 1360 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 生成/min · mg prot; b) 比活单位: nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 生成/min · mg prot; c) 比活单位: nmol H<sub>2</sub> 生成/min · mg prot; d) 比活单位: nmol NH<sub>3</sub> 生成/min · mg prot; e) 数值得自图 3 的反式-/顺式-1, 2-二氘代乙烯的特征峰面积积分比值; f) 数值按文中所述的近似计算获得; g) 此值为实验值, 作为计算同系列反式-/顺式-1, 2-二氘代乙烯比值的起始点

### 3 讨 论

实验结果表明, N<sub>2</sub> 和 N<sub>2</sub>O 会抑制 C<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 的还原, 并引起反式-/顺式-1, 2-二氘代乙烯比值的增大。这些结果是否反映了固氮酶作用的内在规律, 特别是固氮酶中 N<sub>2</sub> 的结合位方面的信息。为了解释这些实验结果及其它们的固有规律, 首先必须提出 3 个假设

1) 根据固氮酶 FeMo-辅基的 K-R 模型和已知的事实, 即固氮酶催化的 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 还原和 N<sub>2</sub> 还原之间的竞争性和非竞争性的关系<sup>[15]</sup>。在固氮酶中 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 可能有两个结合位, 即笼内和笼外(缺口处的 2Fe 位)。

2) 根据已知的实验事实<sup>[9, 16]</sup>, 即 CH=CH 和 CH<sub>3</sub>C=CH 在 D<sub>2</sub>O 中被固氮酶催化时其结合强度和顺式-1, 2-二氘代乙烯选择性有很大的差异, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 还原氘化产物几乎都是顺式-1, 2-二氘代乙烯, 而 CH<sub>3</sub>C=CH 的还原氘化产物顺式-/反式-1, 2-二氘代丙烯比值约为 64/36。乙炔还原作用似乎在笼内发生, 只有很少的 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 在缺口处的 2Fe 位被还原。在笼内, C<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 的还原产物为 100% 顺式-1, 2-二氘代乙烯, 在笼外, C<sub>2</sub>D<sub>2</sub> 的还原产物为 50% 顺式-1, 2-二氘代乙烯和

## 50% 反式-1, 2-二氘代乙烯

3) 笼内的  $C_2H_2$  还原作用被  $N_2$  和  $N_2O$  所抑制

从表 1 可见, 在  $A_r$  气氛和  $P_{C_2D_2}$  为  $0.015 \text{ atm}$  下, 反式-/顺式-1, 2-二氘代乙烯比值约为  $0.9\%$ , 这就是说约有  $98.2\%$   $C_2D_2$  在笼内还原, 它们都被还原为顺式-1, 2-二氘代乙烯; 约有  $1.8\%$   $C_2D_2$  在笼外还原, 只有  $0.9\%$  被还原为反式-1, 2-二氘代乙烯。当  $P_{C_2D_2}$  降低到  $0.007 \text{ atm}$  时,  $C_2D_2$  还原活性降低至约  $46.8\%$ 。根据我们的假设, 只有约  $46.8\% \times 98.2\%$   $C_2D_2$  在笼内还原, 它们均被还原为顺式-1, 2-二氘代乙烯, 而在笼外, 仍然约有  $0.9\%$  顺式-1, 2-二氘代乙烯和  $0.9\%$  反式-1, 2-二氘代乙烯生成; 产物中的反式-/顺式-1, 2-二氘代乙烯的比值为  $0.9 / (0.468 \times 98.2 + 0.9) = 1.9\%$ 。用同样的方法, 可以从不同条件下  $C_2D_2$  还原

活性的降低近似计算反式-/顺式-CHD=CHD 比值(见表 1 和 2)。很明显, 从比较实验和由假设而近似计算的反式-/顺式-比值, 反映了我们假设的合理性, 这些结果直接支持  $N_2$  和  $N_2O$  都结合在  $FeMo$ -辅基的笼内, 并主要是抑制笼内的  $C_2D_2$  还原的观点

感谢翁维正、陈明树博士和严兴国、周明玉、杨茹老师在实验中给予的热情帮助

## 参 考 文 献

- 1 Kim J, Rees D C. Structural models for the metal centers in the nitrogenase molybdenum-iron protein. *Science*, 1992, 257: 1 677~ 1 682
- 2 Tsai K R, Wan H L. On the structure-function relationship of nitrogenase M<sup>-</sup>cluster and P-cluster pairs. *J. Cluster Sci.*, 1995, 6: 485~ 501
- 3 许良树, 曾定, 林清木等. 棕色固氮菌钼铁蛋白的结晶及其氧化还原电位的研究. 厦门大学学报(自然科学版), 1979, 18(4): 89~ 96
- 4 Bradford M M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 247~ 254
- 5 曾定, 许良树, 林清木等. 固氮酶铁钼辅基模拟物的生物活性. 厦门大学学报(自然科学版), 1980, 19(4): 78~ 84
- 6 Li J L, Burris R H. Influence of  $pN_2$  on HD formation by various nitrogenase. *Biochemistry*, 1983, 22: 4 472~ 4 480
- 7 Dilworth M J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 129: 285~ 294
- 8 Crawford B L, Lancaster J E, Inskeep R G. The potential function of ethylene. *J. Chem. Phys.*, 1953, 21: 678~ 686

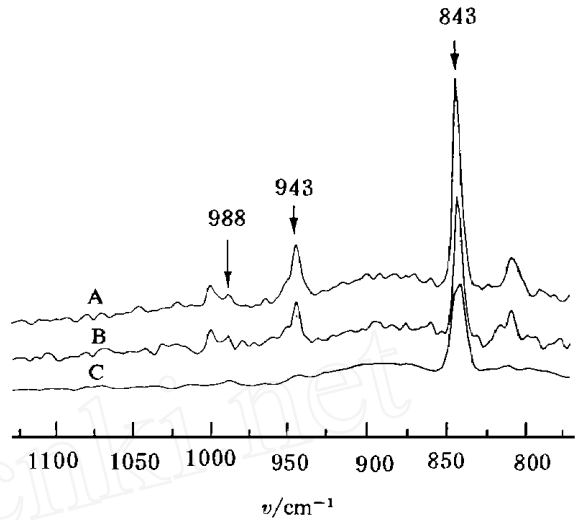


图 3 不同反应气相下产物二氘代乙烯的红外光谱

(A)  $A_r$ -10%  $C_2D_2$ ; (B)  $N_2$ -1%  $C_2D_2$ ;

(C)  $N_2$ -1%  $C_2D_2$ -5%  $N_2O$

Fig 3 IR spectra of product CHD=CHD

- 9 Hardy R W F, Holstm R D, Jackson et al The acetylene-ethylene assay for  $N_2$  fixation: laboratory and field evaluation *Plant Physiol*, 1968, 43: 1 185~ 1 207
- 10 黄静伟, 陈灿和, 张凤章等 氮结合在固氮酶M-簇笼内的一个可能证据 *高等学校化学学报*, 1996, 17: 760~ 763
- 11 Mozen M M, Burris R H. The incorporation of  $^{15}N$ -labelled nitrous oxide by nitrogen fixing agents *Biochim. Biophys Acta*, 1996, 17: 577~ 578
- 12 Hardy R W F, Knight J E. Reduction of  $N_2O$  by biological  $N_2$ -fixing system. *Biochem. Biophys Res Commun*, 1966, 23: 409~ 414
- 13 Jensen B B, Burris R H.  $N_2O$  as a substrate and as a competitive inhibitor of nitrogenase *Biochemistry*, 1983, 25: 1 083~ 1 088
- 14 Liang J H, Burris R H. Interactions among  $N_2$ ,  $N_2O$  and  $C_2H_2$  as substrates and inhibitors of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii* *Biochemistry*, 1988, 27: 6 726~ 6 732
- 15 Rivera-Ortiz J M, Burris R H. Interactions among substrates and inhibitors of nitrogenase *J. Bacteriol*, 1975, 123: 537~ 545
- 16 McKenna C E, McKenna M C, Huang C W. Low stereoselectivity in methylacetylene and cyclopropene reductions by nitrogenase *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 4 773~ 4 777

## A New Method Identifying the Binding Site of $N_2$ and $N_2O$ in Nitrogenase

Zhang Fengzhang<sup>1</sup> Huang Jingwei<sup>2</sup> Qiu Xuehe<sup>1</sup> Zeng Runying<sup>3</sup>  
Rong Minan<sup>1</sup> Zhang Hongtu<sup>2</sup> Xu Liangshu<sup>1</sup> Wan Huilin<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept of Biol, Xiamen Univ., <sup>2</sup>Dept of Chem., Xiamen Univ.,  
<sup>3</sup>The 3rd Inst of Ocean, SOA, Xiamen 361005)

**Abstract** The effects of  $N_2$  and  $N_2O$  on  $C_2D_2$  reduction activity and ratio of trans-/cis-1, 2-dideuteroethylene in products catalyzed by nitrogenase have been studied using GC and GC-FTIR measurements. The results showed that  $N_2$  or  $N_2O$  can inhibit the  $C_2D_2$  reduction, and result in the increase of the trans-/cis-ratio in  $CHD = CHD$ . The changes of the trans-/cis-ratio in 1, 2-dideuteroethylene are in line with the results from approximate calculations based on the hypothesis that the inhibition of  $C_2H_2$  reduction by  $N_2$  or  $N_2O$  takes place practically only inside the cage. The consistency between the experimental results and the approximate calculation supports the suggestions that  $N_2$  and  $N_2O$  bound to inside the cage and mainly inhibit the  $C_2D_2$  reduction inside the cage.

**Key words** Nitrogenase;  $C_2D_2$  reduction, Trans-/cis-1, 2-dideuteroethylene, Binding sites of  $N_2$  and  $N_2O$